



UNIVERSIDAD ARGENTINA DE LA EMPRESA
FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS EXACTAS

PROYECTO FINAL DE BIOTECNOLOGIA
Licenciatura en Biotecnología

**MINI SCREEN DE PROTEASAS QUE
REPERCUTEN EN LA RITMICIDAD
COMPORTAMENTAL DE *DROSOPHILA
MELANOGASTER***

Autor:

Nardelli, Manuel Agustín – LU1079594

Directora:

Herrero, Anastasia, Fundación Instituto Leloir

Codirectora:

Ceriani, M. Fernanda, Fundación Instituto Leloir

Lugar de trabajo:

Laboratorio de Genética del Comportamiento

Fundación Instituto Leloir

Buenos Aires, Agosto 2020

Índice

Índice	2
Resumen.....	5
Abstract	6
Introducción	8
Ritmos Circadianos	9
Propiedades de los relojes circadianos	9
<i>Drosophila melanogaster</i> y el estudio de los ritmos circadianos	10
¿Por qué <i>Drosophila melanogaster</i> ?	12
Estudio de los outputs del reloj.....	13
Red neuronal circadiana de <i>Drosophila</i>	15
PDF	16
Hipótesis	19
Metodología	20
Materiales y métodos	20
1. Líneas de <i>Drosophila</i> empleadas	20
1.1. Mantenimiento de stocks.....	20
1.2. Nomenclatura de <i>Drosophila</i>	20
1.3. Cromosomas balanceadores y generación de líneas	21
1.4. El sistema GAL4/UAS y el sistema GeneSwitch	22
1.5. Stocks utilizados	23
Análisis de la actividad locomotora.....	24
Análisis automatizado de la actividad locomotora.....	24
Análisis de la amplitud	26
¿Cómo determinar si una mosca es rítmica?.....	27
Réplicas biológicas de los experimentos.....	27
Análisis estadístico.....	28
Resultados	29
Rol de <i>amontillado</i> en el procesamiento de proPDF	30
Silenciamiento de <i>amontillado</i>	30
Sobreexpresión de <i>Amontillado</i>	34

Sobreexpresión de <i>Furina 1</i>	39
Silenciamiento <i>Furina 1</i>	42
Silenciamiento <i>Furina 2</i>	44
Discusión.....	47
Rol de Amontillado sobre la producción de PDF	47
Rol de <i>Furina 1</i> sobre el procesamiento de PDF	48
Rol de <i>Furina 2</i> sobre el procesamiento de PDF	Error! Bookmark not defined.
Bibliografía	50

Resumen

El neuropéptido PDF, por sus siglas en inglés PIGMENT DISPERSING FACTOR, tiene un rol central en el sistema nervioso de *Drosophila melanogaster*. Particularmente, se ha demostrado que su presencia es fundamental para el correcto funcionamiento de su reloj biológico. PDF está involucrado en la transferencia de la información circadiana, los cambios diarios de la conectividad de las neuronas que lo expresan. En ausencia de este neuropéptido, los animales presentan alteraciones notorias de la ritmicidad comportamental, observándose un patrón de comportamiento arrítmico. Se ha reportado que este péptido de 18 aminoácidos es generado a partir de una proteína más larga, denominada PAP (PDF associated peptide), la cual es clivada por una enzima con actividad proteolítica para generar el péptido final. Sin embargo, aún se desconoce la identidad de esta proteasa, por lo que su identificación sería de gran utilidad para entender la regulación de la disponibilidad de la forma activa de este péptido y así la regulación de la sincronización de la red circadiana de *Drosophila*.

A lo largo de este trabajo se llevaron a cabo experimentos para identificar potenciales proteasas capaces de procesar el pro-péptido PAP (proPDF). Para ello se realizó un screen acotado a través del silenciamiento de la expresión de estas proteasas candidatas a través de la expresión de ARN de interferencia específicos, como también se ha incrementado la expresión de estas proteasas a través del sistema de expresión binario UAS-Gal4. El impacto de esta desregulación se puso en evidencia en estudios de actividad locomotora en *Drosophila melanogaster*. En estos estudios se vio que la modulación de Furina 1 y Furina 2 generan cambios comportamentales.

Abstract

The neuropeptide PDF, PIGMENT DISPERSING FACTOR, is a molecule with a central role in the nervous system of *Drosophila melanogaster*. Particularly, it has been demonstrated that its presence is fundamental for the proper functioning of its circadian clock. PDF is involved in the transfer of circadian information, it orchestrates the daily changes in connectivity of the neurons expressing it. In the absence of this neuropeptide, animals exhibit notorious alterations of their behavioural rhythmicity, with a pattern of arrhythmic behaviour observed. It has been reported that this 18-amino acid peptide is generated from a longer protein, called PAP (PDF associated peptide), which is cleaved by an enzyme with proteolytic activity to generate the final peptide. However, the identity of this protease is yet unknown, so its identification would be of great interest to understand the regulation of the availability of the active form of this peptide, understanding more about the regulation of the circadian network.

Throughout this work experiments were conducted to identify potential proteases that can process the pro-peptide PAP (proPDF). To do this, a mini-screen was performed where the expression of these candidate proteases has been silenced through the expression of specific interference RNA's, and also the overexpression of these proteases through UAS-GAL4 binary system was evaluated. The impact of this dysregulation was achieved by experiments of locomotor activity in *Drosophila melanogaster*.

Introducción

Los ritmos circadianos (del latín *circa-* cerca de; *diem-* día) consisten en ciclos de aproximadamente 24 horas que se manifiestan a nivel molecular (es decir, en oscilación de los niveles de ARNm y de proteínas), fisiológico (ritmos de temperatura corporal, presión arterial, síntesis y secreción de hormonas) y comportamental (ritmos de actividad y descanso). Estos ritmos existen de manera ubicua en la naturaleza, desde cianobacterias a mamíferos (Young and Kay, 2001) y confieren una ventaja adaptativa al permitir a los organismos anticiparse tanto a los cambios diarios en las condiciones ambientales como acomodarse a las variaciones estacionarias del ambiente en el que viven (Ouyang *et al.*, 1998). De hecho, la consolidación de la actividad en un momento del día permite a las especies alimentarse y buscar refugio antes de la aparición de sus predadores o competidores; en insectos, la emergencia del pupario restringida a la mañana temprana evita el riesgo de desecación mientras esclerotizan su cutícula; los rituales de cortejo ocurren circadianamente, con momentos de mayor probabilidad de encuentro con individuos de la misma especie.

Estos ritmos están gobernados por un reloj endógeno que si bien es independiente del ambiente, se sincroniza mediante claves del entorno (*zeitgebers*, del alemán “dador de tiempo”), de los cuales los ciclos de luz: oscuridad y de temperatura son los más importantes.

En particular, *Drosophila melanogaster* posee comportamientos circadianos fácilmente identificables, como los ritmos en actividad locomotora y emergencia del pupario, que sirvieron de punto de partida para estudiar los mecanismos moleculares del reloj que los controla, así como la localización de las neuronas donde se aloja y la forma en que se sincroniza con el ambiente. Este insecto posee un comportamiento crepuscular, es decir que posee mayor actividad en las transiciones de luz-oscuridad (es decir, al amanecer y anochecer). Se ha observado que individuos de *Drosophila* aislados en condiciones de laboratorio tienen un patrón de comportamiento circadiano rítmico en ausencia de luz, la clave medioambiental de mayor relevancia para sincronizar el reloj interno. Durante el día la actividad decae, en un fenómeno que se denomina “siesta”, y es particularmente evidente en machos. Este patrón rítmico de actividad depende de la actividad de un conjunto de neuronas reloj (150), que comunican entre sí mediante neurotransmisores y neuromoduladores, entre ellos el neuropéptido PIGMENT DISPERSING FACTOR (PDF). Los animales que carecen

del neuropéptido PDF (mutantes *pdf01*) presentan arritmicidad comportamental en oscuridad constante (Park and Hall, 1998).

Ritmos Circadianos

Todos los organismos están constantemente expuestos a cambios cíclicos del ambiente en el que se encuentran. Dentro de los mismos, los cambios de 24 horas (circadianos), ya sean abióticos (luz y temperatura), o bióticos (interacciones sociales ya sea con la misma especie u otras) son los factores determinantes para su supervivencia y reproducción. Por eso, no es sorprendente que un reloj circadiano endógeno haya evolucionado para coordinar las actividades de un organismo con los ciclos de 24 horas de su medioambiente. La habilidad para anticipar dichos cambios tiene claras ventajas evolutivas (Beaver *et al.*, 2002; DeCoursey, Walker and Smith, 2000); (Michael *et al.*, 2003), las cuales están validadas por la existencia de relojes internos en todas las especies, ya sea por un simple cambio en las variables biológicas en especies más rudimentarias o un sistema complejo de retroalimentaciones en organismos superiores.

Propiedades de los relojes circadianos

Los relojes circadianos se caracterizan por cuatro propiedades fundamentales: en primer lugar, sus oscilaciones persisten en condiciones ambientales constantes, lo cual demuestra la existencia de un reloj autónomo. En segundo lugar, éstos son sincronizados diariamente a través de sincronizadores o dadores de tiempo (claves medioambientales, inputs), y se evidencian con un período de alrededor de 24hs aún en ausencia de estos dadores de tiempo. Así, estas señales ponen en hora a un oscilador central, quien controla las diferentes respuestas de salida (outputs), que permiten anticipar y preparar su fisiología a los cambios ambientales, siendo ésta la tercera propiedad (Figura 1). Y por último, los relojes tienen la capacidad de generar mecanismos de compensación a cambios de temperatura, para permitir que el período de las oscilaciones no se modifique al variar la misma dentro del rango fisiológico.

Entonces, el reloj está conceptualizado en 3 componentes: los inputs (rutas de entrada), el oscilador central y los outputs (rutas de salida) (Figura 1).

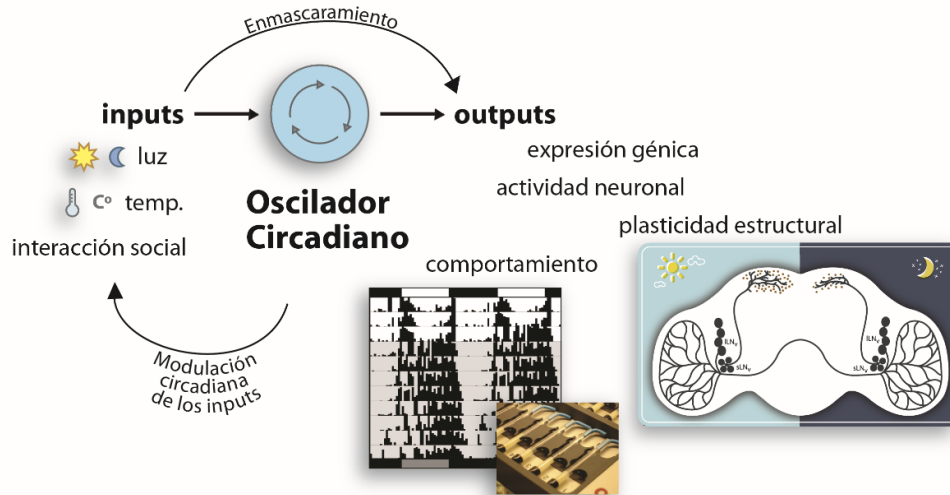


Figura 1: Mecanismos generales de los ritmos biológicos. Modificado de (Muraro, Pérez and Ceriani, 2013).

***Drosophila melanogaster* y el estudio de los ritmos circadianos**

En *Drosophila*, el principal input sincronizador es la luz, aunque también funcionan como dadores de tiempo los ciclos de temperatura (Glaser and Stanewsky, 2007). Por esa razón, la principal vía de entrada de la información al sistema circadiano consiste en estructuras fotorreceptoras de los ojos compuestos, los ocelos y dos estructuras extra retinales llamadas los ojuelos de Hofbauer-Buchner (H-B eyelets (Figura 6, página 14)). A su vez, la luz es percibida directamente en las células que contienen un oscilador a través del fotorpigmento criptocromo (CRY) y forman parte del oscilador central (Stanewsky *et al.*, 1998).

El oscilador central se encuentra en un grupo de neuronas del sistema nervioso que funciona como marcapasos, dirigiendo el ritmo interno del individuo y sincronizando la actividad de

osciladores periféricos de distintos tejidos (Reppert and Weaver, 2001); en *Drosophila*, la red circadiana comprende aproximadamente 150 neuronas. En estas neuronas los niveles de los genes que conforman la maquinaria del reloj oscilan a nivel de ARNm y proteína. Estas oscilaciones moleculares son las responsables de generar y mantener el periodo endógeno.

Los outputs generados y cómo éstos cambian es un campo de gran interés que aún debe ser estudiado. Estas vías de salida incluyen procesos biológicos de distintos grados de complejidad que van desde la regulación transcripcional de genes hasta la modulación de señales eléctricas, endócrinas y metabólicas que influyen en la fisiología de todo el organismo. El output circadiano más estudiado en *Drosophila* es la actividad locomotora (Figura 2).

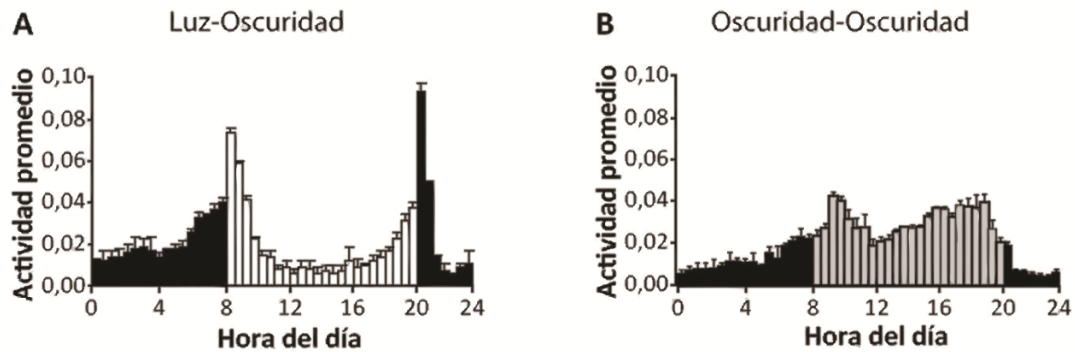


Figura 2: Patrón poblacional de la actividad locomotora de moscas macho silvestres (*wild type*). A. En presencia de ciclos de luz-oscuridad (LD, *light-dark*). Las moscas son animales crepusculares con dos picos de actividad, uno al amanecer y otro al atardecer, separados por una fase de baja actividad o siesta. Las barras negras y blancas representan períodos de oscuridad y luz respectivamente. B. En ausencia de claves ambientales (DD, *dark-dark*), el patrón comportamental es constante a lo largo del día subjetivo, con pequeños incrementos de actividad en torno al inicio del día y de la noche subjetiva. Las barras negras y grises representan períodos de noche y día subjetivos respectivamente. Día subjetivo: momento del día que correspondería a la fase de luz. Modificado de (Dubowy and Sehgal, 2017).

Para evidenciar el funcionamiento endógeno del reloj es necesario aislar al organismo de todas las claves medioambientales, es decir, dejarlo en condiciones de libre curso (oscuridad y temperatura constante). En este contexto, se evidencia un aumento de la actividad cuando se acerca el amanecer subjetivo, luego un periodo de actividad más o menos constante y después se vuelve a ver un aumento de la actividad como paso previo al comienzo de la noche subjetiva (Figura 1B).

Distintos *zeitgebers* (del alemán, dadores de tiempo) pueden sincronizar al oscilador (Figura 1). En condiciones normales, cuando los *zeitgebers* sincronizan al reloj molecular, se utiliza la denominación “*zeitgeber time*” (ZT) para referirse al tiempo pasado desde la última transición. Por ejemplo, ZT2 indica que pasaron 2 hs desde que la luz se prendió. De manera similar, en condiciones de libre curso se utiliza la denominación “*circadian time*” (CT) para referirse al tiempo transcurrido desde el momento en que debería haber ocurrido la transición. En este caso, CT2 indicaría que transcurrieron 2 hs desde que la luz debería haberse encendido, en caso de que el periodo endógeno sea similar a 24h.

¿Por qué *Drosophila melanogaster*?

Utilizar este organismo modelo tiene una innumerable cantidad de ventajas, entre las cuales se destacan:

- Su genoma está secuenciado (Adams *et al.*, 2000)
- El 75% de los genes involucrados en patologías humanas han sido identificados con sus homólogos de *Drosophila*. (Pandey and Nichols, 2011)
- Corto ciclo de vida: en 10 días se tiene descendencia a 25 °C.
- Fácil mantenimiento. Se pueden mantener de manera económica cientos de genotipos diferentes.
- Tienen cuatro cromosomas, lo que simplifica los cruzamientos genéticos.

Estudio de los outputs del reloj

Una de las funciones principales del reloj circadiano es lograr que cada proceso del organismo se lleve a cabo en una fase determinada del ciclo ambiental diario, favoreciendo así su adaptación al medio ambiente.

El patrón actividad locomotora se representa frecuentemente en gráficos denominados “actogramas” (Figura 3), donde las barras horizontales superiores representan los ciclos de luz/oscuridad de cada día. Comúnmente se grafican dos días consecutivos, y a continuación otros dos desfasados (día 1-2, debajo día 2-3, etc). Normalmente, dos días consecutivos son graficados de forma contigua para así obtener la llamada doble gráfica, o “*double-plot*”.

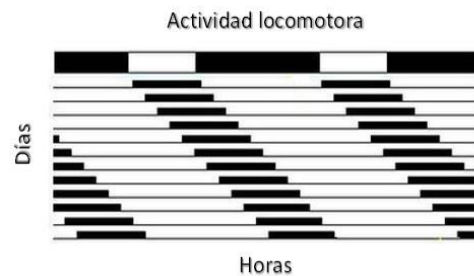


Figura 3: Actograma *double-plot* esquemático de un animal sometido a fotoperíodos cortos (LD 6:6). Modificado de (Jud *et al.*, 2005).

Este es un ejemplo de cómo se registra el patrón de ritmicidad en animales salvajes (Figura 4). Se genera un *double-plot* para mayor facilidad de interpretación, con cada día de registro mostrado de manera concatenada con el siguiente día, de tal manera que en la fila 1 se muestran los datos de los días 1 y 2, en la fila 2 los datos de los días 2 y 3, etc.

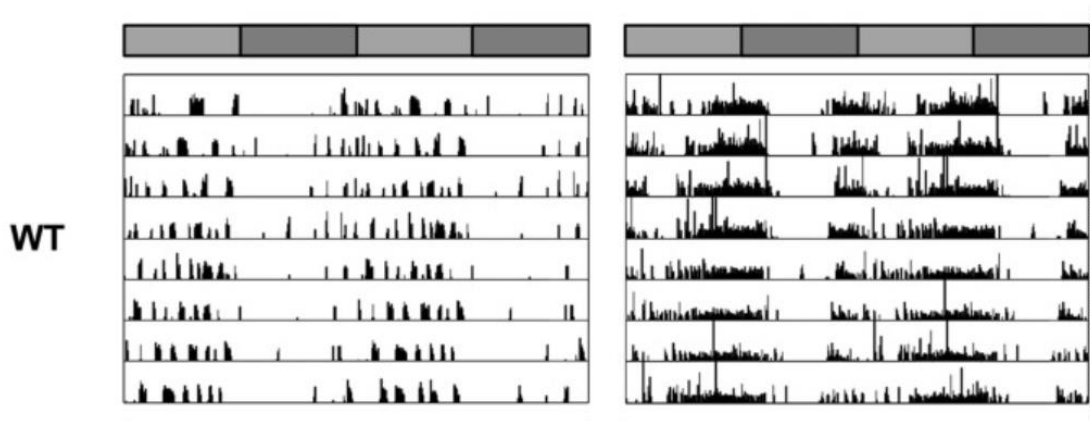


Figura 4: *double-plot* de dos actogramas de animales *wildtype*. Modificado de (Dubowy and Sehgal, 2017)

En ambientes con ciclos de luz/oscuridad (LD), el animal está sincronizado y su actividad comienza siempre a la misma hora y, por lo tanto, su período es de 24 horas. En condiciones constantes (libre curso), sin embargo, el período endógeno de los animales puede variar (Figura 5). En ausencia de un ciclo de luz/oscuridad que actúe como sincronizador, los animales comienzan a estar activos cada día un poco más tarde, o un poco más temprano, dependiendo de la presencia de una disfunción del reloj, manteniendo la fase de actividad según la hora que le indica su reloj biológico endógeno.

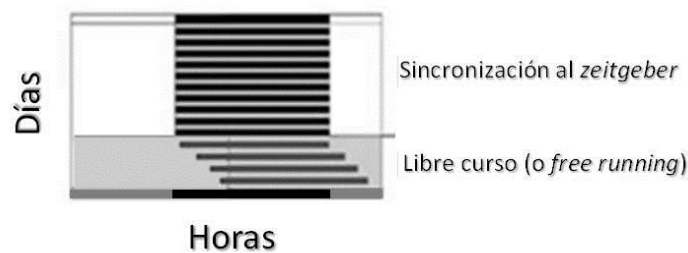


Figura 5: Esquema del registro de actividad locomotora de un animal nocturno en condiciones de laboratorio. Inicialmente sincronizado a un ciclo de luz/oscuridad de 24 hs (panel blanco superior), y bajo condiciones de oscuridad constante, el ritmo entra en libre curso con su período endógeno (panel gris inferior). En este caso, podemos ver como el ritmo de curso libre es mayor a 24 hs ya que se desfasa hacia la derecha, denominado periodo largo. Modificado de (Jud *et al.*, 2005).

Por más sorprendente e intrigante que sea la existencia de ritmos en libre curso, no debe olvidarse que la gran mayoría de las especies vive en ambientes cíclicos y la existencia de un reloj biológico sólo tendría sentido adaptativo si el ritmo endógeno pudiese ajustarse a los ciclos ambientales. Este ajuste ocurre gracias a la sensibilidad de la mayoría de los organismos a las alternancias del medio ambiente, y cada especie percibe y responde a las fases del ciclo ambiental más importante para su supervivencia. En presencia de *zeitgebers* el reloj biológico tiene su período y fase ajustados finamente al ciclo ambiental, en un proceso conocido como sincronización (PITTENDRIGH, 1960). Sea cual fuere el período en libre curso, la sincronización garantiza la vinculación del reloj biológico con los ciclos ambientales.

Red neuronal circadiana de *Drosophila*

En *Drosophila*, sólo aproximadamente 150 neuronas del cerebro expresan genes reloj (Kaneko and Hall, 2000). Estas neuronas reciben sus nombres en función de su posición en el mismo, su tamaño y su patrón de expresión génica.

Así se pueden encontrar dos grandes grupos, las neuronas laterales y las neuronas dorsales (LNs y DNs respectivamente, por sus siglas en inglés) (Figura 6). Las DNs se subdividen a su vez en tres subgrupos a cada lado del cerebro, DN1s (15 neuronas), DN2s (2 neuronas) y DN3s (40 neuronas). Por otro lado, las LNs están formadas por cuatro pequeños subgrupos, también ubicados a cada lado del cerebro. Estos subgrupos están conformados por 6 neuronas laterales dorsales, 5 neuronas laterales ventrales pequeñas y 4 neuronas laterales ventrales grandes (LNds, sLNvs y ILNvs respectivamente, por sus siglas en inglés). De las 5 sLNv, 4 expresan el neuropéptido Pigment Dispersing Factor (PDF), al igual que las ILNv; la restante sLNv es conocida como la quinta sLNv (5- sLNv) y no lo expresa (Figura 6). Los 6 tipos de neuronas reloj interactúan para producir ritmos comportamentales silvestres, sin embargo, los grupos de neuronas laterales (LN) evidencian ser las neuronas marcapasos con mayor relevancia para la actividad comportamental (Stoleru *et al.*, 2004).(Grima *et al.*, 2004)

Las neuronas laterales ventrales (LNvs) son necesarias y suficientes para la generación de ritmos robustos en adultos en ausencia de estímulos medioambientales externos (Ewer *et al.*,

1992) (Frisch *et al.*, 1994). La importancia de estas neuronas que expresan PDF para el comportamiento rítmico bajo condiciones externas constantes ha sido probada en varios estudios independientes (Kaneko, Helfrich-Förster and Hall, 1997; Renn *et al.*, 1999) (Blanchardon *et al.*, 2001).

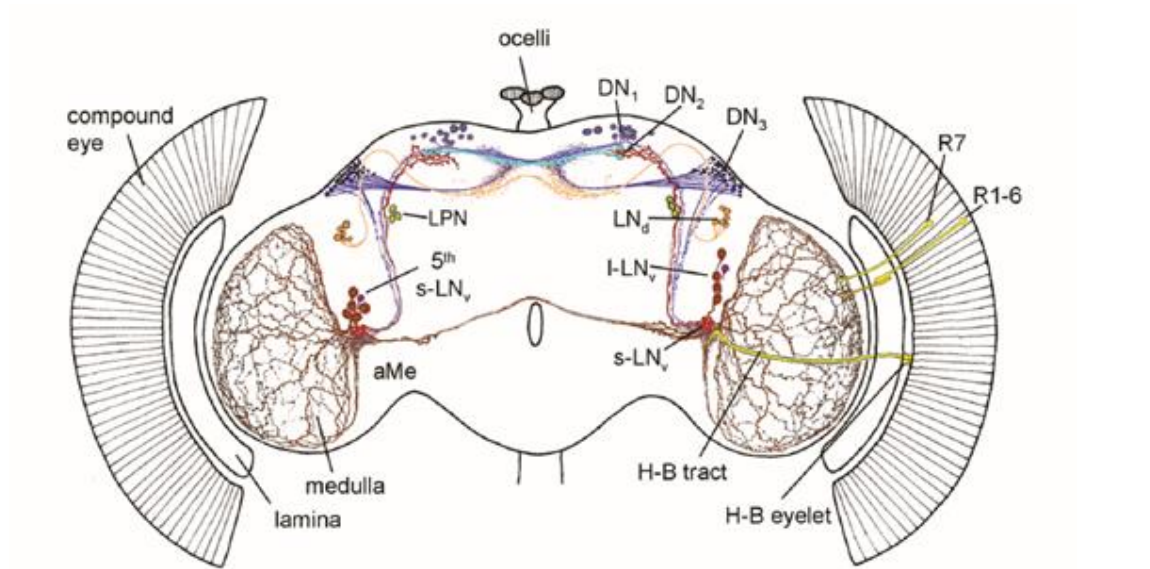


Figura 6: El circuito neuronal de *Drosophila melanogaster*. Grupos neuronales que expresan los genes del reloj. Además de las neuronas del circuito circadiano, el esquema representa las principales estructuras fotorreceptoras que transmiten la información lumínica al reloj endógeno (los rhabdomeros R7 y R1-6 del ojo compuesto, los ocelos, H-B eyelet y H-B tract). aMe es la médula accesoria, región donde se encuentran los somas de las LNv. PI: Pars Intercerebralis. Modificado de (Helfrich-Förster *et al.*, 2007).

PDF

PIGMENT DISPERSING FACTOR (PDF) es un neuropéptido de 18 aminoácidos proveniente de la familia de hormonas de dispersión de pigmento (PDH). El gen que lo codifica no posee intrones y está presente en una sola copia por genoma haploide (Park and Hall, 1998). Su precursor consiste en un péptido señal y un péptido asociado a PDF, llamado

PAP, seguido por la versión madura de PDF. PAP ha divergido a lo largo de la evolución comparado con sus ortólogos en crustáceos mientras que la estructura primaria del PDF maduro se encuentra altamente conservada en otros miembros de la familia PDH (Figura 7).



Figura 7: (A) Secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos del precursor de PDF. Las letras mayúsculas indican la secuencia de cDNA, un posible GC box, un TATA box y una señal de poliadenilación. Un posible péptido señal está indicado en cursiva. Aquellos aminoácidos que representan al PDF maduro se encuentran simbolizados en 3 letras. Los posibles sitios de corte proteolítico son RK y RKR. (B) Representación del propéptido antes de ser clivado. SP= Péptido Señal, PAP= péptido asociado a PDF. Modificado de (Park and Hall, 1998).

A pesar de expresarse sólo en las LNvs, PDF tiene un rol fundamental en el control del comportamiento y la fisiología, siendo el más estudiado en el reloj circadiano (Renn *et al.*, 1999).

Mutantes nulos de *pdf* (*pdf01*) muestran pérdida de la ritmicidad comportamental conforme avanzan el tiempo en condiciones de libre curso. Es característico de estos mutantes la pérdida del pico de actividad que anticipa la mañana y un pico de la actividad del anochecer adelantado en condiciones de luz/oscuridad (LD). Los mutantes *pdf01* también muestran un fenotipo de arritmicidad bajo condiciones constantes de oscuridad y temperatura (DD) indicando que la capacidad de producir ritmos circadianos endógenos está comprometida por la falta de PDF (Renn *et al.*, 1999).

Hipótesis

PDF es una molécula clave para la sincronización de la red circadiana, por lo tanto, indispensable para generar patrones comportamentales rítmicos. Teniendo como base estudios previos llevados a cabo en el laboratorio de genética del comportamiento, donde se estudia la comunicación en dicha red, es fundamental entender de qué manera se produce y regula la disponibilidad de PDF. Para comprender la dinámica del neuropéptido PDF, y particularmente, como aumentan sus niveles por la mañana para luego disminuir a la noche, esta tesis se enfocó en la posibilidad de que sea en el procesamiento del neuropéptido uno de los mecanismos que definen dicha oscilación.

El objetivo puntual de esta tesis es identificar una proteasa capaz de clivar el propéptido de PDF, generando el péptido funcional en las LNvs. Para lograrlo, se realizó una búsqueda en la base de datos de *Drosophila melanogaster* de proteasas que reconocieran como sitio de corte a RKR, para así ser seleccionadas como potenciales candidatas para el relevamiento genético acotado. Específicamente, las proteasas elegidas para el análisis fueron: *amontillado*, *furina 1* y *furina 2*.

La hipótesis que se plantea en este trabajo es:

- Al modular mediante la expresión de un ARN de interferencia específico los niveles de expresión de aquella proteasa capaz de procesar el precursor de PDF para generar el neuropéptido funcional, se observarán fenotipos en el patrón de actividad locomotora; de impedirse completamente esta etapa de procesamiento, el fenotipo obtenido debería ser comparable con un mutante nulo de PDF, dejando así en evidencia la identificación de la proteasa relevante.

Metodología

Materiales y métodos

1. Líneas de *Drosophila* empleadas

1.1. Mantenimiento de stocks

Se utilizaron dos sistemas distintos para el criado y mantenimiento de las moscas. Los cruzamientos y el mantenimiento de los stocks se realizaron en viales de plástico de 2 cm de diámetro y 10 cm de altura conteniendo medio de cultivo a base de polenta, sacarosa, agar, levadura, nipagín y ácido propiónico. Para el criado a mayor escala se utilizaron botellas de plástico de 250 ml (Genesee Scientific) con aproximadamente 50 ml del mismo medio de cultivo.

Los stocks y las botellas para la recolección de moscas fueron mantenidos en un cuarto a 18 °C. El laboratorio cuenta también con 8 incubadoras que permiten controlar las condiciones de luz, temperatura y humedad. Los cruzamientos fueron mantenidos en estas incubadoras a 25 °C y en ciclos de 12 horas de luz y 12 de oscuridad.

Para seleccionar individuos según sexo, presencia o ausencia de cromosomas balanceadores, color de ojos, etc., las moscas se observaron bajo la lupa sobre una plataforma porosa a través de la cual se filtra CO₂, que en *Drosophila* tiene efecto anestésico. Los cruzamientos normalmente consistieron en 3 hembras por cada 2 machos. En la mayoría de los casos se agregó una pequeña cantidad de levadura en polvo a cada vial para optimizar la ovipuesta.

1.2. Nomenclatura de *Drosophila*

Drosophila es un organismo diploide que cuenta con un par de cromosomas sexuales (el par 1 que es, XX en hembras y XY en machos) y 3 autosomas (el par 2, 3 y 4). El cromosoma Y suele presentar estructura heterocromática por lo que no expresa muchos genes. De los 3 autosomas, el cuarto es muy pequeño, contiene muy pocos genes y por eso muchas veces es ignorado.

En *Drosophila* el genotipo de cada mosca se escribe de una manera estandarizada. El detalle de cada cromosoma se separa con punto y comas “;” y de izquierda a derecha se nombra desde el par 1 al 4. Cromosomas homólogos se separan por una barra inclinada / y los cromosomas que corresponden a cada parental se colocan ordenados hacia la izquierda y la derecha de dicha barra. Si el genotipo de un cromosoma es el mismo para ambos parentales, se lo indica sólo una vez sin poner la barra. Por otra parte, si el genotipo para un cromosoma es salvaje se indica con un +. Si el genotipo de los pares de cromosomas “hacia los extremos” es salvaje no se indica en el genotipo para resumir. A continuación, se presenta un ejemplo de genotipo extendido y resumido.

Cromosoma				
X	II	III	IV	
+/+;	<i>pdf</i> - GAL4/ <i>pdf</i> - GAL4;	UAS- <i>fur</i> ^{ARNi} /UAS- <i>fur</i> ^{ARNi} ;	+/+	Genotipo extendido
<i>pdf</i> -GAL4;UAS- <i>fur</i> ^{ARNi}				Genotipo resumido

Tabla 1: Diferentes formas de escribir los genotipos en *Drosophila melanogaster*.

A su vez, cuando se quiere indicar más de un gen o transgen en un mismo cromosoma se indica separando con una coma. En el ejemplo presentado a continuación los transgenes *pdf*-GAL4 y UAS-*fur*^{ARNi} se encuentran en el mismo cromosoma (II del mismo parental) mientras que el transgen UAS-*clk* se encuentra en el par homólogo (II pero del otro parental):

pdf-GAL4,UAS-*fur*^{ARNi}/UAS-*clk*

Por último, los genes se escriben en minúscula e itálica (*gen*) mientras que las proteínas se indican en mayúscula y letra regular (PROTEÍNA).

1.3. Cromosomas balanceadores y generación de líneas

Una de las herramientas más útiles del repertorio disponible para el análisis mediante enfoques genéticos de *Drosophila* son los cromosomas balanceadores, ya que impiden la pérdida de mutaciones de interés por recombinación y facilitan la combinación de elementos transponibles. Están formados por múltiples inversiones, lo que determina que en caso de que

haya una recombinación homóloga, el individuo resultante sea inviable. Suelen contar además con mutaciones que les atribuyen marcadores fenotípicos dominantes facilitando el análisis de segregación en la progenie. Además, en general poseen mutaciones letales recesivas, lo que impide que en la progenie se obtengan individuos homocigotas para el balanceador. La ventaja de esto es que permite la construcción y el mantenimiento de líneas que portan mutaciones letales en homocigocis. En el transcurso de esta tesis se utilizaron los cromosomas balanceadores CyO (II), SM6(II), TM3 (III) y TM6b (III). Además, la línea DB (double balancer), que posee los balanceadores CyO y TM3 sobre un marcador denominado ES, que es una traslocación entre el segundo y tercer cromosoma.

Gracias a dichos cromosomas balanceadores es posible combinar fácilmente mutaciones que están en distintos cromosomas (generando líneas denominadas comúnmente “dobles homocigotas”). Por otra parte, también es posible combinar mutaciones que se encuentren en el mismo cromosoma (generando “líneas recombinantes”).

1.4. El sistema GAL4/UAS y el sistema GeneSwitch

El sistema heterólogo proveniente de levadura UAS-GAL4 es una herramienta muy útil para dirigir la expresión de un gen de interés en un tejido determinado (Brand and Perrimon, 1993). La base de este sistema es el reconocimiento específico del factor de transcripción GAL4 por la secuencia UAS (Upstream Activating Sequence). Una línea que expresa GAL4 bajo un promotor específico de tejido (Promotor), denominada línea inductora, se cruza por otra que expresa un gen de interés X bajo la secuencia UAS (línea UAS-genX); entre la progenie, sólo en aquellos individuos que posean ambas construcciones se expresará el gen X bajo el promotor específico deseado (Figura 8).

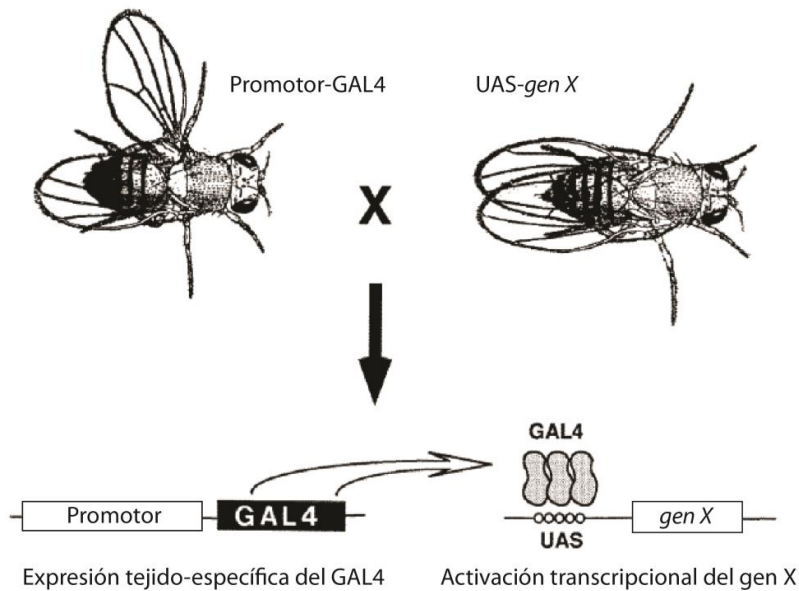


Figura 8: Esquema del funcionamiento del sistema heterólogo UAS-GAL4. Dos líneas transgénicas, una portando una construcción que alberga el promotor específico deseado controlando la expresión del factor de transcripción GAL4, y otra cuya construcción porta la secuencia UAS controlando el gen X, se cruzan para obtener en la progenie moscas que expresen el gen X en el patrón espacial y temporal del promotor utilizado. Modificado de (Brand and Perrimon, 1993).

1.5. Stocks utilizados

Genotipo	Procedencia	Cromosoma
Líneas controles y Balanceadoras		
<i>w¹¹¹⁸</i>	Bloomington Stock Center	
<i>dB: y+;CyO;TM3/ES</i>	Generada en el laboratorio	
Líneas inductoras		
<i>pdf-GAL4;Dicer2</i>	# 6899 Bloomington Stock Center	II
Líneas UAS		
<i>UAS-amon</i>	#29007 Bloomington Stock Center	III
<i>UAS-amon</i>	#29008 Bloomington Stock Center	II
<i>UAS-fur1</i>	#63077 Bloomington Stock Center	III

Lineas ARNi		
<i>amon</i> ^{ARNi}	#28583 Bloomington Stock Center	III
<i>amon</i> ^{ARNi}	#29009 Bloomington Stock Center	III
<i>fur1</i> ^{ARNi}	#25837 Bloomington Stock Center	III
<i>fur1</i> ^{ARNi}	#41914 Bloomington Stock Center	III
<i>fur2</i> ^{ARNi}	#42577 Bloomington Stock Center	II
<i>fur2</i> ^{ARNi}	#25959 Bloomington Stock Center	III

Tabla 2: Líneas de moscas utilizadas en el transcurso de esta tesis. Se detalla también la procedencia y el cromosoma en donde se encuentra la inserción del transgen. Cuando se indica más de un cromosoma es porque se utilizaron líneas con inserciones en uno y otro cromosoma

Análisis de la actividad locomotora

Análisis automatizado de la actividad locomotora

El monitoreo de la actividad locomotora se realizó colocando machos individuales en tubos de 0,5 cm de diámetro y ~6 cm de largo en uno de cuyos extremos contiene alimento. Se cuenta con monitores con capacidad para 32 tubos (Trikinetics, Waltham, MA); cada posición está flanqueada por un haz de luz infrarroja imperceptible para las moscas. Cada vez que una mosca interrumpe el haz de luz se registra un dato de actividad. La actividad locomotora (número de veces que la mosca interrumpió el haz) se registró cada 1 minuto durante todo el experimento obteniéndose un registro diario de cada individuo a lo largo del experimento (alrededor de 12 días). Dicha información fue luego importada a un programa de análisis (Clocklab, Actimetrics, IL) en el cual se visualiza la actividad a lo largo de los días en forma de actograma. Los experimentos consistieron en un entrenamiento de 3-4 días en incubadoras con condiciones controladas de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad (fase de LD) a 25 °C, y luego se los dejó en condiciones de oscuridad constante por al menos 9 días más (fase de DD) (Figura 9).

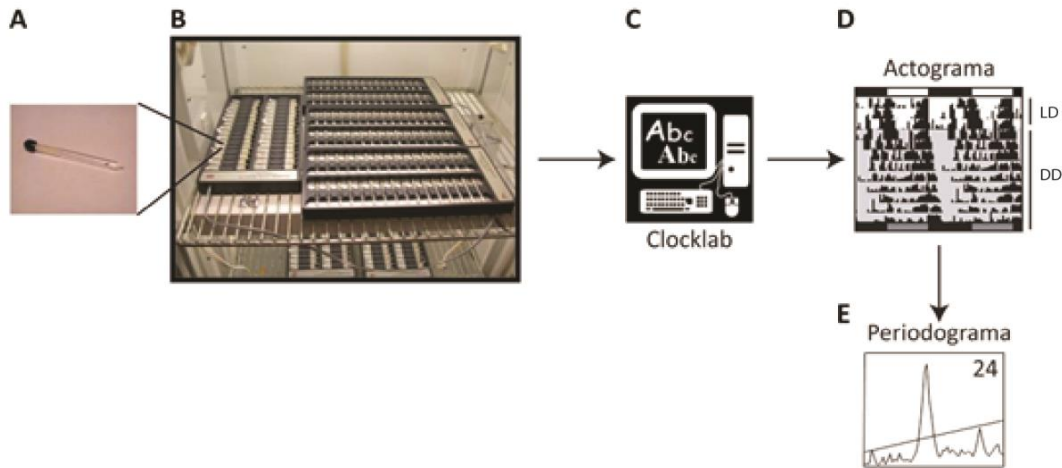


Figura 9: Esquema del proceso de adquisición de datos para los experimentos de actividad locomotora. A. Tubos donde se cargan las moscas individuales. B. Monitores de actividad locomotora dentro de una incubadora que controla la temperatura y las condiciones de luz y oscuridad. C. Procesamiento de los datos con el software Clocklab. D. Obtención de los actogramas de actividad individual. LD: ciclos de 12 hs de luz (barras claras) y 12 de oscuridad (barras oscuras). DD: oscuridad constante. Las barras grises en la fase de DD representan el día subjetivo. El fondo gris indica los días en DD. E. Periodograma obtenido por análisis de Chi cuadrado con el software Clocklab.

El periodo de actividad de cada mosca se analizó en la fase de DD utilizando el mismo programa de análisis realizando un Chi-cuadrado con una significancia de 0,05 (Sokolove and Bushell, 1978).

El periodograma es un gráfico de la estimación del poder rítmico como función del periodo de prueba (para este experimento usamos valores entre 18 y 30 horas). Los parámetros principales del análisis del periodograma obtenido después de tratar la información cruda son el periodo de las moscas rítmicas (el periodo que corresponde al pico significativo más alto del periodograma) y su poder (que indica la robustez de la ritmicidad). El valor de poder está dado por la altura del pico del periodograma el cual es elegido para el análisis de chi cuadrado. Otros parámetros que otorga el periodograma son el ancho y la complejidad del pico. Múltiples picos pasando el límite de significancia indican una ritmicidad más compleja, es decir, que curvas con distinto periodo pueden ajustarse a la serie temporal. Según el

periodograma obtenido los individuos se clasifican como rítmicos, débilmente rítmicos o arrítmicos (Figura 10).

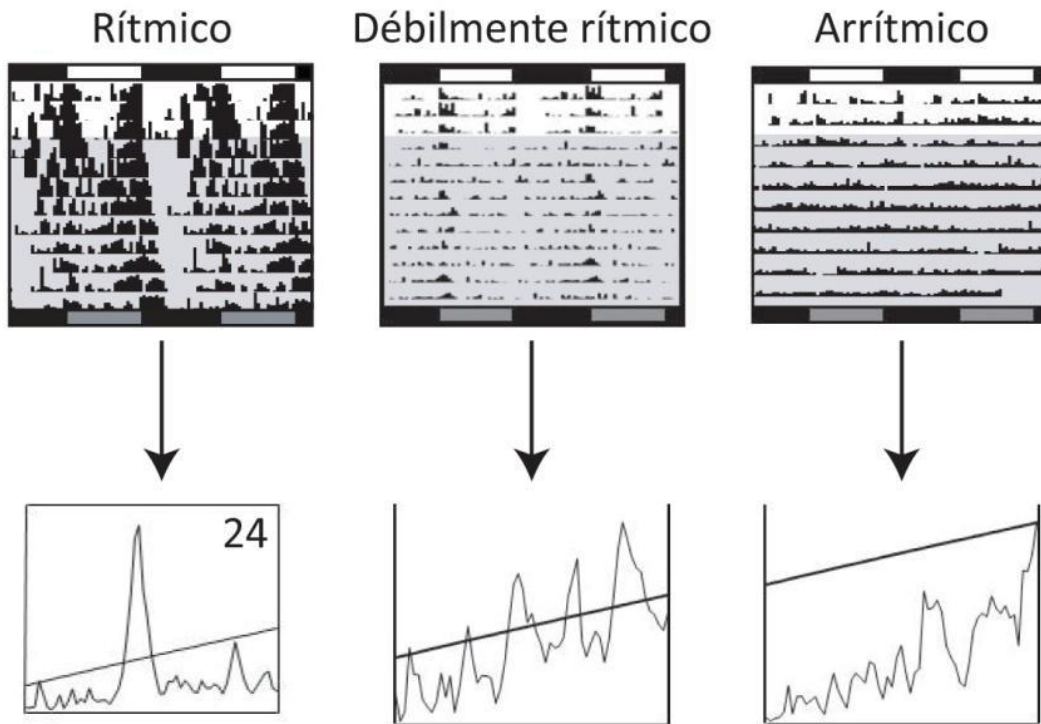


Figura 10: Actogramas (arriba) y periodogramas (abajo) representativos de moscas rítmicas, débilmente rítmicas y arrítmicas. En el caso de los rítmicos, los datos ajustan a una función con un único periodo dentro de un rango esperado (18 a 30 horas). En los débilmente rítmicos el periodo encontrado apenas pasa la línea de significancia o bien varios picos la atraviesan. Los arrítmicos corresponden a individuos donde el programa no identifica periodicidad alguna o lo hace en rangos fuera de lo esperado

Análisis de la amplitud

La amplitud de un ritmo locomotor puede referirse a la diferencia en actividad entre los picos y valles. La medición de la amplitud puede ofrecer una impresión cualitativa de la robustez del reloj interno. Por eso, se utiliza este output como fuente de información sobre la ritmicidad de los individuos.

¿Cómo determinar si una mosca es rítmica?

El primer parámetro que se considera es el poder de los ajustes, es decir, el pico por encima de la línea de significancia. Aquellas moscas que no alcancen esta línea son consideradas arrítmicas. En el eje de las ordenadas se encuentra la amplitud, en el de las abscisas, el período. Un período circadiano ronda las 24 horas (como su nombre lo indica).

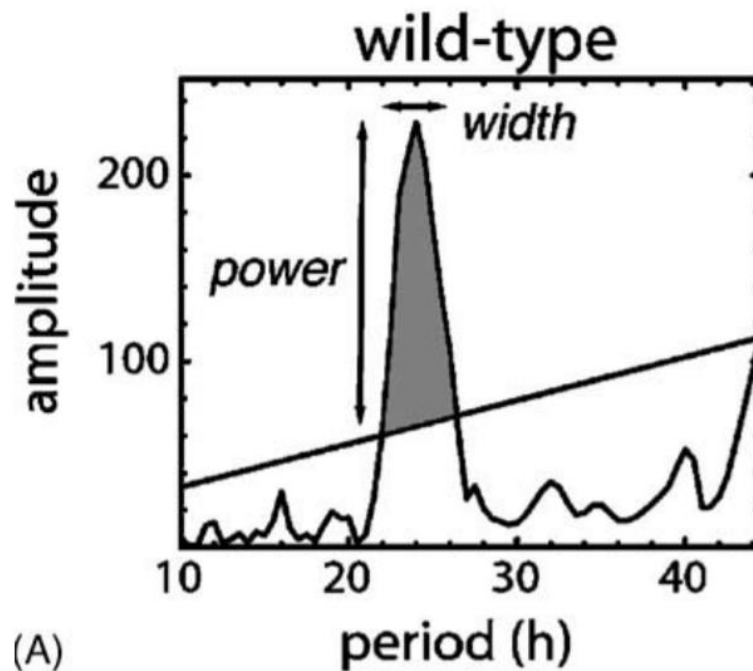


Figura 11: Periodograma representativo de un individuo *wild-type*. Extraído de (Klarsfeld, Leloup and Rouyer, 2003)

Para obtener una estimación más “cuantitativa” de la ritmicidad de cada animal se estima el área bajo la curva, que se calcula restando el valor de “power” a la significancia (ambos parámetros calculados por el programa de análisis Clocklab). Esto permite hacer comparaciones entre los individuos del mismo y de diferentes genotipos.

Réplicas biológicas de los experimentos

Para el análisis de ritmicidad de los genotipos donde se desregularon los niveles de *amontillado* se realizaron 3 experimentos de actividad locomotora independientes; para los

genotipos donde se evaluó el rol de las *furinas* sólo se realizaron 2 por falta de tiempo para generar un tercer experimento de actividad locomotora. La determinación del periodo se realizó para cada mosca individual y se consideró el promedio por condición en cada experimento.

Análisis estadístico

El análisis estadístico de todos los experimentos presentados en esta tesis se realizó con el programa Graphpad Prism. Se utilizó un ANOVA de una vía para comparar las diferencias entre los tratamientos y para saber si diferían significativamente.

Para todos los experimentos los individuos estudiados fueron seleccionados al azar de una población mayor (vial con la progenie del cruzamiento). En cada cruzamiento las moscas provinieron de los mismos parentales y estuvieron en las mismas condiciones de cría por lo que no se consideraron completamente independientes. Por eso mismo, en todos los experimentos las mediciones en moscas de un mismo cruzamiento se consideraron pseudoréplicas y se utilizaron para estimar mejor la variable a analizar. En ese sentido, la unidad experimental fue en todos los casos la totalidad de la progenie de cada cruzamiento. En todos los experimentos se descartaron valores "outliers" que se desviaban más de 2 veces de la media.

En todos los análisis, grupos experimentales con letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas, con un $p < 0.05$.

Resultados

Drosophila melanogaster tiene actividad crepuscular que implica que tiene mayor grado de actividad cerca de las transiciones, es decir, cerca del amanecer y del atardecer. Este comportamiento se caracteriza por un aumento paulatino de la actividad aún en condiciones previas a la aparición y desaparición de la luz, y una actividad muy pronunciada que rápidamente decae cuando ocurre dicha transición. Los animales *wild-type* presentan el comportamiento recientemente descrito; sin embargo, los animales que carecen del neuropéptido PDF se desincronizan progresivamente. Dada la gran importancia que tiene esta molécula en la regulación del comportamiento, se propuso estudiar su procesamiento específicamente observando su efecto sobre el perfil de la actividad locomotora rítmica. En otras palabras, se utilizó el comportamiento como un registro de los niveles circulantes de neuropéptido, ya que hay evidencia que demuestra que la disminución de los niveles de PDF genera fenotipos arrítmicos. Ya se ha mencionado el caso de las mutantes *pdf01*, donde la ausencia de PDF resulta en una pérdida de la anticipación del pico de actividad de la mañana y en aumentos del nivel de arritmicidad significativos en condiciones de libre curso en oscuridad constante (Renn *et al.*, 1999). El enfoque seleccionado fue generar una desregulación crónica exclusivamente en las neuronas reloj, sobreexpresando y silenciando los niveles de las distintas proteasas para identificar si alguna de ellas es responsable del procesamiento de PDF.

Primero se elaboró una lista de proteasas candidatas a partir de la base de datos del genoma de *Drosophila*, seleccionando aquellas que tuviesen sitios de corte correspondiente al RKR que es donde el propéptido de PDF es clivado (Park and Hall, 1998). Se seleccionaron AMONTILLADO, FURINA-1 y FURINA-2 como posibles proteasas relevantes para el clivaje del neuropéptido. Luego, se utilizó el sistema Gal4/UAS para alterar estas proteasas exclusivamente en las LNvs (bajo el control del promotor del neuropéptido PDF, a través de la línea *pdf-Gal4*). Se analizaron los patrones de actividad locomotora de animales en los cuales se había alterado los niveles de estas proteasas a través del silenciamiento mediado por la expresión de uno (o varios) ARN de interferencia (ARNi) específico para cada una de ellas. De acuerdo con la hipótesis planteada, al disminuir los niveles de la proteasa relevante para el procesamiento de PDF, deberían disminuir los niveles del neuropéptido a causa de un clivaje ineficiente. Para obtener información complementaria se evaluó el impacto de la

sobreexpresión constitutiva de dichas proteasas, teniendo en cuenta que la sobreexpresión puede dar lugar a un fenotipo espurio en caso de que se introduzca una proteasa en un contexto celular donde esta no se encuentra habitualmente.

Rol de *amontillado* en el procesamiento de proPDF

Silenciamiento de *amontillado*

Para el experimento que se muestra a continuación, se utilizaron dos ARNs de interferencia provenientes del centro repositor *Bloomington Stock Center*, cada uno dirigido a una secuencia distinta de *amon*. Se utilizó como control la línea *driver pdf-Gal4* en heterocigosis (resultado de la cruce con w^{1118}), el cual no se espera que genere fenotipo de arritmicidad. Las otras líneas control son las empleadas para disminuir los niveles de *amon* en ausencia de la línea *driver* (sin el Gal4), en heterocigosis. Esta es la forma de corroborar que el constructo en sí no afecta el comportamiento de las moscas *per se*, y que cualquier desviación del perfil comportamental esperado es producto de la desregulación a evaluar.

En la figura 12 se muestra el resultado del silenciamiento de la proteasa Amontillado; el experimento fue repetido 3 veces en forma independiente.

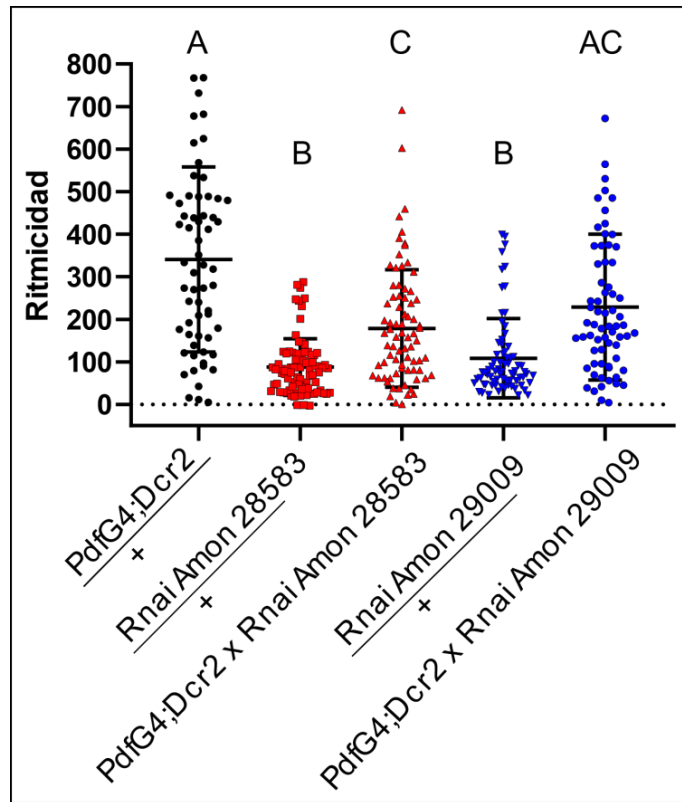


Figura 12: El gráfico representa la ritmicidad comportamental de los distintos genotipos analizados evaluando la contribución de AMON. Se realizaron 3 réplicas biológicas (N=3) de 32 individuos (n) por réplica. La prueba estadística utilizada fue una prueba de Kruskal Wallis con una comparación múltiple de Dunn. Las letras por encima de las columnas de datos indican con cuales otras columnas difieren significativamente ($p \leq 0,05$). La misma letra indica diferencias no significativas.

A continuación se muestra un actograma representativo de cada una de las líneas analizadas (Figura 13).

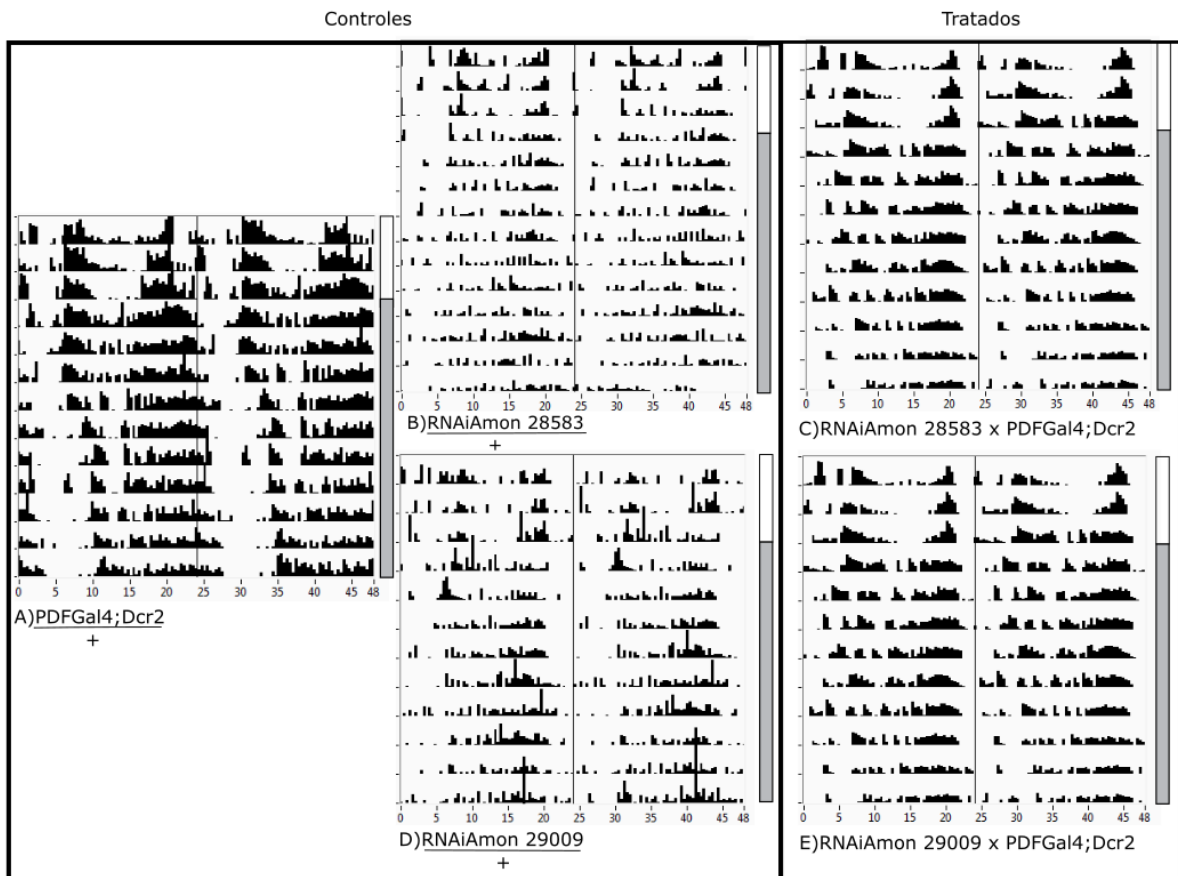


Figura 13: Actogramas representativos de los experimentos de silenciamiento de Amontillado. Cada actograma corresponde a un individuo representativo del genotipo indicado. Las barras en blanco representan el tiempo del individuo en LD (3 días) y las barras grises en DD.

Los resultados obtenidos no permitieron contrastar la hipótesis planteada. Al observarse una diferencia significativa entre la ritmicidad de las líneas parentales (control), *pdf-G4* y *amon^{ARNi} #28583*, no pudo concluirse acerca del efecto del genotipo que es producto de la cruce de ambos controles dado que algo propio de la línea de *amon^{ARNi} #28583* altera la ritmicidad; una posibilidad es que la inserción del constructo interfiera con la expresión de algún gen relevante para el control del comportamiento, o se trate de la acumulación de mutaciones silenciosas propias de esa línea.

Algo similar ocurre con el otro ARNi utilizado. El control de *amon*^{ARNi} #29009 al cruzarse por *w*¹¹¹⁸ genera arritmicidad *per se* y es significativamente diferente al control *pdf-Gal4* x *W*, razón por la cual no se pueden sacar conclusiones sobre la línea que es producto de la cruce entre estos dos controles.

Para un mejor análisis e interpretación de los resultados obtenidos, se realizaron 3 gráficos independientes de cada una de las 3 réplicas biológicas de los controles en heterocigosis *pdf-Gal4* (x *w*), *amon*^{ARNi} #28583 (x *w*) y *amon*^{ARNi} #29009 (x *w*) para evaluar si en alguna de ellas se encuentran patrones que no son similares a las otras dos, evidenciando un error en la generación o en la manipulación de las cruza para dicho experimento.

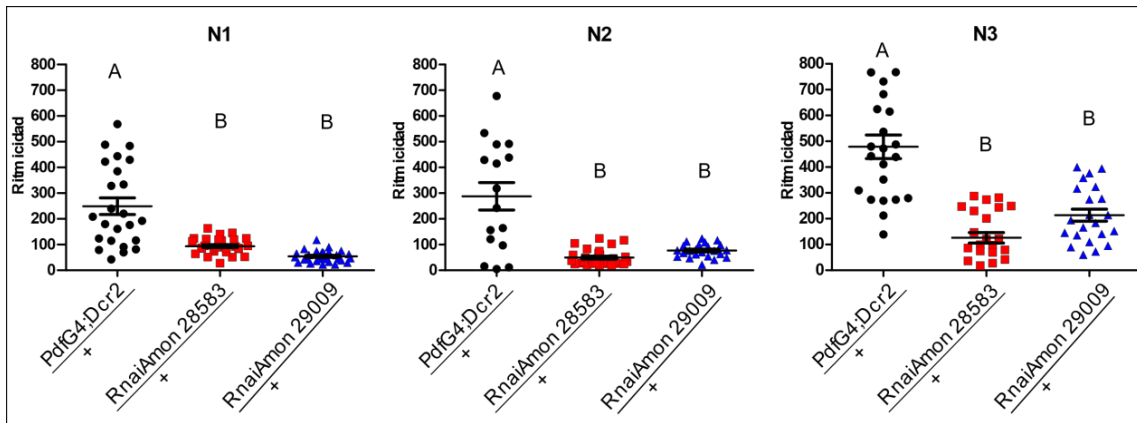


Figura 14: Controles del experimento de silenciamiento de *amontillado*.

Al analizar independientemente cada experimento se puso en evidencia que todos muestran una tendencia similar. Sin embargo, en una de las repeticiones (el n =3) hay una mayor dispersión de los datos, que no alcanza para explicar la diferencia descripta previamente.

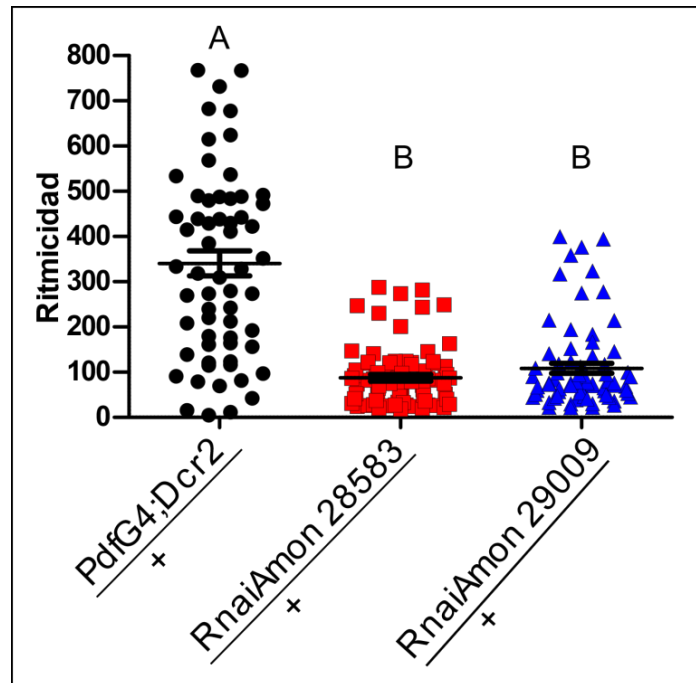


Figura 15: Controles del experimento de silenciamiento de *Amontillado* analizados en conjunto.

Sobreexpresión de *Amontillado*

Para el siguiente experimento se usaron las herramientas de sobreexpresión UAS-amon²⁹⁰⁰⁷ y UAS-amon²⁹⁰⁰⁸, las cuales provienen del centro repositor Bloomington Stock Center, cada uno de los cuales conformados por diferentes constructos. Nuevamente, se utilizó como controles la línea *pdf-Gal4* heterocigota (*x w¹¹¹⁸*), el cual no genera fenotipo de arritmicidad, así como las líneas UAS-*amon* 1 y 2 (también en heterocigosis). Tal como se mencionó anteriormente la comparación con los controles de *background* genético permite descartar que las construcciones *per se* afectan la organización temporal de la actividad locomotora, y que es la activación mediada por *pdf-Gal4* lo que genera expresión del gen de interés y el fenotipo observado.

Cabe mencionar que el control *pdf-Gal4* utilizado en el experimento de silenciamiento es el mismo que aquel utilizado en el experimento de sobreexpresión. Los experimentos se

muestran separadamente para facilitar la visualización y discusión de los resultados (Figura 16).

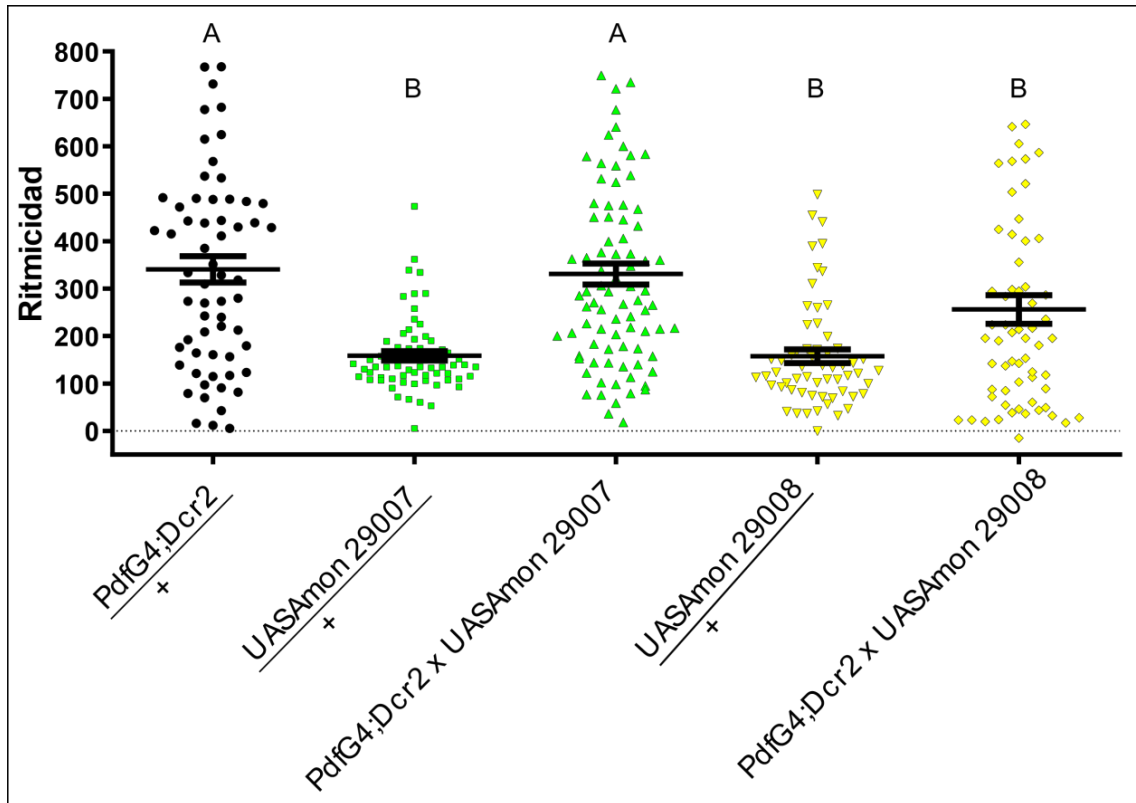


Figura 16: Gráfico donde se representa la ritmicidad comportamental de los distintos genotipos analizados en experimentos de actividad locomotora para la sobreexpresión de *Amontillado*. Se realizaron 3 réplicas biológicas (N=3) de 32 individuos (n) por réplica. La prueba estadística utilizada fue una prueba de Kruskal Wallis con una comparación múltiple de Dunn. Las letras por encima de las columnas de datos indican con que otras columnas difieren significativamente ($p \leq 0,05$). La misma letra indica diferencias no significativas.

En la Figura 17 se muestran un actograma representativo de cada uno de los genotipos analizados. La inspección visual de los mismos muestra que la línea UAS-amon²⁹⁰⁰⁸ el patrón de actividad está muy desconsolidado.

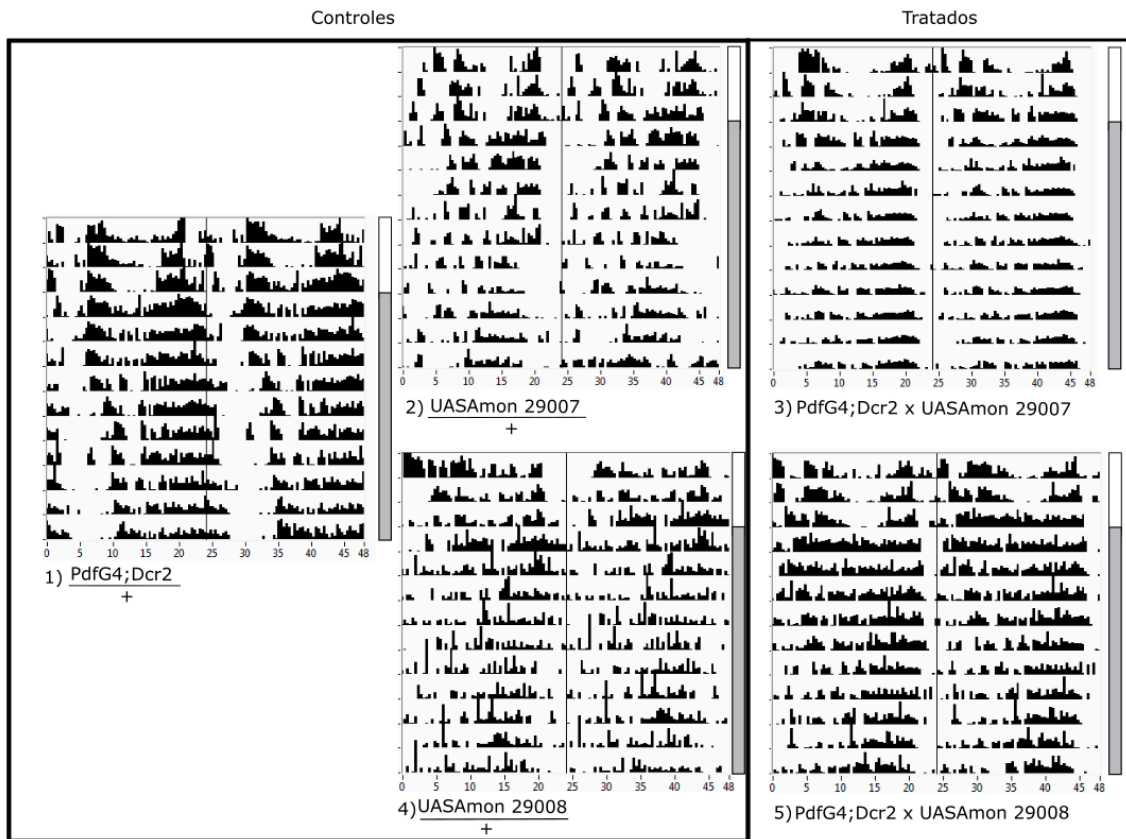


Figura 17: Actogramas representativos de los genotipos de sobreexpresión de *Amontillado*.

Cada actograma corresponde a un individuo representativo del genotipo indicado. Las barras en blanco representan el tiempo del individuo en LD (3 días) y las barras grises en DD.

Al analizar los resultados se observa una situación similar a la del silenciamiento de *Amontillado*. De la misma forma en la que en el experimento de silenciamiento los controles de los ARNi heterocigota ($x w^{1118}$) mostraron patrones de una ritmicidad significativamente menor a la del control de *pdf-Gal4* heterocigota ($x w^{1118}$), los controles de las herramientas de sobreexpresión también mostraron desconsolidación del patrón de actividad, lo cual impide evaluar el impacto de modificar los niveles de *Amon* sobre la actividad locomotora rítmica.

Nuevamente, para una interpretación más clara de los resultados, se realizó un análisis de las 3 réplicas biológicas de forma independiente, para observar si alguna en particular afectaba el resultado obtenido (Figura 18).

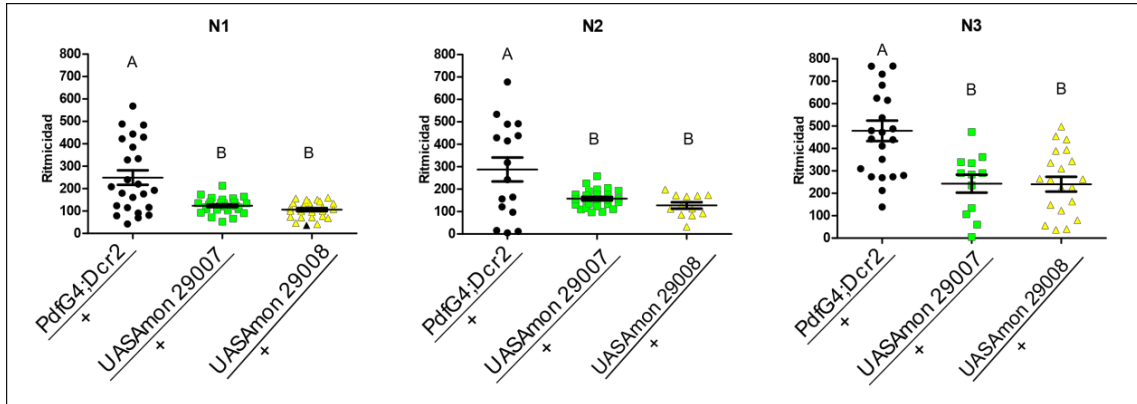


Figura 18: Análisis independiente de los controles de los experimentos de sobreexpresión de Amontillado.

Al igual que con el experimento de silenciamiento de *Amontillado*, el análisis independiente de los controles de los tres experimentos muestra que, aunque en la tercera réplica (N3) se encuentren más dispersos los datos del fenotipo control de UAS-AMON y del fenotipo tratado, se puede observar que todas las réplicas muestran la misma tendencia.

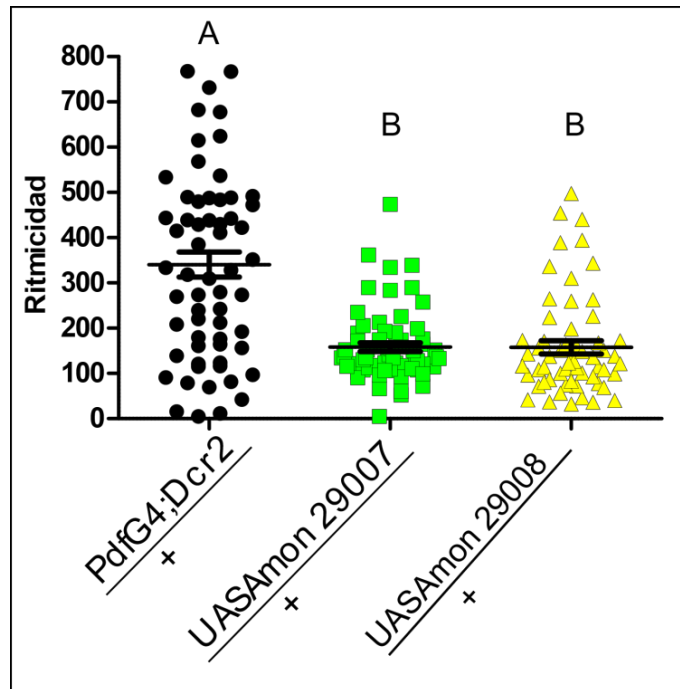


Figura 19: Controles de la sobreexpresión de Amontillado

Los resultados obtenidos muestran que las líneas utilizadas para sobreexpresar y disminuir la expresión de AMONTILLADO tienen la característica de que por sí solas, en ausencia del factor de transcripción Gal4 y solo estando cruzadas por la línea *white*, pueden alterar la ritmicidad de los individuos. Como cierre a los experimentos de sobreexpresión y silenciamiento de Amontillado se concluye que estos experimentos no permiten determinar si AMONTILLADO modula los niveles de PDF.

FURINAS

Estas enzimas son proteasas que clivan sitios de corte cuya secuencia es RKR, es por eso que fueron elegidas para participar en este relevamiento genético acotado.

Cabe destacar que el control *pdf-Gal4* heterocigota utilizado en el experimento de silenciamiento de *furina 1* es el mismo que aquel utilizado en el experimento de sobreexpresión de *furina 1* y de silenciamiento de *furina 2*. Si bien estos controles se utilizaron para analizar estos tres sets de resultados y no es lo ideal, lo mostramos así para facilitar la visualización y comprensión de los resultados. A su vez, se realizaron solamente dos réplicas biológicas para los experimentos de *furina 1* y *furina 2* por falta de tiempo para poder realizar una tercera.

Sobreexpresión de *Furina 1*

En el siguiente experimento se generó la sobreexpresión constitutiva de la *furina 1* al utilizar la herramienta de *pdf-Gal4* x *UAS-fur1* #63077. Se utilizaron como controles *pdf-Gal4* heterocigota (x w^{1118}) y a *UAS-fur1* #63077 heterocigota (x w^{1118}).

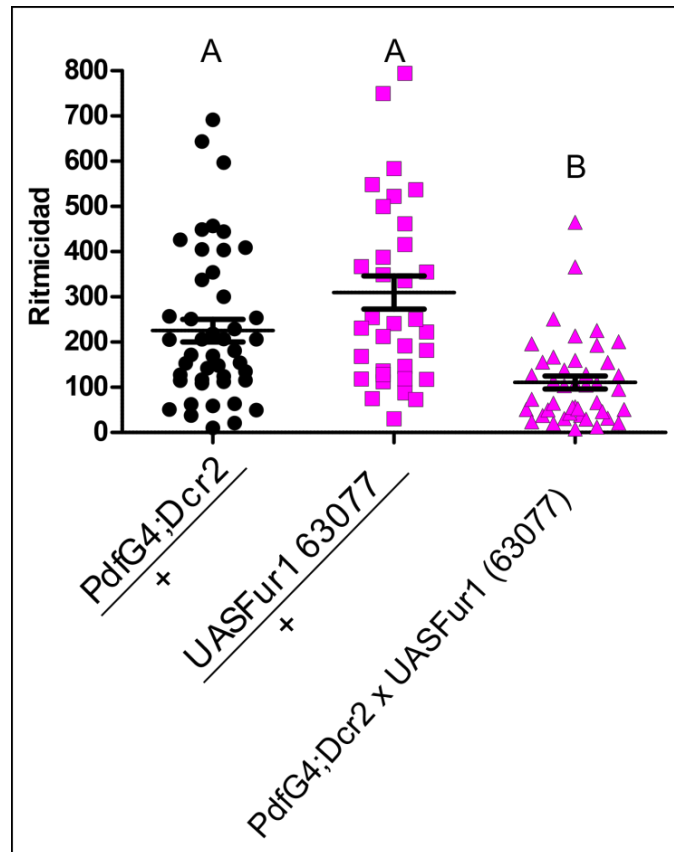


Figura 20: Gráfico donde se representa la ritmicidad comportamental de los distintos genotipos analizados en experimentos de actividad locomotora para la sobreexpresión de la *furina* 1. Se realizaron 2 réplicas biológicas (N=2) de 32 individuos (n) por réplica. La prueba estadística utilizada fue una prueba de Kruskal Wallis con una comparación múltiple de Dunn. Las letras por encima de las columnas de datos indican con que otras columnas difieren significativamente ($p \leq 0,05$). La misma letra indica diferencias no significativas.

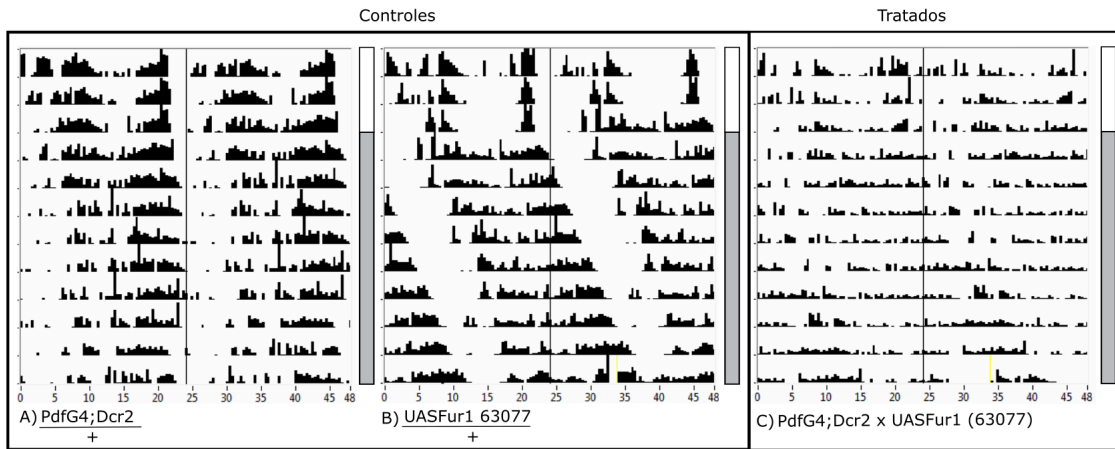


Figura 21: Actogramas representativos de los genotipos del experimento de sobreexpresión de *furina 1*. Notar que el genotipo UAS-Fur1 x heterocigota (x w^{118}) tiene período largo, mientras que el tratado es arrítmico (probablemente producto de la inserción). Cada actograma corresponde a un individuo representativo del genotipo indicado. Las barras en blanco representan el tiempo del individuo en LD (3 días) y las barras grises en DD.

Al analizar los resultados de este experimento se desprende que la ritmicidad de ambos controles no difiere significativamente entre sí, lo cual permite contrastar el impacto de la desregulación. A su vez, el genotipo tratado difiere de ambos controles. Estos resultados sugieren no sólo que la herramienta es efectiva para sobreexpresar *furina 1*, sino principalmente indican que en un contexto de sobreexpresión de *furina 1* en las LNvs se genera una desconsolidación de la actividad locomotora rítmica compatible con la alteración de los niveles de PDF (Figura 20 y Figura 21).

Silenciamiento *Furina 1*

Puesto que la sobreexpresión de *furina 1* dio como resultado la desconsolidación de la organización temporal de la actividad, es fundamental examinar si el silenciamiento del gen también provoca fenotipos comportamentales para descartar la posibilidad de que los defectos se asocien a la sobreexpresión espúrea de una proteasa. Para poner a prueba esta posibilidad en el siguiente experimento se generó el silenciamiento constitutivo de la *furina 1* a través de la expresión de un ARNi específico (*pdf-Gal4* x *UAS-fur1^{ARNi}* #25837). Se utilizaron como controles las líneas *pdf-Gal4* heterocigota (x *w¹¹⁸*) y *UAS-fur1^{ARNi}* #25837 heterocigota (x *w¹¹⁸*).

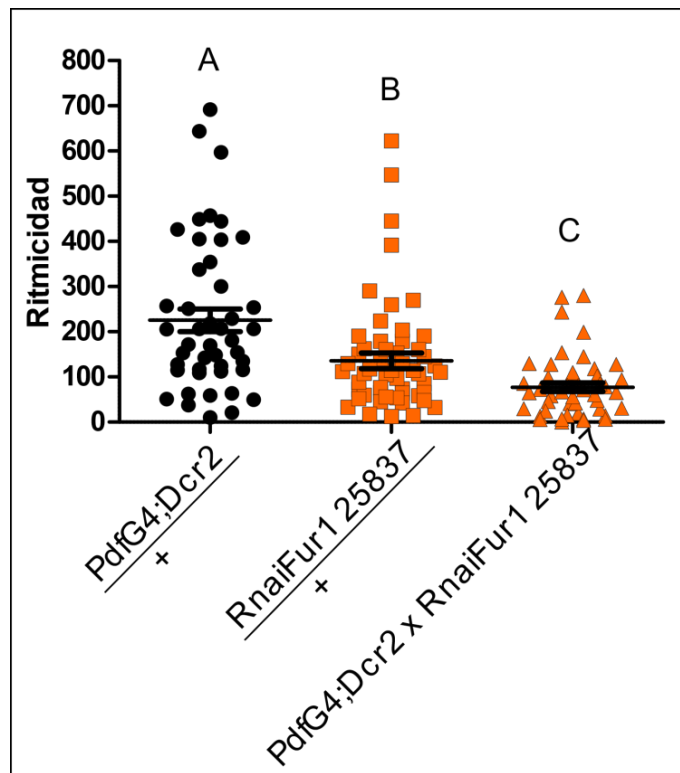


Figura 22: Gráfico donde se representa la ritmicidad comportamental de los distintos genotipos analizados en experimentos de actividad locomotora para el silenciamiento de la *furina 1*. Se realizaron 2 réplicas biológicas (N=2) de 32 individuos (n) por replica. La prueba estadística utilizada fue una prueba de Kruskal Wallis con una comparación múltiple de

Dunn. Las letras por encima de las columnas de datos indican con qué otras columnas difieren significativamente ($p \leq 0,05$). La misma letra indica diferencias no significativas.

A continuación se muestran actogramas representativos de los genotipos evaluados.

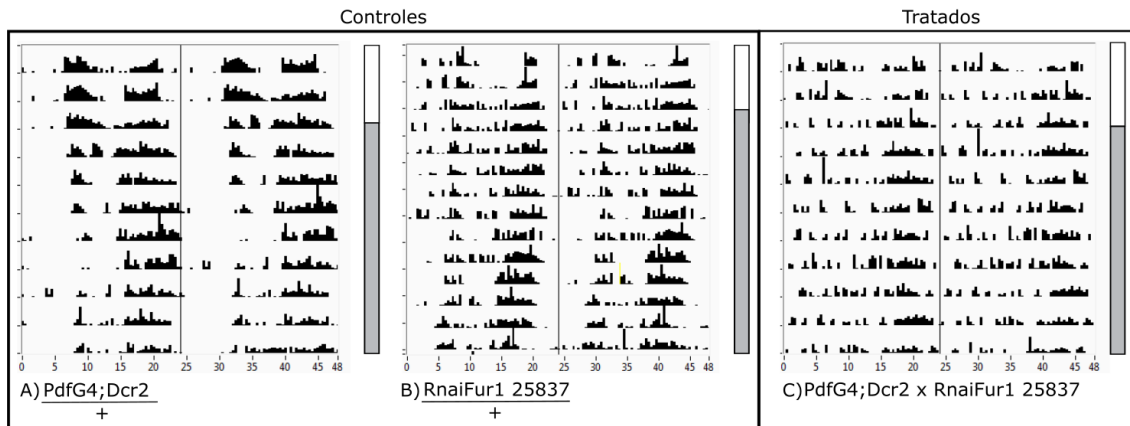


Figura 23: Actogramas representativos de los experimentos de silenciamiento de *furina 1*. Cada actograma corresponde a un individuo representativo del genotipo indicado. Las barras en blanco representan el tiempo del individuo en LD (3 días) y las barras grises en DD.

Si bien el análisis de los resultados de este experimento arroja que los controles difieren significativamente entre sí, vale la pena mencionar que la ritmicidad de los animales tratados difiere significativamente al compararla con cualquiera de los controles (parentales). El hecho que la disminución de niveles de FUR1 se asocie a un patrón de actividad desconsolidado (poco rítmico) sugiere que no sólo esta proteína está presente en las LNvs, sino que su actividad cumple un papel relevante para la ritmicidad comportamental; resta por confirmar si el impacto sobre los niveles de PDF.

Silenciamiento *Furina 2*

En este siguiente experimento utilizamos dos herramientas para silenciar la *furina 2*, UAS-*fur-2^{ARNi}* #4277 y UAS-*fur-2^{ARNi}* #25959. Se utilizaron como líneas control a *pdf-Gal4* heterocigota (x *w¹¹¹⁸*) y a cada uno de los ARNis en heterocigosis (cruzados por *w¹¹¹⁸*).

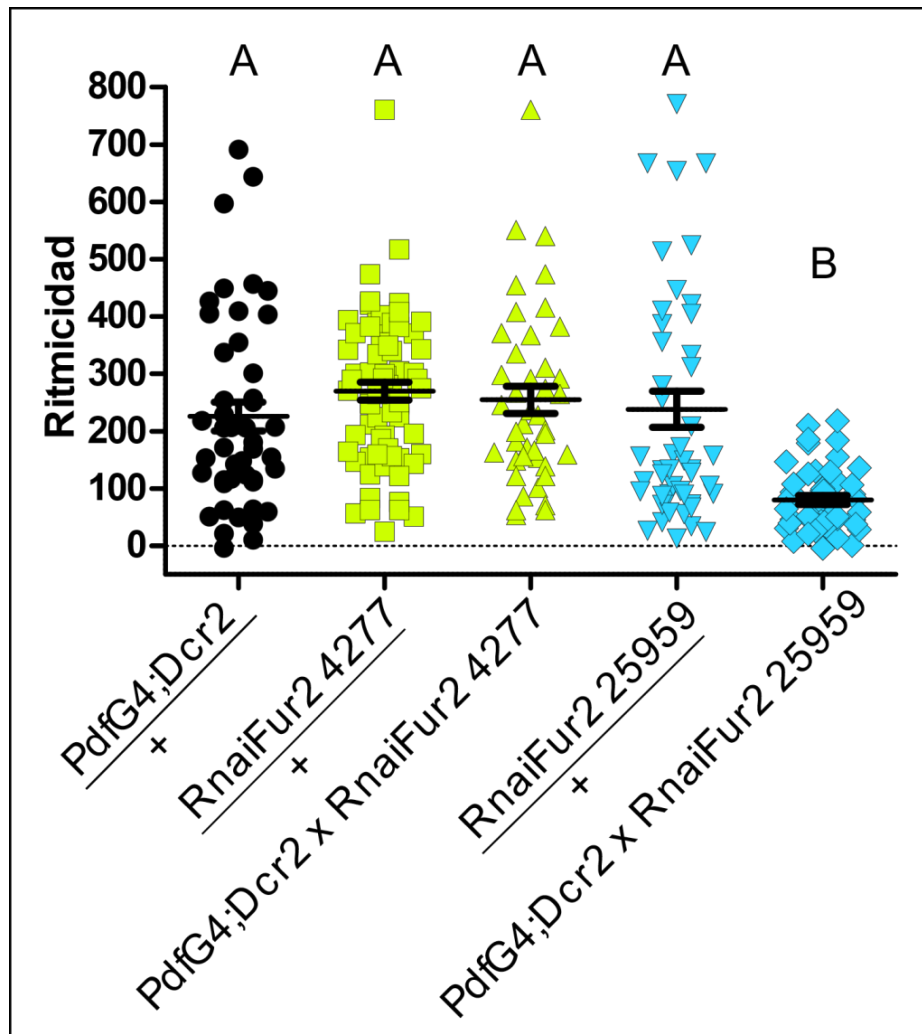


Figura 24: Gráfico donde se representa la ritmicidad comportamental de los distintos genotipos analizados en experimentos de actividad locomotora para el silenciamiento de la *furina 2*. Se realizaron 2 réplicas biológicas (N=2) de 32 individuos (n) por replica. La prueba estadística utilizada fue una prueba de Kruskal Wallis con una comparación múltiple de Dunn. Las letras por encima de las columnas de datos indican con que otras columnas difieren significativamente ($p \leq 0,05$). La misma letra indica diferencias no significativas.

A continuación se muestran actogramas representativos de las líneas analizadas.

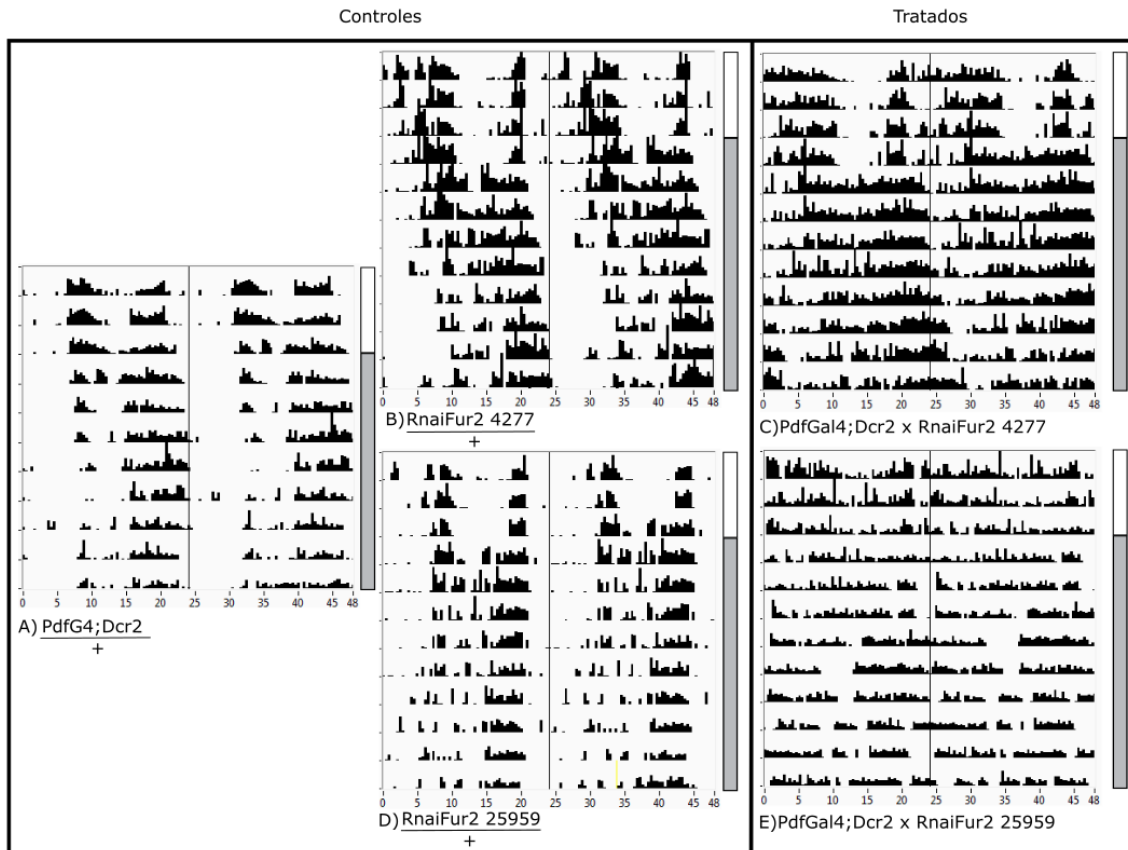


Figura 25: Actogramas representativos de los genotipos utilizados en el experimento de silenciamiento de *furina 2*. Cada actograma corresponde a un individuo representativo del genotipo indicado. Las barras en blanco representan el tiempo del individuo en LD (3 días) y las barras grises en DD.

Al analizar los resultados del experimento de silenciamiento de *furina 2* se puede observar que el silenciamiento con el ARNi #4277 no tiene diferencias significativas con ninguno de los dos controles, en cambio, el genotipo que expresa el ARNi #25959 manifiesta diferencias significativas en la ritmicidad comportamental respecto a sus dos controles (Figura 24 y Figura 25). El hecho que la expresión de dos ARNis resulte en efectos distintos sobre el perfil comportamental sugiere que su efectividad no es equivalente. La hipótesis alternativa es que

FUR2 no sea relevante en la modulación de los niveles de PDF y el efecto observado se deba exclusivamente a alterar los niveles de cualquier otro gen en forma inespecífica (lo cual se conoce como “off-target” effect, y ha sido reportado como consecuencia de la expresión de ARNis, (Green *et al.*, 2014). Sin embargo, las líneas empleadas en este trabajo no corresponden a esas colecciones, por lo que cabría esperar que la diferencia observada entre ambas líneas se asocie a la eficacia distinta de cada una en reducir los niveles endógenos de FUR2.

Discusión

A lo largo de la presente Tesis de grado se evaluaron los efectos de las proteasas Amontillado, FURINA 1 y FURINA 2 sobre la ritmicidad comportamental circadiana de *Drosophila melanogaster*. A continuación, se exponen las conclusiones sobre los experimentos realizados y se proponen experimentos a realizar en el futuro.

Rol de Amontillado sobre el procesamiento de PDF

amontillado codifica para un miembro de la familia de enzimas proteolíticas conocidas como Convertasas de Prohormonas (CP). Las CPs reconocen aminoácidos básicos que están conservados en los precursores y dirigen el procesamiento en sitios específicos. AMON es importante para la producción de varios neuropéptidos bioactivos como HUGGIN, CORAZONIN, sNPF, entre otros. Para examinar la relevancia de AMON en el procesamiento de PDF se analizó la organización temporal de la actividad locomotora en contexto de la sobreexpresión y/o silenciamiento parcial de esta proteasa. Para ello se emplearon dos líneas que permiten la sobreexpresión de una versión de longitud completa la proteasa, así como otras dos que permiten expresar dos regiones distintas del ARNm, para disparar el fenómeno de silenciamiento. Estas líneas se analizaron en heterocigosis, es decir, los machos de la progenie del cruzamiento de las líneas portadoras de las construcciones de interés por una línea silvestre disponible en el laboratorio, conjuntamente con la línea que combina ambas construcciones. De esta manera se evalúa separadamente la posible contribución de cada inserción en el perfil de actividad, para corroborar efectos no deseados (que en general no ocurren). Sorprendentemente, las líneas parentales en heterocigosis resultaron significativamente diferentes entre sí, de modo que fue imposible evaluar el impacto de la desregulación de AMON en ninguna de las dos condiciones. El hecho que 4 líneas distintas hayan mostrado relativamente baja ritmicidad poblacional sugiere como posibilidad que la línea silvestre con la cual han sido cruzadas (factor común en todos esos cruzamientos) podría ser la portadora de mutaciones silenciosas que se pusieron de manifiesto en la progenie. Las condiciones actuales impiden avanzar con tareas de experimentación por lo que no fue posible contrastar esta hipótesis a través de nuevos cruzamientos. Por lo tanto, de los experimentos realizados no se puede concluir que *amontillado* tiene efecto sobre el procesamiento de PDF.

Rol de las Furinas en el procesamiento de PDF

Estas endopeptidasas están poco caracterizadas en *Drosophila*. Pertenecen a una familia de endoproteasas ubicuas, que probablemente funcionan en la vía secretoria, clivando el motivo consenso RX(K/R)R. Se ha detectado su expresión en distintos tejidos, incluyendo el sistema nervioso central. El genoma de *Drosophila* codifica para *furina 1* y *furina 2*. Ninguna de las dos ha sido estudiada en profundidad en este modelo. A lo largo de este proyecto se analizaron separadamente ambas. Hemos encontrado que la sobreexpresión de *furina 1* altera la organización temporal de la actividad locomotora. Puesto que la sobreexpresión ectópica de una endopeptidasa puede llevar a fenotipos inespecíficos, fue primordial analizar el impacto de reducir los niveles de FUR1 en las neuronas LNvs. Coincidentemente, encontramos que el silenciamiento de *furina 1* también afecta significativamente la ritmicidad comportamental, lo cual corrobora la posibilidad que la proteína endógena participa en el procesamiento de alguna molécula relevante en el control de los ciclos de actividad y reposo, entre ellas, PDF. En el futuro se evaluarán los niveles de PDF en líneas portando ambas construcciones, así como los controles, por inmunohistoquímica. Si bien hasta el momento las conclusiones se limitan al análisis de una única línea para modular los niveles en ambos sentidos, los resultados obtenidos hasta el momento sugieren que FUR1 es candidata a cumplir un rol en el procesamiento de PDF.

En cuanto a *furina 2*, no contamos con líneas disponibles para su sobreexpresión; por ello se realizaron experimentos únicamente con dos líneas de ARNi. Cabe aclarar que si bien en ambas líneas la construcción está inserta en cromosomas diferentes, la secuencia target es la misma. Tal como se mencionó anteriormente, la ventaja del uso de herramientas que permiten silenciar un gen es que se evitan efectos asociados a la expresión ectópica de una proteína funcional; es decir, en contexto de una "bajada de función" la observación de un fenotipo permite asumir que la proteína analizada es biológicamente relevante. Los experimentos realizados permiten establecer un vínculo entre *furina 2* y el control de la ritmicidad comportamental. Sin embargo, cabe destacar que en este caso sólo una de las dos líneas empleadas disparó un fenotipo comportamental; una de las posibles explicaciones (dado que ambas líneas expresan la misma secuencia es que los niveles de expresión del ARN doble cadena es diferente, afectando, entonces la eficiencia del silenciamiento. Esto podría

comprobarse por PCR cuantitativa de los genotipos controles y tratados, para evaluar si existe una diferencia significativa en los niveles de ARN obtenidos.

Aún resta por demostrar que FURINA 2 cliva inequívocamente a PDF. Tal como se mencionó anteriormente, esto se podría realizar de varias maneras. Por un lado, mediante tinciones de inmunohistoquímica detectar PDF en los cerebros de controles y tratados (que expresan el ARNi de *furina 2*). De acuerdo con la hipótesis planteada, la reducción de FURINA 2 debería correlacionar con diferencia significativa de los niveles de PDF entre los cerebros controles (niveles altos por la mañana y bajos por la noche), y los cerebros tratados (niveles bajos en todo momento). Para demostrar el impacto de FURINA2 sobre el propeptido se podría realizar una incubación *in vitro* donde el propéptido (sintetizado químicamente) se incubaba en presencia de extracto enriquecido para la proteasa. Los productos de dicha incubación podrían ser analizados por espectrometría de masas, tal como se ha hecho en el laboratorio. (Depetris-Chauvin *et al.*, 2014)

A lo largo de la presente tesina de grado se han descrito elementos regulables que cooperan entre sí para generar un patrón rítmico del comportamiento. Se ha puesto en evidencia la complejidad para comprobar cuál es la proteasa responsable del procesamiento de PDF. Mediante el análisis de actividad locomotora, se ha aportado evidencia que tanto FURINA 2 como FURINA 1 pueden ser responsables de procesar a este neuropéptido.

Mi contribución al campo de la genética del comportamiento fue exponer que proteasas alteran el ritmo circadiano de *Drosophila* y pueden ser responsables de clivar PDF, ayudando a comprender como se procesa esta molécula.

Bibliografía

- Adams, M. D. and Celniker, S. E. and Holt, R. A. and Evans, C. A. and Gocayne, J. D. and Amanatides, P. G. and Scherer, S. E. and Li, P. W. and Hoskins, R. A. and Galle, R. F. and George, R. A. and Lewis, S. E. and Richards, S. and Ashburner, M. and Henderson, S. N. and Sutton, G. G. and Wortman, J. R. and Yandell, M. D. and Zhang, Q. and Chen, L. X. and Brandon, R. C. and Rogers, Y. H. and Blazej, R. G. and Champe, M. and Pfeiffer, B. D. and Wan, K. H. and Doyle, C. and Baxter, E. G. and Helt, G. and Nelson, C. R. and Gabor, G. L. and Abril, J. F. and Agbayani, A. and An, H. J. and Andrews-Pfannkoch, C. and Baldwin, D. and Ballew, R. M. and Basu, A. and Baxendale, J. and Bayraktaroglu, L. and Beasley, E. M. and Beeson, K. Y. and Benos, P. V. and Berman, B. P. and Bhandari, D. and Bolshakov, S. and Borkova, D. and Botchan, M. R. and Bouck, J. and Brokstein, P. and Brottier, P. and Burtis, K. C. and Busam, D. A. and Butler, H. and Cadieu, E. and Center, A. and Chandra, I. and Cherry, J. M. and Cawley, S. and Dahlke, C. and Davenport, L. B. and Davies, P. and de Pablos, B. and Delcher, A. and Deng, Z. and Mays, A. D. and Dew, I. and Dietz, S. M. and Dodson, K. and Doup, L. E. and Downes, M. and Dugan-Rocha, S. and Dunkov, B. C. and Dunn, P. and Durbin, K. J. and Evangelista, C. C. and Ferraz, C. and Ferriera, S. and Fleischmann, W. and Fosler, C. and Gabrielian, A. E. and Garg, N. S. and Gelbart, W. M. and Glasser, K. and Glodek, A. and Gong, F. and Gorrell, J. H. and Gu, Z. and Guan, P. and Harris, M. and Harris, N. L. and Harvey, D. and Heiman, T. J. and Hernandez, J. R. and Houck, J. and Hostin, D. and Houston, K. A. and Howland, T. J. and Wei, M. H. and Ibegwam, C. and Jalali, M. and Kalush, F. and Karpen, G. H. and Ke, Z. and Kennison, J. A. and Ketchum, K. A. and Kimmel, B. E. and Kodira, C. D. and Kraft, C. and Kravitz, S. and Kulp, D. and Lai, Z. and Lasko, P. and Lei, Y. and Levitsky, A. A. and Li, J. and Li, Z. and Liang, Y. and Lin, X. and Liu, X. and Mattei, B. and McIntosh, T. C. and McLeod, M. P. and McPherson, D. and Merkulov, G. and Milshina, N. V. and Mobarry, C. and Morris, J. and Moshrefi, A. and Mount, S. M. and Moy, M. and Murphy, B. and Murphy, L. and Muzny, D. M. and Nelson, D. L. and Nelson, D. R. and Nelson, K. A. and Nixon, K. and Nusskern, D. R. and Pacleb, J. M. and Palazzolo, M. and Pittman, G. S. and Pan, S. and Pollard, J. and Puri, V. and Reese, M. G. and Reinert, K. and Remington, K. and Saunders, R. D. and Scheeler, F. and Shen, H. and Shue, B. C. and Sidén-Kiamos, I. and Simpson, M. and Skupski, M. P. and Smith, T. and Spier, E. and Spradling, A. C. and Stapleton, M. and Strong, R. and Sun, E. and Svirskas, R. and Tector, C. and Turner, R. and Venter, E. and Wang, A. H. and Wang, X. and Wang, Z. Y. and Wassarman, D. A. and Weinstock, G. M. and Weissenbach, J. and Williams, S. M. and Woodage, T. and Worley, K. C. and Wu, D. and Yang, S. and Yao, Q. A. and Ye, J. and Yeh, R. F. and Zaveri, J. S. and Zhan, M. and Zhang, G. and Zhao, Q. and Zheng, L. and Zheng, X. H. and Zhong, F. N. and Zhong, W. and Zhou, X. and Zhu, S. and Zhu, X. and Smith, H. O. and Gibbs, R. A. and Myers, E. W. and Rubin, G. M. and Venter, J. C. (2000) 'The genome sequence of *Drosophila melanogaster*', *Science*, 287(5661), pp. 2185-95.
- Beaver, L. M., Gvakharia, B. O., Vollintine, T. S., Hege, D. M., Stanewsky, R. and Giebultowicz, J. M. (2002) 'Loss of circadian clock function decreases reproductive fitness in males of *Drosophila melanogaster*', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(4), pp. 2134-9.
- Blanchardon, E., Grima, B., Klarsfeld, A., Chélot, E., Hardin, P. E., Prétat, T. and Rouyer, F. (2001) 'Defining the role of *Drosophila* lateral neurons in the control of circadian rhythms in motor activity and eclosion by targeted genetic ablation and PERIOD protein overexpression', *Eur J Neurosci*, 13(5), pp. 871-88.
- DeCoursey, P. J., Walker, J. K. and Smith, S. A. (2000) 'A circadian pacemaker in free-living chipmunks: essential for survival?', *J Comp Physiol A*, 186(2), pp. 169-80.
- Depetris-Chauvin, A., Fernández-Gamba, A., Gorostiza, E. A., Herrero, A., Castaño, E. M. and Ceriani, M. F. (2014) 'Mmp1 processing of the PDF neuropeptide regulates circadian structural plasticity of pacemaker neurons', *PLoS Genet*, 10(10), pp. e1004700.
- Dubowy, C. and Sehgal, A. (2017) 'Circadian Rhythms and Sleep in', *Genetics*, 205(4), pp. 1373-1397.
- Ewer, J., Frisch, B., Hamblen-Coyle, M. J., Rosbash, M. and Hall, J. C. (1992) 'Expression of the period clock gene within different cell types in the brain of *Drosophila* adults and mosaic analysis of these cells' influence on circadian behavioral rhythms', *J Neurosci*, 12(9), pp. 3321-49.
- Frisch, B., Hardin, P. E., Hamblen-Coyle, M. J., Rosbash, M. and Hall, J. C. (1994) 'A promoterless period gene mediates behavioral rhythmicity and cyclical per expression in a restricted subset of the *Drosophila* nervous system', *Neuron*, 12(3), pp. 555-70.
- Glaser, F. T. and Stanewsky, R. (2007) 'Synchronization of the *Drosophila* circadian clock by temperature cycles', *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 72, pp. 233-42.
- Green, E. W., Fedele, G., Giorgini, F. and Kyriacou, C. P. (2014) 'A *Drosophila* RNAi collection is subject to dominant phenotypic effects', *Nat Methods*, 11(3), pp. 222-3.

- Grima, B., Chélot, E., Xia, R. and Rouyer, F. (2004) 'Morning and evening peaks of activity rely on different clock neurons of the *Drosophila* brain', *Nature*, 431(7010), pp. 869-73.
- Helfrich-Förster, C., Shafer, O. T., Wülbeck, C., Grieshaber, E., Rieger, D. and Taghert, P. (2007) 'Development and morphology of the clock-gene-expressing lateral neurons of *Drosophila melanogaster*', *J Comp Neurol*, 500(1), pp. 47-70.
- Jud, C., Schmutz, I., Hampp, G., Oster, H. and Albrecht, U. (2005) 'A guideline for analyzing circadian wheel-running behavior in rodents under different lighting conditions', *Biol Proced Online*, 7, pp. 101-16.
- Kaneko, M., Helfrich-Förster, C. and Hall, J. C. (1997) 'Spatial and temporal expression of the period and timeless genes in the developing nervous system of *Drosophila*: newly identified pacemaker candidates and novel features of clock gene product cycling', *J Neurosci*, 17(17), pp. 6745-60.
- Klarsfeld, A., Leloup, J. C. and Rouyer, F. (2003) 'Circadian rhythms of locomotor activity in *Drosophila*', *Behav Processes*, 64(2), pp. 161-175.
- Michael, T. P., Salomé, P. A., Yu, H. J., Spencer, T. R., Sharp, E. L., McPeck, M. A., Alonso, J. M., Ecker, J. R. and McClung, C. R. (2003) 'Enhanced fitness conferred by naturally occurring variation in the circadian clock', *Science*, 302(5647), pp. 1049-53.
- Muraro, N. I., Pirez, N. and Ceriani, M. F. (2013) 'The circadian system: plasticity at many levels', *Neuroscience*, 247, pp. 280-93.
- Ouyang, Y., Andersson, C. R., Kondo, T., Golden, S. S. and Johnson, C. H. (1998) 'Resonating circadian clocks enhance fitness in cyanobacteria', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(15), pp. 8660-4.
- Park, J. H. and Hall, J. C. (1998) 'Isolation and chronobiological analysis of a neuropeptide pigment-dispersing factor gene in *Drosophila melanogaster*', *J Biol Rhythms*, 13(3), pp. 219-28.
- PITTENDRIGH, C. S. (1960) 'Circadian rhythms and the circadian organization of living systems', *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 25, pp. 159-84.
- Renn, S. C., Park, J. H., Rosbash, M., Hall, J. C. and Taghert, P. H. (1999) 'A pdf neuropeptide gene mutation and ablation of PDF neurons each cause severe abnormalities of behavioral circadian rhythms in *Drosophila*', *Cell*, 99(7), pp. 791-802.
- Reppert, S. M. and Weaver, D. R. (2001) 'Molecular analysis of mammalian circadian rhythms', *Annu Rev Physiol*, 63, pp. 647-76.
- Stanewsky, R., Kaneko, M., Emery, P., Beretta, B., Wager-Smith, K., Kay, S. A., Rosbash, M. and Hall, J. C. (1998) 'The cryb mutation identifies cryptochrome as a circadian photoreceptor in *Drosophila*', *Cell*, 95(5), pp. 681-92.
- Stoleru, D., Peng, Y., Agosto, J. and Rosbash, M. (2004) 'Coupled oscillators control morning and evening locomotor behaviour of *Drosophila*', *Nature*, 431(7010), pp. 862-8.
- Young, M. W. and Kay, S. A. (2001) 'Time zones: a comparative genetics of circadian clocks', *Nat Rev Genet*, 2(9), pp. 702-15.