Tesis de Doctorado Opción Neurociencias Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas

# Plasticidad circadiana de las terminales sinápticas motoras en *Drosophila melanogaster*.

Mag. Santiago Ruiz Perera Orientador: Dr. Rafael Cantera

Tribunal Presidente: Dr. Omar Trujillo Cenóz Vocal: Dra. María Fernanda Ceriani Vocal: Dr. Luis Barbeito Vocal: Dr. Francesco Mattia Rossi

# INDICE

INDICE	1
RESUMEN	3
Lista de publicaciones y manuscritos	5
INTRODUCCIÓN	6
Generalidades del sistema nervioso	6
Plasticidad en las neuronas	6
La unión neuromuscular de Drosophila melanogaster	8
Los Ritmos Circadianos	10
Generalidades del reloj circadiano y su mecanismo de funcionamiento	11
El reloj en la mosca Drosophila melanogaster	12
El mecanismo molecular.	12
El marcapasos central: las neuronas del reloj	15
Las vías de entrada al reloj	16
Las vías de salida	17
Relojes periféricos	18
Cambios circadianos en la morfología de las neuronas	19
Cambios circadianos en el número de sitios activos	21
OBJETIVOS	25
MATERIALES Y MÉTODOS	27
Mantenimiento de cepas de moscas Drosophila melanogaster	27
Uso del sistema GAL4/UAS	27
Disección de las muestras y procesamiento para microscopía electrónica de	
transmisión (MET).	29
Disección, inmunohistoquímica y microscopia láser confocal	29
Experimentos de Silenciamiento y Rescate	30
Experimentos de Parálisis	31
Análisis Estadístico.	32
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
I. Cambios rítmicos en el número de sitios activos en las terminales motoras	
de Drosophila melanogaster	33

II. Las vesículas sinápticas en los sitios activos motoras cambian su tamaño	
y distribución entre el día y la noche	39
III. Los genes del reloj timeless y period son inhibidores de la sinaptogenesis	
en las terminales motoras de Drosophila actuando a distintos niveles	41
IV. La actividad sináptica y la endocitosis estarían involucradas en la	
formación de botones y sitios activos en las terminales motoras de	
Drosophila	44
ANEXO	50
CONCLUSIONES	51
REFERENCIAS	53

#### RESUMEN

El reloj circadiano controla ritmos fisiológicos, metabólicos y de comportamiento, ajustando su periodo en 24 horas. En distintos organismos, se han identificado parte de los genes que codifican los componentes moleculares que constituyen el reloj encargados de generar y mantener estos ritmos. Estos genes también controlan cambios rítmicos en la estructura de la terminal sináptica en algunas neuronas. En la terminal motora de la motoneurona MN5, que controla dos músculos de vuelo de la mosca *Drosophila melanogaster*, estos genes controlan en parte el tamaño de los botones sinápticos, los cuales son más pequeños en la noche, cuando la mosca no vuela, que en el día cuando la mosca esta activa.

En esta tesis, nos propusimos estudiar si la reducción nocturna en el tamaño de los botones de la MN5 incluye una reducción del número de sitios activos u otros organelos relevantes para la función sináptica. De existir, también estudiar si es controlada por el reloj circadiano a través de su control de la actividad sináptica, o a través de otro mecanismo.

Utilizando distintas aproximaciones metodológicas, demostramos que la plasticidad circadiana de la terminal motora de la MN5 incluye una profunda reorganización de los botones sinápticos, las sinapsis e incluso de las vesículas sinápticas. Encontramos un ritmo circadiano en el número de botones, con más botones a medianoche que a mediodía, acompañado por un ritmo diario en los sitios activos. De forma inesperada encontramos un ritmo en el tamaño de las vesículas sinápticas, siendo más grandes cuando la mosca no vuela. También, encontramos un ritmo en el tamaño de las vesículas sinápticas, siendo más grandes cuando la mosca no vuela. Estos resultados sugieren la existencia de un ritmo de formación de botones durante la noche, acompañado por un ritmo de ensamblaje de sitios activos cargados con vesículas sinápticas grandes, y de eliminación de botones durante el día, acompañado por el desensamblaje de sitios activos.

Encontramos que PERIOD se expresa en la terminal sináptica de la MN5 y TIMELESS lo hace en la glía que la envuelve. Los genes *timeless* y *period* controlan el número y el rítmico diario de botones y sitios activos de la MN5. Ambos genes cumplirían funciones distintas sobre estos ritmos. Mientras *timeless* define el ritmo en el número de botones a lo largo del día, controlando el número de botones sin sitios activos, *period* controla la amplitud del ritmo. *timeless* inhibiría fuertemente la formación de botones sin sitios activos a mediodía y *period* lo haría a medianoche. Además, *timeless* y *period* serían inhibidores de la sinaptogénesis y limitarían la adición de sitios activos a botones vacíos. Ambas inhibiciones dependerían del control del reloj sobre la actividad sináptica y/o la endocitosis. Por último, ambos genes controlarían la distribución de sitios activos en los botones, siendo muy probable que *timeless* limite la adición de sitios activos o más, y que *period* la limite para generar botones con tres sitios activos o más. Por su parte, la actividad y/o la endocitosis mantendrían los botones con tres sitios activos o más, inhibiendo la eliminación de estos botones, o inhibiendo la eliminación de sus sitios activos.

#### Lista de publicaciones y manuscritos

Esta tesis se basa en la siguiente lista de publicaciones y manuscritos, y en un experimento adicional detallado en Resultados y Discusión (Punto IV y Anexo):

**Ruiz S**, Ferreiro MJ, Menhert KI, Casanova G, Olivera A, Cantera R. (2013) Rhythmic changes in synapse numbers in *Drosophila melanogaster* motor terminals. PLoS One. 8:e67161. doi: 10.1371/journal.pone.0067161.

**Ruiz S**, Ferreiro MJ, Casanova G, Olivera A, Cantera R (2010) Synaptic vesicles in motor synapses change size and distribution during the day. Synapse 64:14-19.

**Ruiz S**, Ferreiro MJ, Astrada S, Cantera R. (2014) Clock genes *timeless* and *period* are inhibitors of synaptogenesis in *Drosophila* motor terminals acting at different levels.

Manuscrito

# INTRODUCCIÓN

#### Generalidades del sistema nervioso

El sistema nervioso es fundamental para la vida de los animales. Controla cada una de las funciones vitales, posibilita la recepción de la información del ambiente, integra y guarda la información recibida, utiliza la información, dirige y controla el movimiento. El sistema nervioso esta formado por distintos tipos celulares de los que se destacan las neuronas (unidades funcionales independientes, como fueran definidas por Santiago Ramón y Cajal , 1906), y la glía o células gliales (nombradas por Rudolf Virchow, 1856). La idea primaria de S. Ramón y Cajal, resumida en la llamada "primera ley de la polarización dinámica", considerando a las dendritas como un único compartimento de entrada de la información, se ha ido debilitando con el descubrimiento de las sitio activo dentrodendrítica, axoaxónicas y la mayoría de las sitio activo eléctricas. Estos hallazgos introducen complejidades inesperadas en los circuitos que procesan la información neural.

#### Plasticidad en las neuronas

Un concepto importante para esta tesis es el de plasticidad, la capacidad que tiene la neurona de cambiar diversos aspectos como la morfología, la fisiología y sus contactos (las sinapsis) para adaptarse a los cambios en el organismo y el ambiente externo. La plasticidad es evidente durante el proceso de desarrollo, pero también ocurre durante los procesos de aprendizaje y la formación de memoria o como respuesta a injuria y lesiones. A nivel de la transmisión sináptica, la plasticidad sináptica se puede manifestar como cambios en la eficacia de la transmisión sináptica (la fuerza de la sinapsis). La eficacia sináptica depende en las sinapsis químicas, de la magnitud de la liberación de las vesículas sinápticas en respuesta a un potencial de acción y el número de receptores postsinápticos funcionales disponibles para la unión del neurotransmisor (Del Castillo y Katz, 1954).

Una forma de plasticidad sináptica ampliamente estudiada como correlato de algunos tipos de memoria (Bliss y Collingridge, 1993) es la plasticidad Hebbiana, que incluye la potenciación de largo plazo (LTP), y cuya inducción es rápida pero depende de la estimulación simultánea (la asociación) de la presinapsis y postsinapsis (Bliss y Lomo, 1973; Lee et al., 2009). Esta forma también incluye la depresión de largo lazo (LTD), la cual implica un efecto inverso dependiente en principio de la internalización de receptores implicados. Una forma de plasticidad sináptica a largo plazo distinta a la LTP y LTD, que opera como mecanismo de retroalimentación negativa de compensación que mantiene la estabilidad de las conexiones nerviosas (o la excitabilidad dentro de rangos fisiológicos), es llamada plasticidad sináptica homeostática (Turrigiano y Nelson, 2000). Ésta, actúa por ejemplo en condiciones de alta excitabilidad, reduciendo la fuerza sináptica y aumenta la fuerza sináptica bajo condiciones de supresión crónica de la actividad neuronal para prevenir el silenciamiento. Es interesante que esta capacidad de compensar (autoregular el mantenimiento de la constancia de la fuerza sináptica) que tiene la plasticidad sináptica homeostática sobre la plasticidad Hebbiana implica compartir parte de la maquinaria molecular (Vitureira y Goda, 2013).

En *Drosophila*, un ejemplo de modulación homeostática de la estructura y la función sináptica fue identificado en el sistema visual de la larva (Yuan et al., 2011). Durante el desarrollo del sistema nervioso, la experiencia visual modifica el árbol dendrítico de las neuronas laterales ventrales pequeñas (LNvs; ver más abajo), un grupo de neuronas que reciben inervación del órgano de Bolwig, el órgano fotorreceptor primario de la larva (Schmucker et al, 1992; Malpel et al., 2002). La estimulación por luz induce cambios estructurales (complejidad y tamaño) así como una respuesta fisiológica en las dendritas de la LNv inversa a la cantidad del estímulo. Un aumento en la estimulación reduce el árbol dendrítico y la respuesta sináptica del la LNv, mientras que la reducción del estimulo produce el efecto contrario. Dado que las LNv forma parte del circuito neuronal que controla el ritmo circadiano (Helfirch-Forster, 1998) y del comportamiento que la larva realiza para evitar la luz (Mazzoni et al., 2005), se piensa que esta modulación debe cumplir una función importante en la adaptación del comportamiento a cambios ambientales (Frank et al., 2013).

#### La unión neuromuscular de Drosophila melanogaster

La unión neuromuscular en Drosophila es uno de los modelos más usados para el estudio de la plasticidad neuronal (Ruiz-Cañada y Budnik, 2006). Esta estructura se forma cuando el axón de una motoneurona contacta a su músculo blanco durante el desarrollo embrionario (Campos-Ortega y Hartenstein, 1997). El contacto inicial lo realiza el cono de crecimiento, una especialización de la porción distal del axón, el cual guía al axón en crecimiento hacia su posición definitiva mediante un patrón específico espacio-temporal de señales químicas (Tessier-Lavigne y Goodman, 1996). Inicialmente, el cono de crecimiento realiza y refuerza contactos mediante proteínas de adhesión (Kolodkin y Tessier-Lavigne, 2011). Posteriormente, el cono de crecimiento desaparece y el extremo axonal genera en cambio ramificaciones en las cuales se forman los botones sinápticos, estableciéndose la terminal sináptica (Ruiz-Cañada y Budnik, 2006). El embrión completa la formación de las uniones neuromusculares en un breve lapso de tiempo (en un máximo de 3 horas, desde las 13 a las 16 horas post-fecundación) de desarrollo neuronal. Posteriormente, continúa una fase intensa de diferenciación neuronal. La primer actividad sináptica en Drosophila melanogaster fue registrada en motoneuronas del embrión aproximadamente a las 14 horas de desarrollo post-fecundación (Broadie y Bate, 1993) y a las 16 horas en interneuronas (Baines y Bate, 1998). La actividad sináptica se intensifica y la musculatura comienza a contraerse irregularmente y de forma esporádica. Posteriormente, se observan ondas de contracción coordinadas sobre los distintos grupos de músculos que son necesarias para que la larva eclosione pocas horas después aproximadamente 22 horas post-fecundación; Campos-Ortega y Hartenstein, 1997).

Durante la fase de diferenciación neuronal, se diferencian los distintos tipos de motoneuronas con sus contactos sinápticos. Los nervios para cada segmento salen de la cadena ventral y llegan a cada segmento a ambos lados de la línea media ventral y sus ramas inervan los músculos de cada mitad de segmento (Jan y Jan, 1976a). En las motoneuronas se han identificado tres categorías de botones sinápticos de acuerdo a su morfología y sus neurotransmisores. Las terminales con botones tipo I poseen botones grandes (Jan y Jan, 1976a) que contienen un gran número de vesículas sinápticas claras cargadas de glutamato (Jan y Jan, 1976b). Estos botones están

envueltos por un complejo de pliegues de la membranas del músculo llamado retículo subsináptico (Osborne, 1967), donde se concentran los receptores postsinápticos de glutamato, las moléculas de adhesión y otros complejos de proteínas de importancia para la función postsináptica (Dani y Broadie, 2012). Las terminales con botones tipo II poseen botones pequeños, vesículas claras con glutamato y vesículas oscuras cargadas de octopamina (Johansen et al., 1989; Monastirioti et al., 1995). Las terminales con botones de tipo III poseen botones de tamaño intermedio y su forma es ovoide y alargada. Estos botones tienen vesículas sinápticas oscuras cargadas de neuropéptidos (Anderson et al., 1988; Gorczyca et al., 1993).

Durante el desarrollo larvario (estadio que dura entre 5 a 6 días), la larva crece, muda y aumenta rápidamente su tamaño. Las terminales y sus botones acompañan este crecimiento, en un ejemplo de plasticidad neuronal que permite al sistema nervioso mantener el control de los músculos a pesar de su gran crecimiento (Schuster et al., 1996). Posteriormente la larva de Drosophila melanogaster, un insecto homoletábolo, abandona el alimento donde ha comido casi continuamente desde el momento de la eclosión, deja de moverse y se transforma en pupa. Este es el comienzo de la metamorfosis y durante los aproximadamente 4 días siguientes la larva se transforma primero en pupa y luego en adulto. El sistema motor y nervioso se remodela y adecua a los comportamientos y requerimientos de la vida adulta. La mayoría de las neuronas y músculos de la larva, son sustituidas por nuevas neuronas y músculos. Algunas neuronas larvales son eliminadas por muerte celular programada y otras son adaptadas a la vida adulta por medio de una re-diferenciación: primero pierden sus ramitas y sinapsis y luego diferencian nuevas ramificaciones y establecen sinapsis con nuevos blancos, integrándose a circuitos que controlan comportamientos del adulto, lo cual ejemplifica un tipo particular de plasticidad neuronal durante el desarrollo (Truman, 1990; Consoulas et al., 2000). El desarrollo del sistema nervioso adulto, durante la metamorfosis, también incluye la diferenciación de numerosas neuronas que no habían existido en la larva, generadas por proliferación postembrionaria. En la periferia, muchos músculos de la larva degeneran y son remplazados por los músculos adultos, que derivan de mioblastos y, en algunos casos, de remanentes de músculos de la larva (Consoulas et al., 2000). Los músculos longitudinales dorsales (DLMs) de la mosca (los músculos de vuelo entre los cuales se encuentran aquellos que fueron objeto de esta tesis), se desarrollan de tres

músculos dorsales de la larva, que escapan a la histolisis durante la transición larvapupa-adulto y son reorganizados en músculos de un tipo estructural y funcional muy distinto (Shatoury, 1956; Costello y Wyman, 1986; Fernandes et al., 1991).

La neurona motora MN5, que inerva los músculos estudiados en esta tesis, los músculos de vuelo indirectos y longitudinales 5 y 6 (Coggshall, 1978; Sun y Wyman, 1997; Ikeda y Koenig, 1988) nace en el embrión pero no desarrolla su axón hasta el comienzo de la metamorfosis (Consoulas, et al., 2002). En la larva, la MN5 no tiene dendritas y su neurita primaria o principio de axón se detiene en el nervio mesotorácico sin inervar un músculo blanco, y durante la metamorfosis sus dendritas crecen *de novo* y su axón se extiende para inervar sus músculos blanco (Consoulas et al., 2002). En la mosca adulta, en el músculo de vuelo estudiado, existe una terminal sináptica probablemente octopaminérgica que acompaña (por lo general en paralelo pero que no acompaña cada rama) a la inervación glutamatérgica relevante para mi trabajo. Ambas neuritas (octopaminérgica y glutamatérgica) y sus botones son muy fácil de diferenciar unos de otros por su morfología.

#### Los Ritmos Circadianos

Durante su evolución, los organismos se han adaptado al ritmo de luz y oscuridad impuesto por la rotación de la tierra. Esta adaptación incluye ritmos biológicos de expresión génica, metabolismo, fisiología y comportamiento cuya duración es de aproximadamente 24 horas y se denominan ritmos circadianos. Un ejemplo muy conocido es el ritmo de actividad locomotora/vigilia y reposo/sueño exhibido por los seres humanos y muchos animales (Bell-Pedersen et al., 2005; Allada y Chung, 2010). Los ritmos circadianos son dirigidos por un mecanismo endógeno denominado "reloj circadiano", pero son sincronizados ("puestos en hora") y modulados por cambios rítmicos en el ambiente, de los cuales el principal es el ciclo de luz/oscuridad. Gracias a este reloj circadiano, los animales pueden "predecir" el cambio de fase del ciclo luz-oscuridad y ajustar su fisiología y comportamiento con anticipación. El valor adaptativo del reloj ha sido estudiado en distintos organismos y en los seres humanos, y su perturbación tiene consecuencias negativas para la salud (Woelfle et al., 2004; Fleury et al., 2000; Gery y Koeffler, 2010).

#### Generalidades del reloj circadiano y su mecanismo de funcionamiento

A pesar de las diferencias evolutivas y de complejidad entre los organismos, el estudio de los ritmos circadianos en distintos organismos a permitido definir los componentes comunes de un "reloj circadiano" (Bell-Pedersen et al., 2005). Un reloj circadiano consta de al menos un oscilador que "mide" el tiempo, una vía de entrada que sincroniza el oscilador con las condiciones ambientales y una vía de salida que controla los distintos ritmos biológicos. Dependiendo del organismo, varía la cantidad de osciladores que posee y su disposición jerárquica. En los organismos multicelulares existen distintos osciladores, uno que se define como central (conocido como "marcapasos") y varios periféricos. De forma genérica, existen componentes del oscilador definidos como elementos positivos y negativos (Bell-Pedersen et al., 2005) que permiten una autorregulación del funcionamiento del oscilador mediante bucles de retroalimentación (Fig. 1). Los elementos positivos activan la transcripción de los genes del reloj que codifican los ARN mensajeros y proteínas que funcionan como los elementos negativos del sistema.



Figura 1. Los osciladores circadianos son controlados por un mecanismo común en distintos organismos (adaptado de Bell-Pedersen et al., 2005).

Los elementos negativos aumentan su concentración e interactúan con los elementos positivos, inhibiendo su actividad. Como resultado se produce una reducción de la transcripción de los genes que codifican los elementos negativos. La fosforilación de los elementos negativos produce su decaimiento y reducción de su concentración, lo que lleva a una reactivación de los elementos positivos, permitiendo que el ciclo comience nuevamente. Por otra parte, los elementos negativos activan la expresión de otros elementos positivos que funcionan en el mantenimiento y la estabilidad del oscilador. La función normal del sistema define la duración del ciclo en aproximadamente 24 horas.

#### El reloj en la mosca Drosophila melanogaster

#### El mecanismo molecular

El mecanismo molecular básico del reloj ha sido estudiado y definido en una gran variedad de organismos (Glossop y Hardin, 2002, Bell-Pedersen et al., 2005) y en este campo científico los estudios basados en la mosca Drosophila melanogaster han estado a la vanguardia (Hendricks, 2003). La primera identificación de un "gen del reloj" fue hecha por Konopka y Benzer (1971) en Drosophila, quienes encontraron que tanto los ritmos de eclosión como los de actividad locomotora (ciclos de actividad/reposo) están afectados en moscas con mutaciones en un gen que denominaron period. Este primer paso posibilitó descubrir un segundo "gen del reloj" (timeless, también descubierto primero en mosca) y otros genes del reloj, identificar las proteínas que codifican y sus homólogos en mamíferos, comprender sus funciones y elaborar un modelo sobre el mecanismo molecular del reloj (Hendricks, 2003). Hoy en día son casi una decena los genes del reloj descritos en Drosophila (period, Konopka y Benzer, 1971; timeless, Sehgal et al., 1994; cycle, Rutilia et al., 1998; clock, Allada et al., 1998; vrille, Blau y Young, 1999; doubletime, Kloss et al., 1998, Price et al., 1998; cryptocrome, Stanewsky et al., 1998; shaggy, Martinek et al., 2001; caseine kinase 2, Lin et al, 2002), los cuales forman parte del marcapasos central ubicado en el cerebro (Veleri et al., 2003). El mecanismo molecular del marcapasos central se define como dos bucles de transcripción controlados por retroalimentación que están interconectados (Allada y Chung, 2010; Hardin, 2011). El primero bucle depende de la transcripción de los genes *period* y *timeless* determinada por la unión de los factores de transcripción CLOCK y CYCLE en forma de dímero a la secuencia CACGTG en sus promotores (Fig. 2). El pico máximo de transcripción de *period* y *timeless* es al final del día. Las proteínas PERIOD y TIMELESS se acumulan y forman un dímero en el citoplasma temprano en la noche, el cual transloca al núcleo a medianoche. En el núcleo, el dímero se une a CLOCK/CYCLE inhibiendo su unión al ADN y la activación de la transcripción (tarde en la noche).



Figura 2. Mecanismo molecular del marcapasos: primer bucle de retroalimentación negativa. El dímero CLK/CYC se une a los elementos E de los promotores de *per* y *tim* y activa su transcripción. PER es forsforilada por DBT Y CK2. TIM es fosforilada por SGG y CK2. PER y TIM también son modificadas por las fosfatasas PP2A y PP1, respectivamente. PER y TIM forman un dímero que se transloca al núcleo y reprime la actividad de dímero CLK/CYC. La E3 ubiquitina ligasa SLIMB, se asocia y ubiquitina al menos a PER hiperfosforilado, marcándolo para degradación por la vía del proteosoma (adaptado de Allada y Cheng, 2010).

La regulación postraduccional de los componentes inhibidores impone un retraso entre la activación de la transcripción mediada por CLOCK/CYCLE (tarde en el día) y la represión de PERIOD/TIMELESS (tarde en al noche). Estos retrasos temporales entre la activación e inhibición resultan en oscilaciones diarias de la transcripción de los genes blanco de CLOCK/CYCLE. Las proteínas PERIOD, TIMELESS y CLOCK tienen ritmos de fosforilación, con picos máximos tarde en la

noche/temprano en el día. PERIOD es forsforilada por DOUBLETIME y CASEINE KINASE 2, potenciando su actividad represora, y TIMELESS es forsforilada por SHAGGY y CASEINE KINASE 2. SUPERNUMERARY LIMB selectivamente se asocia a PERIOD fosforilado por DOUBLETIME y lo ubiquitina, marcándolo para degradación mediante la vía del proteosoma al inicio del día. La degradación de PERIOD hace que no exista represión sobre CLOCK/CYCLE y permite comenzar un nuevo ciclo de activación de la transcripción. El segundo bucle depende de la transcripción del gen *clock* mediada por la unión de los factores VRILLE y PDP1e a su promotor (Fig. 3). PDP1 activa la transcripción de *clock* y VRILLE la inhibe. PDP1 se acumula con retraso respecto a VRILLE, lo que produce una transcripción y un acumulación de CLOCK en fase opuesta respecto a la de PERIOD y TIMELESS (Revisado en Allada y Chung, 2010).



Figura 3. Mecanismo molecular del marcapasos: El segundo bucle. Además de unirse a los promotores de *per* y *tim*, CLK/CYC activa la transcripción de los genes *clockwork orange* (*cwo*), *pdp1*, y *vri* uniéndose al elemento E en sus promotores. PDP1 activa la transcripción de *clk*, y VRI compite con PDP1 reprimiendo la expresión de *clk*. CWO reprime la activación media por CLK/CYC y conferiría robustez a la oscilación de la transcripción (adaptado de Allada y Cheng, 2010).

La sincronización del reloj, dependen de CRYPTOCHROME. La luz activa a CRYPTOCHROME, el cual se une a TIMELESS y promueve su degradación (Stanewsky et al., 1998; Ceriani et al., 1999; Lin et al., 2001; Busza et al., 2004). A la vez, ésto deja inestable a PERIOD que sufre hiperfosforilación y es degradado, reseteando el reloj.

#### El marcapasos central: las neuronas del reloj

En Drosophila, el marcapasos central es un grupo de aproximadamente 150 neuronas por hemisferio en la región protocerebral del cerebro (Helfrich-Förster, 1998; Helfrich-Förster et al., 2007). A grandes rasgos se definen dos grandes grupos, el grupo de neuronas dorsales y el grupo de neuronas laterales; cada grupo con subgrupos de acuerdo a su localización anatómica, tamaño, contenido de neurotransmisores y función (Fig. 4). El grupo dorsal, se divide en tres subgrupos; DN1, DN2 y DN3 (siglas derivadas del término inglés "dorsal neuron"). El DN1 tiene aproximadamente 16 neuronas, el DN2 tiene sólo dos y el DN3 tiene aproximadamente 40. El grupo lateral se divide básicamente en cuatro subgrupos cada uno con distinto número de neuronas: laterales dorsales (LNd, 6 neuronas), laterales posteriores (LPN, 3 a 4 neuronas), laterales ventrales grandes (lLNv, 4 neuronas) y laterales ventrales pequeñas (sLNv, 5 neuronas). A pesar de que cada uno de los subgrupos cumple funciones sobre distintos aspectos de la actividad locomotora a lo largo del día (Perschel y Helfrich-Förster, 2011), uno de los subgrupos se destaca sobre el resto; el subgrupo de las sLNvs. Al igual que las lLNvs, cuatro de las cinco sLNvs expresan el neuropéptido Pigment Dispersing Factor (PDF). En Drosophila, ha sido demostrado que la señalización por medio de este neuropéptido sincroniza los osciladores del cerebro de la mosca (Renn et al., 1999; Park et al., 2000; Peng et al., 2003; Lin et al., 2004).



Figura 4. Neurotransmisores liberados y recibidos por los distintos grupos y subgrupos de neuronas del reloj de *Drosophila melanogaster* (Adaptado de Muraro et al., 2013).

#### Las vías de entrada al reloj

El reloj circadiano en *Drosophila melanogaster* es sincronizado (puesto en hora) mayoritariamente por dos tipos de estímulos que dependen del ambiente. Un estímulo es la temperatura (Yoshii et al., 2002; 2005; Picot et al., 2009) y la otra, aún más relevante, es la luz (Helfrich-Forster, 2002). Ambas pueden actuar por separado, pero actuando en sinergia producen un efecto más robusto sobre el entrenamiento del ritmo tanto a nivel molecular como a nivel del comportamiento (Yoshii et al., 2009).

En la larva y la mosca adulta, distintos órganos visuales recepcionan la luz: el órgano de Bolwig, la retina, los ocelos y el órgano del Hofbauer-Buchner, todos están involucrados (Rieger et al, 2003; Veleri et al., 2007). En la larva, la luz es detectada por un grupo de doce fotorreceptores (FRs) del "ojo de la larva" (el órgano de Bolwig), el cuál esta situado en la porción antero-lateral de la punta anterior de la larva asociado al esqueleto cefalofaríngeo (Steller et al., 1987; Green et al., 1993). Cuatro FRs expresan exclusivamente rodopsina 5 y detectan luz azul, y los ocho restantes expresan exclusivamente rodopsina 6 y detecta luz verde (Malpel et al., 2002; Sprecher y Desplan, 2008). Una de las funciones de este órgano visual en la larva es sincronizar al reloj molecular para que controle su actividad rítmica circadiana. Los FRs forman un fascículo de axones (el nervio de Bowig) que proyecta al neuropilo óptico en el cerebro (centro óptico larval) donde contactan a las LNs (Marpel et al., 2002; Mazzoni et al., 2005) y modulan su plasticidad (Yuan et al, 2011). Cuando la larva pupa, una parte de este órgano visual es rediferenciado y da lugar a un órgano extra-retiniano sensible a la luz en la mosca (el órgano de Hofbauer-Buchner) y la otra parte muere por muerte celular programada (Veleri et al., 2007; Mishra et al., 2013). En la mosca adulta, en la retina distintas rodopsinas contribuyen al entrenamiento del reloj (Hanai et al., 2008; Hanai y Ishida, 2009; Klarsfeld et al., 2011).

En la larva y en la mosca adulta, la sincronización del reloj también esta a cargo de fotopigmentos. CRYPTOCHROME es un fotopigmento sensible a la luz azul, presente en la mayoría, sino en todas las neuronas del reloj (Yoshii et al., 2008) que expresan *period*, formando parte de una vía de entrada independiente del sistema visual (Klarsfeld et al., 2004). Distintos experimentos han permitido demostrar su contribución al control de los ritmos circadianos y su capacidad de responder

directamente a la luz, a pesar de que las neuronas que lo expresan se localizan profundamente en el cerebro (Emery et al., 2000). Como fue mencionado anteriormente, la activación de CRYPTOCHROME afecta la estabilidad de TIMELESS, el cual es subsecuentemente degradado (Stanewsky et al., 1998; Ceriani et al., 1999; Lin et al., 2001; Busza et al., 2004).

#### Las vías de salida

En Drosophila existen distintos comportamientos que son controlados por el reloj de tal modo que se manifiestan de modo rítmico. Algunos ejemplos son la eclosión del adulto (la emergencia de la mosca del pupario al finalizar su metamorfosis; Konopka y Benzer, 1971), la oviposición (Sehgal et al, 1994; Howlader et al, 2006, Howlader y Sharma, 2006), el cortejo sexual (Ashburner, 1987; Fujii et al., 2007), el aprendizaje y la formación de memoria de corto plazo (Lyons y Roman, 2009) y, el quizás más estudiado, la actividad locomotora (Konopka y Benzer, 1971). Centrándome en este último, en condiciones estándar de laboratorio, la mosca tiene un patrón de actividad locomotora característico con una fase de mayor actividad en el día y una fase de reposo (sueño) durante la noche (Hendricks et al., 2000; Shaw et al., 2000). Dado que es un animal de habito crepuscular, su actividad locomotora se intensifica dos veces al día, alrededor de las transiciones entre luz y oscuridad. Se registran entonces dos picos de actividad locomotora, uno que comienza un poco antes que comience el día y que persiste varias horas, y otro pico que comienza unas horas antes de que comience la noche y que persiste también varias horas (Helfrich-Förster, 2000; Panda et al., 2002; Klarsfeld et al., 2003). Las sLNvs que expresan PDF tienen un posición jerárquica en la regulación circadiana (Muraro et al., 2013), y a pesar de que las conexiones sinápticas entre los distintos grupos de neuronas del reloj no están definidas en detalle (Gorostiza et al., 2014), estas neuronas han sido señaladas como las encargadas de mantener el ritmo de actividad locomotora en oscuridad constante (Grima et al., 2004; Stoleru et al., 2004). Las sLNvs proyectan sus axones hacia la región dorsal del cerebro donde se encuentran las DN1 y la pars intercerebralis, porción del protocerebro donde se localizan importantes neuronas del sistema neuroendocrino (Helfrich-Förster et al., 2007), y un posible sitio efector parte de la vía de salida del reloj. Las sLNvs tienen receptores para acetilcolina, glutamato, octopamina, dopamina, PDF y GABA (revisado en Muraro et la., 2013). Además, poseen dos tipos de vesículas sinápticas en sus terminales dorsales, unas grandes y electrondensas cargadas con PDF, y otras pequeñas y claras (Yasuyama y 2010) conteniendo Meinertzhagen, un neurotransmisor desconocido. El silenciamiento eléctrico de estas neuronas mediante expresión transgénica inducible de canales de potasio hiperpolarizantes en estadios adultos, altera el comportamiento rítmico afectando muy poco el ciclado de la expresión de PERIOD, demostrando la relevancia de la actividad eléctrica de esta neurona como parte de la vía de salida del reloj (Depetris-Chauvin et al 2011; revisado en Muraro et al., 2013). Dado que PDF activa la adenilato ciclasa en las sLNvs y que CREB sería la molécula que interconecta el estado eléctrico de estas neuronas con la expresión génica (Mirzka et al., 2012), se ha propuesto un modelo por el cual las señales excitatorias, inhibitorias y otras son integradas en las neuronas del reloj modificando el potencial de membrana, afectando cascadas de transducción que modificarían la expresión génica y afectando la vía de salida (Muraro et al., 2013).

#### **Relojes periféricos**

Sabemos que en los animales, además del marcapasos central localizado en el cerebro, existen osciladores periféricos en varios tejidos, que pueden actuar coordinadamente bajo el control del marcapasos central o de forma independiente (Glossop y Hardin, 2002). En *Drosophila*, experimentos basados en el cultivo *in vitro* de células y tejidos que expresan luciferasa u otros reporteros de la localización de PERIOD o TIMELESS han demostrado la existencia de estos osciladores periféricos en varios tejidos (Allada y Chung, 2010), como las glándulas salivales, el intestino y órganos implicados en la reproducción (Liu et al., 1988; Hege et al, 1997; Hall, 2005). Por otra parte, Cryptocrome también se expresa en células del reloj periférico (Ivanchenko et al., 2001) y que los osciladores pueden ser sincronizados por la luz (Plautz et al., 1997; Giebultowicz et al., 2001), y puede funcionar independiente de un marcapasos central (Hege et al., 1997). Un ejemplo de oscilador periférico que parece ser modulado por el marcapasos central es sugerido en los enocitos, células encargadas de la síntesis de una feromona sexual relevante para el comportamiento de apareamiento. Recientemente, se ha propuesto que la vía PDF originada en el

cerebro (no el PDF de las neuronas de la cadena nerviosa abdominal (Talsma et al, 2012)) controlaría la regulación del reloj periférico de los enocitos, seteando la fase de su reloj en ausencia de otro sincronizador ambiental. Esta señal de PDF no sería necesaria para sostener el ritmo molecular en los enocitos pero su disrupción reduce la hormona sexual masculina y altera el apareamiento (Krupp et al., 2013).

#### Cambios circadianos en la morfología de las neuronas

Los cambios rítmicos diarios en la morfología de las neuronas, definidos como "plasticidad circadiana estructural" (Muraro et al., 2013), son parte de un tipo especial de plasticidad neuronal descubierto hace relativamente poco y observado en grupos evolutivamente muy distantes de invertebrados y vertebrados. La mayor parte de nuestro conocimiento de este apasionante tema se la debemos a estudios hechos en la mosca doméstica (Musca domestica) y Drosophila melanogaster (Pyza y Górska-Andrzejak, 2008; Mehnert y Cantera, 2011; Muraro et al., 2013). Este tipo de plasticidad fue descubierto por Pyza y Meinertzhagen, quienes encontraron que en Musca domestica mantenida en condiciones de 12 horas de luz y 12 de oscuridad (LD), los axones de las interneuronas visuales L1 y L2 del primer neuropilo óptico (la Lamina) tienen mayor diámetro durante el día que durante la noche (Pyza y Meinertzhagen, 1993a, revisado en Meinertzhagen y Pyza, 1996; Pyza y Górska-Andrzejak, 2008). Este proceso es en parte controlado por la luz, los neurotransmisores (Pyza y Meinertzhagen, 1993b, 1995, 1998), las células gliales (Pyza y Górska-Andrzejak, 2004; Górska-Andrzejak, 2013) y por una ATPasa vacuolar (Pyza et al., 2004). Cambios rítmicos similares también fueron encontrados en las mismas neuronas en Drosophila (Pyza y Menertzhagen, 1999).

Cantera y colaboradores (2007) demostraron que también las motoneuronas de *Drosophila* cambian su morfología con un ritmo circadiano. En las terminales de la motoneurona MN5, que inerva dos grandes músculos torácicos de vuelo, el tamaño promedio de los botones sinápticos aumenta de día y disminuye de noche (Fig. 5). Este ritmo se mantiene en condiciones de oscuridad constante (DD) pero no se detecta en mutantes del reloj *period* y *timeless*, demostrando que se trata de un ritmo circadiano y que requiere la actividad de al menos estos dos genes del reloj (Mehnert et al., 2007). La manipulación experimental de la actividad sináptica demostró que los botones de la MN5 aumentan de tamaño durante la mañana también cuando la mosca ha estado paralizada por la mañana, indicando que este ritmo no es una simple consecuencia de los cambios en actividad sináptica correspondientes al ritmo en actividad locomotora (Mehnert y Cantera, 2008). Más aún, el ritmo también persiste hasta dos ciclos consecutivos en moscas decapitadas, las cuales además de no moverse no poseen el marcapasos central, indicando que el ritmo no es una simple consecuencia de la actividad sináptica y que puede ser controlado por un marcapasos periférico (Mehnert y Cantera, 2008), tal como se descubrió posteriormente para el ritmo de diámetro axonal y sitios activos en fotoreceptores de *Drosophila* (Barth et al., 2010).



Figura 5. Cambio circadiano en la morfología de la terminal motora de la MN5 en *Drosophila melanogaster*. Los botones sinápticos son más grandes de día (A) y pequeños en la noche (B). Este ritmo se mantiene dos días consecutivos en LD y DD (C). Escala: 10 micras; asteriscos marcan p<0,00015 (Adaptado de Mehnert et al., 2007).

Un tercer ejemplo lo representan las neuronas sLNvs de *Drosophila*. Dado que estas neuronas utilizan PDF como neurotransmisor, Ceriani y colaboradores (2008) utilizaron inmunohistoquímica con anticuerpos anti-PDF y expresión transgénica de la proteína fluorescente verde como marcador de neuronas que expresan PDF para estudiar la morfología de sus terminales axonales a lo largo de ciclos LD o DD. Ambos métodos demostraron que las terminales axonales de las sLNvs aumentan su complejidad durante el día y la disminuyen durante la noche (Fernández et al., 2008; Gorostiza et al., 2014). Tal como había sido demostrado para la MN5, el ritmo diario de las sLNvs también es mantenido en condiciones de DD y requiere la expresión de *period* y *timeless* (Fernández et al., 2008). Este descubrimiento es de especial interés porque sugiere que la reorganización morfológica de las neuronas del reloj podría

resultar en cambios circadianos en las conexiones sinápticas entre los circuitos de las neuronas del reloj, algo que posteriormente también fue propuesto para los cambios circadianos en los sitios activos de ciertas neuronas en el núcleo supraquiasmático en la rata (Girardet et al., 2010). Recientemente el grupo de Ceriani logró reforzar esta hipótesis al generar datos indicando que la reorganización circadiana de la ramificación del axón de estas neuronas efectivamente es acompañada de cambios en sus conexiones sinápticas (Gorostiza et al., 2014). El establecimiento rítmico de contactos y sitios activos entre distintas neuronas podría formar parte de un mecanismo para distribuir la información circadiana desde las neuronas del reloj a distintos centros y la periferia, resultando finalmente en la generación de un comportamiento circadiano.

#### Cambios circadianos en el número de sitios activos

Una pregunta muy importante sobre la plasticidad neuronal circadiana es si existen ritmos en el número de sitios activos. Ciertos estudios han sugerido que en el cerebro de *Drosophila* el número de sitios activos disminuye durante la noche (Donlea et al., 2009; Gilestro et al., 2009). Sin embargo, en ambos trabajos los autores se limitaron a realizar una estimación indirecta basada en una aproximación inmunohistoquímica y mediante la cuantificación de niveles de proteína por Western blot con anticuerpos específicos para proteínas sinápticas y cuantificación de botones (Donlea et al., 2009; Gilestro et al., 2009), sin confirmar que esos datos representaran verdaderamente cambios en el número de sitios activos.

Una respuesta más directa y contundente a esta pregunta clave requiere la cuantificación de sitios activos, lo cual a su vez requiere la visualización de sitios activos individuales. El único método que actualmente permitiría contar sitios activos con certeza es la microscopía electrónica de transmisión (MET). Una alternativa menos efectiva pero que también podría permitir contar sitios activos con buena precisión sería el uso de herramientas genéticas para realizar marcado *in vivo* o el uso de técnicas inmunohistoquímicas con anticuerpos específicos para proteínas sinápticas y microscopía confocal, en particular si se combina con tecnologías sofisticadas de microscopía confocal como el STED (Kittel et al., 2006). De acuerdo a una revisión reciente (Frank y Cantera, 2014), la única información sobre cambios

circadianos en el número de sitios activos se restringe a muy pocos tipos neuronales en unas pocas especies de animales. Los datos disponibles hasta el momento indican que mientras que el número de sitios activos en algunas neuronas se mantiene constante entre el día y la noche, en otros casos este número aumenta durante el día y en otros durante la noche, sin que exista una clara correlación entre los cambios y la fase de actividad en animales nocturnos o diurnos. Los datos obtenidos con MET corresponden a estudios realizados en las moscas *Musca domestica* y *Drosophila melanogaster*, y en vertebrados, en la rata *Rattus norvergicus*. También existen datos disponibles obtenidos *in vivo* en el pez cebra *Danio rerio* basados en microscopía de dos fotones y captura por "lapso de tiempo" (del término en Inglés "time-lapse microscopy").

En *Musca*, en condiciones LD, dos tipos de sitios activos aumentan en número una vez al día (Pyza y Meinertzhagen, 1993a). Existen al menos dos tipos de sinapsis entre los fotoreceptores y la interneurona L2. En las sinapsis "tétradas" la terminal axonal del fotoreceptor es presináptica con respecto a la L2 mientras que para las sinapsis "feedback" la situación es la opuesta. Ambos tipos de sinapsis cambian el número de sitios activos rítmicamente pero con fase opuesta: mientras en las "sinapsis tétradas" los sitios activos son más abundantes durante el día, en las "sinapsis feedback" los sitios activos son más abundantes durante la noche. (Pyza y Meinertzhagen, 1993a). En *Drosophila*, los contactos sinápticos que forman los fotoreceptores sobre las interneuronas L1 y L2 poseen más sitios activos en el día

En *Rattus*, un conteo de sitios activos en el núcleo supraquiasmático de animales mantenidos en distintas condiciones de iluminación mostró diferentes resultados para distintos tipos de contactos. Al comparar ratas mantenidas en luz y oscuridad constante, fueron detectados cambios en la ultraestructura de botones y sitios activos de las aferentes ópticas pero no se encontraron cambios en el número total de sitios activos (Güldner et al., 1997). En ratas mantenidas en LD, los contactos axo-somáticos de las neuronas glutamatérgicas y no glutamatérgicas sobre las neuronas productoras del neuropéptido Péptido Intestinal Vasoactivo (VIP) tienen un 36% más de sitios activos en el día, mientras que no se detectan cambios en el número de sitios activos en las neuronas que expresan el neuropéptido arginina-vasopresina (Girardet et al., 2010a). De forma similar, fue encontrado que en los contactos axo-

dendríticos sobre las neuronas VIP, el número de sitios activos de las neuronas GABAérgicas no cambia pero el de las no-GABAérgicas tiene un 62% mas de sitios activos en el día (Girardet et al., 2010b). A pesar de estos cambios, los autores propusieron que el número de sitios activos global en el núcleo supraquiasmático se mantiene constante entre el día y la noche (Girardet et al., 2010a; 2010b).

En la larva del pez cebra (*Danio rerio*), en experimentos *in situ* que se destacan por basarse en muestras vivas, las neuronas hipocretinérgicas/orexinérgicas que proyectan a la glándula pineal y al rombencéfalo, muestran un cambio rítmico en el número de "puntos" positivos para Sinaptofisina (marcador de vesículas sinápticas que los autores utilizaron como marcador de sitios activos) en LD, con más puntos durante el día (Appelbaum et al., 2010). Este ritmo persisten DD y exhibiría un cambio de fase respecto a LD, de acuerdo al área de cerebro donde los puntos fueron contados (Appelbaum et al., 2010).

La existencia de ritmos circadianos en el número de sitios activos es un aspecto de la plasticidad neuronal circadiana pero el significado biológico de los ritmos circadianos en la morfología de las neuronas no es del todo comprendido. En las motoneuronas, el cambio rítmico del tamaño de los botones podría estar relacionado con el patrón rítmico de actividad locomotora, el cual en Drosophila implica intervalos intercalados de actividad y descanso, con descanso/sueño consolidado durante la noche y picos de actividad al comienzo y final del día (Klarsfeld et al., 2003). Desde este punto de vista, se predijo que el ritmo morfológico de la motoneurona MN5 podría ser una consecuencia del patrón rítmico de actividad sináptica inherente al ritmo de locomoción, un requerimiento para esto, o una combinación de ambas posibilidades (Mehnert et al., 2007). Sin embargo, tal como se menciona anteriormente, el ritmo en el tamaño de los botones de la MN5 parece ser independiente de la actividad sináptica (Mehnert y Cantera, 2008). De forma especulativa, se había propuesto que como la mosca no vuela de noche (Hendricks et al., 2000; Shaw et al., 2000), la reducción del tamaño de las terminales motoras en la noche podría ser ventajosa porque disminuiría la demanda de energía necesaria para mantener esta estructura (Mehnert et al., 2007). Esto podría tener valor adaptativo dado que, durante gran parte de la vida de la mosca, la disminución rítmica de la estructura sináptica reduciría el alto metabolismo asociado al transporte axonal y a otros procesos biológicos imprescindibles para el mantenimiento de las sinapsis (Mehnert et al., 2007). No obstante, no se sabía si la reducción nocturna del tamaño de los botones en la MN5 también incluye una reducción del número de sitios activos u otros organelos relevantes para la función sináptica, que refuerce esa hipótesis. Más aún, consideramos oportuno estudiar la pregunta sobre la existencia de cambios rítmicos en el número de sitios activos, como problema general, usando la neurona MN5, para la cual ya se conocía que sufre un cambio circadiano en sus botones sinápticos.

# **OBJETIVOS**

En el marco de estos antecedentes postulamos para esta Tesis de Doctorado los siguientes **objetivos generales**:

- Determinar si la ultraestructura sináptica de una terminal motora cambia de forma rítmica entre el día y la noche, usando como modelo la neurona MN5 de la mosca *Drosophila melanogaster*.
- Si existiera tal ritmo, determinar si se trata de un ciclo circadiano.
- Determinar si ese ritmo es controlado por el reloj biológico a través de su control de la actividad sináptica, o de un mecanismo alternativo.

#### Nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

1) Determinar si el número de sitios activos, densidades presinápticas, vesículas sinápticas y otros organelos relevantes para la función de la sinapsis varía de forma rítmica en moscas salvajes mantenidas en ciclos de luz-oscuridad (LD) u oscuridad constante (DD).

2) Determinar cuáles aspectos de la ultraestructura sináptica son abolidos y cuáles persisten en condiciones de arritmia motriz causada por mutaciones en genes del reloj.

3) En caso de encontrar aspectos de la ultraestructura que son abolidos en los mutantes del reloj, determinar posibles "osciladores" candidatos. ¿Desde donde se ejerce el control, desde la propia neurona, la glía u otras células?

4) Determinar cómo son afectados los parámetros estudiados en 1), en moscas mantenidas en ciclo LD y cuya actividad sináptica fue disminuida experimentalmente durante el día por medio de la expresión de transgenes que bloquean selectivamente la actividad sináptica.

5) Por medio de un análisis comparativo de los resultados obtenidos en 1, 2, 3 y 4, establecer un modelo de estudio para clarificar la relación funcional entre reloj biológico, ritmo circadiano en actividad sináptica/locomoción y ritmo circadiano en la morfología/ultraestructura de la motoneurona.

# **MATERIALES Y MÉTODOS**

#### Mantenimiento de cepas de moscas Drosophila melanogaster.

Las cepas de *Drosophila melanogaster* salvajes ("wild type"), mutantes y transgénicas fueron mantenidas en incubadora a temperatura constante ( $25 \pm 1^{\circ}$ C) bajo un régimen de luz controlada en ciclos LD o DD de 12:12 horas de duración. Las cepas utilizadas fueron: *Oregon R* (control normal) las cepas con mutaciones nulas en "genes del reloj"  $tim^{01}$ ,  $tim^{03}$ ,  $tim^{04}$  (con falta de función en *timeless*),  $per^{01}$  (con falta de función en *period*) y el doble mutante  $per^{01}$ ;  $tim^{01}$ . También utilizamos las cepas transgénicas *uas-timelessARNi* (2885 y 2886, VDRC; para el silenciamiento de *timeless* mediante interferencia de ARN), *uas-shi<sup>ts1</sup>* (Kitamoto 2001; para el silenciamiento sináptico por bloqueo reversible de la endocitosis por expresión condicional del dominante-negativo de la Dinamina (Chen et al., 2002), que causa parálisis reversiblemente cuando las moscas son colocadas a 30°C de temperatura (Masur et al., 1990), *ok371-gal4* (para dirigir la expresión deseada en las neuronas glutamatérgicas; Mahr y Aberle, 2006), *repo-gal4* (para dirigir la expresión deseada en las células gliales; Halter et al., 1995) *uas-gfp* (para controlar el funcionamiento cepas glutamatérgicas y de las células gliales),.

#### Uso del sistema GAL4/UAS.

El sistema GAL4/UAS es una herramienta genética que revolucionó el uso de *Drosophila melanogaster* como modelo de investigación. Actualmente, es usado masivamente por la comunidad científica para expresar transgenes de manera dirigida en tejidos o células a elección. Se basa en el uso de dos secuencias de ADN de levadura introducidas en el genoma de *Drosophila*; el gen que codifica para la proteína GAL4 (*gal4*) y la secuencia de ADN llamada *uas* (de "upstream activating sequence"), la cual es reconocida por la proteína GAL4. La unión de la GAL4 y la secuencia *uas* activa la transcripción de la secuencia que se encuentra corriente abajo del *uas* (Fig. 6; Brand y Perrimon, 1993; Duffy, 2002). Funciona como un sistema de

dos módulos. Cada uno de los progenitores (macho y hembra) posee solamente uno de los dos módulos en todas sus células (*gal4* o *uas*). Al cruzar ambos progenitores, se obtiene una progenie de individuos que tienen ambos módulos, el *gal4* y el *uas*, en todas sus células. Al producir las cepas transgénicas *gal4*, se clona el gen *gal4* de tal manera que luego será expresado bajo el control del promotor de un gen endógeno de *Drosophila*. Esto permite obtener cepas en las cuales la expresión del *gal4* ocurre solamente en las células que activan la expresión del gen de interés. Por ejemplo, al construir la cepa transgénica *ok371-gal4* Mahr y Aberle (2006) usaron el promotor del gen que codifica el transportador vesicular de glutamato, lo cual restringe la expresión del *gal4* sólo a las neuronas glutamatérgicas. Como las motoneuronas de insectos son glutamatérgicas, la cepa *ok371-gal4* puede ser usada para expresar transgenes en motorneuronas.

Al producir las cepas transgénicas *uas*, se clona la secuencia *uas* de tal manera que corriente abajo se encuentre una secuencia de interés (Gen X en Fig. 6), como por ejemplo en nuestros experimentos fue el gen *gfp*, que codifica la proteína fluorescente verde (GFP) o el gen *shibire*<sup>ts1</sup>, que codifica para una variante termosensible de la proteína Dinamina.



Activación transcripcional del Gen X

Figura 6. Esquema del sistema GAL4/UAS (adaptado de Brand y Perrimon, 1993).

# Disección de las muestras y procesamiento para microscopía electrónica de transmisión (MET).

Los experimentos fueron hechos con moscas hembras vírgenes de entre 3 y 5 días de edad. Las moscas fueron disecadas en PBS y los tejidos de interés fueron fijados inmediatamente para el procesamiento de MET utilizando un protocolo estándar (glutaraldehído al 2.5% en una solución 4% de paraformaldehído disuelto en cacodilato de sodio 0.1M con pH ajustado a 7.2-7.4, a 4°C durante 3-6 horas y posteriormente una osmificación con tetróxido de osmio al 2% en agua ultrapura a 4°C en oscuridad, durante 1 hora). Se procesó el tercio dorsal del tórax, conteniendo los dos músculos diana de la MN5 (los músculos longitudinales indirectos de vuelo IFM 5 y 6; Ikeda et al., 1980; Ikeda et al., 1988). Las muestras deshidratadas fueron incluidas en resina Durcupan (kit Durcupan ACM de Fluka) y polimerizadas durante 48 horas a 60°C. Los bloques fueron procesados con métodos de rutina para obtener cortes seminfinos (1 micra) y posteriormente cortes ultrafinos (50-60 nm) usando cuchillas de vidrio fabricadas con un cortador de cuchillas Leica EM KMR2 o cuchilla de diamante RMC MT-X ultramicrotome, los cuales fueron colectados en grillas de ventana y secados sobre una película soporte de Formvar. Los cortes fueron contrastados con acetato de uranilo al 3.33% en agua bidestilada y citrato de plomo al 3% en agua bidestilada (producto de la reacción entre citrato de sodio y nitrato de plomo de acuerdo a Reynolds, 1963). El estudio se realizó utilizando los microscopios del IIBCE y Facultad de Ciencias Jeol JEM 100 CX II y Jeol JEM 1010 operados a un voltaje de 80 Kv. Las imágenes fueron obtenidas a magnificaciones de 40000x, 100000x y 150000x con las cámaras digitales de ambos aparatos (DVC y Hamamatsu C4742-95) y procesadas con los programas PhotoImpact y Photoshop.

#### Disección, inmunohistoquímica y microscopia láser confocal.

Se obtuvieron muestras de tejido correspondientes al tercio dorsal del tórax por medio de microdisección bajo una lupa estereoscópica, trabajando con micropincetas Nr.5 de puntas rectas y agujas hipodérmicas. Las muestras fueron fijadas inmediatamente en una solución de paraformaldehído al 4% en PBS 1X con pH ajustado a 7.2-7.4, sobre hielo. Posteriormente, se realizó un corte sagital medial en cada tórax para descartar una de las dos mitades resultantes. Esta operación mejora la penetración de los anticuerpos, garantiza que cada muestra analizada durante la microscopía corresponde a un individuo distinto y que todas las sinapsis encontradas en una muestra corresponden a una única neurona, lo cual es importante para el análisis estadístico. Permeabilizamos el tejido usando 0.3% Triton X100 en PBS 1X (PBT) y bloqueamos con 1% suero normal de cabra en PBT con 0.5% de Albúmina sérica bovina. La incubación con los anticuerpos primarios fue hecha durante toda la noche a 4ºC en agitación, lavamos con PBT e incubamos con los anticuerpos secundarios durante 2 horas a temperatura ambiente en agitación. Luego de lavar con PBT, montamos las muestras en glicerol al 70%. Las imágenes fueron tomadas con un microscopio láser confocal Fluoview FV300 usando un objetivo 60x apertura numérica 1.42 y un aumento digital de 3,5x. Cada una de las imágenes producidas para cuantificar estructuras sinápticas fue una proyección de píxeles de máxima intensidad en el eje Z cubriendo la totalidad del espesor de los axones observados y, por ende, los botones sinápticos observables en la muestra. El procesamiento de las imágenes y cuantificación se realizaron con los programas ImageJ y Photoshop.

#### Experimentos de Silenciamiento y Rescate

Los experimentos de silenciamiento por interferencia de ARN consistieron en reducir los niveles de expresión normal del gen de interés (*timeless*) de forma específica en la MN5 (usando un promotor específico para motoneurona, el *ok371-gal4*) o en la glía (usando un promotor específico para glía, el *repo-gal4*). Estos experimentos se basaron en el sistema GAl4/UAS, por medio del cual se expresó una secuencia de ARN con repetidos de bases invertidas que causa RNAi sobre *timeless*. Estos repetidos invertidos permiten que la molécula lineal de ARN se pliegue por complementación de los repetidos generando una horquilla (Kennerdell y Carthew, 2000), la cual es procesada posteriormente y actúa como elemento regulador marcando a los ARN mensajeros específicos para su degradación. Para estos experimentos realizamos los siguientes cruces usando cepas transgénicas ya existentes. Las moscas *ok371-gal4* (cromosoma II), *repo-gal4* (cromosoma III) y *uas*-

*dicer2* (cromosoma I) fueron cruzadas por moscas conteniendo cromosomas balanceadores (que permiten el "seguimiento" de los cromosomas mediante la detección de fenotipos distinguibles e impiden la recombinación entre cromosomas homólogos), y luego cruzadas para obtener moscas del genotipo *uas-dicer2/FM7;ok371-gal4/CyO/;TM3,Ser/+* (con el promotor glutamatérgico) y *uas-dicer2/FM7;CyO/+;repo-gal4/TM3,Ser* (con el promotor de célula glial). Las moscas *uas-tim-RNAi* (cromosoma II y III) también fueron cruzadas y balanceadas para obtener moscas del genotipo *uas-tim-RNAi* (cromosoma II y III) también fueron cruzadas y balanceadas para obtener moscas del genotipo *uas-tim-RNAi/CyO;uas-tim-RNAi/TM6b*. Posteriormente, para conseguir las moscas de los experimentos de silenciamiento en la MN5 y en la glia cruzamos moscas del genotipo *uas-dicer2/FM7;CyO/+;repo-gal4/TM3,Ser*, respectivamente, por las moscas del genotipo *uas-tim-RNAi/CyO;uas-tim-RNAi/TM6b*.

Los experimentos de rescate fueron realizados sobreexpresando el gen *timeless* en la glia de moscas mutantes para *timeless*. Para ellos, estos también se basaron en el sistema GAL4/UAS, utilizando cromosomas balanceadores y realizando los cruces necesarios. Las moscas *tim<sup>01</sup>* (cromosoma II), *repo-gal4* (cromosoma III) y las *uas-tim* (cromosoma III) fueron cruzadas por moscas conteniendo cromosomas balanceadores y luego cruzadas para obtener los stocks *tim<sup>01</sup>/CyO;repo-gal4/TM6b* y *tim<sup>01</sup>/CyO;uas-tim/TM6b*. Posteriormente, para conseguir las moscas del experimento de rescate en la glía, ambos stocks fueron cruzados entre si, generando las moscas con el genotipo *tim<sup>01</sup>/tim<sup>01</sup>; repo-gal4/uas-tim*. Estas moscas fueron mutantes para *timeless* en todas sus células (no expresan la proteína en ningún tejido) con la excepción de la glía, que sí expresa *tim* por medio del transgen *uas-tim*.

#### Experimentos de Parálisis.

Las moscas de cada genotipo (las generadas del cruces *ok371-gal4 x uas-shi<sup>ts1</sup>*, controles *ok371-gal4 y uas-shi<sup>ts1</sup>*, y control "salvaje" Oregon R) fueron mantenidas a 25°C en LD hasta el día del experimento. La noche previa al mismo, a ZT19, duplicados de cada genotipo fueron colocados a 30°C (la temperatura restrictiva adecuada para este tipo de experimento, de acuerdo a Kitamoto, 2001; Beramendi et al., 2007; Mehnert y Cantera, 2008). Las disecciones y fijaciones fueron hechas a ZT1 (inicio del día; 6 horas de parálisis para las moscas mantenidas a 30°C) y ZT7

(mediodía; 12 horas de parálisis para las moscas mantenidas a 30°C). Tal como era de esperar (Kitamoto, 2001; Beramendi et al., 2007; Mehnert y Cantera, 2008), sólo las moscas generadas a partir de los cruces entre cepas transgénicas quedaron completamente paralizadas a partir de unos dos minutos de ser transferidas a 30°C. Las moscas control no quedaron paralizadas con este tratamiento, lo cual fue confirmado por medio del control visual y siguieron moviéndose durante el experimento independientemente de que fueran mantenidos a 25 o 30°C durante 6 y 12 horas.

#### Análisis Estadístico.

Para el análisis estadístico utilizamos el software Statistica 7.0. Inicialmente realizamos análisis paramétricos ANOVA (para comparaciones entre más de dos muestras) o Student t-test (para comparaciones entre dos muestras). Para ello, analizamos los supuestos de normalidad y homogeneidad usando el test de Shapiro-Wilk W y el test de Levene, respectivamente. De lo contrario, realizamos los test no paramétricos Kluskal-Wallis (para comparaciones entre más de dos muestras) o Mann-Whitney U (para comparaciones entre dos muestras).

### **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

I. Cambios rítmicos en el número de sitios activos en las terminales motoras de *Drosophila melanogaster*.

Con el propósito de cumplir con el objetivo específico 1, utilizamos microscopía electrónica de transmisión (MET) y microscopía láser confocal (MLC) para cuantificar el número de botones y sitios activos entre la noche y el día en ciclos LD y DD.

La MN5 se caracteriza por tener un axón que produce centenas de ramas generando una gran campo polisináptico que se extiende sobre toda la superficie de sus músculos blanco y que queda incluso rodeado por músculo, posiblemente durante el desarrollo de la unión neuromuscular (Ruiz et al., 2013, Fig. 1; Ikeda et al., 1980; Ikeda y Koenig 1988; Mehnert et al., 2007;). En este trabajo encontramos que las ramas primarias están recubiertas por una glía que genera una envoltura de hasta 10 capas concéntricas que establecen uniones septadas entre sí (Ruiz et al., 2013, Fig. 2). Descubrimos que también las ramas secundarias y terciarias están envueltas en glía y que estas ramas penetran ambos músculos en estrecha asociación con la glía. Sin embargo, en este caso las ramas axonales están envueltas por una única capa de glía (Ruiz et al., 2013, Fig. 2). Esta cobertura glial no existe en los sitios activos, donde la membrana de la MN5 queda próxima a la membrana de la célula muscular.

Al momento de realizar la cuantificación, dado que el conteo de todos los botones y sitios activos de las terminales sinápticas de la MN5 exigiría demasiado tiempo del disponible para realizar mi trabajo de tesis, decidimos cuantificar los botones y los sitios activos en un número definido de fotos por mosca tomadas al azar. Analizamos un total de 827 botones utilizando MET y 31741 botones con MCL en total de las muestras a medianoche y mediodía en LD, y a medianoche subjetiva y mediodía subjetivo en DD. A pesar de la diferencia en el número de botones obtenidos para el análisis, consideramos que ambos métodos son complementarios. MET es probablemente el mejor método para identificar y estudiar los sitios activos dado que su resolución permite observarlas individualmente. Sin embargo, esto es posible a expensas de una mayor demanda de tiempo para alcanzar un número adecuado de muestras para realizar el análisis estadístico. Por otra parte, la resolución alcanzada con MLC solo permite identificar sitios activos individuales a través de una marcación inmunohistoquímica fluorescente, con la consiguiente posibilidad de falsos positivos o negativos (puesto que el observador no llega a ver el sitio activo "directamente" y solamente ve "puntos" fluorescentes). Sin embargo, permite obtener un mayor número de muestras en mucho menos tiempo que con MET. En nuestro caso, la gran especificidad del anticuerpo monoclonal anti-Bruchpilot (nc82, DSHB) usado para marcar sitios activos, la calidad de la señal obtenida mediante la marcación inmunohistoquímica fluorescente con nulo ruido de fondo ("background") y la abundancia de datos que confirman su validez como marcador de sitios activos (Wagh et al., 2006; Kittel et al., 2006; Martin-Peña et al., 2006; Besse et al., 2007; Li et al., 2009; Banovic et al., 2010; Liebl et al., 2010; Danjo et al., 2011; Chen y Featherstone, 2011; Sun et al., 2011; Owald et al., 2012), refuerzan la validez de esta aproximación.

Con el fin de testear el método elegido, particularmente para la cuantificación mediante MLC, evaluamos la representatividad de nuestro muestreo (Ruiz et al., 2013, Fig. 1) y comprobamos que nuestras muestras (el volumen de músculo comprendido en el escaneado xyz que generó las imágenes en las cuales se contaron sitios activos) representan aproximadamente el 5% del total del volumen de los músculos de vuelo analizado en cada mosca (Ruiz et al., 2013, Tabla 1). Teniendo esto presente, luego evaluamos lo que definimos como confiabilidad del muestreo, es decir, si la localización del "microvolumen" incide sobre la cantidad de botones y sitios activos contados. Por medio de un estudio sistemático en el cual cuantificamos botones y sitios activos en microvolúmenes distribuidos a lo largo y ancho del músculo (Ruiz et al., 2013, Fig. 1), descubrimos que los botones y sitios activos de las terminales de la MN5 se encuentran distribuidos homogéneamente a lo largo de los músculos. Esto permite concluir que nuestro método de cuantificación, si bien se basa en un 5% del total del volumen de los músculos, permite generar datos representativos del total de la terminal axonal (Ruiz et al., 2013, Fig. 1 y Fig. Suplementaria 3).

Por otra parte, evaluamos la calidad de la inmunofluorescencia encontrando que los puntos de fluorescencia anti-Bruchpilot obtenidos pueden ser fácilmente contados gracias a su excelente marcación fluorescente contra un tejido circundante sin fluorescencia ("background") y a la suficiente distancia (micras) entre sitios activos contiguos a lo largo de la terminal. Es importante notar que cada uno de estos "puntos fluorescentes" a lo largo de una terminal neuromuscular de Drosophila corresponde a la barra "T" de un sitio activo (Ruiz et al., 2013, Fig. 3; Marrus y DiAntonio, 2004; Martin-Peña et al., 2006; Besse et al., 2007; Li et al., 2007; Schmid et al., 2008; Ataman et al., 2008; Fouquet et al., 2009; Viquez et al., 2009; Chen y Featherstone, 2011; Sun et al., 2011), una densidad presináptica característica de insectos (Trujillo-Cenoz, 1969; Koenig e Ikeda, 1999). En los cientos de sitios activos que identificamos con TEM, una sola vez encontramos una que contuviera más de una barra "T" (el correlato TEM del punto fluorescente visto con LCM). Para confirmar aún más esta correlación por medio de otro método, hicimos doble marcaje con anticuerpos específicos para el elemento post-sináptico (receptores de glutamato) y encontramos que prácticamente cada punto Bruchpilot tiene correspondencia espacial con un "punto" de inmunofluorescencia que corresponde a un acumulo de receptores de glutamato. Esto refuerza nuestra opinión de que en el caso de la MN5, el conteo de los puntos Bruchpilot, por sí solo puede ser usado para obtener una buena estimación del número de sitios activos (Ruiz et al., 2013, Fig. 3), tal como se ha hecho en estudios de otras motoneuronas (Marrus y DiAntonio, 2004; Fouquet et al., 2009; Wagh et al., 2006; Kittel et al., 2006; Pielage et al., 2006; Besse et al., 2007; Banovic et al., 2010; Chen y Featherstone, 2011; Jordán-Alvarez et al., 2012; Owald et al., 2012). Todos estos resultados nos permiten concluir que con nuestro método es posible detectar diferencias en el número de botones y sitios activos entre las muestras, a pesar de comparar una pequeña porción de cada terminal sináptica.

El número de botones fue mayor a medianoche que a mediodía en LD y lo mismo ocurrió a medianoche subjetiva respecto al mediodía subjetivo en DD (Ruiz et al., 2013, Fig. 4). Posteriormente, evaluando si este cambio en el número de botones es acompañando por un cambio en el número de sitios activos, encontramos que la proporción de botones con sitios activos es mayor a medianoche que a mediodía en LD pero al revés en DD (Ruiz et al., 2013, Fig. 5).

Encontramos además que la mayoría de los botones tienen un único sitio activo, menos botones tienen dos sitios activos y menos aún tienen tres o más sitios activos (Ruiz et al., 2013, Figs. 6C y D), lo que diferencia a estos botones de la mosca
adulta de los estudiados frecuentemente en la larva, donde cada botón posee un número de sitios activos muy superior (Atwood et al., 1993; Budnik y Ruiz-Cañada, 2006; Collins y DiAntonio, 2007). Este mantenimiento de la distribución de sitios activos por botón en la MN5 contrasta con el cambio diario en el número de botones, sugiriendo que a medida que la terminal pierde o gana botones, un mecanismo homeostático garantiza que se mantenga la distribución de sitios activos entre los botones. Esta distribución tan regular, independiente del momento del día, junto a nuestra cuantificación del número de sitios activos, indica que en condiciones LD la MN5 tiene más sitios activos a medianoche que a mediodía.

Un aumento en la proporción de botones con sitios activos a medianoche en LD pero no en DD (Ruiz et al., 2013, Fig. 5), sugiere la existencia de un mecanismo de ensamblaje y desensamblaje de sitios activos a lo largo del día que depende en parte de la luz. Consideramos poco probable que estas diferencias entre LD y DD se deban principalmente a diferencias en la actividad locomotora, dado que *Drosophila* muestra un patrón diario de actividad de locomoción similar en ambas condiciones de iluminación, con más actividad locomotora durante el día (Saunders, 2002; Helfrich-Forster, 2010). No obstante, fuera de las condiciones experimentales usadas para el registro de actividad locomotora, podrían existir diferencias en la actividad sináptica de la MN5 sobre músculos de vuelo, no detectadas con los ensayos usados por los autores que cuantificaron la locomoción total de la mosca en condiciones de LD y DD. Es importante recordar que los ensayos más usados en los estudios de actividad motora a lo largo del día se basan en la detección automatizada de los movimientos de moscas encerradas en tubos cuyo diámetro no les permite volar y por lo tanto representan principalmente movimientos efectuados con las patas

La existencia de más sitios activos en la noche, cuando la mosca no vuela, no concuerda con el resultado esperado. En efecto, nuestra hipótesis original era que de existir un ciclo circadiano en el número de sitios activos en una motoneurona, habría más sitios activos en la fase del día, cuando esta neurona mantiene una actividad sináptica considerablemente más intensa que en la fase de reposo. En el caso de la neurona estudiada en este trabajo, puesto que la mosca no vuela de noche sino de día, pronosticábamos que tendría más sitios activos durante el día. Esta hipótesis coincidía con una más general, llamada Hipótesis de Homeostasis Sináptica (SHY) y propuesta originalmente por Tononi y Cirelli (2003) para explicar la función del sueño.

Básicamente, SHY propone que durante el período de actividad sináptica (la vigilia) las neuronas forman sitios activos más grandes, más eficientes y más numerosas. A esto se lo denomina "potenciación" y se estima que debería tener un límite (por ejemplo, el límite físico, de espacio y energía, que impediría que el cerebro aumente constantemente el número de sitios activos, su tamaño y eficiencia, a lo largo de la vida). La solución propuesta por Tononi y Cirelli es que durante el sueño (reposo) muchos sitios activos perderían eficiencia y tamaño, y algunas desaparecerían, lo cual estos autores denominaron "renormalización". La función del sueño según SHY sería entonces impedir que la potenciación, ocurrida durante la actividad sináptica más intensa de la vigilia día tras día, llegara a interferir con el correcto funcionamiento del cerebro, por exceso de sitios activos, eliminando sitios activos durante la fase de reposo. Esta hipótesis ha sido criticada sobre la base de abundantes resultados moleculares, morfológicos, funcionales y otros, que no coinciden con ella (Frank, 2012; Frank y Cantera, 2014).

Es importante señalar que los estudios que ofrecen datos sobre cuantificación de sitios activos durante el reposo y la vigilia, o comparando distintos momentos del ciclo LD, son muy escasos y aportan tres tipos de resultados en proporciones similares: en algunos casos no se han demostrado cambios a lo largo del ciclo LD (o DD), en otros el cambio coincide con la predicción de SHY y en otros, por último, muestran exactamente lo contrario (Frank y Cantera, 2014). En este contexto, nuestros resultados constituyen un nuevo y fuerte ejemplo en contra de la hipótesis SHY.

Nuestros resultados, fortalecidos por haberlos conseguido con dos métodos distintos y con un número de muestras que consideramos suficientes, nos obligan a proponer una hipótesis alternativa. Proponemos la existencia de un ritmo de ensamblaje de sitios activos durante la noche y de degradación durante el día. Al final de la noche, la mosca comienza su fase de actividad con botones pequeños (Menhert et al., 2007; Menhert y Cantera, 2008), y con un máximo de sitios activos recientemente ensambladas y cargadas con vesículas más grandes que las que se encuentran durante el día (Ruiz et al., 2010). A lo largo del día, cuando la mosca vuela, los botones de la MN5 crecen por la continua adición de membrana por la fusión de vesículas durante la actividad sináptica. Al mismo tiempo, una gran cantidad de sitios activos dañados por el uso intenso, son gradualmente degradadas

mediante un programa general y ordenado de desensamblaje de sitios activos, el cual explica la reducción en el número de sitios activos durante el día. Esta degradación controlada no es en sí misma algo particular de los sitios activos, puesto que también afecta a las mitocondrias, vesículas y otros organelos en prácticamente toda célula viva; la clave radica en que ocurre rítmicamente, de modo predecible. Al comenzar una nueva noche, durante la fase de reposo, la MN5 repone los sitios activos por medio de una nueva ronda de ensamblaje de sitios activos y de cargado de vesículas sinápticas, acompañada por un rearreglo de sus terminales sinápticas que incluye la formación de nuevos botones. Finalmente, al comenzar la siguiente fase de vigilia, la MN5 contaría con una dotación de sinapsis enriquecida en sitios activos recientemente formados. Esta hipótesis es consistente con los datos que existen respecto al tiempo que toma el ensamblaje de sitios activos en *Drosophila*; unas horas en las terminales motoras (Fouquet et al., 2009; Rasse et al., 2005; Ataman et al., 2008) y apenas algunos minutos en neuronas del cerebro (Rybak y Meinertzhagen, 1997).

Esta hipótesis podría ser testeada utilizando distintas aproximaciones metodológicas. Utilizando moscas transgénicas, el sistema GAL4/UAS y microscopía de lapso de tiempo, una opción sería expresar por un breve lapso de tiempo, ciertas proteínas constituyentes de sitios activos que contengan una "marca" detectable, que nos permita cuantificar la cantidad de sitios activos generadas en un intervalo de tiempo definido y estudiar su eliminación. Por otra parte, a nivel de la transcripción, una onda intensa de sinaptogénesis que dure unas pocas horas podría dejar "marcas" en el transcriptoma de muestras de tejido del tórax o, con mayor detalle, de muestras de citoplasma de MN5 obtenidas utilizando herramientas electrofisiológicas o por separación de células marcadas con fluorescencia (FACS). Adicionalmente, el uso del sistema GAL4/UAS condicional, para dirigir la interferencia de ARN de genes apropiados con el objetivo de bloquear o reducir el potencial de la MN5 para formar sitios activos durante la noche, llevaría a que la MN5 tuviera pocas y "viejos" sitios activos al día siguiente. En ese momento, un estudio por electrofisiológia podría definir si la MN5 es capaz de funcionar normalmente con sitios activos "viejos".

## II. Las vesículas sinápticas en los sitios activos motoras cambian su tamaño y distribución entre el día y la noche.

Para continuar cumpliendo con el objetivo específico 1, utilizamos la colección de fotos de botones sinápticos obtenida con MET para estudiar distintos organelos asociados a los sitios activos. Los organelos fácilmente identificables son las mitocondrias, los endosomas, los cuerpos multivesiculares y las vesículas electron-densas, pero en esta parte del trabajo presento los resultados del estudio de las vesículas sinápticas, por su importancia para la función sináptica. Conteniendo los neurotransmisores, las vesículas se encuentran asociadas a los sitios activos o se localizan en su cercanía formando parte de distintas subpoblaciones con distintas funciones (Rizzoli y Betz, 2005). Teniendo en cuenta que en la MN5 se ha demostrado una correlación entre el número de vesículas y la cantidad de neurotransmisor liberado (Koenig e Ikeda, 1989) y que en distintas motoneuronas se ha descrito que existe una correlación entre el tamaño de las vesículas y la cantidad de neurotransmisor liberado (Zhang et al, 1998; Karunanithi et al 2002), consideramos que el estudio de posibles cambios rítmicos en estos parámetros (número, tamaño y distribución) de la vesículas es una buena aproximación para investigar qué es lo que ocurre con las vesículas como parte de una reorganización de la sinapsis.

Analizamos un total de 140 botones con sitios activos y barra T cuya calidad permitiera contar y medir las vesículas en muestras obtenidas a intervalos de 6 horas en ciclos LD y DD. Dado que la terminología que nombra a las distintas subpoblaciones de vesículas no esta completamente definida (Rizzoli y Betz, 2005), elegimos una definición simple *ad hoc*. Definimos a las vesículas que se localizan en la zona activa (ver detalles en materiales y métodos) como las vesículas de la zona activa (AZVs) y a que se localizan fuera de la zona activa, como la vesículas de reserva (RPVs), la cual concuerda con lo que es generalmente aceptado y que nos permite determinar un posible ritmo en las vesículas sinápticas. Además seguimos un criterio previamente utilizado (Fox, 1988), incluso en sinapsis motoras de *Drosophila* (Karunanithi et al., 2002), que plantea que una muestra de 200 vesículas es suficiente para realizar una estimación adecuada del tamaño promedio (no absoluto) y la distribución de vesículas.

Las fotos de botones conseguidas a gran magnificación permiten muy claramente identificar los sitios activos para contar y medir las vesículas sinápticas (Ruiz et al., 2010, Fig. 1). Encontramos que en LD las AZVs son más pequeñas que las RPVs al inicio del día y al inicio de la noche (Ruiz et al., 2010, Fig.2), mientras que a mediodía y medianoche las vesículas de ambas subpoblaciones tienen tamaños similares. Además, el tamaño de las AZVs cicla teniendo tamaños más pequeños al inicio del día y de la noche. Ambos resultados refuerzan una correlación entre el tamaño de las vesículas y los momentos de mayor actividad locomotora y concuerdan con la visión de que las vesículas tienen un tamaño menor durante los periodos de intensa actividad sináptica (Atwood y Karunanithi, 2002). En otras preparaciones se ha demostrado que la actividad sináptica produce una reducción del tamaño de las vesículas (Zimmerman y Whittaker, 1974) y la inactividad un aumento en su tamaño, que revierte por la actividad (Maler y Mathieson, 1985; Murthy et al., 2001). Un tamaño menor de las vesículas durante los periodos de intensa actividad sináptica, implicaría una disminución en la cantidad de neurotransmisor liberado por cada vesícula, produciendo una disminución en el tamaño del "cuanto" (Karunanithi et al., 2002). Sin embargo, esto no ocurriría si el determinante del tamaño del "cuanto" fuera la cantidad de neurotransmisor liberado por la vesículas (Hanse y Gustafsson, 2001; Ishikawa, 2002), y si además dependiera de la duración de la apertura del poro en la fusión de la vesícula y de la eficiencia de la liberación del neurotransmisor (Elhandani et al 2001; Renger et al, 2001). En cuanto a las diferencias de tamaños de las vesículas entre las subpoblaciones, esto podría depender del contenido de lípidos y proteínas que poseen sus membranas, y de las distintas proteínas adaptadoras que participan en el proceso de endocitosis y clasificado de vesículas durante la endocitosis (Poudel y Bai, 2014). Como parte del proceso de endocitosis, se ha sugerido la existencia de una relación directa entre la presencia de ciertas proteínas en las vesículas y la morfología que éstas adoptan (Gu et al., 2013).

En DD, las AZVs son más pequeñas que las RPVs también al mediodía subjetivo y en la medianoche subjetiva y no encontramos cambios en el tamaño de las AZVs a lo largo del día (Ruiz et al., 2010, Fig. 2). Esto sugiere que el mecanismo que dirige el cambio rítmico del tamaño de estas vesículas depende en parte de la luz. El análisis de la distribución de las vesículas en LD y DD mostró que la mayoría de las vesículas fueron encontradas en la RPV, como fue previamente reportado para esta

neurona (Koenig y Ikeda, 1989) y en otros modelos (Rizzoli y Betz, 2005). Sin embargo, una vez al día y existiendo diferencias de fase entre LD y DD, la proporción de AZVs es la misma que la de RPVs (Ruiz et al., 2010, Fig. 2). Existe poca información respecto al mecanismo que controla la distribución de vesículas, pero sabemos que en *Drosophila* la proporción de vesículas asociadas a sitios activos y listas para ser liberadas aumenta en mutantes *dunce* y disminuye en mutantes *rutabaga*, los que se espera esté acompañando de mayores o menores niveles de AMPc, respectivamente (Renger et al., 2000).

Esta parte de mi trabajo muestra por primera vez la existencia de cambios rítmicos en el tamaño y la distribución de las vesículas sinápticas localizadas en dos poblaciones que definimos claramente respecto a los sitios activos, indicando un ritmo de reorganización circadiana en uno de los organelos más relevantes para la función sináptica. Asimismo, los resultados indican que además de la influencia de la luz, el ritmo en las vesículas dependería en buena parte del ritmo en la actividad sináptica relacionado al ritmo en la actividad locomotora.

# III. Los genes del reloj *timeless* y *period* son inhibidores de la sinaptogenesis en las terminales motoras de *Drosophila* actuando a distintos niveles.

Con el fin de cumplir con los objetivos específicos 2 y 3, primero estudiamos la expresión de *tim* y *per* en la unión neuromuscular de la MN5 mediante inmunohostoquímica. Luego utilizamos MLC para cuantificar el número de botones y sitios activos en moscas mutantes para los genes del reloj *timeless (tim)* o *period (per)* entre la media noche y el mediodía, en moscas de los experimentos de silenciamiento por interferencia de ARN (ARNi) y de rescate de fenotipo.

En este trabajo analizamos 14416 botones de los distintos mutantes del reloj estudiados, 34729 botones en experimentos de ARNi de *tim* en la MN5, 32712 botones en experimentos de ARNi de *tim* en la glía y 37297 botones en experimentos de rescate de expresión de *tim* en la glía en muestras fijadas a medianoche subjetiva y mediodía subjetivo en DD. Tanto el número de botones como el de individuos estudiados nos permiten considerar que los resultados son representativos.

Dado que en un estudio previo fue reportado que la terminal sináptica de la MN5 muestra sobre-ramificación y morfología anormal del axón en las moscas mutantes *tim* y reducción de las ramificaciones en las moscas mutantes *per* (Mehnert et al., 2007), y que algo similar ocurre en neuronas del reloj (Fernández et al., 2008), decidimos iniciar este trabajo analizando cuidadosamente la neuroanatomía de la MN5 en ambos mutantes. Encontramos casos esporádicos de sobre-ramificación en el mutante *tim*, pero el fenotipo más consistente y claro fue detectado en el tamaño de los botones sinápticos. Encontramos que los botones son más grandes en el mutante *tim* y más pequeños en el mutante *per* relativo a las moscas control salvaje (Manuscrito Ruiz et al., Fig. Suplementaria 1).

En moscas salvajes, la terminal sináptica de la MN5 tiene más botones a medianoche subjetiva que a mediodía subjetivo en DD (Ruiz et al., 2013; Manuscrito Ruiz et al, Fig. 1A). La mutación en per incrementa esta diferencia, pero las tres mutaciones en tim que estudiamos la eliminan (Manuscrito Ruiz et al., Fig. 1A). De forma inversa, el doble mutante tiene más botones a mediodía que a medianoche (Manuscrito Ruiz et al., Fig. 1A). Al estudiar la proporción de botones con sitios activos, no encontramos diferencias entre la medianoche y el mediodía en las moscas salvajes y las mutantes tim. Sin embargo, en el mutante per la proporción de botones con sitios activos fue mayor a medianoche que a mediodía y en el doble mutante fue mayor a mediodía que a medianoche (Manuscrito Ruiz et al., Fig. 1B). La proporción de botones sin sitios activos muestra resultados muy similares a los obtenidos para la proporción de botones (Manuscrito Ruiz et al., Fig. 1C); encontramos una diferencia entre la medianoche y el mediodía existente en las moscas salvajes o en el mutante per, la cual desaparece en las moscas mutantes tim. Todos estos resultados muestran que ambos genes ejercen cierto control sobre el número de botones pero tienen funciones parcialmente distintas sobre el ritmo. Mientras que tim parece definir el cambio rítmico en el número de botones a lo largo del día, a través del control del número de botones sin sitios activos, per por su lado controlaría la amplitud del cambio. Además, independientemente del momento del día, encontramos que en ambos mutantes aumenta el número de botones, botones con sitios activos y botones sin sitios activos relativo a las moscas salvajes (Manuscrito Ruiz et al., Fig. 1D-E), y también aumenta la proporción de botones con sitios activo relativo a la de botones que no tiene sitios activos (Manuscrito Ruiz et al., Fig. 2). Esto nos permite postular que *tim* inhibiría fuertemente la formación de botones sin sitios activos a mediodía y *per* lo haría a medianoche. Esta es la primera vez que se le adjudica a estos genes una función anti-sinaptogénica.

Ambos genes también parecerían actuar como inhibidores de la sinaptogénesis a través de un mecanismo que limita la adición de sitios activos a botones "vacíos" (botones sin sitios activos; Ruiz et al., 2013) y muy probablemente a botones con un sitio activo para generar botones con dos sitios activos en el caso de *tim* y botones con tres sitios activos en *per* (Manuscrito Ruiz et al., Fig. 3). Esto refuerza la idea de que la plasticidad circadiana en la MN5 estudiada en este trabajo es controlada por un mecanismo que regula la formación de sitios activos (Ruiz et al., 2013).

Resulta muy interesante haber encontrado que la proteína PER se expresa en el axón de la MN5 y que la proteína TIM lo hace en la glía que lo envuelve (Manuscrito Ruiz et al., Fig. 4). Esta expresión diferencial en principio no coincide con el modelo de mecanismo molecular del reloj, para el cual ambas proteínas deben estar en la misma célula para así formar un dímero y entrar al núcleo para actuar sobre la transcripción (Allada y Cheng, 2010). Sin embargo, al no haber estudiado la localización subcelular de ambas proteínas en el soma de la motoneurona, no sabemos si TIM y PER se localizan juntas en el soma de la MN5.

El haber encontrado esta expresión diferencial permite realizar otras consideraciones respecto al mecanismo de control de los cambios estructurales rítmicos diarios en la unión neuromuscular. La hipótesis inicial planteaba que el ritmo en la MN5 era controlado por un mecanismo no autónomo dependiente de los genes del reloj, probablemente dirigido por un marcapasos periférico, por hormonas, la glía, o por otras interneuronas (Mehnert et al., 2007; Mehnert and Cantera, 2008). Nuestros resultados muestran que el silenciamiento de *tim* en la glía es suficiente para inducir parte del fenotipo observado en el mutante *tim*, un aumento en el número de botones (Manuscrito Ruiz et al., Fig. 5A), botones con sitios activos (Manuscrito Ruiz et al., Fig. 5B) y botones sin sitios activos (Manuscrito Ruiz et al., Fig. 5C). Además, la expresión de una copia salvaje del gen *tim* en la glía del mutante *tim* (que produce un aumento de la expresión de TIM en estas células (Manuscrito Ruiz et al., Fig. Suplementaria 2) fue suficiente para rescatar el fenotipo salvaje, evidenciable a través del número de botones (Manuscrito Ruiz et al., Fig. 5D), de botones con sitios activos (Manuscrito Ruiz et al., Fig. 5E), de botones sin sitios activos (Manuscrito Ruiz et al., Fig. 5L), de botones sin sitios activos (Manuscrito Ruiz et al., Fig. 5L), de botones sin sitios activos (Manuscrito Ruiz et al., Fig. 5L), de botones sin sitios activos (Manuscrito Ruiz et al., Fig. 5L), de botones sin sitios activos (Manuscrito Ruiz et al., Fig. 5L), de botones sin sitios activos (Manuscrito Ruiz et al., Fig. 5L), de botones sin sitios activos (Manuscrito Ruiz et al., Fig. 5L), de botones sin sitios activos (Manuscrito Ruiz et al., Fig. 5L), de botones sin sitios activos (Manuscrito Ruiz et al., Fig. 5L), de botones sin sitios activos (Manuscrito Ruiz et al., Fig. 5L), de botones sin sitios activos (Manuscrito Ruiz et al., Fig. 5L), de botones sin sitios activos (Manuscrito Ruiz et al., Fig. 5L), de botones sin sitios activos (Manuscrito Ruiz et al.,

Fig. 5F) y de la proporción de botones con una, dos y tres o más sitios activos (Manuscrito Ruiz et al., Fig. 6). Por lo tanto, nuestros resultados apoyan la idea que en la mosca salvaje, la expresión de *tim* en el la glía contribuye con el cambio circadiano en el número de botones y sitios activos en esta unión neuromuscular, controlando la formación de botones y sitios activos. Este mecanismo molecular de control podría depender además de la expresión de *per* en la neurona. Sin embargo, como nuestros experimentos fueron hechos con un promotor glial (*repo-gal4*) que se expresa en varios tipos de glía, debemos considerar también la posibilidad de que el reloj periférico no esté localizado en la glía periférica que recubre al axón en el nervio, donde localizamos la proteína TIM, sino en glías del sistema nervioso central, rodeando al soma de la MN5 o a distancia de él que no fueron estudiadas.

En este trabajo, presentamos evidencias que muestran que los genes del reloj *tim y per* forman parte de un mecanismo que controla cambios rítmicos diarios en el número de botones y sitios activos en la unión neuromuscular de la MN5. También nos permitió ampliar nuestro conocimiento y con ello, complementar la explicación presentada en Ruiz et al., 2013 respecto a la plasticidad circadiana estructural de la MN5. Al final de la noche, la MN5 ya generó un gran número de botones y sitios activos. A lo largo del día, cuando el vuelo requiere actividad sináptica de la MN5, muchos sitios activos son gradualmente desensambladas y muchos botones eliminados, y posiblemente reciclados a cargo de un programa de desensamblaje, eliminación y reciclaje. Este proceso afecta mayoritariamente la subpoblación de botones sin sitios activos (que han perdido su sitio activo en la fase de actividad durante el día) y requiere al menos la expresión de *tim* en la glía y posiblemente de *per* en la neurona. *tim y per* también controlan la distribución de sitios activos en los botones, limitando la adición de sitios activos a los botones vacíos. A la noche siguiente, durante el reposo, la MN5 repone los botones y las sitios activos.

# IV. La actividad sináptica y la endocitosis estarían involucradas en la formación de botones y sitios activos en las terminales motoras de *Drosophila*.

El último de los objetivos de esta tesis es determinar si el ritmo circadiano en

el número de botones y sitios activos descubierto en la terminal motora de la neurona MN5 es controlado por el reloj biológico a través de su control de la actividad sináptica o de un mecanismo alternativo. La pregunta que más nos interesa en este sentido es si esos cambios son dependientes de la actividad sináptica de la MN5. En general, los estudios de plasticidad neuronal atienden a casos de plasticidad dependientes de la actividad. Pero en el caso específico de los ritmos circadianos investigados en esta tesis, podría sospecharse que esta plasticidad no depende de la actividad sináptica, porque dos aproximaciones experimentales demostraron anteriormente que el ritmo circadiano en el tamaño de los botones de la MN5 es independiente de la actividad sináptica. En efecto, este ritmo resiste tanto el bloqueo de la actividad sináptica inducido durante unas horas por la expresión de una mutación de la Dinamina codificada por el gen shibire (ver abajo), como la parálisis crónica durante 48 horas causada por decapitación (Mehnert y Cantera, 2008). En contraste con este antecedente, los datos sobre ritmos diarios en el tamaño de las vesículas sinápticas resumidos anteriormente indicaron una posible dependencia de la actividad sináptica. Las vesículas adoptan tamaños pequeños dos veces al día, en los momentos de mayor actividad locomotora (Ruiz et al., 2010).

A diferencia de los puntos anteriores de esta tesis, este trabajo no fue incluido en ninguno de los artículos publicados o en el manuscrito presentado en el Punto III.

Para investigar la pregunta planteada, cuantificamos el número de botones y sitios activos en moscas cuya actividad sináptica fue bloqueada por la expresión transgénica de una variable mutante termosensible de la proteína Dinamina (Chen et al., 2002). Esta construcción transgénica ha sido usada con éxito para bloquear la actividad sináptica en una gran variedad de neuronas (Kitamoto, 2001; Kitamoto 2002), incluyendo motoneuronas (Beramendi et al., 2007; Mehnert y Cantera, 2008). La mutación produce una proteína sensible a la temperatura, que no causa efectos aparentes en la locomoción a temperaturas llamadas "permisivas" (que en nuestro experimento fue 25°C) pero paraliza cada una de las moscas que portan la mutación cuando son transferidas a 30°C (temperatura restrictiva, Chen et al., 2002). A la temperatura restrictiva, la Dinamina mutada adquiere un efecto dominante negativo, lo cual en este caso significa que bloquea a la Dinamina endógena (no mutada), bloqueando así la endocitosis. Esto indirectamente bloquea la actividad sináptica

consecuencia, dada la falta de otros datos adicionales, no es posible discriminar aquí entre las alteraciones causadas por el bloqueo de la actividad o la endocitosis.

En este trabajo analizamos 49062 botones sinápticos obtenidas de muestras fijadas a intervalos de 6 horas en LD, al inicio del día (momento de gran actividad locomotora) y al mediodía (momento de baja actividad locomotora) a una temperatura de 25°C y a 30°C (temperatura restrictiva que produce la parálisis).

Encontramos que la proporción de botones es menor al inicio del día que al mediodía en las moscas cuya actividad sináptica fue bloqueada (Fig. 7A). Al no encontrar este cambio en la proporción de botones con sitios activos (datos no mostrados), pero sí en la proporción de botones sin sitios activos (Fig. 7B), podemos decir que la diferencia en la proporción de botones entre el inicio del día y el mediodía dependería directamente del cambio en la proporción de botones sin sitios activos. Esto sugiere que la actividad sináptica sería relevante para el mantenimiento de la proporción de los botones sin sitios activos.



Figura 7. Proporción de botones totales y botones sin sitios activos en la terminal sináptica de la MN5 en moscas paralizadas en LD. A) Proporción de botones totales. La proporción de botones es mayor al inicio del día que a mediodía en las moscas control ok371-gal4 (ZT1,  $0.57 \pm 0.04$  vs. ZT7,  $0.43 \pm 0.04$ , Student test, p = 0.0268) y menor al inicio del día que a mediodía en las moscas ok371-gal4;uas-shi<sup>ts1</sup> (ZT1,  $0.42 \pm 0.04$  vs. ZT7,  $0.58 \pm 0.05$ , Student test, p = 0.0490) a 30°C, únicas moscas paralizadas. B) Proporción de botones sin sitios activos. La proporción de botones sin sitios activos es mayor al inicio del día que a mediodía en las moscas control ok371-gal4 (ZT1,  $0.59 \pm 0.08$  vs. ZT7,  $0.41 \pm 0.06$ , Student test, p =

0.0088) a 30°C y en las moscas ok371-gal4;uas-shi<sup>ts1</sup> (ZT1, 0.61 ± 0.06 vs. ZT7, 0.39 ± 0.04) a 25°C. Sin embargo, fue menor al inicio del día que a mediodía en las moscas ok371gal4;uas-shi<sup>ts1</sup> (ZT1, 0.36 ± 0.04 vs. ZT7, 0.64 ± 0.08, Student test, p = 0.0128) a 30°C. Todos los gráficos muestran el promedio ± error estándar. \*  $\leq$  0.05 y \*\*  $\leq$  0.01. Número de moscas analizadas y otros análisis adicionales se detallan en el Anexo.

Encontramos también que el bloqueo de la actividad sináptica no afecta las proporciones de botones con un sitio activo, dos o tres (o más sitios activos). Por el contrario, se mantienen las proporciones normales, es decir, la mayoría de los botones tienen una solo sitio activo, menos tienen dos sitios activos y menos aún tienen tres o más sitios activos (comparar Fig. 8A con 8B; Ruiz et al., 2013; Manuscrito Ruiz et al).



Figura 8. Distribución de los sitios activos en los botones de la MN5 de *Drosophila* al bloquear la actividad sináptica. La proporción de botones con una, dos y tres sitios activos o más se mantiene inalterada en moscas mantenidas a 25°C (temperatura permisiva; A) y a 30°C (temperatura restrictiva; B), independientemente del genotipo. Además, al comparar las proporciones entre 25°C y 30°C, encontramos una única diferencia; los botones con tres o más sitios activos a mediodía a 25°C es mayor que a 30°C, cuando la mosca está paralizada (ZT7,

 $25^{\circ}$ C,  $0.10 \pm 0.02$  vs.  $30^{\circ}$ C,  $0.06 \pm 0.01$ , Student test, p = 0.0183). Todos los gráficos muestran el promedio  $\pm$  error estándar. \*  $\le 0.05$ , \*\*  $\le 0.01$  y \*\*\*  $\le 0.001$ .

Del análisis de las muestras mantenidas a 25°C, a pesar de tratarse de la temperatura permisiva, se desprende que la Dinamina termosensible estaría siendo afectada parcialmente como ha sido descrito en estudios previos (Kim y Wu, 1987; Masur et al., 1990; Kilman et al., 2009), dejando en evidencia una desinhibición de la proporción de botones con un sitio activo y una falla en el mantenimiento de la proporción de botones con tres o más sitios activos al inicio del día (Fig. 8A). Esta falla se repetiría a temperatura restrictiva al mediodía (Fig. 8B), en otro momento del día, probablemente por un corrimiento de fase causado por la perturbación de la función del a Dinamina (Kilman et al., 2009; Wulbeck et al., 2009). Sin embargo, como nuestros experimentos fueron hechos con un promotor glutamatérgico (*ok371-gal4*), y dado que existen neuronas del reloj glutamatérgicas (Muraro et al., 2013), debemos considerar que el corrimiento de fase puede deberse a alteraciones de la Dinamina en las neuronas del reloj (Kilman et al., 2009; Wulbeck et al., 2009).

El análisis de los controles también muestra que existiría un efecto de la proteína GAL4 sobre las proporciones de botones (Fig. 7A y 7B). En *Drosophila*, la expresión de GAL4 es considerada generalmente neutral, pero se sabe que en algunas células tiene un efecto tóxico temperatura y dosis dependiente que produce defectos en el desarrollo (Kramer y Staveley, 2003) y muerte celular programada en neuronas (Rezával et al, 2007) por lo que podríamos esperar alteraciones a nivel de los botones sinápticos. Sin embargo, debo aclarar que en este experimento cometimos el error de usar moscas homocigotos para el control *gal4*, lo cual podría agravar el efecto tóxico del GAL4. El mejor control hubiera sido moscas heterocigotos *gal4*, puesto que las moscas del experimento tienen una sola copia de *gal4*. Al chequear la morfología de estas moscas homocigotos no encontramos alteraciones obvias en la terminal sináptica de la MN5 de estas moscas.

Los resultados de este trabajo muestran evidencias que el mantenimiento de la proporción de botones sin sitios activos de la MN5 dependería en parte de la actividad sináptica (o de la endocitosis, o de una combinación de ambas). La actividad sináptica (o la endocitosis) también controlaría la distribución de los sitios activos en botones, limitando la formación de botones con un sitio activo, probablemente limitando la adición de sitios activos a botones vacíos o a través del control de la eliminación de

sitios activos de los botones con tres o más sitios activos. Dado esto último, la actividad también mantendría a los botones que tienen tres o más sitios activos. Teniendo en cuenta la capacidad de los genes *tim* y *per* para definir el cambio rítmico en el número de botones sin sitios activos a lo largo del día y su capacidad inhibidora de la sinaptogénesis (Manuscrito Ruiz et al.), podemos especular que el reloj circadiano mantendría la proporción de los botones sin sitios activos y controlaría la distribución de los sitios activos en los botones, en parte a través del control de la actividad sináptica.

## ANEXO

Propor	rción de	e botone	8				
Entre 2	25°C y 3	0°C:					
ok371-gal4			ZT1	MW	p =	p = 0.00390	
wt			ZT7	MW	p =	p = 0.00371	
ok371-gal4;uas-shi <sup>ts1</sup>			ZT7	MW	p =	p = 0.00413	
Entre g	genotipo	s en un r	nismo ZT	•			
ZT1	25°C	C wt vs. $ok371$ -gal4; uas-shi <sup>ts1</sup> p = 0.0036				p = 0.0036	
		uas-shi <sup>t</sup>	<sup>s1</sup> vs. ok37	71-gal4;uas-shi <sup>ts1</sup>		p = 0.0451	
ZT1	ZT1 30°C wt vs. of		k371-gal4			p = 0.0179	
		ok371-gal4 vs. $ok371$ -gal4; uas-shi <sup>ts1</sup> $p = 0.012$				p = 0.0127	
$ZT7  25^{\circ}C  wt \ vs. \ u$		as-shi <sup>ts1</sup>			p = 0.0065		
	ok371-g		gal4 vs. uas-shi <sup>ts1</sup>			p = 0.0069	
ZT7	30°C	uas-shi <sup>t</sup>	<sup>s1</sup> vs. ok37	71-gal4;uas-shi <sup>ts1</sup>		p = 0.0113	
Propo	rción de	e botone	s sin sitio	s activos			
Entre Z	ZT1 y Z	T7:	I				
ok371-gal4			30°C	t-test	p =	p = 0.0088	
ok371-gal4;uas-shi <sup>ts1</sup>			25°C	t-test	p =	p = 0.0198	
ok371-gal4;uas-shi <sup>ts1</sup>			30°C	t-test	p =	p = 0.0128	
Entre 2	25°C y 3	0°C:	I				
ok371-gal4			ZT1	MW	p =	p = 0.01275	
wt			ZT7	MW	p =	p = 0.00405	
uas-shi <sup>ts1</sup>			ZT7	MW	p =	p = 0.04847	
ok371-gal4;uas-shi <sup>ts1</sup>			ZT7	MW	p =	p = 0.00041	
Entre g	enotipo	s en un r	nismo ZT	(MW en todos los	s casos	s):	
ZT1 30°C wt vs. of		k371-gal4			p = 0.023		
	ok371-gal4 vs. ok371-gal4; uas-shits1 p = 0.009				p = 0.0098		
ZT7	30°C	30°C wt vs. uas- $shi^{151}$ p = 0.0013				p = 0.0013	
	ok371-gal4 vs. $ok371$ -gal4;uas-shi <sup>ts1</sup> p =					p = 0.0486	
	uas- shi			871-gal4;uas-shi <sup>ts1</sup>	p = 0.0002		

## CONCLUSIONES

Con este trabajo de tesis, ampliamos el conocimiento acerca de la plasticidad circadiana estructural de las neuronas, usando como ejemplo la motoneurona de vuelo MN5 de *Drosophila melanogaster* y demostrado que este tipo de plasticidad incluye una profunda reorganización de los botones sinápticos, los sitios activos e incluso de las vesículas sinápticas. Demostramos que esta reorganización es en parte circadiana, es influida por la luz y que algunos aspectos son controlados por el reloj, posiblemente desde la glía a través de mecanismos que requieren la expresión del gen *timeless*, y que otros dependerían de su control a través del control de la actividad sináptica.

La reorganización de los botones sinápticos incluye un ritmo circadiano en el número de botones, con más botones a medianoche que a mediodía, con un ritmo circadiano de formación de botones durante la noche y de eliminación durante el día. Este ritmo en el número de botones, es acompañado por un ritmo diario en los sitios activos, el cual es el elemento más inesperado descrito en esta tesis: la terminal sináptica de la MN5 tiene más sitios activos a medianoche, cuando la mosca no vuela. Por lo tanto, el ritmo circadiano de formación de botones durante la noche sería acompañado por un ritmo de ensamblaje de sitios activos, y la eliminación de botones durante el día acompañado por el desensamblaje de sitios activos.

La luz es necesaria para controlar aspectos de la reorganización de la terminal, como el cambio rítmico de sitios activos. Además, la luz es necesaria para controlar el ritmo en tamaño y distribución de las vesículas sinápticas. El ritmo en tamaño de las vesículas dependería del ritmo de la actividad sináptica relacionada al ritmo de actividad locomotora.

Las proteínas TIMELESS y PERIOD se expresan en la unión neuromuscular de la MN5. PERIOD se expresa en el axón y en la terminal sináptica de la MN5 y TIMELESS lo hace en la glía que envuelve a ambas estructuras. Los genes *timeless* y *period* forman parte de un mecanismo que controla el número y el cambio rítmico diario de botones y sitios activos de la MN5 a través de un mecanismo que requeriría la expresión de *timeless* en la glía y posiblemente de *period* en la neurona. Ambos genes cumplen funciones distintas sobre estos ritmos diarios. Mientras *timeless* parece definir el rítmico en el número de botones a lo largo del día, a través del control del número de botones sin sitios activos, *period* por su lado controlaría su amplitud. *timeless* inhibiría fuertemente la formación de botones sin sitios activos a mediodía y *period* lo haría a medianoche. Por otra parte, *timeless* y *period* son inhibidores de la sinaptogénesis y controlarían la formación rítmica de sitios activos, limitando la adición de sitios activos a botones vacíos, y la distribución de sitios activos en los botones sinápticos. Como parte del control de la distribución de sitios activos, es muy probable que *timeless* limite la adición de sitios activos a botones con un sitio activo para generar botones con dos y tres sitios activos y que *period* la limite para generar botones con tres o más sitios activos.

La actividad sináptica y/o la endocitosis (o una combinación) mantendría el número de botones sinápticos, a través de la inhibición de la formación de botones sin sitios activos. También controlaría la distribución de sitios activos en los botones. Es muy probable que la actividad sináptica y/o la endocitosis (o una combinación) limite la formación de sitios activos en botones vacíos y que mantenga los botones con tres sitios activos o más, inhibiendo su eliminación o inhibiendo la eliminación de sus sitios activos.

## REFERENCIAS

Allada R, White NE, So WV, Hall JC, Rosbash M. 1998. A mutant *Drosophila* homolog of mammalian Clock disrupts circadian rhythms and transcription of period and timeless. Cell 93:791-804.

Allada R, Chung BY 2010. Circadian organization of behavior and physiology in *Drosophila*. Annu Rev Physiol 72:605-624.

Anderson MS, Halpern ME, Keshishian H. 1988. Identification of the neuropeptide transmitter proctolin in *Drosophila* larvae: characterization of muscle fiber-specific neuromuscular endings. J Neurosci. 8:242-55.

Appelbaum L, Wang G, Yokogawa T, Skariah GM, Smith SJ, Mourrain P, Mignot E. 2010. Circadian and homeostatic regulation of structural synaptic plasticity in hypocretin neurons. Neuron. 68:87-98.

Ashburner M. 1987. *Drosophila* genetics. Love-song and circadian rhythm. Nature. 326:741.

Ataman B, Ashley J, Gorczyca M, Ramachandran P, Fouquet W, et al. 2008. Rapid activity-dependent modifications in synaptic structure and function require bidirectional Wnt signaling. Neuron 57:705-718.

Atwood HL, Govind CK, Wu CF. 1993. Differential ultrastructure of synaptic terminals on ventral longitudinal abdominal muscles in *Drosophila* larvae. J Neurobiol 24:1008-1024.

Atwood HL, Karunanithi S. 2002. Diversification of synaptic strength: presynaptic elements. Nat Rev Neurosci. 3:497-516.

Baines RA, Bate M. 1998. Electrophysiological development of central neurons in the *Drosophila* embryo. J Neurosci. 18:4673-83.

Banovic D, Khorramshahi O, Owald D, Wichmann C, Riedt T, et al. 2010. *Drosophila* neuroligin 1 promotes growth and postsynaptic differentiation at glutamatergic neuromuscular junctions. Neuron 66:724-738.

Barth M, Schultze M, Schuster CM, Strauss R. 2010. Circadian plasticity in photoreceptor cells controls visual coding efficiency in *Drosophila melanogaster*. PLoS One. 5:e9217.

Bell-Pedersen D, Cassone VM, Earnest DJ, Golden SS, Hardin PE, Thomas TL, Zoran MJ. 2005. Circadian rhythms from multiple oscillators: lessons from diverse organisms. Nat Rev Genet. 6:544-56.

Beramendi A, Peron S, Casanova G, Reggiani C, Cantera R. 2007. Neuromuscular junction in abdominal muscles of *Drosophila melanogaster* during adulthood and aging. J Comp Neurol 501:498-598.

Besse F, Martel S, Kittel RJ, Wichmann C, Rasse TM, et al. 2007. The Ig cell adhesion molecule basigin controls compartmentalization and vesicle release at *Drosophila melanogaster* synapses. J Cell Biol 177:843-855.

Blau J, Young MW. 1999. Cycling *vrille* expression is required for a functional *Drosophila* clock. Cell 99:661-71.

Bliss TV, Collingridge GL. 1993. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. Nature. 361:31-9.

Bliss TV, Lomo T. 1973. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. J Physiol. 232:331-56.

Brand AH, Perrimon N. 1993. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. Development. 118:401-15.

Broadie KS, Bate M. 1993. Development of the embryonic neuromuscular synapse of *Drosophila melanogaster*. J Neurosci. 13:144-66.

Budnik V, Ruiz-Cañada C. 2006. The Fly Neuromuscular Junction: Structure and Function, 2<sup>nd</sup> ed. Academic Press, San Diego.

Busza A, Emery-Le M, Rosbash M, Emery P. 2004. Roles of the two *Drosophila* CRYPTOCHROME structural domains in circadian photoreception. Science. 304:1503-6.

Campos-Ortega, J.A., Hartenstein, V. 1997. The embryonic development of *Drosophila melanogaster*. 2nd ed. Springer.

Ceriani MF, Darlington TK, Staknis D, Más P, Petti AA, Weitz CJ, Kay SA. 1999. Light-dependent sequestration of TIMELESS by CRYPTOCHROME. Science. 285:553-6.

Chen K, Featherstone DE. 2011. Pre and postsynaptic roles for *Drosophila* CASK. Mol Cell Neurosci 48:171-182.

Chen ML, Green D, Liu L, Lam YC, Mukai L, Rao S, Ramagiri S, Krishnan KS, Engel JE, Lin JJ, Wu CF. 2002. Unique biochemical and behavioral alterations in *Drosophila shibire(<sup>ts1</sup>)* mutants imply a conformational state affecting *dynamin* subcellular distribution and synaptic vesicle cycling. J Neurobiol. 53:319-29.

Coggshall JC. 1978. Neurons associated with the dorsal longitudinal flight muscles of *Drosophila melanogaster*. J Comp Neurol 177:707-720.

Collins CA, DiAntonio A. 2007. Synaptic development: insights from *Drosophila*. Curr Opin Neurobiol 17:1-8.

Consoulas C, Duch C, Bayline RJ, Levine RB. 2000. Behavioral transformations during metamorphosis: remodeling of neural and motor systems. Brain Res Bull. 53:571-83.

Consoulas C, Restifo LL, Levine RB. 2002. Dendritic remodeling and growth of motoneurons during metamorphosis of *Drosophila melanogaster*. J Neurosci 22:4906-4917.

Consoulas C, Restifo LL, Levine RB. 2002. Dendritic remodeling and growth of motoneurons during metamorphosis of *Drosophila melanogaster*. J Neurosci. 22:4906-17.

Costello WJ, Wyman RJ. 1986. Development of an indirect flight muscle in a muscle-specific mutant of *Drosophila melanogaster*. Dev Biol. 118:247-58.

Dajno R, Kawasaki F, Ordway RW. 2011. A tripartite synapse model in *Drosophila*. PLoS ONE 6(2):e17131.

Dani N, Broadie K. 2012. Glycosylated synaptomatrix regulation of trans-synaptic signaling. Dev Neurobiol. 72:2-21.

Del Castillo J, Katz B. 1954. Quantal components of the end-plate potential. J Physiol. 124:560-73.

Depetris-Chauvin A, Berni J, Aranovich EJ, Muraro NI, Beckwith EJ, Ceriani MF. 2011. Adult-specific electrical silencing of pacemaker neurons uncouples molecular clock from circadian outputs. Curr Biol. 21:1783-93.

Donlea JM, Ramanan N, Shaw PJ. 2009. Use-dependent plasticity in clock neurons regulates sleep need in *Drosophila*. Science 324:105-8.

Duffy JB. 2002. GAL4 system in *Drosophila*: a fly geneticist's Swiss army knife. Genesis. 34:1-15.

Elhamdani A, Palfrey HC, Artalejo CR. 2001. Quantal size is dependent on stimulation frequency and calcium entry in calf chromaffin cells. Neuron. 31:819-30.

Emery P, Stanewsky R, Helfrich-Förster C, Emery-Le M, Hall JC, Rosbash M. 2000. *Drosophila* CRY is a deep brain circadian photoreceptor. Neuron. 26:493-504.

Fernandes J, Bate M, Vijayraghavan K. 1991. Development of the indirect flight muscles of *Drosophila*. Development. 113:67-77.

Fernández MP, Berni J, Ceriani MF. 2008. Circadian remodeling of neuronal circuits involved in rhythmic behavior. PloS Biol 6:e69.

Fleury F, Allemand R, Vavre F, Fouillet P, Boulétreau M. 2000. Adaptive significance of a circadian clock: temporal segregation of activities reduces intrinsic competitive inferiority in *Drosophila* parasitoids. Proc Biol Sci. 267:1005-10.

Fouquet W, Owald D, Wichmann C, Mertel S, Depner H, et al. 2009. Maturation of active zone assembly by *Drosophila* Bruchpilot. J Cell Biol 186:129-145.

Frank CA, Wang X, Collins CA, Rodal AA, Yuan Q, Verstreken P, Dickman DK. 2013. New approaches for studying synaptic development, function, and plasticity using *Drosophila* as a model system. J Neurosci. 33:17560-8.

Frank MG, Cantera R. 2014. Sleep, clocks, and synaptic plasticity. Trends Neurosicence 9:491-501.

Frank MG. 2012. Erasing synapses in sleep: is it time to be SHY? Neural Plast. 2012:264378.

Fujii S, Krishnan P, Hardin P, Amrein H. 2007. Nocturnal male sex drive in *Drosophila*. Curr Biol. 17:244-51.

Gery S, Koeffler HP. 2010. Circadian rhythms and cancer. Cell Cyc. 9:1097-1103.

Giebultowicz JM. 2001. Peripheral clocks and their role in circadian timing: insights from insects. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 356:1791-9.

Gilestro GF, Tononi G, Cirelli C. 2009. Widespread changes in synaptic markers as a function of sleep and wakefulness in *Drosophila*. Science 324:109-12.

Girardet C, Becquet D, Blanchard MP, François-Bellan AM, Bosler O. 2010b. Neuroglial and synaptic rearrangements associated with photic entrainment of the circadian clock in the suprachiasmatic nucleus. Eur J Neurosci 32:2133-2142.

Girardet C, Blanchard MP, Ferracci G, Lévêque C, Moreno M, et al. 2010a. Daily changes in synaptic innervation of VIP neurons in the rat suprachiasmatic nucleus: contribution of glutamatergic afferents. Eur J Neurosci 31:359-370.

Glossop NR, Hardin PE. 2002. Central and peripheral circadian oscillator mechanisms in flies and mammals. J Cell Sci 115:3369-3377.

Gorczyca M, Augart C, Budnik V. 1993. Insulin-like receptor and insulin-like peptide are localized at neuromuscular junctions in *Drosophila*. J Neurosci. 13:3692-704.

Gorostiza EA, Depetris-Chauvin A, Frenkel L, Pírez N, Ceriani MF. 2014. Circadian Pacemaker Neurons Change Synaptic Contacts across the Day. Curr Biol. S0960-9822:00932-4.

Górska-Andrzejak J. 2013. Glia-related circadian plasticity in the visual system of Diptera. Front Physiol. 23;4:36.

Green P, Hartenstein AY, Hartenstein V. 1993. The embryonic development of the

Drosophila visual system. Cell Tissue Res. 273:583-98.

Grima B, Chélot E, Xia R, Rouyer F. 2004. Morning and evening peaks of activity rely on different clock neurons of the *Drosophila* brain. Nature. 431:869-73.

Gu M, Liu Q, Watanabe S, Sun L, Hollopeter G, Grant BD, Jorgensen EM. 2013. AP2 hemicomplexes contribute independently to synaptic vesicle endocytosis. Elif (Cambridge). 2:e00190. doi: 10.7554/eLife.00190.

Güldner FH, Bahar E, Young CA, Ingham CA. 1997. Structural plasticity of optic synapses in the rat suprachiasmatic nucleus: adaptation to long-term influence of light and darkness. Cell Tissue Res 287:43-60.

Hall JC. 2005. Systems approaches to biological rhythms in *Drosophila*. Methods Enzymol. 393:61-185.

Halter DA, Urban J, Rickert C, Ner SS, Ito K, Travers AA, Technau GM. 1995. The homeobox gene repo is required for the differentiation and maintenance of glía function in the embryonic nervous system of *Drosophila melanogaster*. Development. 121:317-32.

Hanai S, Hamasaka Y, Ishida N. 2008. Circadian entrainment to red light in *Drosophila*: requirement of Rhodopsin 1 and Rhodopsin 6. Neuroreport. 19:1441-4.

Hanai S, Ishida N. 2009. Entrainment of *Drosophila* circadian clock to green and yellow light by Rh1, Rh5, Rh6 and CRY. Neuroreport. 20:755-8.

Hanse E, Gustafsson B. 2001. Quantal variability at glutamatergic synapses in area CA1 of the rat neonatal hippocampus. J Physiol. 531:467-80.

Hardin PE. 2011. Molecular genetic analysis of circadian timekeeping in *Drosophila*. Adv Genet. 74:141-73.

Hege DM, Stanewsky R, Hall JC, Giebultowicz JM. 1997. Rhythmic expression of a PER-reporter in the Malpighian tubules of decapitated *Drosophila*: evidence for a brain-independent circadian clock. J Biol Rhythms. 12:300-8.

Helfrich-Förster C, Yoshii T, Wülbeck C, Grieshaber E, Rieger D, Bachleitner W, Cusamano P, Rouyer F. 2007. The lateral and dorsal neurons of *Drosophila melanogaster*: new insights about their morphology and function. Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 72:517-25.

Helfrich-Förster C. 1998. Robust circadian rhythmicity of *Drosophila melanogaster* requires the presence of lateral neurons: a brain-behavioral study of disconnected mutants. J Comp Physiol A. 182:435-53.

Helfrich-Förster C. 2002. The circadian system of *Drosophila melanogaster* and its light input pathways. Zoology (Jena).105:297-312.

Helfrich-Förster C. 2002. The circadian system of Drosophila melanogaster and its

light input pathways. Zoology (Jena). 105:297-312.

Helfrich-Förster C. 2010. Differential control of morning and evening components in the activity rhythm of *Drosophila melanogaster*-sex specific differences suggest a different quality of activity. J Biol rhythms 15:135-154.

Hendricks JC, Finn SM, Panckeri KA, Chavkin J, Williams JA, Sehgal A, Pack, AI. 2000. Rest in *Drosophila* is a sleep-like state. Neuron 25:129-138.

Hendricks JC. 2003. Invited review: Sleeping flies don't lie: the use of *Drosophila melanogaster* to study sleep and circadian rhythms. J Appl Physiol. 94:1660-72.

Howlader G, Paranjpe DA, Sharma VK. 2006. Non-ventral lateral neuron-based, non-PDF-mediated clocks control circadian egg-laying rhythm in *Drosophila melanogaster*. J Biol Rhythms. 21:13-20.

Howlader G, Sharma VK. 2006. Circadian regulation of egg-laying behavior in fruit flies *Drosophila melanogaster*. J Insect Physiol. 52:779-85.

Ikeda K and Koenig JH. 1988. Morphological identification of the motor neurons innervating the dorsal longitudinal flight muscle of *Drosophila melanogaster*. J Comp Neurol 273:436-444.

Ikeda K, Koenig JH, Tsuruhara T. 1980. Organization of identified axons innervating the dorsal longitudinal flight muscle of *Drosophila melanogaster*. J Neurocytol. 9:799-823.

Ishikawa T, Sahara Y, Takahashi T. 2002. A single packet of transmitter does not saturate postsynaptic glutamate receptors. Neuron 34:613-21.

Ivanchenko M, Stanewsky R, Giebultowicz JM. 2001. Circadian photoreception in *Drosophila*: functions of cryptochrome in peripheral and central clocks. J Biol Rhythms. 16:205-15.

Jan LY, Jan YN. 1976. L-glutamate as an excitatory transmitter at the *Drosophila* larval neuromuscular junction. J Physiol. 262:215-36.

Jan LY, Jan YN. 1976. Properties of the larval neuromuscular junction in *Drosophila melanogaster*. J Physiol. 262:189-214.

Johansen J, Halpern ME, Keshishian H. 1989. Axonal guidance and the development of muscle fiber-specific innervation in Drosophila embryos. J Neurosci. 9:4318-32.

Jordán-Alvarez S, Fouquet W, Sigrist SJ, Acebes A. 2012. Presynaptic PI3K activity triggers the formation of glutamate receptors at neuromuscular terminals of *Drosophila*. J Cell Sci 125:3621-3629.

Karunanithi S, Marin L, Wong K, Atwood HL. 2002. Quantal size and variation determined by vesicle size in normal and mutant *Drosophila* glutamatergic synapses. J Neurosci. 22:10267-76.

Kennerdell JR, Carthew RW. 2000. Heritable gene silencing in *Drosophila* using double-stranded RNA. Nat Biotechnol. 18:896-8.

Kilman VL, Zhang L, Meissner RA, Burg E, Allada R. 2009. Perturbing dynamin reveals potent effects on the *Drosophila* circadian clock. PLoS One. 4:e5235.

Kim YT, Wu CF. 1987. Reversible blockage of neurite development and growth cone formation in neuronal cultures of a temperature-sensitive mutant of *Drosophila*. J Neurosci. 7:3245-55.

Kitamoto T. 2001. Conditional modification of behavior in *Drosophila* by targeted expression of a temperature-sensitive shibire allele in defined neurons. J Neurobiol. 47:81-92.

Kitamoto T. 2002. Targeted expression of temperature-sensitive dynamin to study neural mechanisms of complex behavior in *Drosophila*. J Neurogent 16:205-228

Kittel RJ, Wichmann C, Rasse TM, Fouquet W, Schmidt M, Schmid A, Wagh DA, Pawlu C, Kellner RR, Willig KI, Hell SW, Buchner E, Heckmann M, Sigrist SJ. 2006. Bruchpilot promotes active zone assembly, Ca2+ channel clustering and vesicle release. Science 312:1051-1054.

Klarsfeld A, Leloup JC, Rouyer F. 2003. Circadian rhythms of locomotion activity in *Drosophila*. Behav Processes 64:161-175.

Klarsfeld A, Malpel S, Michard-Vanhée C, Picot M, Chélot E, Rouyer F. 2004. Novel features of cryptochrome-mediated photoreception in the brain circadian clock of *Drosophila*. J Neurosci. 24:1468-77.

Klarsfeld A, Picot M, Vias C, Chélot E, Rouyer F. 2011. Identifying specific light inputs for each subgroup of brain clock neurons in *Drosophila* larvae. J Neurosci. 31:17406-15.

Kloss B, Price JL, Saez L, Blau J, Rothenfluh A, Wesley CS, Young MW. 1998. The *Drosophila* clock gene *double-time* encodes a protein closely related to human casein kinase Iepsilon. Cell. 94:97-107.

Koenig JH, Ikeda K. 1989. The relationship between the number of synaptic vesicles and the amount of transmitter released. J Neurosci 9:1937-1942.

Koenig JH, Ikeda K. 1999. Contribution of active zone subpopulation of vesicles to evoked and spontaneous release. J Neurophysiol. 81:1495-505.

Koenig JH, Kosaka T, Ikeda K. 1989. The relationship between the number of synaptic vesicles and the amount of transmitter released. J Neurosci. 9:1937-42.

Kolodkin AL, Tessier-Lavigne M. 2011. Mechanisms and molecules of neuronal wiring: a primer. Cold Spring Harb Perspect Biol. 3: a001727.

Konopka RJ, Benzer S. 1971. Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. Proc Natl Acad Sci USA 68:2112-6.

Kramer JM, Staveley BE. 2003. GAL4 causes developmental defects and apoptosis when expressed in the developing eye of *Drosophila melanogaster*. Genet Mol Res. 2:43-7.

Krupp JJ, Billeter JC, Wong A, Choi C, Nitabach MN, Levine JD. 2013. Pigmentdispersing factor modulates pheromone production in clock cells that influence mating in *Drosophila*. Neuron. 79:54-68.

Lee SJ, Escobedo-Lozoya Y, Szatmari EM, Yasuda R. 2009. Activation of CaMKII in single dendritic spines during long-term potentiation. Nature. 458:299-304.

Li J, Ashley J, Budnik V, Bhat MA. 2007. Crucial role of *Drosophila* neurexin in proper active zone apposition to postsynaptic densities, synaptic growth, and synaptic transmission. Neuron 55:741-755.

Liebl FL, McKeown C, Yao Y, Hing HJ. 2010. Mutations in Wnt2 alter presynaptic motor neuron morphology and presynaptic protein localization at the *Drosophila* neuromuscular junction. PLoS ONE 5(9):e12778.

Lin FJ, Song W, Meyer-Bernstein E, Naidoo N, Sehgal A. 2001. Photic signaling by cryptochrome in the *Drosophila* circadian system. Mol Cell Biol. 21:7287-94.

Lin JM, Kilman VL, Keegan K, Paddock B, Emery-Le M, Rosbash M, Allada R. 2002. A role for casein kinase 2alpha in the *Drosophila* circadian clock. Nature. 420:816-20.

Lin Y, Stormo GD, Taghert PH. 2004. The neuropeptide pigment-dispersing factor coordinates pacemaker interactions in the *Drosophila* circadian system. J Neurosci. 24:7951-7.

Liu X, Lorenz L, Yu QN, Hall JC, 1988. Rosbash M. Spatial and temporal expression of the period gene in *Drosophila melanogaster*. Genes Dev. 2:228-38.

Mahr A, Aberle H. 2006. The expression pattern of the *Drosophila vesicular* glutamate transporter: A marker protein for motoneurons and glutamatergic centers in the brain. Gene Expr Patterns 6:299-309.

Maler L, Mathieson WB. 1985. The effect of nerve activity on the distribution of synaptic vesicles. Cell Mol Neurobiol. 5:373-87.

Malpel S, Klarsfeld A, Rouyer F. 2002. Larval optic nerve and adult extra-retinal photoreceptors sequentially associate with clock neurons during *Drosophila* brain development. Development. 129:1443-53.

Marrus AB, DiAntonio A. 2004. Preferential localization of glutamate receptors opposite sites of high presynaptic release. Curr Biol 14:924-931.

Martinek S, Inonog S, Manoukian AS, Young MW. 2001. A role for the polarity segment polarity gene shaggy/GSK-3 in the *Drosophila* circadian clock. Cell 105:769-779.

Martin-Peña A, Acebes A, Rodríguez JR, Sorribes A, de Polavieja GG, et al. 2006. Age-independent synaptogenesis by phosphoinositide 3 kinase. J Neurosci 26:10199-10208.

Masur SK, Kim YT, Wu CF. 1990. Reversible inhibition of endocytosis in cultured neurons from the *Drosophila* temperature-sensitive mutant shibirets1. J Neurogenet. 6:191-206.

Mazzoni EO, Desplan C, Blau J. 2005. Circadian pacemaker neurons transmit and modulate visual information to control a rapid behavioral response. Neuron. 45:293-300.

Mehnert KI, Beramendi A, Elghazali F, Negro P, Kyriacou CP, Cantera R. 2007. Circadian changes in *Drosophila* motor terminals. Dev Neurobiol 67:415-421.

Mehnert KI, Cantera R. 2008. A peripheral pacemaker drives the circadian rhythm of synaptic boutons in *Drosophila* independently of synaptic activity. Cell Tissue Res 334:103-109.

Mehnert KI, Cantera R. 2011. Circadian rhythms in the morphology of neurons in *Drosophila*. Cell Tissue Res 334:381-389.

Meinertzhagen IA, Pyza E. 1996. Daily rhythms in cells of the fly's optic lobe: Taking time out from the circadian clock. Trends Neurosci 19:285-291.

Mishra AK, Tsachaki M, Rister J, Ng J, Celik A, Sprecher SG. 2013. Binary cell fate decisions and fate transformation in the *Drosophila* larval eye. PLoS Genet. 9:e1004027.

Mizrak D, Ruben M, Myers GN, Rhrissorrakrai K, Gunsalus KC, Blau J. 2012. Electrical activity can impose time of day on the circadian transcriptome of pacemaker neurons. Curr Biol. 2012 22:1871-80.

Monastirioti M, Gorczyca M, Rapus J, Eckert M, White K, Budnik V. 1995. Octopamine immunoreactivity in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. J Comp Neurol. 356:275-87.

Muraro NI, Pírez N, Ceriani MF. 2013. The circadian system: plasticity at many levels. Neuroscience. 247:280-93.

Murthy VN, Schikorski T, Stevens CF, Zhu Y. 2001. Inactivity produces increases in neurotransmitter release and synapse size. Neuron 32:673-82.

Osborne, MP. 1967. The fine structure of neuromuscular junctions in the segmental muscles of the blowfly larva. J Insect Physiol. 13:827-833.

Owald D, Khorramnshahi O, Gupta VK, Banovic D, Depner H, et al. 2012. Cooperation of Syd-1 with Neurexin synchronizes pre- with postsynaptic assembly. Nat Neurosci 15:1219-1226.

Panda S, Hogenesch JB, Kay SA. 2002. Circadian rhythms from flies to human. Nature. 417:329-35.

Park JH, Helfrich-Förster C, Lee G, Liu L, Rosbash M, Hall JC. 2000. Differential regulation of circadian pacemaker output by separate clock genes in *Drosophila*. Proc Natl Acad Sci U S A. 97:3608-13.

Peng Y, Stoleru D, Levine JD, Hall JC, Rosbash M. 2003. *Drosophila* free-running rhythms require intercellular communication. PLoS Biol. 1:E13.

Peschel N, Helfrich-Förster C. 2011. Setting the clock-by nature: circadian rhythm in the fruitfly *Drosophila melanogaster*. FEBS Lett. 585:1435-42.

Picot M, Klarsfeld A, Chélot E, Malpel S, Rouyer F. 2009. A role for blind DN2 clock neurons in temperature entrainment of the *Drosophila* larval brain. J Neurosci. 29:8312-20.

Pielage J, Fetter RD, Davis GW. 2006. A postsynaptic spectrin scaffold defines active zone size, spacing, and efficacy at the *Drosophila* neuromuscular junction. J Cell Biol 175:491-503.

Plautz JD, Kaneko M, Hall JC, Kay SA. 1997. Independent photoreceptive circadian clocks throughout Drosophila. Science. 278:1632-5.

Poudel KR, Bai J. 2014. Synaptic vesicle morphology: a case of protein sorting? Curr Opin Cell Biol. 26:28-33.

Price JL, Blau J, Rothenfluh A, Abodeely M, Kloss B, Young MW, 1998. *double-time* is a novel *Drosophila* clock gene that regulates PERIOD protein accumulation. Cell 94:83-95.

Pyza E, Borycz J, Giebultowicz, Meinertzhagen IA. 2004. Involvement of V-ATPase in the regulastion of cell size in the fly's visual system. J Insect Physiol 50:985-994.

Pyza E, Górska-Andrzejak J. 2008. External and internal inputs affecting plasticity of dendrites and axons of the fly's neurons. Acta Neurobiol Exp (Wars) 68:322-333.

Pyza E, Górska-Andrzejak J. 2008. External and internal inputs affecting plasticity of dendrites and axons of the fly's neurons. Acta Neurobiol Exp (Wars). 68:322-33.

Pyza E, Górzka-Andrzejak J. 2004. Involvement of glial cells in rhythmic size changes in neurons of the house fly's visual system. J Neurobiol 59:205-215.

Pyza E, Meinertzhagen IA. 1993a. Daily and circadian rhythms of synaptic frequency in the first visual neuropile of the housefly's (*Musca domestica L.*) optic lobe. Proc Biol Sci 254:97-105.

Pyza E, Meinertzhagen IA. 1993b. The regulation of circadian rhythms in the fly's visual system: involvement of FMRFamide-like neuropeptides and their relationship to pigment dispersing factor in *Musca domestica* and *Drosophila melanogaster*. Neuropeptides 37:277-289.

Pyza E, Meinertzhagen IA. 1995. Monopolar cell axons in the first optic neuropile of the housefly, *Musca domestica* L., undergo daily fluctuations in diameter that have a circadian basis. J Neurosci 15:407-418.

Pyza E, Meinertzhagen IA. 1998. Neurotransmitters alter the numbers of synapses and organelles in photoreceptor terminals in the lamina of the housefly, *Musca domestica*. J Comp Physiol 183:719-727.

Pyza E, Meinertzhagen IA. 1999. Daily rhythmic changes of cell size and shape in the first optic neuropile in *Drosophila melanogaster*. J Neurobiol 40:77-88.

Ramón y Cajal S. 1906. The structure and connexions of the neurons. Nobel Lectures.

Rasse TM, Fouquet W, Schmid A, Kittel RJ, Mertel S, et al. 2005. Glutamate receptor dynamics organizing synapse formation in vivo. Nat Neurosci 8:898-905.

Renger JJ, Egles C, Liu G. 2001. A developmental switch in neurotransmitter flux enhances synaptic efficacy by affecting AMPA receptor activation. Neuron. 29:469-84.

Renger JJ, Ueda A, Atwood HL, Govind CK, Wu CF. 2000. Role of cAMP cascade in synaptic stability and plasticity: ultrastructural and physiological analyses of individual synaptic boutons in *Drosophila* memory mutants. J Neurosci. 20:3980-92.

Renn SC, Park JH, Rosbash M, Hall JC, Taghert PH. 1999. A pdf neuropeptide gene mutation and ablation of PDF neurons each cause severe abnormalities of behavioral circadian rhythms in *Drosophila*. Cell. 99:791-802.

Reynolds ES. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. J Cell Biol. 17:208-12.

Rezával C, Werbajh S, Ceriani MF. 2007. Neuronal death in *Drosophila* triggered by GAL4 accumulation. Eur J Neurosci. 25:683-94.

Rieger D, Stanewsky R, Helfrich-Förster C. 2003. Cryptochrome, compound eyes, Hofbauer-Buchner eyelets, and ocelli play different roles in the entrainment and masking pathway of the locomotor activity rhythm in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. J Biol Rhythms. 18:377-91.

Rizzoli SO, Betz WJ. 2005. Synaptic vesicle pools. Nat Rev Neurosci. 6:57-69.

Ruiz S, Ferreiro MJ, Casanova G, Olivera A, Cantera R. 2010. Synaptic vesicles in motor synapses change size and distribution during the day. Synapse 64:14-19.

Ruiz S, Ferreiro MJ, Menhert KI, Casanova G, Olivera A, Cantera R. 2013. Rhythmic changes in synapse numbers in *Drosophila melanogaster* motor terminals. PLoS One. 8:e67161.

Ruiz-Cañada C, Budnik V. 2006. Introduction on the use of the *Drosophila* embryonic/larval neuromuscular junction as a model system to study synapse development and function, and a brief summary of pathfinding and target recognition. Int Rev Neurobiol. 75:1-31.

Rutila JE, Suri V, Le M, So WV, Rosbash M, Hall JC. 1998. CYCLE is a second bHLH-PAS clock protein essential for circadian rhythmicity and transcription of *Drosophila period* and *timeless*. Cell 93:805-14.

Rybak J, Meinertzhagen IA. 1997. The effects of light reversals on photoreceptor synaptogenesis in the fly *Musca domestica*. Eur J Neurosci 9:319-33.

Saunders DS. 2002. Insect Clocks. 3<sup>rd</sup> ed. Oxford New York. Illustrated Publisher Elsevier.

Schmid A, Hallermann S, Kittel RJ, Khorramnshahi O, Frölich AM, et al. 2008. Activity-dependent, site-specific changes of glutamate receptor composition in vivo. Nat Neurosci 11:659-666.

Schmucker D, Taubert H, Jäckle H. 1992. Formation of the *Drosophila* larval photoreceptor organ and its neuronal differentiation require continuous Krüppel gene activity. Neuron. 9:1025-39.

Schuster CM, Davis GW, Fetter RD, Goodman CS. 1996. Genetic dissection of structural and functional components of synaptic plasticity. I. Fasciclin II controls synaptic stabilization and growth. Neuron. 17:641-54.

Sehgal A, Price JL, Man B, Young MW. 1994. Loss of circadian behavioral rhythms and per RNA oscillations in the *Drosophila* mutant *timeless*. Science 263:1603-6.

Shatoury HH. 1956. Differentiation and metamorphosis of the imaginal optic glomeruli in *Drosophila*. J Embryol Exp Morphol 4:240-247.

Shaw PJ, Cirelli C, Greenspan RJ, Tonomi G. 2000. Correlates of sleep and waking in *Drosophila melanogaster*. Science 287:1834-1837.

Sprecher SG, Desplan C. 2008. Switch of rhodopsin expression in terminally differentiated *Drosophila* sensory neurons. Nature. 454:533-7.

Stanewsky R, Kaneko M, Emery P, Beretta B, Wager-Smith K, Kay SA, Rosbash M, Hall JC. 1998. The cryb mutation identifies cryptochrome as a circadian photoreceptor in *Drosophila*. Cell. 95:681-92.

Steller H, Fischbach KF, Rubin GM. 1987. Disconnected: a locus required for neuronal pathway formation in the visual system of *Drosophila*. Cell. 50:1139-53.

Stoleru D, Peng Y, Agosto J, Rosbash M. 2004. Coupled oscillators control morning and evening locomotor behaviour of *Drosophila*. Nature. 431:862-8.

Sun M, Xing G, Yuan L, Gan G, Knight D, et al. 2011. Neuroligin 2 is required for synapse development and function at the *Drosophila* neuromuscular junction. J Neurosci 31:687-699.

Sun YA, Wyman RJ. 1997. Neurons of the *Drosophila* giant fiber system: I. Dorsal longitudinal motor neurons. J Comp Neurol 387:157-166.

Talsma AD, Christov CP, Terriente-Felix A, Linneweber GA, Perea D, Wayland M, Shafer OT, Miguel-Aliaga I. 2012. Remote control of renal physiology by the intestinal neuropeptide pigment-dispersing factor in *Drosophila*. Proc Natl Acad Sci U S A. 109:12177-82.

Tessier-Lavigne M, Goodman CS. 1996. The molecular biology of axon guidance. Science. 274:1123-33.

Tononi G, Cirelli C. 2003. Sleep and synaptic homeostasis: a hypothesis. Brain Res Bull 62:143-150.

Trujillo-Cenóz O. 1969. Some aspects of the structural organization of the medulla in muscoid flies. J Ultrastr Res 27:533-553.

Truman JW. 1990. Metamorphosis of the central nervous system of *Drosophila*. J Neurobiol. 21:1072-84.

Veleri S, Brandes C, Helfrich-Förster C, Hall JC, Stanewsky R. 2003. A selfsustaining, light-entrainable circadian oscillator in the *Drosophila* brain. Curr Biol. 13:1758-67.

Veleri S, Rieger D, Helfrich-Förster C, Stanewsky R. 2007. Hofbauer-Buchner eyelet affects circadian photosensitivity and coordinates TIM and PER expression in *Drosophila* clock neurons. J Biol Rhythms. 22:29-42.

Viquez NM, Füger P, Valakh V, Daniels RW, Rasse TM, et al. 2009. PP2A and GSK-3beta act antagonistically tor regulate active zone development. J Neurosci 16:11484-11494.

Virchow R. 1856. Gesammelte A bhantllungen zur Wissenschaftlichen Medicin. Hamm, Frankfurt a.M., 1024 pp.

Vitureira N, Goda Y. 2013. Cell biology in neuroscience: the interplay between Hebbian and homeostatic synaptic plasticity. J Cell Biol. 203:175-86.

Wagh DA, Rasse TM, Asan E, Hofbauer A, Schwenkert I, Durrbeck H, Buchner S, Dabauvalle MC, Schmidt M, Qin G et al. 2006. Bruchpilot, a protein with homology to ELKS/CAST, is required for structural integrity and function of synaptic active zones in *Drosophila*. Neuron 49:833-844.

Woelfle MA, Ouyang Y, Phanvijhitsiri K, Johnson CH. 2004. The adaptive value of circadian clocks: an experimental assessment in cyanobacteria. Curr Biol. 14:1481-6.

Wülbeck C, Grieshaber E, Helfrich-Förster C. 2009. Blocking endocytosis in *Drosophila*'s circadian pacemaker neurons interferes with the endogenous clock in a PDF-dependent way. Chronobiol Int. 26:1307-22.

Yasuyama K, Meinertzhagen IA. 2010. Synaptic connections of PDF-immunoreactive lateral neurons projecting to the dorsal protocerebrum of *Drosophila melanogaster*. J Comp Neurol. 518:292-304.

Yoshii T, Heshiki Y, Ibuki-Ishibashi T, Matsumoto A, Tanimura T, Tomioka K. 2005. Temperature cycles drive *Drosophila* circadian oscillation in constant light that otherwise induces behavioural arrhythmicity. Eur J Neurosci. 22:1176-84.

Yoshii T, Sakamoto M, Tomioka K. 2002. A temperature-dependent timing mechanism is involved in the circadian system that drives locomotor rhythms in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. Zoolog Sci. 19:841-50.

Yoshii T, Todo T, Wülbeck C, Stanewsky R, Helfrich-Förster C. 2008. Cryptochrome is present in the compound eyes and a subset of *Drosophila*'s clock neurons. J Comp Neurol. 508:952-66.

Yoshii T, Vanin S, Costa R, Helfrich-Förster C. 2009. Synergic entrainment of *Drosophila*'s circadian clock by light and temperature. J Biol Rhythms24:452-64.

Yuan Q, Xiang Y, Yan Z, Han C, Jan LY, Jan YN. 2011. Light-induced structural and functional plasticity in *Drosophila* larval visual system. Science. 333:1458-62.

Zhang B, Koh YH, Beckstead RB, Budnik V, Ganetzky B, Bellen HJ. 1998. Synaptic vesicle size and number are regulated by a clathrin adaptor protein required for endocytosis. Neuron. 21:1465-75.

Zimmermann H, Whittaker VP. 1974. Effect of electrical stimulation on the yield and composition of synaptic vesicles from the cholinergic synapses of the electric organ of Torpedo: a combined biochemical, electrophysiological and morphological study. J Neurochem. 22:435-50.

## Rhythmic Changes in Synapse Numbers in *Drosophila melanogaster* Motor Terminals

## Santiago Ruiz<sup>1,2</sup>, Maria Jose Ferreiro<sup>1,2</sup>, Kerstin I. Menhert<sup>4</sup>, Gabriela Casanova<sup>3</sup>, Alvaro Olivera<sup>3</sup>, Rafael Cantera<sup>1,2,4</sup>\*

1 Departamento de Biología del Neurodesarrollo, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente, 2 Estable, Montevideo, Uruguay, 3 Unidad de Microscopía Electrónica de Transmisión, Facultad de Ciencias, UdelaR, Montevideo, Uruguay, 4 Zoology Department, Stockholm University, Stockholm, Sweden

## Abstract

Previous studies have shown that the morphology of the neuromuscular junction of the flight motor neuron MN5 in *Drosophila melanogaster* undergoes daily rhythmical changes, with smaller synaptic boutons during the night, when the fly is resting, than during the day, when the fly is active. With electron microscopy and laser confocal microscopy, we searched for a rhythmic change in synapse numbers in this neuron, both under light:darkness (LD) cycles and constant darkness (DD). We expected the number of synapses to increase during the morning, when the fly has an intense phase of locomotion activity under LD and DD. Surprisingly, only our DD data were consistent with this hypothesis. In LD, we found more synapses at midnight than at midday. We propose that under LD conditions, there is a daily rhythm of formation of new synapses in the dark phase, when the fly is resting, and disassembly over the light phase, when the fly is active. Several parameters appeared to be light dependent, since they were affected differently under LD or DD. The great majority of boutons containing synapses had only one and very few had either two or more, with a 70:25:5 ratio (one, two and three or more synapses) in LD and 75:20:5 in DD. Given the maintenance of this proportion even when both bouton and synapse numbers changed with time, we suggest that there is a homeostatic mechanism regulating synapse distribution among MN5 boutons.

Citation: Ruiz S, Ferreiro MJ, Menhert KI, Casanova G, Olivera A, et al. (2013) Rhythmic Changes in Synapse Numbers in *Drosophila melanogaster* Motor Terminals. PLoS ONE 8(6): e67161. doi:10.1371/journal.pone.0067161

Editor: Thomas H. Gillingwater, University of Edinburgh, United Kingdom

Received January 14, 2013; Accepted May 15, 2013; Published June 28, 2013

**Copyright:** © 2013 Ruiz et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This work was supported by grants from Programa de Desarrollo Tecnológico (058-54) and the Swedish Research Council. S.R. has a PhD Fellowship from Programa de Deserrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA). K.I.M received travel grants from the Tullberg Foundation (Uppsala University), the Silén Foundation (Stockholm University) and Boehringer Ingelheim Fonds. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: rcantera@zoologi.su.se

### Introduction

Neurons change morphology following circadian rhythms, which are influenced by light, glial cells, neurotransmitters and proteins encoded by "clock genes", among other factors. This special type of neuronal plasticity has been vastly documented through the study of several types of fly neurons (reviewed in [1], [2], [3]) and has also been demonstrated in several species of vertebrates [4–7].

"Synaptic boutons" is the term used to define discrete swellings of the axonal terminal in contact with the target muscle, within which synapses are localized. In larval axons of the fly *Drosophila melanogaster*, synaptic boutons are dynamic structures that can appear, grow, subdivide or disappear in a few hours [8], [9]. In the neuron studied here, *Drosophila* flight motor neuron 5 (MN5) of the adult *Drosophila*, synaptic boutons increase in diameter during the day and shrink again during the night following a circadian rhythm, which is not present in flies with mutations in the clock genes *period* and *timeless* or in old wild type flies [10]. Given that the term "synapse" is used in the scientific literature to describe different structures (a semantic issue discussed by Collins and DiAntonio [11]), we would like first to specify that we use the term "synapse" as synonymous for "active site", identified with electron microscopy as a place where presynaptic and postsynaptic membranes are more electron dense and parallel to each other, with a cluster of synaptic vesicles and often a presynaptic ribbon termed "T-bar" on the presynaptic side [11–15]. The proportion of synapses without T-bars ranges from 15 to 25% depending on the type of motor neuron and fly stock [16–18]. A single bouton might lack synapses entirely ("empty bouton") or contain a combination of synapses of different age. In *Drosophila*, synapses between photoreceptors and visual interneurons are formed within minutes [19] but neuromuscular synapses take most probably a few hours to be formed or dismantled [12], [20], [21].

The biological relevance of circadian rhythms in neuronal shape is not well understood. In the case of motor neurons, the rhythmic change in bouton size could be related to the rhythmic pattern of locomotion activity, which in *Drosophila* comprises alternating intervals of activity and rest [22] with a prolonged period of sleep/ rest during the night [23], [24]. However, an experimental approach to test this hypothesis indicated that the rhythm in bouton size was largely independent of synaptic activity [25]. Circadian changes in membrane excitability have been reported for a subset of "clock neurons" [26], [27] but electrophysiological studies of the activity of motor neurons at different times of the day are still not available. On a purely speculative basis, it has been proposed that a nocturnal reduction in the size of motor terminals could provide a less energetically demanding morphology during



**Figure 1. Inclusiveness of the LCM sampling method used for the study of the MN5 terminals.** (A) The figure shows a panoramic view of an hemithorax showing muscles IFM4, IFM5 and IFM6 (from ventral to dorsal: dorsal, D and anterior, A). The bar scale represents 100  $\mu$ m. (B) Magnification of the same hemithorax presented in A, with yellow lines showing the regions of flight muscles IFM5 and IFM6 considered for the analyses (anterior stack, AS; medial stack, MS; posterior stack, PS). The bar scale represents 100  $\mu$ m. (C) Schematic representation showing how the inclusiveness was calculated. The total volume of muscles IFM5 and IFM6 was calculated measuring thickness, height and sagittal length of each muscle (in four flies). These measurements were done in MS IFM6 and MS IFM5 (see panel B). The volume for the stacks scanned in each sample (fly) (S1 and S2 volumes) was calculated knowing that each stack comprised approximately 15 optical sections scanned at intervals of 0.3  $\mu$ m with a 60 × lens and a digital zoom of 3.5. Inclusiveness was calculated as the sum of S1 and S2 volumes divided by the total muscles IFM5/6 volume.

the night [10] while the fly is resting [23], [24], [28]. This could have adaptive value because it will reduce the high metabolism associated with axonal transport and other biological processes demanded for the maintenance of motor synapses during a substantial part of the fly's life [10]. From this point of view, consistent with the "synaptic homeostasis" hypothesis of Tononi and Cirelli [29], it is plausible to assume that the nocturnal reduction of bouton size in flight motor neurons also includes a reduction of synapse numbers. However, data on synapse numbers in motor neurons at different times of the day is still not available for neurons from *Drosophila* or other animal species.

Our knowledge on circadian changes in synapse numbers is restricted to a few neuronal types from a few animal species. The scarcity of the data and the variability of results preclude any sound generalization and further elaboration of explanatory models. Some neurons keep synapse numbers constant over several days while others have more synapses during the night or during the day (see below). In some cases the results differ when the experimental animals are kept in constant darkness, a condition that does not radically change their circadian rhythm of activity/rest. Moreover, there are examples of neurons of nocturnal animals with more synapses during the day and of neurons of diurnal animals with more synapses during the night. In the housefly (a diurnal animal), under light:darkness (LD) cycles, two types of synapses increase in number once a day with opposite phase. Photoreceptor synapses on the visual interneuron L2 ("tetrad synapses") are more abundant during the day and L2 synapses on photoreceptors ("feedback synapses") are more abundant during the night. Only the "feedback synapses" exhibit the rhythm when flies are kept in constant darkness (DD) [30], [31]. In the fruit fly (also diurnal), the synapses formed by retinal axons onto visual interneurons L1 and L2 increase in number during the day [32]. In the rat (a nocturnal animal), careful counting of synapses in the suprachiasmatic nucleus of animals kept in different conditions gave different results for different synapse types. When comparing rats kept in constant light or darkness, ultrastructural changes were detected in synaptic boutons and synapses of optic afferents but without changes in

synapse numbers [33]. In rats kept in LD, axo-somatic synapses made by glutamatergic and non-glutamatergic neurons onto vasoactive intestinal peptide producing neurons increased by 36% at daytime, whereas no changes were detected in the number of synapses made on arginin-vasopressin expressing neurons [6]. A similar finding regarding axo-dendritic synapses on vasoactive intestinal peptide producing neurons was that the number of GABAergic synapses did not change but that of non-GABAergic synapses increased by 62% during daytime [7]. In spite of these selective changes, the authors proposed that the global number of synapses in the suprachiasmatic nucleus remains constant between day and night [6], [7]. Finally, in the zebrafish (a diurnal animal), hypocretin/orexin neurons projecting to either the hindbrain or pineal gland show a rhythmic change in the number of synapses in LD, with more synapses during the transition between light and darkness [5]. This rhythm persists under DD and exhibits different phases according to the brain area where those synapses were counted (hindbrain or pineal gland).

In the present work, we use two complementary microscopy methods (Transmission Electron Microscopy and Laser Confocal Microscopy) to count boutons and synapses in a motor neuron of Drosophila melanogaster at different time points of the day to investigate the possibility of a daily rhythm in synapse numbers. One of the many advantages of using Drosophila motor neurons for this type of studies is that good estimations of synapse numbers can be obtained in relatively short time without the aid of the electron microscope, a method that has the advantage of giving higher resolution but that is exceedingly time demanding. The most widely used method to count synapses in the Drosophila neuromuscular junction is to stain this structure with specific fluorescent markers (i.e. antibodies against Horseradish peroxidase to outline the neuronal membrane [34] and antibodies against synaptic proteins), to study the preparation with laser confocal microscopy and to count the immunofluorescent "spots" (each representing a synapse). A monoclonal antibody (nc82, [35]) specific for the synaptic protein Bruchpilot (BRP, an ELK/CAST homologue, [15]) has became widely used to stain Drosophila neuromuscular synapses because of its many advantages [12],



**Figure 2. Neuroanatomy of the neuromuscular junction of motor neuron 5 (MN5) studied with TEM.** (A) The adult MN5 forms many axonal branches (Ax) that penetrate deeply into longitudinal flight muscles (Mu) covered by glia (Gl) and accompanied by tracheae (Tr). (B) When the primary branches of the MN5 axon (Ax) reach their target muscle (Mu), they are covered by up to 10 concentric layers of glia (Gl) forming septate junctions (only a small portion of such junction is seen here, arrow). (C) Inside the muscle (Mu), secondary axonal branches (Ax) are covered by a single glial layer (Gl) with a meandering septate junction (arrow). Thickenings of the axonal branches (synaptic boutons, D and E) form synapses (black arrows in D and E) and contain mitochondria (Mi in E), endosomes (End in D), multivesicular body (MVB in D) and other organelles. Some synapses contain a presynaptic density called T-bar (asterisk in D and E). There is a large variation among boutons in the number of synaptic vesicles (SV; compare D with E, see also [51]). Scale bars: 1 µm (A), 100 nm (B), 200 nm (C), 500 nm (D) and 100 nm (E).

[15], [21], [36–46]. On one hand, antibody nc82 gives very consistent results with beautifully distinct, strongly fluorescent "spots" against a practically negative background, making very easy to count the stained structures [12], [21], [37], [39–42], [47–49]. On the other hand, a wealth of experimental cell biology, genetics and electrophysiology supports the idea that the great

majority of "nc82 spots" do indeed represent individual synapses along the neuromuscular junction. When the BRP immunostaining at the neuromuscular junction was observed with the electron microscope, it appeared exclusively at synapses [12]. Double staining for nc82 and antibodies specific for glutamate receptors defined that practically each BRP-spot (presynaptic side of a single

Table 1. Measurements for the analysis of Inclusiveness and Reliability.

	Thickness (Z; $\mu$ m)	Height (H; $\mu$ m)	Sagittal length (L; $\mu$ m)	Calculated sagittal area (μm²)	Volume (calculated sagittal area)(µm³)
Muscle 6	41.1	114.3	533.2	60944.8	2504829.6
	41.1	87.1	629.8	54855.6	2254564.3
	44.4	94.1	718	67563.8	2999832.7
	38.1	82.8	708.4	58655.5	2234775.3
Mean	41.2±1.3	94.6±7	647.4±42.9	60504.9±2667.0	2498500.5±178051.9
Muscle 5	34.2	121	555.4	67203.4	2298356.3
	42.9	109.2	759	82882.8	3555672.1
	50.7	73.9	729.7	53924.8	2733988.9
	35.1	60	867.4	52044.0	1826744.4
Mean	40.7±3.9	91.0±14.4	727.9±64.7	64013.8±7137.2	2603690.4±367437.2
	<b>Height (μm)</b>	Area (μm²)	Thickness (min-max; mean; μm)	Mean Volume (Stack 1 or Stack 2; $\mu m^3$ )	Two images per fly (Stacks 1+2; μm³)
Stack (60×, x3.5)	67.67	4579.2	11.7-14.4; 13.0±1.3	59758.9	119517.9
	Inclusiveness (%)				
Muscle 6	4.8				
Muscle 5	4.6				

doi:10.1371/journal.pone.0067161.t001



Figure 3. Visualization of synapses in the MN5 terminal based on synaptic markers and LCM. (A) Example of the staining of the MN5 neuromuscular junction with anti-Horseradish Peroxidase (HRP, blue) and anti-nc82 (BRP, magenta) in some of the thinnest branches, located deeply inside the muscle. The bar scale represents 10 µm. (B) Example of the same staining in a branch of this neuromuscular junction showing boutons with synapses (white arrowheads), and boutons without them (outlined arrowheads) at larger magnification. The bar scale represents 2 µm. (C) Triple staining done at CT19 and CT7 confirming the presence of synaptic vesicles (Syn, magenta) and synapses (BRP, green) in the presynaptic side of synapses in each bouton (see outlined boutons b1, b2 and b3). Orange dotted lines in b1, b2 and b3 show the places where the analysis of fluorescence intensity was done to confirm the presence of Synorf1 in the proximity of the synapses. Details of the signals obtained are shown for HRP (D), BRP (E) and Syn (F). In (E and F) orange outlines mark selected synapses (S1, S2 and S3) located in boutons marked as b1, b2 and b3. (G) The graph shows the profiles of fluorescence intensity measured for the immunofluorescence corresponding to HRP, BRP and Syn, detailed in (C), (E) and (F). Syn and BRP signals match their location in b1, b2 and b3 and confirm that synaptic vesicles are in the proximity of S1, S2 and S3 synapses. (H) Triple staining confirming the accumulation of glutamate receptors (GluRIIA, magenta) apposed to the accumulation of BRP signals (see outlined boutons b1, b2 and b3). Orange dotted lines in b1, b2 and b3 show the places where the analysis of fluorescence intensity was done to confirm the presence of GluRIIA in the proximity of the synapses. Details of the signals obtained are shown for HRP (I), BRP (J) and GluRIIA (K). In (J and K) orange outlines mark selected synapses (S1, S2 and S3) analyzed in b1, b2 and b3. (L) The graph shows the profiles of fluorescence intensity measured for HRP, BRP and GluRIIA, detailed in (H), (J) and (K). GluRIIA and BRP signals match their location in b1, b2 and b3 and confirm that the accumulations of glutamate receptors correspond with accumulations of BRP in the synapses marked S1, S2 and S3. doi:10.1371/journal.pone.0067161.g003

synapse) correlated with a single cluster of glutamate receptors (postsynaptic side of the same synapse) reinforcing the view that anti-BRP alone can be used to obtain a good estimation of synapse numbers [12], [15], [36], [38], [39], [43], [46–48], [50].

## **Materials and Methods**

## Flies and Rearing Conditions

Wild-type flies of the strain Oregon R were raised on standard *Drosophila* medium at  $25^{\circ}$ C and kept at LD cycles of 12:12 hours with Zeitgeber time 0 (ZT0; lights-on) set at 09:00 am. For DD experiments, flies were kept in LD cycles for at least three days

before the light was switched off at ZT0 the first day of the experiment (setting the circadian time 0, CT0 in DD). All experiments were done with 4–5-days old female flies because they are known to exhibit strong rhythmicity in bouton size [10], [23]. The same two time points were studied in both conditions of illumination: ZT19 (midnight, in the middle of the phase of sleep), and ZT7 (midday) in LD cycles, and CT19 (subjective midnight) and CT7 (subjective midday) in DD. The flies were anesthetized with nitric oxide (Sleeper TAS, INJECT+MATIC, Switzerland), decapitated with a sharp needle and thereafter the dorsal portion of the thorax was dissected and fixed for either method as described below (TEM: in LD, n = 7 flies per ZT and in DD, n = 6 per CT; LCM: in LD, ZT19 n = 38 flies and ZT7 n = 43; in DD, CT19 n = 33 and CT7 n = 37, Table S1 and Table S2).

#### Transmission Electron Microscopy (TEM)

The samples were prepared for TEM according to the method detailed in [51]. The neuromuscular junction formed by the MN5 is extraordinarily large and complex compared to other motorneurons. This precludes the possibility of counting every single bouton or generating as many complete reconstructions of them as it will be necessary to obtain a representative sample of the thousands of boutons involved in a single terminal. The method adopted here instead, is based on the analysis of single sections complemented with a few serial reconstructions of single boutons. Every section contained the two longitudinal indirect flight muscles (IFM5 and IFM6) innervated by MN5 [52], [53]. Two time points (ZT19/CT19 or "midnight" and ZT7/CT7, or "midday") throughout two consecutive LD or DD cycles were analyzed. Then, after it was observed that the results were very similar for both consecutive cycles, data from the same time points were pooled in each condition of illumination. A minimum of 80 images per time point were analyzed (LD, 260 boutons in ZT19 and 168 boutons in ZT7; DD, 215 boutons in CT19 and 184 boutons in CT7). The ultrathin sections (40 to 60 nm) were observed with a JEOL JEM 1010 operated at 80 kV and the images were taken with a digital camera (Hamamatsu C4742-95) at magnification  $40,000 \times$ ,  $100,000 \times$  or  $150,000 \times$ . Image processing and counts were done with AMT Advantage CCD, Adobe Photoshop and Photoimpact softwares.

### Laser Confocal Microscopy (LCM)

A double staining was performed to count boutons and synapses. The MN5 neuronal membrane was outlined by immunostaining with a rabbit polyclonal anti-Horseradish Peroxidase serum (Jackson ImmunoResearch), which stains insect neuronal membranes [34] and specifically recognizes the glycoprotein 3-alpha-L-fucosyltransferase [54]. Simultaneously, synapses were marked with monoclonal antibody nc82 (DSHB) that specifically recognizes the protein Bruchpilot, a well documented



**Figure 4. Proportion of synaptic boutons found along the MN5 axon in LD and DD.** The graphs show means  $\pm$  s.e.m in all cases. (A–D) For LCM and TEM, the proportion of boutons per time point was calculated as the number of boutons found in each time point divided by the number of boutons found in the experiment. (A–B) In the LCM samples, the proportion of boutons was higher at ZT19 (0.55 $\pm$ 0.04) than ZT7 (0.45 $\pm$ 0.03) in LD (A, Mann-Whitney U test, P=0.03), and higher at CT19 (0.53 $\pm$ 0.02) than CT7 (0.47 $\pm$ 0.02) in DD (B, Student *t* test, P=0.04). (C–D) In TEM samples, the proportion of boutons counted in LD and DD showed no significant differences between time points, although the same tendency as in the LCM samples under LD (ZT19, 0.61 $\pm$ 0.12 vs. ZT7, 0.39 $\pm$ 0.06) and DD (CT19, 0.54 $\pm$ 0.08 vs. CT7, 0.46 $\pm$ 0.04). Number of flies used in LCM per ZT: ZT19, n=38; ZT7, n=43; CT19, n=33; CT7, n=37. In TEM: ZT19/ZT7 n=7 and CT19/CT7 n=6. doi:10.1371/journal.pone.0067161.a004
Table 2. Summary of the statistical analyses of all parameters studied with LCM and TEM.

Parameter Studied	Method	LD	DD	LD vs. DD
Proportion of boutons	LCM	ZT19 vs. ZT7: MW test p = 0.03473	CT19 vs. CT7: t-test p = 0.045062	ZT7 vs. CT7: MW test p=0.003778
	TEM	ZT19 vs. ZT7: nd	CT19 vs. CT7: nd	ZT7 vs. CT7: nd
Proportion of boutons with synapses	LCM	ZT19 vs. ZT7: t-test p=0.0129	CT19 vs. CT7: nd	ZT7 vs. CT7: t-test p=0.000196
	TEM	ZT19 vs. ZT7: MW test p=0.03787	CT19 vs. CT7: t-test p = 0.020478	ZT7 vs. CT7: nd
Proportion of boutons with vs. without synapses	LCM	ZT19: nd	CT19: nd	ZT7 vs. CT7, without synapses: nd
		ZT7: t-test p=0.042197	CT7: t-test p=0.000012	ZT7 vs. CT7, with synapses: nd
		ZT19 vs. ZT7, without synapses: nd	CT19 vs. CT7, without synapses: t-test p = 0.034085	
		ZT19 vs. ZT7, with synapses: nd	CT19 vs. CT7, without synapses: t-test p = 0.034085	
Distribution of boutons with 1, 2 and 3 or more synapses	LCM	ZT19 vs. ZT7, 1 synapse: nd	CT19 vs. CT7, 1 synapse: nd	ZT7 vs. CT7, 1 synapse: nd
		ZT19 vs. ZT7, 2 synapses: nd	CT19 vs. CT7, 2 synapses: nd	ZT7 vs. CT7, 2 synapses: t-test p=0.026557
		ZT19 vs. ZT7, 3 or more synapses: nd	CT19 vs. CT7, 3 or more synapses: nd	ZT7 vs. CT7, 3 or more synapses: nd
		ZT19: Kruskal-Wallis test H(2,N = 114) = 97.0312, p = 0.0000	CT19: Kruskal-Wallis test H(2,N = 99) = 85.4745, p = 0.0000	
		Post hoc MW test:	Post hoc MW test:	
		1 and 2 synapses: $p = 2.9 \times 10^{-22}$	1 and 2 synapses: $p = 2.77 \times 10^{-19}$	
		1 and 3 or more synapses: $p = 2.9 \times 10^{-22}$	1 and 3 or more synapses: p = $2.77 \times 10^{-19}$	
		2 and 3 or more synapses: $p = 4.4 \times 10^{-16}$	2 and 3 or more synapses: $p = 9.71 \times 10^{-16}$	
		ZT7: Kruskal-Wallis test H(2.N = 129) = 111.9703 p = 0.0000	CT7: Kruskal-Wallis test H(2.N = 111) = 96.7972 p = 0.000	
		Post hoc MW test:	Post hoc MW test:	
		1 and 2 synapses: $p = 3.01 \times 10^{-25}$	1 and 2 synapses: $p = 1.15 \times 10^{-21}$	
		1 and 3 or more synapses: $p = 3.0 \times 10^{-25}$	1 and 3 or more synapses: $p = 1.15 \times 10^{-21}$	
		2 and 3 or more synapses: $p = 8.6 \times 10^{-21}$	2 and 3 or more synapses: $p = 5.8 \times 10^{-19}$	

Light:darkness (LD), constant darkness (DD), transmission electron microscopy (TEM), laser Confocal microscopy (LCM), Zeitgeber time (ZT), circadian time (CT), Mann-Whitney test (MW test), no statistical difference (nd).

doi:10.1371/journal.pone.0067161.t002

marker of synapses [12], [15], [21], [36–50]. The antibody recognizes a region of the synapse [12], [55]. Additionally, a triple staining was performed to confirm the presence of synaptic vesicles in the presynaptic side of the synapse and glutamate receptors in the postsynaptic side. Synaptic vesicles were marked with monoclonal antibody 3C11 (DSHB) that specifically recognizes the protein Synorf1 [56], [57] and glutamate receptors were marked with monoclonal antibody 8B4D2 (DSHB) that specifically recognizes the glutamate receptor subunit IIA [58]. The dorsal half of the thorax was dissected in a droplet of phosphatebuffered saline (PBS, 0.1 M at pH 7.4), bisecting the thorax along the midsagittal plane to improve antibody penetration. Only one hemithorax per fly was processed further. The samples were fixed in ice-cold 4% paraformaldehyde buffered at pH 7.4 for 2.5 hours or in Bouin's solution (for 8B4D2 antibody) for 30 minutes. Tissues were then permeabilized in 0.3% Triton X100 in PBS (PBST) and unspecific binding sites were blocked with 1% Normal Goat Serum in PBST with 0.5% bovine serum albumin (PBSTA). The samples were then incubated with the primary antibodies (rabbit anti-HRP diluted 1:600, mouse nc82 diluted 1:100, 3C11 and 8B4D2 both diluted 1:10) over-night at room temperature (RT). The next day, the samples were washed 4×15 min in PBST before being incubated with the corresponding secondary antibodies for 2 hours at RT (goat anti-rabbit conjugated to Alexa 488 from Molecular Probes, diluted 1:1000 in PBST and goat anti-mouse conjugated to Cy3 from Jackson ImmunoReseach, Inc., diluted 1:1000). In triple staining, given that two of three antibodies used were monoclonal antibodies of the same species, samples were incubated with the corresponding combination of secondary isotype-specific antibodies (goat anti-mouse IgG2b Alexa 568 from Molecular Probes, diluted 1:1000 in PBST and goat antimouse IgG1 Alexa 488 from Molecular Probes, diluted 1:1000). The samples were rinsed 4×15 min in PBS and thereafter IFM5 and IFM6 were dissected in PBS with a sharp needle and mounted in 80% glycerol. All samples were examined with a laser confocal microscope Olympus FV300. Each final image was a projection of a Z-series of approximately 15 optical sections scanned at intervals of 0.3  $\mu$ m with a 60× lens and a digital zoom of 3.5, covering the whole thickness of the muscle under study. Two such images were done for each fly. The quality of the colors was optimized with ImageJ software and the number of boutons and synapses was counted in each image working "blind". For the analysis of synapse profiles, the fluorescence intensity was measured with ImageJ software using the plug-in Colour Profiler.

#### Quantification of Boutons and Synapses

Two microscopy methods (TEM and LCM) were used to count boutons and synapses at each ZT or CT. As the counting of all boutons and synapses in the terminal of the MN5 over and inside its target muscles IFM5 and IFM6 is practically not feasible given its neuroanatomy and size, we counted those features in two random samples per fly, each representing a relatively small volume of the entire MN5 terminal. We evaluated the inclusiveness and reliability of this method. The inclusiveness of the samples of the muscle analyzed (two stacks per fly) was calculated as the volume of the stacks divided by the total volume of the muscles and expressed as a percentage. The volume of the stacks was calculated using their thickness, height and sagittal length (approximately 15 optical sections scanned at intervals of  $0.3 \ \mu m$ with a  $60 \times$  lens and a digital zoom of 3.5) (Fig. 1). The total volume of the muscles IFM5 and IFM6 was calculated using the mean of the thickness, height and sagittal length of these muscles. This was measured in four flies. To evaluate the reliability of our sampling method we tested if there were significant differences in the counts depending on where in the muscle the stacks were done. This was evaluated in four flies, taking three confocal stacks per fly (ZT19) each in one of three different regions of the IFM5 and IFM6 muscles (anterior, medial and posterior region; Fig. 1B, Table S3), counting boutons, synapses, boutons with and without synapses, and investigating if there were statistical differences between regions. The proportion of boutons per time point was calculated as the number of boutons found in each time point divided by the number of boutons found in the experiment. The same calculation was done for the proportion of boutons with synapses. For TEM, the proportion of boutons with synapses was quantified as the number of boutons with synapses found in each time point divided by the number of boutons with synapses found in the experiment. Finally, the proportion of boutons with and without synapses per time point (relative to the total number of boutons found in each time point) and synapse distribution among boutons was analyzed in LCM. Boutons with synapses were classified into three classes: boutons with one, two, or more synapses and the percentage of each subpopulation were calculated. Thereafter the mean  $\pm$  s.e.m was calculated and graphically represented.

### Statistical Analysis

Student *t*-tests were performed when assumptions for parametric test were accomplished (normality using Shapiro-Wilk W test and homoscedasticity using Levenes test). If these assumptions were not achieved, nonparametric Kruskal -Wallis and Mann-Whitney U tests were performed instead. Statistical significance was set at 0.05, 0.01 and 0.001. Analyses were done using Statistica 7.0 software (Statsoft).



**Figure 5. Proportion of boutons with synapses found along the MN5 axon in LD and DD.** The graphs represent means  $\pm$  s.e.m in all cases. (A–D) For LCM and TEM samples, the proportion of boutons with synapses per time point was calculated as the number of boutons with synapses found in each time point divided by the number of boutons with synapses found in the experiment. In LD, a higher proportion of boutons with synapses was found at midnight compared to midday with LCM (A, 0.55 $\pm$ 0.03 vs. 0.45 $\pm$ 0.02, Student *t* test, P=0.012) and TEM (C, 0.72 $\pm$ 0.2 vs. 0.28 $\pm$ 0.08, Mann-Whitney U test, P=0.037). In DD, a higher proportion of boutons with synapses was found at midday with TEM (D, 0.26 $\pm$ 0.1 vs. 0.74 $\pm$ 0.15, Student *t* test, P=0.0205). The comparison of LCM results for LD and DD samples (A vs. B) and TEM results (C vs. D) showed significant differences in the proportion of boutons with synapses between ZT7 and CT7 using LCM (0.44 $\pm$ 0.02 vs. 0.56 $\pm$ 0.02, Student *t* test, P=0.002) but not using TEM (0.34 $\pm$ 0.10 vs. 0.66 $\pm$ 0.13, Student *t* test, P=0.06). Number of flies used in LCM per ZT: ZT19, n = 38; ZT7, n = 43; CT19, n = 37. In TEM, ZT19/ZT7 n = 7 and CT19/CT7 n = 6. doi:10.1371/journal.pone.0067161.q005



**Figure 6. Quantification of boutons with synapses and synapse distribution among boutons by LCM in LD and DD.** (A–B) The proportion of boutons with and without synapses (relative to the number of boutons found per time point in each experiment) was around 50:50 at ZT19 and CT19. However, a larger proportion of boutons with synapses was found at midday under LD and DD conditions (A, LD: ZT7  $0.53\pm0.02$  vs.  $0.47\pm0.02$ , Student *t* test, P = 0.042; B, DD: CT7  $0.55\pm0.01$  vs.  $0.45\pm0.01$ , Student *t* test, P = 0.000012). No significant differences were found between LD and DD. (C–D) The distribution of synapses among boutons was very similar at all time points. (C) In LD, most boutons had one synapse (ZT19:  $0.72\pm0.01$ , ZT7:  $0.71\pm0.01$ ), few had two (ZT19:  $0.21\pm0.01$ , ZT7:  $0.22\pm0.01$ ) and even fewer had three or more (ZT19:  $0.07\pm0.01$ , ZT7:  $0.07\pm0.01$ ) (Kruskal-Wallis test, ZT19: H(2,N = 14) = 97.03, P = 0.000; ZT7: H(2,N = 129) = 111.97, P = 0.000. See Table 2 for Post hoc comparisons). (D) Also in DD most boutons had one synapse (CT19:  $0.72\pm0.01$ , CT7:  $0.05\pm0.01$ ) (CT19:  $0.02\pm0.01$ , CT7:  $0.05\pm0.01$ ) (Kruskal-Wallis test, CT19:  $0.77\pm0.01$ , CT7:  $0.75\pm0.01$ ), few had two (CT19:  $0.72\pm0.01$ , and even fewer had three or more (CT19:  $0.06\pm0.005$ , CT7:  $0.06\pm0.01$ ) (Kruskal-Wallis test, CT19: H(2,N = 99) = 85.47, P = 0.000; CT7: H(2,N = 111) = 96.79, P = 0.000. See Table 2 for Post hoc comparisons). (D) Also in DD hoc comparisons). The percentage of boutons with one, two and three or more synapses was approximately 70:25:5 at midnight and midday in LD samples (C) and 75:20:5 in DD samples (D). The comparison of LD and DD results showed significant differences between ZT7 and CT7 for the subpopulation of boutons with two synapses (Student *t* test, P = 0.026). doi:10.1371/journal.pone.0067161.g006

#### Results

#### General Neuroanatomy of the MN5 Axonal Arborization

The neuroanatomy of MN5 has been studied with different methods [10], [53], [59-62]. A brief description of the major differences between this neuron and the majority of larval



**Figure 7. Diagrammatic representation of the daily changes in bouton and synapse numbers found in this study.** The bars do not represent exact values and they are only meant to provide a simplified graphic summary of the results detailed in Figs. 4 and 5. In both LD and DD conditions, we found more boutons at midnight than at midday. Synapses, instead, were more abundant at midnight in LD samples and at midday in DD samples. Abbreviations: Boutons (B, gray bars); synapses (S, black bars); light:darkness (LD); constant darkness (DD).

doi:10.1371/journal.pone.0067161.g007

(reviewed in [63]) and adult [64-66] Drosophila motor neurons studied so far is given below. One major difference is that the adult MN5 axon makes hundreds of branches [10], [52], [53], an order of magnitude more than all other Drosophila motor neurons. Furthermore, contrary to what is the rule for larval and most adult motor terminals, we found that the axonal branches of the MN5 penetrated both target muscles and did so in tight association with glia (Fig. 2A). The primary axonal branches on the surface of the muscle were wrapped by a glial cell forming up to ten concentric layers (Fig. 2B) with a septate junction. Secondary and tertiary axonal branches penetrated the muscle and were also wrapped by glia, although in this case only with a single layer and a septate junction (Fig. 2C). The synaptic boutons were not covered by a subsynaptic reticulum (Fig. 2D, E). About 90% of the images of adult MN5 boutons containing synapses had only one synapse instead of several as is seen frequently in images of larval boutons [11], [63], [67]. Many of our bouton images showed very few vesicles in accordance with previous studies [51], [68]. This stands in contrast with larval motor terminals, in which practically every ultra-thin section across a synaptic bouton contains abundant synaptic vesicles [11], [63], [67]. Furthermore, we found that the majority of MN5 boutons were located inside the muscle (i.e. completely surrounded by muscle cytoplasm) whereas in larval muscles practically all boutons are located on the surface of the muscle.

## The Numbers of Boutons and Boutons Containing Synapses are Increased at Midnight

Our analyses of inclusiveness and reliability showed that the microscopy and sampling methods used here generated representative and reproducible results. Each couple of confocal stacks used to count boutons and synapses in each fly represented about 5% of the total volume of the corresponding IFM5 and IFM6 muscles (Fig. 1 and Table 1). We found no statistical differences between results obtained when these two stacks were scanned in different regions of the muscles, indicating that boutons and synapses are homogeneously distributed across these muscles (Fig. 1 and Table 1). Using these data we estimated that a single MN5 has approximately 4000 boutons and 3000 synapses.

Double staining of the MN5 neuromuscular junction showed that not all boutons have synapses (Fig. 3A–B). Triple staining made possible to confirm the presence of synaptic vesicles in the presynaptic side of the synapse (Fig. 3C–G) and glutamate receptors in the postsynaptic side (Fig. 3H–L). Synaptic vesicles were found concentrated in synaptic boutons (Fig. 3C, F, G). Concentrations of glutamate receptors were located in close apposition to the presynaptic marker nc82 as expected (Fig. 3H, L).

The number of boutons registered with LCM was significantly higher at midnight than midday in flies kept under LD cycles (Fig. 4A and Table 2). The same result was found in flies kept in constant darkness (Fig. 4B and Table 2). The data obtained with TEM was consistent with the LCM findings in LD and DD but did not show statistical differences between time points (Fig. 4C–D and Table 2).

After learning that the MN5 has more boutons at midnight, we used LCM and TEM to investigate if this change included a nocturnal increment in the number of synapses. With LCM, we scored the proportion of boutons with synapses were detected at midnight during LD cycles (Fig. 5A and Table 2) but not under DD conditions (Fig. 5B and Table 2). The TEM data confirmed the LCM finding in flies kept under LD cycles (Fig. 5C and Table 2) but detected a reversed relationship in DD conditions (Fig. 5D and Table 2). Although both methods gave a strong indication of the existence of boutons without synapses, we confirmed this feature by serial reconstructions (Figure S1).

In summary, LCM showed that the number of boutons was higher at midnight than midday in LD and DD. Both microscopy methods showed that the proportion of boutons with synapses was also higher at midnight in LD. However, TEM showed that this proportion was higher at midday in DD.

# Synapses were not Detected in a Substantial Proportion of Boutons

The double staining in our LCM samples made possible to study the proportion of boutons with synapses relative to the proportion of boutons without synapses (Fig. 6A–B). Half of the boutons had synapses at ZT19 and CT19 (Fig. 6A–B), but this proportion increased at midday in LD (Fig. 6A) and even more in DD (Fig. 6B).

# The Proportion of Boutons with One, Two or more Synapses is Constant along the Day

The double staining also made possible to analyze the distribution of synapses among boutons, discriminating boutons with one, two and three or more synapses (Fig. 6C–D). In LD, most boutons had one synapse, few had two and even fewer had three or more (Fig. 6C). This distribution was very similar in the

DD samples (Fig. 6D). The proportion of boutons with 1, 2 and 3 or more synapses was approximately 70:25:5 in LD and 75:20:5 in DD, at all time points. The statistical comparison of LD and DD data showed significant differences between ZT7 and CT7 for the subpopulation of boutons with 2 synapses (Student *t* test, P = 0.026). A similar relationship was observed with TEM.

### Discussion

In this study, we present the first evidence for the existence of rhythmic daily changes in synapse numbers in a motor neuron. Contrary to our expectations, in flies kept under LD conditions, the studied flight motor neuron (MN5) had more synapses in the night, when the fly does not fly. Before discussing in detail our principal results we will take up some considerations regarding the methods that we developed to quantify synapses in this particular motor neuron and the reliability of our data.

TEM is certainly the best method to identify synapses regardless of the particular neuron under scrutiny because its optical resolution makes possible for the observer to see individual synapses directly and count them one by one. The level of resolution of LCM is not enough to identify with certainty each individual synapse but this method can be used to count synapses more rapidly than working with TEM, using fluorescently labeled "synaptic markers" which are assumed to give a very good representation of actual synapse numbers [37], [42], [48], [49]. The main disadvantage of TEM is that it demands much longer time per sample than LCM and hence becomes inadequate for the study of the MN5, which has thousands of synapses. Here we found that a combination of TEM and LCM made possible to obtain good replicability (consistency between values of individual flies from each time point at LD or DD) and reproducibility (agreement of the data obtained with different methods and different experiments). In addition, we highlight that our LCM sampling method gave reliable results because the statistical comparison of data obtained from different regions of the muscles indicated that boutons and synapses are distributed remarkably homogeneously across the MN5 target muscles and thus a single image stack per muscle is enough to obtain representative results.

Since boutons are the only portions of the axon where synapses are normally made [11], [14], [69], more boutons during the night would also imply more synapses at night. This would only be true if all boutons contain synapses and if all synapses are uniformly distributed among boutons along the day. Our results show that only about 50% of all boutons have synapses. However, our results also show that synapses are uniformly distributed among boutons along LD and DD cycles. In all samples, the majority of boutons with synapses had only one and the rest had two or more. The maintenance of synapse distribution during the day contrasts with the change in bouton number, suggesting the existence of a homeostatic mechanism regulating synapse distribution among MN5 boutons.

These findings, together with our estimations of the total number of synapses in each sample, strongly indicate that in flies kept in LD conditions the MN5 has more synapses at midnight (Fig. 7). However, we observed the opposite relationship in DD. We do not think that this difference between LD and DD depends mainly on differences in locomotor activity, because it is well established that *Drosophila* flies show a similar pattern of daily locomotion when kept in constant darkness, with more activity during the subjective day [70], [71]. We think instead that this difference indicates the existence of a light-dependent mechanism for synapse assembly/disassembly along the day. It is well documented that light has a positive influence on axonal diameter and on synapse numbers in neurons associated with vision (larger in LD than DD; [19], [30], [32]) as well as on boutons size in the motor neuron studied here (larger in LD than DD; [10]).

The observation of more synapses at midnight than midday in LD samples sounds counterintuitive and as a first explanation we propose the existence of a rhythmic cycle of synapse assembly during the night and degradation during the day. In conformity with this hypothesis, towards the end of the night the fly will start its active phase with a maximum number of synapses, many of which were recently built within boutons of smaller size than those found in the day [10], [25], and loaded with vesicles of larger size than those found in the day [51]. During the day, as the fly flies, the boutons of the MN5 will grow as a result of the continued addition of membrane through the fusion of vesicles used during synaptic activity. At the same time, a proportion of the thousands of synapses made on flight muscles by the MN5 terminal will gradually waste away and be eventually degraded along a global program of ordered synapse disassembly. This would explain the decrease in the number of synapses during the day. The next night, during the phase of rest/sleep, the MN5 will replace these synapses through a wave of synapse assembly which most probably also comprises a dynamic rearrangement of the entire terminal, including the formation of new boutons and their reloading with large vesicles [51]. Our hypothesis is consistent with available data on the time required for the assembly of synapses in Drosophila, which takes a few hours in motor terminals [12], [20], [21] and even a few minutes in some brain neurons [19].

This hypothesis can be tested in several ways. An intense wave of synaptogenesis spanning a few hours in the night could leave clear traces in the transcriptome, possibly detectable by, for example, mRNAseq of thoracic tissue samples collected at the right time points. Blocking or reducing the potential of the MN5 to rebuild synapses massively during a short time of the night, using the GAL4-UAS system to drive RNA interference of appropriate genes, would lead to a MN5 with abnormally few and old synapses the next morning. Electrophysiological studies could address whether the day after such an experiment the MN5 will function with a set of relatively "aged" synapses.

#### References

- Meinertzhagen IA, Pyza E (1996) Daily rhythms in cells of the fly's optic lobe: Taking time out from the circadian clock. Trends Neurosci 19: 285–291.
- Pyza E, Górska-Andrzejak J (2008) External and internal inputs affecting plasticity of dendrites and axons of the fly's neurons. Acta Neurobiol Exp (Wars) 68: 322–333.
- Mehnert KI, Cantera R (2011) Circadian rhythms in the morphology of neurons in *Drosophila*. Cell Tissue Res 334: 381–389.
- Becquet D, Girardet C, Guillaumond F, François-Bellan AM, Bosler O (2008) Ultrastructural plasticity in the rat suprachiasmatic nucleus. Possible involvement in clock entrainment. Glia 56: 294–305.
- Appelbaum L, Wang G, Yokogawa T, Skariah GM, Smith SJ, et al. (2010) Circadian and homeostatic regulation of structural synaptic plasticity in hypocretin neurons. Neuron 68: 87–98.
- Girardet C, Blanchard MP, Ferracci G, Lévêque C, Moreno M, et al. (2010a) Daily changes in synaptic innervation of VIP neurons in the rat suprachiasmatic nucleus: contribution of glutamatergic afferents. Eur J Neurosci 31: 359–370.
- Girardet C, Becquet D, Blanchard MP, François-Bellan AM, Bosler O (2010b) Neuroglial and synaptic rearrangements associated with photic entrainment of the circadian clock in the suprachiasmatic nucleus. Eur J Neurosci 32: 2133– 2142.
- Zito K, Parnas D, Fetter RD, Isacoff EY, Goodman CS (1999) Watching a synapse grow: Noninvasive confocal imaging of synaptic growth in *Drosophila*. Neuron 22: 719–729.
- Eaton BA, Fetter RD, Davis GW (2002) Dynactin is necessary for synapse stabilization. Neuron 34: 729–741.
- Mchnert KI, Beramendi A, Elghazali F, Negro P, Kyriacou CP, et al. (2007) Circadian changes in *Drosophila* motor terminals. Dev Neurobiol 67: 415–421.
- Collins CA, DiAntonio A (2007) Synaptic development: insights from *Drosophila*. Curr Opin Neurobiol 17: 1–8.

In conclusion, in flies kept under LD cycles the MN5 has a daily rhythm of bouton formation/elimination and synapse assembly/ disassembly. New boutons and synapses are formed in the night, when the fly is resting, and some boutons and synapses are eliminated during the day, when the fly is active.

#### **Supporting Information**

**Figure S1 TEM serial reconstruction of a bouton without synapse.** The glia is depicted in green. Scale bar represents 200 nm. (TIF)

Table S1Total number of boutons and boutons withsynapses found with TEM in each sample/fly.(XLS)

Table S2 Total number of boutons, boutons with synapses and boutons without synapses found in each sample with LCM.

(XLS)

Table S3 Measurements used for the Analysis ofReliability of the sampling method.(DOC)

#### Acknowledgments

The nc82 antibody, developed by Dr. Buchner, was obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank developed under the auspices of the NICHD and maintained by The University of Iowa, Department of Biology, Iowa City, IA 52242. We thank Dr. W. Norbis for advice with statistics and Dr. Olivier Bosler for constructive comments. S.R. thanks Magdalena Cardenas and the Molecular Human Genetics Laboratory of the Institute Pasteur Montevideo for supplying the isotype-specific secondary antibodies. S.R. thanks Dr. Omar Trujillo-Cenóz for helpful advice in the preparation of TEM serial section images.

#### **Author Contributions**

Conceived and designed the experiments: SR RC. Performed the experiments: SR MF KM GC AO RC. Analyzed the data: SR MF RC. Wrote the paper: SR MF RC.

- Fouquet W, Owald D, Wichmann C, Mertel S, Depner H, et al. (2009) Maturation of active zone assembly by *Drosophila* Bruchpilot. J Cell Biol 186: 129–145.
- Trujillo-Cenóz O (1969) Some aspects of the structural organization of the medulla in muscoid flies. J Ultrastr Res 27: 533–553.
- Prokop A, Meinertzhagen IA (2006) Development and structure of synaptic contacts in *Drosophila*. Sem Cell Dev Biol. 17: 20–30.
- Wagh DA, Rasse TM, Asan E, Hofbauer A, Schwenkert I, et al. (2006) Bruchpilot, a protein with homology to ELKS/CAST, is required for structural integrity and function of synaptic active zones in *Drosophila*. Neuron 49: 833–844.
- Renger JJ, Ueda A, Atwood HL, Govind CK, Wu C-F (2000) Role of camp cascade in synaptic stability and plasticity: ultrastructural and physiological analyses of individual synaptic boutons in *Drosophila* memory mutants. J Neurosci 20: 3980–3992.
- Coyle IP, Koh Y-H, Lee W-CM, Slind J, Fergestad T, et al. (2004) Nervous wreck, an SH3 adaptor protein that interacts with Wsp, regulates synaptic growth in *Drosophila*. Neuron 41: 521–534.
- Stewart BA, Pearce J, Bajec M, Khorana R (2005) Disruption of synaptic development and ultrastructure by *Drosophila* NSF2 alleles. J Comp Neurol 488: 101–111.
- Rybak J, Meinertzhagen IA (1997) The effects of light reversals on photoreceptor synaptogenesis in the fly *Musca domestica*. Eur J Neurosci 9: 319–33.
  Rasse TM, Fouquet W, Schmid A, Kittel RJ, Mertel S, et al. (2005) Glutamate
- Rasse TM, Fouquet W, Schmid A, Kittel RJ, Mertel S, et al. (2005) Glutamate receptor dynamics organizing synapse formation in vivo. Nat Neurosci 8: 898– 905.
- Ataman B, Ashley J, Gorczyca M, Ramachandran P, Fouquet W, et al. (2008) Rapid activity-dependent modifications in synaptic structure and function require bidirectional Wnt signaling. Neuron 57: 705–718.
- Klarsfeld A, Leloup JC, Rouyer F (2003) Circadian rhythms of locomotion activity in *Drosophila*. Behav Processes 64: 161–175.

- Hendricks JC, Finn SM, Panckeri KA, Chavkin J, Williams JA, et al. (2000) Rest in *Drosophila* is a sleep-like state. Neuron 25: 129–138.
- Shaw PJ, Cirelli C, Greenspan RJ, Tonomi G (2000) Correlates of sleep and waking in *Drosophila melanogaster*. Science 287: 1834–1837.
- Mehnert KI, Cantera R (2008) A peripheral pacemaker drives the circadian rhythm of synaptic boutons in *Drosophila* independently of synaptic activity. Cell Tissue Res 334: 103–109.
- Cao G, Nitabach MN (2008) Circadian control of membrane excitability in Drosophila melanogaster lateral ventral clock neurons. J Neurosci 28: 6493–6501.
- Sheeba V, Gu H, Sharma VK, ODowd DK, Holmes TC (2008) Circadian- and light-dependent regulation of resting membrane potential and spontaneous action potential firing of *Drosophila* circadian pacemaker neurons. J Neurophysiol 99: 976–988.
- Huber R, Hill SL, Holladay C, Biesiadecki M, Tononi G, et al. (2004) Sleep homeostasis in *Drosophila melanogaster*. Sleep 27: 628–639.
- Tononi G, Cirelli C (2003) Sleep and synaptic homeostasis: a hypothesis. Brain Res Bull 62: 143–150.
- Pyza E, Meinertzhagen IA (1993a) Daily and circadian rhythms of synaptic frequency in the first visual neuropile of the housefly's (*Musca domestica L.*) optic lobe. Proc Biol Sci 254: 97–105.
- Pyza E, Meinertzhagen IA (1993b) The regulation of circadian rhythms in the fly's visual system: involvement of FMRFamide-like neuropeptides and their relationship to pigment dispersing factor in *Musca domestica* and *Drosophila melanogaster*. Neuropeptides 37: 277–289.
- Barth M, Schultze M, Schuster CM, Strauss R (2010) Circadian plasticity in photoreceptor cells controls visual coding efficiency in *Drosophila melanogaster*. PLoS One 5(2): e9217.
- Güldner FH, Bahar E, Young CA, Ingham CA (1997) Structural plasticity of optic synapses in the rat suprachiasmatic nucleus: adaptation to long-term influence of light and darkness. Cell Tissue Res 287: 43–60.
- Jan LY, Jan YN (1982) Antibodies to horseradish peroxidase as specific neuronal markers in *Drosophila* and grasshopper embryos. Proc Nat Acad Sci USA 79: 2700–2704.
- Hofbauer A (1991) A library of monoclonal antibodies against the brain of Drosophila melanogaster. Habilitation thesis. University of Würzburg, Germany.
  Kittel RJ, Wichmann C, Rasse TM, Fouquet W, Schmidt M, et al. (2006)
- Kittel RJ, Wichmann C, Rasse TM, Fouquet W, Schmidt M, et al. (2006) Bruchpilot promotes active zone assembly, Ca2+ channel clustering and vesicle release. Science 312: 1051–1054.
- Martin-Peña A, Acebes A, Rodríguez JR, Sorribes A, de Polavieja GG, et al. (2006) Age-independent synaptogenesis by phosphoinositide 3 kinase. J Neurosci 26: 10199–10208.
- Pielage J, Fetter RD, Davis GW (2006) A postsynaptic spectrin scaffold defines active zone size, spacing, and efficacy at the *Drosophila* neuromuscular junction. J Cell Biol 175: 491–503.
- Besse F, Martel S, Kittel RJ, Wichmann C, Rasse TM, et al. (2007) The Ig cell adhesion molecule basigin controls compartmentalization and vesicle release at *Drosophila melanogaster* synapses. J Cell Biol 177: 843–855.
- Li J, Ashley J, Budnik V, Bhat MA (2007) Crucial role of *Drosophila* neurexin in proper active zone apposition to postsynaptic densities, synaptic growth, and synaptic transmission. Neuron 55: 741–755.
- Schmid A, Hallermann S, Kittel RJ, Khorramnshahi O, Frölich AM, et al. (2008) Activity-dependent, site-specific changes of glutamate receptor composition in vivo. Nat Neurosci 11: 659–666.
- Viquez NM, Füger P, Valakh V, Daniels RW, Rasse TM, et al. (2009) PP2A and GSK-3beta act antagonistically tor regulate active zone development. J Neurosci 16: 11484–11494.
- Banovic D, Khorramshahi O, Owald D, Wichmann C, Riedt T, et al. (2010) Drosophila neuroligin 1 promotes growth and postsynaptic differentiation at glutamatergic neuromuscular junctions. Neuron 66: 724–738.
- Liebl FL, McKeown C, Yao Y, Hing HJ (2010) Mutations in Wnt2 alter presynaptic motor neuron morphology and presynaptic protein localization at the *Dosophila* neuromuscular junction. PLoS ONE 5(9): e12778.
- Dajno R, Kawasaki F, Ordway RW (2011) A tripartite synapse model in Drasophila. PLoS ONE 6(2): e17131.
- Jordán-Alvarez S, Fouquet W, Sigrist SJ, Acebes A (2012) Presynaptic PI3K activity triggers the formation of glutamate receptors at neuromuscular terminals of *Drosophila*. J Cell Sci 125: 3621–3629.

- Marrus AB, DiAntonio A (2004) Preferential localization of glutamate receptors opposite sites of high presynaptic release. Curr Biol 14: 924–931.
- Chen K, Featherstone DE (2011) Pre and postsynaptic roles for *Drosophila* CASK. Mol Cell Neurosci 48: 171–182.
- Sun M, Xing G, Yuan L, Gan G, Knight D, et al. (2011) Neuroligin 2 is required for synapse development and function at the *Drosophila* neuromuscular junction. I Neurosci 31: 687–699.
- Owald D, Khorramnshahi O, Gupta VK, Banovic D, Depner H, et al. (2012) Cooperation of Syd-1 with Neurexin synchronizes pre- with postsynaptic assembly. Nat Neurosci 15: 1219–1226.
- Ruiz S, Ferreiro MJ, Casanova G, Olivera A, Cantera R (2010) Synaptic vesicles in motor synapses change size and distribution during the day. Synapse 64: 14– 19.
- Ikeda K, Koenig JH, Tsuruhara T (1980) Organization of identified axons innervating the dorsal longitudinal flight muscle of *Drosophila melanogaster*. J Neurocytol 9: 799–823.
- Ikeda K, Koenig JH (1988) Morphological identification of the motor neurons innervating the dorsal longitudinal flight muscle of *Drosophila melanogaster*. J Comp Neurol 273: 436–444.
- Sun B, Salvaterra PM (1995) Characterization of nervana, a Drosophila melanogaster neuron-specific glycoprotein antigen recognized by anti-horseradish peroxidase antibodies. J Neurochem 65: 434–443.
- Hamanaka Y, Meinertzhagen I (2010) Immunocytochemical localization of synaptic proteins to photoreceptor synapses of *Drosophila melanogaster*. J Comp Neurol 518: 1133–1155.
- Klagges BR, Heimbeck G, Godenschwege TA, Hofbauer A, Pflugfelder GO, et al. (1996) Invertebrate synapsins: a single gene codes for several isoforms in *Drosophila*. J Neurosci. 16: 3154–65.
- Godenschwege TA, Reisch D, Diegelmann S, Eberle K, Funk N, et al. (2004) Flies lacking all synapsins are unexpectedly healthy but are impaired in complex behaviour. Eur J Neurosci. 20: 611–622.
- Schuster CM, Ultsch A, Schloss P, Cox JA, Schmitt B, et al. (1991) Molecular cloning of an invertebrate glutamate receptor subunit expressed in *Drosophila* muscle. Science 254: 112–114.
- Coggshall JC (1978) Neurons associated with the dorsal longitudinal flight muscles of *Drosophila melanogaster*. J Comp Neurol 177: 707–720.
- Sun YA, Wyman RJ (1997) Neurons of the *Drosophila* giant fiber system: I. Dorsal longitudinal motor neurons. J Comp Neurol 387: 157–166.
- Consoulas C, Restifo LL, Levine RB (2002) Dendritic remodeling and growth of motoneurons during metamorphosis of *Drosophila melanogaster*. J Neurosci 22: 4906–4917.
- Hebbar S, Fernandes JJ (2004) Pruning of motor neuron branches establishes the DLM innervation pattern in *Drosophila*. J Neurobiol 60: 499–516.
- Budnik V, Ruiz-Cañada C (2006) The Fly Neuromuscular Junction: Structure and Function, 2<sup>nd</sup> ed. Academic Press, San Diego.
- Rivlin PK, St. Clair RM, Vilinsky I, Ditcher DL (2004) Morphology and molecular organization of the adult neuromuscular junction of *Drosophila*. J Comp Neurol 468: 596–613.
- Hebbar S, Hall RE, Demski SA, Subramanian A, Fernandes JJ (2006) The adult abdominal neuromuscular junction of *Drosophila*: A model for synaptic plasticity. J Neurobiol 66: 1140–1155.
- Beramendi A, Peron S, Casanova G, Reggiani C, Cantera R (2007) Neuromuscular junction in abdominal muscles of *Drosophila melanogaster* during adulthood and aging. J Comp Neurol 501: 498–598.
- Atwood HL, Govind CK, Wu CF (1993) Differential ultrastructure of synaptic terminals on ventral longitudinal abdominal muscles in *Drosophila* larvae. J Neurobiol 24: 1008–1024.
- Koenig JH, Ikeda K (1989) The relationship between the number of synaptic vesicles and the amount of transmitter released. J Neurosci 9: 1937–1942.
- Prokop A (1999) Integrating bits and pieces: synapse structure and formation in Drosophila embryos. Cell Tissue Res 297: 169–186.
- 70. Saunders DS (2002) Insect Clocks. Oxford New York: Illustrated Publisher Elsevier.
- Helfrich-Förster C (2010) Differential control of morning and evening components in the activity rhythm of *Drosophila melanogaster*-sex specific differences suggest a different quality of activity. J Biol rhythms 15: 135-154.

# Synaptic Vesicles in Motor Synapses Change Size and Distribution During the Day

SANTIAGO RUIZ,<sup>1</sup> MARIA JOSE FERREIRO,<sup>1</sup> GABRIELA CASANOVA,<sup>2,3</sup> ALVARO OLIVERA,<sup>2</sup> and RAFAEL CANTERA<sup>1,4\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biología del Neurodesarrollo, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, 11600 Montevideo, Uruguay

<sup>2</sup>Unidad de Microscopía Electrónica de Transmisión, Facultad de Ciencias, UdelaR, 11400, Montevideo, Uruguay <sup>3</sup>Departamento de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias, UdelaR, 114 00 Montevideo, Uruguay <sup>4</sup>Zoology Department, Stockholm University, 106 91 Stockholm, Sweden

# *KEY WORDS* Drosophila; synaptic plasticity; circadian rhythms; synapse; synaptic vesicle

ABSTRACT The morphology of Drosophila motor terminals changes along the day with a circadian rhythm controlled by the biological clock. Here, we used electron microscopy to investigate the size, number, and distribution of synaptic vesicles, at intervals of 6 h during 2 consecutive days, under light-dark (LD) or the first 2 days in constant darkness (DD). We found changes in the size and distribution of vesicles located either at the active zone or in the reserve pool, indicating a circadian rhythm of synapse reorganization. Vesicles at the active zone were generally smaller than those in the reserve pool in LD and DD conditions. The size of active zones vesicles decreased twice in LD, corresponding with times of more intense locomotion activity, but only once in DD conditions. **Synapse 64:14-19, 2010.** ©2009 Wiley-Liss, Inc.

### **INTRODUCTION**

A special type of neuronal plasticity involves rhythmic, circadian changes in the morphology of axons and synaptic terminals, which are influenced by light and require the normal expression of the clock genes period and timeless. Documented so far in neurons of the flies Musca domestica and Drosophila melanogaster, it includes rhythms in invaginating organelles (Pyza and Meinertzhagen, 1997), axonal diameter, synapse numbers, and dendritic shape in visual interneurons (Meinertzhagen and Pyza, 1996; Weber et al., 2009), axonal branching in "clock" neurons (Fernández et al., 2008), and size of synaptic boutons in motor neurons (Mehnert et al., 2007). This last rhythm persists in flies that are experimentally paralyzed by transgenic expression of a dominant-negative form of dynamin or by decapitation, indicating that it operates independently of synaptic activity (Mehnert and Cantera, 2008). It is necessary to clarify whether this rhythm involves a reorganization of synapses.

Synaptic vesicles (SVs) are fundamental for synaptic function. Hence, monitoring rhythmic changes in their size, number, or distribution appears as a good approach to investigate the possibility of circadian synapse reorganization. The number of SVs has generally relevance for how much neurotransmitter is

© 2009 WILEY-LISS, INC.

available for secretion when an action potential arrives at the active site. A positive relationship between SV number and transmitter release has been demonstrated experimentally for the Drosophila flight motor terminals studied here (Koenig and Ikeda, 1989). SV size has relevance for the amount of neurotransmitter released by a single vesicle and thus quantal size. A direct relation between SV size and quantal size is documented in several motor neurons of wild-type and mutant Drosophila (Karunanithi et al., 2002; Zhang et al., 1998). Distribution of SVs is also an important parameter to consider, because SVs are segregated into functionally distinct subpopulations or "pools" (Rizzoli and Betz, 2005). Because the terminology regarding these pools is not completely defined (Rizzoli and Betz, 2005), we choose here a simple ad hoc definition that corresponds well with

Contract grant sponsor: PDT; Contract grant number: 058-54; Contract grant sponsor: Swedish Research Council.

<sup>\*</sup>Correspondence to: Rafael Cantera, IIBCE, Departamento Biología del Neurodesarrollo, Av. Italia 3318, 11600, Montevideo, Uruguay. E-mail: rafael.cantera@zoologi.su.se

Received 24 March 2009; Accepted 21 April 2009

DOI 10.1002/syn.20699

Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

what is generally accepted and is sufficient to address the question of a possible rhythm in SVs.

### MATERIALS AND METHODS Flies and raising conditions

Wild-type flies Oregon R were raised on standard *Drosophila* medium at 25°C under 12-h light–dark (LD) condition, with ZT0 (lights-on) at 09:00. Four to 5-day-old females flies were used in all experiments because of their strong rhythmicity in bouton size (Mehnert et al., 2007) and in order to avoid additional differences due to genre. For the study of samples at free-running conditions, flies were trained at least three days in LD and then switched to constant darkness (DD).

### Time points and sampling method

The neuromuscular junction of the MN5 forms thousands of boutons and we found a great variation in the number of synapses, vesicles, and other organelles among individual boutons. This means that serial reconstruction of a few boutons, as it is often done, will not represent an adequate sampling strategy. We designed a sampling method to obtain representative samples, based on the analysis of single sections in a similar way as done by Koenig and Ikeda (1989, 1999). Three flies were analyzed for each of eight consecutive time-points along two consecutive LD (24 flies) or DD (24 flies) cycles. The dissections of DD samples started in the first subjective day. We restricted our analysis to the first 2 days in DD, but flies are reported to keep a rhythmic pattern of locomotion activity for several weeks under these conditions (Saunders, 2002). The tissue was oriented to obtain a cross section containing the two target muscles of the MN5 on each side of the thorax (left and right, each side innervated by an individual MN5 neuron), and sections were obtained from two different positions along the longitudinal axis of the thorax, at a distance large enough to avoid that both sites contained the same boutons. For each of the 48 flies, all boutons detected in a single section of the first site were analyzed, taking one digital image per bouton. When fewer than 20 boutons/images at the first site were obtained, sections from the second site were also analyzed; choosing always the fly that had the lowest score in the first site. This was continued until a minimum of 80 boutons per ZT were taken. Images were acquired at  $40,000\times$ ,  $100,000\times$ , or  $150,000 \times$  magnification.

### Transmission electron microscopy

Flies were anesthetized with nitric oxide (Sleeper TAS, INJECT + MATIC, Switzerland) and decapitated with a sharp needle. The thorax was dissected

with forceps and sharp needles in a droplet of 0.1 M phosphate-buffer saline (PBS), pH 7.3. The dorsal one-third of the thorax was immersed for 3-6 h in a freshly prepared ice-cooled fixative solution containing 2.5% glutaraldehyde and 4% paraformaldehyde, in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.3. Samples were then rinsed  $4 \times 15$  min in cacodylate buffer, postfixed for 1 h in an aqueous 2% solution of osmium tetroxide, rinsed in water, dehydrated in a gradual series of ethanol and acetone, and embedded in Durcupan (Durcupan ACM embedding kit of Fluka) according to the manufacturer's instructions. Finally, they were placed in molds with pure resin for polymerization at  $60^{\circ}C$  for 48 h. Semithin sections (around 1  $\mu$ ) were cut along the transverse plane of the thorax with glass knife, mounted on microscope slides, stained with 1% boracic toluidine blue, and used to localize appropriate sites for ultrastructural analysis. Ultrathin sections (50-60 nm) were cut with a diamond knife on a RMC MT-X ultramicrotome, collected with slot grids and dried on 0.4% Formvar support film, contrasted with uranyl acetate and lead citrate, and observed with a JEOL JEM 1010 operated at 80 kV.

# Quantification of vesicle number, size, and distribution

Images were taken with a digital camera Hamamatsu C4742-95. Measurements and image processing were done with Image-Pro Plus 5.1 software. From the total of images taken, only boutons with synapses with a presynaptic density ("T-bar") were selected for the analysis (n = 139 boutons). We followed the criterion that 200 vesicle profiles are sufficient for an adequate estimate of distribution and mean size proposed by Fox (1988) and adopted by other colleagues for a quantification of other glutamatergic motor synapses in Drosophila (Karunanithi et al., 2002). The outer diameter was measured with the Image-Pro Plus 5.1 software, although in a simplified version, because the aim of our study was to detect differences between time points, rather than absolute values. Number and distribution of vesicles were monitored by counting all clear vesicles within rectangular areas marked digitally at increasing distance from the synapse. The first rectangular zone was 0–100 nm from the inner leaflet of the presynaptic membrane and the second spanned from 100 nm and beyond. In both cases, the rectangle spanned 50 nm to each side of the T-bar. In our images of MN5 boutons, the 0-100 nm area enclosed all vesicles in contact with the presynaptic membrane and vesicles attached to the presynaptic density characteristic of active sites in insects (T-bar) (Koenig and Ikeda, 1999; Trujillo-Cenoz, 1969). The other area contained vesicles too distant from the synapse to be considered as part of the active zone. From now on, vesicles within the first area are referred to as "active zone vesicles" (AZVs), and the others as "reserve pool vesicles" (RPVs). A small proportion of boutons were too large to be included in a single image frame at high magnification, meaning that an unknown proportion of vesicles distant from the synapse could not be counted. Profiles without a clear core or with an irregular (noncircular) shape were not measured, to avoid tangential sections, or profiles that could belong to organelles others than SVs. Dense-cored vesicles were not included. When data from 2 consecutive days were compared at each light condition, clearly consistent results were found. Therefore, for the following analysis, the data from both cycles were pooled, as it is often done when values of consecutive days are measured in the study of other biological rhythms.

### **Statistical analysis**

One-way ANOVA parametric test was performed if normality and homoscedasticity were accomplished. Normality was checked using Shapiro–Wilk W test, and the homoscedasticity was checked using Levene's test. If not, Kluskall–Wallis and Mann–Whitney Unonparametric tests were performed instead. All analyses were done using Statistica 7.0 software (Statsoft).

### RESULTS

Digital images made at high magnification allowed us to unambiguously identify active zones and to count and measure SVs (Fig. 1). The results from both days at either LD or DD were very similar, so that the data were pooled to be presented as a single cycle for LD or DD.

In LD conditions, AZVs were significantly smaller than RPVs at ZT1 and ZT13 (Fig. 2A, ZT1, Mann-Whitney U test, n = 206 vesicles, P = 0.012 and ZT13, ANOVA, n = 237,  $F_{1235} = 4.946$ , P = 0.040). In contrast, in the middle of the day (ZT7) or night (ZT19), both types of vesicles had similar size. In addition, the size of AZVs appeared to cycle, with smaller sizes observed at ZT1 and ZT13 [Fig. 2A, Kluskal–Wallis test, H(3, n = 346) = 11.968, P =0.007]. We found a slightly different correlation in our DD samples. Here, AZVs were smaller than RPVs also during the middle of the subjective day (CT7, ANOVA, n = 243,  $F_{1221} = 7.801$ , P = 0.005) and subjective night (CT19, Mann–Whitney U test, n = 152, P = 0.013) and changes in AZV size along the day were not detected (Fig. 2B).

The distribution analysis of total SV showed that the subpopulation of AZVs was significantly smaller than that of RPVs during most of the day both in LD and DD (ANOVA in all cases. ZT7 LD, n = 20 vesicle samples (from 10 boutons),  $F_{1,18} = 5.713$ , P = 0.030; ZT13 LD, n = 38,  $F_{1,36} = 13.872$ , P = 0.00067; ZT19



Fig. 1. Representative example of the electron micrographs used to count and measure synaptic vesicles in motor terminals of *Drosophila* flight muscle. This synaptic bouton is deeply embedded in muscle (Mu) and shows an active site (arrow) with it characteristic presynaptic density, synaptic vesicles and a mitochondrion (Mi). Scale bar: 100 nm.

LD, n = 52,  $F_{1,50} = 21.705$ , P = 0.00002; CT1 DD, n = 28,  $F_{1,26} = 50.739$ , P = 0.00000; ZT13 DD, n = 52,  $F_{1,50} = 28.697$ , P = 0.00000; CT19 DD, n = 22,  $F_{1,20} = 14.464$ , P = 0.00111). However, once a day at LD (ZT1), the subpopulation of AZVs increased and equaled that of RPVs (Fig. 2C). The same was observed in DD, although with a delay of 6 h (Fig. 2D).

Vesicle numbers appeared to fluctuate rhythmically along both LD and DD conditions but without statistical significance (AZVs LD: Kluskal–Wallis test, H(3, n = 19) = 0.954, P = 0.813; RPVs LD: ANOVA, n =19 flies,  $F_{1,15} = 0.477$ , P = 0.703; AZVs DD: ANOVA, n = 21,  $F_{1,17} = 0.615$ , P = 0.614; RPVs DD: ANOVA, n = 21,  $F_{1,17} = 0.641$ , P = 0.598; Figs. 2E and 2F). More RPVs than AZVs were found in all samples, but this difference was statistically significant only at a few time points, different in LD and DD (Mann–Whitney U test: ZT19 in LD, n = 12, P = 0.0104, Fig. 2E; CT1 and C13 in DD, n = 10, P = 0.0088 and P =0.0249, respectively, Fig. 2F).

A summary of the statistical analysis for the comparison of different parameters at either LD or DD, as well a between LD and DD samples, is shown in Table I.

#### DISCUSSION

The data reported here indicate that *Drosophila* motor synapses are reorganized in a rhythmic way

RHYTHMIC CHANGES IN SVS

17



Fig. 2. Size, distribution, and number of vesicles on flight neuromuscular synapses. The graphs in (**A–D**) show means  $\pm$  s.e.m and in (**E–F**) means of means  $\pm$  s.e.m. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, and \*\*\*P < 0.001. **A:** In LD, active zone vesicles (AZVs, light bars) showed a rhythmic change in size, with smaller average size at times of intense locomotion (ZT1 and ZT13) (see Materials and Methods for details). They were also significantly smaller than RPVs (dark bars) at these time points. ZT1 LD:  $n_{AZVs} = 96$ , 39.40 nm  $\pm$  0.97,  $n_{RPVs} = 110$ , 43.91 nm  $\pm$  0.90; ZT7 LD:  $n_{AZVs} = 43$ , 41.51 nm  $\pm$  1.03,  $n_{RPVs} = 90$ , 41.25 nm  $\pm$  0.81; ZT13 LD:  $n_{AZVs} = 90$ , 38.34 nm  $\pm$  1.32,  $n_{RPVs} = 147$ , 41.28 nm  $\pm$  0.91; ZT19 LD:  $n_{AZVs} = 117$ , 41.87 nm  $\pm$  0.93,  $n_{RPVs} = 281$ , 43.62 nm  $\pm$  0.60. **B:** In DD, we detected no changes in AZVs average size, but AZVs continued to be smaller than RPVs. CT1 DD:  $n_{AZVs} = 47$ , 42.17 nm  $\pm$  1.40,  $n_{RPVs} = 128$ , 45.47 nm  $\pm$  0.85; CT7 DD:  $n_{AZVs} = 92$ , 40.85 nm  $\pm$  0.02,  $n_{RPVs} = 151$ , 43.18 nm  $\pm$  0.04; CT13 DD:  $n_{AZVs} = 119$ , 41.02 nm  $\pm$  0.62,  $n_{RPVs} = 229$ , 43.35 nm  $\pm$  0.44; CT19 DD:  $n_{AZVs} = 44$ , 40.24 nm  $\pm$  1.23,  $n_{RPVs} = 108$ , 43.90 nm  $\pm$  0.78. **C**—**D**: The distribution of vesicles appeared to change once a day both in LD and DD (number of AZVs or RPVs/total of SVs). C: ZT1 LD:  $n_{boutons} = 15$ , AZVs 0.48  $\pm$  0.07, RPVs 0.52  $\pm$  0.07; ZT7 LD:  $n_{boutons} = 10$ , AZVs 0.49  $\pm$  0.04, RPVs 0.63  $\pm$  0.04. D: CT1 DD:  $n_{boutons} = 14$ , AZVs 0.29  $\pm$  0.04, RPVs 0.63  $\pm$  0.04; CT19 DD:  $n_{boutons} = 26$ , AZVs 0.35  $\pm$  0.04, RPVs 0.65  $\pm$  0.04; CT19 DD:  $n_{boutons} = 26$ , AZVs 0.35  $\pm$  0.04, RPVs 0.65  $\pm$  0.04; CT19 DD:  $n_{boutons} = 26$ , AZVs 0.35  $\pm$  0.04, RPVs 0.65  $\pm$  0.04; CT19 DD:  $n_{boutons} = 26$ , AZVs 0.35  $\pm$  0.04, RPVs 0.65  $\pm$  0.04; CT19 DD:  $n_{boutons} = 26$ , AZVs 0.35  $\pm$  0.04, RPVs 0.65  $\pm$  0.04; CT19 DD:  $n_{boutons} = 11$ , AZVs 0.49  $\pm$  0.07, RPVs 0.51  $\pm$  0.07; CT13 DD:  $n_{boutons} = 26$ , AZVs 0.35  $\pm$  0.0

both in LD and in DD. Significant daily changes were detected in SV size and distribution, although not in total numbers.

In general, AZVs were of smaller size than RPVs. We found two bimodal cycles of vesicle size during LD conditions. First, AZVs were significantly smaller than RPVs at ZT1 and ZT13, corresponding to the morning and evening peaks of locomotion (Saunders, 2002). Second, the size of AZVs changed along the day, with smaller size at ZT1 and ZT13, reinforcing

Type of comparison			מת	I D yorgug DD
Type of comparison		LD	DD	LD versus DD
Vesicle size	Between ZT/CT	AZVs: ZT1 versus ZT7, M-W <sup>a</sup> , $P = 0.048$ ZT7 versus ZT13, M-W, $P = 0.016$	AZVs: nd <sup>b</sup>	AZVs: ZT13 versus CT13, M-W, $P = 0.033$
		ZT13 versus ZT19, M-W, $P = 0.004$	RPVs: nd	
	AZVs versus RPVs	RPVs: nd ZT1: M-W, $P = 0.012$ ZT13: ANOVA, $P = 0.04$	CT7: ANOVA, P = 0.005 CT13: M-W, P = 0.02 CT19: M-W, P = 0.013	RPVs: nd
Vesicle proportion	Between ZT/CT AZVs versus RPVs	AZVs: nd RPVs: nd ZT7: ANOVA, P = 0.03 ZT13: ANOVA, P = 0.00067 ZT19: ANOVA, P = 0.00002	AZVs: nd RPVs: nd CT1: ANOVA, P = 0 CT13: ANOVA, P = 0 CT19: ANOVA, P = 0.001	AZVs: nd RPVs: nd
Vesicle number	Between ZT/CT AZVs versus RPVs	AZVs: nd RPVs: nd ZT19: M-W, P = 0.0104	AZVs: nd RPVs: nd CT1: M-W, P = 0.0088 CT13: M-W, P = 0.0249	AZVs: nd RPVs: nd

TABLE 1. Summary of the statistical analysis of the main comparisons

<sup>a</sup>M-W, Mann–Whitney U test.

<sup>b</sup>nd, no differences.

the correlation between smaller vesicle size at times of more locomotion activity. To our knowledge, this is the first report of changes in vesicle size during the day as well as different vesicle size between different pools. The two bimodal cycles agree with the current view that SVs have smaller size during periods of intense synaptic activity (Atwood and Karunanithi, 2002). AZVs were also smaller than RPVs in DD, although without clear evidence of cycling, suggesting that light is necessary for the mechanism that drives a rhythmic change in vesicle size at the active zone. We noticed that the largest average size of the RPVs was always measured early in the morning (ZT1 or CT1) in LD and DD, respectively, suggesting a circadian control of the recycling pathway that operates through intermediate profiles at a distance from the active zone (Koenig and Ikeda, 1996).

When the distribution of vesicles was analyzed a remarkable relationship was observed. During most of the LD or DD cycles, the majority of SVs were found in the reserve pool, as previously reported for this neuron (Koenig and Ikeda, 1989) and several other models (Rizzoli and Betz, 2005). However, once a day this relationship changed toward equal proportions. This cycle persisted in DD, although with different phase. There is little information on the mechanisms that control SV distribution, but it is known that in *Drosophila* the proportion of docked vesicles increases in *dnc* mutants and decreases in *rut* mutants, which are expected to have higher or lower levels of cAMP, respectively (Renger et al., 2000). The most prominent result from this study is that ultrastructural parameters of functional relevance for synaptic function fluctuate rhythmically along the day, suggesting a cycle of synapse reorganization. However interesting this possibility appears to us, we must await for a more detailed analysis of the ultrastructure and electrophysiology of this neuron at relevant times of the day to elaborate a more clear interpretation. Considering the importance of understanding the molecular and cellular mechanisms that regulate the formation of new synapses and the degradation of old ones in a programmed way, the occurrence of these processes on a daily basis in *Drosophila*, seems to open a very promissory research field.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. W. Norbis for advice with statistics.

#### REFERENCES

- Atwood HL, Karunanithi S. 2002. Diversification of synaptic strength: presynaptic elements. Nat Rev Neurosci 3:497–516. Fernández MP, Berni J, Ceriani MF. 2008. Circadian remodeling of
- neuronal circuits involved in rhythmic behavior. PloS Biol 6:e69. Fox GQ. 1988. A morphometric analysis of synaptic vesicle disrtibu-
- tions. Brain Res 475:103–117. Karunanithi S, Marin L, Wong K, Atwood HL. 2002. Quantal size
- and variation determined by vesicle size in normal and mutant Drosophila glutamatergic synapses. J Neurosci 22:10267–10276.
- Koenig JH, Ikeda K. 1989. The relationship between the number of synaptic vesicles and the amount of transmitter released. J Neurosci 9:1937-1942.
- Koenig JH, Ikeda K. 1996. Synaptic vesicles have two distinct recycling pathways. J Cell Biol 135:797–808.

- Koenig JH, Ikeda K. 1999. Contribution of active zone subpopulation of vesicles to evoked and spontaneous release. J Neurophysiol 81:1495–1505.
- Mehnert KI, Cantera R. 2008. A peripheral pacemaker drives the circadian rhythm of synaptic boutons in *Drosophila* independently of synaptic activity. Cell Tissue Res 334:103–109.
- Mehnert KI, Beramendi A, Elghazali F, Negro P, Kyriacou CP, Cantera R. 2007. Circadian changes in *Drosophila* motor terminals. Dev Neurobiol 67:415–421.
- Meinertzhagen IA, Pyza E. 1996. Daily rhythms in cells of the fly's optic lobe: Taking time out from the circadian clock. Trends Neurosci 19:285–291.
- Pyza E, Meinertzhagen IA. 1997. Circadian rhythms in screening pigment and invaginating organelles in photoreceptor terminals of the housefly's first optic neuropile. J Neurobiol 32:517–529.
- Renger JJ, Ueda A, Atwood HL, Govind CK, Wu CF. 2000. Role of cAMP cascade in synaptic stability and plasticity: Ultrastructural and physiological analyses of individual synaptic boutons in *Drosophila* memory mutants. J Neurosci 20:3980–3992.
- Rizzoli SO, Betz WJ. 2005. Synaptic vesicle pools. Nature Rev Neurosci 6:57-69.
- Saunders D. 2002. Insect clocks, 3rd ed. Elsevier.
- Trujillo-Cenoz O. 1969. Some aspects of the structural organization of the medula in muscoid flies. J Ultrastruct Res 27:533-553.
- Weber P, Kula-Eversole E, Pyza E. 2009. Circadian control of dendrite morphology in the visual system of *Drosophila* melanogaster. PloS ONE 4:e4290.
- Zhang B, Ho Koh Y, Beckstead RB, Budnik V, Ganetzky B, Bellen HJ. 1998. Synaptic vesicle size and number are regulated by a clathrin adaptor protein required for endocytosis. Neuron 21:1465–1475.

Clock genes *timeless* and *period* are inhibitors of synaptogenesis in *Drosophila* motor terminals acting at different levels.

# SANTIAGO RUIZ<sup>a</sup>, MARIA JOSE FERREIRO<sup>a</sup>, SOLEDAD ASTRADA<sup>a, b</sup> AND RAFAEL CANTERA<sup>a, c</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Biología del Neurodesarrollo, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente

Estable, 11600, Montevideo, Uruguay

<sup>b</sup> Institut Pasteur de Montevideo, 11400, Montevideo, Uruguay.

<sup>c</sup> Zoology Department, Stockholm University, 106 91, Stockholm, Sweden

SANTIAGO RUIZ<sup>a</sup>, tiagosruiz@gmail.com MARIA JOSE FERREIRO<sup>a</sup>, mariajofe77@gmail.com SOLEDAD ASTRADA<sup>a, c</sup>, sastrada@pasteur.edu.uy RAFAEL CANTERA<sup>a, d</sup>, rcantera@zoologi.su.se

Corresponding author: Rafael Cantera, IIBCE, Departamento de Biología del Neurodesarrollo, Av. Italia 3318, 11600, Montevideo, Uruguay. E-mail: <u>rcantera@zoologi.su.se</u>. Phone: +598-2 4871616. Fax: +598-2-4875548.

# ABSTRACT

Daily changes in synapse number, axonal diameter and branching complexity are examples of a type of neuronal plasticity termed circadian structural plasticity, One of the best studied neurons of the fly Drosophila melanogaster, the flight motor neuron MN5, has larger synaptic boutons during the day, when the fly is active, compared to the night, when the fly is resting, but more boutons and synapses at midnight, relative to midday. Here we investigate the contribution of the clock genes timeless (tim) and period (per) to circadian changes in the number of boutons and synapses in this neuron. Loss-of-function mutations of these genes resulted in a disturbance of the normal rhythmicity in numbers of boutons and synapses and caused over-proliferation of boutons and synapses, indicating that *tim* and *per* normally function as inhibitors of synaptogenesis. Several observations indicated that Per and Tim act at different levels. The rhythmic change in bouton numbers is accentuated in *per* mutants but is abolished in *tim* mutants. Per protein is predominantly found in the axon and Tim in the glial wrap around the axon. Knockdown of tim specifically in glial cells was sufficient to induce part of the phenotype of tim mutants, and expression of wild-type tim in the glia of *tim* mutants was sufficient to eliminate the mutant phenotype. We conclude that in wild type flies timeless expression in the glia contribute to the circadian changes in bouton and synapse numbers in this neuromuscular junction by controlling the formation of boutons and synapses.

## **INTRODUCTION**

Rhythmic daily changes in the morphology of neurons, defined as "structural circadian plasticity", are part of a special type of neuronal plasticity observed in neurons of the fly and several species of vertebrates (Pyza and Górska-Andrzejak, 2008; Mehnert and Cantera, 2011; Muraro et al., 2013). This novel type of neuronal plasticity is repeated every twenty-four hours in light-

darkness (LD) and constant darkness conditions (DD). It is controlled by the biological clock and influenced by external and internal factors such as light, glia, neurotransmitters and several proteins, including those encoded by clock genes *timeless* and *period* (reviewed in Pyza and Górska-Andrzejak, 2008; Mehnert and Cantera, 2011; Muraro et al., 2013).

In a remarkable example of this type of neuronal plasticity, the flight motor neuron 5 (MN5) of the fly Drosophila melanogaster, which innervates the longitudinal (indirect) flight muscles IFM5 and IFM6, shows a daily reduction in the size of synaptic boutons during the phase of rest/sleep (Mehnert et al., 2007). Synaptic boutons are dynamic structures that can appear, grow, divide and disappear in few hours, as it happens in motor neurons of Drosophila larvae (Zito et al., 1999; Eaton et al., 2002). In the adult MN5, the boutons increase in size during the day and decrease during the night, both in LD and DD cycles (Mehnert et al., 2007). Measurement of bouton size in wild-type flies, every three hours during a complete LD cycle, showed that the rhythmic increment in bouton size has a single peak in the morning, at a time of increased locomotor activity (Mehnert and Cantera, 2008). However, bouton size starts to decline at the beginning of the dark phase (Mehnert and Cantera, 2008), when the fly has a second daily "bout" of locomotion activity (Wheeler et al., 1993; Helfrich-Forster, 2000). Bouton size increases in the morning also in flies whose synaptic activity has been experimentally eliminated during the previous night using the shibire mutation and in flies that do not move as a consequence of being decapitated (Mehnert and Cantera, 2008). The results of these experiments indicate that the rhythmic change in bouton size in the MN5 is not activity-dependent. As the main biological clock resides in the brain (Helfrich-Förster 2005), rhythmic change of bouton size in decapitated flies (without the main clock) also indicates that this rhythm can be driven from peripheral pacemakers. Several studies revealed the function of peripheral pacemakers in different tissues outside the head (Giebultawicz, 2001), even functioning in tissues of decapitated flies (Hege et al., 1997) and glial cells in the thoracic nervous system have been suggested to control the circadian cycle in MN5 bouton size (Mehnert and Cantera, 2011). Glial cells displays their own circadian rhythm of structural plasticity in Drosophila

(Pyza and Gorska-Andrzejak, 2004), can regulate locomotor activity downstream of the main clock (Suh and Jackson, 2007) and houses a calcium-dependent signaling to neurons that regulates circadian locomotor rhythms (Ng and Jackson, 2011).

The MN5 has also a rhythmic circadian change in bouton and synapse numbers, suggesting a global program of bouton formation/elimination and synapse assembly/disassembly along the day (Ruiz et al., 2013), which could be controlled by the circadian clock or other mechanism. Synapses, referred here as active sites (discussed by Collins and DiAntonio, 2007) are formed in *Drosophila* within minutes in photoreceptors and visual interneurons (Rybak and Meinertzhagen, 1997) and formed and dismantled in few hours in the neuromuscular junction (Rasse et al., 2005; Ataman et al., 2008; Fouquet et al., 2009). A synaptic bouton can have one or several synapses but it can also lack synapses (referred as "empty boutons" in Ruiz et al., 2013). In the MN5, half of the synaptic boutons are "empty boutons" at midnight but this proportion is reduced at midday (Ruiz et al., 2013).

In the present work, we use confocal microscopy to estimate bouton and synapse numbers at different time points of the day in the MN5 in flies carrying null mutations in the "clock" genes *timeless (tim)* or *period (per)*, and in a double mutant *tim/per*, to determine the consequences of the absence of a functional clock on the circadian change in numbers of boutons and synapses. Towards the identification of the peripheral pacemaker from where the circadian plasticity of the MN5 is controlled, the possibility that *tim* and *per* are expressed in the MN5 neuromuscular junction was investigated with immunocytochemistry; RNA interference was used to knock down *tim* expression in the glia or the neuron, and a *tim* transgene was expressed in the glia of *tim* null mutants.

## MATERIALS AND METHODS

4

The fly strains used in the experiments were Oregon R as wild type, the clock null mutants  $tim^{01}$ ,  $tim^{03}$ ,  $tim^{04}$ ,  $per^{01}$ , the double mutant  $per^{01}$ ;  $tim^{01}$  (Stempfl et al., 2002) and several transgenic flies (see below). For immunohistochemistry, the transgenic strain repo-gal4, containing a specific driver for glia (Xiong et al., 1994; Halter et al., 1995), was crossed with the transgenic strain uascd8-gfp (Lee and Luo, 1999), allowing the specific glial expression of the green fluorescent protein (GFP) that is anchored to the membrane through the CD8 protein. For timeless RNA interference (tim-RNAi; Martinek and Young, 2000; Dietzl et al., 2007) experiments in the MN5 or glia, and tim rescue experiments in the glia of *tim<sup>01</sup>* mutants, the following transgenic fly strains were used: ok371-gal4 (a specific driver for glutamatergic motor neurons, Mahr and Aberle, 2006) was crossed and balanced to obtained the stock uas-dicer2/FM7;ok371-gal4/CyO;TM3,Ser/+, that was then crossed with uas-tim-RNAi/CyO;uas-tim-RNAi/TM6b for silencing tim expression in the MN5; repo-gal4 was crossed and balanced to obtained the stock uas-dicer2/FM7;CyO/+;repogal4/TM3,Ser, that was then crossed with uas-tim-RNAi/CyO;uas-tim-RNAi/TM6b for silencing tim expression in the glia; and finally,  $tim^{01}/CvO$ ; repo-gal4/TM6b was crossed with  $tim^{01}/CvO$ ; uas*tim/TM6b* to recover the expression of *tim* specifically in the glia of *tim*<sup>01</sup> mutant flies. In all cases, parental controls were generated crossing the parental strains with Oregon R to eliminate the balancer chromosomes from the genome.

# **Raising conditions**

All fly strains were raised on standard *Drosophila* medium at 25°C and kept at LD cycles of 12:12 hours for at least three days before DD experiments. In DD experiments, the light was switched off at ZT0 the first day of the experiment setting the circadian time 0, CT0. All experiments were done with 4-5-days old female flies because wild type flies of this age exhibit strong rhythmicity in bouton size (Mehnert et al., 2007; Mehnert and Cantera, 2008). Two time points were studied under DD conditions: circadian time 19 (CT19) corresponding to subjective

midnight (in the middle of the phase of sleep) and circadian time 7 (CT7) corresponding to subjective midday. The flies were anesthetized with nitric oxide (Sleeper TAS, INJECT+MATIC, Switzerland), decapitated with sharp needles and thereafter the dorsal portion of the thorax was dissected and fixed as described below (see Supplementary Table 1 for details in the number of samples).

## Immunohistochemistry and laser confocal microscopy (LCM)

A double staining was performed to count total boutons, boutons with and without synapses and the number of synapses per bouton. The MN5 neuronal membrane was outlined by immunostaining with a rabbit polyclonal anti-Horseradish Peroxidase serum (HRP; Jackson ImmunoResearch), which stains insect neuronal membranes (Jan and Jan, 1982) and specifically recognizes the glycoprotein 3-alpha-L-fucosyltransferase (Sun and Salvaterra, 1995). Simultaneously, T-bars [a presynaptic component of insect synapses, (Trujillo-Cenóz, 1969; Prokop and Meinertzhagen, 2006)] were marked with mouse monoclonal antibody (nc82; Hofbauer, 1991; DSHB) that specifically recognizes the protein Bruchpilot [BRP, an ELK/CAST homologue (Wagh et al., 2006; Kittel et al., 2006)]. This monoclonal antibody binds exclusively to the presynaptic site of synapses when used for immunogold staining for electron microscopy (Fouquet et al., 2009; Hamanaka and Meinertzhagen, 2010) and is widely used to count Drosophila neuromuscular synapses because it gives well-defined, strongly fluorescent "spots" in a practically negative background, making very easy to quantify synapses (Ataman et al., 2008; Fouquet et al, 2009; Sun et al., 2011; Ruiz et al., 2013). The thorax was open along the mid-sagittal plane in a droplet of phosphate-buffered saline (PBS, 0.1M at pH 7.4). Only one hemithorax per fly was processed further to improve antibodies penetration. The samples were fixed for 2.5 hours in ice-cold PBS containing 4% paraformaldehyde, tissues were then permeabilized in 0.3% Triton X100 in PBS (PBST) and unspecific binding sites were blocked with 1% Normal Goat Serum in PBST with 0.5%

bovine serum albumin. The samples were then incubated with anti-HRP (diluted 1:600) and anti-BRP (diluted 1:100) antibodies over-night at room temperature (RT). The next day, the samples were washed 4x15 minutes in PBST and then incubated with goat anti-rabbit secondary antibody conjugated to Alexa 488 (Molecular Probes, diluted 1:1000 in PBST) and goat anti-mouse secondary antibody conjugated to Cy3 (Jackson ImmunoReseach, Inc., diluted 1:1000 in PBST) for 2 hours at RT. After that the samples were rinsed 4x15 minutes in PBST and 2x10 minutes in PBS. Finally, IFM5 and IFM6 flight muscles were mounted in 80% glycerol. A double staining with rabbit and rat polyclonal anti-Timeless (provided by Amita Sehgal; UP991, diluted 1:1000 and UPR41 diluted 1:100) and rabbit polyclonal anti-Period (provided by Ralf Stanewsky; diluted 1:700) was used to detect Timeless and Period proteins in the neuromuscular junction of the MN5 and to evaluate the expression of wild type timeless in the rescue experiment. The samples were examined with a laser confocal microscope Olympus FV300. Each image generated for bouton and synapse quantification was a Z projection of a series of optical sections scanned at intervals of 0.3  $\mu$ m with a 60x lens and a digital zoom of 3.5. Two such images were done for each fly. The quality of the colors was optimized with ImageJ software and the number of boutons and synapses was counted in each image working in "blind".

## Quantification of boutons and synapses

Laser confocal microscopy was used to count boutons and synapses at each CT according to the method previously described in Ruiz et al. (2013). The proportion of boutons per time point was calculated as the number of boutons found in each time point divided by the number of boutons found in the whole experiment. The same calculation was done for the proportion of boutons with synapses and the proportion of boutons without them. Finally, the proportion of boutons with and without synapses per time point (relative to the total number of boutons found in each time point) and the distribution of synapses among boutons were analyzed using LCM. Boutons with synapses were classified into three classes: boutons with one, two, or more synapses, and the percentage of each subpopulation were calculated. Thereafter all parameters were graphically represented as the mean  $\pm$  sem.

# Statistical analysis

Student *t*-tests were performed when assumptions for parametric test were accomplished (normality using Shapiro-Wilk W test and homoscedasticity using Levene's test). If these assumptions were not achieved, nonparametric Kruskal -Wallis and Mann-Whitney U tests were performed instead. Statistical significance was set at 0.05, 0.01 and 0.001. Analyses were done using Statistica 7.0 software (Statsoft).

## RESULTS

We started our study with a careful analysis of the neuroanatomy of the synaptic motor terminals of the MN5 in *timeless* and *period* mutant flies. A previous study reported that the MN5 terminals show over-branching and abnormal axonal morphology in *tim* mutants and reduced branching in *per* mutants (Mehnert et al., 2007) and a similar phenotype was reported for clock neurons in the same mutants (Fernandez et al., 2008). Here we found sporadic cases of "sprouting" in the motor terminals of *tim* mutant flies although not as frequent as reported previously (Mehnert et al., 2007). The most consistent and clear axonal phenotypes observed here were larger boutons in *tim* mutants and thinner branches with smaller boutons in *per* mutants (Supplementary Fig. 1).

# The rhythmic change in the number of boutons is incremented in per mutants but abolished in timeless mutant flies

In wild type flies the neuromuscular junction made by the MN5 has more boutons at midnight relative to midday in LD and DD conditions (Ruiz et al., 2013). This feature was confirmed in our DD samples from wild type flies (Fig. 1A). This daily difference is even larger in *per* mutants but absent in the three *tim* mutants tested here ( $tim^{01}$ ,  $tim^{03}$ ,  $tim^{04}$ ; Fig. 1A). Conversely, flies double mutant for *per* and *tim* (*per*<sup>01</sup>; *tim*<sup>01</sup>) have more boutons at subjective midday than midnight (Fig. 1A).

After finding that the circadian rhythm in bouton numbers is abolished by mutations in *timeless*, we compared the proportion of boutons with synapses (Fig. 1B) and without synapses (Fig. 1C) between samples taken at subjective midnight and midday. We found no significant differences between wild type and *tim* mutant flies in the proportion of boutons with synapses (Fig. 1B). In *per* mutant flies, on the other hand, the proportion of boutons with synapses was higher at subjective midnight than subjective midday and in the double mutants this relationship was inverted (Fig. 1B). Similarly, we also found a change in the proportion of boutons without synapses between subjective midnight and subjective midday in *per* mutants and in the double mutants, although with an inverted relationship (Fig. 1C). The proportion of boutons without synapses was higher at subjective midnight than subjective midday in wild type flies and this difference was even larger in *per* mutant flies (Fig. 1C). This change was abolished by the three mutations in *tim* (Fig. 1C).

In summary, the rhythm observed in the number of boutons and boutons without synapses in wild type flies is present in *per* mutants, abolished in *tim* mutants and inverted in the double mutants.

# Timeless and period are inhibitors of the number of boutons and synapses

After demonstrating the influence of clock gene mutations in the proportion of boutons with or without synapses along the day in DD conditions, we compared the total number of these types of boutons at subjective midday and midnight. We found that the mutations in *tim* and *per* cause all an increase in the number of total boutons (Fig. 1D), boutons with synapses (Fig. 1E), and boutons without synapses (Fig. 1F), both at subjective midnight and subjective midday. In all mutants we found also modest differences between subjective midnight and subjective midday.

In wild type flies kept in DD conditions, about half of the population of MN5 boutons has synapses at subjective midnight, and this proportion shows a slight increase at subjective midday (Ruiz et al., 2013 and Fig. 2). All the clock gene mutations examined here result in a large increment of the proportion of boutons with synapses relative to that of boutons without synapses. The *tim* mutations cause the largest increase, followed by the *per* mutation and the double mutant (Fig. 2).

In summary, the number of boutons and synapses increases in *timeless* and *period* mutants compared to wild type flies.

# Timeless and period control the distribution of synapses among boutons

In MN5 terminals of wild type flies kept in DD conditions, the proportion of boutons with either one, two or more synapses, has a distribution of 75:20:5 (Ruiz et al., 2013). The distribution was the same in clock mutants at subjective midnight, but shifted to approximately 65:30:5 in *tim* mutants and to 65:20:15 in *per* mutants at subjective midday (Fig. 3). In the double mutant the distribution was the same as in wild type flies at both time points (75:20:5; Fig. 3). In summary, these results showed that mutations in either *timeless* or *period* mutants increment the proportion of boutons with more than one synapse and that this shift is completely restored to the wild-type distribution in double mutants.

Timeless and period are differentially expressed in the neuromuscular junction of the MN5

To determine where *tim* and *per* are expressed in the neuromuscular junction of the MN5, we performed immunostainings using antibodies specific for each of the corresponding proteins, in transgenic flies expressing GFP in the glia and raised in DD conditions. Timeless was predominantly localized in the glia that surrounds the axon and Period was predominantly located in the axon and its terminals (Fig. 4). As a control of these immunostainings we confirmed the specific staining of clock neurons in the larval brain (not shown) in wild type flies, and the absence of stained neurons in the larval brain of the corresponding mutants (not shown).

## Timeless expression in the glia controls the number of boutons and synapses of the MN5

Knowing that *tim* is predominantly expressed in the glia that wraps the MN5 axon, we performed two types of experiments to investigate whether the expression of *tim* in glial cells is necessary to control the circadian changes of the MN5's neuromuscular junction. We used the GAL4-UAS method (Brand and Perrimon, 1993) to direct the expression of transgenes for RNAi of *tim* in the glia, or to express *tim* in the glia of *tim* mutants. Knockdown of *timeless* in the glia produced an increase in the number of total boutons (Fig. 5A), boutons with synapses (Fig. 5B) and boutons without synapses (Fig. 5C) relative to the wild type, similar to what was reported above for *tim* mutants. Furthermore, the expression of a wild type copy of *tim* in the glia of *tim*<sup>01</sup> mutant flies (which leads to high levels of Tim protein in these cells, Supplementary Fig. 2) gave a recovery of the wild type phenotype with regards to the number of total boutons (Fig. 5D), boutons with synapses (Fig. 5E) and boutons without synapses (Fig. 5F). Also the relative proportions of boutons with one, two or more synapses were restored from the abnormal proportion observed before in *tim*<sup>01</sup> mutants (approximately 65:30:5 at CT7) to the wild type proportion (75:25:5, Fig. 6)

In summary, timeless expression in the glia is sufficient to control the circadian changes in the neuromuscular junction made by the MN5, controlling the number of boutons and the distribution of synapses per bouton.

## DISCUSSION

Here we present the first experimental evidence for the participation of the clock genes *timeless* and *period* in the mechanism that controls rhythmic daily changes in the numbers of boutons and synapses in an identified motor neuron. Interestingly, both genes have partially different functions in this regard. Our findings suggest that *tim* defines the rhythmic change in bouton numbers during the day through the control of the number of boutons without synapses and *per* controls the amplitude of the change. Whereas both genes appear to act as inhibitors of the formation of boutons, *tim* strongly inhibits the boutons without synapses at midday and *per* does the same at midnight. It appears that *tim* and *per* also inhibit synapse formation through a mechanism that limits the addition of synapses to "empty" boutons (boutons without synapses; Ruiz et al., 2013). These results reinforce the view that the circadian plasticity of the MN5 is controlled by a homeostatic mechanism that regulates synapse formation (Ruiz et al., 2013).

The observation that the proteins encoded by *per* and *tim* accumulate in different cellular components of the neuromuscular junction (*per* in the axon and *tim* in the glial wrap) adds an interesting turn to the consideration of the mechanisms that control this case of structural circadian plasticity. The initial hypothesis was that the rhythmicity of the MN5 is controlled by a clock-gene dependent non-autonomous mechanism probably driven by a peripheral pacemaker, and by hormones, glia and/or interneurons (Mehnert et al., 2007; Mehnert and Cantera, 2008). Whereas the influence of hormones, the target muscle, interneurons or other cells on the structural circadian plasticity of the MN5 has not been investigated yet, our results strongly supports that it is at least in part controlled by a molecular mechanism that depend on glial expression of *timeless* and the neuronal expression of *period*. In the *Drosophila* neuromuscular junction, glia to neuron signaling through secreted growth factors influences synapse formation and regulates synaptic physiology (Bialas and Stevens, 2012; Fuentes-Medel et al., 2012; Kerr et al., 2014).

Previously, we proposed that the change between night and day in the number of boutons and synapses of the MN5 could be explained by a daily cycle of synapse waste during the day, when the fly uses its flight muscles, followed by a phase of synapse assembly during the night, when the fly is at rest (Ruiz et al., 2013). Taking in consideration the new data presented here, we propose now a more detailed explanation. Towards the end of the night, when the fly starts its active phase, the MN5 has a large number of boutons and synapses, some of which were assembled during the night. During the day, as the fly flies, boutons grow in size as a result of the continued addition of membrane through the fusion of vesicles used during synaptic activity. At the same time, some boutons and synapses are damaged and dismantled ("wasted") and/or recycled along a global program of ordered disassembly, elimination and recycling. This process affects mainly the subpopulation of boutons without synapses (boutons which have yet not acquired their first synapse, or that have lost their synapses in the active phase during the day) and requires the expression of *timeless* in the glia and the expression of *period* in the neuron. Both genes also control synapse distribution among boutons, limiting the addition of synapses to "empty" boutons (boutons without synapses; Ruiz et al., 2013) and specially the addition of a second or third synapse to boutons, which already have one or two synapses.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The nc82 antibody, developed by Dr. Buchner, was obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank developed under the auspices of the NICHD and maintained by The University of Iowa, Department of Biology, Iowa City, IA 52242. We express our gratitude to Maria Fernanda Ceriani for her gift of *timeless* and *period* mutants, and Ralf Stanewsky and Amita Sehgal for their gift of antibodies specific for Per and Tim.

## REFERENCES

Pyza E, Górska-Andrzejak J (2008) External and internal inputs affecting plasticity of dendrites and axons of the fly's neurons. Acta Neurobiol Exp (Wars) 68:322-333.

Mehnert KI, Cantera R (2011) Circadian rhythms in the morphology of neurons in *Drosophila*. Cell Tissue Res 334:381-389.

Muraro NI, Pírez N, Ceriani MF. 2013. The circadian system: plasticity at many levels. Neuroscience.247:280-93.

Mehnert KI, Beramendi A, Elghazali F, Negro P, Kyriacou CP, et al. (2007) Circadian changes in *Drosophila* motor terminals. Dev Neurobiol 67:415-421.

Zito K, Parnas D, Fetter RD, Isacoff EY, Goodman CS (1999) Watching a synapse grow: Noninvasive confocal imaging of synaptic growth in *Drosophila*. Neuron 22:719-729.

Eaton BA, Fetter RD, Davis GW (2002) Dynactin is necessary for synapse stabilization. Neuron 34:729-741.

Mehnert KI, Cantera R (2008) A peripheral pacemaker drives the circadian rhythm of synaptic boutons in *Drosophila* independently of synaptic activity. Cell Tissue Res 334:103-109.

Wheeler et al., 1993

Helfrich-Förster C. 2000. Differential control of morning and evening components in the activity rhythm of Drosophila melanogaster-sex-specific differences suggest a different quality of activity. J Biol Rhythms. 15:135-54.

Chen ML, Green D, Liu L, Lam YC, Mukai L, Rao S, Ramagiri S, Krishnan KS, Engel JE, Lin JJ,

Wu CF. 2002. Unique biochemical and behavioral alterations in *Drosophila shibire(<sup>ts1</sup>)* mutants imply a conformational state affecting *dynamin* subcellular distribution and synaptic vesicle cycling. J Neurobiol. 53:319-29.

Yellman C, Tao H, He B, Hirsh J. 1997. Conserved and sexually dimorphic behavioral responses to biogenic amines in decapitated Drosophila. Proc Natl Acad Sci U S A. 94:4131-6.

Helfrich-Förster C. 2005. Neurobiology of the fruit fly's circadian clock. Genes Brain Behav. 4(2):65-76.

Giebultowicz JM. 2001. Peripheral clocks and their role in circadian timing: insights from insects. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 356:1791-9.

Hege DM, Stanewsky R, Hall JC, Giebultowicz JM. 1997. Rhythmic expression of a PER-reporter in the Malpighian tubules of decapitated *Drosophila*: evidence for a brain-independent circadian clock. J Biol Rhythms. 12:300-8.

Pyza E, Górska-Andrzejak J. 2004. Involvement of glial cells in rhythmic size changes in neurons of the housefly's visual system. J Neurobiol. 59:205-15.

Suh J, Jackson FR. 2007. *Drosophila* ebony activity is required in glia for the circadian regulation of locomotor activity. Neuron. 55:435-47.

Ng FS, Tangredi MM, Jackson FR. 2011. Glial cells physiologically modulate clock neurons and circadian behavior in a calcium-dependent manner. Curr Biol. 21:625-34

Ruiz S, Ferreiro MJ, Menhert KI, Casanova G, Olivera A, Cantera R. 2013. Rhythmic changes in synapse numbers in *Drosophila melanogaster* motor terminals. PLoS One. 8:e67161. doi: 10.1371/journal.pone.0067161.

Collins CA, DiAntonio A (2007) Synaptic development: insights from *Drosophila*. Curr Opin Neurobiol 17:1-8.

Rybak J, Meinertzhagen IA (1997) The effects of light reversals on photoreceptor synaptogenesis in the fly *Musca domestica*. Eur J Neurosci 9:319-33.

Rasse TM, Fouquet W, Schmid A, Kittel RJ, Mertel S, et al. (2005) Glutamate receptor dynamics organizing synapse formation in vivo. Nat Neurosci 8:898-905.

Ataman B, Ashley J, Gorczyca M, Ramachandran P, Fouquet W, et al. (2008) Rapid activitydependent modifications in synaptic structure and function require bidirectional Wnt signaling. Neuron 57:705-718.

Fouquet W, Owald D, Wichmann C, Mertel S, Depner H, et al. (2009) Maturation of active zone assembly by *Drosophila* Bruchpilot. J Cell Biol 186:129-145.

Stempfl T, Vogel M, Szabo G, Wülbeck C, Liu J, Hall JC, Stanewsky R. 2002. Identification of circadian-clock-regulated enhancers and genes of *Drosophila melanogaster* by transposon mobilization and luciferase reporting of cyclical gene expression. Genetics. 160:571-93.

Xiong WC, Okano H, Patel NH, Blendy JA, Montell C. 1994. *repo* encodes a glial-specific homeo domain protein required in the *Drosophila* nervous system. Genes Dev. 8:981-94.

Halter DA, Urban J, Rickert C, Ner SS, Ito K, Travers AA, Technau GM. 1995. The homeobox gene *repo* is required for the differentiation and maintenance of glia function in the embryonic nervous system of *Drosophila melanogaster*. Development. 121:317-32.

Lee T, Luo L. 1999. Mosaic analysis with a repressible cell marker for studies of gene function in neuronal morphogenesis. Neuron. 22:451-61.

Martinek S, Young MW. 2000. Specific genetic interference with behavioral rhythms in Drosophila

by expression of inverted repeats. Genetics. 156:1717-25.

Dietzl G, Chen D, Schnorrer F, Su KC, Barinova Y, Fellner M, Gasser B, Kinsey K, Oppel S, Scheiblauer S, Couto A, Marra V, Keleman K, Dickson BJ. 2007. A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in *Drosophila*. Nature. 448:151-6.

Mahr A, Aberle H. 2006. The expression pattern of the *Drosophila* vesicular glutamate transporter: a marker protein for motoneurons and glutamatergic centers in the brain. Gene Expr Patterns. 6:299-309.

Jan LY, Jan YN (1982) Antibodies to horseradish peroxidase as specific neuronal markers in *Drosophila* and grasshopper embryos. Proc Nat Acad Sci USA 79:2700-2704.

Sun B, Salvaterra PM (1995) Characterization of nervana, a *Drosophila melanogaster* neuronspecific glycoprotein antigen recognized by anti-horseradish peroxidase antibodies. J Neurochem 65:434-443.

Trujillo-Cenóz O (1969) Some aspects of the structural organization of the medulla in muscoid flies. J Ultrastr Res 27:533-553.

Prokop A, Meinertzhagen IA (2006) Development and structure of synaptic contacts in *Drosophila*. Sem Cell Dev Biol. 17:20-30.

Hofbauer A (1991) A library of monoclonal antibodies against the brain of *Drosophila melanogaster*. Habilitation thesis. University of Würzburg, Germany.

Wagh DA, Rasse TM, Asan E, Hofbauer A, Schwenkert I, et al. (2006) Bruchpilot, a protein with homology to ELKS/CAST, is required for structural integrity and function of synaptic active zones in *Drosophila*. Neuron 49:833-844.

Kittel RJ, Wichmann C, Rasse TM, Fouquet W, Schmidt M, et al. (2006) Bruchpilot promotes active zone assembly, Ca2+ channel clustering and vesicle release. Science 312:1051-1054.

Hamanaka Y, Meinertzhagen I (2010) Immunocytochemical localization of synaptic proteins to photoreceptor synapses of *Drosophila melanogaster*. J Comp Neurol 518:1133-1155.

Sun M, Xing G, Yuan L, Gan G, Knight D, With SI, He C, Han J, Zeng X, Fang M, Boulianne GL, Xie W. 2011. Neuroligin 2 is required for synapse development and function at the *Drosophila* neuromuscular junction. J Neurosci. 31:687-99.

Fernández MP, Berni J, Ceriani MF. 2008. Circadian remodeling of neuronal circuits involved in rhythmic behavior. PLoS Biol. 6:e69. doi: 10.1371/journal.pbio.0060069.

Brand AH, Perrimon N. 1993. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. Development. 118:401-15.

Bialas AR, Stevens B. 2012. Glia: regulating synaptogenesis from multiple directions. Curr Biol.22:R833-5.

Fuentes-Medel Y, Ashley J, Barria R, Maloney R, Freeman M, Budnik V. 2012. Integration of a retrograde signal during synapse formation by glia-secreted TGF-β ligand. Curr Biol. 22:1831-8.

Kerr KS, Fuentes-Medel Y, Brewer C, Barria R, Ashley J, Abruzzi KC, Sheehan A, Tasdemir-Yilmaz OE, Freeman MR, Budnik V. 2014. Glial wingless/Wnt regulates glutamate receptor clustering and synaptic physiology at the *Drosophila* neuromuscular junction. J Neurosci. 34:2910-20.

# **FIGURE LEGENDS**

Effects of the mutations in *timeless* and *period* in the number of boutons and synapses of the Drosophila MN5. The graphs (A-C) represent the proportion of total boutons (A), boutons with synapses (B) and boutons without synapses (C) measured either at subjective midday or midnight in wild type and clock mutant flies. All graphs represent means of each parameter  $\pm$  s.e.m. The graphs (D-F) represent the fold change in the number of total boutons (D), boutons with synapses (E) and without synapses (F) relative to wild type, in tim and per mutants at subjective midnight and subjective midday. p<0,05 (\*); p<0,01 (\*\*); p<0,001 (\*\*\*). See Material and Methods for a detailed explanation of the measurements. (A) The proportion of total boutons is higher at subjective midnight than subjective midday in wild type flies (WT) reared in DD (CT19:  $0.53 \pm 0.03$  vs CT7:  $0.47 \pm 0.01$ , Student t test, P=0,04). This change is absent in the three tim mutants (tim<sup>01</sup>, CT19:0.51)  $\pm 0.03$  vs CT7:0.49  $\pm 0.03$ , Student t test, P=0,65946; tim<sup>03</sup>, CT19: 0.49  $\pm 0.02$  vs CT7:0.51  $\pm 0.02$ , Student t test, P=0,58985;  $tim^{04}$ , CT19: 0.46 ± 0.02 vs CT7: 0.54 ± 0.03, Student t test, P=0,10436). The change persists in flies with a mutation in *per* but its amplitude is incremented (CT19:  $0.58 \pm$ 0.02 vs CT7:  $0.42 \pm 0.02$ , Student t test, P=0,00066) and persists also in the double mutant per: tim although it is inverted (CT19:  $0.43 \pm 0.03$  vs CT7:  $0.57 \pm 0.04$ , Student *t* test, P=0,01739). (B) The proportion of boutons with synapses shows no difference between subjective midnight and subjective midday in WT or in *tim* mutants (WT, CT19:  $0.51 \pm 0.03$  vs CT7:  $0.49 \pm 0.01$ , Student t test, P=0,63744;  $tim^{01}$ , CT19: 0.52 ± 0.03 vs CT7: 0.48 ± 0.03, Student t test, P=0,52521;  $tim^{03}$ , CT19:  $0.49 \pm 0.04$  vs CT7:  $0.51 \pm 0.04$ , Student *t* test, P=0,62794; *tim*<sup>04</sup>, CT19: 0.46 \pm 0.03 vs CT7:

 $0.54 \pm 0.03$ , Student *t* test, P=0,11807). However, it is higher at subjective midnight than subjective midday in *per* mutants (CT19:  $0.56 \pm 0.03$  vs CT7:  $0.44 \pm 0.03$ , Student *t* test, P=0,02323) and inverted in the double mutant (CT19:  $0.43 \pm 0.03$  vs CT7:  $0.57 \pm 0.04$ , Student *t* test, P=0,03113). (C) The proportion of boutons without synapses is higher in WT flies at subjective midnight than subjective midday (CT19:  $0.55 \pm 0.03$  vs CT7:  $0.45 \pm 0.03$ , Mann-Whitney U test, P=0,00937), and

this difference is even larger in *per* mutants  $(0.67 \pm 0.05 \text{ vs}, 0.33 \pm 0.05, \text{ Student } t \text{ test}, P=0,00006)$ ,

inverted in the double mutant (CT19:  $0.42 \pm 0.03$  vs CT7:  $0.58 \pm 0.05$ , Student *t* test, P=0,02586), and absent in *tim* mutants ( $tim^{01}$ , CT19:  $0.46 \pm 0.03$  vs CT7:  $0.54 \pm 0.04$ , Student *t* test, P=0,15570;  $tim^{03}$ , CT19:  $0.50 \pm 0.06$  vs CT7:  $0.50 \pm 0.08$ , Student *t* test, P=0,96333;  $tim^{04}$ , CT19:  $0.47 \pm 0.05$  vs CT7:  $0.53 \pm 0.07$ , Student *t* test, P=0,44240). (D) *tim* and *per* mutations cause an increase in the number of total boutons relative to WT ( $tim^{01}$ , 2.3 and 2.4 folds;  $tim^{03}$ , 1.7 and 1.9 folds;  $tim^{04}$ , 1.8 and 2.4 folds; *per*, 2.3 and 1.9 folds; double mutant, 2 and 2.9 folds, CT19 and CT7 respectively). (E) Both mutations also generate an increase in the number of boutons with synapses relative to WT ( $tim^{01}$ , 1.8 and 2.4 folds; *per*, 2.2 and 2 folds; *tim^{03}*, 1.7 and 1.9 folds; double mutant, 2 and 2.8 folds; *tim^{03}*, 1.5 and 1.9 folds; *tim^{04}*, 1.6 and 2.4 folds; *per*, 2.4 and 1.5 folds; double mutant, 1.7 and 3 folds, CT19 and CT7 respectively).

## Figure 2

Quantification of the proportion of MN5 boutons with and without synapses relative to total boutons in *Drosophila* clock mutants *timeless* and *period*. In wild type flies, the proportion of boutons with and without synapses (relative to the total number of boutons found per time point in each experiment) is around 50:50 (with:without) at subjective midnight (CT19:  $0.50 \pm 0.02$  vs  $0.50 \pm 0.02$ , respectively, Student *t* test, P=0,75607) and 55:45 (with:without) at subjective midday (CT7:  $0.55 \pm 0.01$  vs  $0.45 \pm 0.01$ , respectively, Student *t* test, P=0.000012). All clock mutants have an abnormally high proportion of boutons with synapses regardless the moment of the day. The highest proportion is found in *tim* mutants (*tim*<sup>01</sup>, CT19:  $0.91 \pm 0.01$  vs  $0.09 \pm 0.01$ , Mann-Whitney U test, P=0,000007, CT7:  $0.89 \pm 0.01$  vs  $0.11 \pm 0.01$ , Mann-Whitney U test, P=0,000000; *tim*<sup>03</sup>, CT19 and CT7:  $0.89 \pm 0.02$  vs  $0.11 \pm 0.02$ , Mann-Whitney U test, P=0,000000; *tim*<sup>04</sup>, CT19:  $0.89 \pm 0.01$  vs  $0.11 \pm 0.01$ , Mann-Whitney U test, P=0,000000; *tim*<sup>04</sup>, CT19:  $0.89 \pm 0.01$  vs  $0.11 \pm 0.01$ , Mann-Whitney U test, P=0,000000; *tim*<sup>04</sup>, CT19:  $0.89 \pm 0.01$  vs  $0.11 \pm 0.01$ , Mann-Whitney U test, P=0,000000; *tim*<sup>04</sup>, CT19:  $0.89 \pm 0.01$  vs  $0.11 \pm 0.01$ , Mann-Whitney U test, P=0,000000; *tim*<sup>04</sup>, CT19:  $0.89 \pm 0.01$  vs  $0.11 \pm 0.01$ , Mann-Whitney U test, P=0,000000; *tim*<sup>04</sup>, CT19:  $0.89 \pm 0.01$  vs  $0.11 \pm 0.01$ , Mann-Whitney U test, P=0,000000; *tim*<sup>04</sup>, CT19: 0.89 \pm 0.01 vs  $0.11 \pm 0.01$ , Mann-Whitney U test, P=0,000000; *tim*<sup>04</sup>, CT19: 0.89 \pm 0.01 vs  $0.11 \pm 0.01$ , Mann-Whitney U test, P=0,000000; *tim*<sup>04</sup>, CT19: 0.89 \pm 0.01 vs  $0.11 \pm 0.01$ , Mann-Whitney U test, P=0,000000; *tim*<sup>04</sup>, CT19: 0.89 \pm 0.01 vs  $0.11 \pm 0.01$ , Mann-Whitney U test, P=0,000000; *tim*<sup>04</sup>, CT19: 0.89 \pm 0.01 vs  $0.11 \pm 0.01$ , Mann-Whitney U test, P=0,000000; *tim*<sup>04</sup>, CT19: 0.89 \pm 0.01 vs  $0.11 \pm 0.01$ , Mann-Whitney U test, P=0,000000; *tim*<sup>04</sup>, CT19: 0.20, Mann-Whitney U test, P=0,000000; tim

Whitney U test, P=0,000000, CT7:  $0.81 \pm 0.02$  vs  $0.19 \pm 0.02$ , Mann-Whitney U test, P=0,000003) and finally by the double mutant (CT19:  $0.66 \pm 0.02$  vs  $0.34 \pm 0.02$ , Student *t* test, P=0,000000, CT7:  $0.65 \pm 0.01$  vs  $0.35 \pm 0.01$ , Student *t* test, P=0,000000). p<0,0001 (\*).

## Figure 3

Synapse distribution among MN5 boutons in *Drosophila* clock mutants *timeless* and *period*. In all genotypes the majority of boutons have one synapse, few have two and even fewer have three or more synapses, but there are slight differences between genotypes. In wild type flies kept in DD conditions, the proportion of boutons with one, two and three or more synapses is approximately 75:20:5 at CT19 and CT7 (Kruskal-Wallis test, CT19: H(2,N=99)=85.47, P=0,000; CT7: H(2,N=111)=96.79, P=0.000). In both clock mutants, at CT19, the proportions shifted to approximately 70:20:10 (the same as for WT flies kept in LD, see Ruiz et al., 2013). However, at CT7, the majority of *tim* mutants shift the proportion to approximately 65:30:5 (*tim*<sup>01</sup>, Kruskal-Wallis test, CT7: H(2,N=48)=41.63, P=0,000; *tim*<sup>03</sup>, Kruskal-Wallis test, CT7: H(2,N=66)=57.02, P=0,000). On the other hand, in *per* mutants, at CT7, the proportion shift to approximately 65:20:15 (Kruskal-Wallis test, CT7: H(2,N=45)=36.12, P=0,000). The double mutants, have the same proportion as the WT kept in DD at both time points analyzed (approximately 75:20:5; Kruskal-Wallis test, CT19: H(2,N=42)=36.46, P=0,000; Kruskal-Wallis test, CT7: H(2,N=45)=39.13, P=0,000). p<0,001 (\*).

# Figure 4

Clock proteins TIM and PER are expressed in different cellular components of the *Drosophila* MN5 neuromuscular junction (NMJ). All images were taken from *repo-gal4*; *uas-cd8-gfp* flies. (A-C) The main expression of TIM is in the glia wrapping the axon of the MN5. (A) Representative view of the MN5 NMJ immunostained for Timeless (anti-TIM, Red) and for a neuronal membrane

protein (anti-HRP, Blue). Glial cells express specifically green fluorescent protein anchored to the membrane through the CD8 protein (GFP, Green).(B) Same view as in (A) after elimination of the blue channel for clarity. (C) Orthogonal reconstruction of a fine series of confocal planes along the Z-axis to show the localization of the three markers simultaneously (C<sup>I</sup>: green=glia; red=TIM; blue=MN5), or separately: (C<sup>II</sup>=glia), (C<sup>III</sup>=TIM) and (C<sup>IV</sup>=MN5). The dashed line in (C) indicates the plane used for the orthogonal reconstructions.

(D-F) The main expression of PER is in the axon of the MN5. (D) Representative view of the MN5 NMJ immunostained for PER (anti-PER, Red) and for a neuronal membrane protein (anti-HRP, Blue). Glial cells express specifically green fluorescent protein anchored to the membrane through the CD8 protein (GFP, Green). (E) Same view as in (D) after elimination of the blue channel for clarity. (F) Orthogonal reconstruction of a fine series of confocal planes along the Z-axis to show the localization of the three markers simultaneously (F<sup>I</sup>: green=glia; red=PER; blue=MN5), or separately: (F<sup>II</sup>=glia), (F<sup>III</sup>=PER) and (F<sup>IV</sup>=MN5).The dashed line in (E) indicates the plane used for the orthogonal reconstructions. The scale bar shown in (A) indicates 20 microns in A, B, D and E.

# Figure 5

Results of the knockdown of *timeless* in glial cells of wild type flies and of the expression of a wild type copy of *timeless* in the glia of *tim* null mutants. All graphs represent the fold change in the number of total boutons (A and D), boutons with synapses (B and E) and without synapses (C and F) relative to wild type, for *tim*-RNAi and *tim* rescue experiments (respectively) at subjective midnight and subjective midday. (A) Knockdown of *tim* cause an increase in the number of total boutons relative to WT, very similar to *tim* mutants at CT19 but less effective at CT7 (WT: 1 as reference value; *glial tim-RNAi*, 2 and 2 folds; *tim<sup>01</sup>*, 2.3 and 2.4 folds; *uas-tim RNAi*, 1.6 and 2, CT19 and CT7 respectively). (B) Knockdown of *tim* cause also an increase in the number of boutons with synapses relative to WT, very similar to *tim* mutants at CT19 but less effective at CT7

(WT: 1 as reference value; glial tim-RNAi, 2.3 and 1.8 folds; tim<sup>01</sup>, 2.3 and 2.4 folds, uas-tim RNAi, 1.8 and 1.8, CT19 and CT7 respectively). (C) Finally, knockdown of *tim* cause an increase in the number of boutons without synapses relative to WT, very similar to *tim* mutants at CT19 but less effective at CT7 (WT: 1 as reference value; *glial tim-RNAi*, 1.8 and 2 folds; *tim*<sup>01</sup>, 1.8 and 2.8 folds), uas-tim RNAi, 1.6 and 2, CT19 and CT7 respectively).(D) The expression of a tim+ copy in the glia of *tim* null mutants cause a decrease in the number of total boutons compared to *tim*<sup>01</sup> mutants, showing values more similar to WT at CT7 but less effective at CT19 (WT: 1 as reference value; tim<sup>01</sup>; glial tim-rescue, 1.3 and 1.4 folds; tim<sup>01</sup>, 2.3 and 2.4 folds; tim<sup>01</sup>; uas-tim 1.9 and 2 folds, CT19 and CT7 respectively). (E) The expression of a *tim*+ copy in the glia of *tim* null mutants also cause a decrease in the number of boutons with synapses compared to *tim<sup>01</sup>* mutants, showing values more similar to WT at CT7 but less effective at CT19 (WT: 1 as reference value; *tim<sup>01</sup>;glial timrescue*, 1.4 and 1.4 folds; *tim*<sup>01</sup>2.3 and 2.4 folds; *tim*<sup>01</sup>;*uas-tim*, 2.1 and 1.9, CT19 and CT7 respectively). (E) Finally, the expression of a *tim*+ copy in the glia of *tim* null mutants cause a decrease in the number of boutons without synapses compared to *tim<sup>01</sup>* mutants, showing values more similar to WT at CT7 but less effective at CT19 (WT:1 as reference value; tim<sup>01</sup>-glial timrescue, 1.2 and 1.4 folds; tim<sup>01</sup>, 1.8 and 2.8 folds; tim<sup>01</sup>; uas-tim, 1.8 and 2, CT19 and CT7 respectively).

## Figure 6

Synapse distribution among MN5 boutons in *Drosophila* flies with *tim* knockdown in glial cells. In all genotypes the majority of boutons have one synapse, few have two and even fewer have three or more synapses, but there are slight differences between genotypes. In wild type flies kept in DD conditions, the proportion of boutons with one, two and three or more synapses is approximately 75:20:5 at CT19 and CT7 (Kruskal-Wallis test, CT19: H(2,N=99) = 85.47, P = 0,000; Kruskal-Wallis test, CT7: H(2,N=111) = 96.79, P = 0,000). In *tim* mutants, at CT19, the proportions shifted to approximately 70:20:10 (the same as for WT flies kept in LD, see Ruiz et al., 2013). However, at

CT7, *tim* mutants shift the proportion to approximately 65:30:5 (Kruskal-Wallis test, CT7: H(2,N =48) = 41.63, P = 0,000). In *glial tim-rescue* flies, the proportion of boutons with one, two and three or more synapses was restored from the abnormal proportion observed in  $tim^{01}$  mutants to wild type proportion 75:20:5 at CT19 and 70:20:10 at CT7 (Kruskal-Wallis test, CT19: H(2,N=81) = 68.00, P = 0,000; Kruskal-Wallis test, CT7: H(2,N=72) = 61.21, P = 0,000). p<0,001 (\*).

## **Supplementary Figure 1**

Neuroanatomy of the synaptic motor terminals of the MN5 in *timeless* and *period* mutant flies. The neuronal membrane was stained with anti-HRP (green) and the synapses with anti-BRP (magenta). The motor terminals show over-branching and abnormal axonal morphology, with larger boutons and reduced branching in *tim* mutants, and with smaller boutons in *per* mutants, as previously reported (Mehnert et al., 2007). Wild type, *wt*; *tim* mutant, *tim*<sup>01</sup>; *per* mutant, *per*<sup>01</sup>. The scale bar corresponds to 5 microns.

## **Supplementary Figure 2**

Clock protein TIM expression is restored in the glia wrapping the MN5 axon and synaptic motor terminals of *glial tim-rescue* flies. The neuronal membrane was stained with anti-HRP (blue) the protein TIM with anti-TIM (red). In wild type flies, TIM is mainly expressed in the glia (A) but it is absent in *tim<sup>01</sup>* mutants (B). (C-D) show the staining of parental controls flies that were crossed to obtain *glial tim-rescue* flies (C, *tim<sup>01</sup>;uas-tim* and D, *tim<sup>01</sup>;repo-gal4*). Unspecific staining is found in the nuclei of the muscles (B, C and D). (E-F) Staining of *glial tim-rescue* flies that shows the restoration of TIM expression in glial cells by adding a *tim*+ copy to the glia of *tim* null mutants (E, low magnification, and F, higher magnification). The scale bar in A, B, C, D and E is 20 microns, and in F is 10 microns.
Summary of the numbers of flies use in each set of experiments.





Figure 2



Figure 3



## Figure 4



Figure 5



## Figure 6



Supplementary Figure 1



## Supplementary Figure 2



## Supplementary Table 1

Analysis of clock mutants						
	wt	tim <sup>01</sup>	tim <sup>03</sup>	tim <sup>04</sup>	per <sup>01</sup>	$per^{01}$ ;tim <sup>01</sup>
CT19	33	14	18	16	18	14
CT7	37	16	22	18	15	15
Glial timeless-RNAi						
	Wt	tim <sup>01</sup>	Glial tim-	uas-tim-		
			RNAi	RNAi		
CT19	33	14	17	21		
CT7	37	16	18	18		
Glial rescue of <i>timeless</i> in the <i>tim<sup>01</sup></i> mutant						
	wt	tim01	Glial tim-	tim <sup>01</sup> ;uas-		
			rescue	tim		
CT19	33	14	27	15		
CT7	37	16	24	21		