

Estudio y caracterización de los receptores ionotrópicos Ir21a, Ir25a y Ir93a en *Drosophila melanogaster*

The study of ionotropic receptors Ir21a, Ir25a and Ir93a in *Drosophila melanogaster*

CATALINA TRONCONE^(1,2), CAROLINA ABREU⁽¹⁾, NICOLÁS ARRIONDA⁽¹⁾, VICTORIA BASEDAS⁽¹⁾, MILAGROS BENITEZ⁽¹⁾, MARIANA DI DOMÉNICO⁽¹⁾, GONZALO BUDELLI^(2,3), SANTIAGO SASTRE^(2,3)

(1) Estudiante de Medicina, Ciclo de Metodología Científica II. Facultad de Medicina, Universidad de la República. Montevideo, Uruguay.

(2) Departamento de Biofísica. Facultad de Medicina, Universidad de la República. Montevideo, Uruguay.

(3) Docente supervisor. Departamento de Biofísica. Facultad de Medicina, Universidad de la República. Montevideo, Uruguay.

Correos electrónicos de contacto:
Gonzalo Budelli:
gonzalobudelli@gmail.com
Catalina Troncone:
catalinatroncone@gmail.com

Grupo 89.

RESUMEN

Muchos animales cuentan con sistemas termosensoriales para evitar temperaturas extremas, y también para hallar temperaturas óptimas. Estos sistemas son utilizados por insectos vectores de enfermedades para localizar a sus presas, como los mosquitos, responsables de aproximadamente más de 700.000 muertes por año(1, 2).

El estudio de sistemas sensoriales en insectos puede dar pistas para combatir estos vectores, así como el avance en el desarrollo de técnicas disuasorias para la contención de hematófagos(3). En este proyecto se utilizó el modelo experimental *Drosophila melanogaster* para estudiar neuronas termosensibles (4).

Se cuenta con líneas transgénicas de mosca de la fruta que permiten la expresión de GFP en las células que expresan los receptores en estudio; de esta forma, se estudiaron los patrones de expresión de receptores tanto en larva como en adulto de esta especie, utilizando microscopía de fluorescencia y confocal. Se utilizó la técnica de imagenología de calcio para el registro fisiológico de neuronas termosensibles frente a cambios de temperatura. Se pudieron observar cambios en la intensidad de la fluorescencia dependientes de los cambios de temperatura. Finalmente, se realizó una predicción de la estructura de estos receptores mediante el uso de AlphaFold 3 (5, 6).

Palabras clave: *Drosophila melanogaster*, microscopía confocal y epifluorescencia, receptores ionotrópicos, electrofisiología, AlphaFold

ABSTRACT

Many animals have thermosensory systems to avoid extreme temperatures, and also to find optimal temperatures. These systems are used by disease vector insects to locate their prey, such as mosquitoes, responsible for more than 700,000 deaths per year (1, 2).

The study of sensory systems in insects can provide clues to combat these vectors, as well as progress in the development of deterrent techniques to contain hematophages (3). In this project, the *Drosophila melanogaster* experimental model was used to study thermosensitive neurons (4).

There are fruit fly lines that allow the expression of GFP in the cells that express the receptors under study, in this way the expression patterns of receptors were studied in both larva and adult of this species using fluorescence and confocal microscopy. The calcium imaging technique was used for the physiological recording of thermosensitive neurons against temperature changes. Changes in fluorescence intensity dependent on temperature changes could be observed. Finally, a prediction of the structure of these receptors was carried out using different in silico techniques (5, 6).

Key words: *Drosophila melanogaster*, confocal and epifluorescence microscopy, ionotropic receptors, electrophysiology, AlphaFold

GRAPHICAL ABSTRACT

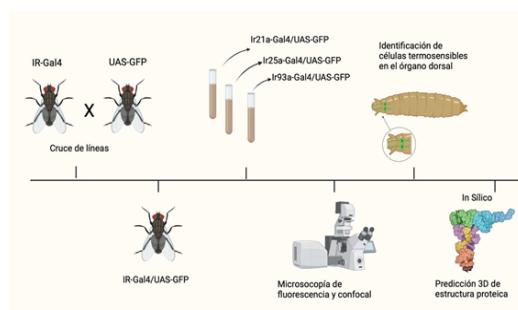


TABLA DE ABREVIATURAS UTILIZADAS EN EL TEXTO

GFP	Proteína fluorescente verde.
DOG	Ganglio del órgano dorsal.
DOCC	Células frías del órgano dosal.
BOSS	Subestructuras Superficiales Ortogonales Dominantes.
IR	Receptores ionotrópicos.
CA	Carbono alfa.
ROI	Región de interés.
TR	Receptores de potencial transitorio.
ME	Microscopía electrónica.

INTRODUCCIÓN

La homeostasis de la temperatura corporal es esencial en ectotermos y depende de la integración de múltiples tipos de células que responden a distintos cambios de temperatura⁽²⁾. Esto es fundamental para regular los mecanismos fisiológicos y de comportamiento que mantienen la temperatura corporal cerca del punto de ajuste homeostático⁽³⁾. Es muy importante comprender los mecanismos moleculares y celulares de la sensación de temperatura, ya que pueden proporcionar objetivos moleculares para evitar conductas de búsquedas de huésped en vectores de enfermedades⁽¹⁾.

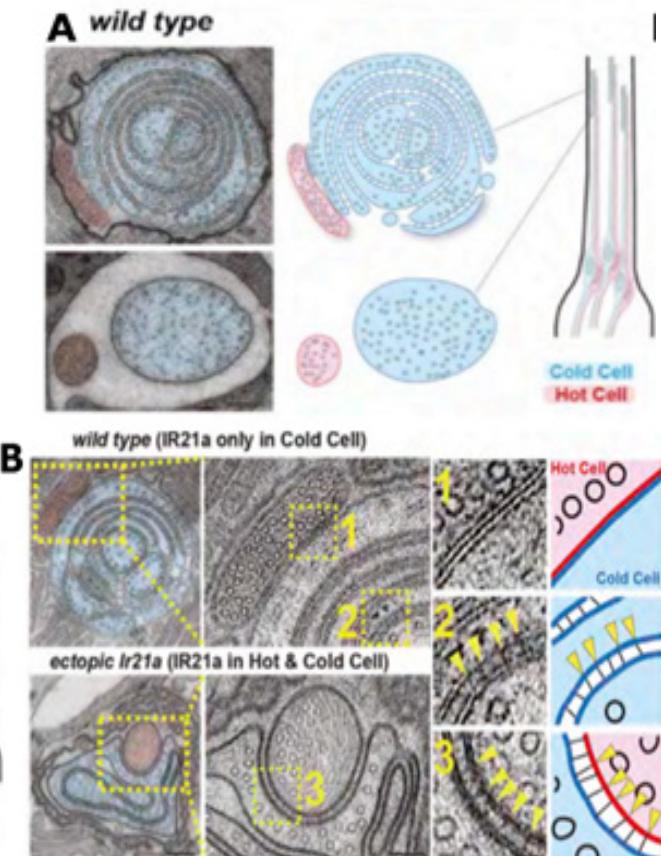
La mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster* o *D. melanogaster* (DM), es un excelente organismo modelo para la neurobiología del comportamiento que utiliza un sistema nervioso con al menos 1.000 veces menos neuronas que el nuestro para realizar una extensa variedad de comportamientos⁽⁷⁾. El avance en el entendimiento de sistemas sensoriales en *Drosophila melanogaster* es importante para nuestra comprensión global de estos sistemas ya que sus mecanismos fundamentales están evolutivamente conservados en otras especies.

Los receptores de potencial transitorio (TRP, por sus siglas en inglés), son canales catiónicos no selectivos, que responden a varios estímulos, entre ellos, la temperatura, que están conservados desde la mosca a los humanos⁽⁸⁾. Algunos de ellos, los termo TRP, juegan un rol fundamental en determinar el comportamiento frente a estímulos térmicos⁽⁸⁾. En *Drosophila*, además de los receptores TRP, algunos receptores ionotrópicos y miembros de la familia de receptores gustativos tienen un rol en la termorrecepción y en el comportamiento asociado^(9, 4, 10). Estos sistemas termo sensoriales son sumamente importantes para *Drosophila* y otros insectos, ya que no controlan su temperatura, y por su tamaño, se equilibran rápidamente con la temperatura que los rodea⁽¹¹⁾.

En *D. melanogaster* se han reportado células que responden a cambios de temperatura en distintos órganos sensoriales, en larvas se ha observado que las neuronas termosensoriales requieren de los receptores ionotrópicos (Ir21a, Ir25a e Ir93a) para su funcionamiento^(4, 12). El órgano dorsal presenta varias neuronas sensoriales, de las cuales cinco responden a cambios de temperatura. Las neuronas termosensibles de este órgano expresan los receptores ionotrópicos mencionados anteriormente, tres de ellas expresan Ir21a, Ir25a e Ir93a^(4, 12) y responden a disminución de temperatura (llamadas células frías del órgano dorsal del inglés DOCC); las dos restantes expresan Ir68a, Ir25a e Ir93a y responden a aumentos de temperatura⁽¹³⁾. Las DOCCs son tres neuronas que responden a la disminución de temperatura en cada ganglio del órgano dorsal (del inglés DOG). Estas neuronas muestran grandes "bulbos dendríticos" ricos en membrana que conforman estructuras llamadas lamelas, observadas en otras células que responden a disminución de temperatura en varios insectos^(14, 15). Los receptores mencionados (Ir21a, Ir25a) son de importancia para la correcta morfogénesis de esta estructura,

que se forma a partir de un auto plegamiento de las dendritas⁽¹⁶⁾. Los espacios intermembrana de las lamelas se mantienen a una dimensión constante de aproximadamente 20 nm y presentan estructuras electrodensas llamadas BOSSs. (Figura 1).

Figura 1. Los receptores ionotrópicos especifican la morfogénesis de los sensores fáscicos que controlan la temperatura rápida



A. A la izquierda se ve la microscopía electrónica de transmisión de células de la arista. Se puede observar en azul las lamelas de la dendrita de la célula que responde a disminución de temperatura. A la derecha una representación esquemática de la misma y la región de la arista a la que corresponden los cortes. B. Distancia entre las membranas de las células que responden al aumento y disminución de la temperatura (1), distancia entre las membranas de las lamelas de la célula que responde a disminución de temperatura y las BOSS (2)

Fuente: Adaptado de Budelli, G. et al. 2019 ©. Ionotropic Receptors Specify the Morphogenesis of Phasic Sensors Controlling Rapid Thermal Preference in *Drosophila*. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.12.022>

En este plan de investigación se propuso continuar con la línea de investigación del Prof. Adjunto Gonzalo Budelli, en la Unidad Académica de Biofísica que consiste en el estudio de termorreceptores y la integración de la información termosensorial en la larva de *Drosophila melanogaster*. El trabajo en larva no es solo económicamente favorable, también cuenta con variadas herramientas genéticas, la posibilidad de hacer imagenología en el animal entero, su estudiada respuesta comportamental, y la disponibilidad de un conectoma con detalle a nivel sináptico.

Además, se plantea el estudio de la expresión de estos termorreceptores en larvas y adultos de *Drosophila melanogaster*, ya que estudios preliminares mostraron que los canales IR se expresan en adultos en distintas partes del cuerpo, como en células de las patas, labellum y sáculo⁽¹⁷⁾.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar los receptores ionotrópicos Ir21a, Ir25a e Ir93a y su patrón de expresión en *Drosophila melanogaster*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

OBJETIVO 1:

Estudio electrofisiológico de células termosensoriales ubicadas en el órgano dorsal de la larva de *Drosophila melanogaster* que expresan los receptores Ir21a, Ir25a, Ir93a. Dado que estos registros aún no han sido documentados y su obtención requiere un preparado experimental complejo, en caso de no ser posible realizar electrofisiología, se plantea como objetivo alternativo el estudio fisiológico a través de imagenología de calcio. Este último permitiría la observación indirecta de la activación celular mediante cambios en las concentraciones intracelulares de calcio.

OBJETIVO 2:

Caracterización de los patrones de expresión en larva y adulto de Ir21a, Ir25a e Ir93a. Se utilizará el sistema Gal4-UAS, para visualizar con GFP las células que expresan estos receptores termosensibles. Se analizará la expresión de los receptores con técnicas de fluorescencia y microscopía confocal.

OBJETIVO 3:

Predecir la estructura del heterotetrámero formado por estas proteínas mediante el empleo de AlphaFold3 evaluando diferentes estequeometrías para el receptor y la presencia de ligandos.

MATERIALES Y MÉTODOS

MODELO EXPERIMENTAL

Se llevó a cabo la investigación en el área básica fundamental, en el Departamento de Biofísica de la Facultad de Medicina. El modelo experimental es una investigación con animales, específicamente el modelo biológico *Drosophila melanogaster*. Para estudiar las neuronas que expresan Ir21a, Ir25a e Ir93a se utilizaron herramientas genéticas como el sistema Gal4-UAS. Mediante este sistema se utilizó una línea mutante con la secuencia de Gal4 regulada por las secuencias promotoras del receptor ionotrópico de interés y otra línea transgénica en donde se insertó el promotor UAS regulando la expresión de GFP⁽¹⁸⁾. Finalmente, se realizó un cruzamiento y la progenie resultante va a contar con individuos que expresan GFP en las células que expresan el receptor de interés (Ir21a, Ir25a, Ir93a, TRPA1, Gr28b).

MÉTODOS

Se utilizaron distintas líneas transgénicas de la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*). Se estudiaron los patrones de expresión de los receptores ionotrópicos (Ir21a, Ir25a y Ir93a) en la larva y adulto de esta especie mediante microscopía de fluorescencia y confocal. Para la caracterización molecular de estos canales se utilizó un banco de datos de estructuras de proteínas (RCSB- PDB), para predecir con herramientas

computacionales la estructura de los mismos. Finalmente, se utilizó la imagenología de calcio para analizar la activación celular frente a los cambios de temperatura.

MICROSCOPIA DE EPIFLUORESCENCIA Y CONFOCAL

Para los experimentos de microscopía de fluorescencia se utilizó un microscopio de epifluorescencia invertido Nikon Eclipse Ti-2 con cámara CMOS Hamamatsu Orca Flash 4.0 Fusión-BT que permite captación de imágenes en tiempo real de alta resolución y bajo ruido. Se trabajó en la caracterización de los receptores Ir21a, Ir25a y Ir93a, y en la de sus patrones de expresión. Para los ensayos se utilizaron larvas y adultos mutantes con expresión de GFP. Para microscopía confocal se utilizó el microscopio confocal Leica SP5 II. El mismo obtiene imágenes de todo el volumen del preparado, permitiendo analizar plano a plano la expresión de los receptores, así como obtener una reconstrucción tridimensional de los datos adquiridos. Para el análisis de las imágenes se utilizó el programa Fiji (de ImageJ) de código abierto.

PATCH CLAMP

La metodología permite el estudio electrofisiológico de las neuronas del órgano dorsal *in situ* en la larva de *Drosophila* con su sistema nervioso central prácticamente intacto. Se utilizó la técnica de Patch Clamp, en una preparación basada en la descrita para el registro de motoneuronas en el protocolo metodológico específico para larva de *Drosophila* según Cold Spring Harbor Laboratory⁽¹⁹⁾.

El protocolo para Patch Clamp comenzó con la técnica de disección del preparado, en caso de tratarse de la larva, la misma se corta a la mitad, preservando la porción céfálica, donde se conserva el cerebro. Luego, se introdujo hacia caudal toda la mitad de la larva hasta lograr exponer en su totalidad los órganos internos, debiendo estar sumergida en una solución isosmolar, sujetada con pins. Para estudiar las neuronas termosensibles del DOG, se colocó una pipeta de vidrio con proteasa, para así degradar la membrana del ganglio y exponer los somas de las neuronas.

Una vez el preparado está listo, se coloca al microscopio para acercarle con un micromanipulador una pipeta de vidrio de punta chica (1-3 um) pulida, la cual permite tener un contacto directo con la célula en estudio, dado que se genera un sello eléctrico entre el vidrio y la membrana, esto permite la medición eléctrica de la actividad de la misma. Se aplica succión una vez formado el sello eléctrico y se logra romper el parche de membrana en la punta de la pipeta, el interior de la pipeta se encuentra en contacto directo con el interior de la célula. Esta configuración de la técnica de Patch Clamp se llama Whole-cell (célula entera) y posibilita el registro eléctrico del potencial eléctrico de la célula ante cambios de temperatura.

IMAGENOLOGÍA DE CALCIO

La metodología empleada permite el análisis fisiológico de las neuronas del órgano dorsal *in vivo* en larvas de *Drosophila*, mediante el sistema de expresión Gal4-UAS. Para ello, se realizaron cruces de líneas de moscas transgénicas: una línea que expresa Gal4 bajo el control del promotor del receptor de interés, y otra que expresa el sensor de calcio GCaMP regulado por el promotor UAS. De este modo, las neuronas seleccionadas expresaron Gal4, induciendo así la expresión de GCaMP. Cuando las neuronas termosensibles se activan, los niveles de calcio intracelular aumentan, generando un incremento en la fluorescencia de GCaMP⁽²⁰⁾. Esta metodología proporciona una herramienta eficaz para observar indirectamente la activación celular a través de cambios en las concentraciones intracelulares de calcio.

PROTOCOLO PARA CUANTIFICACIÓN DE LA VARIACIÓN DE FLUORESCENCIA

El mismo se generó en larvas de *Drosophila melanogaster* en función del cambio en las condiciones de temperatura. Se partió de un stack de 150 imágenes a 40x (a 4 Hz) de la región de interés (neuronas expresando GCaMP6m en línea Gal4 para el receptor ionotrópico Ir21a) en escala de grises. Utilizando Fiji (Image J) se seleccionaron las regiones de interés (ROI) que incluyen este grupo de neuronas en el stack. Se creó una máscara con las ROI como imagen unitaria independiente y se utilizó el plugin "Multi-template-Matching" obteniendo una plantilla única para localizar las demás ROI dentro de los 150 cuadros que componen el stack. Este procedimiento dio como resultado una región rectangular por cada cuadro conteniendo una zona de interés reducida.

Posteriormente, se creó un sub-stack con todas las ROI, resultando en un nuevo stack. Dado que en este último stack las áreas estaban desfasadas (producto del movimiento de la larva), se utilizó "StackReg" para estabilizar las imágenes, quitando movimiento.

Sobre el primer cuadro del stack regularizado se seleccionaron 2 ROI para cuantificar los valores de intensidad promedio (Mean Gray Value), y obtener intensidades comparativas. Utilizando el "ROI Manager" se realizó una medida múltiple. De esta forma se obtuvo una tabla con los valores en escala de grises para las dos regiones de interés seleccionadas, las cuales se graficaron junto al tiempo correspondiente (Anexos I).

IN SILICO

Como parte de la caracterización de las proteínas de membrana de interés, se buscó predecir su estructura mediante la utilización de aproximaciones *in silico* como AlphaFold3. Se trata de una herramienta que permite predecir mediante algoritmos matemáticos y modelos computacionales la estructura 3D de proteínas a partir de su secuencia aminoacídica y el patrón de coevolución de la proteína de

interés. La red se compone de dos partes principales: el tronco, que procesa la información de las secuencias, y el módulo de estructura, que crea la estructura 3D. Se emplea un enfoque iterativo (de muchas repeticiones) para mejorar gradualmente las predicciones, generándose bloques de estructuras donde se selecciona la más probable en cada uno, de forma de obtener mejoras incrementales constantes hasta lograr una predicción de la estructura óptima. La utilización de dicha herramienta tiene grandes implicaciones en la investigación biomédica y farmacéutica. La caracterización de las proteínas, contribuye a comprender su función, así como las consecuencias de mutaciones genéticas. Ha demostrado ser un método altamente efectivo para predecir estructuras de proteínas con gran precisión^(5, 6). Para llevar a cabo esta predicción se obtuvieron las secuencias aminoacídicas de las proteínas Ir21a, Ir25a e Ir93a cuyos códigos UNIPROT son Q9VPI2, E9NA96, Q9VDH6 respectivamente.

Tabla 1. Conformación del heterotetrámero estudiado

	Cantidad de protómeros por sistema			Ca ²⁺
	IR93a	IR25a	IR21a	
Sistema 1	2	1	1	Si
Sistema 2	2	1	1	No
Sistema 3	1	2	1	Si
Sistema 4	1	2	1	No
Sistema 5	1	1	2	Si
Sistema 6	1	1	2	No

Fuente: elaboración propia

Se realizó la predicción dos veces para 3 modelos (Tabla 1), considerando las combinaciones posibles para un tetrámero formado por estos protómeros, también contando con la presencia de 70 moléculas de ácido oleico, ya que era el máximo número permitido por AlphaFold, como moléculas de membrana y la presencia o no de Ca²⁺ con el fin de lograr un modelo más preciso. Se midió la longitud del ectodominio en las moléculas, considerando el límite superior del dominio de membrana y el límite superior del ectodominio: Ir93a desde el CA del residuo 827 al CA del residuo 60, Ir21a desde el CA del residuo 404 al CA del residuo 89, Ir25a desde el CA del residuo 662 al CA del residuo 101. El área del poro se midió con la fórmula del rombo, delimitado por un diámetro mayor (D) y un diámetro menor (d), (D*d/2): Ir93a se seleccionó la glutamina 625 (GLN625), Ir25a se seleccionó la prolina 622 (PRO622), Ir21a se seleccionó la treonina 425 (THR452). La hipótesis de que las lamelas son formadas por puentes entre las estructuras extracelulares conformadas por el ectodominio de estos tetrámeros podría ser fortalecida por la medida de su ectodominio⁽¹⁶⁾.

Finalmente, se analizó la expresión de aminoácidos en las secuencias de canales ionotrópicos glutamatérgicos y se realizó alineamiento de secuencias de las mismas en EMBL-EBI: NMDE1_HUMAN (Q12879), GRIA4_RAT (P19493), GRIK2_DANRE (A0A2R8QF68), GRID1_RAT (Q62640), NMDA1_DROME (Q24418), D0VWX9_NOSP7 (D0VWX9),

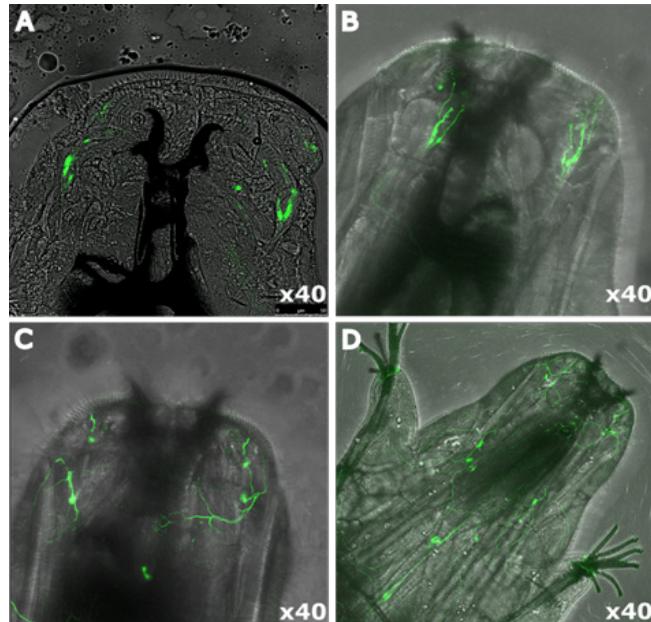
GLR34_ARATH (Q8GXJ4), IR21A_DROME (Q9VPI2), IR93A_DROME (Q9VDH6), IR25A_DROME (Q9V8N1), IR40A_DROME (Q9V9N1). Estas secuencias ya alineadas se insertaron en WebLogo 3 para generar una figura esquemática del sector de interés, el poro.

RESULTADOS

MICROSCOPIA DE EPIFLUORESCENCIA Y CONFOCAL

Se emplearon microscopía de epifluorescencia y confocal para analizar los patrones de expresión de distintos termorreceptores en larvas de *Drosophila melanogaster*. A través del sistema Gal4-UAS, se expresó GFP en las neuronas donde se expresan los receptores Ir21a, Ir93a, GR28b y TRPA1. De esta forma se determinaron los patrones de expresión de estos receptores en la región cefálica de la larva de *Drosophila*.

Figura 2. Imagenología con microscopio confocal



Las neuronas fluorescentes con GFP son aquellas que expresan termorreceptores en la porción cefálica de la larva de *Drosophila melanogaster*. A. Expresión de Ir21a en tres células del ganglio del órgano dorsal DOG. B. Expresión de Ir93a en cinco células del DOG. C. Expresión de TRPA1 en múltiples neuronas de distintos ganglios de la región cefálica de la larva. D. Expresión de GR28b en neuronas de morfología diversa en distintos sitios de la región cefálica.

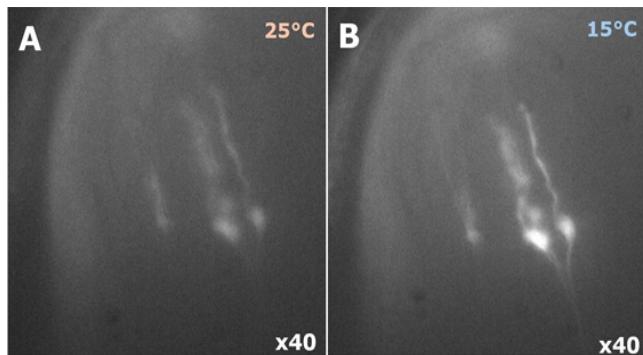
Fuente: elaboración propia

IMAGENOLOGÍA DE CALCIO

Se estudió la actividad neuronal en larvas de *Drosophila melanogaster* mediante técnicas de imagenología de calcio, enfocadas en la respuesta térmica de neuronas sensoriales. Utilizando un marcador fluorescente (GCaMP6m) bajo el sistema Gal4 específico para el receptor Ir21a, se analizaron las variaciones en los niveles de calcio intracelular como indicador de activación neuronal.

En condiciones basales, a 25°C, se identifican tres neuronas en el DOG con fluorescencia basal. Ante un descenso de temperatura a 15°C, se observa un incremento en la fluorescencia, lo que sugiere una respuesta activa de estas neuronas al cambio térmico. (Figura 4).

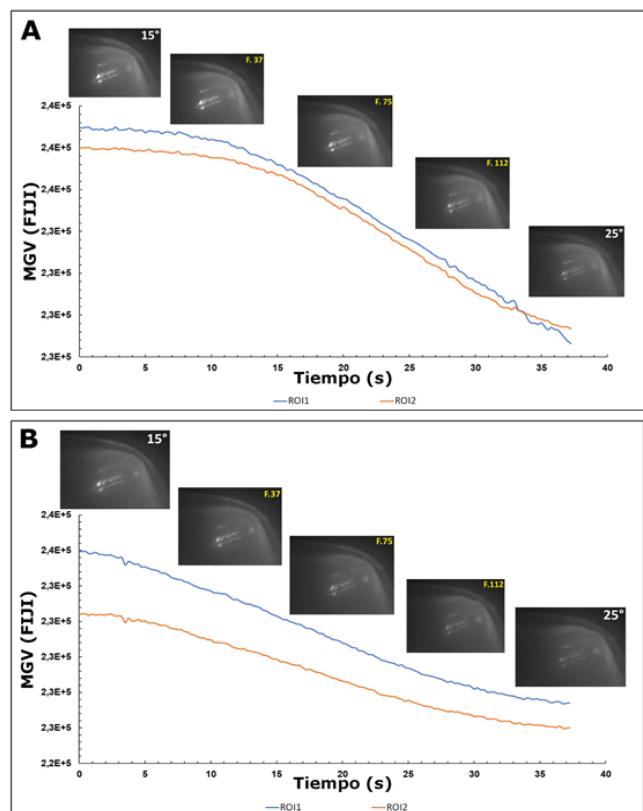
Figura 3. Imagenología de calcio en larva de *Drosophila melanogaster*



A. Se distinguen tres somas neuronales expresando GCamp6m cuando se utiliza una línea Gal4 para el receptor ionotrópico Ir21a a 25°C. Las neuronas se localizan en el ganglio del órgano dorsal, y se aprecia al menos una neurona que podría ser el ganglio terminal. B. Aumento de la fluorescencia producido por la activación de estas neuronas frente a una disminución de temperatura a 15°C. La activación de estas neuronas produce un aumento del calcio intracelular, provocando un aumento de la fluorescencia de GCamp.

Fuente: elaboración propia

Figura 4. Intensidad de fluorescencia en función del tiempo A.B



Cuantificación de la variación de fluorescencia en función del cambio de temperatura. Variación de intensidad de fluorescencia en las neuronas que expresan Ir21a frente a un cambio de temperatura, en función del tiempo. Cambio de la intensidad de fluorescencia frente a un cambio de temperatura de 15°C a 25°C en dos regiones de interés (trazos azul y naranja) en dos larvas distintas (A y B).

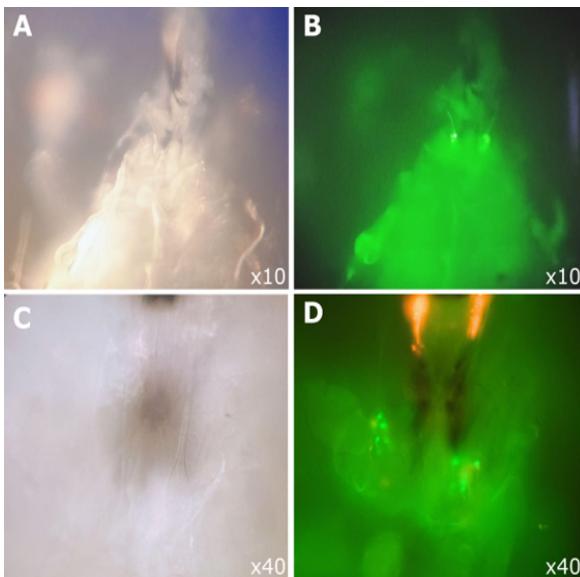
Fuente: elaboración propia

En la cuantificación de variación de fluorescencia se evidencia un aumento de la misma frente a disminución de temperatura (25°C a 15°C) en ambas larvas.

Adicionalmente, se trabajó con el preparado para realizar *patch clamp*, logrando realizar eficientemente el mismo. (Figura 5). Este tipo de preparación, cuidadosamente optimizada, incluye el uso de placas recubiertas con *Sylgard*, pines para fijación precisa y micropipetas de vidrio adaptadas, garantizando la estabilidad y viabilidad del tejido para registros electrofisiológicos confiables. Estos avances son

fundamentales para posteriores estudios detallados de la función neuronal y las interacciones sinápticas.

Figura 5. Preparado de larva Ir93a Gal 4 para Patch Clamp



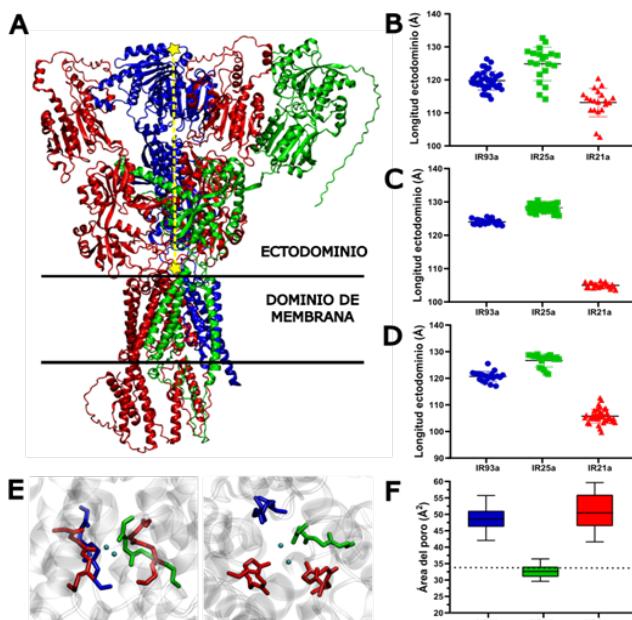
En los siguientes paneles se aprecia la disección de la larva y su visualización anatómica. Como referencia, el DOG se encuentra caudal con respecto a los ganchos (estructura negra). A. Preparado bajo luz transmitida. B. Preparado bajo filtro de fluorescencia, destacando la expresión de GFP en células del DOG. C. Preparado bajo luz transmitida donde se aprecia la membrana del DOG y el nervio que se dirige al cerebro con el objetivo 40X. D. Preparado bajo filtro de fluorescencia expresando GFP en cinco células de cada DOG.

Fuente: elaboración propia

ANÁLISIS IN SILICO TERMORRECEPTOR

Siguiendo la metodología planteada en la sección 3.6 se realizó una predicción de la estructura de los tetrámeros conformados por distintas combinaciones de los protómeros Ir21a, Ir25a e Ir93a. (Figura 7).

Figura 6. Modelo de proteína de membrana termosensibles con AlphaFold3



A. Proteína de membrana compuesta por receptores ionotrópicos: dos Ir21a (rojo), Ir25a (verde) y Ir93a (azul). Las líneas horizontales negras delimitan el ectodominio con el dominio transmembrana. La línea punteada amarilla representa la distancia medida en cada cadena desde las estrellas amarillas. B, C, D. Gráficos con medias de las cadenas de los IR.

B. Modelo 2Ir93a; Ir25a; Ir21a. C. Modelo Ir93a; 2Ir25a; Ir21a. D. Modelo Ir93a; Ir25a; 2Ir21a. E. Vista superior y lateral del poro del canal, respectivamente, con calcio intraporo.

F. Gráfico de áreas del poro en cada modelo, la línea punteada muestra la media de áreas de poros glutamatérgicos experimentales de PDB aproximadamente de 34 Å² (7YFI y 6NJM).

Fuente: elaboración propia

A continuación, se realizó una medida de la extensión del ectodominio y del área del poro, ambas propiedades definidas en la sección 3.6. Se realizó un test ANOVA para comparar las medias de los grupos, mostrando diferencias estadísticamente significativas en las longitudes del ectodominio entre los grupos de IR93A, IR21A e IR25A (Tabla 2).

Tabla 2. ANOVA

Protein	SS	DF	MS	F(DFn,DFd)	P Value	
IR93A	Between groups	245,1	2	122,5	F (2, 77) = 23,97	P <0.0001
	Within groups	303,5	77	5,111		
	Total	638,6	79			
IR21A	Between groups	889,1	2	444,5	F (2, 77) = 54,93	P <0.0001
	Within groups	623,2	77	8,093		
	Total	1512	79			
IR25A	Between groups	155,9	2	77,96	F (2, 77) = 9,294	P=0.0002
	Within groups	645,9	77	8,388		
	Total	801,8	79			

Fuente: elaboración propia

Posteriormente, mediante el test de múltiples comparaciones de Tukey, para Ir93A, se encontraron diferencias significativas entre 2Ir93A vs 2Ir25a y 2Ir25A vs 2Ir21A, pero no entre 2Ir93A vs 2Ir21A. Para Ir21A, hubo diferencias significativas entre 2Ir93A vs 2Ir25A y 2Ir93A vs 2Ir21A, pero no entre 2Ir25A vs 2Ir21A. Finalmente, para Ir25A, solo se detectó una diferencia significativa entre 2Ir93A vs 2Ir25A, sin otros hallazgos relevantes. (Tabla 3).

Tabla 3. Tukey's multiple comparisons test

Protein	Mean Diff.	95,00% CI of diff. threshold?	Below		P Value
			Yes	No	
IR93A 2	IR93A vs. 2 IR25A -4,254	-5,734 to -2,774	Yes	****	<0,0001
	2 IR93A vs. 2 IR21A -0,9165	-2,396 to 0,5631	No	ns	
	2 IR25A vs. 2 IR21A 3,338	1,629 to 5,046	Yes	****	
IR21A 2	IR93A vs. 2 IR25A 8,201	6,051 to 10,35	Yes	****	<0,0001
	2 IR93A vs. 2 IR21A 7,391	5,529 to 9,253	Yes	****	
	2 IR25A vs. 2 IR21A -0,8095	-2,671 to 1,052	No	ns	
IR25A 2	IR93A vs. 2 IR25A -3,392	-5,288 to -1,497	Yes	****	0,0002
	2 IR93A vs. 2 IR21A -1,855	-4,043 to 0,3342	No	ns	
	2 IR25A vs. 2 IR21A 1,538	-0,3578 to 3,433	No	ns	

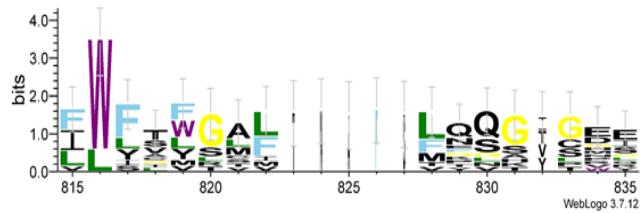
Fuente: elaboración propia

Midiendo el área del poro en cada modelo, observamos que en el tetrámero donde se expresan 2Ir25a, la media del área en los modelos es similar a la de poros glutamatérgicos experimentales^{21, 22}.

ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS

Para estudiar la conservación de los residuos que forman el poro de los receptores ionotrópicos Ir21a, Ir25a y Ir93a entre los receptores glutamatérgicos se realizó un alineamiento de secuencia múltiple, destacando en la Figura 8 los residuos que forman dicho poro.

Figura 7. Alineamiento de secuencias de receptores ionotrópicos glutamatérgicos desde el aminoácido 815 al 835 en WebLogo 3



Fuente: elaboración propia

La figura representa los aminoácidos alineados de múltiples secuencias, donde el tamaño de las letras de cada aminoácido es directamente proporcional al número de ocurrencias del mismo. El segmento del aminoácido 822 al 828 corresponde a una porción del poro, dentro del mismo se observan múltiples repeticiones de ciertos aminoácidos como Leucina (L), Glicina (G), Alanina (A) y Fenilalanina (F), lo que sugiere la importancia estructural o funcional de estos residuos en la función de los canales ionotrópicos glutamatérgicos. Se conoce que la porción del poro es una región altamente conservada, teniendo las secuencias de Ir93a e Ir25a similitudes con las comparadas. Sin embargo, en los datos se obtuvo que la porción del poro en la secuencia de Ir21a no se encuentra conservada. En conclusión, las secuencias contrastadas no presentan alta conservación a pesar de ser la porción del poro, lo cual puede deberse a que se comparó un bajo número de secuencias y a que las mismas provienen de diferentes miembros de la familia de receptores glutamatérgicos.

DISCUSIÓN

El trabajo realizado aborda aspectos importantes sobre patrones de expresión y funcionalidad de los receptores ionotrópicos Ir21a, Ir25a e Ir93a en las neuronas termosensoriales del DOG de *Drosophila melanogaster*, indicando una expresión específica de estos receptores, lo que refuerza la noción de que las estructuras están involucradas en la detección de cambios de temperatura⁽²³⁾. Esto resulta relevante dentro del contexto de la neurobiología sensorial, ya que el papel de los receptores ionotrópicos es un área activa con implicaciones tanto evolutivas como funcionales^(4, 16, 23).

El estudio sugiere que el receptor Ir21a responde a la reducción de temperatura de 25°C a 15°C, lo que confirma su rol en la percepción de descensos de temperatura. La sensibilidad térmica, compartida en conjunto con los receptores Ir25a e Ir93a, apunta a un sistema de adaptación biológica esencial para que *Drosophila* mantenga conductas de termorregulación en ambientes fluctuantes⁽²³⁾. Los datos obtenidos refuerzan observaciones anteriores sobre el papel de estos receptores en el comportamiento termotáctico de la larva, donde se vio que la capacidad de evitar zonas frías es determinante para su supervivencia⁽⁴⁾.

Los resultados del test de Tukey destacan las diferencias significativas en las longitudes del ectodominio, especialmente entre 2Ir93A vs 2Ir25a y 2Ir25a vs 2Ir21a. Esto sugiere que las combinaciones específicas de estas proteínas pueden generar cambios estructurales en el tetramero, afectando su interacción con el medio, mientras que, la ausencia de diferencia significativa entre 2Ir93a vs 2Ir21a podría indicar que estas proteínas comparten características estructurales más homogéneas, tal vez cumpliendo funciones similares en el receptor. Los dominios extracelulares de los tetrameros formados por distintas combinaciones de Ir21a, Ir25a e Ir93a (Tabla 1) presentan una longitud media de 12 nm, lo que

respalda la hipótesis de que estos receptores pueden formar complejos multiméricos a través del espacio entre membranas de las lamelas. La distancia intermembrana observada en las lamelas mediante microscopía electrónica (ME) es de 20 nm⁽¹⁶⁾, la predicción estructural obtenida muestra que es posible que los dominios extracelulares de los receptores ionotrópicos podrían interactuar en el espacio intermembrana de las lamelas. Esto sugiere que los ectodominios de estos tetrameros podrían actuar como unidades funcionales de señalización⁽⁸⁾, facilitando la transmisión de la señal térmica al inducir un cambio conformacional en la estructura del receptor en respuesta a descensos de temperatura. Por supuesto, experimentos adicionales son necesarios para testear esta hipótesis. Se propone a la formación de tales complejos como un mecanismo mediante el cual las células pueden ajustar su sensibilidad y especificidad a estímulos ambientales, particularmente en sistemas sensoriales especializados.

El alineamiento de las secuencias revela patrones de conservación de aminoácidos que podrían ser cruciales para la función y permeabilidad a ciertos iones de los canales glutamatérgicos. Las posiciones de los aminoácidos repetidos podrían correlacionarse con regiones funcionales clave en estos canales.

Finalmente, la combinación de estudios *in vivo* y modelado estructural mediante técnicas *in silico* proporciona un enfoque sólido para comprender cómo las subunidades receptoras interaccionan y se ensamblan, permitiendo no solo predecir interacciones basadas en la conformación tridimensional^(5, 6), sino también hipotetizar sobre cómo estas estructuras se alteran o estabilizan en distintos estados funcionales. Investigar sobre los receptores térmicos de *Drosophila* podría tener influencia en el desarrollo de compuestos para modular la termotaxis en insectos vectores, articulando estrategias de control de plagas y prevención de enfermedades infecciosas⁽²⁴⁾. En definitiva, este estudio no solo sienta las bases para entender la biología de la percepción térmica en un modelo sencillo y accesible como *Drosophila melanogaster*, sino que invita a considerar futuras preguntas que aborden la interacción estructural y funcional de receptores de temperatura en sistemas más complejos.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Se identificaron patrones de expresión específicos de los receptores ionotrópicos Ir21a, Ir93a, TRPA1 y GR28b en neuronas particulares del sistema nervioso de *Drosophila melanogaster*, destacando su presencia en el DOG. Ir21a mostró una respuesta significativa a la disminución de temperatura, desde 25°C hasta 15°C, lo que sugiere que podría desempeñar un papel esencial en la detección de cambios térmicos, actuando como sensor de disminución de temperatura.

Adicionalmente, se observó que en la estructura de las lamelas de estas neuronas, los receptores Ir21a, Ir25a e Ir93a podrían

interactuar entre sí formando uniones extracelulares. Esta hipótesis se basa en la proximidad estructural estimada entre las proteínas, ya que el ectodomínio de estos modelos presenta una media de 12 nm, resultando compatible con interacciones físicas que faciliten la formación de complejos funcionales entre ellos. Lo anterior sugiere un mecanismo de cooperación molecular en la transducción de señales térmicas, aportando una nueva perspectiva sobre las propiedades de ensamblaje y funcionalidad de los Ir en la detección sensorial de cambios de temperatura.

Como perspectiva futura, el grupo pretende cumplir con el objetivo 1 del trabajo, que implica llevar a cabo un estudio electrofisiológico de las células termosensoriales del órgano dorsal de *Drosophila melanogaster*, que expresan los receptores Ir21a, Ir25a e Ir93a. Este enfoque permitiría caracterizar tanto el potencial transmembrana como las corrientes generadas en respuesta frente a cambios de temperatura, añadiendo un abordaje biofísico sobre las propiedades y mecanismos involucrados en estos fenómenos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- WHO, WH O. A global brief on vector-borne diseases. World Health Organization Geneva; 2014.
- Fleischer J, Pregitzer P, Breer H, Krieger J. Access to the odor world: olfactory receptors and their role for signal transduction in insects. *Cell Mol Life Sci.* 2018;75(3):485-508.
- Sengupta P, Garrity P. Sensing temperature. *Curr Biol.* 2013;23(8):R304-7.
- Ni L, Klein M, Svec KV, Budelli G, Chang EC, Ferrer AJ, et al. The Ionotropic Receptors IR21a and IR25a mediate cool sensing in *Drosophila*. *Elife.* 2016;5.
- Abramson J, Adler J, Dunger J, Evans R, Green T, Pritzel A, et al. Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3. *Nature.* 2024;630(8016):493-500.
- Jumper J, Evans R, Pritzel A, Green T, Figurnov M, Ronneberger O, et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature.* 2021;596(7873):583-9.
- Koon AC, Chan HY. *Drosophila melanogaster* As a Model Organism to Study RNA Toxicity of Repeat Expansion-Associated Neurodegenerative and Neuromuscular Diseases. *Front Cell Neurosci.* 2017;11:70.
- Julius D. TRP channels and pain. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2013;29:355-84.
- Hamada FN, Rosenzweig M, Kang K, Pulver SR, Ghezzi A, Jegla TJ, et al. An internal thermal sensor controlling temperature preference in *Drosophila*. *Nature.* 2008;454(7201):217-20.
- Ni L, Bronk P, Chang EC, Lowell AM, Flam JO, Panzano VC, et al. A gustatory receptor parologue controls rapid warmth avoidance in *Drosophila*. *Nature.* 2013;500(7464):580-4.
- Chiang MH, Lin YC, Wu T, Wu CL. Thermosensation and Temperature Preference: From Molecules to Neuronal Circuits in *Drosophila*. *Cells.* 2023;12(24).
- Knecht ZA, Silbering AF, Ni L, Klein M, Budelli G, Bell R, et al. Distinct combinations of variant ionotropic glutamate receptors mediate thermosensation and hygrosensation in *Drosophila*. *Elife.* 2016;5.
- Hernandez-Nunez L, Chen A, Budelli G, Berck ME, Richter V, Rist A, et al. Synchronous and opponent thermosensors use flexible cross-inhibition to orchestrate thermal homeostasis. *Sci Adv.* 2021;7(35).
- Altner H, Tichy H, Altner I. Lamellated outer dendritic segments of a sensory cell within a poreless thermo- and hygroreceptive sensillum of the insect *Carausius morosus*. *Cell Tissue Res.* 1978;191(2):287-304.
- Schneider ES, Kleineidam CJ, Leitinger G, Romer H. Ultrastructure and electrophysiology of thermosensitive sensilla coeloconica in a tropical katydid of the genus *Mecopoda* (Orthoptera, Tettigoniidae). *Arthropod Struct Dev.* 2018;47(5):482-97.
- Budelli G, Ni L, Berciu C, van Giesen L, Knecht ZA, Chang EC, et al. Ionotropic Receptors Specify the Morphogenesis of Phasic Sensors Controlling Rapid Thermal Preference in *Drosophila*. *Neuron.* 2019;101(4):738-47 e3.
- Rimal S, Lee Y. The multidimensional ionotropic receptors of *Drosophila melanogaster*. *Insect Mol Biol.* 2018;27(1):1-7.
- Jones WD. The expanding reach of the GAL4/UAS system into the behavioral neurobiology of *Drosophila*. *BMB Rep.* 2009;42(11):705-12.
- Fernandez-Chiappe F, Muraro NI. Patch-Clamping Fly Brain Neurons. *Cold Spring Harb Protoc.* 2022;2022(8):Pdb top107796.
- Brand AH, Perrimon N. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development.* 1993;118(2):401-15.
- Zhang J, Zhang M, Wang Q, Wen H, Liu Z, Wang F, et al. Distinct structure and gating mechanism in diverse NMDA receptors with GluN2C and GluN2D subunits. *Nat Struct Mol Biol.* 2023;30(5):629-39.
- Zhao Y, Chen S, Swensen AC, Qian WJ, Gouaux E. Architecture and subunit arrangement of native AMPA receptors elucidated by cryo-EM. *Science.* 2019;364(6438):355-62.
- Tyrrell JJ, Wilbourne JT, Omelchenko AA, Yoon J, Ni L. Ionotropic Receptor-dependent cool cells control the transition of temperature preference in *Drosophila* larvae. *PLoS Genet.* 2021;17(4):e1009499.
- Greppi C, Laursen WJ, Budelli G, Chang EC, Daniels AM, van Giesen L, et al. Mosquito heat seeking is driven by an ancestral cooling receptor. *Science.* 2020;367(6478):681-4.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradecemos a Prof. Adjunto Gonzalo Budelli y Asistente Santiago Sastre, miembros del Departamento de Biofísica por su colaboración e interés, quienes nos proporcionaron su tiempo para desarrollar este proyecto de investigación. En segundo lugar, al Ciclo de Metodología Científica que impulsa a cada estudiante de la Facultad de Medicina la posibilidad de poder aprender a investigar, por lo cual, fueron fundamentales para la elaboración del trabajo.