



RIDAA
Repositorio Institucional
Digital de Acceso Abierto de la
Universidad Nacional de Quilmes



Universidad
Nacional
de Quilmes

Goya, María Eugenia

Estudio de las bases moleculares de los ritmos circadianos en *C. elegans* mediante un sistema reportero luminiscente



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina.
Atribución - No Comercial - Sin Obra Derivada 2.5
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/ar/>

Documento descargado de RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes de la Universidad Nacional de Quilmes

Cita recomendada:

Goya, M. E. (2018). *Estudio de las bases moleculares de los ritmos circadianos en C. elegans mediante un sistema reportero luminiscente. (Tesis de doctorado). Bernal, Argentina : Universidad Nacional de Quilmes. Disponible en RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes <http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/865>*

Puede encontrar éste y otros documentos en: <https://ridaa.unq.edu.ar>

Estudio de las bases moleculares de los ritmos circadianos en *C. elegans* mediante un sistema reportero luminiscente

TESIS DOCTORAL

María Eugenia Goya

eugeniagoya@gmail.com

Resumen

Los ritmos circadianos están basados en relojes endógenos que les permiten a los organismos ajustar su fisiología y comportamiento mediante la sincronización al día solar y, a través de ello, seleccionar el momento óptimo para la mayoría, sino todas, las variables biológicas. Diversos modelos, incluyendo roedores, moscas, hongos, plantas y bacterias han contribuido a conocer los mecanismos de la ritmicidad circadiana. Sin embargo, los principios generales que gobiernan el reloj circadiano del nematodo *Caenorhabditis elegans* han permanecido sin conocerse durante muchos años, excepto por la descripción de algunas variaciones diurnas y circadianas relacionadas con su comportamiento, bioquímica y expresión génica. En este trabajo se describe el desarrollo y aplicación de un sistema bioluminiscente para registrar ritmos circadianos en *C. elegans*, así como las principales características del sistema circadiano del nematodo. Mediante la construcción de un reportero basado en luciferasa acoplado al promotor del gen *sur-5*, se demuestra que *C. elegans* expresa ritmos circadianos con un período cercano a 24 h bajo condiciones ambientales constantes, los cuales pueden ser sincronizados por ciclos duales de luz oscuridad y temperatura, en ensayos poblacionales e individuales. Estos ritmos muestran además compensación por temperatura y son capaces de re-sincronizar después de cambios en la fase de las claves ambientales. Además, los ritmos de luminiscencia pueden ser sincronizados a ciclos más largos o más cortos que 24 h (22 y 26 h) y a ciclos ambientales discontinuos (denominados “ciclos esqueleto”). Finalmente, este trabajo también demuestra que el sensado de luz y la temperatura requiere de las proteínas LITE-1, GUR-3 y TAX-2. Los resultados de la presente tesis aportan información desconocida sobre la biología circadiana de *C. elegans* y demuestran características evolutivamente conservadas en el sistema circadiano del nematodo.

Abstract

Circadian rhythms are based on endogenous clocks which allow organisms to adjust their physiology and behavior by entrainment to the solar day and, in turn, to select the optimal times for most, if not all, biological variables. Diverse model systems – including mice, flies, fungi, plants and bacteria – have shed light on the mechanisms of circadian rhythmicity. However, general principles that govern the circadian clock of the nematode *Caenorhabditis elegans* have remained largely elusive except for the description of a number of diurnal and circadian variations in its behavior, biochemistry and gene expression. This work describes the development and application of a new bioluminescent system to record circadian rhythms in *C.*

C. elegans and demonstrates the main features of the circadian system of the nematode. By constructing a luciferase-based reporter coupled to the *sur-5* gene promoter, we show that *C. elegans* expresses circadian rhythms with a period close to 24 h under constant environmental conditions, which can be entrained by light-dark and temperature cycles, both in population and single-worm assays. These rhythms also showed temperature-compensation and are able to re-entrain after changes in the phase of the synchronizing agents. In addition, the luminescent rhythms can be entrained to cycles longer or shorter than 24 h (22 and 24 h) and to environmental discontinuous cycles (called "skeleton cycles"). Finally, this work also demonstrates that light and temperature sensing requires LITE-1, GUR-3 and TAX-2. The results of the present thesis shed light on *C. elegans* circadian biology and demonstrate evolutionarily conserved features in the circadian system of the nematode.



Estudio de las bases moleculares de los ritmos circadianos en *C. elegans* mediante un sistema reportero luminiscente

Autor: Lic. M. Eugenia Goya

Director: Dr. Diego A. Golombek

Departamento de Ciencia y Tecnología

Universidad Nacional de Quilmes

2016

Trabajo para optar al título de Doctor de la Universidad Nacional de Quilmes

Índice

Resumen	1
Abstract	2
Listado de abreviaturas	3
Agradecimientos	5
Objetivos	10
Objetivos generales	11
Objetivos específicos	11
Introducción general	12
Métodos generales	57
Capítulo I: Desarrollo de un sistema reportero basado en luminiscencia	63
Introducción	64
Materiales y Métodos	81
Resultados	93
Discusión	107
Capítulo II: Aplicación del sistema reportero para estudiar mecanismos de regulación circadiana	114
Introducción	115
Materiales y Métodos	128
Resultados	130
Discusión	145
Capítulo III: Vías fóticas y térmicas involucradas en la sincronización del reloj	142
Introducción	149
Materiales y Métodos	160
Resultados	161
Discusión	171
Capítulo IV: Regulación transcripcional de <i>sur-5</i> y modulación farmacológica de los ritmos de luminiscencia	176
Introducción	177
Materiales y Métodos	188
Resultados	195
Discusión	212

Conclusión general	218
Anexo: Ensayos preliminares del reportero con otros genes de interés	225
Introducción	226
Materiales y Métodos	238
Resultados y conclusiones	245
Bibliografía	257

Listado de abreviaturas

ADNc	ADN complementario
ADNdc	ADN doble cadena
ARNi	ARN interferencia
ARNm	ARN mensajero
bHLH	del inglés, <i>basic-Helix-Loop-Helix</i>
CCG	Gen controlado por el reloj (del inglés, <i>Clock Controlled Gen</i>)
CGC	Centro Genético <i>Caenorhabditis</i> (del inglés, <i>Caenorhabditis Genetics Center</i>)
CK1	Caseína quinasa 1 (del inglés, <i>Casein Kinase 1</i>)
CT	Tiempo circadiano (del inglés, <i>Circadian Time</i>)
DBT	del inglés DOUBLETIME, proteína quinasa de <i>D. melanogaster</i>
DNs	Neuronas dorsales de <i>D. melanogaster</i> (del inglés, <i>dorsal neurons</i>)
FF o CC	Temperatura constante (fría o caliente)
FuDR	5-fluorodeoxyuridina
GFP	Proteína fluorescente verde (del inglés, <i>Green Fluorescent Protein</i>)
GMPc	Guanosín monofosfato cíclico
HMM	Modelo oculto de Markov (del inglés, <i>Hidden Markov Model</i>)
LN_s	Neuronas laterales de <i>D. melanogaster</i> (del inglés, <i>lateral neurons</i>)
LO/FC	Ciclo de luz-oscuridad y temperatura baja-alta.
NGM	Medio de crecimiento de nematodos (del inglés, <i>Nematode Growth Medium</i>)
OO/CC	Oscuridad y temperatura alta constante
OO/FF	Oscuridad y temperatura baja constante
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés, <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PDF	Factor dispersor de pigmentos (del inglés, <i>Pigment Dispersing Factor</i>)
PRC	Curva de respuesta de fase (del inglés, <i>Phase response curve</i>)
PRX	Peroxirredoxina
RHT	Tracto retino-hipotalámico (del inglés, <i>Retinohypothalamic tract</i>)
RT-PCR	PCR de transcripción reversa (del inglés, <i>reverse transcription PCR</i>)
s-LN_v	Neuronas laterales ventrales pequeñas de <i>D. melanogaster</i> (del inglés, <i>small ventral LN</i>)
toc1	Gen reloj de <i>Arabidopsis thaliana</i> (del inglés, " <i>timing of cab1 expression</i> ")

TSS	Sitio de inicio de transcripción (del inglés, <i>Transcription Start Site</i>)
TTFL	del inglés <i>transcription-translation feedback loop</i>
UNDL	Unidades normalizadas de luminiscencia sin la tendencia (<i>detrended</i> , inglés)
URL	Unidades relativas de luminiscencia
UV	Ultra-Violeta
WT	Salvaje (del inglés, <i>wild-type</i>)
YFP	Proteína fluorescente amarilla (del inglés, <i>Yellow Fluorescent Protein</i>)
ZT	Tiempo del <i>Zeitgeber</i> (del inglés, <i>Zeitgeber Time</i>)

Agradecimientos

Esta es probablemente la parte más difícil de la tesis, porque involucra sacar afuera muchos recuerdos, sentimientos y emociones que he ido recopilando durante estos años de trabajo en el laboratorio. Es difícil saber por donde empezar, pero voy a tratar de no olvidarme de ningún detalle.

Quiero dedicar esta tesis especialmente a mi abuelo Antonio, que aunque ya no esté en este mundo, fue y será una persona inolvidable para mí, un abuelo insuperable y un compañero de aventuras y sobretodo un gran impulsor de ideas. Mi abuelo fue para mí el mejor inventor que vaya a conocer y la persona que probablemente despertó en mí el gusto por romper y desarmar, experimentar, probar y divertirse. Nunca me voy a olvidar de las horas que pasábamos armando cosas de todo tipo en su taller todo desordenado y lleno de porquerías, y el amor con cual siempre respondía ante cualquiera de nuestra locuras con nuestros primos. La casa de los abuelos Goya fue siempre un espacio único de esparcimiento y un lugar donde siempre todo era posible, solo había que darse un poco de mañas y tener ganas de crear. Gracias eternamente abuelo, ¡siempre vas a estar en mi corazón!

En segundo lugar, quiero agradecer con el alma a mi mamá y a mi papá, que fueron, son y serán la fuerza mas grande de propulsión de mi vida y los que siempre nos impulsaron a soñar en grande y a dedicarnos a lo que realmente amáramos, mas allá de cualquier cosa que pudiera pasar en el futuro y de tener que soportar que a la larga nos fuéramos a vivir lejos (perdón por el posdoc).

Mamá, gracias por haber descubierto en mí la vocación por investigar, y por haberme impulsado a anotarme en el club de ciencias de la escuela en Entre Ríos cuando estaba terminando la primaria (aunque papá te rompiera con que me ibas a convertir en una nerd jaja). Desde ese momento ya todo pasó a segundo plano, y las horas en el laboratorio de la escuela se hicieron cada vez más largas y más apasionantes. Gracias por enseñarnos a ser exigentes y dar todo de nosotras, a veces te ibas un poco a la mierda, pero después de grande te empezamos a comprender un poco mas.

Papá, gracias por bancarme siempre en todas las aventuras de las ferias de ciencias, por ayudarme a construir la primera trampa de mosquitos automática y por acompañarme en la Goyaneta durante las largas jornadas de muestreos por el campo. ¡Cómo olvidarme del aparatoso panel que me ayudaste a armar con fierros para mostrar mi primer poster en la

feria de internacional en Estados Unidos! (que parecía el baúl de un muerto jaja), con el cual casi me deportan al país por cargamento peligroso... Y gracias por las largas charlas sobre ciencia y biotecnología, por el interés en lo que hacemos y por ser tan curioso (y por hacer a veces preguntas que realmente me hacen pensar mas que las de muchos científicos que conozco).

Gracias a los dos por apoyarme desde un inicio cuando decidí estudiar una carrera científica, aunque no entendieran bien qué iba a hacer, y por agarrar el auto y acompañarme a recorrer universidades de varios lados del país. Gracias por bancarme toda la carrera y por romperse el lomo para que pudiera venir a estudiar a Buenos Aires, aunque tuvieran mucho miedo por lo que generaba la gran ciudad. Gracias por apoyarme y apoyarnos siempre, en las buenas y en las malas, y por estar incondicionalmente atrás del teléfono para cualquier cosa que necesitemos. A ustedes le debo gran parte de lo que soy, y no hubiera podido saltar el charco y llegar tan lejos sin su apoyo incondicional. ¡Los quiero muchísimo!

Quiero agradecerle especialmente a la mejor hermana del mundo (y no porque sea la única que tengo), que siempre me ayudó cuando la necesité y me dio una palabra de apoyo cuando me sentía desorientada. Gracias Flor por estar presente cada vez que fue importante para mí. Aunque estemos lejos por razones profesionales siempre vamos a estar cerca, y siempre vamos a ser unidas no importa lo que pase. ¡Te quiero mucho hermanita!

Andre, mi compañero, mi confidente, mi psicólogo, mi amigo, mi referencia científica, mi amor incondicional, te quiero agradecer por lo invaluable que hiciste por mí durante estos 7 años que caminamos juntos. Gracias por ayudarme a ser mejor en todos los aspectos de mi vida, por bancarme en las peores situaciones personales, cuando todo estaba muy difícil y no podía encontrar el rumbo. Gracias por creer siempre en mí y por impulsarme siempre a mejorar. Gracias por ayudarme a crecer como ser humano y por hacerme entender que no todos ven las cosas de la misma manera. Gracias por hacer cualquier cosa por mí, aunque eso signifique sacrificar algo que tenías pensado. Gracias por todo el apoyo que me brindaste especialmente durante estos últimos años, cuando la cosa se puso muy difícil para mí. Sos la mejor persona que podría haber encontrado para compartir mi vida, y tengo que agradecer al laboratorio por haberme dado la oportunidad de conocerte y de formar esta familia tan hermosa que tenemos. Espero que siempre sigamos caminando juntos y bancándonos en nuestros proyectos personales y profesionales. ¡Te amo mucho!

Quiero mencionar también a una persona muy especial para mí, mi profesora de biología del secundario y la directora del club de ciencias de la escuela, quien despertó mi amor por esta rama de la ciencia y sembró en mí las primeras inquietudes científicas. Gracias Graciela Minhondo por todo los años que compartimos juntas y por dar conmigo los primeros pasos en esta actividad tan apasionante.

Ahora toca el turno de Cronobiología, este laboratorio desordenado, *hippie*, desastroso y por momentos insoportable pero inevitablemente adorable en el que he trabajado durante 7 años. Crono es una gran familia, y no estoy diciendo nada original, y es un laboratorio único desde muchos sentidos, del cual me llevo experiencias de todo tipo. Gracias a los ex y a los actuales Crono: Juli, Lea, Santi, Pato, Nati, Juan, Flaco, Sergio, Jose, Lu, Lucho, Agus, Anas, Sole, Meli, Nacho, Laux2, Male, Charly, Ivi, Fer, Fer2 y Andre, por los momentos divertidos compartidos, por hacer algunos *overnights* mas amenos, por los consejos científicos y no tan científicos, y por generar ese ambiente de trabajo súper relajado y divertido (a veces se van al carajo, pero bué). Quiero agradecer especialmente a Lucho por haber formado parte de mi grupo de trabajo durante los primeros años y por haberme soportado como guía y haberme enseñado a compartir un proyecto; a Meli, por haber aceptado formar parte del futuro de la línea, que construimos con muchos esfuerzo y muy de abajo, y por haberme bancado durante estos últimos meses caóticos; a Sole, con la cual compartimos muchas cosas dentro y fuera del labo y siempre está dispuesta a dar una mano para lo que cualquiera necesite; a Fer2, una persona muy especial para mí y con cual pegamos onda enseguida en el laboratorio; a Ivi, con la cual compartimos muchos momentos buenos y malos durante el último tiempo, y largas horas de charlas, y a Charly, por el apoyo constante durante las crisis de estadística y los carteles de error de Matlab, y por aportar muchísimo al grupo desde su visión de Ingeniero-Magister-Futuro Doctor (puse todos tus títulos, y son muchos).

Quiero agradecer también especialmente a mis amigos de la universidad, Sabri, Fer y Fede, con quienes compartimos los mejores años como estudiantes, transitamos la mayor parte de la carrera juntos y vivimos momentos inolvidables, de los que me guardo muchos recuerdos. Y también a toda la gente de los pasillos de la UNQ, con la que diariamente se comparte alguna que otra charla corta, un mate, un consejo experimental y un saludo. ¡Gracias a esta hermosa Universidad por haberme dado la oportunidad de estudiar gratuitamente y formarme tan bien como profesional y por ayudarme a seguir creciendo

durante mi doctorado! (¡y a CONICET por pagarme el sueldo y por permitirme vivir de lo que me gusta!). Y también gracias a todos los científicos de afuera de la UNQ que de una u otra manera me ayudaron con mi trabajo, mis experimentos, el *paper* y la tesis: especialmente a Marcelo Yanovsky, Fernanda Ceriani, Pablo Schwarzbaum, Cora Álvarez, Alejandro Colman-Lerner, Sergio Simonetta, Andrea Thackeray, Cassie Blanchette, Anagha Kulkarni, y a muchos otros mas que seguramente me estoy olvidando.

Me queda agradecerte a vos Diego, por muchísimas cosas. Primero, por haberme invitado a formar parte del grupo cuando yo todavía no tenía idea de qué iba a hacer de mi vida, y por haberme dado la libertad de diagramar totalmente el proyecto, aun cuando era absolutamente arriesgado y tenía altas chances de fracaso por donde se lo mirara. Gracias por ser uno de los primeros que confió plenamente en mí, y aunque fuimos conociéndonos un poco a los ponchazos y tuvimos y tenemos nuestras diferencias, te agradezco por seguir apoyándome y nunca bajar los brazos (porque sé que soy difícil). Gracias por la increíble oportunidad de haberme permitido irme afuera durante el doctorado, una experiencia que me marcó para siempre y fue genial en todo sentido. Gracias por enseñarme a escribir un *paper*, aunque me costara mucho al principio. Gracias también por reconocerme siempre los logros y por ser generoso conmigo. Gracias por el apoyo personal en los peores momentos que pasé en el laboratorio, es algo que voy a valorar siempre. Y gracias por la ayuda con la búsqueda de nuestro futuro trabajo. Espero que el proyecto siga creciendo, aunque esté lejos, y que nos volvamos a encontrar en el camino científico en algún momento.

Quiero agradecer a mi segunda familia, Silvia, Berti, Vero y Pablo, por el apoyo que siempre nos brindan con todas las cosas y por saber entender cuando pegamos el faltazo a algún asado o comida familiar por el trabajo. Gracias Berti por el amor que nos das, por mandarnos comida cuando estamos tapados de trabajo y ¡por las mejores humitas y empanadas tucumanas del mundo!. Gracias Silvia por ayudarme con cosas personales y por tus consejos para mi carrera científica. ¡Los quiero mucho!.

También quiero agradecer a mis amigas, las de mi casa de allá y las de mi casa de acá: Manu, Vero, Flor, Eli, Sol, Pame, Eri, Jose de Concordia y Mir y Sole de acá. Gracias por ser mi cable a tierra, por los momentos de relax compartidos, por las noches de fiesta, por los mates y las charlas distendidas, por apoyarme siempre y por hacer mi vida más feliz. ¡Las quiero mucho!.

Por último, quiero agradecer a una persona muy especial para mí, que conocí durante mi estadía en Estados Unidos y que me ha apoyado incondicionalmente desde entonces en todo sentido. ¡Gracias Clarita!, por haberme dado la oportunidad de ir a tu labo sin casi conocerme y ayudar a la ciencia latinoamericana siempre, por haberme enseñado muchas cosas sobre el modelo, por haber compartido conmigo charlas muy profundas y haberme guiado durante estos últimos años y por haber sido esencial para encontrar mi trabajo postdoctoral. Te agradezco de todo corazón por todo lo que hiciste y hacés por mí, y espero que nuestra colaboración científica y nuestra relación de amistad sigan creciendo en el futuro.

Objetivos

“Good science cannot proceed without a deep emotional investment on the part of the scientist. It is that emotional investment that provides the motivating force for the endless hours of intense, often grueling, labor”.

— Evelyn Fox Keller. *A Feeling for the Organism*, 1983

Objetivos generales

- Desarrollar un sistema reportero basado en luminiscencia para medir expresión génica *in vivo* y en tiempo real en el nematodo *Caenorhabditis elegans*.
- Estudiar mecanismos y propiedades fundamentales de los ritmos circadianos del nematodo mediante la aplicación del sistema reportero.
- Elucidar posibles vías fóticas y/o térmicas involucradas en la sincronización del reloj circadiano de *C. elegans*.

Objetivos específicos

- Generar por ingeniería genética constructos que expresen una proteína reportera basada en los dos mecanismos de bioluminiscencia existentes en la naturaleza: el sistema procariota *lux*, proveniente de *Vibrio harveyi* y el sistema eucariota *luc*, de *Photinus pyralis*.
- Desarrollar un método para medir expresión génica con el reportero en tiempo real, *in vivo* y por períodos largos de tiempo.
- Aplicar el reportero basado en luminiscencia para estudiar la regulación circadiana de la expresión génica del gen *sur-5* bajo diferentes ciclos ambientales.
- Analizar las propiedades fundamentales del sistema circadiano del nematodo.
- Evaluar mecanismos de sincronización del reloj central en líneas transgénicas mutantes deficientes en el sensado de luz y/o temperatura.
- Generar por microinyección líneas transgénicas estables de nematodos bioluminiscentes bajo el control de promotores de genes de interés para futuros estudios de regulación transcripcional.

Introducción

General

Reseña histórica de los ritmos biológicos

La evolución ha moldeado y refinado a todos los seres vivos hasta su forma actual. Durante más de tres mil millones de años, todos los organismos de este planeta han experimentado que el sol sale y se esconde cada día a causa de la rotación de la Tierra alrededor de su propio eje y han ido perfeccionando su bioquímica para sacar provecho de este conocimiento. Adaptaciones a diferentes ambientes tales como el mar, el bosque o las montañas produjeron la evolución de aletas, alas o patas y permitieron que las criaturas pudieran conquistar nuevos territorios. Así, no es sorprendente que los organismos se adaptaran a los ciclos naturales en las variables ambientales y encontraran de esta manera nuevos nichos ecológicos vacantes, no en términos de espacio, sino de tiempo. Se desarrollaron entonces animales nocturnos, diurnos o crepusculares, todos viviendo bajo el mismo hábitat, pero activos a diferentes momentos del día, lo cual les permitía coexistir, aprovechando mejor los recursos y evitando eventuales predadores.

Los primeros seres humanos también deben haber notado los cambios periódicos, y seguramente hayan sido plenamente conscientes de las variaciones en el mundo en que vivían. Sus propios patrones de sueño-vigilia, la apertura y cierre de las flores con el ciclo lumínico, y hasta las temporadas altas y bajas en los cultivos pueden haber sido ejemplos de ello. Quizás el hecho de que estos cambios fueran tan obvios sea la razón por la cual no atrajeran prácticamente la atención de los primeros científicos, hasta la llegada de Aristóteles. En un fragmento de “La historia de los animales” del 350 antes de Cristo, el filósofo y científico griego relataba por primera vez que los insectos cesaban de volar y de alimentarse después del atardecer cuando se ponía el sol, pero que incluso si les acercaba una vela encendida seguían durmiendo profundamente. Sin embargo, pasaron más de 2000 años hasta que se hizo el primer intento experimental para explicar la verdadera naturaleza del fenómeno descrito por Aristóteles (Daan 2010).

Estrictamente hablando, cualquiera de estas observaciones podrían haber sido el resultado de una respuesta directa a las constantes variaciones de la luz o la temperatura, pero esta conclusión no podía explicar que la mayoría de los organismos mantuvieran su mismo horario de actividad aún en ausencia de señales ambientales. Este fenómeno endógeno, conocido como “ritmo circadiano” (del latín *circa diem* o “cerca de un día”) se conoce desde hace cientos de años y fue descrito por primera vez en la planta *Mimosa*

pubica, en la cual De Mairan observó que las hojas se extendían y retraían a lo largo del día (De Mairan 1729). Sin embargo, el astrónomo fue un paso más allá y colocó la maceta dentro de un armario dentro del cual no llegaba la luz solar. Para su sorpresa, las hojas de la *Mimosa* se seguían moviendo, con lo que demostró por primera vez que los ritmos circadianos eran capaces de mantenerse incluso en ausencia de señales temporales del ambiente. Más tarde, otros estudios demostraron que los movimientos de las hojas en la oscuridad no respondían a cambios en la temperatura ambiente (Duhanel Du Monceau 1759) y que su período en libre curso o “*free running*” era muy cercano, pero no exactamente igual a 24 horas (De Candolle 1832). En 1866 William Ogle, trabajando con humanos, midió la temperatura corporal y determinó su ascenso antes del despertar, y su paulatino descenso al atardecer durante la vigilia. Como este ritmo no parecía depender ni del ciclo sueño-vigilia ni de factores ambientales, Ogle concluyó que era producido por variaciones periódicas en las funciones orgánicas (en Golombek 2007).

En 1900, Hugo von Buttel-Reepen encontró que las abejas eran capaces de aprender la hora del día en la que las flores producían néctar y polen. Diez años más tarde, en 1910, Forel describió un comportamiento similar en el que las abejas eran capaces de recordar y acercarse todo los días a la misma hora a su mesa del desayuno. Este concepto de memoria temporal o *zeitgedächtnis*, fue extensamente estudiado en aquella época y se planteó que estaba de alguna manera relacionado con la secreción de néctar y polen de las flores y que las abejas forrajeaban solamente cuando dicha secreción alcanzaba su pico máximo durante el día (Lehmann, et al. 2011).

Sin embargo, el concepto de “reloj endógeno” era todavía muy difícil de comprender para aquella época y muchos científicos aún cuestionaban si los ritmos persistentes bajo las denominadas condiciones constantes no eran un mero reflejo en realidad de fallas técnicas para excluir todas las señales latentes del ambiente que eran imposibles de eliminar en los laboratorios de esos tiempos. A fines de la década del 40, el muy respetado científico alemán Gustav Kramer observó que las aves migratorias requerían de una especie de brújula solar para volar hacia el norte, y razonó que para poder usar este punto de referencia continuamente móvil y volar en una dirección fija, debían tener necesariamente *eine biologische Uhr*: un reloj biológico (Dunlap, et al. 2004). El término “reloj biológico” rápidamente reemplazó la vaga noción de fenómeno endógeno y le otorgó el verdadero sentido a esta entidad fisiológica precisa de los organismos vivos. Este descubrimiento fue

acompañando por el fuerte indicio de que también las abejas tenían un mecanismo endógeno para estimar el tiempo, cuando Renner mediante un experimento transoceánico en el cual trasladó abejas sincronizadas de París a Nueva York en avión, observó que las mismas todavía seguían buscando alimento con el huso horario francés (Lehmann, et al. 2011). Estas observaciones tuvieron un gran impacto e inspiraron a muchos otros investigadores de la época, quienes comenzaron a considerar la idea de los ritmos circadianos como relojes y a ahondar más en las propiedades de estos relojes que parecían tener suficiente precisión ante la variabilidad externa.

Entre los científicos sorprendidos por los trabajos con las aves migratorias aparece el famoso británico Colin S. Pittendrigh, quien se convertiría en uno de los fundadores de la cronobiología moderna. En 1950, Pittendrigh se trasladó a la Universidad de Princeton y focalizó su investigación en los ritmos de eclosión de la mosca *Drosophila melanogaster*. Entre los numerosos descubrimientos que se le atribuyen, se encuentra por ejemplo la independencia térmica de la frecuencia de eclosión en condiciones de *free running*. Esta propiedad, más tarde conocida como “compensación por temperatura” fue rápidamente confirmada en muchos otros organismos y es considerada hoy en día como una de las principales características de los ritmos circadianos.

En la misma época, Jurgen Aschoff, médico alemán y profesor en Heidelberg, demostró por primera vez que la descendencia de ratones crecidos por varias generaciones en luz constante aún mostraba ritmos robustos de actividad diaria, a pesar de la ausencia de un ciclo de luz-oscuridad durante su desarrollo. Con observaciones similares pero realizadas en pollos, donde el huevo se desarrollaba adentro del útero en ausencia total de luz, Aschoff demostró que no era necesaria una experiencia previa a un ciclo de luz- oscuridad para desarrollar ritmicidad.

En 1958, Aschoff conoce a Pittendrigh en Princeton y, dos años mas tarde, llevan a cabo en 1960 la primera reunión de la historia de la Cronobiología moderna, en Cold Spring Harbor, donde reunieron a científicos de distintos campos y presentaron las visiones generales y propiedades fundamentales del análisis de la ritmicidad circadiana en experimentos de comportamiento. Juntos, propusieron la visión de que los ritmos circadianos son ubicuos, y siguen reglas generales, remarcando que cualquier sistema podría contribuir al campo en cuestión e inspirando a investigadores de muchas disciplinas.

Sin embargo, la pregunta fundamental acerca de cómo se generaban estos ritmos no fue respondida hasta fines del siglo pasado e involucraba la idea de la existencia de un mecanismo interno capaz de sincronizar el tiempo biológico con el tiempo externo, de naturaleza heredable. A comienzos de 1970, Seymour Benzer y su alumno Ron Konopka estaban trabajando con la mosca de fruta *Drosophila melanogaster* y observaron después de una mutagénesis química que algunas moscas mostraban un comportamiento circadiano anormal en la eclosión de la pupa. Pudieron aislar tres cepas bien diferenciadas, una con período de eclosión inusualmente largo (29h), otro con un período corto (19h) e incluso una tercera que había perdido completamente los ritmos de eclosión. Más tarde se descubrió que la mutación responsable de ese fenotipo se hallaba dentro del mismo locus de un gen localizado en el cromosoma X. Este gen fue posteriormente llamado “*period*”, y los mutantes designados como *period*^{Long}, *period*^{Short} y *period*⁰¹. De esta manera se dio a conocer el primer “gen reloj” de la historia de la cronobiología (Konopka y Benzer 1971). Numerosos genes reloj fueron descritos con el correr de los años y trascendió que *period* no era exclusivo de *Drosophilidae*, sino muy conservado entre roedores, el pez cebra y humanos.

Propiedades de los ritmos circadianos

La coordinación temporal de procesos biológicos internos, tanto entre sí como con ciclos ambientales externos, es crucial para la salud y la supervivencia de todos los organismos, desde bacterias a humanos. Esta coordinación es orquestada por un reloj interno, el cual controla a los ritmos circadianos de expresión génica y a las actividades biológicas resultantes.

Durante los últimos años, el funcionamiento del sistema circadiano se ha estudiado a nivel molecular, celular y fisiológico en una serie de organismos modelo, incluyendo las cianobacterias *Synechococcus* (Dong oro 2008), el hongo *Neurospora crassa* (Dunlap et al. 2007), la planta *Arabidopsis thaliana* (Harmer 2009), la mosca *Drosophila melanogaster* y el ratón *Mus musculus* (Weber, 2009). El clásico, aunque más bien simplificado, modelo de un sistema circadiano se muestra en la Figura 1 y comprende tres componentes básicos: un componente exógeno o *input*, que hace referencia a las vías de entrada, conocidas como *Zeitgebers* o “dadores de tiempo”; un reloj biológico o *pacemaker* que consiste básicamente en un oscilador molecular; y los ritmos biológicos o *outputs*, es decir, las vías de salida del

reloj. Sin embargo, los diversos componentes interactúan entre sí, pudiendo los ritmos biológicos retroalimentar la actividad del reloj central o los componentes exógenos afectar directamente a los ritmos de salida, pasando por alto al reloj, en un fenómeno conocido como enmascaramiento o *masking* (Mrosovsky 1999).

El oscilador central puede recibir directa o indirectamente claves ambientales que le permiten sincronizarse con el ambiente externo y transferir información temporal a las vías de salida, para regular la expresión rítmica de genes controlados por el reloj (conocidos por sus siglas en inglés, *ccg*) y finalmente las funciones fisiológicas tales como la temperatura corporal, el ciclo sueño-vigilia, la alimentación, etc. Existen varios factores ambientales que actúan como sincronizadores que armonizan a las neuronas del oscilador central forzando la periodicidad del reloj circadiano a adoptar la 24 horas del ambiente (Dunlap, et al. 2004). La luz, temperatura, el alimento, las señales sociales (Levine, et al. 2002) e incluso el magnetismo terrestre (Gegear, et al. 2008) pueden influir en el reloj circadiano, siendo la luz solar el *input* más importante para la mayoría de los organismos.

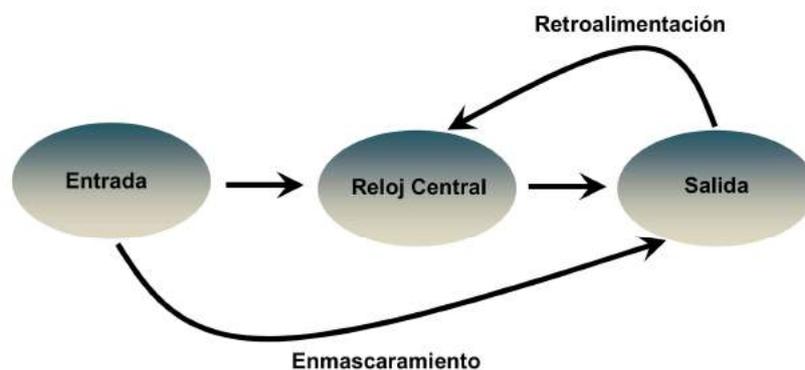


Figura 1| Esquema del sistema circadiano, el cual está compuesto por tres componentes principales: el oscilador central, dedicado a generar y sostener los ritmos, recibe e integra señales de las vías de entrada o sincronizadores y controla las vías de salida o los ritmos biológicos.

Tal como se mencionó anteriormente, se puede definir como ritmo *circadiano* a cualquier variable fisiológica que presenta una variación a lo largo del día con un período cercano a 24 horas. Los ritmos cuyas frecuencias son mayores son llamados *ultradianos* (por ejemplo el ritmo cardíaco o el respiratorio); aquellos de menor frecuencia son llamados *infradianos* (tales como la hibernación o el ciclo menstrual). Para poder caracterizar, cuantificar y analizar a los ritmos en el laboratorio, se utilizan una serie de parámetros

específicos: *período* (simbolizado con la letra griega tau, τ), la *amplitud* y la *fase*. El *período* se define como el intervalo de tiempo entre dos sucesos idénticos, lo que equivale a la duración de un ciclo; la *amplitud* es la distancia entre el valor medio y el valor máximo que alcanza la variable, y la *fase* hace referencia al momento del ciclo temporal en que está situada al variable en estudio, es decir, un punto arbitrario dentro del ciclo (por ejemplo el pico) con respecto a un evento fijo (por ejemplo, el comienzo del día) (Figura 2) (Golombek 2002; Dunlap, et al. 2004).

Otras definiciones muy utilizadas en cronobiología tienen que ver con los ciclos que se emplean para sincronizar al reloj de los organismos en condiciones de laboratorio. Durante la fase cíclica del entrenamiento, por ejemplo bajo un ciclo de luz/oscuridad de 12h : 12h, el momento de encendido de la luz se define como ZT0, por "*Zeitgeber time*" o dador de tiempo. De esta manera, en un ciclo de 12 horas de luz/ 12 horas de oscuridad donde la luz se prende a las 9 am hora reloj, este momento correspondería a ZT0, mientras que las 9 pm o momento de apagado de la luz correspondería a ZT12. Cuando el organismo es dejado en condiciones constantes o de *free-running*, que en este ejemplo correspondería a estar bajo oscuridad constante, el organismo mostrará ritmos de la variable en análisis de acuerdo al tiempo interno del reloj, ya que se encuentra en completa ausencia de claves ambientales. Normalmente, bajo esta fase constante, el período deja de ser exactamente igual a 24 horas y se hace ligeramente más largo o más corto de acuerdo a la regulación circadiana de la variable en estudio. En este caso, el tiempo se define entonces como CT, de las siglas en inglés "*Circadian time*" y se utilizan los términos día subjetivo y noche subjetiva, para hacer referencia a las fases respectivas de día y noche que el organismo esperaría encontrar si aún estuviera bajo el esquema de entrenamiento cíclico previo. Durante la condición de *free-running*, también se analiza si la fase del ritmo en estudio se mantiene en un horario cercano con respecto a la fase previa de sincronización. Aquí vamos a introducir y discriminar dos términos de la jerga circadiana que, según lo definimos específicamente en este trabajo, serán de utilidad para la presente tesis. Si un ritmo circadiano mantiene la fase que exhibía mientras estaba bajo condiciones de un *Zeitgeber* cíclico hablaremos de un *entrenamiento* a las condiciones ambientales. Por el contrario, si el ritmo muestra una fase clara bajo el ciclo ambiental, es decir, una *sincronización* al "*Zeitgeber*", pero luego la fase cambia abruptamente al liberar el organismo en condiciones constantes, estamos en presencia del fenómeno de *enmascaramiento* o "*masking*" previamente mencionado.

Por otro lado, para que un proceso biológico pueda ser definido como circadiano debe cumplir al menos tres propiedades fundamentales (Figura 2):

- Un patrón rítmico que se repita con una periodicidad cercana a las *24 horas*, incluso en ausencia de señales ambientales, lo que se conoce como período de libre curso o "*free-running*".

- *Sincronización* del ritmo en una manera dependiente del tiempo mediante claves ambientales, tales como un ciclo de luz/oscuridad o de variación de temperatura. De esta propiedad se desprende además la capacidad de los ritmos circadianos conocida como *reseteo de fase*, la cual establece que la fase del ritmo puede ser modificada por cambios en las señales externas, tales como pulsos de oscuridad durante la fase de noche subjetiva o día subjetivo. Además, esta propiedad es la que explica la respuesta que se observa cuando se somete a un organismo a un esquema de "*jet-lag*" o desincronización forzada por cambios abruptos en el ciclo de sincronización. Por ejemplo, en un cambio de huso horario simulado en el laboratorio en un roedor por un retraso del momento del encendido de la luz o alargamiento de la noche, el reloj del animal tarda algunos días en recuperarse y volver a re-entrenar a las nuevas condiciones ambientales.

- El período del ritmo biológico evaluado bajo condiciones de *free-running* debe ser relativamente constante ante cambios de temperatura que se encuentren dentro del rango fisiológico del organismo. Esta propiedad, conocida como *compensación por temperatura*, es de suma importancia y hace referencia a la capacidad de amortiguación que posee el sistema circadiano para compensar cambios en la velocidad de las reacciones bioquímicas con la temperatura. Dicho de otra manera, refleja la capacidad homeostática del sistema circadiano que le permite a cualquier organismo mantenerse relativamente inmutable frente a cambios abruptos en el ambiente. Esta propiedad se evalúa mediante el coeficiente Q_{10} , el cual permite conocer cuánto varía la velocidad de una reacción en un rango de 10°C y debe ser cercano a 1 para considerar que el proceso biológico es independiente de la temperatura (Harmer, et al. 2001).

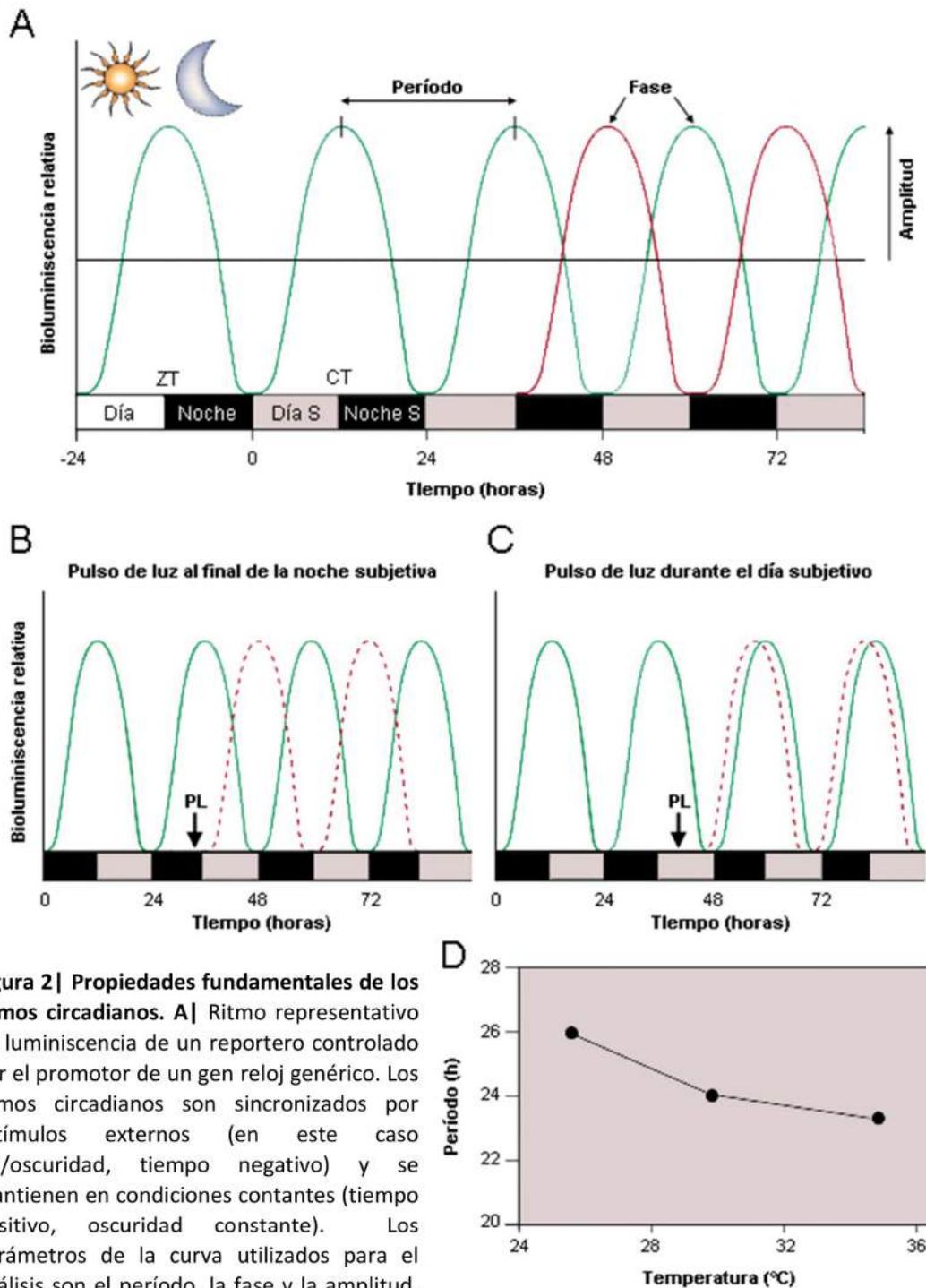


Figura 2 | Propiedades fundamentales de los ritmos circadianos. A | Ritmo representativo de luminiscencia de un reportero controlado por el promotor de un gen reloj genérico. Los ritmos circadianos son sincronizados por estímulos externos (en este caso luz/oscuridad, tiempo negativo) y se mantienen en condiciones constantes (tiempo positivo, oscuridad constante). Los parámetros de la curva utilizados para el análisis son el período, la fase y la amplitud. Las barras blancas indican la fase de luz y las negras la oscuridad (ZT), mientras que con gris y negro se representa el día y la noche subjetiva, respectivamente (CT). **B |** La fase de un ritmo puede ser reseteada por el mismo estímulo con el cual fue sincronizado. Por ejemplo, un pulso de luz al final de la noche subjetiva provoca un avance de fase, mientras que el mismo pulso de luz durante el día subjetivo tiene un efecto casi despreciable. **C |** El período de los ritmos circadianos es compensado por temperatura y se mantiene cerca de las 24 horas dentro de un rango fisiológico para el organismo. Adaptado de Golden y Canales, 2003.

Organismos modelo y *outputs* del reloj

A lo largo de la introducción, se han ido mencionando diferentes organismos utilizados como modelo para el estudio de la cronobiología. Algunos de ellos fueron protagonistas de los primeros descubrimientos que dieron lugar a esta disciplina y fueron esenciales para el estudio de cuestiones mecanísticas básicas que rigen el funcionamiento de la mayoría de los relojes. Y, lo que es más importante, algunos de estos organismos resultaron ser indispensables como herramientas para llegar a estos descubrimientos, porque ofrecieron en su momento - y aún lo siguen haciendo - características específicas ventajosas por sobre otros organismos. Es importante remarcar que la cronobiología es una ciencia compleja y de múltiples variables, por lo que contar con organismos que ofrecieran fenotipos claros y fácilmente apreciables en un primer momento y, más adelante en el tiempo, simplicidad y facilidad de manipulación genética, fue esencial para lograr el éxito de muchas de las investigaciones fundacionales. En esta sección se describirá brevemente a algunos de los organismos de mayor relevancia en cronobiología, así como también qué ofrece cada sistema modelo en términos de métodos no invasivos o automáticos para poder medir ritmos diarios.

Uno de los organismos modelo más importante en la historia de la cronobiología es, sin duda, la mosca del vinagre *Drosophila melanogaster* (Ashmore y Sehgal 2003). Se trata de un insecto muy pequeño, con un ciclo de vida corto que tarda en condiciones óptimas alrededor de dos semanas en completarse; asimismo son muy fecundos, ya que una hembra puede poner cientos de huevos fertilizados durante su vida (alrededor de un mes). Es el organismo en el cual casi se identificaron por primera vez casi todos los genes principales del reloj, tales como *per* y *tim*. Dos características fundamentales pueden ser las responsables de este hecho: la primera, su fácil manipulación genética y crianza en el laboratorio debido a su pequeño tamaño y su rápida reproducción, y segundo, la robustez de varias actividades fisiológicas circadianas fácilmente medibles sin la necesidad de demasiada tecnología. Los ritmos de eclosión de la mosca adulta desde la pupa fueron de gran importancia en los inicios de los estudios cronobiológicos de Konokpa y Benzer en 1970, por la ventaja de que este evento ocurría al amanecer en moscas *wild-type* y era fácilmente medible. Sin embargo, se trataba de un ensayo circadiano poblacional, el cual generaba miles de eclosiones cada 24 horas, difíciles de seguir en simultáneo, incluso en condiciones constantes, por lo que

resultaba muy engorroso como método para genotipar numerosas moscas individuales. Por esta razón, pronto se estableció el auge de los ensayos de actividad locomotora para el *screening* de moscas sometidas a mutágenos, en los que era posible registrar el movimiento de muchas moscas individuales al mismo tiempo en un espacio reducido y con costos relativamente bajos; así se hallaron patrones de reposo y actividad, incluso homologables a ciclos de sueño y vigilia tal como se pueden observar en humanos (Rosato, et al. 2006).

Su genoma totalmente secuenciado y la gran capacidad de mapeo de mutaciones, conjuntamente con la automatización del registro locomotor (Figura 3) y de eclosión para realizar *high-throughput screenings*, permitieron establecer las pautas genéticas que determinan los ritmos circadianos en *D. melanogaster*, y descubrir más tarde que las bases moleculares del reloj de los invertebrados mostraba similitudes remarcables con la de los mamíferos. Asimismo, el hallazgo de las neuronas laterales encargadas de controlar el ritmo locomotor en las moscas permitió descubrir que esta homología no era tan sólo a nivel genético, sino también fisiológico (Panda, et al. 2002b). La cantidad de factores cronobiológicamente conectados funcionando dentro de este insecto comprenden actualmente un ejemplo cada vez más sobresaliente de versatilidad génica, donde la actividad multifacética de estos genes y las complejas interacciones entre ellos resultan en la determinación global de la forma y la función (Hall 2005).

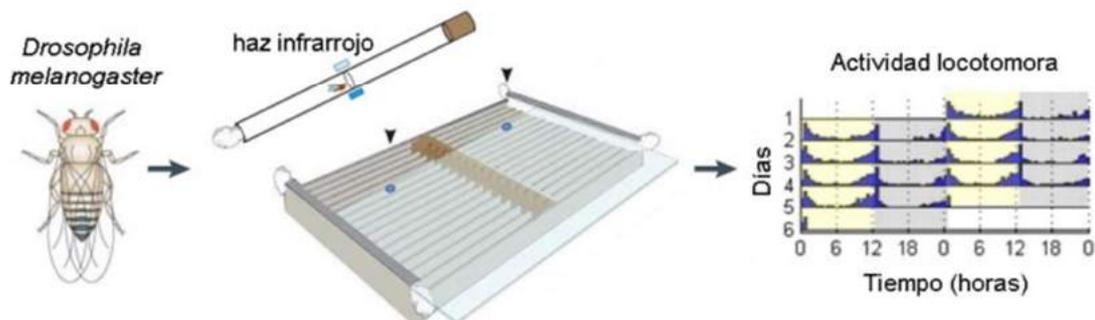


Figura 3| Registro de actividad locomotora en *D. melanogaster*. Una única mosca adulta es colocada dentro de un tubo de vidrio que posee comida en un extremo y algodón para cerrar el otro. Un haz de luz infrarroja atraviesa el medio del tubo y un colector conectado a una computadora puede grabar y contar la cantidad de veces que la mosca atraviesa el haz infrarrojo. De esta manera, muchos tubos de vidrios con moscas en su interior son colocados en los sistemas de registros dentro de incubadoras con condiciones controladas de luz y temperatura y registradas automáticamente durante días en una computadora. El resultado se grafica como bloques de actividad (sombra azul) en orden cronológico a lo largo del eje Y, durante las 24 horas diarias en el eje X con un doble ploteado para dar mayor claridad. En amarillo y gris se muestran los días y noches subjetivas respectivamente. Imagen adaptada de Gilestro, 2012.

Entre los vertebrados, el ratón común (*Mus musculus*) y el hámster dorado o Sirio (*Mesocricetus auratus*) son los organismos más extensamente utilizados en el estudio de los ritmos circadianos. El primer roedor mutante de un gen reloj se descubrió por casualidad en 1988, cuando Martin Ralph y Michael Menaker, mientras registraban la actividad locomotora en rueda de numerosos hámsters dorados en condiciones de *free-running*, descubrieron una mutación natural que hacía que unos de sus animales tuviera un período de actividad locomotora mucho más corto (22 h en heterocigosis vs 24 h del hámster *wild type*) (Ralph y Menaker 1988). La variante natural fue denominada mutación *tau* y muchos años más tarde se descubrió que el gen afectado codificada para la caseína quinasa 1 epsilon (CKIε) (Lowrey, et al. 2000). En 1994, Joe Takahashi y colaboradores describieron el primer ratón mutante del gen *clock*, mediante un *screening* de mutantes de actividad locomotora (Vitaterna, et al. 1994), que fue clonado e identificado recién en 1997 (Antoch, et al. 1997). Esta fue la única vez registrada donde el estudio de roedores se adelantó a los resultados de genes circadianos que se encontraron en moscas. El gen *clock* mutado afectaba el período de los roedores en *free-running* (lo alargaba) y causaba una pérdida de amplitud de los ritmos bajo condiciones ambientales constantes.

El registro de actividad locomotora de roedores corriendo en una rueda bajo ciclos de luz:oscuridad (LD) y oscuridad constante (OO) es el *output* cronobiológico más utilizado desde los inicios en mamíferos para estudiar ritmos comportamentales y uno de los más robustos y fiables (Figura 4). Además, tiene la ventaja de también poder automatizarse y por ende resulta ideal para hacer *screening* de mutantes, aunque los costos y el espacio requerido para ensayos *high-throughput* no son tan accesibles como al trabajar con invertebrados.

Los roedores pequeños resultaron ser modelos muy útiles para estudios de cronobiología, y la ventaja principal reside quizás en su propia naturaleza mamífera, y por ende, en la posibilidad de comprender fenómenos cronobiológicos en un modelo que se asemejan mucho en complejidad a los seres humanos (Dunlap, et al. 2004). La posibilidad de determinar ritmos de temperatura corporal, de alimentación, de secreción hormonal, ritmos metabólicos y en de expresión génica robusta de manera individual, son ejemplos de ello. Además, con el paso de los años, su genoma completamente secuenciado, su relativamente corto período de gestación (de 19 a 21 días) y la posibilidad de poder realizar genética reversa son algunas de las características terminaron de convertir a estos roedores

como organismos modelo en cronobiología, así como también en otras áreas de investigación (Ko y Takahashi 2006).



Figura 4| Registro de actividad locomotora en *Mus musculus*. Un ratón adulto es colocado dentro de una jaula especialmente diseñada con una rueda que permite registrar de manera automática la cantidad de vueltas que realiza el animal al correr en la rueda diariamente. Estas jaulas son colocadas bajo condiciones controladas de luz y temperatura, con alimento y agua y se registra la actividad automáticamente durante días bajo condiciones de El resultado se grafica en un actograma, como una pila vertical de bloques de actividad en orden cronológico a lo largo del eje y (representado en negro), durante las 24 horas diarias en el eje X con un doble plotado para dar mayor claridad. Las barras blancas y negras representan luz y oscuridad, y las grises oscuridad constante. Imagen adaptada de <http://www.agnthos.se/>.

El hongo filamentoso *Neurospora crassa* es un organismo modelo que ha sido extensamente caracterizado cronobiológicamente. Esto se debe tanto a la posibilidad de poder registrar fácilmente su comportamiento circadiano, como así también a la existencia de técnicas moleculares y genéticas para su estudio. Se trata de un hongo clasificado dentro del *Phylum Ascomycota* y está ampliamente distribuido en la naturaleza (Baker, et al. 2012). El hongo se encuentra comúnmente en su estado vegetativo creciendo como micelio de hifas haploides pero posee un ciclo dual de reproducción sexual y asexual. Ante ciertas señales, los micelios cambian su desarrollo y empiezan a formar hifas aéreas que se segmentan en esporas asexuales llamadas macronidias. Estos conidios son de color naranja brillante característico debido a los pigmentos carotenoides y su proceso de producción está controlado por el reloj circadiano y alcanza su máximo justo antes del amanecer (Baker, et al. 2012). El método que comúnmente es utilizado para poder estudiar este comportamiento consiste en cultivar a los hongos en un tubo de vidrio, que permite visualizar la producción de conidios que se forman en un patrón lineal hacia abajo (Loros y Dunlap 2001). Este ensayo muy simple es capaz de reportar la actividad del reloj de manera muy robusta y ha

permitido la realización de *screenings* de mutantes que identificaron muchos de los componentes del reloj circadiano central y por lo tanto ha contribuido a nuestra comprensión del mecanismo básico detrás de todos los ritmos circadianos (Figura 5).

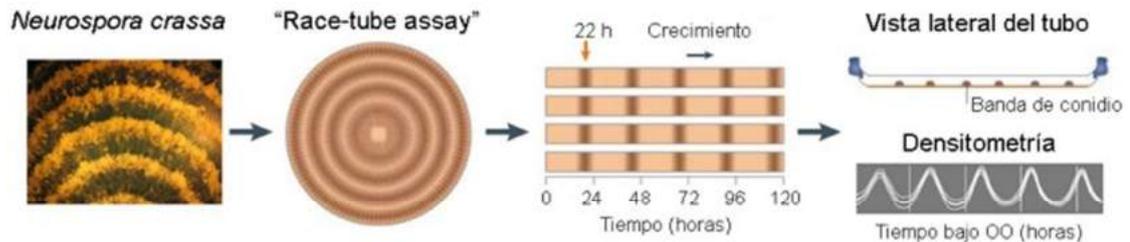


Figura 5| Ensayo de crecimiento de conidios en tubo en *Neurospora crassa*. En el hongo, la producción de esporas asexuales está bajo el control de reloj biológico. Este proceso de conidiación se puede medir utilizando una cámara de crecimiento especializada denominada *race tube* en inglés, que consiste en tubos de vidrio que contienen medio de cultivo inoculado en uno de los extremos con el hongo, y dejados en condiciones de luz constante y temperatura controlada. Después de 24 horas, los tubos son colocados en oscuridad constante (OO) para sincronizar el reloj de los hongos y los micelios van creciendo hacia abajo a una tasa semi-constante. El período de conidiación está determinado por el tiempo que transcurre entre dos bandas de conidios sucesivas, lo que se analiza mediante una densitometría de una fotografía del ensayo real. Este simple ensayo permite analizar la regulación circadiana sobre el desarrollo del hongo. Imagen adaptada de Golden y Canales 2003; Price-Lloyd, et al. 2005.

Entre las plantas, la dicotiledónea *Arabidopsis thaliana* es el organismo modelo más utilizado para el estudio de ritmos circadianos. Las plantas han jugado un rol histórico importante en el estudio de los ritmos circadianos, que comenzó con las observaciones del movimiento de las hojas de la *Mimosa* en oscuridad constante (De Mairan 1729). Además de los ritmos morfológicos, las plantas exhiben numerosas oscilaciones circadianas a niveles fisiológicos y moleculares. Procesos tan diversos como el movimientos de las hojas (Figura 6), la elongación del tallo, la apertura y el cierre de estomas, germinación, actividad fotosintética y apertura de flores, la tolerancia al estrés y muchas actividades enzimáticas están bajo el control circadiano (Barak, et al. 2000). La mayoría de estos ritmos conocidos están ahora fuertemente vinculados a oscilaciones robustas en la expresión génica en la mayoría de los organismos, fenómeno que fue caracterizado por primera vez con un estudio de todo el genoma en las plantas (Harmer, et al. 2000). Aunque los ritmos morfológicos de las plantas son muy robustos y observables a simple vista, a diferencia de lo que pasa en otros organismos modelo, no son adecuados para realizar *high-throughput screenings*, por lo

que la era molecular de la cronobiología en plantas se retrasó hasta la década de 1990, cuando gracias al desarrollo de un reportero basado en el gen de la luciferasa se crearon fusiones promotor::luciferasa que permitieron a los investigadores monitorear simultáneamente ritmos en la expresión de genes en tiempo real e *in vivo* en miles de plantas individuales (Millar, et al. 1992). Este enfoque dio lugar a la identificación del primer mutante del reloj en *Arabidopsis*, correspondiente al gen *toc1* (por las siglas en inglés “*timing of cab1 expression*”) (Millar, et al. 1995a; Millar, et al. 1995b). Sin embargo, *Arabidopsis* se estableció luego muy rápido como sistema modelo para el estudio de ritmos circadianos y, gracias principalmente al uso de la luciferasa como gen reportero no invasivo, rápidamente se recuperó el tiempo perdido en relación a otros modelos.



Figura 6| Ensayo de movimiento de hojas en *Arabidopsis thaliana*. En las plantas, uno de las salidas mas robustas y mas estudiadas del reloj es el movimiento de hojas a lo largo del día. En este caso, plántulas de 10 días de vida son colocadas en una incubadora bajo condiciones de luz constante, y se obtienen imágenes de las mismas cada 1 h durante por alrededor de 7 días de registro. Luego, estas imágenes son procesas y se grafica el ángulo de apertura las hojas en función del tiempo circadiano (LL), a partir de lo cual se estima el período y la fase de los ritmos. Imagen adaptada de <http://www.bio.sci.osaka-u.ac.jp/>.

Finalmente, también existen organismos procariotas que son estudiados en cronobiología, entre los cuales las cianobacterias se encuentran entre los organismos modelo. Algunas de sus características son su pequeño tamaño genómico, la facilidad con la que pueden ser manipuladas genéticamente (Golden y Sherman 1984; Elhai y Wolk 1988), y la disponibilidad de vectores para estudios genéticos y moleculares (Golden y Sherman 1983). Actualmente se sabe que muchas especies poseen un sistema circadiano que controla su metabolismo y ciclo de división celular (Golden, et al. 1997; Wijnen y Young 2006). Como los “comportamientos” bacterianos son básicamente microscópicos y moleculares, el descubrimiento de los ritmos bacterianos vino cientos de años después de lo que se conoce

sobre organismos macroscópicos. De hecho, la noción prevalente a mediados de los 80 era que los procariontes, por su corta vida útil y por no poseer estructuras unicelulares definidas, no tendrían ningún motivo ni recursos aparentes para organizar su metabolismo en base a un sistema circadiano de 24 h. Debido a esto fue una gran sorpresa encontrar que cianobacterias unicelulares de la especie *Synechococcus elongatus* alternaban la fijación de nitrógeno con la fotosíntesis de acuerdo a un reloj circadiano interno (Huang, et al. 1990).

Para que las cianobacterias sean reconocidas como organismos modelo para la investigación circadiana, fue necesario entonces el desarrollo de ensayos adecuados y sistemas genéticos que permitieran llegar a investigar el mecanismo molecular de estos relojes y se aprovecharon entonces muchas de las técnicas que ya habían sido desarrolladas para otros sistemas circadianos. El uso de reporteros luminiscentes fue esencial para el estudio del reloj de estos organismos, ya que *Synechococcus elongatus* es muy fácil de manipular genéticamente, y transcribe su genoma con un ritmo circadiano muy robusto, lo cual es muy sencillo de analizar y registrar con el registro automático de bioluminiscencia usando procedimientos similares a los adaptados para otros organismos modelo (Golden y Canales 2003) (Figura 7).

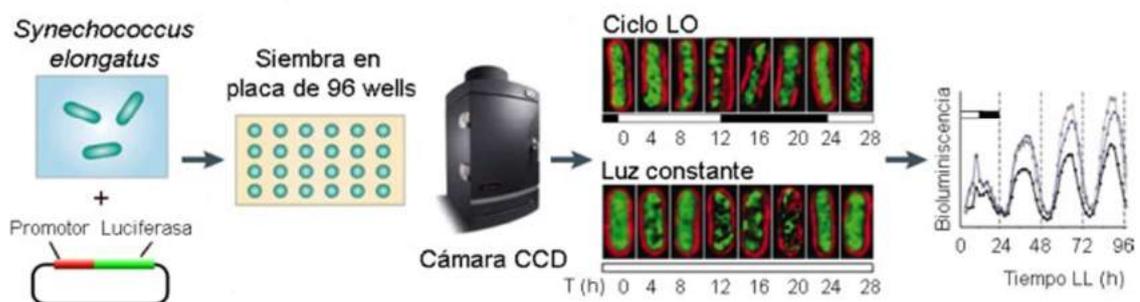


Figura 7] Registro de luminiscencia en *Synechococcus elongatus*. En cianobacterias y en otros organismos modelo, la transcripción génica se monitorea *in vivo* y en tiempo real mediante la fusión de un promotor de un gen circadiano de interés con un gen reportero tal como el codificante para la enzima luciferasa de *Photinus pyralis*. Las cianobacterias transgénicas son sembradas en placas de 96 wells y la emisión de bioluminiscencia es registrada a distintos tiempos mediante fotografías con una cámara CDD bajo condiciones controladas de luz y temperatura. Los ritmos resultantes son analizados en un gráfico donde se puede ver la variación de la cantidad de luminiscencia con el tiempo en condiciones constantes (en este caso luz continua), lo cual permite analizar parámetros como período o fase de la expresión del gen en estudio, en múltiples cepas de manera simultánea, por ejemplo en cianobacterias que presentan mutaciones en distintos componentes del reloj. Imagen adaptada de Golden y Canales, 2003; Smith y Williams, 2006.

Organización del sistema circadiano

Anatómicamente, la organización del sistema circadiano es muy diferente de acuerdo a la complejidad de los diversos organismos. En organismos unicelulares, tales como la cianobacteria *Synechococcus elongatus*, el sistema circadiano está obviamente basado en oscilaciones moleculares a nivel de cada célula individual (Golden y Canales 2003).

En mamíferos, el reloj central está conformado por un pequeño grupo de neuronas en el hipotálamo del cerebro que forman una región denominada núcleos supraquiasmáticos (NSQ), los cuales sincronizan a distintos osciladores periféricos en tejidos tales como el hígado, el corazón o riñones (Green et al., 2008). En este caso, la luz es captada por los fotorreceptores de la retina y llega al SCN a través del tracto retino-hipotalámico, mediante el neurotransmisor glutamato, el cual activa a los receptores de las neuronas del reloj iniciando una cascada de eventos que finalizan con un cambio de fase del reloj (Golombek 2007) (Figura 8A). Entonces, en el modelo más simplificado del sistema circadiano de mamíferos, los NSQ controlan las fases de todos los relojes periféricos, con la excepción de los osciladores semiautónomos ubicados en el bulbo olfatorio (Granados-Fuentes, et al. 2004).

Drosophila melanogaster también presenta un oscilador central ubicado en el cerebro (Figura 8B), que está conformado por alrededor de 300 neuronas clasificadas como neuronas laterales (LNs) y neuronas dorsales (DNs) por su posición anatómica. Un subgrupo de neuronas laterales llamadas neuronas laterales ventrales pequeñas (s-LNv) son probablemente el *cluster* más importante en la red circadiana: producen el neuropéptido PDF (de sus siglas en inglés *Pigment-dispersing factor*), el cual es esencial para dispersar los ritmos y sincronizar a las diferentes clases de neuronas del reloj. El oscilador del cerebro controla distintos comportamientos rítmicos a distancia; por ejemplo, un grupo de neuronas s-LNvs de cada hemisferio es necesario y suficiente para la coordinación de los ritmos de actividad locomotora en adultos (Grima, et al. 2004). Además, se ha encontrado que las neuronas principales del oscilador del cerebro son capaces de controlar a al menos dos osciladores periféricos, con lo cual desempeñarían estrictamente la función de *pacemaker* central: a) el oscilador no-autónomo en la glándula protorácica, que regula el ritmo de eclosión de pupa (Myers, et al. 2003), y b) la fase de sincronización del reloj en los oenocitos,

que están involucrados en la síntesis de feromonas sexuales secretadas en la superficie de la cutícula, a través de la señalización vía PDF (Krupp, et al. 2013).

Sin embargo, y diferencia de los mamíferos, donde la luz solo llega directamente al SCN y donde la mayor parte de los *outputs* rítmicos en los osciladores periféricos dependen directamente del reloj central, *Drosophila melanogaster* posee relojes periféricos que pueden ser sincronizados directamente por claves ambientales, dispersados por la cabeza y el cuerpo. Distintos tejidos aislados de moscas, tales como las alas, patas, ojos y antenas poseen osciladores capaces de funcionar de manera autónoma (Bell-Pedersen, et al. 2005). Estos relojes periféricos producen criptocromos que actúan como fotorreceptores de luz azul – además de ser parte del mecanismo de oscilación molecular - y son codificados por el gen *cry*, cuya expresión puede regular a su vez la actividad del oscilador central del cerebro (Nikhil, et al. 2016). Un ejemplo bien estudiado de ritmos controlados únicamente por osciladores periféricos son los ritmos de olfacción en la mosca adulta, donde se ha demostrado que algunas neuronas de la antena que poseen receptores para diferentes olores son necesarias y suficientes para inducir respuestas electrofisiológicas ante estos estímulos (Tanoue, et al. 2004). Resultados similares se han encontrado para el reloj de la probóscide, el cual controla ritmos fisiológicos gustatorios y en los osciladores de los tubos de Malpighi, el órgano renal de las moscas, los cuales oscilan en fase con el reloj central del cerebro pero mediante percepción directa de los mismos estímulos ambientales (Plautz, et al. 1997). De esta manera, el sistema circadiano de *D. melanogaster* está basado en un set de osciladores capaces de actuar como relojes autónomos distribuidos a lo largo de todo el cuerpo, lo cual contrasta con la organización jerárquica estricta del sistema circadiano de mamíferos (Bell-Pedersen, et al. 2005).

En *Arabidopsis thaliana*, inicialmente se demostró que cada célula de la epidermis y del mesófilo de la hoja tiene su propio sistema circadiano autónomo y es capaz de sensor luz de manera independiente (Thain, et al. 2002). Sin embargo, recientemente se ha descubierto también una estructura jerárquica en la organización del sistema circadiano vegetal, donde existen relojes autónomos en el ápice de los brotes que pueden regular a distancia la actividad circadiana de los relojes moleculares en las raíces. De esta manera, las células del reloj del ápice podrían funcionar como el SCN de los mamíferos, emitiendo señales que viajan a través de la vasculatura de la planta hasta la parte inferior de las raíces para sincronizar relojes periféricos distales (Takahashi, et al. 2015).

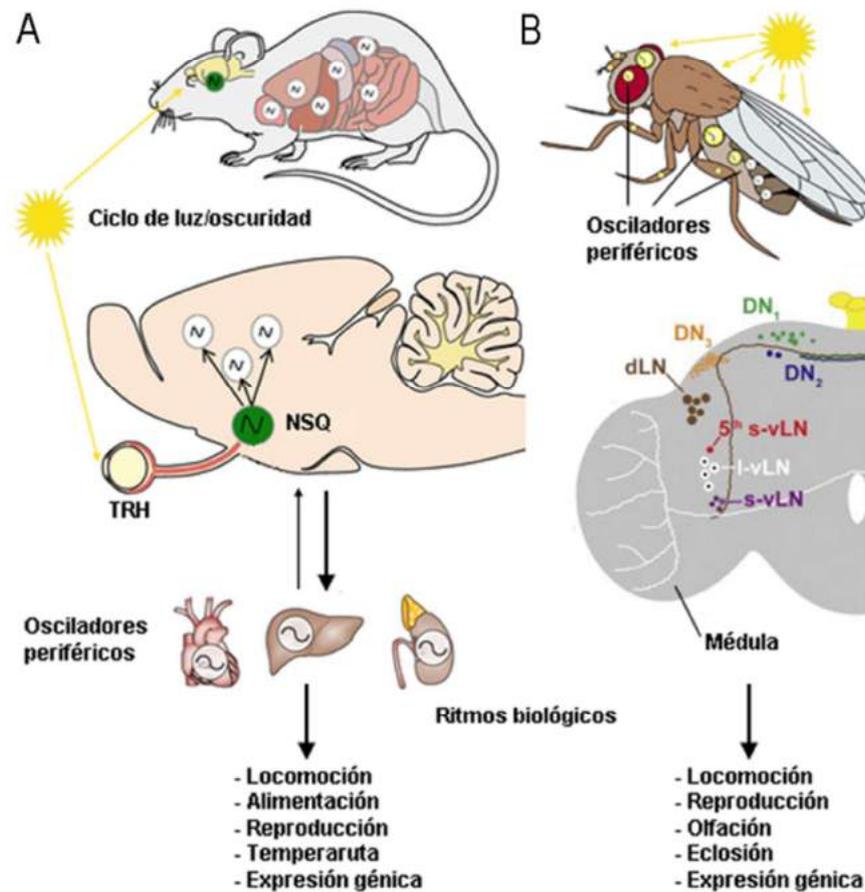


Figura 8 | Organización del sistema circadiano en mamíferos y *D. melanogaster*. **A** | En mamíferos, el sistema circadiano está organizado de una manera jerárquica y consiste en un oscilador central y una serie de osciladores secundarios que dependen directamente de éste para ponerse en hora. El *pacemaker* central está localizado en los núcleos supraquiasmáticos (NSQ), un grupo de neuronas del hipotálamo que recibe información del ciclo luz/oscuridad mediante una proyección directa con la retina (tracto retino-hipotalámico, RHT). Las neuronas del NSQ son sincronizadas mediante estas señales con el ambiente externo y envían señales eléctricas y humorales para sincronizar las fases de otros osciladores locales del cerebro y de relojes periféricos, que se encuentran en otros órganos del cuerpo. Finalmente, el sistema genera como consecuencia ritmos biológicos en diferentes variables tales como metabolismo, secreción hormonal, expresión génica y síntesis de proteínas, y otras actividades fisiológicas. **B** | A diferencia de lo que ocurre en mamíferos, el sistema circadiano de *D. melanogaster* es complejo y menos jerárquico, y consiste en un oscilador central en el cerebro (detallado en la figura gris) y un conjunto de osciladores periféricos autónomos ubicados en distintos tejidos del cuerpo, que pueden funcionar como *pacemakers*, ya que son capaces de sentir luz de manera directa y controlar *outputs* rítmicos (marcados en amarillo). Sin embargo, existen algunos pocos osciladores periféricos no autónomos, tales como el de los oenocitos (marcados en blanco), cuya fase depende directamente del reloj central cerebral, encargado de regular ritmos de salida tales como la actividad locomotora, la eclósión y la reproducción. Muchos otros ritmos circadianos están bajo el control de relojes periféricos no cerebrales, tales como la olfacción, el gusto y la función renal. Finalmente, hay ritmos, tales como la expresión génica circadiana que pueden ser generados y mantenidos en todos los osciladores de la mosca. Imagen adaptada de Tomchik y Davis, 2008; Kondratova y Kondratov, 2012.

Bases moleculares del reloj circadiano

El reloj circadiano es un mecanismo de cronometraje que ha evolucionado para adaptarse a predecir y anticipar cambios asociados con la rotación de la Tierra. El sol no sale ni se pone todos los días del año a la misma hora; los días cortos de invierno tienen un amanecer tardío, mientras que durante los días largos de verano el sol asoma muy temprano. Si el reloj circadiano no fuera flexible para adaptarse a diferentes ambientes o fotoperiodos, no proveería a los organismos de una ventaja adaptativa. Sin embargo, los relojes circadianos han desarrollado mecanismos moleculares sofisticados para reaccionar a pequeños cambios en el entorno (Peschel y Helfrich-Forster 2011).

A pesar de los orígenes filogenéticos diversos y las vastas diferencias en complejidad entre las especies que muestran ritmicidad circadiana, el mecanismo central de todos los relojes circadianos está conformado por al menos un oscilador autónomo interno (Figura 9). Estos osciladores celulares contienen elementos positivos y negativos que forman un *loop* de retroalimentación a nivel transcripcional y traduccional, que es utilizado para generar circuitos de 24 horas (TTFL, *transcription-translation feedback loop*) (Golden y Canales 2003). Los elementos positivos del *loop* son factores de transcripción que se unen a regiones consenso de ADN en el núcleo y activan la transcripción de los llamados “genes del reloj”, que codifican los elementos negativos del sistema. Cuando la concentración de los elementos negativos alcanza un cierto nivel en el citoplasma de la célula, estos translocan al núcleo, se unen a los elementos positivos para inhibir su actividad proteica y de esta manera reprimen su propia síntesis. Aunque en principio solamente un componente en este *loop* debería tener un patrón cíclico de expresión, en todos los relojes descritos hasta ahora todos los elementos negativos y algunos de los elementos positivos ciclan a nivel de ARN mensajero y/o proteína. Además, la concentración de los elementos negativos disminuye gracias a un mecanismo de degradación por fosforilación, lo que lleva a la reactivación de los elementos positivos, permitiendo que el ciclo comience de nuevo (Harmer, et al. 2001).

Los elementos negativos también activan la expresión de uno o más elementos positivos para formar *loops* de retroalimentación interconectados adicionales que son muy importantes para mantener la estabilidad y la robustez del oscilador. Estos eventos imponen retrasos temporales dentro del *loop* de retroalimentación central, de manera que el ciclo molecular toma aproximadamente 24 horas en completarse (Bell-Pedersen, et al. 2005).

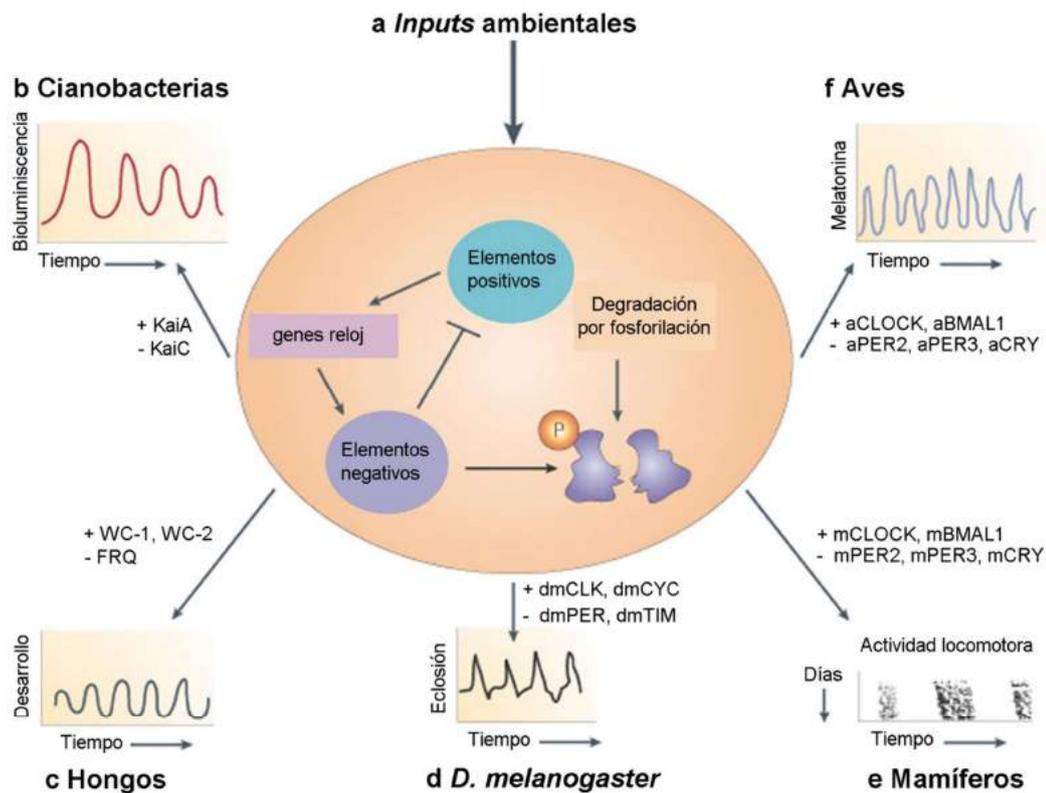


Figura 9 | La base molecular de los osciladores circadianos está conservada en distintos organismos.

a | La mayoría de los sistemas circadianos descritos hasta el momento utilizan un mecanismo basado en uno o más osciladores que están compuestos por elementos positivos y negativos, los cuales forman un *loop* de retroalimentación. En este *loop*, los elementos positivos activan la expresión de los genes reloj, los cuales orquestan río abajo la regulación de distintos *outputs* rítmicos, y además codifican a los elementos negativos del ciclo, que se unen e inhiben a las proteínas de los elementos positivos. La fosforilación de los elementos negativos lleva a su eventual degradación en el citoplasma, permitiendo a los elementos positivos reiniciar el ciclo. Aunque el mecanismo básico es esencialmente el mismo para todos los relojes estudiados, los componentes moleculares varían entre los distintos organismos. En cada caso, se muestran los elementos positivos y negativos (+ ó -) y ejemplos de las actividades fisiológicas que son comúnmente estudiadas en cronobiología en cada organismo. **b |** En cianobacterias como *Synechococcus elongatus*, el *loop* está conformado por KaiA y KaiC y la producción rítmica se mide mediante la fusión de los promotores de genes rítmicos a un gen de luciferasa para supervisar la bioluminiscencia resultante. **c |** En hongos como *Neurospora crassa*, los elementos están conformados por WHITE COLLAR-1 (WC-1), WHITE COLLAR-2 (WC-2) y FREQUENCY (FRQ), y se determina la ritmicidad en el desarrollo de conidiosporas asexuales. **d |** En *Drosophila melanogaster*, dmCLOCK (CLK) y dmCYCLE (CYC), conforman los elementos positivos, mientras que dmPERIOD (PER) y dmTIMELESS (TIM) funcionan como elementos negativos del *loop* y uno de los ritmos más estudiados es el de eclósión o aparición de moscas adultas de su envoltura pupal durante el desarrollo larval. **e-f |** En mamíferos y aves, se encuentran las respectivas CLOCK (CLK), BMAL1, PERIOD (PER) y CRYPTOCHROME (CRY). En los primeros, se pueden registrar ritmos de actividad locomotora de un roedor que corre sobre una rueda. En aves, se utiliza mucho también la determinación diaria de actividades bioquímicas, tales como las de la hormona melatonina, que es la molécula señalizadora de la noche para muchos organismos. Adaptado de Bell-Pedersen, et al. 2005.

El concepto de funcionamiento general de un reloj biológico se puede comparar entonces directamente con el de cualquier reloj analógico tradicional. Dentro de un reloj hay engranajes y resortes que giran y se interconectan, moviéndose a cierta velocidad dentro de una escala temporal que no tiene necesariamente 24 horas, pero sus movimientos colectivos nos permiten medir el tiempo diario. Similarmente, el corazón del reloj circadiano es un oscilador que integra una serie de eventos bioquímicos y modificaciones secuenciales de sus componentes, para producir un *loop* temporal de 24 horas. Las conexiones desde los engranajes hasta las agujas del reloj nos permiten visualizar e interpretar información acerca de la hora del día. De manera similar, las vías de salida del reloj conectan el oscilador circadiano con los comportamientos biológicos que éste controla. Como en un reloj mecánico, el reajuste regular es primordial para sincronizar el tiempo biológico, menos preciso que el movimiento de la Tierra sobre su eje, con el tiempo local. Tal como la corona del reloj permite ajustar la hora hacia adelante o hacia atrás, las vías de entradas del reloj circadiano transmiten la información de avance o retrasos de fases desde claves ambientales, como el amanecer, para reajustar el reloj circadiano (Golden y Canales 2003).

Aunque en principio el mecanismo básico del *loop* transcripcional-traducciona de retroalimentación es considerado el bloque universal de los relojes circadianos (Brown, et al. 2012) y es necesario para generar y mantener los ritmos, el reloj tiene además otros niveles de complejidad. Algunos de los ejemplos son las regulaciones postranscripcionales, tales como el *splicing* alternativo y el control de la estabilidad de los ARNm, controles traduccionales, modificaciones postraduccionales, estabilidad proteica y degradación, remodelación de la cromatina y regulación de la localización intracelular. Estos procesos colectivamente aseguran la periodicidad precisa del reloj, generando pequeños retrasos en los ciclos para que se ajusten aún más a las 24 horas, manteniendo la robustez en la amplitud de los ciclos de transcripción de los componentes centrales que controlan las salidas fisiológicas y amortiguando el sistema contra cambios abruptos en el ambiente. Además, estos mecanismos adicionales de control permiten que el reloj sea reajustado por claves ambientales (Harmer, et al. 2001).

De manera muy simplificada, en mamíferos los elementos positivos están representados por los factores de transcripción CLOCK y BMAL1, los cuales forman durante el día un heterodímero que se une a elementos llamados *E-box* en los promotores de los elementos negativos, para activar su transcripción. PER y CRY se traducen y luego se

acumulan en el citoplasma y cuando la concentración es suficientemente alta, ambas proteínas se unen formando homo o heterodímeros (PER/PER, PER/CRY) que son capaces de translocar de nuevo al núcleo durante el anochecer e inhibir la actividad de CLOCK/BMAL1, reprimiendo de esta manera su propia síntesis. Asimismo, CLOCK/BMAL1 también activan la transcripción de muchos otros genes controlados por el reloj (*crg*, de *clock controlled genes*) generando de esta manera oscilaciones diarias en la cantidad de ARNm y por lo tanto ritmos biológicos en distintas variables fisiológicas. Diversos eventos postranscripcionales ajustan finamente la maquinaria circadiana molecular (Harmer, et al. 2001; Brown, et al. 2012). Por ejemplo, las caseína quinasas 1 epsilon (CK1ε) y delta (CK1δ) cumplen tres roles: 1) marcan monómeros de PER para su degradación; 2) ayudan a traslocar a los dímeros PER/PER y PER/CRY al núcleo; y 3) marcan también a los dímeros para su degradación por fosforilación una vez que han cumplido su rol represor (Ko y Takahashi 2006) (Figura 10).

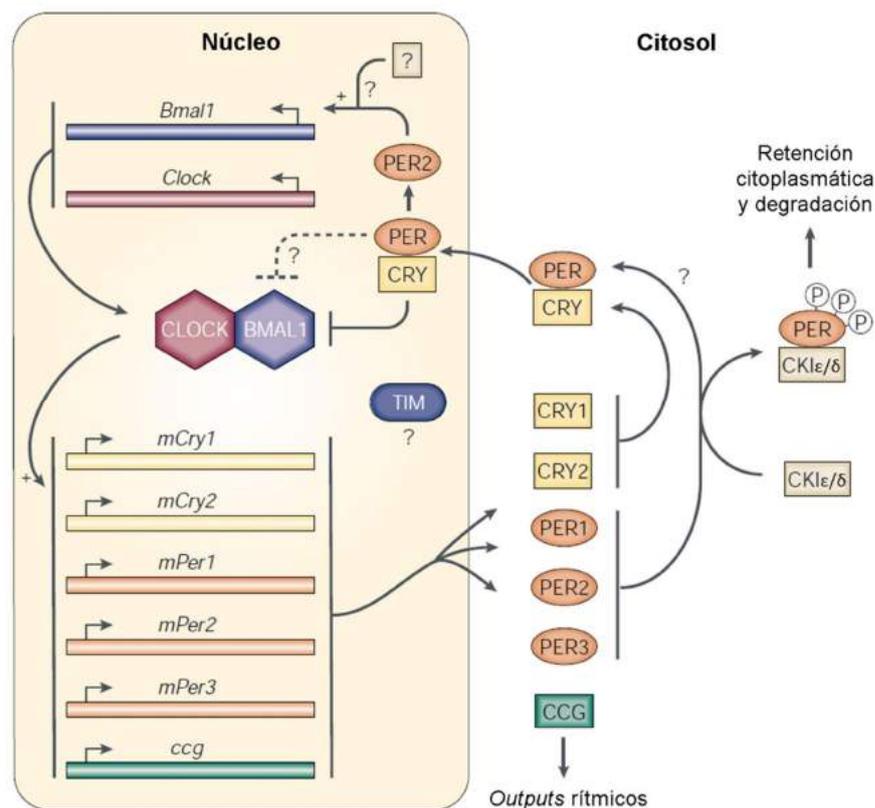


Figura 10| Modelo del mecanismo molecular del reloj circadiano de mamíferos. Al menos dos *loops* de retroalimentación interconectados están involucrados en la generación de los ritmos: un *loop* autoregulatorio negativo de CRY y PER sobre sus propios genes (a través de la inhibición del activador transcripcional CLOCK/BMAL1), y un efecto positivo de PER2 sobre la expresión de *bmal1*. CK1ε/δ regulan la estabilidad y la translocación nuclear de PER. CLOCK/BMAL1 también regulan a los *ccg* y estos a todos los ritmos biológicos circadianos. Adaptado de Cermakian y Sassone-Corsi, 2000.

En *Drosophila*, el proceso es muy similar pero con algunas diferencias en sus componentes. Los elementos positivos CLOCK y CYCLE forman un heterodímero que activa la transcripción de PER y TIM, y de muchos otros genes controlados por el reloj. Los elementos negativos PER y TIM son capaces de formar el heterodímero PER/TIM y de inhibir la actividad de los elementos positivos traslocando al núcleo. Sin embargo, en este caso, CRY - que es un elemento negativo para los mamíferos - actúa principalmente como un fotorreceptor, uniéndose al heterodímero PER/TIM durante el día y mediando la degradación de TIM dependiente de la luz (Ceriani, et al. 1999). Por otro lado, en moscas, PER/TIM regula positivamente la expresión de *clock* solo, mientras que en mamíferos también existe un mecanismo similar, donde PER2 monomérico activa la transcripción de *bmal1*. De esta manera, los genes *clock* en *Drosophila* y *bmal1* en mamíferos oscilan en antifase con los genes *per* (Cermakian y Sassone-Corsi 2000).

El homólogo de CK1ε en las moscas, DOUBLETIME, es el encargado de marcar a los monómeros de PER en el citoplasma. Al comienzo del día, CRY es activado e induce la degradación de TIMELESS en los dímeros PER/TIM, mientras que DBT induce la degradación de PER mediante fosforilación (Claridge-Chang, et al. 2001) (Figura 11).

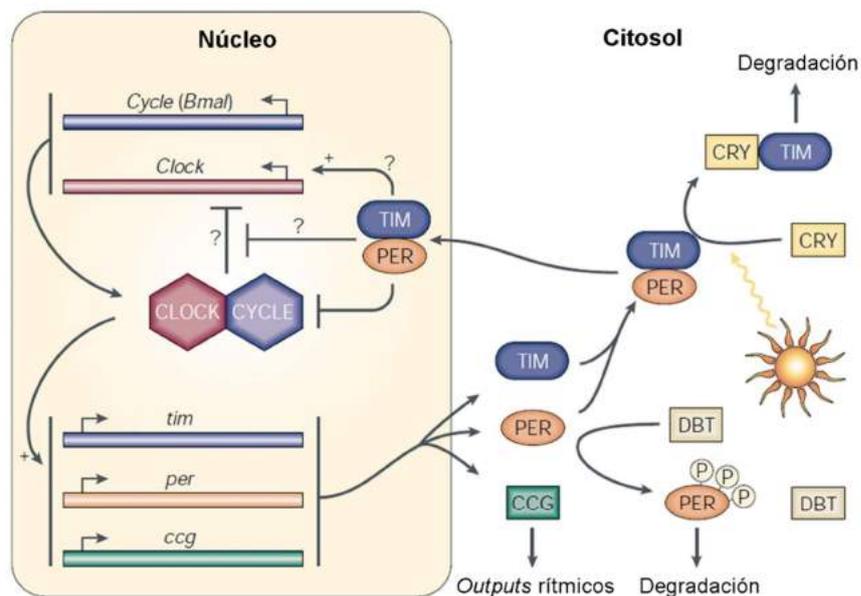


Figura 11| Modelo del mecanismo molecular del reloj circadiano de *Drosophila melanogaster*. Al menos dos *loops* de retroalimentación interconectados están involucrados: un *loop* autoregulatorio negativo de TIM y PER sobre sus propios genes (a través de la inhibición del activador transcripcional CLOCK/CYCLE), y un efecto positivo de estas proteínas sobre la expresión de *clock*. CRY y DBT regulan

la estabilidad de TIM y PER, respectivamente. CLOCK/CYCLE también regulan a los *ccg* y estos a todos los ritmos biológicos circadianos. Adaptado de Cermakian y Sassone-Corsi, 2000.

Como se dijo anteriormente, un prerrequisito esencial para obtener oscilaciones en este *loop* de retroalimentación transcripcional-traducciona negativo es la vida media corta de los ARN y/o las proteínas del oscilador central. Para que esto se pueda llevar a cabo, los mecanismos de degradación juegan un papel crucial para asegurar que los componentes se eliminen rápido después de cierto tiempo. En este sentido, se ha descrito un rol dominante para la caseína quinasa 1 (CK1) en mamíferos (Lee, et al. 2009), *Drosophila melanogaster* (Kloss, et al. 1998; Price, et al. 1998), *Neurospora crassa* (Querfurth, et al. 2011) y *Ostreococcus tauri* (van Ooijen, et al. 2013), aun cuando las proteínas *target* de CK1 no son conservadas. Mutantes de este gen tienen como consecuencia ritmos de actividad locomotora con períodos anormales.

La transcripción rítmica parece ser la base del funcionamiento de los osciladores circadianos en la mayoría de los organismos; sin embargo, no es un requerimiento universal. Estudios recientes demuestran que las regulaciones postraduccionales juegan un rol crítico en el funcionamiento del reloj molecular tanto en procariontas como en eucariotas.

Por ejemplo, en la cianobacteria *Synechococcus elongatus* las oscilaciones en la abundancia de las proteínas del reloj podrían no ser esenciales, incluso para la ritmicidad circadiana básica (Bell-Pedersen, et al. 2005). En este organismo, los genes *kaiA* y *kaiC* actúan como elementos positivos y negativos del *loop* traducciona-transcripcional, respectivamente. En presencia de luz KAI A interactúa con KAI C, lo que estimula la autofosforilación y la formación de un hexámero de KAI C. Al atardecer, KAI B se une al complejo hexamérico de KAI C con KAI A para inhibir la activación de fosforilación mediada por KAI A y finalmente el ciclo termina a media mañana con la disociación de todos los componentes (Figura 12). En un comienzo se pensaba que la fosforilación circadiana de KAI C era estrictamente dependiente de la transcripción de novo de ARNm de KAI B y KAI C. Sin embargo, se demostró recientemente que la fosforilación-desfosforilación circadiana de KAI C persiste incluso en ausencia de transcripción o traducción en las cianobacterias, bajo oscuridad constante o en ausencia de nutrientes, gracias a un mecanismo regulatorio postraducciona interconectado con el TTFL que funciona como un proceso de “memoria de tiempo” para asegurar la robustez del reloj en *Synechococcus*. En este caso, la propia capacidad de autofosforilación y desfosforilación de la proteína KAIC es suficiente para

sostener el circuito oscilatorio mínimo bajo condiciones específicas del ambiente (Tomita, et al. 2005).

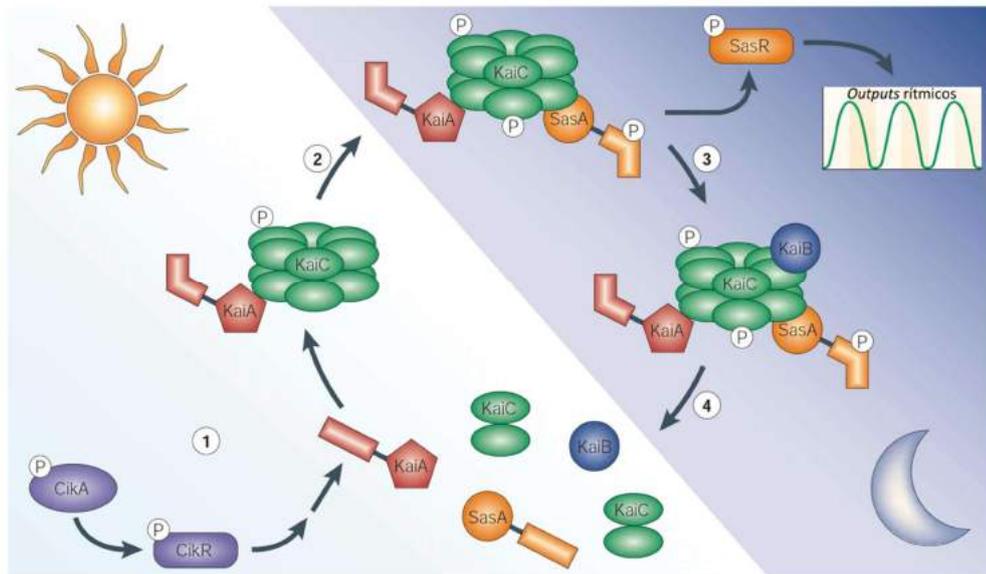


Figura 12| Modelo del mecanismo molecular del reloj circadiano de *Synechococcus elongatus*. La Información del medio ambiente, como la luz y la temperatura, se transduce desde la proteína quinasa de histidina, CikA, a su regulador de la respuesta CikR (1). Esta entrada probablemente continúa a través una vía de transducción de señales que conduce a la proteína receptora de amino-terminal de KaiA. La interacción entre KaiA y KaiC estimula la autofosforilación de KaiC y la formación de un estado hexamérico (2). En la tarde, SasA se une al complejo KaiA / KaiC y KaiC estimula la autofosforilación del SasA, quien transfiere su grupo fosfato una proteína aún no identificada (3). SasR, así como otras proteínas en la vía de salida, transducen la información temporal desde el oscilador a todo el genoma. Mientras tanto, KaiB se une a KaiC al final de la noche para anular el efecto positivo de KaiA en KaiC. A media mañana, el complejo se disocia en sus componentes (4). Los cambios conformacionales de KaiA y SasA que puedan ocurrir como resultado de la transducción de señales están representados por cambios de forma en este modelo.

Adaptado de Golden y Canales, 2003.

De manera similar, se ha demostrado la existencia de mecanismos de regulación postraduccionales a nivel del estado redox de ciertas proteínas en eucariotas, capaces de seguir funcionando incluso en ausencia de actividad transcripcional o transduccionales (O'Neill y Reddy 2011; O'Neill, et al. 2011). En el alga unicelular eucariota *Ostreococcus tauri*, por ejemplo, existe un reloj basado en un TTFL mínimo, que es muy similar al de las plantas, y consiste en un *loop* de retroalimentación negativa central que involucra la expresión en la mañana de CCA1 y durante el atardecer de genes TOC1. Aunque normalmente el TTFL funciona en conjunto con mecanismos postraduccionales para llevar a cabo un control fino del reloj, existe una proteína muy conservada denominada peroxirredoxina, que es capaz de

alternar entre un estado oxidado y otro reducido, incluso en ausencia de transcripción funcional en el alga. Esta proteína está muy conservada entre géneros muy diversos tales como mamíferos (*Mus musculus*), plantas (*Arabidopsis thaliana*), cianobacterias (*Synechococcus elongatus*), algas (*Ostreococcus tauri*), levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*), hongos (*Neurospora crassa*), moscas (*Drosophila melanogaster*), nematodos (*Caenorhabditis elegans*) y humanos. Dado que además se han encontrado ciclos de oxidación diarios en las peroxirredoxinas de todos estos organismos, actualmente esta molécula es considerada un marcador universal de ritmos circadianos, lo que lleva a pensar en un origen ancestral común del reloj en todos los organismos del planeta (Edgar, et al. 2012).

***Caenorhabditis elegans*: un modelo en desarrollo para cronobiología**

Hasta ahora, se han descrito a lo largo de la introducción los fundamentos básicos del reloj circadiano a nivel molecular, las claves ambientales que funcionan como vías de entrada hacia el reloj y la gran versatilidad en las variables de salida que se utilizan para estudiar comportamientos circadianos en los distintos organismos modelo ampliamente empleados en cronobiología. Sin embargo, no se mencionó dentro de esta categoría a nuestro organismo de estudio, el nematodo *Caenorhabditis elegans*. Y no se trata de una cuestión de organización del texto, sino que se fundamenta en el mero hecho de que éste aún no está establecido como organismo modelo para el estudio de ritmos biológicos y de hecho hay muy pocos laboratorios a nivel mundial que se dedican a intentar comprender cómo funciona el reloj en este nematodo. Si bien *C. elegans* es un organismo modelo y uno de los más estudiados en muchas áreas de investigación tales como desarrollo, genética, envejecimiento y neurociencias, la cronobiología en el nematodo comenzó mucho más tarde temporalmente que en otros organismos (los primeros registros datan del 2002), y recién está dando sus primeros pasos. Para intentar comprender porqué se tardó tanto tiempo en estudiar los ritmos en este organismo que ofrece innumerables ventajas y cuáles fueron las razones que llevaron a los primeros fracasos en el área, se describirá primero algo acerca de la morfología, ciclo de vida y ecología, para después ahondar más sobre las bases del sistema nervioso y sobre los registros de ritmos circadianos que se conocen hasta la fecha.

Caenorhabditis elegans es un pequeño nematodo redondo de vida libre que alcanza 1 mm de largo en estadio adulto (Figura 13), cuyo hábitat está siempre asociado al suelo y presenta dos dimorfismos sexuales: macho y hermafrodita.

En el laboratorio, los animales se crecen normalmente en placas de Petri con un medio sólido (NGM) y se alimentan con una pátina de la bacteria *Escherichia coli* (las cepas más utilizadas son la OP50 y la HB101). En las placas, son fácilmente observables con lupa o microscopio de bajo aumento, de manera que no se requiere gran equipamiento para su estudio. Cuando los animales se comen todas las bacterias disponibles, comienzan a utilizar sus reservas de grasa y se produce un arresto del desarrollo larval (llamado larva *dauer*). Se pueden mantener en estas placas hasta por 4 meses a 15°C sin añadirles comida, ya que los *dauer* son altamente resistentes, por lo que los stocks no requieren alimentación constante. Cuando se necesitan animales saludables y metabólicamente activos, un trozo de agar de esta placa vieja se transfiere a una nueva placa con bacterias. De esta manera los animales salen del trozo de agar a explorar la nueva monocapa y se reinicia el desarrollo. A causa de que normalmente los nematodos se encuentran en estado hermafrodita, el cual es capaz de autofertilizarse, un único nematodo puede dar lugar a una población completa.

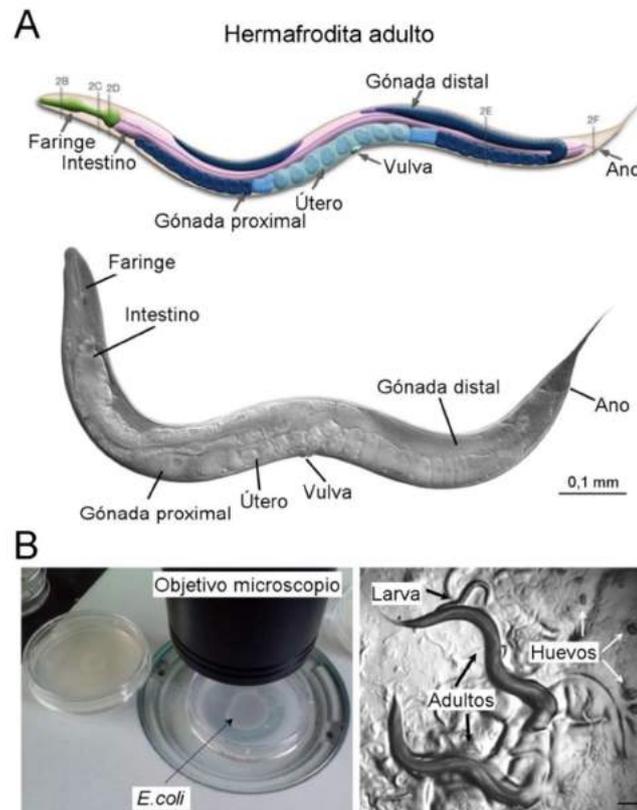


Figura 13| Distintas representaciones del organismo modelo *C. elegans*. **A|** Representación esquemática y foto de microscopía real de Nomarski (DIC) de un adulto hermafrodita N2 (*wild-type*) con su morfología habitual. Se muestran señaladas las partes más relevantes de su anatomía. **B|** Placa de Petri con medio de cultivo NGM normalmente utilizado para el crecimiento de los nematodos con una pátina de *Escherichia coli* en el centro. A la derecha se muestra una foto de microscopía representativa de la observación con un aumento de 10X de una placa que contiene nematodos de la cepa N2 en estadio adulto, embriones y diversos estadios larvales. Barra de escala: 0,1 mm. Adaptada de Corsi, 2015.

El rango de temperatura de crecimiento varía desde los 12 a los 25°C, con un Q_{10} de crecimiento de aproximadamente 2 (es decir, un aumento de 10°C provoca una duplicación en el número de nematodos). La variación de temperatura es una estrategia muy utilizada para controlar entonces la tasa de desarrollo y es muy útil también para el aislamiento y utilización de mutantes sensibles a temperatura. Además, es posible sincronizar el estadio de desarrollo de toda una población tratando a los adultos llenos de embriones con una solución de cloro e hidróxido de sodio, la cual rompe la cutícula de los adultos pero no la de los embriones que son altamente resistentes, permitiendo de esta manera extraer los huevos sin causarles ningún efecto nocivo.

A lo largo de su vida, *C. elegans* atraviesa 4 estadios larvales y un estadio adulto. Una vez puestos los huevos (estadio de gástrula, alrededor de 30 células), los nematodos eclosionan a larvas L1 y luego pasan por los estadios larvales L2, L3 y L4, hasta que se convierten en gusanos adultos, desarrollo que es directamente dependiente de la temperatura (4,5 días a 15°C, 2,5 días a 20°C y 1,5 días a 25°C). Después de aproximadamente 3-4 semanas los adultos mueren, mostrando claros signos de envejecimiento. Cada cambio de estadio larval o muda está marcado por un cambio de cutícula (Cassada y Russell 1975). El ciclo de vida de *C. elegans* depende no sólo de la temperatura, sino también de las condiciones del medio de cultivo. Hacia el final del estadio L2, si las condiciones del medio son desfavorables los nematodos entran en el estadio larval alternativo o *dauer*. Algunos factores del medio ambiente tales como la sobrepoblación (sensado a través de feromonas), ausencia de comida o altas temperaturas, disparan la formación de un estadio larval intermedio, L2d, que es morfológicamente diferente al estadio L2. La larva L2d tiene el potencial de transformarse en *dauer* o en larva L3 dependiendo de la persistencia de las señales desfavorables del medio ambiente (Riddle 1997). Una vez que las condiciones ambientales son nuevamente óptimas, pueden continuar su desarrollo, pasando al estadio de larva L4 directamente (Figura 14).

Entre las numerosas ventajas que posee como *C. elegans* como organismo modelo se pueden nombrar (Wood 1988; Riddle 1997; Kiontke y Sudhaus 2006):

- Pequeño tamaño, por lo que se pueden crecer en espacios reducidos sin mayores exigencias (cabén alrededor de 4000 nematodos en estadio adulto en una placa de Petri con una pátina bacteriana)
- Tiempo de generación corto, de alrededor de 4 días a 20°C.
- Existen tanto machos como hermafroditas, lo cual es ideal para hacer cruzamientos fácilmente entre cepas mutantes.
- Alta progenie, cada hermafrodita adulto pone alrededor de 300 huevos a lo largo de su vida.

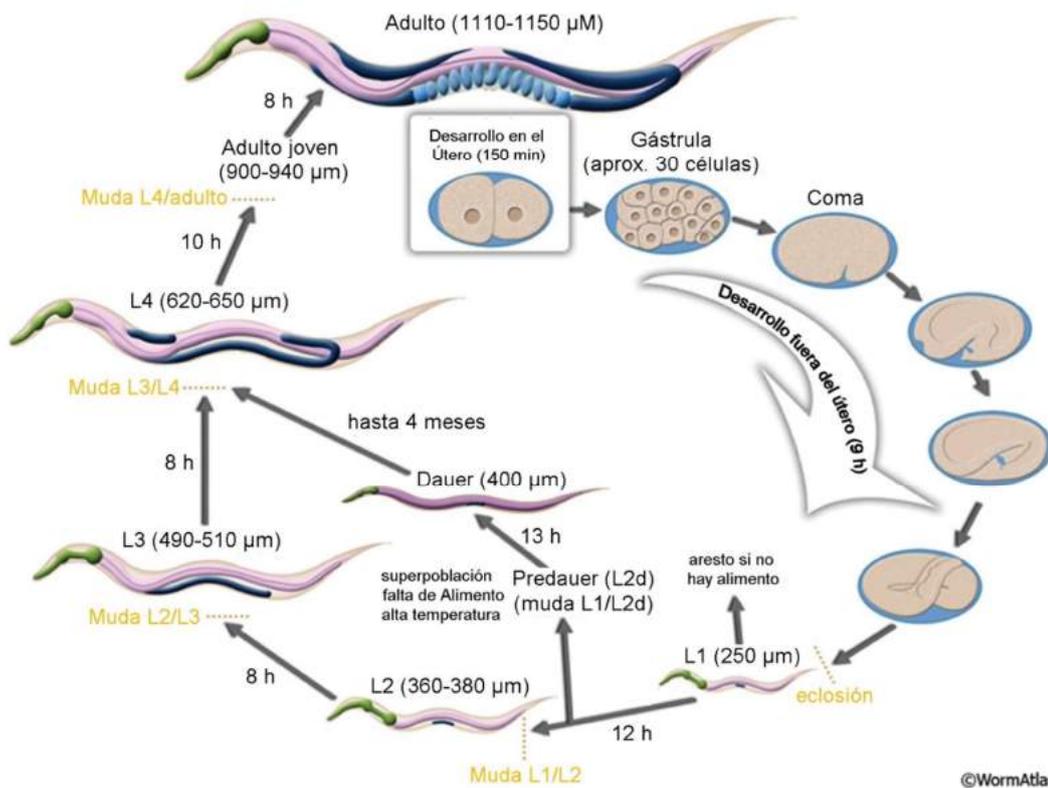


Figura 14| Ciclo de vida de *C. elegans*. La imagen muestra los diferentes estadios del desarrollo de *C. elegans* a 22°C. Modificado de Altun y Hall, 2012.

- Bajo costo de mantenimiento: además de su pequeño tamaño se alimenta de bacterias como fuente de comida en el laboratorio.

- Su genoma fue el primero en secuenciarse completamente y también se conocen los genomas completos de muchas especies relacionadas.
- La amplia disponibilidad de mutantes existentes, las cuales se encuentran en el *Caenorhabditis Genetics Center* (CGC) de Estados Unidos.
- Dos Bibliotecas de ARN de interferencia completas y complementarias contra todos los genes del genoma disponibles y una facilidad incomparable para realizar ensayos de ARNi mediante la introducción del plásmido codificante contra el gen de interés adentro de las bacterias que luego son el alimento para el nematodo.
- Mapa tridimensional neuronal completamente dilucidado, con el conocimiento de todas las neuronas que componen el sistema nervioso, su posición y el interactoma completo, es decir, todas las conexiones existentes entre ellas.
- Supervivencia al congelamiento, por lo que no es necesario mantener constantemente por repique las cepas generadas sino que se pueden conservar con criopreservantes a -80°C durante años en estadio L1.

Ecología de *C. elegans*

El género *Caenorhabditis* es morfológicamente similar, pero ecológicamente muy diverso. Pertenece al phylum Nematoda, el cual es parte del clado Ecdysozoa. Este grupo contiene organismos cuyo desarrollo atraviesa distintos estadios larvales delimitados por un cambio de cutícula o muda (Bourlat, et al. 2008), lo que les da cierta relación evolutiva con *Drosophila* y otros insectos (Kiontke y Sudhaus 2006). Se han aislado 23 especies hasta la fecha, distribuidas por todo el mundo (América del Norte y del Sur, Hawai, Europa, Asia, África, Japón y Australia): *C. anthobia*, *C. auriculariae*, *C. avicola*, *C. bovis*, *C. briggsae*, *C. drosophilae*, *C. japonica* Kiontke, *C. perrieri*, *C. plicata*, *C. perrieri*, *C. plicata*, *C. plicata*, *C. remanei*, *C. sonora*; *Caenorhabditis n. sp. 1* (SB341), *Caenorhabditis n. sp. 2* (DF5070), *Caenorhabditis n. sp. 3* (PS1010, RGD1, RGD2), *Caenorhabditis n. sp. 4* (CB5161, LKC28, SB129, SB280), *Caenorhabditis n. sp. 5* (JU727, SB378), *C. clavopapillata*, *C. craspedocerca*, *C. formosana*, *C. fruticicola*, *C. genitalis*, *C. oncomelaniae* y *C. elegans* (Kiontke y Sudhaus 2006).

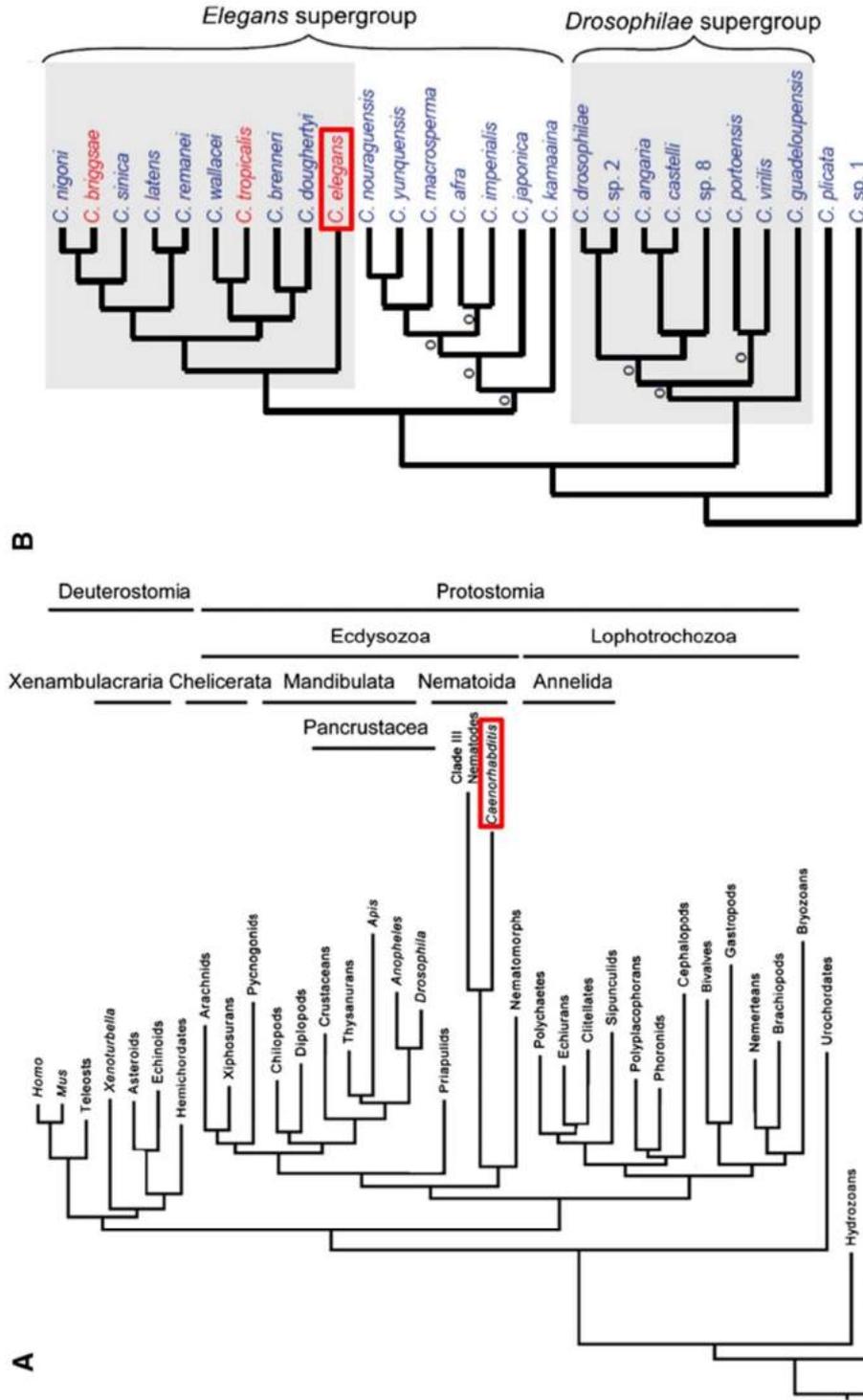


Figura 15 | Filogenia de las especies de *Caenorhabditis* dentro del reino animal. A | Árbol filogenético que muestra al género *Caenorhabditis* (recuadrado en rojo) entre los metazoos basado en datos de secuencia de dos subunidades ribosomales, 8 genes codificantes de proteínas y los genomas mitocondriales. **B |** Árbol filogenético que muestra a *C. elegans* (recuadrado en rojo) entre todas las especies de *Caenorhabditis* conocidas. Las especies en rojo son las que poseen tanto machos como hermafroditas, y las azules tienen hembras y machos. “o” indica ramas con baja probabilidad. Imagen tomada de Kiontke y Sudhaus, 2006.

C. elegans está distribuido en todo el mundo, predominantemente en zonas húmedas templadas. Hasta la fecha se tienen registrados 65 aislamientos diferentes de esta especie en Europa, África, Asia, América del Norte y Sur y Australia (Frezal y Felix 2015) (Figura 16).

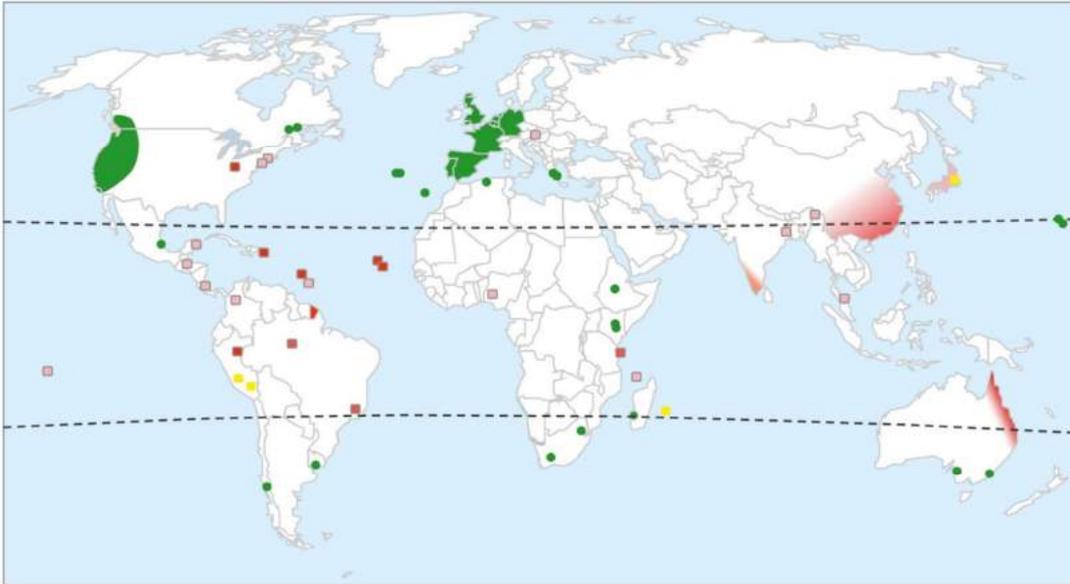


Figura 16| Distribución mundial de *C. elegans* hasta la fecha. La imagen muestra las diferentes zonas geográficas donde se han encontrado aislamientos de *C. elegans*. Las áreas sombreadas verdes muestran zonas donde se han colectado nematodos de esta especie en numerosas ocasiones en el tiempo. Los puntos verdes indican islas o localizaciones donde *C. elegans* ha sido encontrado al menos alguna vez. Los cuadrados amarillos representan áreas donde muchas especies de *Caenorhaditis* han sido encontradas juntas, y donde *C. elegans* está presente pero no es la población mayoritaria. Las zonas sombreadas en rojo y los cuadrados rosas corresponden a lugares donde *C. elegans* nunca fue hallado, a pesar de los numerosos muestreos llevados a cabo y del aislamiento de otras especies del género *Caenorhaditis*. El resto de las áreas en blanco nunca fueron muestreadas para la búsqueda del nematodo. Imagen tomada de Frezal y Felix, 2015.

El nombre *Caenorhabditis elegans* es una mezcla de griego y latín (*Caeno*, reciente; *rhabditis*, varilla; *elegans*, agradable). Existen dos cepas de importancia histórica por su uso en laboratorio: Bergerac, que fue aislada del suelo en Francia por Victor Nigon de la Universidad de Lyon en 1949, y Bristol - más conocida como N2 - que se aisló por L.N. Staniland (Servicio Nacional de Asesoramiento Agrícola, Londres) de compost de champiñón, cerca de Bristol, Inglaterra, en 1995 (Riddle 1997). La cepa de referencia y de uso rutinario en el laboratorio en la actualidad es la N2. Ellsworth Dougherty comenzó a trabajar por primera vez con esta cepa en el Instituto de Investigación de la Fundación Kaiser en Richmond, California. Posteriormente, en 1962, se trasladó al Departamento de Ciencias de

la Nutrición de la Universidad de California, en Berkeley, donde desarrolló los primeros estudios sobre requerimientos nutricionales y cultivos axénicos de la especie. Dado que esta cepa fue cultivada en condiciones de laboratorio en placa de agar con bacterias por muchos años hasta que fue congelada por primera vez, es considerada una cepa “domesticada” o de “laboratorio”. Un subcultivo independiente del aislamiento original fue mantenido en condiciones axénicas en medio líquido con suplementos químicos definidos desde 1959, lo que dio lugar a una divergencia entre ambos subgrupos por la acumulación de numerosas mutaciones que generaron también diferencias fenotípicas. Con el tiempo, fue el científico Sydney Brenner, destacado biólogo sudafricano, quien continuó en Cambridge con los estudios del desarrollo embrionario sobre la cepa N2 que obtuvo de Ellsworth Dougherty en 1964 y quien finalmente convirtió al organismo en un modelo ampliamente utilizado para estudios en neurociencias (Riddle 1997).

A pesar de ser un organismo ampliamente utilizado en el laboratorio, la única información disponible sobre la historia natural de *C. elegans* proviene de los aislamientos. Desde el 2000 en adelante, esto comenzó a cambiar cuando algunos investigadores se embarcaron en un proyecto extenso de muestreo de cepas salvajes y estudio de la ecología del nematodo, motivados por querer posicionarlo como un organismo modelo para la biología evolutiva y la ecología, lo que también podría aprovechar las herramientas y los conocimientos ya adquiridos para esta especie. Asimismo, la exploración de la historia natural de *C. elegans* puede proporcionar un contexto para desarrollar aún más la investigación biológica básica llevada a cabo con este organismo, tales como estudios de su genoma, el desarrollo, comportamiento y el sistema inmunológico (Frezal y Felix 2015).

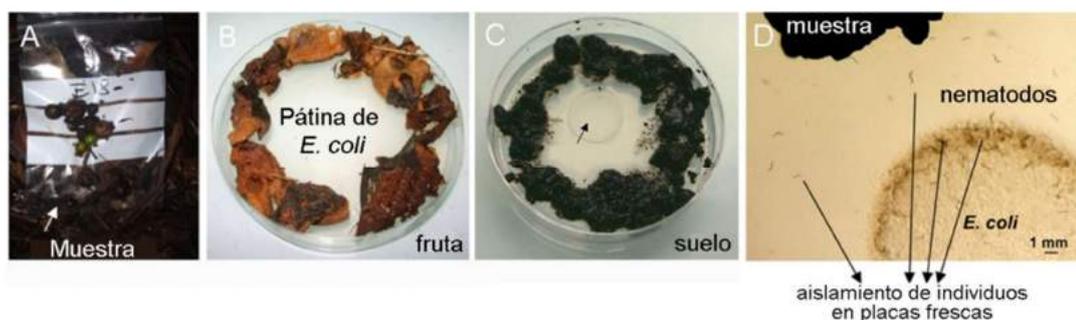


Figura 17| Aislamientos de nematodos de su hábitat natural. En la figura se observan placas de Petri con restos de muestras (A) de frutas en descomposición (B) y de suelo (C) de donde salen nematodos salvajes hacia la pátina de *E. coli* que se siembra en el centro de la placa (D). Generalmente se aíslan

de esta manera nematodos en estadio *dauer*. Las flechas muestran nematodos recientemente salidos de la muestra. Adaptado de Barrière y Félix, 2006.

Aunque a menudo es caracterizado erróneamente como un nematodo del suelo, ya que las primeras cepas salvajes fueron aisladas principalmente del compost de suelos de varias regiones del mundo, en años recientes se han encontrado nematodos de distintos estadios en forma rutinaria en abono de suelo, frutas en descomposición caídas de los árboles y tallos de plantas, y solo rara vez en suelo directo (Felix y Braendle 2010; Blaxter y Denver 2012; Frezal y Felix 2015). Su hallazgo en el compost se cree en la actualidad que está relacionado más con su forma de alimentación, que está basada principalmente en bacterias muy abundantes en el suelo. En realidad, solo se encuentra en sus formas larvales activas en frutas podridas y tallos, mientras que en el suelo generalmente se encuentra en su forma de *dauer*, que por su mayor resistencia es el estadio clásico de dispersión. Estas larvas muestran además comportamientos muy extraños, tales como el denominado nictante (*nictation*), durante el cual se apoyan sobre la cola agitando su cuerpo en el aire de un lado a otro (Lee, et al. 2012). Se piensa que esta actividad ayuda a que las larvas hambreadas entren en contacto con huéspedes tales como milpiés, caracoles y babosas (Kiontke y Sudhaus 2006), y de esta manera se puedan dispersar rápidamente para encontrar a una nueva fuente de alimento. Como otros organismos modelo, *C. elegans* se encuentra parcialmente asociado con actividades humanas (cultivos de frutas, tallos de hortalizas y compost) pero también se halla comúnmente en lugares más salvajes, como el bosque, y se hipotetiza que nuevos tipos de hábitats y localizaciones geográficas quedan todavía por descubrirse (Frezal y Felix 2015).

Por otro lado, aunque *C. elegans* crece perfectamente bien alimentándose de *E. coli*, esta no es su fuente natural de nutrientes y se conoce muy poco acerca de la dieta en su hábitat natural. Se han aislado distintas especies de bacterias coexistiendo con *C. elegans* a partir de compost de hongos y entre ellas, cultivos monogénicos de 5 de estas especies (géneros *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* y *Serratia*) fueron capaces de sostener el crecimiento y reproducción de los nematodos por varias generaciones. Especies del género *Bacillus* son capaces de mantener el crecimiento, pero no la reproducción, y mezclas heterogéneas de *Bacillus cereus* y *Pseudomonas sp.* son capaces de sostener ambas, pero resultan en menores densidades poblacionales que los cultivos monogénicos. También se ha observado que *C. elegans* es capaz de alimentarse de amebas y moho mucilaginoso (Kessin,

et al. 1996). La capacidad reproductiva y el metabolismo de *C. elegans* varían ampliamente con la fuente de comida disponible, por lo que es necesario controlar estos factores en el laboratorio durante la realización de experimentos (Grewal 1991).

El sistema nervioso de *C. elegans*

El sistema nervioso es el más complejo de *C. elegans*. Aproximadamente un tercio de las células de este organismo son neuronas (302 de un total de 959 células, en los hermafroditas). Veinte de estas neuronas están situadas dentro de la faringe; el resto de las 282 neuronas están localizadas en el anillo nervioso de la cabeza, el ganglio de la cola, y también a lo largo del cordón ventral, que constituye el principal tracto axónico longitudinal (Figura 18). La mayoría de las neuronas se desarrollan durante la embriogénesis, con la excepción de 80 neuronas (principalmente motoneuronas) que se desarrollan pos-embriónariamente. La estructura del sistema nervioso ha sido descrita con un detalle sin precedentes mediante la reconstrucción por medio de microscopías electrónicas (White, et al. 1976). Las neuronas de la cabeza están organizadas en un número de ganglios alrededor de la faringe, formando el “cerebro” del animal. Existen 68 neuronas sensoriales, capaces de detectar varios compuestos químicos solubles y volátiles (Ward, et al. 1975; Yu, et al. 1997; Wes y Bargmann 2001; Bargmann 2006; Bretscher, et al. 2011), estímulos mecánicos (Syntichaki y Tavernarakis 2004; O'Hagan y Chalfie 2006), temperatura (Mori y Ohshima 1995; Kimura, et al. 2004; Kimata, et al. 2012), luz (Edwards, et al. 2008; Ward, et al. 2008; Liu, et al. 2010) y, según lo descubierto recientemente, campos magnéticos (Vidal-Gadea, et al. 2015). Estas neuronas sensoriales mandan dendritas a la punta de la nariz, que posee varias estructuras sensoriales. Los axones sensoriales se unen a un gran haz axonal, el anillo nervioso, donde hacen sinapsis con las interneuronas. Algunas de estas interneuronas, a su vez, mandan largos axones a través del cordón ventral que corre a lo largo del animal. Las interneuronas que comandan el circuito motor se conectan a las motoneuronas localizadas en el cordón ventral, y éstas se conectan a las células musculares permitiendo que los nematodos respondan a las entradas sensoriales cambiando sus patrones de movimiento. Dada la geometría del nematodo, las neuronas están organizados de a pares, de manera que cada una tiene sus contrapartes derecha e izquierda (Sulston, et al. 1975; Albertson y Thomson 1976; White, et al. 1976; Sulston y Horvitz 1977; Lewis, et al. 1980; Sulston, et al.

1983; White JG 1986; McIntire, et al. 1993a; McIntire, et al. 1993b; Nguyen, et al. 1995; Rankin 2002; Hobert 2003).

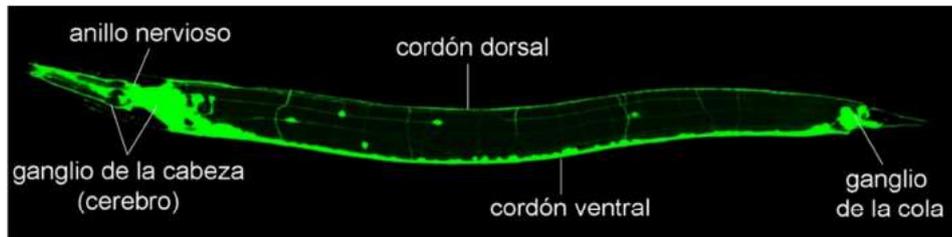


Figura 19]. Sistema nervioso de *C. elegans*. Nematodo hermafrodita adulto que porta el marcador *punc-119::gfp*, el cual dirige la expresión de *gfp* en todas las neuronas. Imagen adaptada de: http://www.sfu.ca/biology/faculty/hutter/hutterlab/research/Ce_nervous_system.html.

Sydney Brenner y sus colegas de la Universidad de Cambridge completaron el primer borrador del conectoma de *C. elegans* en 1986 (White, et al. 1986). En primer lugar, se pudieron etiquetar cada una de las 302 neuronas, ya sea como una neurona sensorial, una neurona motora que controla los músculos o un interneurona, que conecta las dos. La alta resolución de las imágenes de microscopía electrónica permitió la identificación de todas las sinapsis (alrededor de 5000 sinapsis químicas, 2000 uniones neuromusculares y casi 500 uniones GAP) y mapear todo el conexionado neuronal (Albertson y Thomson 1976; Sulston y Horvitz 1977; Sulston, et al. 1983). Con el tiempo, las redes neuronales se fueron puliendo gracias a la posibilidad de realizar ablación con rayos laser de neuronas particulares y observando qué habilidades del nematodo se perdían o retenían. De esta manera se pudieron categorizar todas las neuronas haciendo referencia al número y tipos de conexiones entre ellas. El diagrama de cableado también permitió a los científicos identificar de inmediato cómo una neurona de interés se vincula a otras neuronas. Esto tiene un gran impacto para estudios de comportamiento, ya que es posible asociar de manera directa la afección de un tipo particular de neurona con un fenotipo específico, por ejemplo de movimiento, y de esta manera volver al mapa neuronal para observar qué tipo de interacciones tiene la neurona afectada con otras neuronas de la red. Esto permitió, por ejemplo, identificar un grupo particular de interneuronas que median el movimiento hacia adelante y otro set exclusivo para el retroceso, lo cual se confirmó por estudios de ablación láser. Con las mejoras tecnológicas del siglo XXI, los investigadores continuaron utilizando el

conectoma de *C. elegans* para estudiar el sistema nervioso del nematodo y el comportamiento. Combinando herramientas genéticas con registros de actividad eléctrica, el conectoma ha ayudado a entender cómo *C. elegans* responde a la temperatura, a compuestos químicos y la estimulación mecánica, así como también cómo se lleva a cabo la cópula y la puesta de huevos, comportamientos que ya fueron completamente mapeados a nivel de redes neuronales. Los científicos también han utilizado el conectoma para descubrir talentos ocultos que el nematodo poseía: por ejemplo, la capacidad sorprendente de sensor luz (Edwards, et al. 2008), en un organismo que vive en la tierra y no posee ojos, o la interesante capacidad de sensor campos magnéticos (Vidal-Gadea, et al. 2015), antes mencionadas.

En la actualidad, se conoce el conectoma completo del hermafrodita (Varshney, et al. 2011) y del macho adulto (Jarrell, et al. 2012), tanto a nivel de los tipos neuronales que lo componen como de las conexiones entre las distintas neuronas y la fuerza de esas sinapsis. El análisis de las fuerzas sinápticas en el conectoma es esencial para entender conceptos básicos del desarrollo neuronal. Hoy en día se sabe, por ejemplo, que pares homólogos de neuronas en cada lado del cuerpo del nematodo forman conexiones fuertes y débiles muy similares, y que incluso las conexiones débiles no son totalmente aleatorias (Figura 19).

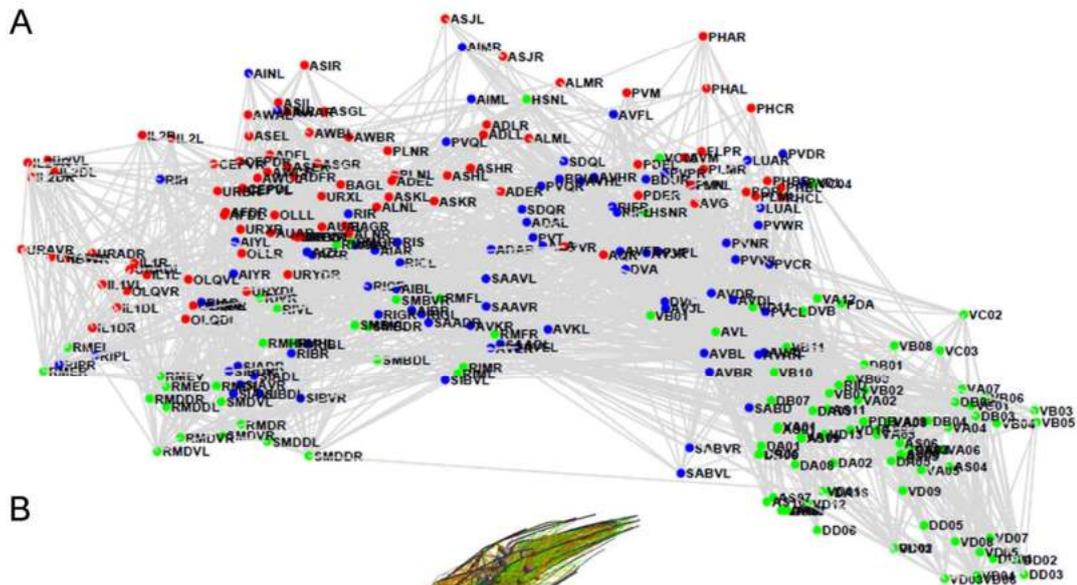


Figura 19| Conectoma de *C. elegans*. A) Diagrama de conexiones del sistema nervioso de *C. elegans*, representando la red de neuronas identificadas y etiquetadas por sus nombres en inglés, conectadas por sinapsis eléctricas y químicas. En rojo se muestran las neuronas sensoriales, en azul las interneuronas y en verde las neuronas motoras. En esta forma de representación, la red está construida según el flujo de señales entre las neuronas, dispuestas de modo tal que la dirección de las sinapsis está dada hacia abajo. Tomada de <http://www.wormatlas.org/neuronalwiring.html>. B) Modelo 3D del conectoma de *C. elegans* construido por el “OpenWorm Project”. Se trata de un modelo generado por computadora utilizando una herramienta estándar para la descripción de modelos computacionales de las neuronas y redes. Los puntos representan los somas de las neuronas mientras que las líneas largas representan axones y dendritas. Este modelo es un trabajo en progreso, y representa el primer modelo de compartimentos múltiples completo de la red de un organismo entero, pero aún carece de la caracterización de las propiedades biofísicas de las neuronas. Los esfuerzos actuales se dirigen hacia la integración de las sinapsis en el modelo, el cual puede ser encontrado y explorado en 3D a través de “Open Source Brain” *online*, y permite a los científicos conocer fácilmente las propiedades de las neuronas y navegar a través de sus conexiones simplemente haciendo clic sobre ellas. Imagen tomada de <http://www.openworm.org/science.html>.

Antecedentes de estudios de ritmos circadianos en *C. elegans*

Como se describió previamente, *C. elegans* es un organismo modelo ampliamente utilizado en diversas áreas de investigación, pero sólo en años recientes ha surgido como un potencial modelo en cronobiología. Su corto período de vida, su fácil manipulación y cultivo y su genoma secuenciado, son algunas de las características que hacen de este nematodo un modelo ideal de estudio para interacciones entre genes y comportamiento.

Cuando se trabaja con *C. elegans* y se puede vivenciar diariamente la cantidad de cosas a nivel de genética y de comportamiento que se pueden realizar con este organismo de manera tan simple, aún con recursos limitados, y en tiempos tan cortos, resulta difícil imaginarse cómo pueden haber pasado tantos años hasta que aparecieron los primeros reportes de estudios de ritmos circadianos en el modelo. También resulta muy llamativo que desde la primera publicación científica de la que se tiene conocimiento sobre ritmos en *C. elegans* que data de 1987, pasaran 15 años hasta que el tema volviera a captar la atención de algunos, pero aún pocos, cronobiólogos. Quizás la explicación subyace un poco justamente en este primer acercamiento al estudio los ritmos en el nematodo, el cual aclamaba lisa y llanamente: "*Failure to Find Circadian Rythms in C. elegans*", y fue publicado como resumen online en la *Worm Breeder's Gazette*, un sitio que publica artículos breves sobre nuevos descubrimientos de interés para la comunidad de *C. elegans* (<http://www.wormbook.org/wli/wbg10.2p38/>). Básicamente, el resumen era un listado de fracasos en la búsqueda de ritmos de cualquier clase, como en actividad, consumo de oxígeno y metabolismo en general, sensibilidad a gradientes de temperatura bajo ciclos de luz/oscuridad, etc, y los adjetivos inconcluso, dificultoso, arduo, variable y marginalmente respetable, denotan que no se trataba de una tarea muy fácil de realizar, ni de un modelo muy ameno en primera instancia para el estudio de ritmos biológicos. Quizás un poco por temor y otro poco porque de verdad la cosa no era tan fácil como parecía, recién en 2002 aparecieron en simultáneo los dos primeros estudios que demostraron la existencia de un reloj endógeno en *C. elegans*, en los cuales se caracterizaron dos comportamientos circadianos: velocidad de nado y resistencia a estrés osmótico (Kippert, et al. 2002; Saigusa, et al. 2002). Desde entonces, diferentes ritmos diarios y circadianos han sido caracterizados en este nematodo en numerosas variables fisiológicas (Figura 20).

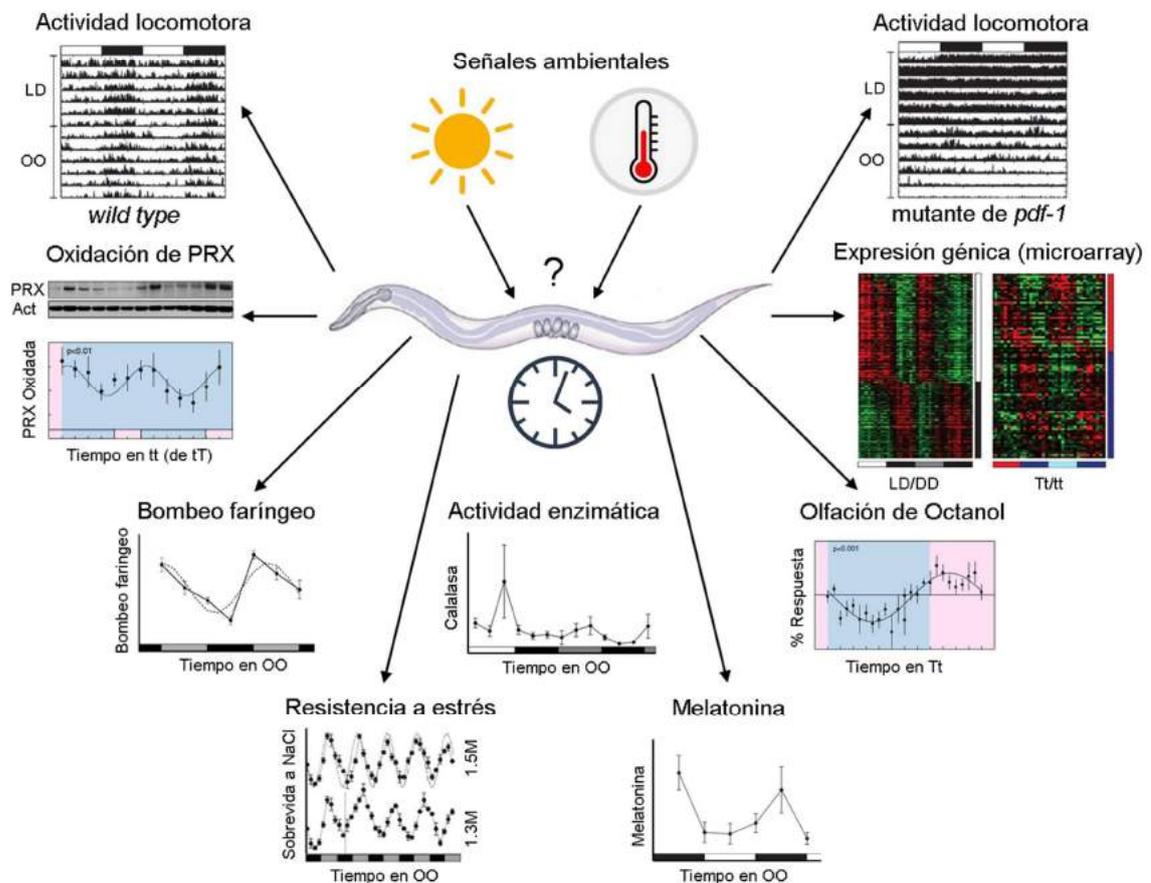


Figura 20| Ejemplos de ritmos circadianos descritos en *C. elegans*. Entre las variables circadianas que se han estudiado en el nematodo se encuentran los ritmos de actividad locomotora en medio líquido de adultos bajo ciclos de luz-oscuridad, que permitieron encontrar la función de algunos genes tales como *pdf-1* (Herrero, et al. 2015). También se han descrito ritmos circadianos en el estado de oxidación de la proteína peroxirredoxina (PRX-2) involucrada en la detoxificación celular y en la señalización redox (Olmedo, et al. 2015); ritmos metabólicos tales como en bombeo de la faringe a lo largo del día (Migliori, et al. 2012); ritmos de resistencia a diferentes tipos de estrés, como bióticos y abióticos (Kippert, et al. 2002); ritmos en actividad enzimática, tales como el hallado en las enzimas del sistema redox catalasa y la superóxido dismutasa (resultados no publicados del laboratorio) y ritmos en la producción de hormonas, tales como la melatonina, una molécula de gran relevancia en cronobiología (Migliori, et al. 2012). También se han descubierto ritmos en comportamientos olfatorios a distintos alcoholes como el 1-octanol bajo ciclos de temperatura (Olmedo, et al. 2012). Y finalmente, existe un estudio *high-throughput* de expresión génica que identificó transcritos rítmicos en condiciones de entrenamiento y constantes bajo ciclos de luz-oscuridad y temperatura van der Linden, et al. 2010.

Desde los inicios, existió siempre el interés por analizar si los nematodos eran más activos durante alguna fase del día, lo cual dio lugar a la continuación de los estudios de actividad locomotora, ya sea a través del registro del movimiento de nematodos adultos en medio líquido dentro de un *well* atravesado por un haz infrarrojo (Simonetta y Golombek

2007; Simonetta, et al. 2009) o bien por medio de videos en tiempo real de nematodos moviéndose libremente en placas de agar (Winbush, et al. 2015). Por otro lado, también se siguió profundizando en la idea inicial de un sistema de defensa y de resistencia que estuviera bajo el control de un reloj endógeno, ya que al tratarse de un nematodo asociado con el suelo seguramente existirían muchos tipos de estrés redox bióticos y abióticos con los cuales debería enfrentarse. Esto llevó al hallazgo de una tolerancia variable a lo largo del día a estrés osmótico y oxidativo (Simonetta, et al. 2008) y a una capacidad de defensa regulada también por un reloj endógeno frente a *Pseudomonas* (Romanowski, et al. 2011). De la mano con los hallazgos de una actividad rítmica también se lograron describir ritmos en variables metabólicas, tales como el bombeo faríngeo, alimentación, el consumo de oxígeno y la defecación (Migliori, et al. 2011) y en comportamientos de olfacción (Olmedo, et al. 2012).

Recién en los últimos años se empezó a pensar en la idea de un reloj endógeno que funcionara de manera homóloga al de los organismos modelo ampliamente estudiados, y entonces se avanzó hacia la búsqueda de posibles mecanismos y de componentes conservados. Aquí es importante mencionar el hallazgo de ritmos diarios en la producción de la hormona melatonina, molécula señalizadora de la noche en mamíferos (Migliori, et al. 2012) o en la variación del estado redox de la peroxirredoxina PRX-2 en el nematodo (Olmedo, et al. 2012), que como se dijo anteriormente son consideradas en la actualidad un marcador universal de ritmos circadianos todos los organismos del planeta (Edgar, et al. 2012). También cabe citar el estudio reciente de nuestro laboratorio sobre el rol del gen *pdf-1*, homólogo al codificante para el neuropéptido PDF de *D. melanogaster*, que al igual que en la mosca, es importante para la generación y entrenamiento de los ritmos de actividad locomotora bajo ciclos de luz-oscuridad en *C. elegans* (Herrero, et al. 2015).

Finalmente, también se ha intentado ir en búsqueda del reloj molecular del nematodo, o más precisamente, de un control jerárquico de todos los *outputs* rítmicos descritos hasta el momento por alguna clase de reloj central previamente descrito, basado en un mecanismo de TTFL utilizado para generar circuitos de 24 horas en todos los organismos estudiados hasta ahora. Al respecto, mediante un estudio del perfil de expresión de todo el genoma por *microarrays* de poblaciones de nematodos entrenados bajo luz-oscuridad o ciclos de temperatura, se encontraron cientos de genes rítmicos bajo ambas condiciones pero con un solapamiento casi nulo entre ambos subgrupos, y sin ninguna

conexión aparente que pueda fundamentar la presencia de un único reloj central basado en un TTFL compuesto por elementos homólogos (van der Linden, et al. 2010). Recientemente, y con el objetivo de encontrar nuevos genes de interés posiblemente involucrados en la generación de los comportamientos rítmicos, en el laboratorio se ha analizado de manera exhaustiva mediante nuevas técnicas bioinformáticas todas las homologías por alineamientos de secuencias de proteínas del nematodo y de muchos organismos modelo tales como mamíferos (*Mus musculus*), plantas (*Arabidopsis thaliana*), cianobacterias (*Synechococcus elongatus*), hongos (*Neurospora crassa*) y moscas (*Drosophila melanogaster*) (Romanowski, et al. 2014) (Figura 21). Si bien surgieron nuevos genes potenciales que no habían sido previamente tomados en cuenta, aparecieron de nuevo muchos de los genes que se habían descrito previamente como homólogos a genes reloj en *C. elegans*, tales como *aha-1*, *lin-42b/c* o *tim-1*, que muestran diferentes grados de homologías con CLOCK, PERIOD y TIMELESS, respectivamente (Hasegawa, et al. 2005; Temmerman, et al. 2011; Romanowski, et al. 2014). Sin embargo, ninguno de estos genes parece tener un patrón rítmico de expresión en el nematodo adulto (van der Linden, et al. 2010; Olmedo, et al. 2012) y por el contrario solo han sido involucrados hasta el momento en funciones de desarrollo: *aha-1* es requerido para dirigir la diferenciación de neuronas específicas (Qin y Powell-Coffman 2004), *tim-1* participa en la regulación de la cohesión cromosomal (Chan, et al. 2003) y *lin-42* es un miembro importante de la vía heterocrónica, regulando temporalmente la identidad celular y eventos en la gónada, vulva, mioblastos y la hipodermis (Jeon, et al. 1999; Tennessen, et al. 2006). Aún se desconoce la relación de estos genes con la ritmicidad circadiana y, a pesar de su alta homología con otros genes reloj, no ha sido posible elucidar si estos genes realmente cumplen una función conservada en el nematodo, redundante con respecto a su funcionalidad ya reportada.

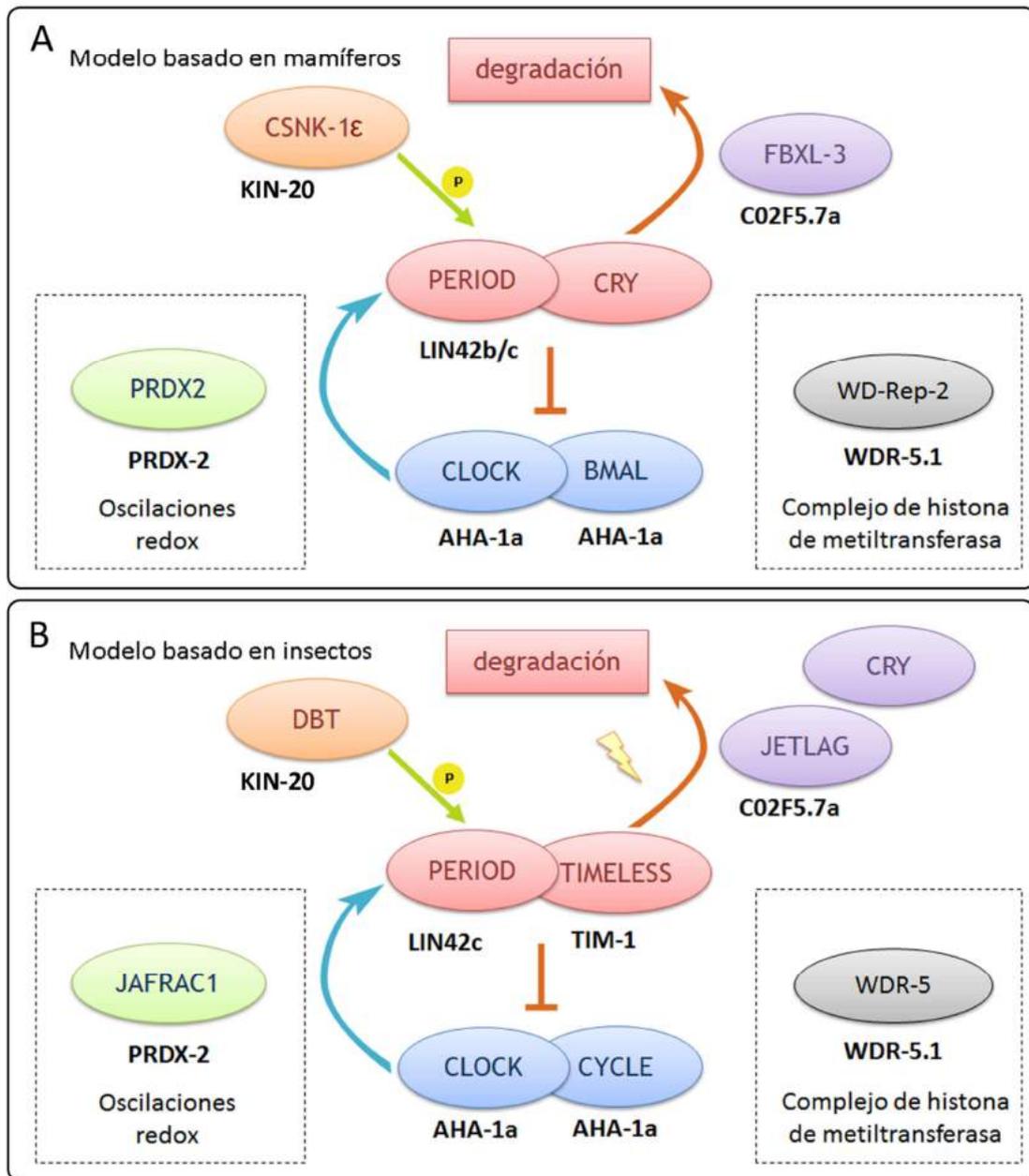


Figura 21| Proteínas similares encontradas por análisis bioinformático entre *C. elegans*, *Mus musculus* y *Drosophila melanogaster*. La figura muestra las siete proteínas más conservadas y dos posibles modelos de funcionamiento del reloj de *C. elegans* en función de lo que se conoce del TTFL para mamíferos (A) e insectos (B). Imagen adaptada de Romanowski, et al. 2014.

Compilando todos los resultados que se conocen sobre ritmos circadianos en *C. elegans* hasta la fecha, es evidente que el nematodo posee un sistema circadiano que gobierna muchos comportamientos y variables fisiológicas, pero aún no queda claro cómo es la base del funcionamiento de este sistema o cómo se relaciona con el de otros organismos

estudiados. Sabemos que cientos de genes ciclan de manera diaria y responden a estímulos ambientales como la luz y la temperatura, pero aún no fue posible establecer la conexión entre ellos y los *outputs* rítmicos, y lo que es aún más atractivo y desafiante, pero algo desalentador, es que todavía no fuimos capaces de armar el rompecabezas y de hilar todos los datos de comportamiento y de genómica con un modelo de reloj funcional, basado en componentes conservados o novedosos. Parte de la falta de comprensión de las bases moleculares del reloj de *C. elegans* provienen de la ausencia de un método robusto y confiable para medir ritmos en el nematodo. En este sentido, el objetivo principal del presente trabajo es desarrollar un método nuevo para medir expresión génica *in vivo* y en tiempo real, basado en luminiscencia, que pueda ser utilizado para hallar nuevos componentes del reloj central así como también mecanismos y propiedades fundamentales de estos ritmos. Finalmente, si el reportero permitiera obtener oscilaciones robustas, también se plantea la posibilidad de utilizarlo como herramienta para estudiar cómo el nematodo sensa luz y temperatura y cómo utiliza estos *Zeitgebers* para la sincronización del reloj circadiano.

Métodos Generales

Condiciones de cultivo

Los nematodos fueron cultivados en placas de Petri de 15 mm de diámetro con medio NGM agar y un césped de *E. coli* tal como se describió previamente (Brenner 1974), pero con la cepa HB101. Los nematodos se mantuvieron siempre bajo un ciclo dual de luz:oscuridad (LO, 0/400 lux) y temperatura caliente:fría (CF, 18.5/20°C, $\Delta = 1,5 \pm 0,125^\circ\text{C}$) de 12 h: 12 h. La luz y la temperatura son los principales *Zeitgebers* (o sincronizadores) descriptos para ritmos circadianos y en este esquema, *Zeitgeber time* 0 o ZT0 (9 am) indica el momento de encendido de la luz y el inicio del rango de temperatura baja. Asimismo, *Circadian time* (CT) hace referencia al horario durante las condiciones constantes o de libre curso (en este caso, oscuridad constante y temperatura caliente, OO/CC). Las condiciones fóticas y térmicas fueron controladas con una incubadora I-291PF (INGELAB, Argentina) y la temperatura fue monitoreada utilizando Termocrones *iButton DS1921H-F5* (Maxim Integrated, Estados Unidos). Tubos fluorescentes *4xPhilips Daylight TL-D 18W/54-765 1SL* fueron utilizados como fuente de iluminación (CT = 6200K y CRI = 72 Ra8).

Para poder obtener poblaciones sincronizadas en el mismo estadio larval L4 para los ensayos, *C. elegans* adultos fueron pasados a 3 placas de NGM agar con bacterias y se dejaron crecer las poblaciones durante 3 días bajo el ciclo LO/FC antes descripto. Cuando las placas se encontraban llenas de hermafroditas adultos con huevos (durante la mañana del 4 día), se sincronizaron mediante el método de cloro (Lewis y Fleming 1995) con el fin de extraer los huevos. Posteriormente, los embriones se resuspendieron en 3,5 ml de buffer M9 (Na_2HPO_4 42 mM, KH_2PO_4 22 mM, NaCl 85,5 mM, MgSO_4 1 mM), suplementado con Antibiótico-antimicótico 1X (Thermo Fisher Scientific) y 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de tobramicina (Tobrabortic, Denver Farma) y se dejaron en agitación durante 24 horas a 50 rpm en un agitador tipo vaivén (Serie 2014, Decalab, Argentina) bajo las mismas condiciones de LO/FC (400 lux; 18.5/20°C, $\Delta = 1.5^\circ\text{C} \pm 0.25^\circ\text{C}$). A las 10 de la mañana del siguiente día (ZT1) las larvas que eclosionaron de los huevos se transfirieron a nuevas placas de NGM sembradas con *E. coli* HB101 (4000 L1s por placa) y se dejaron crecer hasta el estadio L4 por 48 horas en las mismas condiciones. Al día siguiente, los nematodos L4 que presentaban mayor expresión de GFP fueron seleccionados manualmente mediante picado bajo una lupa de microscopía (SMZ100, Nikon, Estados Unidos) equipada con un sistema de epi-fluorescencia basado en tecnología LED (Multi-TK-LED, Tolket, Argentina) para evitar el calentamiento

sobre la placa. La selección de los nematodos transgénicos para los experimentos de luminiscencia fue realizada en un laboratorio con temperatura constante a 18°C y con luz blanca de intensidad baja en la lupa de microscopía, con el fin de mimetiza la fase correspondiente del ciclo de la incubadora (luz ON, 18.5°C). Cada placa fue expuesta solo 15 minutos a la luz azul para prevenir efectos a largo plazo sobre el entrenamiento o la viabilidad.

Ensayo de luminiscencia con el sistema *luc*

En general, los registros de luminiscencia se realizaron en placas de Petri de 35 mm, a 20°C y en oscuridad constante, o en placas *multiwell* bajo condiciones cíclicas y luego constantes. En todos los casos, el medio de luminiscencia utilizado como óptimo consistió de medio de cultivo celular Leibovitz's L-15 sin indicador de pH fenol rojo (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos) suplementado con Antibiótico-antimicótico 1X (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos), 40 µM de 5-fluoro-2'-deoxiuridina (FUdR) para evitar el desarrollo de nuevos embriones, 5 mg/ml de colesterol, 10 µg/ml de tobramicina (Tobrabortic, Denver Farma, Argentina), 1 mM de D-luciferina (Gold Biotechnology, Estados Unidos) y 0,05% de Tritón X-100, para aumentar la permeabilidad de la cutícula al sustrato. Todos los compuestos no especificados anteriormente fueron adquiridos de Sigma-Aldrich.

Ensayo en placa de Petri bajo OO/CC

Para este ensayo, 8 poblaciones de 100 nematodos L4 crecidas como se describió anteriormente (cada población fue considerada como una réplica biológica independiente, n = 8) fueron seleccionadas manualmente a ZT10 (19 h) y pasadas a 200 µl de buffer M9 como se describió previamente mediante picado bajo lupa de fluorescencia. Los nematodos se lavaron dos veces con M9 para remover todas las trazas de bacterias y se transfirieron a placas de Petri de 35 mm (Greiner Cellstar, Estados Unidos) con 1 ml de medio de luminiscencia, que fueron selladas con silicona (SYLGARD-184-DOWC, Estados Unidos) para evitar la evaporación y la contaminación del medio de cultivo. Posteriormente, las placas fueron dejadas durante 3 días mas bajo el ciclo LO/FC /18,5/20°C) para reforzar el entrenamiento luego del cambio de medio, y ZT12 (21 h) se colocaron en un luminómetro AB-2550 Kronos Dio (ATTO, Japón). La luminiscencia fue monitoreada en oscuridad

constante a 20°C (mínima temperatura que permite el equipo) durante 5 días. La señal emitida por los nematodos fue integrada por 1 minuto y registrada con un intervalo de 10 minutos.

Ensayo en placa *multiwell* bajo LO/FC y condiciones constantes

En este caso, poblaciones 100 nematodos L4 cada una (cada población fue considerada como una réplica biológica independiente) fueron seleccionadas manualmente comenzado a ZT1 (10 h) y pasadas a 200 µl de buffer M9 como se describió previamente mediante picado bajo lupa de fluorescencia. Las poblaciones de nematodos se lavaron dos veces con M9 para remover todas las trazas de bacterias y se resuspendieron en 200 µl de medio de luminiscencia (1 mM of D-luciferina y 0,05% de Tritón X-100). Luego, se transfirieron a una placa de 96 *wells* blanca, de fondo plano (Greiner, Estados Unidos), se selló la misma con un film óptico (*Microseal B PCR Plate Sealing Film*, Biorad, Estados Unidos) y se realizaron dos perforaciones pequeñas con una aguja de 25G estéril, para evitar la condensación. Posteriormente, a ZT10 (19 h) del mismo día, se colocó la placa en un luminómetro *Berthold Centro LB 960 microplate luminometer* (Berthold Technologies, Alemania) dentro de una incubadora *E-30B* (Percival, Estados Unidos) para controlar las condiciones de temperatura y luz. El software Microwin 2000 software 4.43 (Mikrotek 2 Laborsysteme, Alemania) fue utilizado para adquirir los datos y fue programado de manera tal que permitiera el ingreso y la salida de la placa del luminómetro cada 15 minutos, de manera que los nematodos pudieran estar expuestos al ciclo de entrenamiento. La luminiscencia fue monitoreada bajo LO/FC y OO/CC, durante 8 días. La señal emitida por los fue integrada por 10 segundos y registrada con un intervalo de 30 minutos.

Las condiciones generales de entrenamiento para la mayor parte de los experimentos con ese formato fueron 3,5 días bajo el ciclo de 24 h LO/FC 12 h: 12 h (0/400 lux; 15,5°C/17°C, ZT0, luz ON e inicio de la fase fría) y 4 días en condiciones de *free-running* (OO/CC, 17°C). Este ciclo fue elegido porque 15,5°C es la mínima temperatura permitida por el equipo y porque bajo esta condición los nematodos viven por mas días que a 18,5/20°C. Esto permite una señal de luminiscencia sostenida por mas tiempo que a altas temperaturas.

Análisis de Datos

Los datos de luminiscencia fueron obtenidos como datos crudos de cada luminómetro, se extrajo el ruido de fondo (restando el *background*) y en el caso de los experimentos durante varios días, se normalizaron los niveles de cada registro al valor máximo inicial de luminiscencia, para poder compararlos entre ellos. Todos los datos crudos fueron analizados mediante un software desarrollado en conjunto con el Ing. Carlos Caldart del laboratorio, que consiste en una serie de códigos de MATLAB basados en métodos clásicos pero modificados para su aplicación en el análisis de series cortas de datos, obtenidos a partir de los nematodos.

En el caso de los datos crudos provenientes de experimentos realizados en el luminómetro AB-2550 Kronos Dio, el ruido de fondo fue removido con la opción *waiting time background*. En todos los casos, se descartaron las primeras 12/24 h horas de registro por el efecto antes observado de acumulación de enzima y la tendencia (*trend*) de los datos crudos fue removida (*detrend*) mediante la división de cada punto sobre una ventana móvil promedio de 24 h (método de *moving average*) y suavizados cada 12 horas (*smooth*). Luego, los datos fueron normalizados al valor máximo inicial de cada muestra y graficados con el software OriginLab 2016 (Estados Unidos). Todos los datos son presentados como el promedio \pm SEM y expresados como unidades normalizadas de luminiscencia sin la tendencia (*detrended*, UNDL). En cada caso, la media corresponde a una población de nematodos o un registro individual, dependiendo de cada ensayo.

El período circadiano fue calculado mediante cuatro métodos distintos: periodogramas de autocorrelación, FFT-NLLS (*Fast Fourier Non-Linear Least Square algorithm*), MESA (Dowse 2013) y LS (*Lomb-Scargle*) (Press 1992), evaluando dentro de un rango de 20 a 32 h. Finalmente, se eligió informar los resultados mediante el algoritmo LS, porque con éste se obtuvo un ajuste más exacto a la forma de los datos y porque es el mejor método reportado para la determinación del período en registros circadianos cortos de pocos días (Zielinski, et al. 2014). Con el período obtenido se estimó la acrofase (momento de mayor actividad) de cada señal, la amplitud el método de Cosinor y se realizó un ajuste mediante una regresión de mínimos cuadrados (*least-square regression fit*) para calcular el R^2 del ajuste. Toda señal resultante de análisis poblacionales con un período cercano a 24 h y un R^2 de ajuste $\geq 0,7$ fue considerada como "Sincronizada" bajo condiciones de

entrenamiento cíclicas. Para el caso de *free-running*, cualquier señal resultante del análisis con un período cercano a 24 h y un R^2 de ajuste $\geq 0,5$ fue considerada como "Rítmica". Se consideró "Entrenada" a aquellas poblaciones de nematodos cuya acrofase en condiciones de *free-running* tenía una diferencia menor de 3 h con respecto a la acrofase durante las condiciones de entrenamiento.

En cuanto al resto de la nomenclatura utilizada, "Porcentaje de sincronizados" indica el número de poblaciones con un período y una fase ajustados a las condiciones del *Zeitgeber* (24 h,) sobre el total de poblaciones testeadas; "Porcentaje de entrenados" indica el número de poblaciones que retienen su acrofase circadiana cuando son liberadas en condiciones constantes, sobre el total de poblaciones que se ajustaron a las condiciones del *Zeitgeber*; finalmente, "Porcentaje de rítmicos bajo *free-running*" indica el número de poblaciones rítmicas bajo condiciones constantes, sobre el total de poblaciones testeadas. Un *test* exacto de Fisher fue realizado para comparar las proporciones de poblaciones sincronizadas, entrenadas y rítmicas en todos los experimentos.

El análisis de acrofase fue realizado mediante estadística circular (*test* de *Rayleigh*), donde las 24 del día son graficadas en un círculo que va desde ZT0 a ZT24 (ZT0-12 luz, ZT12-24 oscuridad) y se analiza estadísticamente la distribución de los máximos de actividad de las distintas poblaciones, indicadas como puntos dentro del gráfico. Para comparar estadísticamente las medias de distribución de acrofases bajo LO/FC y OO/CC se realizó un *multi-sample test for equal median directions* (análogo circular del *Kruskal-Wallis test*).

Si no se indica otra cosa, la significancia estadística fue calculada mediante un ANOVA de una vía, seguido por un *test* de Dunnett de comparación de grupos, y en todos los caso un valor de $P < 0,05$ fue considerado como el mínimo para ser estadísticamente diferente. Los valores de significancia se denotaron como sigue: *** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,05$.

Capítulo I:

Desarrollo de un sistema reportero basado en luminiscencia

“If you wish to make an apple pie from scratch, you must first invent the universe.”

— Carl Sagan. *Cosmos*, 1980

Introducción

Principios básicos de luminiscencia

La bioluminiscencia es el proceso natural de emisión de luz visible en organismos vivos mediado por una catálisis enzimática que es llevada a cabo por proteínas denominadas luciferasas. Existen diversos tipos de luciferasas en la naturaleza, las cuales son estructuralmente muy heterogéneas, y se encuentran en una amplia variedad de organismos tales como bacterias, luciérnagas, hongos, dinoflagelados, peces, metazoos, y una amplia diversidad de organismos marinos (Wilson y Hastings 1998). Las luciferasas más estudiadas son de origen procariota, como las provenientes de la bacteria marina *Vibrio harveyi* o de *Photorhabdus luminescens*, de vida terrestre, codificadas por los genes *lux*; entre los organismos eucariotas, las más populares y ampliamente utilizadas son las luciferasas provenientes de la luciérnaga *Photinus pyralis*, codificada por el gen *luc* y del cnidario marino *Renilla reniformis*, cuyo gen correspondiente es denominado *ruc*. Algunos organismos eucariotas, como *Photinus pyralis*, tienen su propio sistema sustrato-luciferasa autosuficiente, sin embargo, muchos otros organismos marinos, como ciertos peces de mediana profundidad o moluscos, emiten luz gracias a una simbiosis con bacterias productoras de luciferasas que crecen dentro de ellos en órganos altamente especializados para la producción de luz, tales como *Photobacterium phosphoreum*, *P. leiognathi*, *Vibrio logei*, *V. harveyi* y *V. fischeri* (Greer y Szalay 2002).

A lo largo de la evolución, la bioluminiscencia se ha reinventado en la naturaleza muchas veces, y en la actualidad existen alrededor de 30 sistemas independientes de generación de luz, cuyas luciferasas no tienen ninguna homología entre sí, y sus sustratos tampoco están relacionados químicamente. Sin embargo, todos ellos tienen algo en común: todas las luciferasas solo son capaces de emitir luz en presencia de oxígeno y de al menos un sustrato (denominado luciferina) y todas catalizan reacciones en las cuales se forma un intermediario peroxy-luciferina que, al romperse, provee la energía necesaria para la excitación (Wilson y Hastings 1998). Es de esperarse, entonces, que una característica tan costosa metabólicamente como la producción de luz solo fuera retenida si generara una ventaja evolutiva. La bioluminiscencia es utilizada por los organismos como un mecanismo de evasión de predadores, para atraer presas, como un mecanismo de señalización para el

cortejo y el apareamiento, para la comunicación por *Quorum Sensing* o incluso como una respuesta de estrés (Greer y Szalay 2002).

Las luciferasas de todas las bacterias bioluminiscentes estudiadas hasta el momento son heterodímeros de subunidades α (de aproximadamente 40 kDa) y β (de aproximadamente 35 kDa). En este caso, la generación de luz depende de un *cluster* genético que consiste de seis genes *lux* (*luxCDABEG*), que se disponen en un operón transcripto como un ARN mensajero policistrónico. Los genes *luxA* y *luxB* codifican para las subunidades α y β de la luciferasa, que es capaz de catalizar una reacción de emisión de luz que involucra la oxidación de la luciferina (FMNH_2) y un aldehído de cadena larga como sustrato (tetradecanal, decanal, nonanal, etc), con la consecuente emisión de luz de color verde-azul ($\lambda_{\text{max}} = 490 \text{ nm}$). La reacción catalizada se puede escribir como: $\text{FMNH}_2 + \text{n-decanal} + \text{O}_2 \rightarrow \text{FMN} + \text{ácido n-decanoico} + \text{H}_2\text{O} + \text{luz}$ (Figura 23). Esta reacción tiene un rendimiento de aproximadamente 0,3 fotones por molécula de FMNH_2 (Meighen 1993).

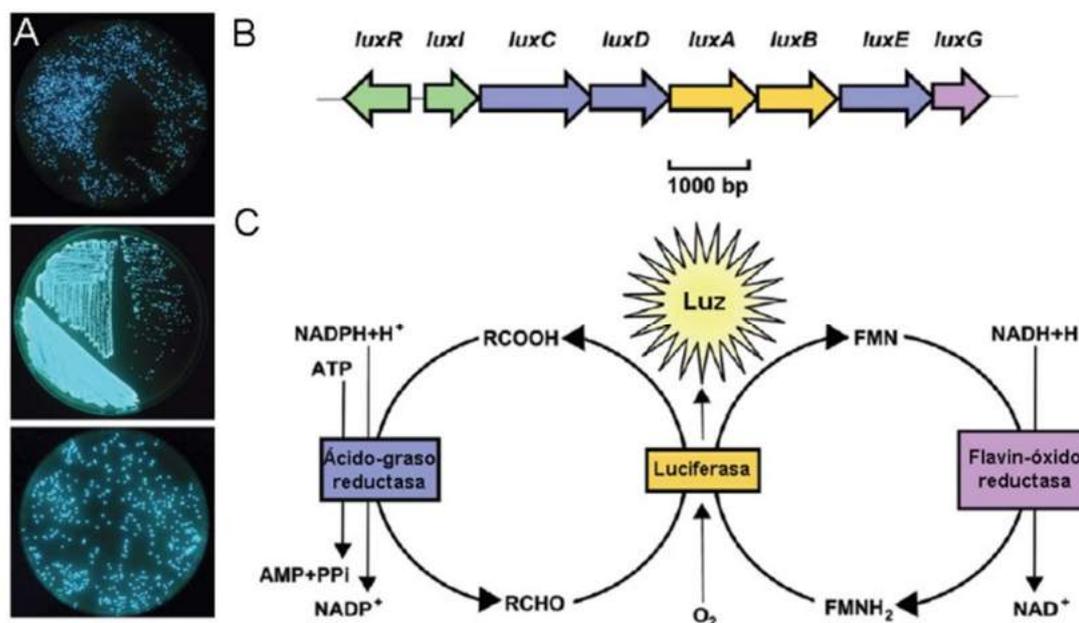


Figura 1.1 | Sistema de bioluminiscencia bacteriano. **A** | Colonias de *P. mandapamensis*, *V. harveyi* y *V. fischeri*, respectivamente, crecidas sobre placas de agar nutritivo con de agua de mar. **B** | Organización estructural del operón bacteriano. Los genes *luxR* y *luxI* codifican para enzimas involucradas en el mecanismo de *Quorum sensing*; los genes *luxA* y *luxB* codifican para la luciferasa $\alpha\beta$; La síntesis del aldehído está catalizada por un complejo multienzimático de reducción de ácidos grasos, conformado por los genes *luxC*, *luxD* y *luxE*, que están presentes en los operones de todas las bacterias luminiscentes. Finalmente, el gen *luxG* codifica para una NAD(P)H flavina reductasa, que cataliza la reducción de FMN libre en solución y está implicada en la producción de FMNH_2 en la

reacción. **C**] Reacciones catalizadas por todas las enzimas del sistema bacteriano para la generación de bioluminiscencia. Imagen adaptada de Miyashiro y Ruby, 2012.

Finalmente, el sistema de *Photinus pyralis*, probablemente el más utilizado hoy en día para investigación, está conformado por una luciferasa monomérica de 62 kDa codificada por el gen *luc*, la cual cataliza la emisión de luz verde ($\lambda_{\text{max}} = 560 \text{ nm}$) desde su sustrato natural, una luciferina de estructura química tipo benzotiazolil-tiazol, en presencia de O_2 y ATP como sustratos y de Mg^{+2} como cofactor. La reacción catalizada es la siguiente: Luciferina + ATP + O_2 (Mg^{+2}) \rightarrow Oxiluciferina + AMP + PP_i + CO_2 + luz (Figura 24). Esta reacción tiene un rendimiento de aproximadamente 1 fotón por molécula de benzotiazolil-tiazol.

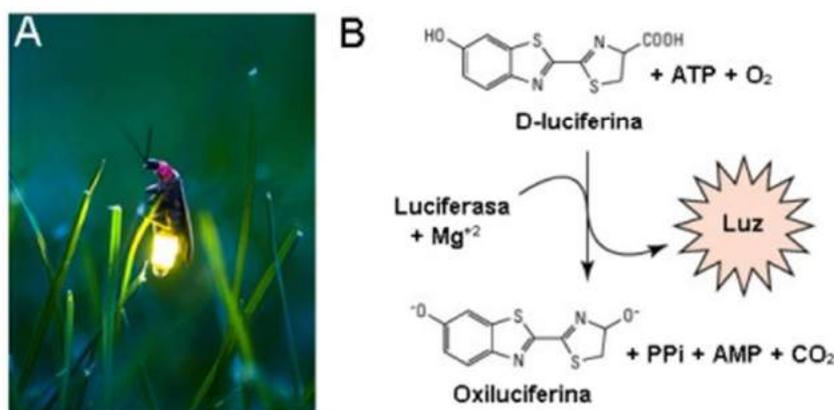


Figura 1.2] Sistema de bioluminiscencia eucariota de *Photinus pyralis*. **A**] Especímen de *Photinus pyralis* adulto hembra emitiendo luz para atraer al macho para aparearse. **B**] Reacción catalizada por la enzima de la luciérnaga codificada por el gen *luc* para la generación de bioluminiscencia, donde el sustrato está ejemplificado por la D-luciferina, que se utiliza comercialmente. Imagen adaptada de: <https://www.thermofisher.com/ar/es>.

Sistemas luminiscentes como reporteros para el estudio de ritmos circadianos.

Si bien existen muchos métodos para medir directamente la expresión o actividad génica que pueden ser aplicados a estudios de ritmos circadianos, tales como *Northern blots*, PCR en tiempo real, *Western blots*, técnicas de inmunohistoquímica, y detección de actividad enzimática, cada uno de estos métodos requieren sacrificar al organismo en estudio a diferentes puntos horarios y procesar las muestras, son muy intensivos, toman muchos días en completarse, tienen muchas fuentes de error y no permiten realizar medidas de manera continua, conllevando en muchos casos a la pérdida de información temporal.

Muchos fueron los esfuerzos realizados para el desarrollo de sistemas de registro automatizados que permitieran medir una variable de manera continua durante días o semanas haciendo posible determinar precisamente el período, la fase o la amplitud de un ritmo. Con los avances en la biología molecular, el descubrimiento de los genes que codifican para las proteínas luciferasas y el desarrollo de equipos que permiten cuantificar la bioluminiscencia generada por reacciones químicas, la utilización de los sistemas reporteros basados en luz se expandió ampliamente en el campo de la cronobiología. Muchas luciferasas tienen una vida media relativamente corta, de solo unas pocas horas o incluso minutos (Leclerc, et al. 2000), lo cual las hace ideales para ser utilizadas como reporteros de cambios en la actividad transcripcional en una escala de tiempo circadiana. Además, algunos de los genes bacterianos codificantes para la luciferasa y los de la luciérnaga *Photinus pyralis* han sido clonados y están disponibles comercialmente (Welsh, et al. 2005). Durante las últimas décadas, en varios vectores de expresión y e incluso en constructos de fusión con otros productos génicos tales como la proteína verde fluorescente (GFP; del *jellyfish* *Aequorea*), las luciferasas han sido utilizadas ampliamente como reporteros en un gran número de investigaciones para la búsqueda de promotores bajo regulación circadiana o para dirigir la expresión génica de manera cíclica en numerosos organismos (Welsh, et al. 2005).

La luminiscencia generada por las luciferasas, principalmente por la de *Photinus pyralis*, es muy tenue y a menudo demasiado débil como para ser observada a simple vista para aplicaciones experimentales, por lo que requieren equipamiento costoso. Existen también otros reporteros mucho más brillantes basados en fluorescencia disponibles (Zhang, et al. 2002), y dos de ellos se han utilizado con éxito para estudiar ritmos circadianos: GFP (Kuhlman, et al. 2000) y *Cameleon*, un sensor de Ca^{+2} citoplasmático (Ikeda, et al. 2003). Sin embargo, la luciferasa posee dos ventajas principales sobre los reporteros fluorescentes. En primer lugar, la enzima no requiere iluminación exógena: la luz detectada es emitida desde la muestra biológica por sí sola. Los reporteros fluorescentes, por otro lado, requieren un bombardeo de fotones tóxicos de relativamente alta energía para ser excitados y generar la emisión de fotones de baja energía que pueden ser captados como fluorescencia. En experimentos a largo plazo como los circadianos, la fototoxicidad es un problema muy serio en los reporteros fluorescentes, algo que no ocurre con la luminiscencia. En segundo lugar, el ruido de fondo o *background* de luz generado por las muestras biológicas o por el sustrato

solo es generalmente extremadamente bajo en comparación con la señal, mientras que el ruido generado por la autofluorescencia puede ser tan alto como la señal fluorescente en sí misma. Por lo tanto, a pesar de generar un *output* luminiscente muy modesto, las luciferasas son los reporteros de elección por excelencia para el estudio de funciones circadianas (Welsh, et al. 2005).

La primera aplicación de luminiscencia para el monitoreo de ritmos circadianos fue realizada con dinoflagelados marinos del género *Gonyaulax*, el cual exhibe un ritmo circadiano natural de producción de luz (Hastings 1989). Subsecuentemente, genes exógenos de luciferasas bajo el control de promotores regulados circadianamente han sido introducidos en una gran diversidad de organismos tales como cianobacterias (*Synechococcus*) (Kondo, et al. 1993), plantas (*Arabidopsis*) (Millar, et al. 1992), insectos (*Drosophila*) (Brandes, et al. 1996; Plautz, et al. 1997), hongos (*Neurospora*) (Morgan, et al. 2003), peces (Zebrafish) (Kaneko y Cahill 2005; Kaneko, et al. 2006) y roedores (Yamazaki, et al. 2000; Asai, et al. 2001; Wilsbacher, et al. 2002; Yamaguchi, et al. 2003; Yoo, et al. 2004). En mamíferos, la luciferasa de *Photinus pyralis* ha sido utilizada para estudiar ritmos de expresión génica en explantos de tejido periférico (Yamazaki, et al. 2000), cultivos de cortes de núcleos supraquiasmáticos (NSQ) (Yamaguchi, et al. 2003) e incluso in vivo (Yamaguchi, et al. 2001). Estos organismos transgénicos exhiben ritmos circadianos robustos (aunque de relativa baja intensidad) de bioluminiscencia, útiles para un amplio rango de estudios genéticos y bioquímicos de mecanismos del reloj circadiano.

En cuanto a las ventajas y desventajas de los sistemas luminiscentes disponibles, el bacteriano tiene como característica positiva que todos los genes del operón han sido estudiados y sus secuencias están disponibles libremente en *Genbank*, lo que ofrece la posibilidad de producir tanto la enzima luciferasa como el sustrato de manera endógena y la generación de organismos bioluminiscentes que emiten luz de manera constitutiva y mantenida en el tiempo, sin la necesidad de añadir sustratos exógenos. Sin embargo, la enzima es dimérica, lo cual requiere la expresión de dos subunidades simultáneamente y en cantidades equivalentes para generar la proteína funcional. Además, el sistema requiere altas cantidades de FMNH₂, generalmente escaso en organismos eucariotas y, por la propia naturaleza bacteriana de los genes, muchas veces existen problemas en los niveles de expresión en organismos eucariotas. Por último, el sustrato, normalmente decanal, tiene muchos problemas de toxicidad para diversos organismos. Por estas razones, ha sido el

sistema de elección para el estudio de ritmos circadianos en cianobacterias (Kondo, et al. 1993; Kondo y Ishiura 1994; Liu, et al. 1995), pero no en otros modelos experimentales.

Por otro lado, en cuanto al sistema de bioluminiscencia de *Photinus pyralis*, la ventaja principal es su origen eucariota, así como también el carácter monomérico de la enzima y la simplicidad de la reacción que solo requiere adicionar luciferina en exceso de manera exógena, la cual no tiene en general problemas de permeabilidad o toxicidad. Además, una característica muy destacada de esta luciferasa es su baja vida media comparada con proteínas fluorescentes, lo que lo convierte en un sistema adaptable ideal para mediciones dinámicas *in vivo* donde se busca seguir los niveles de transcripción génica (Welsh, et al. 2005). Se ha estimado que la vida media de la luciferasa de *Photinus pyralis* expresada en organismos eucariotas varía entre 2-4 horas (Leclerc, et al. 2000) y también es posible fusionar su marco de lectura con ciertos dominios proteicos capaces de desestabilizarla y marcarla para su degradación, reduciendo aún mas su vida media y por ende el rango temporal durante el cual la señal es emitida. Un ejemplo muy utilizado en la luciferasa *Photinus pyralis* es el dominio PEST, una región de 41 aminoácidos rica en prolina, gultamina, serina y treonina que queda localizada en la superficie de la proteína debido a su carácter hidrofílico y genera que ésta sea rápidamente degradada en el citoplasma celular (Rechsteiner y Rogers 1996).

Por todo esto, la aplicación de la luciferasa *Photinus pyralis* se ha extendido en organismos modelo tales como plantas, hongos, moscas, peces y mamíferos (Yamazaki y Takahashi 2005; Rosato 2007), lo que generó como consecuencia la aparición de una gran diversidad de vectores disponibles comercialmente para expresión en distintos organismos.

Antecedentes de luminiscencia en *C. elegans*

En el momento de iniciar este trabajo, existía un solo laboratorio trabajando con luminiscencia en *C. elegans*. Se había descrito con anterioridad el desarrollo y aplicación de una línea de *C. elegans* bioluminiscente a partir de genes *luc* de luciérnaga, para testear mediante ensayos de corto tiempo, los efectos de exposición a temperatura elevada, a metales pesados y al 3-5 DCPC (Lagido, et al. 2001). En este trabajo, los nematodos transgénicos (cepa PE39) fueron generados por microinyección del plásmido pPECL1 que contenía el gen *luc* de la luciferasa de *Photinus pyralis* de Promega, con una delección de una

secuencia de direccionamiento a peroxisoma (*lucv*) bajo el control del promotor constitutivo del gen *let-858* de *C. elegans*, presente en el vector pPD103.05, del kit de vectores de expresión para *C. elegans* creado por Andrew Fire. Estos nematodos expresaban constitutivamente una versión de la luciferasa de luciérnaga, en el citosol de todas las células somáticas. Mediante una línea de nematodos integrada espontáneamente los autores mostraron que era posible medir luminiscencia *in vivo* e *in vitro*, poniendo especial énfasis en que el sustrato D-luciferina no era capaz de atravesar la cutícula de los nematodo y se requería la permeabilización con DMSO y Tritón X-100, dos compuestos muy utilizados para este fin en ensayos farmacológicos. La determinación de luminiscencia se realizaba entonces en un buffer fosfato, por tiempos cortos y después de un período de incubación determinado, para obtener niveles altos de luminiscencia (Lagido, et al. 2001).

En un trabajo posterior, los mismos autores describen la generación de nematodos bioluminiscentes integrados (cepas PE255, PE254, and PE322) mediante una segunda versión de la enzima luciferasa de *Photinus pyralis* a partir del vector comercial pSP-luc+NF de Promega, pero esta vez fusionada a *gfp*, y bajo 3,7 Kb del promotor del *sur-5*, cuya expresión es ubicua, fuerte, y constitutiva a lo largo de todos los estadios de desarrollo en *C. elegans*. En este trabajo, los autores mostraron que niveles de fluorescencia y luminiscencia del reportero *in vivo* correlacionaban directamente con la cantidad de ATP endógeno de los nematodos, y no con posibles cambios en la actividad transcripcional del gen *sur-5* (Lagido, et al. 2008), mediante ensayos también de tiempos cortos, bajo tratamiento con azida, un compuesto que inhibe reversiblemente la respiración mitocondrial y por ende causa la depleción de ATP. Finalmente, un trabajo publicado en 2009 se describe la utilización de estos mismos nematodos luminiscentes como biosensores multicelulares eucariotas para realizar determinaciones de compuestos tóxicos de cadmio, en un ensayo sensible y por un período de tiempo más largo (19 horas) a partir de poblaciones de larvas L1, que permitía analizar del efecto de este compuesto sobre el desarrollo y la reproducción del nematodo. En este caso, el medio de luminiscencia utilizado consistió de buffer citrato- fosfato pH 6.5, DMSO 1 %, Tritón X-100 0,05% y luciferina 100 μ M.

Recientemente, y mientras un trabajo de nuestro grupo basado en el presente trabajo de tesis estaba siendo enviado para publicar, se describió por primera vez un ensayo automatizado *in vivo* realizado durante el desarrollo con nematodos transgénicos luminiscentes desde huevo hasta estadio joven adulto, portando el constructo *psur-*

5::luc+::gfp (cepa PE255, de Lagido *et al* 2009) (Olmedo, et al. 2015). En este caso, nematodos sincronizados L1 se transferían de a uno y en poblaciones de 20, a placas de 96 wells conteniendo 200 μ l de medio basal S con 10 g/l de peso seco de *E. coli* OP50 y D-luciferina 100 μ M, sin agentes permeabilizantes. Bajo estas condiciones, los nematodos se dejaban desarrollar dentro del well a 21.5°C, y la luminiscencia era registrada durante la progresión del desarrollo larval. Bajo estas condiciones, se reportó que la luz emitida por los animales mostraba un patrón cuadrado, con una caída brusca de la luminiscencia cada vez que los nematodos atravesaban un cambio de cutícula o *molting*, donde la cavidad bucal se cierra por la formación de un *plug* y cesa el bombeo faríngeo. De esa manera, y ante la ausencia de sustancias permeabilizantes de cutícula, los autores proponían que la D-luciferina ingresaba a los nematodos solo a través de las bacterias de las cuales los animales se alimentaban constantemente, mostrando una señal constante y alta, excepto durante las horas que transcurrían entre *moltings*, cuando la señal caía a cero. Adicionalmente, también se mostraba que el ATP no estaba involucrado en la determinación final de la reacción, de manera que no era el sustrato limitante en las condiciones utilizadas (Figura 1.3).

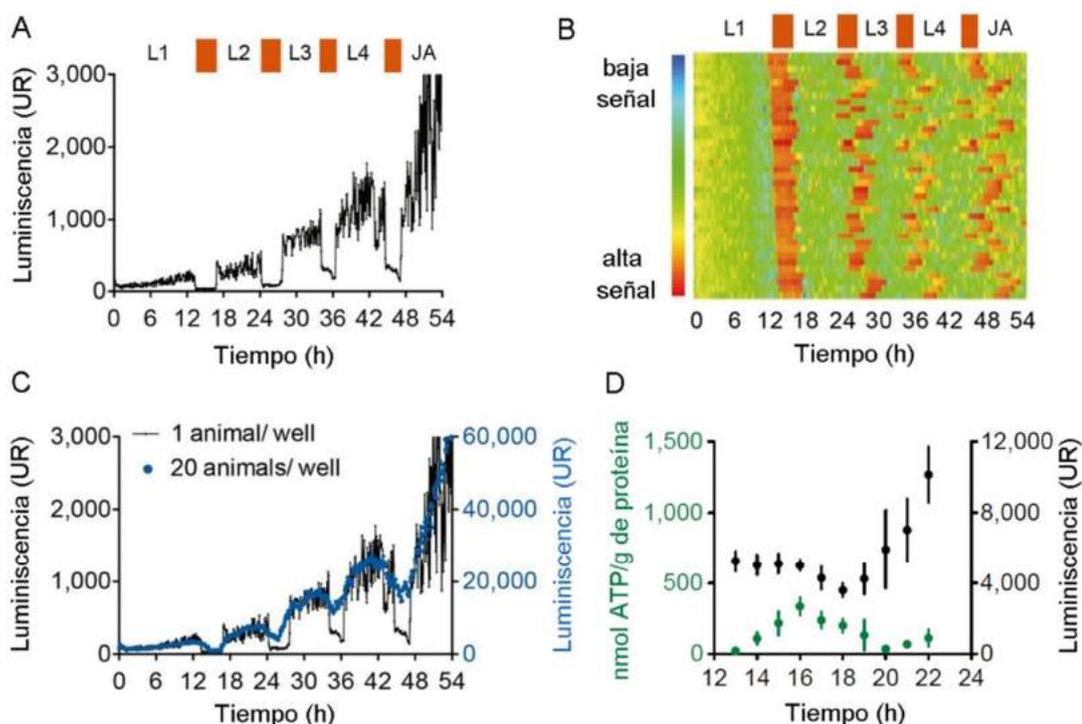


Figura 1.3] La señal de luminiscencia de nematodos transgénicos para *Psur-5::luc+::gfp* refleja el desarrollo larval en nematodos crecidos con bacterias desde L1 hasta joven adulto. A] Bioluminiscencia de larvas individuales (cepa PE255) crecidas desde L1 hasta joven adulto, a lo largo de 54 h a 21.5°C. La ausencia de ingreso de sustrato entre los *moltings* genera una disminución la

cantidad de luz. **B**] *Heat map* que muestra datos corregidos por *detrend* de 37 animales independientemente monitoreados. **C**] Comparación de datos crudos de bioluminiscencia de larvas individuales (cepa PE255) y de poblaciones de 20 animales. **C**] Determinación de ATP *in vitro* y luminiscencia de una población de animales crecidos a 20.5°C entre L1 y L2 (n = 3, se muestran datos promediados \pm error estándar. Imagen adaptada de Olmedo, et al. 2015.

Transgénesis en *C. elegans*: principios básicos de microinyección

La generación de *C. elegans* transgénicos se puede realizar fácil y rápidamente mediante la microinyección de ADN plasmídico dentro de la gónada de un joven adulto hermafrodita (Stinchcomb, et al. 1985). Cuando una mezcla de ADN que contiene un gen de interés y un gen que codifica para un marcador celular autónomo es microinyectado en el nematodo, se produce la formación espontánea de un minicromosoma compuesto de muchas copias de esas moléculas de ADN (Stinchcomb et al., 1985) (Figura 1.4). En general, el ADN inyectado de los distintos plásmidos sufre una recombinación homóloga de manera bastante eficiente dentro de la gónada, de manera que lo mejor es que ambos vectores contengan fragmentos de homología en sus *backbones*, aunque también algo de recombinación homóloga puede ocurrir. Además, el material genético puede ser inyectado de manera circular o lineal, sin cambios en la eficiencia de la técnica (Mello y Fire 1995). Estos concatémicos extracromosomales son establemente heredados, aunque no con la misma eficiencia que los cromosomas reales, dando lugar a una progenie heterogénea, donde solo algunos de los nematodos hijos heredarán al menos una copia del material genético por célula (Mello, et al. 1991).

Luego de un ronda de microinyecciones, se puede entonces esperar hasta que el nematodo adulto inyectado dé lugar a progenie, y seleccionar animales que contengan un *array* que muestre buena expresión de ambos, el gen a ser analizado, que puede ser evaluado por el cambio fenotípico, y el gen marcador. Luego, como consecuencia de procesos mitóticos, se genera la pérdida de estos *arrays* en algunas células dando como resultado animales mosaicos, donde algunas de las células dejan de expresar ambos genes (Figura 1.4).

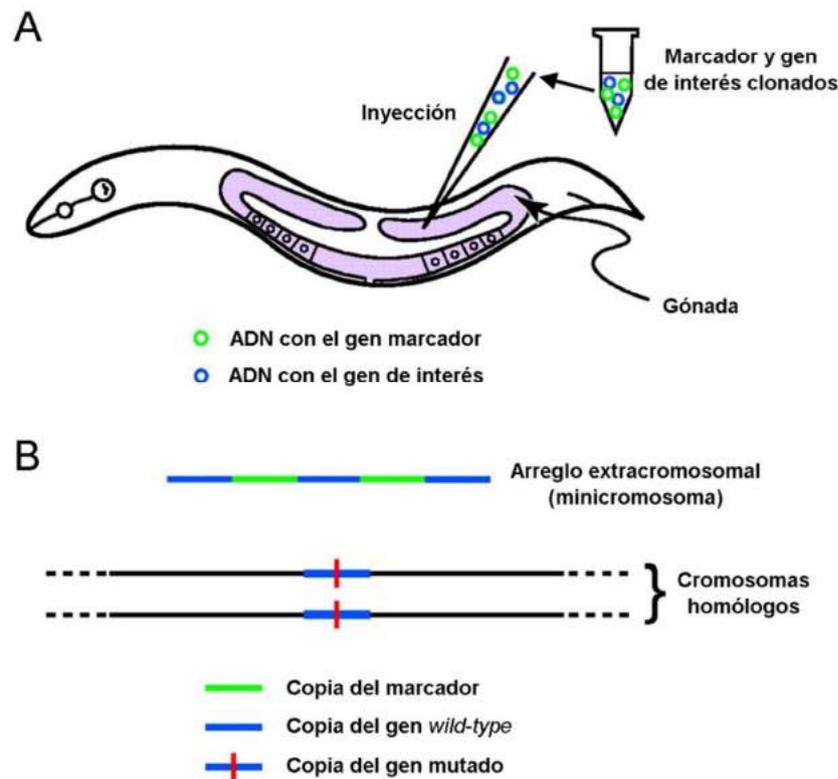


Figura 1.4] Representación esquemática de la formación de arreglos extracromosomales en una microinyección en *C. elegans*. **A]** Plásmidos que contienen el gen de interés (círculo azul, en este caso representando una copia *wild-type* de un gen para rescatar un fenotipo mutante de pérdida de función) y el gen marcador (círculo verde, en este caso codificante para la expresión somática de GFP) se mezclan en un tubo y una pequeña cantidad de la mezcla se coloca en una aguja de microinyección con la cual se inyecta la parte sincicial de la gónada de un joven adulto hermafrodita. **B]** Después de esperar algunos días, la recombinación homóloga entre los ADN inyectados en la F1 da lugar a la formación de minicromosomas, denominados arreglos extracromosomales. Cada *array* puede contener múltiples copias de cada tipo de ADN inyectado. Las copias endógenas del gen en los cromosomas, representadas en azul, portan una mutación de pérdida de función (línea roja) y son complementadas por las copias *wild-type* extracromosomales del *array*. Imagen adaptada de Yochem y Herman, 2003.

La microinyección es la técnica más utilizada para generar nematodos transgénicos que expresan eficientemente el gen de interés en cualquiera de los tejidos, excepto para la línea germinal o estadios embrionarios tempranos (Kelly, et al. 1997). Generalmente, estos arreglos extracromosomales son rutinariamente empleados para la obtención de rescates por transformación (o complementación) de un fenotipo mutante, para expresar un constructo que confiere una característica de interés, tales como proteínas fluorescentes bajo promotores específicos para marcar algún tipo celular o incluso en la inserción de

copias extras de un gen *wild-type* para generar la sobreexpresión del mismo (Mello and Fire, 1995).

Existe una amplia diversidad de marcadores de co-inyección. Entre los más utilizados se encuentra el gen marcador *rol-6(su1006)*, codificado en el plásmido pRF4, que confiere un fenotipo fácilmente observable bajo una lupa de disección. Se trata de un gen mutante codificante para colágeno anormal, el cual funciona como un marcador genético dominante para la transformación (Kramer, et al. 1990). Los animales que portan el alelo semidominante *rol-6(su1006)*, exhiben un cutícula y un cuerpo helicalmente doblados, de manera que las contracciones musculares que normalmente propulsan al nematodo hacia adelante o hacia atrás en un movimiento sinusoidal en este caso causan que ruede sobre su eje longitudinal y se mueva en círculos. Otros marcadores muy utilizados son los que codifican para proteínas fluorescentes, tales como *pmyo-2::mCherry* (expresión de *mCherry* en la faringe), *cc::RFP* (expresión de RFP en *coelomocytes*, 3 pares de células específicas adyacentes a la musculatura somática), *unc-119::GFP* (marcador *pan-neuronal*, de todo el sistema nervioso). Todos estos marcadores se pueden inyectar en nematodos N2 (*wild-type*), pero existe un segundo grupo que es utilizado para rescatar el fenotipo de un gen mutado en la cepa a inyectar, de manera que el plásmido con el gen marcador y el constructo de interés, se coinyectan en la cepa que porta esa mutación. Entre estos se puede mencionar al sistema *pha-1*, basado en la mutación *pha-1(e2123)* sensible a temperatura que es letal en embriones y que causa un crecimiento normal a 15°C pero 100% de letalidad a 25°C. En este caso, los animales transgénicos se seleccionan coinyectando con el gen de interés el plásmido pBX, que lleva la copia *wild-type* del gen *pha-1*, y la búsqueda de transgénicos se realiza cambiando los nematodos de la F1 o la F2 de 15°C a 25°C. Otro ejemplo muy utilizado es el gen marcador *unc-119*, que es expresado en varios plásmidos distintos, y confiere rescate al *background* mutante *unc-119(ed3)*, fácilmente observable por su morfología mas corta y su apariencia curvada, y una movilidad altamente reducida. Los marcadores son muy útiles en todos los casos, pero especialmente en aquellos donde el gen de interés no confiere una característica fenotípica, ya que permiten seleccionar aquellos nematodos de la progenie que portan el arreglo extracromosomal de interés.

Por su naturaleza, la desventaja principal de esta técnica es que no todos los nematodos de la progenie heredan el transgen de interés, ya que el mismo no se inserta en el genoma. Además, los animales transgénicos generados por microinyección llevan arreglos

extracromosomales muy grandes que contienen múltiples copias de los ADN co-inyectados, por lo que el patrón de expresión del transgen puede no mimetizar al del endógeno, especialmente para genes expresados en la línea germinal (Kelly, et al. 1997). Por esta misma razón, los transgenes de *arrays* repetitivos pueden ser fuertemente silenciados en el núcleo de las células germinales y a veces se genera cierta supresión o expresión ectópica del transgen en tejidos somáticos. Asimismo, suele ser difícil predecir y controlar el nivel de expresión entre diferentes líneas transgénicas que portan el mismo array (Mello y Fire 1995). Estos arreglos repetitivos son inestables en las divisiones celulares, pero una fracción de la F1 que contiene los transgenes transmitirá el *array* a lo largo de muchas subsecuentes generaciones sin cambios en la heredabilidad o expresión. Sin embargo, siempre existe cierto grado de inestabilidad mitótica y herencia incompleta, de manera que muchas veces es necesario integrar el arreglo extracromosomal dentro de los cromosomas por algún técnica de radiación, como la gama o la X, que genera rupturas en el ADN e inserción de las moléculas de interés por la propia maquinaria de reparación de ADN del nematodo (Evans 2006).

A pesar de las desventajas, la microinyección sigue siendo la técnica de transgénesis más utilizada actualmente en *C. elegans*, ya que es un método relativamente rápido, económico y muy eficiente, para expresar genes en tejidos somáticos. Con cierta práctica, una persona puede generar de 3-6 líneas transgénicas independientes en solo 10 días a partir de 15-40 gónadas inyectadas, dependiendo de la experiencia del inyector, y con solos unos microlitos de ADN plasmídico purificado en bajas concentraciones (Evans 2006).

Expresión de transgenes en *C. elegans*

En muchos organismos eucariotas además de *C. elegans*, se ha reportado que versiones idénticas de secuencias codificantes para ciertos genes conteniendo o no intrones, pueden exhibir perfiles de expresión dramáticamente diferentes. El *cis-splicing* alternativo de estos intrones puede afectar la expresión génica a muchos niveles, incluyendo transcripción, poliadenilación, exportación del ARN mensajero, eficiencia de traducción y vida media (Nott, et al. 2003). En este sentido, diversos reportes demuestran que la expresión de transgenes en distintos organismos eucariotas y en cultivos celulares es más eficiente en transcriptos que contienen intrones y son capaces de sufrir *cis-splicing*, que de

aquellos clonados directamente como ADN codificantes sin intrones (Brinster, et al. 1988; Buchman y Berg 1988). En particular, en el caso de *C. elegans*, esta característica es vital a la hora de expresar transgenes de manera eficiente, y es ampliamente conocido que la funcionalidad de las regiones no-codificantes dentro de los mismos debe ser considerada cuidadosamente. Algunas proteínas foráneas han logrado ser expresadas en nematodos a partir de ADN codificante, pero en la mayoría de los casos esto resulta en una expresión ineficiente a menos que uno o dos intrones sean insertados dentro del *ORF*. Por esta razón, se han diseñado muchos intrones sintéticos que ayudan a incrementar sustancialmente la expresión de transgenes reporteros en el nematodo. Los ejemplos mas relevantes de mejoras en la expresión mediante el uso de *Artificial Introns (AI)* incluyen el caso del gen *lacZ* (Fire, et al. 1990), *gfp* (Fire, et al. 1998) y *mCherry* (McNally, et al. 2006), y muchos vectores que contienen genes reporteros con intrones se utilizan en la actualidad del kit para expresión en *C. elegans* de Andrew Fire (Fire Lab, *C. elegans Vector Kit*, Addgene). Por ejemplo, algunos de estos vectores, tales como el pPD158.87 contienen la variante de *gfp* S65C, que contiene en su secuencia codificante tres intrones sintéticos (IVSR, IVSS y IVST) y otros, como el pPD95.75, contienen también un intrón artificial (IVSA) entre el sitio múltiple de clonado y el inicio de la secuencia codificante para *gfp* S65C (Figura 1.5).

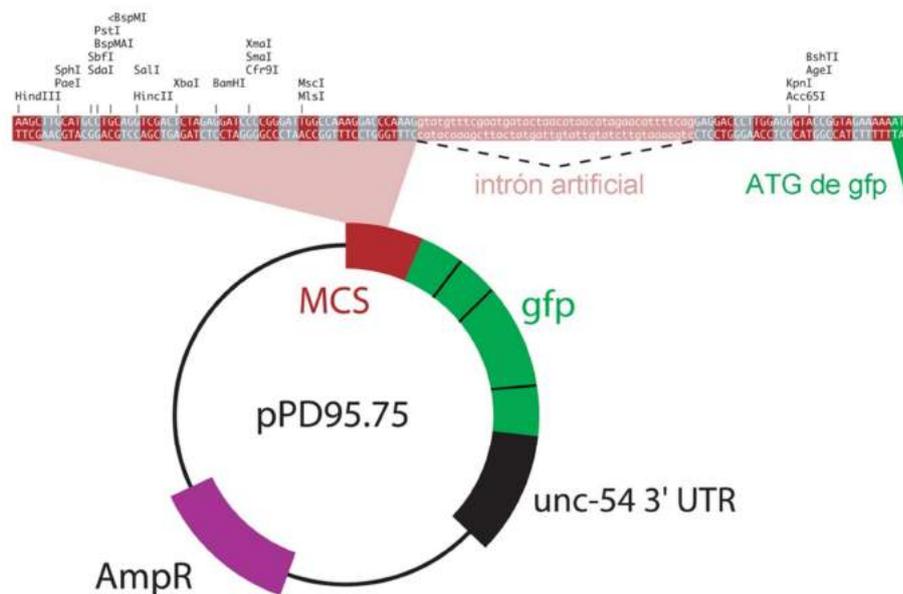


Figura 1.5| Representación esquemática del vector pPD95.75 (Addgene). El sitio múltiple de clonado se encuentra entre HindIII y MlsI. En rosa se muestra el intrón artificial IVSA, que se extiende entre el sitio múltiple de clonado y la región codificante para GFP. El marco de GFP está indicado en gris y rojo, con el primer codón del ORF en verde. Imagen adaptada de Motohashi, et al. 2006.

Otra particularidad a tener en cuenta a la hora de expresar transgenes en *C. elegans* es que, a pesar de tratarse de un organismo eucariota, alrededor del 15 % de todos los genes del nematodo (aproximadamente 1000) están organizados en operones, muy similares a los bacterianos (Blumenthal y Gleason 2003; Blumenthal 2004). Estos operones se transcriben como pre-ARNm policistrónicos que son procesados a monocistrones mientras se transcriben, por clivaje y poliadenilación del extremo 3' de cistrón, a través un mecanismo de *trans splicing* que involucra la adición de una secuencia líder de *splicing* (que puede ser del tipo SL1 o SL2) de 22 nucleótidos, en el extremo 5' de cada ARN mensajero. Estos operones pueden contener entre 2 y 8 secuencias codificantes, que están separadas por una región intercistrónica (*intercistrionic region, ICR*) de alrededor de 100-200 pb que posee sitios internos de unión a ribosomas y una zona rica en U que se utiliza para reclutar ribonucleoproteínas pequeñas nucleares de SL2 (*SL2 snRNP*) que procesan el extremo 5' del cistrón río abajo (Blumenthal y Gleason 2003; Blumenthal 2012). Por ejemplo, en el operón CEOP5428, el procesamiento del pre-ARN mensajero se realiza mediante mecanismos de *cis splicing* a partir de intrones internos de *fib-1* y *rps-16*, así como también de *trans splicing*, que ocurre a través del ICR que separa a ambas secuencias codificantes (Lee, et al. 2010).

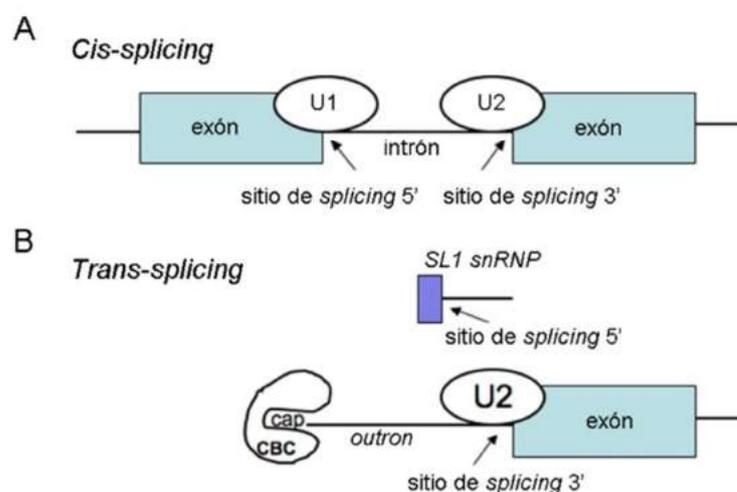


Figura 1.6] Mecanismos de *cis* y *trans-splicing* en *C. elegans*. **A)** En el *cis-splicing*, una *snRNP* U1 se une a un sitio de splicing 5', y una *snRNP* U2 se une a un sitios conocido como *branchpoint* cerca del sitio de splicing 3'. El intrón se escinde y los dos exones se juntan. **B)** En el *trans-splicing*, no existe un sitio de splicing 5' en el pre-ARNm, sino que este es proveído por la SL1 *snRNP* donora, que reconoce una secuencia del *outtron* (región entre el cap 5' y el sitio del *trans-splicing*). El exón SL se une entonces con el primer exón del pre-ARNm. CBC: *nuclear cap binding complex*. Imagen adaptada de Blumenthal, 2005.

Dado que las *ICRs* ocurren naturalmente, se ha descrito su utilización para la generación de vectores bi o tri-cistrónicos, que permiten la expresión de varias proteínas en tándem bajo un mismo promotor (Lee, et al. 2010). Por ejemplo, utilizando la secuencia *ICR* del operón CEOP5428, se ha reportado la co-expresión eficiente del antígeno viral D fusionado a la proteína fluorescente roja (DSRED) separado por un *ICR* de *gfp*, el antígeno viral D fusionado a la proteína fluorescente roja (DSRED) separado por un *ICR* de *fibrilarina::gfp*, e incluso se han logrado co-expresar hasta tres proteínas en tándem (*fibrilarina::gfp::ICR::S-HDAg::dsRed*) (Lee, et al. 2010).

Características del gen *sur-5*

sur-5 es probablemente el gen más renombrado dentro del ambiente de *C. elegans*, y la mayor parte de los investigadores que trabajan con este organismo modelo seguramente hayan utilizado el promotor de este gen alguna vez. Paradójicamente, *sur-5* no es conocido por su función biológica en el nematodo sino porque su promotor dirige la expresión de cualquier transgen de manera ubicua y fuerte a lo largo de todos los estadios de desarrollo y durante el estadio adulto. Esta característica lo ha convertido en el promotor de elección para la sobreexpresión de distintos transgenes de interés, y como se dijo anteriormente, muchos vectores comerciales como los que posee el kit de Andrew Fire, contienen una versión de mínima pero totalmente funcional del promotor original del gen, para realizar fusiones transcripcionales o traduccionales.

Notablemente, existe un único reporte de la caracterización de *sur-5* en el nematodo, que data de 1998 (Gu, et al. 1998). Buscando supresores de un alelo dominante negativo del gen *ras let-60*, el cual actúa en la vía de señalización involucrada en el control de la diferenciación de la vulva en el nematodo, se encontraron tres mutaciones por pérdida de función en el gen *sur-5*. Esto reveló que *sur-5* regula negativamente a uno de los dos grupos de *let-60* durante la inducción de la vulva, y que mutaciones en *sur-5* no generan ningún fenotipo visible. Además, se reportó que *sur-5* actúa de manera sinérgica con *lin-45*, controlando la muerte larval, el movimiento y la puesta de huevos. En este estudio, se clonó por primera vez la secuencia codificante de *sur-5* y se demostró que la misma codifica para una proteína funcional, que muestra además cierta homología con la Acetil-Coenzima A sintetasa de *H. sapiens* (BlastP, 88% de cobertura, 40% de identidad, $E = 2 \times 10^{-162}$), así como

también sitios predictivos de unión a ATP/GTP y AMP (Gu, et al. 1998). Sin embargo, ésta función nunca fue probada experimentalmente, y no se realizaron estudios posteriores para caracterizar con mayor detalle el rol de *sur-5*.

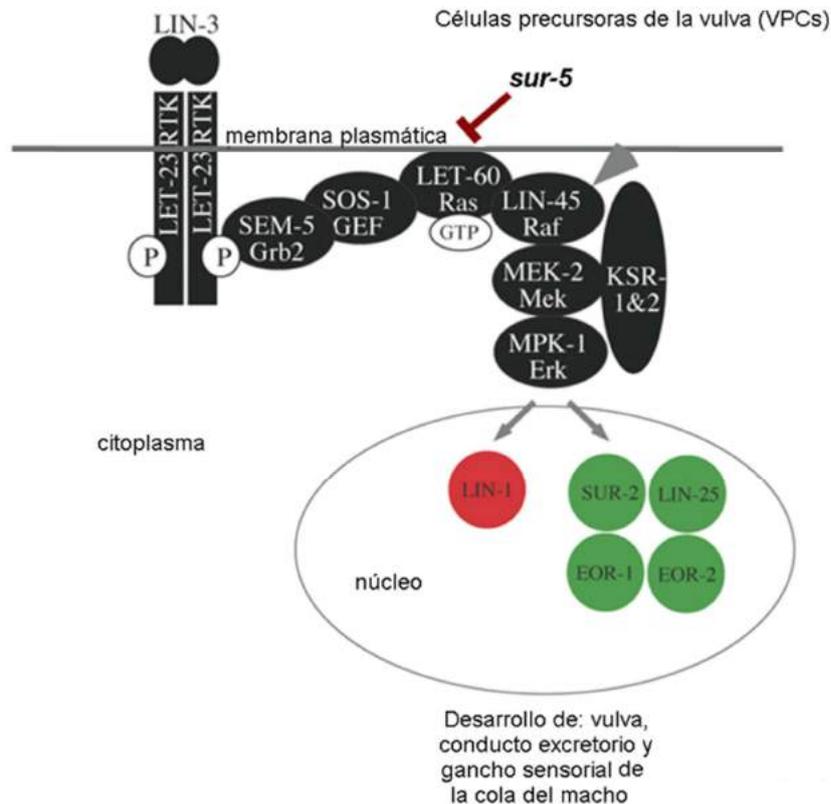


Figura 1.7 | Vía de señalización que participa en el desarrollo de la vulva en *C. elegans*. A | Una señal inductora (LIN-3) proveniente de la llamada *anchor cell* en la gónada, induce una cascada de señalización en tres de las células precursoras de la vulva (VPCs) provocando que éstas adopten el destino final como células de la vulva. Esta cascada de señalización está mediada por el receptor de tirosina quinasa (RTK) LET-23/EGFR/LET-60 Ras GTPasa/MAP quinasa (MAPK) y es utilizada para controlar diversos procesos de desarrollo en *C. elegans*, de los cuales el de la vulva se conoce en detalle. En este caso, LIN-3 actúa como ligando de LET-23/EGFR, lo cual estimula a LET-60/Ras y finalmente a la cascada de MAPK río abajo, conformada por LIN-45/Raf, MEK-2 y MPK-1. Esto induce la expresión de los genes que controlan los diversos procesos de desarrollo. *sur-5* actúa como un supresor de la actividad de Ras, ya sea de manera indirecta o directa. Imagen adaptada de Sundaram, 2006.

En cuanto al patrón de expresión de este gen, una fusión traduccional SUR-5::GFP, con una secuencia artificial de direccionamiento a núcleo (NLS), se expresa en la mayoría de las células somáticas de *C. elegans* (Figura 1.8). Entre las células positivas para *gfp* se encuentran VPCs, neuronas, hipodermis, células musculares, muchas células de la faringe y

algunas en las gónadas, intestino y células excretorias, siendo éstas últimas particularmente fuertes. Además, esta expresión puede ser visualizada desde estadios de desarrollo tempranos, en embriones de 100 a 150 células, hasta el estadio adulto (Gu, et al. 1998).

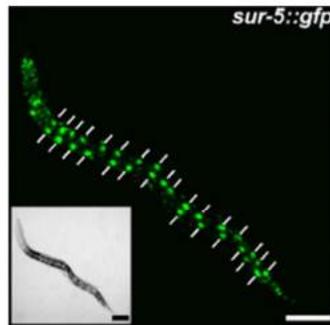


Figura 1.8] Patrón de expresión de SUR-5::GFP. A] Nematodo L4 con un arreglo extracromosomal portando la fusión traduccional SUR-5::GFP (plásmido pTG96), con 3,8 Kb río arriba del 5' del gen y la secuencia codificante completa fusionada en el extremo C terminal con una versión de GFP que presenta una secuencia artificial de localización nuclear (NLS). Imagen adaptada de Jose, et al. 2009.

A partir de todo lo expuesto durante la introducción, en este capítulo se buscará desarrollar un sistema reportero basado en luciferasas, para tratar de aprovechar las ventajas que estas enzimas ofrecen como reporteros para estudiar expresión génica en el nematodo. Para abordar este objetivo, se buscará estudiar la viabilidad de dos sistemas de luminiscencia en el nematodo, el bacteriano de *Vibrio harveyi* y el sistema eucariota *luc*, de *Photinus pyralis*. Con tal fin, se generarán líneas transgénicas estables de nematodos por microinyección, que expresen los genes de las luciferasas propuestos, bajo el promotor del gen *sur-5*. Se caracterizarán ambos sistemas utilizando condiciones de reacción apropiadas para cada enzima y se analizará la factibilidad de la utilización de cada uno para futuras caracterizaciones circadianas en *C. elegans*.

Materiales y Métodos

Cepas de nematodos

En esta sección del trabajo se utilizaron nematodos pertenecientes a la cepa N2 (*wild-type*), adquiridos del *Caenorhabditis Genetics Center* (Universidad de Minnesota, Estados Unidos, <http://cbs.umn.edu/cgc/home>).

Constructos moleculares

Constructos generados a partir del sistema luminiscente de *Vibrio harveyi*:

- *Psur-5::Al::luxAB* fue construido a partir de una versión fusionada de las secuencias *wild-type* de los ORF de *luxA* y *luxB* de *Vibrio harveyi* generada en Szittner, et al, 2003. La versión fusionada se creó originalmente mediante la eliminación del codón de stop de *luxA* de *Vibrio harveyi* y la adición de un linker corto de 10 aminoácidos en marco con la secuencia codificante para *luxB*. Además, en esta versión, el codón de iniciación ATG de *luxB* fue reemplazado por el codón CAG (codificante para glutamina). Esta versión fue clonada en el vector pLG-*luxA-B* y su funcionalidad fue probada en *S. cerevisiae* (Szittner, et al. 2003). Para construir el *Psur-5::Al::luxAB*, se realizó una PCR para amplificar *luxAB* del pLG-*luxA-B* con los sitios KpnI y NheI/XhoI, utilizando los siguientes *primers*:

Forward: 5'- CATCGGGGTACCATGAAATTTGGAACTTCCTTCTC -3'

Reverse: 5'- CCGCTCGAGGCTAGCTTACGAGTGGTATTTGACG -3'

Este fragmento de 2097 pb se cortó con KpnI y XhoI y se ligó con el vector pPD95.75 para *C. elegans* del kit de A. Fire (Addgene). Con esta estrategia, se reemplazó parte del ORF de GFP en pPD95.75 por el constructo *luxAB*. Luego, el fragmento *Al::luxAB* fue cortado con BamHI y NheI y clonado dentro del pPD158.87, bajo el promotor de *sur-5*, reemplazando el ORF de GFP.

- *Psur-5::luxAB::gfp* fue construido mediante la digestión de un fragmento de PCR de 2087 pb conteniendo la fusión *luxAB* sin el codón de stop de *luxB* amplificado de pLG-*luxA-B* con los sitios BamHI y KpnI y la posterior ligación con el vector pPD158.87 para *C. elegans* del kit de A. Fire (Addgene). Con esta estrategia, la región codificante para *luxAB*

quedó fusionada en marco con el *ORF* de GFP en pPD158.87. Los *primers* utilizados para la PCR fueron:

Forward: 5'- CGCGGATCCATGAAATTTGGAAACTTC -3'

Reverse: 5'- CGGGGTACCACGAGTGGTATTTGACG -3'

- Para generar el *Psur-5::Al::luxA^{CO}::ICR::luxB^{CO}*, se construyó in silico el fragmento *luxA::ICR::luxB*, a partir de las secuencias *wild type* de *Vibrio harveyi* y de la secuencia de la región intercistrónica (*ICR*) previamente descrita (Lee, et al. 2010). Con el fin de optimizar el código de codones de *luxA* y *luxB* para *C. elegans* y de obtener la secuencia *icr*, se realizó una síntesis de novo de todo el constructo en GenScript (Estados Unidos). El constructo sintético resultante de 2316 pb fue clonado en pUC57-*luxA^{CO}::ICR::luxB^{CO}* con los sitios KpnI y BamHI. Aprovechando sitios internos que se agregaron durante la síntesis, se digirió el *luxA^{CO}::ICR::luxB^{CO}* con los sitios KpnI y EcoRI y se ligó con el vector pPD95.75 para *C. elegans* del kit de A. Fire (Addgene). Con esta estrategia, se reemplazó el *ORF* de GFP en pPD95.75 por el *luxA^{CO}::ICR::luxB^{CO}*. Luego, el fragmento *Al::luxA^{CO}::ICR::luxB^{CO}* fue cortado con BamHI y EcoRI y clonado dentro del pPD158.87, bajo el promotor de *sur-5*, reemplazando el *ORF* de GFP.

- *Psur-5::luxA^{CO}::ICR::luxB^{CO}::gfp* fue construido mediante la digestión de un fragmento de PCR de 2301 pb conteniendo la fusión *luxA^{CO}::ICR::luxB^{CO}* sin el codón de stop de *luxB^{CO}* con los sitios BamHI y KpnI y la posterior ligación con el vector pPD158.87 para *C. elegans* del kit de A. Fire (Addgene). Con esta estrategia, la región codificante para *luxA^{CO}::ICR::luxB^{CO}* quedó fusionada en marco con el *ORF* de GFP en pPD158.87. Los *primers* utilizados para la PCR fueron:

Forward: 5'- CGCGGATCCATGAAATTCGGAAACTTCCTG -3'

Reverse: 5'- GGGGTACCAGGAATGGTATTTACGAT -3'

Constructos generados a partir del sistema luminiscente de *Photinus pyralis*:

- *Psur-5::luc* fue construido mediante la digestión de un fragmento de PCR de 1671 pb amplificado de la secuencia codificante para la luciferasa de *Photinus pyralis* proveniente del pGL3-Basic Vector (Promega) con los sitios KpnI y EcoRI y la posterior ligación con el vector pPD158.87 para *C. elegans* del kit de A. Fire (Addgene). Con esta estrategia, se

reemplazó el *ORF* de GFP en pPD158.87 por el de la luciferasa. Los *primers* utilizados para la PCR fueron:

Forward: 5'-CATCGGGGTACCATGGAAGACGCCAAAAAC-3'

Reverse: 5'-GGAATTCTACACGGCGATCTTTCCGCCCT-3'

- *Psur-5::Al::luc* fue construido mediante la digestión del mismo fragmento de PCR de 1673 pb amplificado de la secuencia codificante para la luciferasa de *Photinus pyralis* proveniente del pGL3-Basic Vector (Promega) con los sitios KpnI y EcoRI y la posterior ligación con el vector pPD95.75 para *C. elegans* del kit de A. Fire (Addgene). Con esta estrategia, también se reemplazó el *ORF* de GFP en pPD95.75 por el de la luciferasa. Luego, el fragmento *Al::luc* fue cortado con BamHI y EcoRI y clonado dentro del pPD158.87, bajo el promotor de *sur-5*, reemplazando el *ORF* de GFP.

- Para la construcción del *Psur-5::luc::ICR::gfp*, se aprovechó el pUC57-*luxA^{co}::ICR::luxB^{co}* sintetizado de GenScript para reemplazar el *luxA^{co}* que se encontraba entre los sitios KpnI y BglII por el *ORF* de la luciferasa de *Photinus pyralis* de 1679 pb amplificado del pGL3-Basic Vector (Promega) con los mismos sitios, utilizando los siguientes *primers*:

Forward: 5'-CATCGGGGTACCATGGAAGACGCCAAAAAC-3'

Reverse: 5'-CATGAGAAGATCTTTTACACGGCGATCTTTCCGC-3'

Luego, se amplificaron 900 pb del *ORF* de *gfp* del pPD158.87 del kit de A. Fire (Addgene) con los sitios Sall (compatible con XhoI) y EcoRI, con los siguientes *primers*:

Forward: 5'-ACGCGTCGACATGAGTAAAGGAGAAGAAC-3'

Reverse: 5'-CGGAATTCTTAGTTCGTCATGCCATG-3'

Este fragmento se clonó en el pUC57-*luc::ICR::luxB^{co}* entre los sitios de XhoI y EcoRI, generando el pUC57-*luc::ICR::gfp*. Finalmente, se cortó todo el constructo *luc::ICR::gfp* de 2261 pb con KpnI y EcoRI y se ligó con el pPD158.87, bajo el promotor de *sur-5*, reemplazando el *ORF* de GFP.

- *Psur-5::luc::gfp* fue construido mediante un fragmento de 1659 pb amplificado por PCR de la luciferasa de *Photinus pyralis* del pGL3-Basic Vector (Promega), con el último codón de STOP removido, y con los sitios BamHI y KpnI. Posteriormente, se digirió y ligó este fragmento con el of pPD158.87 (Addgene) con las mismas enzimas de restricción, y en marco

con *gfp* para generar una proteína de fusión. El *ORF* de la luciferasa fue amplificado con los siguientes *primers*:

Forward: 5'- GCGGATCCATGGAAGACGCCAAAAAC -3'

Reverse: 5'- CGGGGTACCAACACGGCGATCTTTCCGCC -3'

- *Psur-5::luc::gfp::PEST* fue construido mediante la fusión del fragmento *gfp::PEST* de 1012 pb digerido del vector pAF207 (Frand, et al. 2005) con KpnI y EcoRI, y el *backbone* de pPD158.87-*sur-5::luc* (5795pb) obtenido a partir de una digestión con las mismas enzimas del pPD158.87-*sur-5::luc::gfp*.

De esta manera, en todos los casos, el vector utilizado pPD158.87 dirige la expresión de *luc::gfp* al citoplasma celular, controlada por *sur-5*.

Todos los *primers* utilizados fueron diseñados con el software online *primer3 PLUS* (<http://primer3plus.com/>) y sintetizados en Thermo Fisher Scientific (Estados Unidos) o en Genbiotech SRL (Argentina) y en todos los casos, las secuencias de los constructos fueron validadas por secuenciación por la técnica de Sanger en Macrogen (Corea). Todos los diseños de las estrategias para los clonados y las evaluaciones de las secuenciaciones se realizaron mediante el software CloneManager7 (*Scientific & Educational Software*, Estados Unidos).

Reacciones de PCR a punto final

Las reacciones de PCR fueron realizadas utilizando un termociclador *MasterCycler* (Eppendorf, Alemania). Todas las secuencias codificantes para las distintas proteínas se amplificaron utilizando *Platinum Taq DNA Polymerase* (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos). El programa de PCR utilizado fue de 2 minutos a 92°C y 35 ciclos de: 30 segundos a 92°C, 30 segundos a 55-65°C dependiendo de la temperatura de *melting* de cada *primer*, extensión específica para cada fragmento a 72°C y una extensión final de 5 minutos a 72°C.

Electroforesis desnaturalizante, revelado y aislamiento de ácidos nucleicos

Tanto las reacciones de PCR como las digestiones fueron corroboradas mediante electroforesis preparativa en geles de agarosa 0.8 % (Genbiotech, Argentina), utilizando para

la corrida buffer TAE 1X (Stock TAE 50X: Tris-Acetato 2 M, EDTA 0,05 M; Sigma-Aldrich, Estados Unidos) y como marcador de peso molecular *Ladder 1kb plus* y *250 bp* (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos). La tinción de ácidos nucleicos se realizó con *GelRed 0,5X* (Biotium stock 10000X, Estados Unidos), se analizó en un transiluminador UV (DyNA Light, Labnet International, Estados Unidos) y la imagen fue digitalizada mediante el programa *Kodak Digital Images* (Kodak, Estados Unidos).

La purificación de ácidos nucleicos lineales a partir de los geles de agarosa se llevó a cabo mediante la utilización del kit comercial *HiYieldTMGel/PCR DNA Mini Kit* (Real Biotech Corporation, Estados Unidos) y la purificación de los plásmidos se realizó mediante el kit de miniprep *illustra plasmidPrep Mini Spin Kit* (GE Healthcare, Estados Unidos), siguiendo en ambos casos los protocolos detallados por los proveedores. Todos los ácidos nucleicos fueron cuantificados por espectroscopía mediante *Nanodrop* (Thermo Scientific, Estados Unidos).

Todos los fragmentos amplificados mediante PCR fueron clonados primero mediante el kit *pGEM-T Easy Vector* (Promega, Estados Unidos) siguiendo las instrucciones del proveedor. El resto de los constructos antes descritos fueron generados mediante ligaciones estándares, utilizando la enzima *T4 DNA Ligase* con su respectivo buffer de reacción según las especificaciones del proveedor (Thermo Scientific, Estados Unidos). Los cálculos de relación de cantidad de masa de inserto/vector se realizaron mediante la herramienta *BioMath Calculators* disponible en la web (Promega, Estados Unidos). Todos los plásmidos resultantes fueron transformados en cepas de *E. coli* top10 electrocompetentes preparadas y transformadas mediante el protocolo estándar (Green y Sambrook 2012).

Generación de los animales transgénicos mediante microinyección

Los animales transgénicos fueron generados por la técnica de microinyección estándar (Mello y Fire 1995), mediante una colaboración y estadía en el laboratorio de la Dra. Claire Bénard, del *Department of Neuroscience, UMass, Worcester, Massachusetts*, Estados Unidos. Para ello, se utilizó un sistema compuesto de un microscopio invertido *DIC Axiovert 135* (Carl Zeiss AG, Germany), un micromanipulador *Joystick MN-151* mecánico (Narishige, Japón) con un brazo *H-7* para sostener la micropipeta de inyección y un microinyector *FemtoJet express* (Eppendorf AG, Germany). Para fabricar las micropipetas de

inyección se utilizaron capilares de vidrio de 100 mm de largo y 1,2 mm de diámetro (World Precision Instruments, Estados Unidos) y un *puller Sutter* modelo P-87 (Sutter Instruments, Estados Unidos). Para mantener los gusanos en el *pad* de agarosa se utilizó aceite *Halocarbon 700* (Sigma-Aldrich, Estados Unidos).

Los constructos fueron inyectados a una concentración de 50 o 100 ng/ μ l, con pRF4 (*rol-6(su1006)*) como marcador a una concentración de 100 ng/ μ l en la cepa N2 (*wild-type*). Todos los ensayos de luminiscencia fueron realizados con cepas transgénicas con los arreglos extracromosomales y una línea transgénica integrada con el constructo *Psur-5::luc*::gfp* se obtuvo de manera espontánea (100 % de tasa de transmisión de ambos plásmidos) y fue seleccionada para experimentos futuros.

Microscopía de fluorescencia

Las imágenes de fluorescencia se realizaron montando nematodos de diferentes estadios seleccionados bajo una lupa de microscopía *SMZ100* (Nikon, Estados Unidos) en *pads* de agarosa al 5% sobre portaobjetos. Los nematodos se inmovilizaron con 20 μ l de Azida 50 mM (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) y con un cubreobjetos. El patrón de expresión de cada constructo fue analizado mediante un microscopio *Axio Scope.A1* (Zeiss, Alemania) equipado con una fuente de luz *X-Cite 120Q* (EXFO, Canadá) y una cámara *Axiocam 506 mono* (Zeiss, Alemania).

Cepa de levadura, transformación y condiciones de cultivo

Para los ensayos de puesta a punto del sistema de luminiscencia bacteriano, se utilizaron levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) de la cepa *W303-1A*, *MAT α* , *leu2-3, 112*, *ura3-1*, *his3-11 15*, *trp1-1*, and *ade2-1*. Las levaduras fueron transformadas con los plásmidos pLG-luxA-B (*ura⁺*, *amp^r*), pRS-*frp* (*leu⁺*, *amp^r*) o ambos mediante un tratamiento con acetato de litio (Gietz y Woods 2002). Las células transformadas fueron seleccionadas a 30°C en placas de agar con medio *Yeast Nitrogen Base* (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) al 0,67% suplementado con Galactosa 2 % (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) y 0,1 % de medio *Synthetic Drop-out* (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) sin el complemento de uracilo y/o leucina para la selección de los transformantes. Para los cultivos líquidos, se utilizó el mismo

medio sin agar y se incubaron las levaduras transformadas a 30°C y 250 rpm y el crecimiento fue seguido por absorbancia a 600 nm (DO₆₀₀).

Ensayos de luminiscencia

Ensayo de luminiscencia con el sistema *luxAB*

En el caso de las levaduras transformadas con el sistema pLG-luxA-B - pRS-*frp*, se realizaron medidas in vivo tomando 200 µl de cultivos de *S. cerevisiae* transformadas con pRS-*frp*, pLG-luxA-B ó pLG-luxA-B+pRS-*frp* crecidas ON a 30°C y 200 rpm hasta una DO₆₀₀ ≈ 2. Los cultivos fueron crecidos con Glucosa 1 % (control negativo) o inducidos con Galactosa 1 % y se utilizó decanal 1 % como sustrato. Una vez agregado el sustrato, se incubó durante 2 minutos y la señal fue integrada durante 10 segundos, en el rango de los 490 ± 40 nm, utilizando un luminómetro Synergy HTX Multi-Mode Microplate (BioTek, Estados Unidos) a 30°C. También se realizaron ensayos *in vitro*, con el objetivo de analizar si la enzima luciferasa era capaz de resistir a un protocolo de lisado por sonicación, que fue realizado a partir de 500 µl de cultivos de *S. cerevisiae* transformadas con pLG-luxA-B+pRS-*frp* y crecidos bajo las mismas condiciones antes mencionadas. La sonicación se realizó utilizando un sonicador VCX 130PB Vibra-Cell ultrasonic (Sonics, Newtown, Estados Unidos), en dos ciclos de 15 segundos, a 40 % de potencia. Se centrifugaron las muestras durante 10 minutos a 5000 rpm y se tomaron 200 µl del sobrenadante. En este caso, la luminiscencia fue registrada de la misma manera que antes, pero con el agregado de decanal 1 % (Sigma Aldrich, Estados Unidos) suplementado con FMNH₂ 10 µM, NADPH 0,1 mM, BSA 0,2 % y 1 U de NAD(P)H:FMN Oxidoreductasa de *Photobacterium fischeri* (Roche, Alemania).

En el caso de los nematodos, se sincronizaron las poblaciones al mismo estadio mediante una sincronización por el método de cloro y se seleccionaron los nematodos L4 para el registro como se describió durante los métodos generales.

Se realizaron ensayos *in vivo* con distintas cantidades de nematodos L4 transgénicos con el constructo *Psur-5::luxA^{co}::icr::luxB^{co*}::gfp* en buffer fosfato pH 7, decanal 1 % (Sigma Aldrich, Estados Unidos), distintas concentraciones de FMNH₂ (10-100 µM) y 1U de NAD(P)H:FMN Oxidoreductasa de *Photobacterium fischeri* (Roche, Alemania). Una vez agregado el sustrato, se incubó durante 2 minutos y la señal fue integrada durante 10-60 segundos, en el rango de los 490 ± 40 nm, utilizando un luminómetro Synergy HTX Multi-

Mode Microplate (BioTek, Estados Unidos) a 25°C (mínima temperatura permitida por el equipo). Los ensayos *in vitro*, se llevaron a cabo mediante un lisado de 1000, 2000 y 4000 nematodos adultos transgénicos, sonicados utilizando un sonicador VCX 130PB Vibra-Cell ultrasonic (Sonics, Newtown, Estados Unidos), en dos ciclos de 15 segundos, a 40 % de potencia. Se centrifugaron las muestras durante 10 minutos a 5000 rpm para descartar restos de nematodos y se tomaron 200 µl del sobrenadante. En este caso, la luminiscencia fue registrada de la misma manera que antes, pero con el agregado de decanal 1 % (Sigma Aldrich, Estados Unidos) solo o suplementado con FMNH₂ 10 µM, NADPH 0,1 mM, BSA 0,2 % y 1 U de NAD(P)H:FMN Oxidoreductasa de *Photobacterium fischeri* (Roche, Alemania).

Ensayo de luminiscencia con el sistema *luc*

Los registros de luminiscencia se realizaron en placas de Petri de 35 mm o en placas *multiwell*, en ambos casos bajo temperatura y oscuridad constantes.

Ensayo en placa de Petri bajo oscuridad y 20°C

Para este ensayo, 8 poblaciones de 100 nematodos L4 crecidas como se describió anteriormente (cada población fue considerada como una réplica biológica independiente, n = 8) fueron seleccionadas manualmente a ZT10 (19 h) y pasadas a 200 µl de buffer M9 como se describió previamente mediante picado bajo lupa de fluorescencia. Los nematodos se lavaron dos veces con M9 para remover todas las trazas de bacterias y se transfirieron a placas de Petri de 35 mm (Greiner Cellstar, Estados Unidos) con 1 ml de medio de luminiscencia, que fueron selladas con silicona (SYLGARD-184-DOWC, Estados Unidos) para evitar la evaporación y la contaminación del medio de cultivo. El medio de luminiscencia fue probado con distintas concentraciones de D-luciferina (100 µM, 1 mM y 10 mM) y distintos agentes permeabilizantes (0,05% de Tritón X-100 y 1 % de DMSO). Posteriormente, las placas fueron colocadas a ZT12 (21 h) en un luminómetro AB-2550 Kronos Dio (ATTO, Japón) y la luminiscencia fue monitoreada en oscuridad constante a 20°C (mínima temperatura que permite el equipo) durante 5 días. La señal emitida por los nematodos fue integrada por 1 minuto y registrada con un intervalo de 10 minutos.

Ensayos de luminiscencia en placa *multiwell* bajo oscuridad y 25°C

En este caso, poblaciones de 10, 20, 50 y 100 nematodos L4 cada una (cada población fue considerada como una réplica biológica independiente) fueron seleccionadas manualmente comenzando a ZT1 (10 h) y pasadas a 200 µl de buffer M9 como se describió previamente mediante picado bajo lupa de fluorescencia. Las poblaciones de nematodos se lavaron dos veces con M9 para remover todas las trazas de bacterias y se resuspendieron en 200 µl de medio de luminiscencia (1 mM of D-luciferina y 0,05% de Tritón X-100). Luego, se transfirieron a una placa de 96 *wells* blanca, de fondo plano (Greiner, Estados Unidos), se selló la misma con un film óptico (*Microseal B PCR Plate Sealing Film*, Biorad, Estados Unidos) y se realizaron dos perforaciones pequeñas con una aguja de 25G estéril, para evitar la condensación. El proceso completo de selección manual requirió aproximadamente 3 horas para completar 48 *wells*. Solamente la mitad de los *wells* fueron utilizados y de manera intercalada, para evitar la superposición de la señal de poblaciones adyacentes, y los vacíos fueron llenados con 200 µl de agua estéril de para reducir la evaporación y mantener la temperatura homogénea en toda la placa. Las placas fueron dejadas por 72 h mas adentro de la incubadora bajo el ciclo LO/FC (18,5°C-20°C) y a ZT12 (21 h) del tercer día, se colocó la placa en un luminómetro *Synergy HTX Multi-Mode Microplate* (BioTek, Estados Unidos). La luminiscencia fue monitoreada en oscuridad constante a 25°C (mínima temperatura que permite el equipo) durante 3 días. La señal emitida por los nematodos fue integrada por 10 segundos y registrada con un intervalo de 30 minutos.

Ensayos de luminiscencia en placa *multiwell* bajo oscuridad y 20°C

En este caso, poblaciones 100 nematodos L4 cada una (cada población fue considerada como una réplica biológica independiente) fueron seleccionadas manualmente comenzando a ZT1 (10 h) y pasadas a 200 µl de buffer M9 como se describió previamente mediante picado bajo lupa de fluorescencia. Las poblaciones de nematodos se lavaron dos veces con M9 para remover todas las trazas de bacterias y se resuspendieron en 200 µl de medio de luminiscencia (1 mM of D-luciferina y 0,05% de Tritón X-100). Luego, se transfirieron a una placa de 96 *wells* blanca, de fondo plano (Greiner, Estados Unidos), se selló la misma con un film óptico (*Microseal B PCR Plate Sealing Film*, Biorad, Estados Unidos) y se realizaron dos perforaciones pequeñas con una aguja de 25G estéril, para evitar la condensación. Posteriormente, a ZT12 (21 h) del mismo día, se colocó la placa en un

luminómetro *Berthold Centro LB 960 microplate luminometer* (Berthold Technologies, Alemania) dentro de una incubadora *E-30B* (Percival, Estados Unidos) para controlar las condiciones de temperatura y luz. El *software* *Microwin 2000 4.43* (Mikrotek 2 Laborsysteme, Alemania) fue utilizado para adquirir los datos. La luminiscencia fue monitoreada en oscuridad constante a 20°C, durante 7 días. La señal emitida por los nematodos fue integrada por 10 segundos y registrada con un intervalo de 30 minutos.

Ensayo de toxicidad por actividad locomotora

Para la realización de los experimentos de registro de actividad locomotora, poblaciones de gusanos N2 (*wild-type*) se crecieron bajo las mismas condiciones de entrenamiento antes mencionadas y se sincronizaron al mismo estadio de desarrollo utilizando el método de cloro antes descrito. Posteriormente, los embriones se resuspendieron en 3,5 ml de buffer M9, suplementado con Antibiótico-antimicótico 1X (Thermo Fisher Scientific) y 10 µg/ml de tobramicina (Tobrabiocin, Denver Farma) y se dejaron en agitación durante 24 horas a 50 rpm en un agitador tipo vaivén (Serie 2014, Decalab, Argentina) bajo las mismas condiciones de LO/FC (400 lux; 18.5/20°C, $\Delta = 1.5^{\circ}\text{C} \pm 0.25^{\circ}\text{C}$). A las 10 de la mañana del siguiente día (ZT1) las larvas que eclosionaron de los huevos se transfirieron a nuevas placas de NGM sembradas con *E. coli* HB101 (4000 L1s por placa) y se dejaron crecer hasta el estadio L4 por 48 horas en las mismas condiciones. A las 10 de la mañana (ZT1), se levantaron los nematodos de las placas, se lavaron con buffer M9 para descartar posibles restos de bacterias y poblaciones de 40 nematodos por *well* se transfirieron a placas de 96 *wells* transparente, de fondo plano (Greiner, Estados Unidos) conteniendo el medio de cultivo desarrollado para luminiscencia pero suplementado con leche descremada al 2 %. Las placas fueron cubiertas con cinta adhesiva para evitar la evaporación del medio y se realizaron dos orificios pequeños con aguja estéril de 25G para evitar la condensación.

El registro de la actividad locomotora de los nematodos se llevó a cabo mediante un sistema original desarrollado en nuestro laboratorio (Simonetta y Golombek 2007) con un equipo basado en haces infrarrojos WMicrotrackert (Phylum Technologies, Argentina), a 18.5°C y en oscuridad constante. Los datos del sistema de registro fueron adquiridos a intervalos de 1 minuto y agrupados de a 30 minutos para su procesamiento. Las condiciones

fólicas y térmicas fueron controladas con una incubadora I-291PF (INGELAB, Argentina) y la temperatura fue monitoreada utilizando Termocrones *iButton DS1921H-F5* (Maxim Integrated, Estados Unidos). Tubos fluorescentes *4xPhilips Daylight TL-D 18W/54-765 1SL* fueron utilizados como fuente de iluminación (CT = 6200K y CRI = 72 Ra8).

Ensayo de cicloheximida para determinar la vida media

Para la determinación de la vida media de la proteína LUC::GFP, nematodos transgénicos con el constructo *Psur-5::luc::gfp* se crecieron una semana bajo luz constante (400 lux) a 20°C, con el objetivo de desincronizarlos y evitar cualquier posible fluctuación a causa de alguna ritmicidad en la determinación posterior de luminiscencia. Cuando las placas se encontraban llenas de hermafroditas adultos con huevos se sincronizaron mediante el método de cloro (Lewis y Fleming 1995) con el fin de extraer los huevos. Posteriormente, los embriones se resuspendieron en 3,5 ml de buffer M9 (Na₂HPO₄ 42 mM, KH₂PO₄ 22 mM, NaCl 85,5 mM, MgSO₄ 1 mM), suplementado con Antibiótico-antimicótico 1X (Thermo Fisher Scientific) y 10 µg/ml de tobramicina (Tobratic, Denver Farma) y se dejaron en agitación durante 24 horas a 50 rpm en un agitador tipo vaivén (Serie 2014, Decalab, Argentina) bajo luz constante (400 lux) a 20°C. A las 10 de la mañana del siguiente día las larvas que eclosionaron de los huevos se transfirieron a nuevas placas de NGM sembradas con *E. coli* HB101 (4000 L1s por placa) y se dejaron crecer hasta el estadio L4 por 36 horas en las mismas condiciones. Posteriormente, nematodos L4 que presentaban mayor expresión de GFP fueron seleccionados manualmente mediante picado bajo una lupa de microscopía (SMZ100, Nikon, Estados Unidos) equipada con un sistema de epi-fluorescencia basado en tecnología LED (Multi-TK-LED, Tolket, Argentina) para evitar el calentamiento sobre la placa.

En este caso, poblaciones de 100 nematodos L4 cada una (cada población fue considerada como una réplica biológica independiente, n = 4) fueron seleccionadas manualmente y pasadas a 200 µl de buffer M9 como se describió previamente. Las poblaciones de nematodos se lavaron dos veces con M9 para remover todas las trazas de bacterias y se resuspendieron en 200 µl de medio de luminiscencia (1 mM of D-luciferina y 0,05% de Tritón X-100). Luego, se transfirieron a una placa de 96 *wells* blanca, de fondo plano (Greiner, Estados Unidos), y antes de medir luminiscencia, se agregó vehículo (etanol) a 4 *wells* y 500 µg/ml de cicloheximida (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) (Burkewitz, et al.

2012) a otros 4 *wells* (tiempo 0). Se selló la placa con un film óptico (Microseal B PCR Plate Sealing Film, Biorad, Estados Unidos) y se realizaron dos perforaciones pequeñas con una aguja de 25G estéril, para evitar la condensación. Posteriormente, se colocó inmediatamente la placa en un luminómetro *Berthold Centro LB 960 microplate luminometer* (Berthold Technologies, Alemania) dentro de una incubadora *E-30B* (Percival, Estados Unidos) para controlar las condiciones de temperatura y luz. El software *Microwin 2000 software 4.43* (Mikrotek 2 Laborsysteme, Alemania) fue utilizado para adquirir los datos. La luminiscencia fue monitoreada en luz constante constante a 20°C durante 2 horas. La señal emitida por los nematodos fue integrada por 10 segundos y registrada con un intervalo de 10 minutos.

Análisis de Datos

Los datos de luminiscencia fueron tomados como datos crudos de cada luminómetro, se extrajo el ruido de fondo (restando el *background*) y en el caso de los experimentos durante varios días, se normalizaron los niveles de cada registro al valor máximo inicial de luminiscencia, para poder compararlos entre ellos. Todos los datos fueron expresados como valores de luminiscencia promedio \pm SEM, crudos o relativos (URL, unidades relativas de luminiscencia).

Los datos crudos del sistema de registro de actividad locomotora fueron adquiridos a intervalos de 1 minuto y agrupados de a 30 minutos para los gráficos de actividad y el cálculo de la actividad total promedio \pm SEM. El ensayo de toxicidad fue analizado por ANOVA de una vía, seguido por un *test* de Dunnet de comparación de grupos.

Los resultados de luminiscencia del ensayo de determinación de la vida media de la proteína LUC::GFP mediante cicloheximida, fueron analizado a partir de los datos crudos de sin el ruido de fondo (restando el *background*) y se normalizaron los niveles de cada registro al valor máximo inicial de luminiscencia, para poder compararlos entre ellos. Los datos fueron expresados como valores de luminiscencia relativos (URL, unidades relativas de luminiscencia) y expresados como el valor promedio \pm SEM. Para terminar la vida media, se realizó un ajuste de la señal a una exponencial del tipo $A \cdot e^{(-x/t)}$ y se calculó el tiempo correspondiente (en minutos) para alcanzar el 50% del valor de luminiscencia inicial.

Resultados

Constructos moleculares

Por cuestiones de extensión, de densidad de información y de facilidad de lectura, todos los resultados relacionados con la generación de los distintos constructos, es decir, los clonados mediante ingeniería genética, y los correspondientes pasos intermedios que fueron controlados mediante electroforesis preparativa en geles de agarosa, no fueron incluidos dentro de la presente tesis. Las secuencias de todos los constructos finales obtenidas mediante secuenciación en Macrogen, están disponibles para su visualización en las siguientes direcciones web:

Constructo	Link
	https://drive.google.com/open?id=0B7qiEW415y6SV2FITDBmcm1IN3M
	https://drive.google.com/open?id=0B7qiEW415y6SNIRUQjIXRTR6N0U
	https://drive.google.com/open?id=0B7qiEW415y6SWXRsoXJ0WVFyYmM
	https://drive.google.com/open?id=0B7qiEW415y6SbFR2WTIfS0Fzdm8
	https://drive.google.com/open?id=0B7qiEW415y6SVVh6MjZVQlBYNjA
	https://drive.google.com/open?id=0B7qiEW415y6SWWNfREVlcXpDLWs
	https://drive.google.com/open?id=0B7qiEW415y6SZlc3ZmIHdVFfZEE
	https://drive.google.com/open?id=0B7qiEW415y6SeFQ2N2JHZm9CZ3M
	https://drive.google.com/open?id=0B7qiEW415y6SbW9NMnROTzNMT1E

Sistema de luminiscencia basado en *luxAB* de *Vibrio harveyi*

Como primera instancia para poner a punto el sistema de luminiscencia bacteriano, se utilizó el sistema basado en los plásmidos pLG-*luxA-B* y pRS-*frp*, desarrollados previamente (Szittner, et al. 2003). El pLG-*luxA-B* codifica para los genes *luxA* y *luxB* de la luciferasa de *Vibrio harveyi*, mientras que el pRS-*frp* codifica para la NAD(P)H flavina reductasa, que como se describió previamente, está implicada en la producción de FMNH₂.

Se registró la luminiscencia de cultivos de *S. cerevisiae* transformadas con estos plásmidos, cultivados con Glucosa (control negativo) o el Galactosa (inducción) y crecidos en agitación a 30°C y 200 rpm hasta una DO₆₀₀ ≈ 2. Después de la adición de decanal 1%, las levaduras transformadas con pLG-*luxA-B* y pLG-*luxA-B*+pRS-*frp* mostraron cantidades de luminiscencias fácilmente detectables, con valores mucho mayores para el caso de las que portaban ambos plásmidos, tal como era esperable debido a la mayor disponibilidad del sustrato FMNH₂ (Figura 1.9).

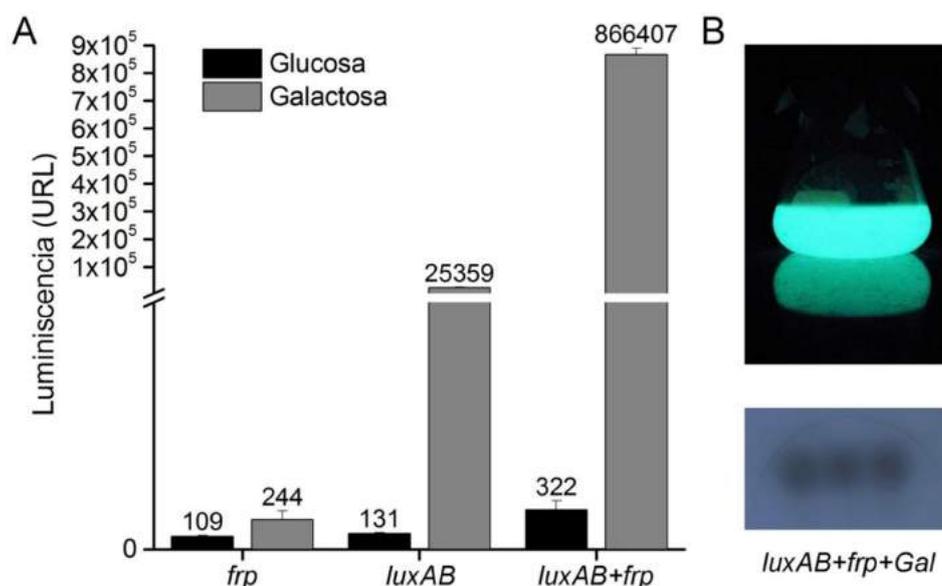


Figura 1.9| Luminiscencia emitida por *S. cerevisiae* transformada con distintos constructos. A| Registros de la luminiscencia emitida por 200 μ l de cultivos de *S. cerevisiae* transformadas con pRS-*frp*, pLG-*luxA-B* ó pLG-*luxA-B*+pRS-*frp* crecidas ON a 30°C y 200 rpm hasta una DO₆₀₀ ≈ 2. La expresión fue inducida con Galactosa 1% y se utilizó decanal 1% como sustrato (n = 3). La señal fue integrada durante 10 segundos y se muestra el promedio \pm SEM. **B|** Arriba, fotografía de alta exposición en cuarto oscuro del cultivo líquido correspondiente a las levaduras transformadas con pLG-*luxA-B*+pRS-*frp*, cuya luminiscencia fue observable a simple vista. Abajo, se muestra una exposición durante 30 segundos a una placa radiográfica, de una placa de petri con tres *spots* de levaduras transformadas con pLG-*luxA-B*+pRS-*frp* y crecidas en medio agar *Yeast Nitrogen Base*, con Galactosa 1% y con el agregado de 50 μ l de decanal 1% en cada colonia en el momento del revelado.

Posteriormente, se procedió a analizar lo que sucedía con nematodos transgénicos con todas las versiones construidas a partir de los genes *luxAB* de *Vibrio harveyi*. Se generaron por microinyección y se analizaron mediante ensayos de luminiscencia *in vivo* y microscopía de fluorescencia, al menos dos líneas transgénicas con los constructos *Psur-5::AI::luxAB* y *Psur-5::luxAB::gfp*. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla:

Constructo inyectado	Características	Resultado
	Secuencia <i>luxAB</i> de <i>V. harveyi</i> con ambas subunidades fusionadas mediante un <i>linker</i> de 10 aminoácidos (Szittner, et al. 2003) bajo intrón artificial (3' UTR: let-858).	Ausencia de luz detectable tanto <i>in vivo</i> como <i>in vitro</i> .
	Secuencia <i>luxAB</i> de <i>V. harveyi</i> anterior (Szittner, et al. 2003) fusionada además a <i>gfp</i> S65C (3' UTR: let-858).	Ausencia de fluorescencia <i>in vivo</i> y de luz detectable tanto <i>in vivo</i> como <i>in vitro</i> .

La ausencia de emisión de luminiscencia en los nematodos que portaban ambos, el arreglo extracromosomal solo con *luxAB*, y la versión fusionada a *gfp*, construida con el objetivo de analizar si el constructo *luxAB* se estaba expresando en los nematodos, mostró que este constructo no podía ser transcrito y/o traducido correctamente a partir del promotor de *sur-5*. Dado que la secuencia codificante para *luxAB* provenía de una fusión de las secuencias *luxA* y *luxB* de *Vibrio harveyi*, la primera hipótesis que surgió fue que la maquinaria de *C. elegans* no era capaz de traducir esta secuencia por diferencias en el uso de codones entre ambos organismos. Mediante un análisis bioinformático, se determinó que este podría ser el caso, ya que el índice de adaptación de codones (*Codon adaptation index*, *CAI*), que toma un valor de 1 como máximo, era de 0,70 y 0,72 para *luxA* y *luxB*, respectivamente. (Figura 1.10).

Con el objetivo entonces de analizar si esto era lo que afectaba la expresión del constructo, se generó una versión sintética de los *ORFs* de *luxA* y *luxB* con optimización de codones para *C. elegans*, y además se decidió optar por una versión policistrónica, donde ambas secuencias codificantes estaban separadas por una región intercistrónica (*ICR*). La secuencias de *luxA* y *luxB* fueron optimizadas *in silico* de acuerdo a la frecuencia de uso de codones de *C. elegans* utilizando el software "OptimumGene" por GenScript y se obtuvieron por bioinformática valores de *CAI* de 0,84 y 0,83, lo que implicaba una mejora en la

frecuencia de utilización de codones. Además, el porcentaje de GC, que se considera como óptimo entre 30-70% fue de alrededor de 45% para ambas secuencias (Figura 1.8).

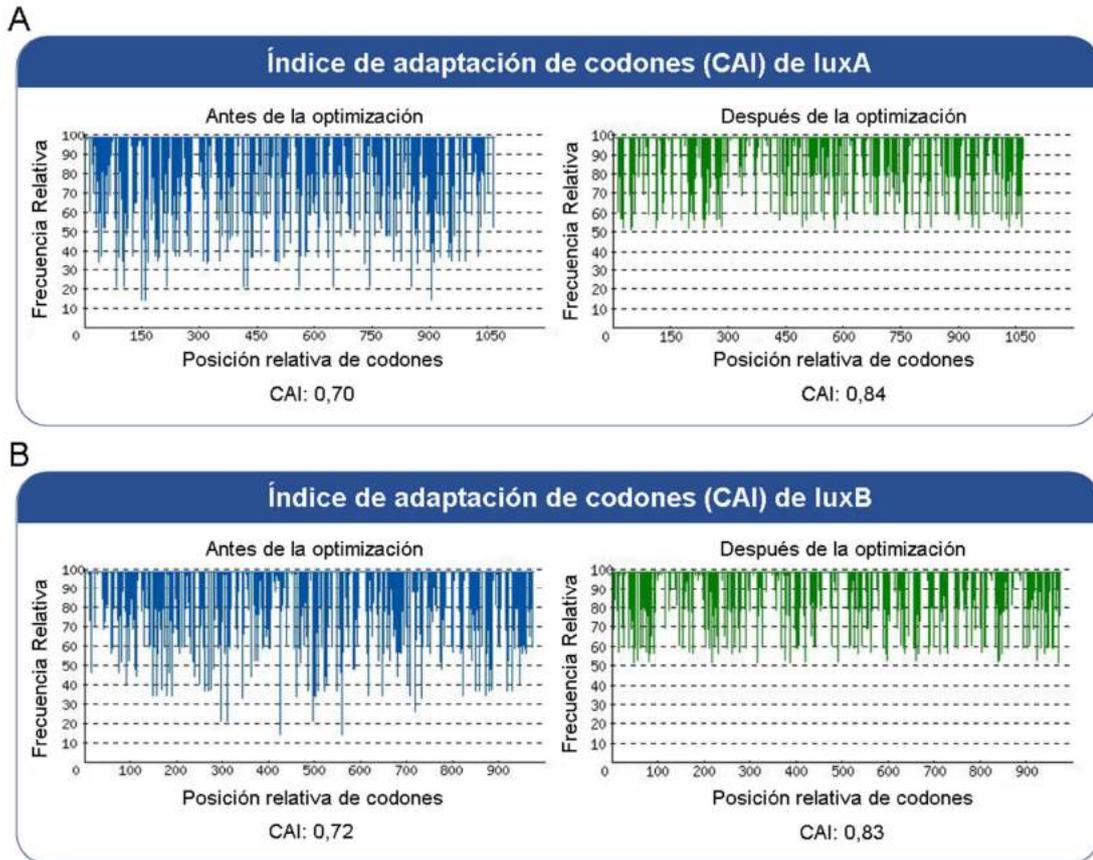


Figura 1.10 | Resultados bionfórmáticos de la optimización de codones de *luxA* y *luxB* mediante el algoritmo *OptimumGene* de *GenScript*. **A** | Índice de adaptación de codones de *luxA* y **B** | de *luxB*, antes y después de la optimización.

Se microinyectaron entonces los constructos *Psur-5::AI::luxA^{CO}::ICR::luxB^{CO}* y *Psur-5::luxA^{CO}::ICR::luxB^{CO}::gfp* en nematodos N2 y se realizaron los ensayos de luminiscencia de la misma manera que en el caso anterior. Además, se analizó mediante microscopía de fluorescencia la expresión de *gfp* en las líneas con *Psur-5::luxA^{CO}::ICR::luxB^{CO}::gfp*. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla a continuación:

Constructo inyectado	Características	Resultado
	Secuencias de <i>luxA</i> y <i>B</i> de <i>V. harveyi</i> optimizada para <i>C. elegans</i> , separadas por una región intercistónica (ICR), bajo intrón artificial (3' UTR: <i>let-858</i>).	Ausencia de luz detectable tanto <i>in vivo</i> como <i>in vitro</i> .

Constructo inyectado	Características	Resultado
	<p>Secuencia <i>luxAB</i> optimizada anterior fusionada además a <i>gfp</i> S65C (3' UTR: <i>let-858</i>).</p>	<p>Fluorescencia observable en todos los estadios larvales, pero ausencia de luz detectable tanto <i>in vivo</i> y como <i>in vitro</i>.</p>

La expresión de *gfp* en los nematodos transgénicos para *Psur-5::luxA^{CO}::ICR::luxB^{CO}::gfp* fue indicativo de que la optimización de codones fue eficiente y permitió que la maquinaria de *C. elegans* fuera capaz de transcribir y traducir el constructo de interés (Figura 1.11). La expresión del transgen fue detectable en la mayor parte de las células del nematodo adulto, incluyendo neuronas, hipodermis, músculo, células precursoras de la vulva (VPCs), muchas células de la faringe y algunas de las gónadas somáticas. La intensidad de la expresión fue variable entre las distintas células, siendo las intestinales y excretorias siempre muy brillantes, mientras que las neuronas normalmente mostraron patrones mas tenues. El reportero *luc::gfp* se expresó además en todos los estadios del desarrollo, desde estadios embrionarios tempranos de apenas algunas horas en el huevo y se mantuvo siempre encendido hasta el estadio adulto. Esto fue consistente con lo esperado de acuerdo a bibliografía (Gu, et al. 1998).

Sin embargo, no fue posible detectar luminiscencia, en ninguna de las condiciones ensayadas. Por la fluorescencia detectada fue posible saber que al menos *luxB^{CO}::gfp* se estaba traduciendo correctamente, y como el elemento *ICR* proviene del operón CEOP5428, el cual se transcribe como un único pre-ARNm, que luego sufre *trans-splicing* por la región intercistronica, se puede sospechar que *luxA^{CO}* al menos se estaría transcribiendo porque de lo contrario no se hubiera visto expresión de *luxB^{CO}::gfp*.

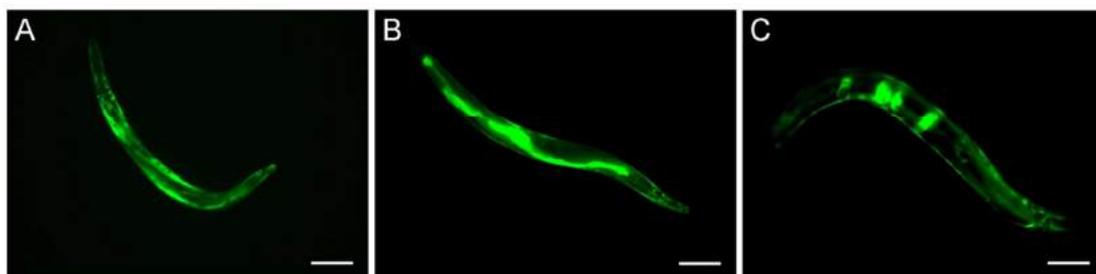


Figura 1.11 | Microscopía de fluorescencia de nematodos transgénicos con el constructo *Psur-5::luxA^{CO}::ICR::luxB^{CO}::gfp*. **A** | Nematodo de estadio L4. **B** | Nematodo de estadio joven adulto. **C** | Nematodo adulto de aproximadamente 2 días, donde se visualizan también embriones portando el arreglo extracromosomal. Barra de escala, 50 μ m.

Sistema de luminiscencia basado en *luc* de *Photinus pyralis*

Como se describió durante la introducción del capítulo, ya existían reportes de la expresión exitosa de la enzima luciferasa de *Photinus pyralis* en el nematodo, bajo el promotor del gen *let-858* o del gen *sur-5*, ambos promotores fuertes, ubicuos y que se expresan de manera constitutiva a lo largo de todo el desarrollo, y en todos los casos en versiones fusionadas a *gfp*. Con el objetivo entonces de evaluar la viabilidad de este sistema para estudiar ritmos circadianos *in vivo* y por períodos largos de tiempo (días), se tomó como punto de partida esta información disponible y se construyeron un plásmido codificante para *psur-5::luc::gfp* como control positivo, y varias otras versiones con distintas combinaciones de elementos génicos. El fin era encontrar el mejor constructo que nos permitiera estudiar en el futuro ritmos de expresión génica en estadio adulto, dejando de lado efectos del desarrollo. Dado que en el laboratorio ya teníamos muchos años de experiencia en el análisis de actividad locomotora en nematodos adultos por 8-10 días, y en un medio líquido axénico, sin necesidad de la adición de bacterias, previamente desarrollado para tal fin, se tomó esta información como base para encontrar la condición ideal en la fuera posible mantener nematodos vivos durante varios días y registrar luminiscencia de manera constante.

Se comenzó entonces con un medio de cultivo base, compuesto por parte de la formulación original que ya se utilizaba para medir actividad locomotora en el laboratorio (Simonetta y Golombek 2007) (medio Leibovitz's L15, suplementado con antibióticos, 40 μ M de 5-fluoro-2'-deoxiuridina (FUdR) para evitar el desarrollo de nuevos embriones y 5 mg/ml de colesterol) y se fueron cambiando algunos componentes con el fin de optimizarlo para el registro de luminiscencia. Particularmente se retiró el fenol rojo del medio original L15, se eliminó la leche descremada al 2% para permitir que el medio fuera mas translúcido y se agregó tobramicina al mismo para evitar la contaminación con *Pseudomonas*. Se probaron además los distintos compuestos normalmente utilizados para aumentar la permeabilización de la cutícula (Tritón X-100 0,05% y DMSO1%) (Lagido, et al. 2001; Duerr 2006) y distintas cantidades del sustrato (100 μ M, 1 mM y 10 mM). En este punto, se decidió dejar de lado en primera instancia la idea de utilizar bacterias en el medio de cultivo de los nematodos, ya que esto podría resultar en mucho ruido de fondo, contaminaciones y la posibilidad del ingreso de la D-luciferina mediante la alimentación (Olmedo, et al. 2015), lo

cual haría que la emisión de luz estuviera altamente ligada a la actividad metabólica y no a la expresión génica.

Se generaron entonces las distintas líneas transgénicas de los constructos de interés mediante microinyección, y se analizó primero la cantidad de luminiscencia detectada de 100 nematodos L4 de las distintas versiones, primero utilizando una base con medio de cultivo Leibovitz's L-15 sin indicador de pH fenol rojo (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos), suplementado con Antibiótico-antimicótico 1X (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos), 40 μ M de 5-fluoro-2'-deoxiuridina (FUdR) para evitar el desarrollo de nuevos embriones, 5 mg/ml de colesterol, 10 μ g/ml de tobramicina (Tobrabiotic, Denver Farma, Argentina), 1 mM de D-luciferina (Gold Biotechnology, Estados Unidos) y 0,05% de Tritón X-100. Se analizaron 2 líneas independientes con cada constructo y una línea que se integró espontáneamente con el constructo *Psur-5::luc::gfp*. Los resultados obtenidos fueron bastante concisos, y mostraron que los nematodos que llevaban el constructo *Psur-5::luc* solo no emitieron luz detectable bajo ninguna condición, mientras que las adición de un intrón artificial en *cis* mejoró ligeramente la expresión y la fusión con *gfp* S65C, la cual posee tres intrones artificiales dentro del *ORF*, incrementó notablemente la cantidad de luminiscencia. La cuarta versión, basada en la separación entre el ORF de luciferasa y el de *gfp* por una región intercistrónica, si bien también fue generó niveles detectables de luz, fue menos eficiente que las anteriores, por lo resultó claro que los intrones en *trans* de *gfp* no fueron suficientes para aumentar la expresión del ORF de la luciferasa (Figura 1.12).

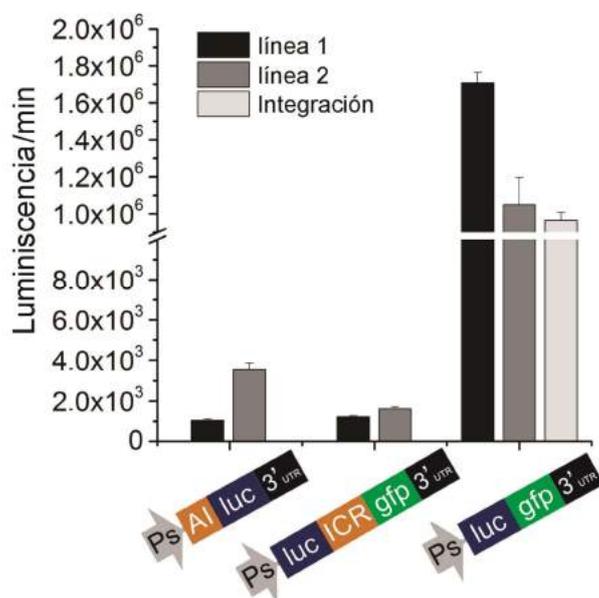


Figura 1.12| Luminiscencia emitida por nematodos transgénicos con distintos constructos de la luciferasa de *Photinus pyralis*. La luminiscencia fue registrada a partir de 100 nematodos L4 seleccionados manualmente por su fenotipo *roller* o por la expresión de *gfp*, a 20°C y en oscuridad constante. La señal fue integrada durante 1 minuto, 10 minutos después de añadirles el medio de luminiscencia. La señal mostrada corresponde al promedio \pm SEM (n = 4). En todos los casos se utilizaron 1052 pb del promotor de *sur-5*, y el 3'UTR de *let-858*. La línea integrada fue obtenida espontáneamente a partir de la línea con el arreglo extra cromosomal número 2. URL: Unidades relativas de luminiscencia.

En cuanto al patrón de expresión de fluorescencia, se observó un patrón similar al antes descrito para la construcción con la enzima *lux*, ubicuo y en la mayor parte de las células, consistente también con lo descrito en bibliografía (Gu, et al. 1998). Además, no se observaron discrepancias evidentes entre los constructos *Psur-5::luc::ICR::gfp* y *Psur-5::luc::gfp*, de manera que aún cuando la luciferasa no alcanzó los mismos niveles, la expresión de *gfp* fue equiparable en ambas líneas transgénicas bajo microscopía de fluorescencia (Figura 1.13).

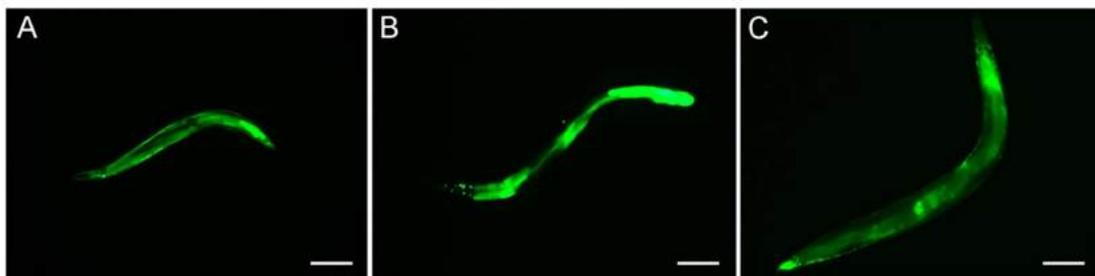


Figura 1.13 | Microscopía de fluorescencia de nematodos transgénicos con el constructo *Psur-luc::gfp*. A | Nematodo de estadio L3. B | Nematodo de estadio joven adulto. C | Nematodo adulto de aproximadamente 2 días, donde se visualizan también embriones portando el arreglo extracromosomal. Barra de escala, 50 μ m.

Determinación del medio óptimo para el registro continuo de luminiscencia

Con estos resultados, se optó por seguir la caracterización posterior del sistema con la versión *Psur-5::luc::gfp* que resultó ser la más eficiente, dado que para realizar medidas a largo plazo era muy importante tener cantidades detectables de luz durante varios días. Se probaron entonces distintas condiciones de permeabilización de acuerdo a lo que existía en bibliografía (Tritón X-100 0,05%, DMSO 1% o ambos) con una concentración 1 mM de D-luciferina y se registraron 100 nematodos desde estadio L4 a 20°C continuamente durante 5 días. Estos resultados mostraron que el Tritón X-100 0,05% solo (sin DMSO) fue suficiente para generar niveles altos de luminiscencia, los cuales fueron mayores a largo plazo a los obtenidos solo con DMSO 1% o una mezcla de ambos (Figura 1.13). Esto puede ser consistente con una mayor permeabilización por parte del Tritón X-100 solo o ser consecuencia de efecto de toxicidad del DMSO 1%.

Entonces, se repitió el mismo ensayo solo con Tritón X-100 0,05%, pero esta vez con dos concentraciones nuevas de luciferina: 100 μM y 10 mM. Durante las primeras medidas, los nematodos con 10 mM mostraron valores iniciales mas altos de luz con respecto a la concentración 1 mM, pero la señal luego cayó rápidamente y fue mas baja durante el primer día, equiparando a tiempos más largos a la señal de la concentración 1 mM. Con respecto a los nematodos incubados con 100 μM , la señal fue más baja durante los primeros tres días que la mostraba por 1 mM de luciferina, pero a tiempos largos resultó ligeramente más estable (Figura 1.14).

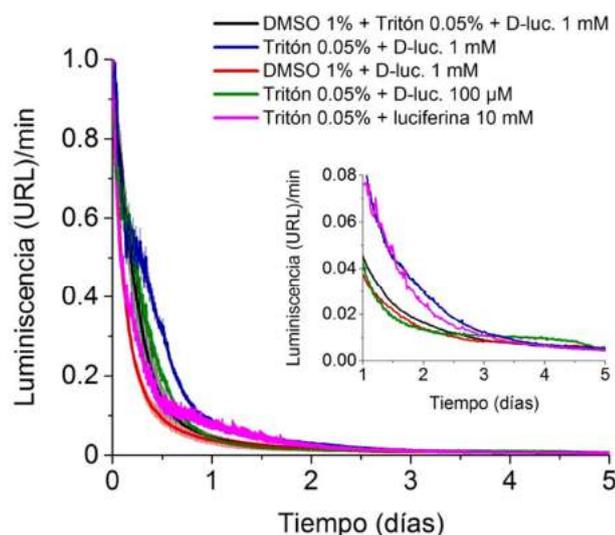


Figura 1.14| Luminiscencia emitida por nematodos transgénicos para *Psur-5::luc::gfp*, con distintas condiciones en el medio de cultivo. La luminiscencia fue registrada a partir de 100 nematodos L4 de la línea número 1 que mostró mayores niveles de luz previamente, a 20°C y en oscuridad constante. La señal fue integrada durante 1 minuto, 10 minutos después de añadirles el medio de luminiscencia. El gráfico mas pequeño dentro del principal muestra en mayor detalle el registro de luminiscencia a partir del primer día del experimento. Le señal mostrada corresponde al promedio \pm SEM (n = 4). URL: Unidades relativas de luminiscencia.

Si el sustrato fuera totalmente inocuo para los nematodos, estos perfiles serían consistentes con la bioquímica de la reacción catalizada por la luciferasa. A mayores cantidades de sustrato disponible, mas rápido ocurre la reacción con las moléculas de enzimas acumuladas hasta el momento inicial y se genera el subproducto oxiluciferina, el cual forma un complejo inhibitorio reversible con la enzima, impidiendo que ésta siga reaccionando con nuevas moléculas del sustrato (Van Leeuwen 2000). Esto podría explicar la caída mas brusca de la señal con la concentración 10 mM. Después, la enzima secuestrada comienza a liberarse y es degradada, y al mismo tiempo se produce la síntesis de enzima

nueva, que comienza a reaccionar nuevamente con el sustrato. En el caso de luciferina 10 mM, hay una cantidad tan excesiva de sustrato que es capaz de titular toda la enzima acumulada durante el crecimiento y consumir ya parte de las moléculas nuevas que se están sintetizando durante el primer día. Sin embargo, después de 24 horas de registro, los niveles de luz son equiparables a la concentración 1 mM. Es decir, aún cuando con esta última concentración toma más tiempo consumir y degradar todas las enzimas previamente acumuladas, a la larga, ambas concentraciones podrían ser igualmente útiles para el registro. Para ello, solo sería necesario descartar el primer día completo de datos por el efecto previo de acumulación de enzima. En el mismo sentido, la menor cantidad de luz mostrada con la concentración 100 μ M durante los primeros días, implica que no se llegó al nivel necesario de sustrato saturante para consumir y ayudar a la degradación de todas las moléculas de enzima acumuladas previamente durante el crecimiento. Este efecto es mucho más prolongado a largo plazo y la señal alcanza los niveles mostrados con luciferina 1 mM recién al tercer día de registro, implicando que se arrastraría mucho ruido de fondo y la señal sigue estando contaminada con la enzima vieja.

Ensayo de toxicidad por actividad locomotora

Para analizar si la combinación de Tritón X-100 0,05% y de luciferina 1 mM y las otras opciones de agentes permeabilizantes, afectaban la viabilidad de los nematodos a largo plazo, se realizaron ensayos de toxicidad mediante el registro de actividad locomotora. Para ello, se utilizó un equipo basado en 4 haces infrarrojos que atraviesan cada *well* de una placa 96 *wells*, que son interrumpidos por los nematodos cuando se mueven en el medio líquido. Cada vez que los nematodos atraviesan estos haces, estos datos son registrados como unidades de actividad por una computadora. De esta manera, si el compuesto es tóxico, los nematodos tenderán a moverse menos, y esto se verá reflejado en la cantidad total de actividad o en la media a lo largo del ensayo. Mediante este método, se registró la actividad de nematodos N2 (*wild-type*), durante 5 días a 18°C, en poblaciones de 40 animales por *well*, condiciones óptimas para esta técnica (Simonetta y Golombek 2007; Herrero, et al. 2015). Cabe aclarar, que los nematodos transgénicos microinyectados con el marcador pRF4 no fueron utilizados para el ensayo, porque no eran capaces de nadar correctamente en el medio líquido por su movimiento circular debido al fenotipo *roller*.

Los resultados revelaron que, mientras que la adición de Tritón X-100 0,05% al medio no generó un cambio en el patrón general de actividad con respecto a la situación control (D- luciferina 1 mM), la presencia de DMSO 1% o la combinación de ambos agentes permeabilizantes fueron tóxicas para los animales, y mostraron una reducción significativa en la cantidad total de actividad a lo largo de todo el ensayo (Figura 1.15).

Compilando todos los resultados obtenidos, el medio óptimo elegido para futuros registros fue el medio de cultivo celular L15 base descrito anteriormente, con la adición de D-luciferina 1 mM como sustrato y de Tritón X-100 0,05% como permeabilizante. Es importante aclarar que el detergente fue también importante experimentalmente para facilitar la manipulación y el lavado de los nematodos para descartar restos de bacterias y para las medidas de luminiscencia, ya que evita que los mismos queden adheridos por la carga presente en la cutícula al plástico de los *tips* de las micropipetas y se pierdan individuos durante el pipeteo.

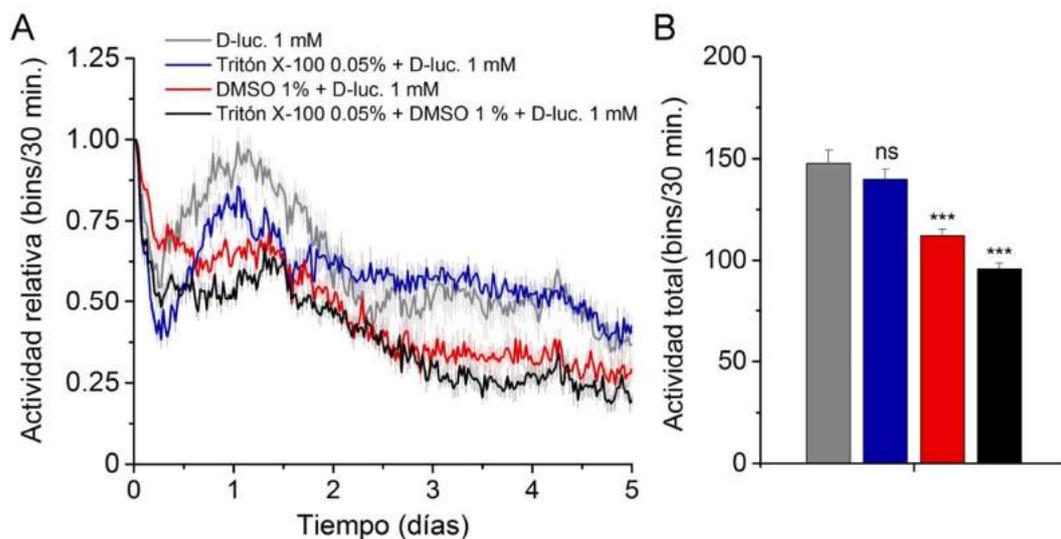


Figura 1.15] Actividad locomotora registrada de nematodos N2 bajo distintas condiciones en el medio de cultivo. A] Patrón de actividad registrado a partir de 40 nematodos L4 de la cepa N2 (*wild-type*), ya que los animales transgénicos generados por microinyección presentaban fenotipo *roller*, y por ende no eran capaces de nadar correctamente en medio líquido. Se utilizó una temperatura de 18°C y oscuridad constante. La señal fue registrada cada 1 minuto en cada *well* y los datos fueron graficados en bloques de 30 minutos. Le señal mostrada corresponde al promedio \pm SEM ($n = 12$). **B]** Actividad total relativa obtenida como un promedio de la actividad total de los 12 *wells*, y su correspondiente error estándar. La actividad total fue significativa mas baja en el medio de cultivo con DMSO 1% y Tritón X-100 0,05% + DMSO 1% con respecto al control, que solo tenía el sustrato (D-luciferina 1 mM). *** $P < 0.001$ vs control, ns: no significativo; ANOVA seguido de un *test* de comparaciones de Dunnet.

Determinación de la cantidad óptima de nematodos a registrar en ensayos poblaciones

Para determinar el número de individuos óptimo a registrar a fin de obtener una señal detectable y analizable durante varios días, se realizó un ensayo con poblaciones de distintas cantidades de gusanos (10, 20, 50 y 100), que fueron entrenados bajo el ciclo LO/FC (18.5/20°C, $\Delta = 1,5 \pm 0,125^\circ\text{C}$) hasta estadio L4. Luego, las poblaciones fueron pasadas a placas *mutiwell* con el medio de luminiscencia y registradas a oscuridad constante y 25°C en un luminómetro *BioTek Synergy HTX Multi-Mode Microplate* (mínima temperatura que aceptaba el luminómetro utilizado). Los resultados obtenidos mostraron que parecía haber una oscilación circadiana, al menos durante los primeros dos días, pero que solo podía ser visualizada a partir de los datos crudos con 50 y 100 nematodos. Sin embargo, entre ellos, una proporción más grande de las poblaciones con 100 nematodos mostraron oscilaciones, por lo que se decidió continuar con éste número en futuros ensayos. Además, la temperatura fue demasiado alta para los animales, y generó una evaporación muy grande del medio y la muerte de la mayoría de los individuos al día 4 del ensayo (Figura 1.16).

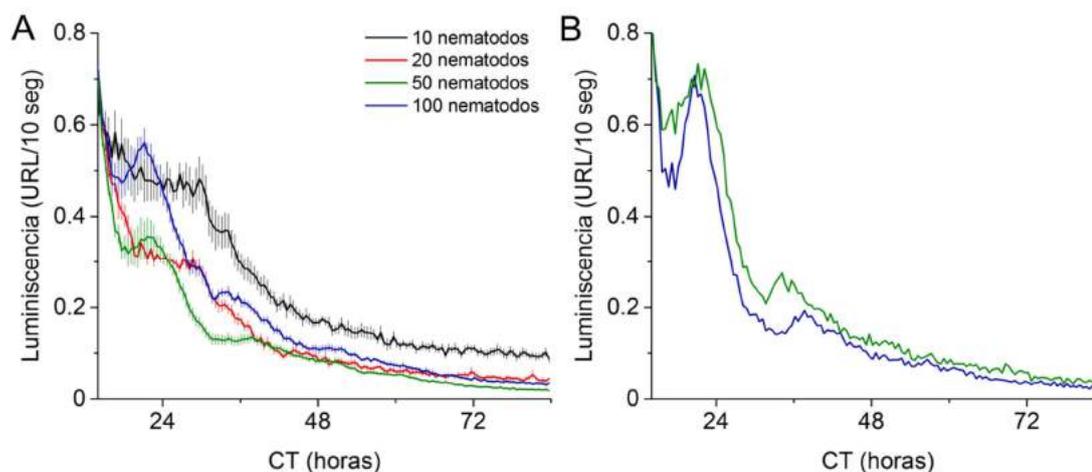


Figura 1.16| Luminiscencia emitida por poblaciones de distintas cantidades de nematodos transgénicos con *Psur-5::luc::gfp* bajo condiciones constantes. A| Registro de luminiscencia de poblaciones de 10, 20, 50 y 100 nematodos bajo oscuridad y 25°C. La señal mostrada corresponde al promedio \pm SEM ($n = 8$). **B|** Registro de luminiscencia de dos poblaciones representativas de **B**, con 50 (línea verde) y 100 nematodos (línea azul). URL: Unidades relativas de luminiscencia.

Ensayo de cicloheximida para determinar la vida media de la proteína LUC::GFP

Como se describió en la introducción, una característica de gran relevancia a la hora de utilizar reporteros para medir expresión génica *in vivo*, es la necesidad de que la proteína

tenga una vida media corta (por lo general menor a 3 horas) de manera tal que la señal emitida por el reportero sea directamente proporcional a la cantidad de proteína nueva sintetizada constantemente.

Con el objetivo de analizar la vida media de la proteína expresada por los nematodos transgénicos a partir del constructo *Psur-5::luc::gfp*, se realizó un ensayo clásico con cicloheximida, un inhibidor de la síntesis proteica comúnmente utilizado para este fin. Para ello, poblaciones de 100 nematodos L4 fueron incubadas desde tiempo 0 con vehículo (etanol puro) o 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de cicloheximida y se monitoreó la luminiscencia cada 10 minutos durante 2 horas. Luego se realizó un ajuste utilizando la función exponencial $Y = A \cdot e^{(-x/t)}$ y se determinó el tiempo necesario para que la luminiscencia cayera hasta el 50% de su valor inicial (vida media). Con este ajuste, se estimó que la vida media en presencia de cicloheximida fue de aproximadamente 100 minutos (Figura 1.17). Esta degradación relativamente rápida de la proteína LUC::GFP en un tiempo menor a las 2 horas demostró que podía ser utilizada perfectamente como reportero transcripcional para ensayos circadianos.

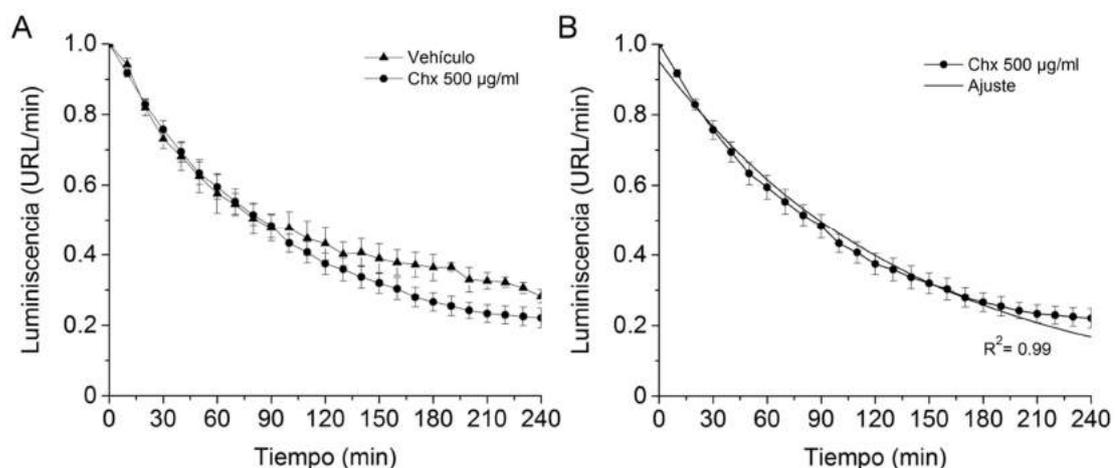


Figura 1.17 | Determinación de vida media de la proteína LUC::GFP. A | luminiscencia registrada a partir de 100 nematodos L4 de la línea número 1 (que previamente mostró mayores niveles de luz) a 20°C y en luz constante. A tiempo cero, los nematodos recibieron vehículo (etanol) ó 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de cicloheximida. La señal fue integrada durante 10 segundos, cada 10 minutos y se muestra el promedio \pm SEM ($n = 4$). URL: Unidades relativas de luminiscencia. **B |** Ajuste realizados para estimar la vida media de la proteína después de la inhibición de la síntesis proteica, utilizando la fórmula exponencial $Y = A \cdot e^{(-x/t)}$. $R^2 = 0.99$, vida media 100 minutos.

Finalmente, y aún cuando los resultados de vida media fueron muy satisfactorios, se realizó un último experimento utilizando nematodos transgénicos para el constructo *Psur-*

5::luc::gfp::PEST. Como se describió durante la introducción, la secuencia señal PEST codifica para un péptido rico en Prolina-Glutamina-Serina-Treonina que confiere degradación rápida a la proteína de interés, y mediante estudios previos en nematodos se determinó que la fusión *gfp::PEST* tiene una vida media de menos de 1 hora *in vivo* (Frاند, et al. 2005). Con el objetivo de comparar los patrones de emisión de luminiscencia de nematodos con la versión normal *Psur-5::luc::gfp* y con la fusión al péptido PEST, se registró la luminiscencia de poblaciones de 100 nematodos L4 en condiciones de oscuridad constante a 20°C, durante 7 días. Tal como se esperaba, los niveles de luminiscencia fueron ligeramente más altos durante los primeros días para los nematodos con el constructo *Psur-5::luc::gfp*, de vida media esperada mas larga. Además, *Psur-5::luc::gfp::PEST* mostró una caída mas brusca de la señal, indicando que la degradación de la luciferasa fue más rápida con este constructo, lo cual debe estar relacionado con una menor acumulación de la enzima. Sin embargo, a tiempos largos el patrón de la señal fue muy similar con ambos constructos (Figura 1.18). Es de destacar, que a esta temperatura mas baja, la señal fue detectable por al menos 8 días.

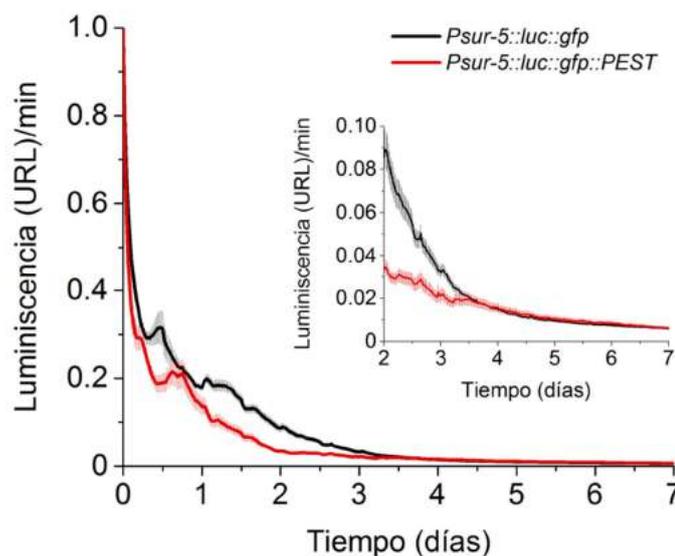


Figura 1.18 | Luminiscencia emitida por nematodos transgénicos con *Psur-5::luc::gfp* y *Psur-5::luc::gfp::PEST*. La luminiscencia fue registrada a partir de 100 nematodos L4 de la línea número 1 de *Psur-5::luc::gfp* que previamente mostró mayores niveles de luz y a partir de dos líneas distintas *Psur-5::luc::gfp::PEST*, a 20°C y en oscuridad constante. La señal fue integrada durante 10 segundos y medida en intervalos de 30 minutos. El gráfico mas pequeño dentro del principal muestra en mayor detalle el registro de luminiscencia a partir del segundo día del experimento. La señal mostrada corresponde al promedio \pm SEM (n = 12). URL: Unidades relativas de luminiscencia.

Discusión

Caenorhabditis elegans es un nematodo de vida libre del suelo, ampliamente estudiado y empleado como modelo para neurociencias, genética, biología del desarrollo, y otras áreas. Sin embargo, el estudio de los ritmos circadianos en el nematodo está recién dando sus primeros pasos y los mecanismos subyacentes de las bases moleculares que conforman el reloj central aún son desconocidos. *C. elegans* es un modelo muy atractivo y que presenta muchas ventajas para el estudio de la cronobiología, ya que se trata de un organismo con un genoma totalmente secuenciado, que posee un sistema nervioso compacto y simple y del cual se conoce el conectoma completo, y especialmente por la facilidad con la que puede ser manipulado genéticamente. En este sentido, en los últimos años se han descrito numerosos procesos fisiológicos bajo regulación circadiana a diferentes niveles, tales como ritmos en actividad locomotora (Simonetta y Golombek 2007; Simonetta, et al. 2009; Herrero, et al. 2015; Winbush, et al. 2015), distintos comportamientos fisiológicos (tasa de defecación, tasa de bombeo faríngeo, olfacción) (Simonetta, et al. 2008; Olmedo, et al. 2012); metabolismo (tolerancia a estrés biótico y abiótico, consumo de oxígeno y alimento) (Simonetta, et al. 2008; Migliori, et al. 2011; Romanowski, et al. 2011), actividad proteica y regulación humoral (síntesis de melatonina y estado redox de peroxirredoxinas) (Edgar, et al. 2012; Migliori, et al. 2012; Olmedo, et al. 2012) y algunos pocos de expresión génica (van der Linden, et al. 2010; Olmedo, et al. 2012). Además, en un estudio bioinformático exhaustivo realizado recientemente en nuestro laboratorio se han identificado diversas proteínas que muestran una alta homología con componentes de otras especies. Sin embargo, la mayoría de los estudios realizados hasta el momento consistieron en una descripción de *outputs* circadianos, aplicando métodos clásicos *in vitro* o registros de comportamientos, que presentan en la mayoría de los casos limitaciones para estudios por períodos largos de tiempo, en términos de sensibilidad, precisión y reproducibilidad. Además, si bien aportaron mucha información valiosa acerca de la existencia fehaciente de un reloj biológico en *C. elegans*, fueron mayormente descriptivos, sin ahondar en mecanismos moleculares. Por otro lado, mostraron que no se trata de un organismo simple de estudiar desde la perspectiva circadiana, ya que muchas de las hipótesis acerca de la existencia de posibles mecanismos homólogos de regulación fueron descartadas en el nematodo, especialmente las relacionadas con el rol de los genes

homólogos a otros genes reloj, que no se han podido vincular de ninguna manera con el mecanismo molecular del reloj central y por el contrario tienen papeles esenciales en el programa de desarrollo del nematodo (Chan, et al. 2003; Qin y Powell-Coffman 2004; Tennessen, et al. 2006). Frente a los desafíos que nos plantea el modelo de estudio y la necesidad imperante de ir mas allá de lo que ya conocemos y comenzar por fin a armar el rompecabezas que nos permita vincular todas las variables conocidas de salida del reloj de *C. elegans* con el fundamento molecular que las origina, se plantea entonces la necesidad de desarrollar un método nuevo, reproducible, sensible, confiable y capaz de adaptarse a la biología del nematodo, atípica en muchos sentidos, con respecto a otros organismos modelo estudiados en cronobiología. Como se dijo anteriormente, la utilización de los sistemas reporteros basados en luminiscencia a lo largo de la historia de la cronobiología ha resultado ser muy exitosa para elucidar nuevos mecanismos y componentes moleculares del reloj de muchos organismos modelo. Debido a que nunca antes se ha considerado esta opción en el nematodo y que muchas técnicas clásicas fueron probadas sin demasiado éxito, se plantea la idea original de emplear por primera vez este sistema para estudiar la regulación de la expresión génica circadiana.

Poner a punto un sistema nuevo en cualquier área de investigación representa siempre un gran desafío y se debe ser muy metódico; por esta razón se enfocó esta etapa de la tesis doctoral al trabajo en paralelo en dos sistemas luminiscentes naturales disponibles: el sistema bacteriano basado en los genes *lux* de *Vibrio harveyi* y el sistema más utilizado como reportero, basado en el gen *luc* de la luciérnaga *Photinus pyralis*. Para ello, se construyeron entonces distintas estrategias moleculares para lograr niveles de expresión que permitieran el registro de luz a partir de poblaciones de nematodos adultos *in vivo* y durante varios días. Se decidió elegir un sistema de expresión basado en un plásmido comercial, muy utilizado y altamente eficiente para *C. elegans* (pPD158.87), donde la expresión es dirigida por el promotor del gen *sur-5*, el cual también es muy empleado por tratarse de un promotor fuerte, de expresión ubicua y constitutivo a lo largo de todos los estadios de desarrollo. Además, este promotor ya había sido probado y demostró ser funcional con el sistema eucariota *luc* (Lagido, et al. 2008), por lo que nos daba la ventaja de conocer previamente que la luminiscencia emitida por nematodos transgénicos con este constructo podía ser detectada con equipos convencionales. En cuanto a la regulación circadiana de este gen, se había publicado previamente un estudio poblacional *high-*

throughput realizado con microarrays (van der Linden, et al. 2010), donde *sur-5* no mostraba ritmos de transcripción bajo ciclos de luz-oscuridad o temperatura baja-alta. La región 3'UTR del gen *let-858*, presente en el vector pPD158.87 pero no en otros del mismo kit comercial, fue elegida específicamente porque el gen *let-858* no había mostrado ser rítmico en el mismo estudio bajo ninguna condición. Por el contrario, la región 3'UTR del gen *unc-54*, presente en muchos de los otros vectores comerciales que también portan el promotor de *sur-5*, fue descartada porque este gen sí mostró una transcripción circadiana bajo ciclos de luz-oscuridad (van der Linden, et al. 2010).

Sistema de luminiscencia basado en *luxAB* de *Vibrio harveyi*

Inicialmente, se decidió optar por el sistema basado en el operón *lux* bacteriano de *Vibrio harveyi*, y analizar la viabilidad del mismo tomando como control positivo un sistema de plásmidos que habían sido reportados como funcionales en levaduras, y que contenían los genes *luxAB* codificantes para la enzima luciferasa y *frp*, que expresaba la NADP(H) oxidoreductasa, encargada de generar el sustrato FMNH₂.

La versión fusionada de los genes *luxA* y *luxB* a partir de las secuencias *wild-type* de *Vibrio harveyi* no fueron correctamente expresados por *C. elegans* y esto no se pudo revertir utilizando la estrategia de fusión a *gfp*, para aportar en marco intrones en *cis* que mejoraran la transcripción. La segunda alternativa fue entonces la expresión de una versión sintética optimizada en codones para *C. elegans*, donde cada ORF fue separado mediante una región intercistrónica (*ICR*), mimetizando el funcionamiento del operón CEOP5428, elemento que ya había sido probado con éxito para co-expresar en tándem y bajo el mismo promotor distintas proteínas (Lee, et al. 2010). Mediante la fusión *Psur-5::luxA^{co}::ICR::luxB^{co}::gfp*, fue posible hallar expresión de *gfp*, confirmando que la versión optimizada fue expresada correctamente en el nematodo. Sin embargo, no fue posible detectar emisión de luminiscencia a partir de nematodos transgénicos con este constructo, en ninguna condición *in vivo* o *in vitro* de concentración de decanal, FMNH₂, o cantidades de gusanos ensayadas. Por la forma esperada de transcripción de este constructo como una pre-ARNm policistrónico debido a la presencia del *ICR*, y porque el ORF *luxB^{co}::gfp* fue traducido correctamente generando fluorescencia, las principales hipótesis que pueden explicar la ausencia de luz detectable son a) una expresión ineficiente de la secuencia *luxA^{co}* y, por

ende, la ausencia de disponibilidad de ambas subunidades necesarias para reconstituir *in vivo* la enzima dimérica o bien b) un plegamiento incorrecto de ambas subunidades *in vivo* ya sea por un contexto celular inapropiado en *C. elegans* o bien por la presencia de *gfp* en *luxB^{co}*, que podría generar un impedimento estérico.

Para descartar entre ambas hipótesis, son necesarios más estudios de caracterización. Para poder determinar si existe un problema de expresión de *luxA^{co}*, se necesitan más caracterizaciones moleculares a partir de los nematodos transgénicos, mediante ensayos de RT-PCR y PCR en tiempo real de ambos cistrones y a nivel de proteína, análisis de western blot con anticuerpos anti *luxA^{co}* y anti *gfp* para detectar *luxB^{co}::gfp*. Este ensayo no pudo ser realizado por el momento, porque no existen anticuerpos disponibles contra *luxA* y *luxB*. Una opción directa para evaluar si el problema es una expresión deficiente de *luxA^{co}* sería comparar los niveles de ARN mensajero de nematodos transgénicos para *Psur-5::luxA^{co}::ICR::luxB^{co}::gfp* con otros inyectados con una tercera versión *Psur-5::luxA^{co}::DsRed::ICR::luxB^{co}::gfp*, donde la expresión de *luxA^{co}* debería mejorar por los intrones en *cis* de *DsRed*. Sin embargo, puede ocurrir que la presencia de ahora dos proteínas fluorescentes fusionadas con los ORFs de *luxA^{co}* y *luxB^{co}* impidan que la enzima pueda reconstituirse correctamente *in vivo*, algo que deberá ser analizado mediante ensayos de luminiscencia *in vivo* e *in vitro*. Finalmente, si este fuera el caso, se deberá pensar en una nueva estrategia de modificación de las secuencias *luxA^{co}* y *luxB^{co}* donde cada ORF sea interrumpido con intrones artificiales a lo largo del marco, tales como los presentes en la variante de *gfp S65C* utilizada en nematodos. Para ello, será necesario realizar estudios bioinformáticos para encontrar cuales serían los mejores sitios de inserción de acuerdo al entorno necesario para que esos intrones funcionen correctamente como lo hacen en *gfp* y luego estrategias moleculares mediante fusión por PCR o una nueva síntesis para generar el nuevo constructo y microinyecciones para evaluar su expresión *in vivo*.

En cuanto a la posibilidad de que esta enzima nunca llegue a plegarse y a adoptar la conformación funcional *in vivo*, no tenemos ninguna seguridad, pero existen diversos estudios donde se ha demostrado no solo la actividad de la enzima luciferasa bacteriana *in vivo* sino la expresión exitosa de todo el *cassette* del operón bacteriano en levaduras, células de mamífero y roedores (Gupta, et al. 2003; Szittner, et al. 2003; Eldridge, et al. 2007; Close, et al. 2010; Tehrani, et al. 2014). Esto es de gran importancia, ya que la principal ventaja de este sistema con respecto al eucariota, y la razón por la cual se eligió probarlo en *C. elegans*,

es la de conocer las secuencias codificantes para las distintas enzimas de la vía metabólica involucradas en la producción de los sustratos necesarios para la reacción. Esto posibilitaría la generación de nematodos bioluminiscentes que emitan luz de manera autónoma y mantenida en el tiempo, sin la necesidad de añadir sustratos exógenos, evitando problemas de permeabilidad de cutícula y de toxicidad.

Sin embargo, y después de intentar varias alternativas, todas sin éxito, en este punto se consideró que quizás no valía la pena seguir buscando exhaustivamente las razones por las que el sistema no funcionaba en el nematodo, y optar por un método alternativo que nos permitiera registrar ritmos de expresión génica, que era en definitiva el objetivo final del trabajo.

Sistema de luminiscencia basado en *luc* de *Photinus pyralis*

En el momento de iniciar esta tesis, ya existían dos trabajos que reportaban la expresión exitosa de la luciferasa codificada por el gen *luc* de *Photinus pyralis*, bajo promotores de los genes *let-858* y *sur-5*, y en todos los casos de manera fusionada a *gfp* (Lagido, et al. 2001). Dado que estas cepas no estaban disponibles en el *Caenorhabditis Genetics Center* y tampoco fue posible obtener ninguna a través del contacto con los autores de los trabajos, se construyó una versión similar de *novo* con el constructo *Psur-5::luc::gfp*, como control positivo para la puesta a punto del sistema. Dado que en estos trabajos no se explicaba con demasiado detalle la razón por la cual el ORF de la luciferasa había sido fusionado a *gfp*, y teniendo en cuenta que el objetivo final de este trabajo era utilizar el sistema como reportero de expresión génica aprovechando la vida media corta de la luciferasa, no parecía conveniente en primera instancia una construcción fusionada a *gfp*, por la gran estabilidad que normalmente posee GFP *in vivo* (Corish y Tyler-Smith 1999).

Se construyeron entonces distintos plásmidos basados en el ORF de la luciferasa de *Photinus pyralis* del vector comercial PGL3 de Promega, para analizar los niveles de expresión de la luciferasa fusionada a distintos elementos génicos, y se encontró que la secuencia codificante de la enzima por sí sola, no se expresaba de manera suficiente como para poder detectar emisión de luz. Mediante distintas combinaciones de intrones artificiales en *cis* y en *trans*, muy utilizados para inducir mecanismos de *splicing* del ARN mensajero y de esta manera aumentar la transcripción en *C. elegans* (Fire, et al. 1990; Fire,

et al. 1998; McNally, et al. 2006), se determinó que el constructo mas eficiente para expresar la proteína de interés era efectivamente el que contenía la luciferasa fusionada a *gfp*. De esta manera se concluyó que era necesaria la presencia de intrones artificiales dentro del marco abierto de lectura de la enzima para poder generar niveles altos de expresión y de luminiscencia. Sin embargo, por el posible problema asociado con la vida media larga de *gfp*, se decidió realizar un último constructo *Psur-5::luc::gfp::PEST*, mediante la adición del dominio corto PEST, para asegurar la degradación rápida de la proteína LUC::GFP (Rechsteiner y Rogers 1996).

El análisis por microscopía de fluorescencia de los nematodos transgénicos para *Psur-5::luc::gfp* mostró que, tal como se esperaba, la expresión del constructo se daba de manera ubicua y fuerte en la mayoría de las células del nematodo, y en todos los estadios del desarrollo comenzando desde huevo. Además, el patrón fue muy similar a lo publicado en bibliografía, aún cuando el protomotor clonado en el reportero es mínimo, de solo 1052 pb río arriba del TSS de *sur-5* (Gu, et al. 1998). Además, la fusión con GFP fue muy útil para la selección de los nematodos con mayor expresión del constructo y para el análisis espacio-temporal del patrón de expresión del promotor de interés. Esto puede representar una ventaja importante en futuros experimentos, y ayudar a caracterizar promotores de genes aún no estudiados y/o con niveles de expresión mucho mas sutiles que el de *sur-5*.

Para la búsqueda del medio óptimo para registrar luminiscencia, se aprovechó un medio de cultivo líquido previamente desarrollado en el laboratorio para medir actividad locomotora *in vivo*, basado en el medio de cultivo celular Leibovitz's L15 (Simonetta y Golombek 2007). A partir de esta base, se modificaron algunos componentes y se probaron distintas condiciones de permeabilización de cutícula para permitir el ingreso del sustrato D-luciferina y distintas concentraciones de la misma en ensayos *in vivo* durante varios días. De esta manera, se determinó cuál era la condición ideal para medir luminiscencia en registros crónicos a partir de poblaciones de 100 nematodos cada una.

La combinación de los nematodos transgénicos *Psur-5::luc::gfp* y del medio de cultivo elegido fue muy satisfactoria y la técnica fue muy sensible, permitiendo detectar niveles de luminiscencia por encima del *background* de fondo por hasta 8 días en poblaciones de nematodos. Además, el ensayo por cicloheximida reveló que la vida media de este constructo es corta, de menos de 2 horas, por lo que el sistema es perfectamente utilizable para medir expresión génica *in vivo*, de acuerdo a lo publicado (Welsh, et al. 2005).

Asimismo, se encontró que la luminiscencia emitida por nematodos microinyectados con el constructo *Psur-5::luc::gfp::PEST*, donde la vida media de *gfp::PEST* fue estimada en menos de una hora en un estudio previo (Frand, et al. 2005), era más baja al inicio del registro, pero la señal alcanzaba los mismos niveles que el constructo sin el dominio PEST hacia el final. Esto es lo esperado para una proteína LUC::GFP de vida media más corta, que al ser degradada más rápido, se podría acumular menos en los animales durante el crecimiento y el registro.

Con todos estos resultados, se decidió continuar con la caracterización circadiana utilizando el medio óptimo desarrollado y los nematodos que portaban tanto el *Psur-5::luc::gfp* como el *Psur-5::luc::gfp::PEST*, ya que *gfp::PEST* fue caracterizado previamente como un buen reportero para analizar la expresión génica circadiana del neuropéptido NLP36 mediante fluorescencia (van der Linden, et al. 2010).

En resumen, en este capítulo se avanzó en el desarrollo y caracterización de un modelo bioluminiscente en *C. elegans*, que sin duda resultará de gran utilidad para una variedad de estudios sobre la expresión génica, la fisiología y el comportamiento de este organismo. Teniendo en cuenta nuestro objetivo principal en la presente tesis, a esta altura contábamos con el modelo adecuado para el registro continuo durante varios días e *in vivo* de ritmos circadianos en este nematodo.

Capítulo II:

Aplicación del sistema reportero para estudiar mecanismos de regulación circadiana

“We cannot solve our problems with the same thinking we used when we created them”.

— Albert Einstein. Copenhagen, 1995.

Introducción

Repaso de conceptos básicos de cronobiología

Tal como se describió en detalle durante la introducción general, para que un proceso biológico pueda ser definido como circadiano debe cumplir al menos tres propiedades fundamentales: 1) mostrar una oscilación con un período cercano a las 24 horas, incluso en ausencia de señales ambientales, que llamamos *período de libre curso* o *“free-running”*(τ); 2) tener que la capacidad de ser *sincronizado* por un ciclo ambiental y 3) mostrar *compensación por temperatura*, es decir, que su período en *free-running* se mantenga relativamente constante frente a cambios de temperatura que se encuentren dentro del rango fisiológico del organismo ($Q_{10} \approx 1$) (Harmer, et al. 2001).

Por otro lado, se habían definido también previamente una serie de parámetros muy utilizados en el estudio de la cronobiología tales como *período*, *fase* y *amplitud* que serán muy utilizados a partir de este capítulo. En referencia a la nomenclatura, es importante también volver a recordar que bajo condiciones cíclicas de luz o temperatura (los dos principales *Zeitgebers*), por convención, *Zeitgeber time 0* o ZT0, indica el momento de encendido de la luz o el inicio del rango de temperatura baja/alta. En este caso se habla entonces de día o noche o temperatura baja o alta. Asimismo, *Circadian time* (CT) hace referencia a cualquier momento temporal durante las condiciones constantes o de *free-running* (en este caso, oscuridad o temperatura constantes). Aquí, las fases del día ya no están delimitados por el *Zeitgeber* y entonces se habla de “día subjetivo” o “temperatura alta subjetiva” para el rango temporal donde antes había luz o calor y de la misma manera “noche subjetiva” o “temperatura baja subjetiva”, para los bloques temporales que coinciden con la correspondiente ausencia de luz o pulso de frío durante la fase de sincronización (Figura 2.1). Finalmente, recordemos que a los efectos de esta tesis definimos como “sincronización” el ajuste de la fase de los ritmos por parte del *Zeitgeber*, y como “entrenamiento” al caso particular de sincronización en que la fase se mantiene luego de colocar a los nematodos bajo condiciones de constantes de luz y temperatura.

Sincronización y entrenamiento del reloj circadiano

Los organismos coordinan y ajustan su fisiología y comportamiento diariamente, a través de la utilización de reloj circadiano. La capacidad de oscilar en condiciones constantes es la cualidad más notable de este sistema y fue la responsable de su descubrimiento (De Mairan 1729), pero en su estado natural, el reloj es sincronizado a distintos *Zeitgebers* (dadores de tiempo), dado que el entorno constante está esencialmente ausente en el mundo biológico real.

La palabra entrenamiento proviene de un vocablo francés que significa literalmente “ir a bordo de un tren”. Por lo tanto, como su nombre lo indica, entrenamiento hace referencia en cronobiología a ser arrastrado por un “tren” de estímulos controlados. En este contexto, el entrenamiento de un reloj biológico se produce cuando éste es forzado a adoptar un período τ exactamente igual al del ambiente, que en general es de 24 horas (Johnson, et al. 2003) y luego es capaz de mantener la fase anterior aun en ausencia total de estímulos. Es decir, que al ser liberado bajo condiciones constantes (*free-running*), mostrará su regulación endógena, con un τ que es cercano, pero no exactamente igual a 24 horas, manteniendo el máximo de actividad en el mismo horario circadiano derivado del ciclo ambiental antes impuesto.

Por otro lado, la sincronización representa el ajuste constante del reloj a los *Zeitgebers* bajo condiciones cíclicas, de manera de para estimar de manera interna el tiempo local externo. En este sentido, “entrenamiento” no es lo mismo que “sincronización”. Podemos hablar entonces de que un ritmo está sincronizado, solo analizando su comportamiento bajo condiciones variables, si la forma de onda de la oscilación del ambiente produce un efecto sobre la forma de onda del ritmo controlado por esas condiciones ambientales (el reloj interno). Por lo tanto, el reloj biológico no está necesariamente entrenado a un ciclo ambiental cuando está sincronizado.

Las consecuencias del entrenamiento son que el período de un ritmo biológico se vuelve igual en promedio a la del estímulo utilizado para la sincronización y que se puede establecer una relación de la fase entre la condición cíclica y la condición donde hay ausencia de estímulos (*free-running*) (Aschoff 1962b; Daan y Aschoff 2011). Esta relación de fase se calcula tomando un punto determinado del ciclo de sincronización (por ejemplo, el momento de encendido de la luz) y una fase de referencia en el ritmo en *free-running* (por

ejemplo el máximo de actividad). La diferencia entre ambos puntos es denominada ángulo de fase (ψ).

Por esta razón, para establecer que un ciclo ambiental es capaz de entrenar a un ritmo biológico, es necesario mostrar que: 1) el período del ritmo es capaz de adoptar el período de las condiciones cíclicas con una relación de fase estable y 2) después de liberar al organismo en condiciones constantes, éste muestra su período endógeno con la fase determinada por el ciclo ambiental (Daan y Aschoff 2011). En algunos casos, el ritmo puede parecer entrenado al estímulo periódico, pero después de remover el ciclo ambiental el ritmo en *free-running* muestra una fase que no era predecible a partir del comportamiento previo frente al estímulo. En este caso, se dice que el estímulo fuerza la actividad del comportamiento circadiano sin generar un entrenamiento real en el reloj central. Este fenómeno es conocido como enmascaramiento (*masking*) (Figura 2.1).

Estímulos ambientales rítmicos que sincronizan al reloj

Como se dijo anteriormente, un estímulo ambiental capaz de sincronizar a una variable circadiana es denominado *Zeitgeber* (de la palabra alemana, “dador de tiempo”). En la naturaleza, muchos factores ambientales oscilan a lo largo del día, incluyendo la luz y la oscuridad, la temperatura, la humedad, la disponibilidad de comida and algunas actividades sociales y algunos de estos factores funcionan como *Zeitgebers* para distintos organismos.

El estímulo ambiental más consistente y el más fuerte para la mayoría de los organismos es el ciclo de 24 h de luz y oscuridad (Daan y Aschoff 2011). En el mundo natural, este ciclo causado por la rotación de la Tierra provee una señal temporal muy precisa para muchos organismos. Además, en muchas latitudes, la señal luz-oscuridad fluctúa de manera estacional de una forma muy controlada. En el laboratorio, muchos organismos con capaces de entrenar a estímulos lumínicos mediante un ciclo de luz-oscuridad artificial de 24 h. La luz es detectada en general por distintas clases de foto-receptores presentes incluso en organismos ciegos (Daan y Aschoff 2011).

La temperatura es el segundo *Zeitgeber* de mayor importancia, ya que existen constantes variaciones térmicas cíclicas en la atmósfera como consecuencia de la radiación solar a la cual se han adaptado las distintas formas de vida. Sin embargo, debido a cambios bruscos diarios y estacionales, la temperatura puede considerarse como un estímulo

ambiental menos preciso. Aun así, existen organismos capaces de entrenar a ciclos de temperatura tan pequeños como de 2°C de variación (Johnson, et al. 2003).

Entrenamiento a distintos ciclos T

Una de las mejores maneras de demostrar entonces que una variable circadiana ha sido entrenada por el *Zeitgeber*, es estudiar la misma bajo ciclos ambientales con períodos diferentes (T) a 24 horas. Estos ciclos distintos de 24 horas son denominados “ciclos T” y son muy utilizados para caracterizar comportamientos circadianos. Cuando el reloj circadiano es sometido a distintos ciclos T, la relación de fase, es decir el momento de máxima actividad, entre el ritmo bajo 24 h y el mismo ritmo bajo un período distinto, cambia sistemáticamente, mostrando un ligero retraso bajo ciclos ambientales de períodos más cortos y avances relativos en ciclos ambientales de períodos mas largos. (Aschoff 1962b; Hoffmann 1969). Por otro lado, si el ritmo observable muestra una relación de fase similar en los distintos ciclos T, es probable que el ritmo de salida sea una consecuencia de un efecto de *masking* más que de verdadero entrenamiento del oscilador central.

El entrenamiento a ciclos T distintos de 24 h puede tener efectos dramáticos sobre el comportamiento. Por ejemplo, cuando ratones que normalmente son activos de noche son entrenados en el laboratorio a ciclos T de 26 h, el inicio de la actividad muestra un avance de fase comparado con el ciclo de 24 h, de manera que los animales se vuelven activos durante la fase de luz. Por otro lado, estos mismos ratones activos durante la noche bajo 24 h, son incluso mas nocturnos bajo un ciclo de 22 h (Aschoff 1965) (Figura 2.1).

Los relojes circadianos solo pueden ser entrenados dentro de un rango de períodos del *Zeitgeber*, lo que se denomina “rango de entrenamiento”. Por ejemplo, es posible entrenar organismos a ciclos T de 20 o 22 h (LD 10:10, T = 20 ó LD 11:11, T = 22); sin embargo, por debajo o por encima de cierto T, muchos organismos son incapaces de entrenarse y muestran su período endógeno o de *free running*. Los límites de entrenamiento son distintos para cada organismo y la única manera de conocer el rango de entrenamiento es mediante el análisis experimental. Por ejemplo, en roedores como ratones y hámster el rango va aproximadamente desde T = 21 a T = 26. En muchos otros animales y plantas es posible entrenar el reloj circadiano a ciclos T tan cortos como 18 h y tan largos como 28 a 30 h (Bunning 1973).

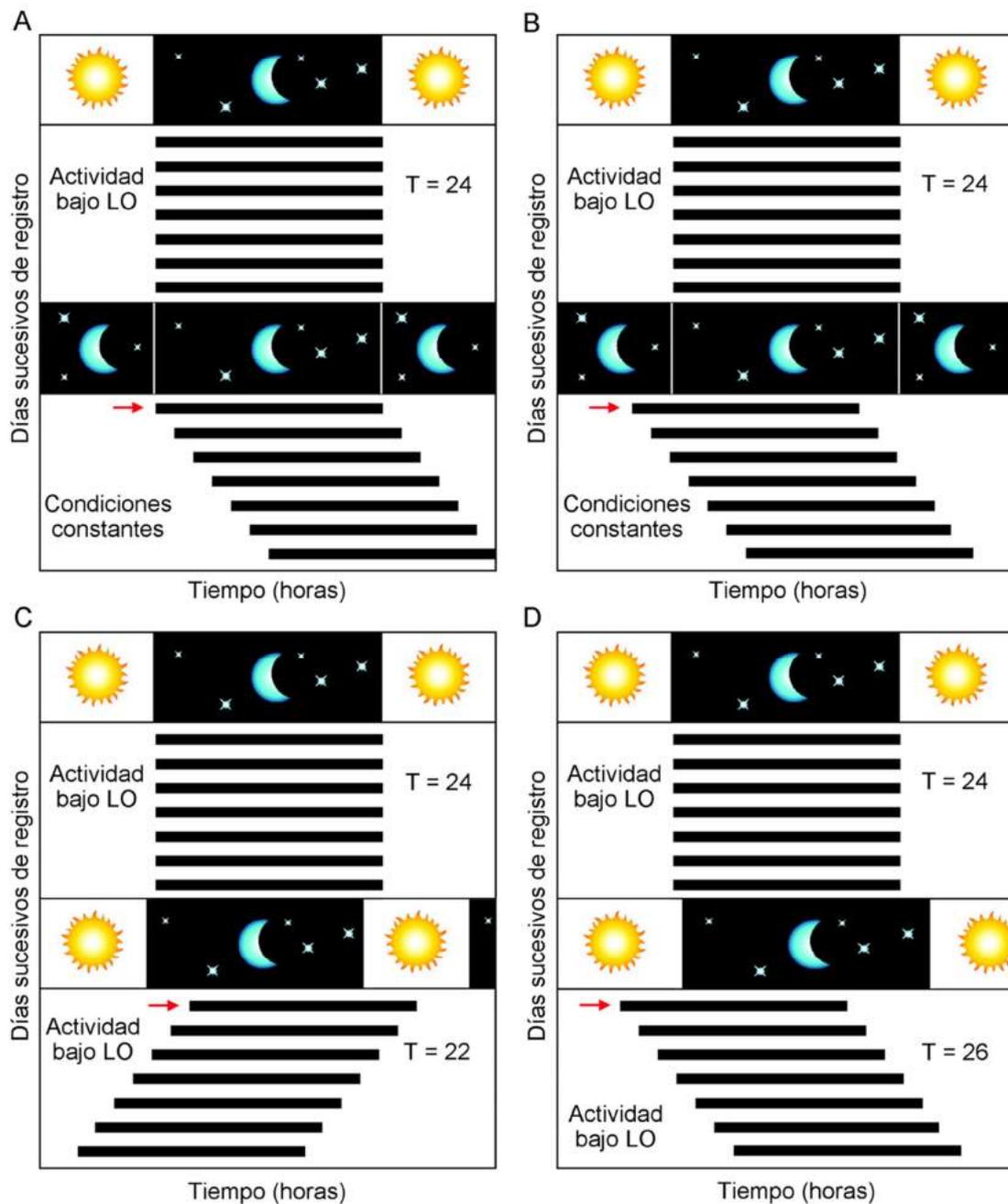


Figura 2.1| Entrenamiento del reloj circadiano a fotoperíodos continuos, ejemplificado mediante actogramas de actividad locomotora de roedores en una rueda. A| Representación esquemática de la actividad locomotora de un roedor que corre en una rueda bajo un ciclo de Luz-oscuridad (LO) de 24 h (12 h:12 h) y luego es liberado en condiciones constantes. En este caso, el actograma está dibujado en una escala de 24 h, por lo que es posible determinar que el período del animal en *free-running* es mayor a 24 h y que su reloj biológico está entrenado al *Zeitgeber*, ya que el inicio de la actividad (señalado con la flecha roja) muestra la misma fase que durante LO. **B|** Este es un caso similar al anterior, pero donde la actividad del animal no está entrenada realmente al *Zeitgeber* sino que muestra *masking*, lo que se puede visualizar por el cambio brusco del momento de inicio de la actividad cuando este es liberado en condiciones constantes (señalado con la flecha roja). **C|** En este

caso el animal fue entrenado durante varios días a un ciclo LO de 24 h (12 h:12 h) y luego es sometido a un ciclo T mas corto de 22 h (11 h:11 h). Bajo estas nuevas condiciones, la actividad muestra un retraso de fase comparado con el ciclo de 24 h, es decir, el inicio de la actividad empieza mas tarde y los animales se vuelven mas nocturnos. **D]** En este último ejemplo, el animal fue entrenado durante varios días a un ciclo LO de 24 h (12 h:12 h) y luego es sometido a un ciclo T mas largo de 26 h (13 h:13 h). Bajo estas nuevas condiciones, la actividad muestra un avance de fase comparado con el ciclo de 24 h, es decir, el inicio de la actividad empieza mas temprano y los animales se vuelven diurnos. Adaptada de Golombek y Rosenstein, 2010.

Por otro lado, algunas veces organismos sometidos a ciclos cortos exóticos, tales como $T = 12$ (LD 6:6), no son capaces de entrenar pero tampoco muestran su período τ de *free running* sino que permanecen entrenados al ciclo de 24 h. Esto ocurre cuando el ciclo externo tiene un período que es múltiplo del ritmo interno. En general cuando el período del *Zeitgeber* es cercano a la mitad del período endógeno ($T \approx \tau/2$), el reloj puede entrar a cualquier otro *Zeitgeber* que hay en el ambiente, un fenómeno denominado “*demultiplicación de frecuencia*” (Morrow, et al. 1999).

Entrenamiento a ciclos esqueleto

Un descubrimiento sorprendente acerca de la biología circadiana es que, en algunos organismos, el reloj no solo puede ser entrenado a fotoperíodos completos (por ejemplo un ciclo LO de 12:12 o de 14:10) sino también a fotoperíodos incompletos, denominados fotoperíodos esqueleto. Este entrenamiento se basa en la asunción de que lo más relevante del fotoperíodo para el entrenamiento son las transiciones discretas entre el encendido y el apagado de la luz. Entonces, dentro un entrenamiento de 12:12 LO, lo más importante para el reloj es en realidad registrar entre qué horarios la luz se enciende y se apaga, y estas transiciones pueden ser aparentemente mimetizadas con un ciclo de luz-oscuridad mínimo, por ejemplo con pulsos de solo 15 minutos de duración cada 12 h. Estos fotoperíodos esqueleto han sido capaces de reproducir los resultados encontrados bajo ciclos continuos razonablemente bien en algunos organismos tales como *Drosophila melanogaster* y ciertos roedores (Pittendrigh 1960, 1966, 1976a, 1981b). Mediante diversos experimentos, se ha determinado que los fotoperíodos esqueleto diseñados para proveer el *Zeitgeber* en un formato de dos pulsos por cada ciclo circadiano generan un mejor entrenamiento y un ángulo de fase mas estable en comparación con diseños de 1 solo pulso, al inicio o al final de la fase de luz (Pittendrigh 1976a). En general, el esquema más utilizado actualmente consiste

entonces en dos pulsos de luz de 1 h, delimitando el inicio y el final del día durante varios ciclos de entrenamiento y el posterior análisis del ritmo bajo condiciones de *free running* para determinar la relación de fase (Figura 2.2).

En la naturaleza, los fotoperíodos esqueleto son muy comunes. Por ejemplo, muchos animales nocturnos realmente viven solo bajo estos ciclos, ya que durante la noche salen a cazar y durante el día se esconden para dormir y evitar ser atacados por predadores en cuevas o madrigueras totalmente oscuras donde no llega nada de luz solar. Por lo tanto, la única luz que reciben corresponde a tiempos muy cortos durante el amanecer y el atardecer y esto es suficiente para entrenar al reloj circadiano. En el laboratorio, unos de los primeros estudios que mostraron elegantemente este tipo de respuestas fue el DeCoursey, en 1986, utilizando distintos fotoperíodos esqueleto en la ardilla voladora *Glaucomys volans* (DeCoursey 1986). Simular este tipo de protocolos en el laboratorio tiene la utilidad adicional de estar estudiando un fenómeno muy parecido al que se da naturalmente, algo que no siempre se logra en condiciones artificiales.

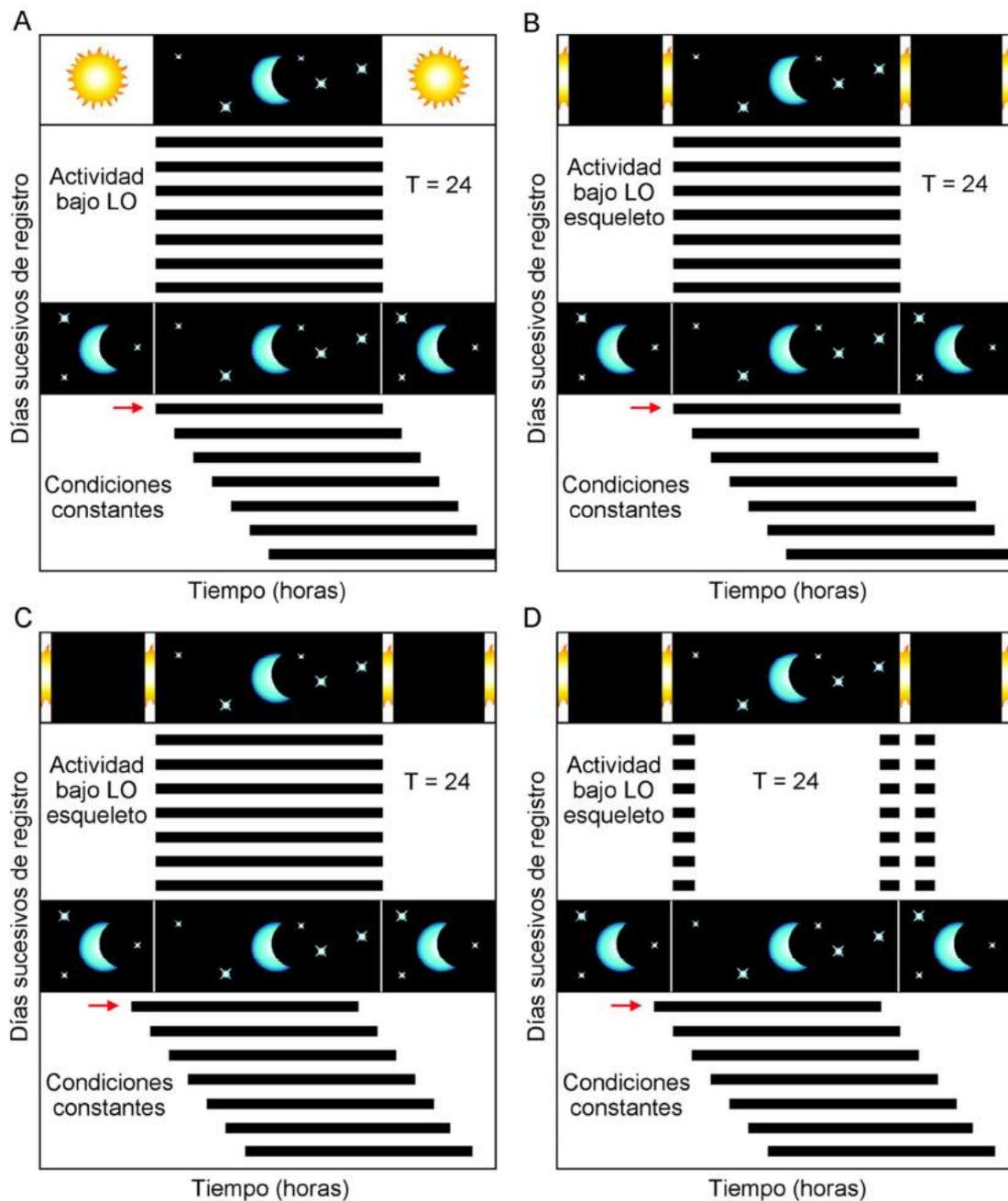


Figura 2.2| Entrenamiento del reloj circadiano a fotoperíodos esqueleto. **A|** Representación esquemática de la actividad locomotora de un roedor que corre en una rueda bajo un ciclo de Luz-oscuridad (LO) de 24 h (12 h:12 h) y luego es liberado en condiciones constantes. En este caso, el actograma está dibujado en una escala de 24 h, por lo que es posible determinar que el período del animal en *free-running* es mayor a 24 h y que su reloj biológico está entrenado al *Zeitgeber*, ya que el inicio de la actividad (señalado con la flecha roja) muestra la misma fase que durante LO. **B|** El mismo experimento antes descrito es realizado ahora con el ratón bajo un fotoperíodo esqueleto de 24 h, el cual consiste de 2 pulsos de luz de 1 h cada uno, cada 12 h, y luego el animal es dejado en condiciones constantes. En este caso, el animal interpretó el fotoperíodo esqueleto como un ciclo continuo y su reloj biológico está entrenado al *Zeitgeber*, ya que el inicio de la actividad (señalado

con la flecha roja) muestra la misma fase que durante LO. **C** Este es el mismo caso anterior, pero donde el animal, a pesar de haber interpretado el fotoperíodo esqueleto como un fotoperíodo continuo y mostrar un patrón equivalente de distribución de actividad durante LO, en realidad no está entrenado al *Zeitgeber*. El *masking*, es evidente por el cambio brusco del momento de inicio de la actividad cuando este es liberado en condiciones constantes (señalado con la flecha roja). **D** En una tercer posibilidad, puede suceder que el animal no sea capaz de interpretar el fotoperíodo esqueleto como un ciclo continuo de LO y por ende su reloj biológico no sea capaz de sincronizarse al ciclo ambiental, por lo que su actividad muestra *masking* ya bajo condiciones de LO. Cuando es liberado en *free-running* el animal muestra su período endógeno y su propia fase, y no se puede hablar de entrenamiento debido a la imposibilidad de comparar las fases antes y después del ciclo LO. Adaptada de Golombek y Rosenstein, 2010.

Re-sincronización del reloj circadiano

Cuando se realiza un viaje transmeridiano, el reloj está expuesto a un cambio brusco en las condiciones ambientales. Por ejemplo, si se viaja al este, el amanecer y el atardecer ocurren más temprano y el horario de la luz natural está más avanzado con respecto al fotoperíodo original. Esto genera como consecuencia una noche más corta al principio seguida por un nuevo ciclo de entrenamiento. Cuando se viaja al oeste, el sol sale y se pone más tarde que en fotoperíodo original, dando como resultado un día aparentemente más largo, seguido por un nuevo ciclo. En ambos casos se dice que el reloj sufre un cambio de fase (*phase shift*) del *Zeitgeber* en el ambiente. Aunque los viajes de norte a sur no representan cambios bruscos en husos horarios, también existen algunos cambios en el fotoperíodo debido a los cambios en la latitud. En los casos de viajes longitudinales y latitudinales, el reloj circadiano central debe resetearse para volver a sincronizarse con el nuevo ciclo ambiental local. Durante el período de adaptación, se producen en general ciclos intermedios, denominados transientes, donde se observan algunos desajustes entre el viejo y el nuevo ciclo, hasta que se logra de nuevo un ciclo estable. En humanos, el período de readaptación durante estos viajes se denomina *jet lag*.

El reloj circadiano está también sometido a cambios en las condiciones de luz y temperatura a lo largo del año, causados por los cambios estacionales. Para mantenerse sincronizado a estos ciclos ambientales fluctuantes, el reloj debe ser capaz de adaptarse a estos cambios y resetearse constantemente. La razón por la cual un organismo necesita resetear su reloj se basa en el hecho de que cambios en los *Zeitgebers* producen cambios de fase en el reloj central. Por lo tanto, el reseteo solo se puede entender analizando qué le ocurre al ritmo cuando es sometido a cambios bruscos en las condiciones ambientales.

La oscilación circadiana debe responder de manera diferente a la luz en distintos momentos del ciclo para poder sincronizarse a un ciclo de luz-oscuridad. En cronobiología, para analizar esto se utiliza mucho un tipo de experimento denominado “curva de respuesta de fase” (*PCR* en inglés) que consiste en un gráfico del cambio de fase del ritmo circadiano en función del momento circadiano en el que un estímulo o *Zeitgeber* es aplicado (Aschoff 1965; Pittendrigh 1981b) (Figura 2.3). Cuando un organismo entrenado a un ciclo ambiental y luego mantenido en condiciones constantes es expuesto a una señal perturbadora única (por ejemplo un pulso de luz corto) a diferentes momentos del período de 24 h, el reloj mostrará distintos tipos de cambios de fase. En términos generales, pulsos de luz dados durante el día subjetivo (es decir, la fase que correspondería al día durante el entrenamiento previo, CT0-12) tienen un efecto nulo sobre el inicio de la actividad rítmica (fase del ritmo) en días sucesivos. Por el contrario, pulsos de luz presentes durante la noche subjetiva del organismo (es decir, la fase que correspondería a la noche durante el entrenamiento previo, CT12-24) generalmente provocan un cambio de fase brusco del ritmo en *free-running*. De esta manera, durante la primera mitad de la noche subjetiva los pulsos de luz generan un retraso en el ritmo (por ejemplo, la actividad locomotora comienza más tarde), mientras que durante la segunda mitad de la noche subjetiva estos mismos pulsos generan un avance de fase en el ritmo (es decir, la actividad empieza más temprano) (Johnson, et al. 2003).

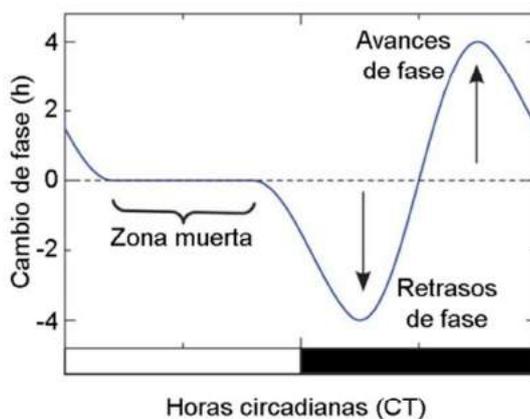


Figura 2.3| Representación esquemática de una curva de respuesta de fase a la luz. El eje Y representa el cambio de fase que sufre el organismo que se encuentra bajo condiciones constantes cuando recibe el pulso de luz; si el cambio es un avance de fase, el valor es positivo, mientras que si se trata de un retraso de fase, el cambio se representa con valores negativos. A lo largo del día subjetivo, los pulsos de luz no tienen efecto en general sobre la fase, por lo que se denominó a esta región como zona muerta. Si el pulso se efectúa al comienzo de la noche subjetiva se generan retrasos de fase, mientras que si se dan al final de la noche subjetiva se producen avances de fase. Adaptada de Hasegawa y Arita, 2014.

En muchos organismos se observa a menudo un transiente en el comportamiento durante los primeros ciclos después de que el pulso de luz o temperatura fue aplicado (Pittendrigh 1960; Johnson, et al. 2003). En mamíferos, la re-sincronización frente a un avance de fase suele ser lenta, presentar muchos transientes y requerir varios días en alcanzar el nuevo estado estable, mientras que cuando se realiza un cambio de fase por retraso, se observa exactamente lo contrario y la re-sincronización del reloj suele ser inmediata (Daan y Aschoff 2011). Estos ciclos transientes probablemente reflejan un estado de desequilibrio entre el reloj central y el ritmo de salida en respuesta al cambio de fase (Pittendrigh 1981b) (Figura 2.4).

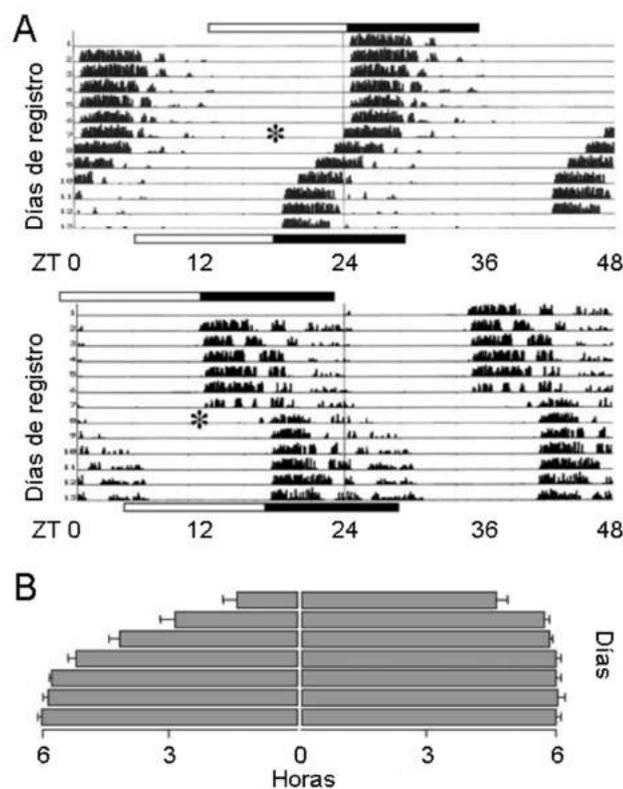


Figura 2.4| Re-sincronización del reloj circadiano de un roedor frente a distintos cambios bruscos de fase. A| Arriba, Actograma de actividad de un ratón (graficado como un doble planteado) que fue entrenado a un esquema de LO de 24 h (12 h:12 h) y luego se corre el fotoperíodo bruscamente mediante un avance de fase de 6 h (el * indica el momento del cambio). Bajo este nuevo ciclo, la luz se enciende 6 h más temprano y el reloj del animal tarda alrededor de 5 días en volver a alcanzar un estado estable. Abajo, el mismo experimento antes descrito es realizado ahora con el ratón bajo un fotoperíodo de LO de 24 h (12 h:12 h) y luego se lo somete a un retraso de fase de 6 h. Bajo este nuevo ciclo, la noche se alarga, la luz se enciende 6 h más tarde y el reloj del animal es capaz de adaptarse casi inmediatamente al nuevo *Zeitgeber*, mostrando un transiente muy corto. **B|** Cuantificación de la cantidad de días que tarda el reloj del animal en volver a alcanzar un estado estable en la fase luego del cambio del fotoperíodo. Como se puede observar, la re-sincronización

frente al avance de fase es lenta, presenta muchos transientes y requiere varios días en alcanzar el nuevo estado estable, mientras que cuando se realiza el cambio de fase por retraso, se observa exactamente lo contrario y la re-sincronización del reloj es casi inmediata. Adaptada de Reddy, et al. 2002.

Es importante aclarar que, en el contexto de este trabajo, se utilizará el término *sincronizado* para definir a aquellas poblaciones de nematodos que muestren oscilaciones bajo los ciclos ambientales, cuyo período y fase sean modulados por los *Zeitgebers* impuestos; *rítmico* hará referencia a aquellas poblaciones que muestren oscilaciones con períodos cercanos a las 24 h bajo condiciones constantes de luz y oscuridad y finalmente, el término *entrenado* será empleado para aquellas poblaciones que sean capaces de sincronizar bajo el ciclo ambiental y luego muestren ritmos que mantengan la acrofase (momento de mayor actividad) previa durante las condiciones cíclicas de luz y oscuridad, pero bajo condiciones constantes. Además, si la acrofase no se mantiene luego de dicha transición, hablaremos de un ritmo enmascarado por el reloj (*masking*).

***Zeitgebers* a los que está expuesto de *C. elegans* en su ambiente natural**

Como se describió previamente, *C. elegans* es un nematodo de vida libre que habita en el suelo de muchas regiones del mundo. A pesar del gran volumen de información disponible acerca del desarrollo, genética y sistema nervioso de este organismo, muy poco se conoce acerca de la vida del nematodo fuera de la placa de Petri, y la historia natural y la ecología de *C. elegans* están recién comenzando a ser estudiadas en su ambiente original, a través de la caracterización de distintos aislamientos (Felix y Braendle 2010; Frezal y Felix 2015). A partir de los primeros estudios ecológicos, se sabe ahora que en su nicho de tierra y materia vegetal en descomposición, estos nematodos están expuestos a un medio ambiente complejo biológicamente, sujeto a fluctuaciones diarias de temperatura como consecuencia de la energía solar (Robinson 1994), pero también reciben directamente radiación cuando migran a la superficie del suelo en busca de alimento o cuando muestran su comportamiento de nictación para ser acarreados por insectos como estrategia de dispersión y supervivencia (Frezal y Felix 2015). En este sentido, la temperatura y la humedad varían con el momento del día, con la distancia a la superficie y a lo largo de las estaciones. La temperatura del suelo varía diariamente con una forma de onda sinusoidal que se propaga hacia abajo de la tierra con una amplitud que decae exponencialmente con

la profundidad, mostrando un máximo de 10°C de variación en la superficie, pero menos de 2°C a los 15-20 cm de profundidad (Figura 2.5) (Robinson 1994; Monteith y Unsworth 2013), donde *C. elegans* ha sido aislado (Morise, et al. 2012; Petersen, et al. 2014). A medida que la profundidad aumenta, el máximo de temperatura de esta onda sinusoidal se retrasa cada vez más desde el mediodía hasta el atardecer, y como resultado se genera un mayor desfase entre el pico de la temperatura y el momento de mayor radiación solar. Esta combinación particular de factores ambientales puede ser de gran relevancia para la biología circadiana de este organismo, dado que varios trabajos han demostrado la alta sensibilidad de *C. elegans* para sensor tanto luz UV de longitud de onda corta (de manera directa e indirecta) (Edwards, et al. 2008; Liu, et al. 2010), como variaciones mínimas de temperatura (Ramot, et al. 2008), mediante la participación de distintas vías de transducción de señales, en la que están involucradas diversos grupos de neuronas tales como ASJ, AWB, ASK y ASH para la foto-recepción (Ward, et al. 2008; Bhatla y Horvitz 2015) y AFD, AWC y ASI para la termo-recepción (Kimura, et al. 2004; Clark, et al. 2006; Kimata, et al. 2012).

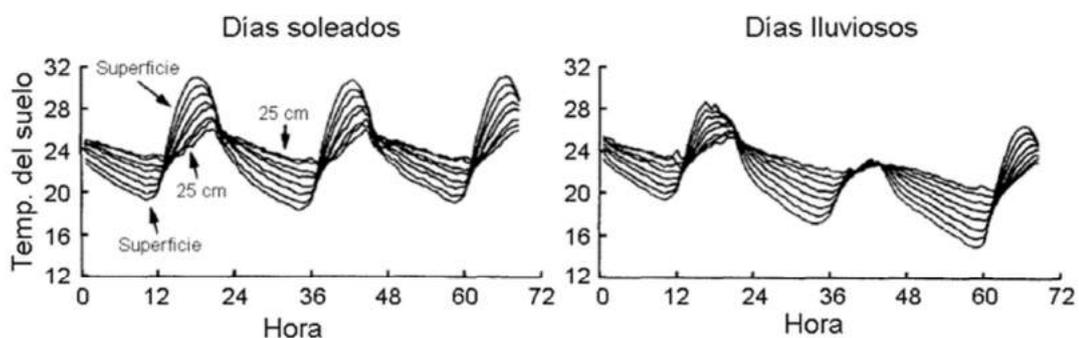


Figura 2.5| Variación de temperatura en suelo húmedo cultivado de Texas, Estados Unidos. Gradientes de temperatura medidos desde 5 cm de la superficie hasta una profundidad de 25 cm en un campo cultivado con algodón, durante el final del verano en el este de Texas. Estos registros corresponden a uno de los primeros trabajos que analizó el movimiento de 5 especies distintas de nematodos en suelo sometidos a gradientes naturales de temperatura simulados en el laboratorio mediante un dispositivo cilíndrico (Robinson 1994).

En este capítulo se utilizará el método basado en el reportero *luc::gfp* antes desarrollado, para caracterizar ritmos de luminiscencia de *sur-5* en poblaciones de nematodos sincronizadas a un ciclo dual de luz y temperatura. Asimismo, mediante distintas variaciones de las condiciones foto y termoperiódicas, se analizarán diversas propiedades subyacentes de los ritmos de luminiscencia que han sido descritas como fundamentales en el reloj de otros organismos modelo.

Materiales y Métodos

Cepa de nematodos

En esta sección del trabajo se utilizaron nematodos pertenecientes a la cepa N2 (*wild-type*), adquiridos del *Caenorhabditis Genetics Center* (Universidad de Minnesota, Estados Unidos, <http://cbs.umn.edu/cgc/home>); las líneas con el arreglo extracromosomal *Psur-5::luc::gfp*; pRF4, la línea integrada espontáneamente a partir de este arreglo extracromosomal y las líneas transgénicas con *Psur-5::luc::gfp::PEST*; pRF4, todas generadas mediante microinyección. Todos los ensayos de luminiscencia fueron realizados con las cepas portandos los arreglos extracromosomales.

Ensayo de luminiscencia

Los registros de luminiscencia se realizaron en placas de Petri de 35 mm o en placas *multiwell*, bajo distintas condiciones ambientales. En todos los casos, se utilizó el medio de luminiscencia óptimo descrito en los métodos generales y 100 nematodos en cada población.

Ensayos bajo condiciones constantes (OO/CC): placa de Petri

Este ensayo se realizó tal como se describió durante la sección de métodos generales.

Ensayo de luminiscencia en placa *multiwell* bajo LO/FC y condiciones constantes

Estos ensayos fueron realizados tal como se describió en la sección de métodos generales. Para los ensayos generales y para la re-sincronización por cambio de fase se utilizó el esquema clásico de 3,5 días bajo el ciclo de 24 h LO/FC 12 h: 12 h (0/400 lux; 15,5°C/17°C, ZT0, luz ON e inicio de la fase fría) y 4 días en condiciones de *free-running* (OO/CC, 17°C). Para la compensación de temperatura, se utilizó un segundo ciclo LO/FC 12 h: 12 h (0/400 lux; 19,5°C/21°C, ZT0, luz ON e inicio de la fase fría).

Finalmente, para el experimento bajo LO/FC-LL/FF, los nematodos fueron entrenados durante 3,5 días bajo el ciclo de 24 h LO/FC 12 h: 12 h (0/400 lux; 15,5°C/17°C, ZT0, luz ON e inicio de la fase fría) y 4 días en condiciones de luz constante y temperatura fría (LL/FF).

Análisis de Datos

Los datos fueron analizados tal como se describió en la sección de métodos generales. Para el análisis de re-entrenamiento por el cambio de fase, un *test* de *Rayleigh* seguido de un ANOVA de una vía y un *test* de Tukey de comparación múltiple fueron empleados para analizar la diferencia estadística entre la media de acrofases bajo LO/FC antes y después del cambio de fase y para comparar la media de las acrofases del segundo esquema de entrenamiento (LO/FC2) con el *free-running*.

Si no se indica otra cosa, la significancia estadística fue calculada mediante un ANOVA de una vía, seguido por un *test* de Dunnet de comparación de grupos, y en todos los caso un valor de $P < 0,05$ fue considerado como el mínimo para ser estadísticamente diferente. Los valores de significancia se denotaron como sigue: *** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,05$.

Resultados

Registros de luminiscencia de poblaciones de nematodos bajo LO/FC y OO/CC

Como punto de partida para realizar los experimentos circadianos, se realizó una búsqueda bibliográfica para conocer acerca de las condiciones ambientales en que las que se desarrolla el nematodo, especialmente en lo relacionado con la luz y la temperatura. Como se describió en la introducción, en su ambiente natural, *C. elegans* probablemente está expuesto a ambos estímulos al mismo tiempo y su ciclo de vida involucra el desplazamiento constante entre la superficie del suelo donde encuentra frutas en descomposición y el *compost* (unos pocos centímetros por debajo de la superficie) y suelo más profundo, a no más de 20 cm (Felix y Braendle 2010; Felix y Duveau 2012; Frezal y Felix 2015). Además, como se describió también previamente, debajo del suelo, el máximo de temperatura está retrasado unas horas con respecto al momento de mayor radiación solar. Dado que *C. elegans* es un nematodo transparente y por ende altamente sensible a la luz UV, es probable entonces que pase la mayor parte del día dentro del suelo, evitando los efectos nocivos de la radiación. Además, en el mismo sentido, en nuestro laboratorio ya hemos descrito que se trata de un animal nocturno, que muestra un máximo de actividad durante la madrugada (Simonetta, et al. 2009; Herrero, et al. 2015).

Con toda esta información, decidimos realizar un registro de temperatura en el suelo en Concordia, Entre Ríos, donde previamente habíamos identificado la presencia de distintos nematodos en el suelo, a través de unos sensores de temperatura altamente sensibles denominados Termocrones *iButton DS1921H-F5* (Maxim Integrated, Estados Unidos), que tienen una resolución de 0,125°C. Los sensores fueron enterrados a aproximadamente 15-20 cm de profundidad, debajo de varios arbustos en una zona muy rica en *compost* durante febrero de 2013 y la temperatura fue registrada durante algunos días. Los resultados mostraron que la variación promedio de temperatura entre los tres sensores utilizados fue de $1,83 \pm 0,11^\circ\text{C}$, cercana a la que efectivamente estaba publicada en bibliografía (Robinson 1994; Monteith y Unsworth 2013) (Figura 2.6).

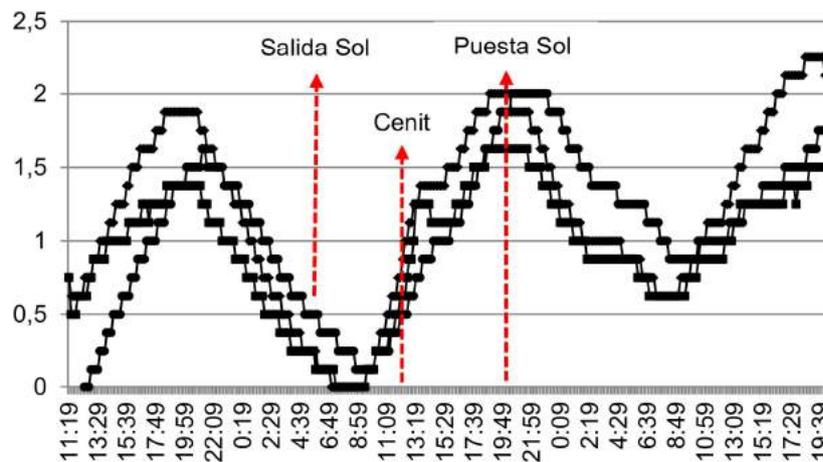


Figura 2.6| Registros de temperatura realizados durante el verano de 2013 (9 al 12/2/2013) en Concordia, Entre Ríos, Argentina (31°23'21.9"S y 58°00'30.7"O). Tres sensores *Termocrones iButton DS1921H-F5* fueron colocados en la tierra a aproximadamente 15-20 cm de profundidad y la temperatura fue registrada cada 10 minutos durante 72 h. Se muestran valores normalizados al mínimo de cada serie de datos.

De esta manera, se decidió utilizar una forma original de entrenamiento de los nematodos utilizando condiciones cíclicas que se ajustaran mejor a aquellas encontradas en el nicho natural de los animales, el cual consistió de un esquema de ciclos cuadrados que combinan luz y temperatura. El encendido de la luz coincide con el inicio de la fase fría de entrenamiento, y la variación de temperatura es pequeña, de $1,5 \pm 0,125^{\circ}\text{C}$, mimetizando las condiciones encontradas en la profundidad del suelo a la que *C. elegans* fue aislado (Figura 2.7) (Morise, et al. 2012; Petersen, et al. 2014).

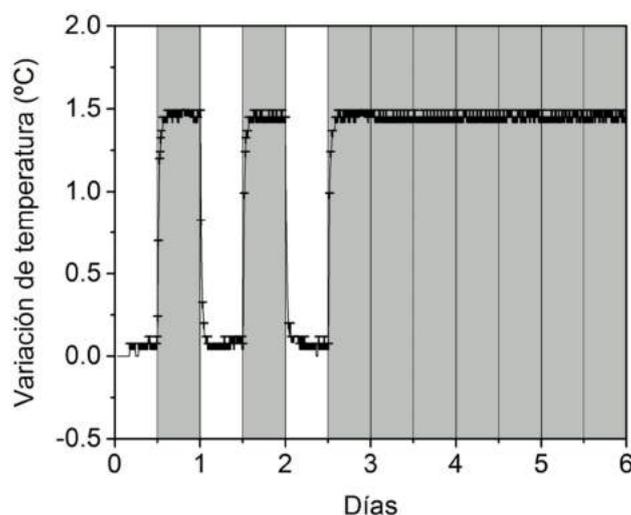


Figura 2.7| Condiciones foto y termoperiódicas simuladas en una de las incubadoras utilizadas para entrenar a los nematodos. Tres sensores *Termocrones iButton DS1921H-F5* fueron colocados en la incubadora en distintas posiciones y se muestran los resultados de temperatura como un promedio \pm SEM. Las barras blancas indican la fase de luz (400 lux) y las barras grises la de oscuridad (0 lux).

Para analizar la luminiscencia de los nematodos bajo el ciclo antes mostrado, se utilizó una estrategia previamente desarrollada para medir ritmos en plantas (Perales, et al. 2006), que consiste en realizar el registro en un luminómetro para placas *multiwell* dentro de una incubadora que controla las condiciones ambientales. El *software* se programa de manera tal que permite la entrada y la salida de la placa cada 15 minutos, con lo cual los nematodos pueden recibir luz y temperatura a lo largo de todo el día mientras se registra la luminiscencia. Este formato tiene además la ventaja de permitir un rango de temperatura de registro amplio, con un mínimo de 15,5°C, que es el límite mas bajo para el luminómetro.

Bajo este nuevo esquema de sincronización, los nematodos que portaban el arreglo extracromosomal de *Psur-5::luc::gfp* mostraron una oscilación robusta y claramente sincronizada al ciclo de LO/FC (15.5/17°C). La luminiscencia mostró un incremento antes del comienzo de la fase de oscuridad y temperatura alta, indicando una respuesta de anticipación al momento de transición de los *Zeitgebers*, una característica muy importante de la sincronización circadiana. Además, en una proporción de las poblaciones, la luminiscencia mostró una clara correlación de fases antes y después de que los nematodos fueran liberados en oscuridad y temperatura alta constante, indicando un entrenamiento verdadero, y no una respuesta de tipo enmascaramiento. Del total de poblaciones analizadas (n = 77), el 75 % se sincronizaron al ciclo LO/FC (n = 58), el 48 % mostraron estar entrenadas cuando fueron liberadas en condiciones constantes (n = 28) (es decir, mantuvieron la acrofase con respecto al ciclo anterior) y alrededor del 50 % fueron rítmicas en condiciones constantes.

Los picos de luminiscencia fueron detectados a $ZT15,6 \pm 0,3$ h y $CT16.8 \pm 0,7$ h mediante un *test* de *Rayleigh* y no se halló diferencia significativa entre ambas medias. El período promedio de las oscilaciones bajo condiciones constantes de oscuridad y 17°C fue de $25 \pm 0,4$ h (n = 33) (Figura 2.8).

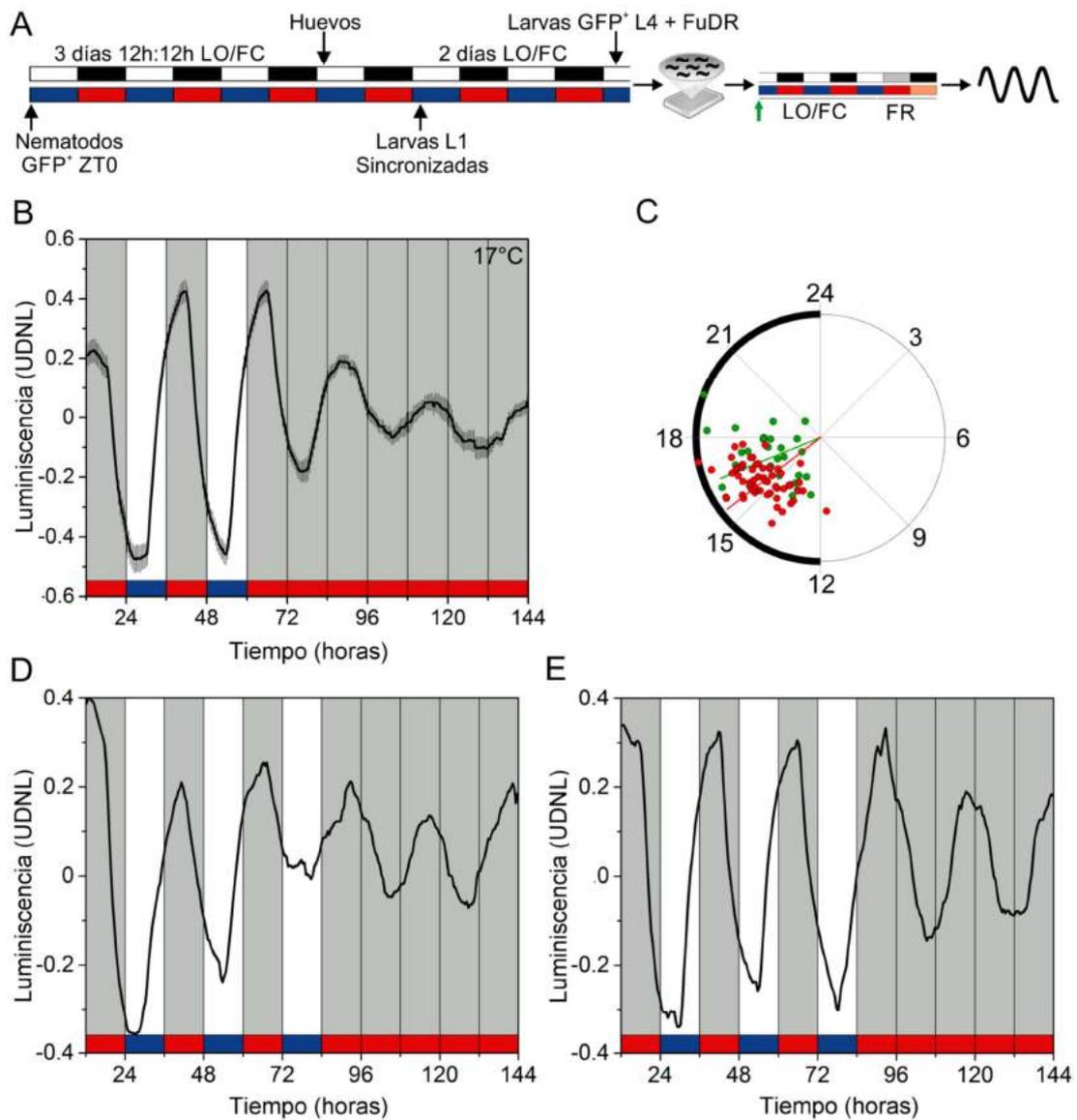


Figura 2.8| Luminiscencia emitida por poblaciones de 100 nematodos transgénicos con *Psur-5::luc::gfp* bajo condiciones de entrenamiento y constantes. **A|** Representación esquemática de las condiciones foto y termo-periódicas utilizadas y del experimento. La luminiscencia se registró bajo condiciones de LO/FC (400/0 lux, 15.5/17°C) y luego bajo condiciones constantes (*free-running*, FR). La flecha verde indica el momento donde comenzó el registro de luz (ZT10). **B|** Luminiscencia promedio \pm SEM de los nematodos adultos bajo LO/FC y luego OO/CC (n = 28). **C|** Gráfico de *Rayleigh* que muestra las acrofas (máximo) de los registros de luminiscencia bajo LO/FC (n = 58, puntos rojos) y OO/CC (n = 28, puntos verdes). Las 30 poblaciones que no se muestran bajo FR fueron arrítmicas o mostraron *masking* (no mantuvieron la fase cuando fueron liberadas en FR). *Test de Rayleigh*, $P < 0,001$; *multi-sample test for equal median directions*, fase promedio de LO/FC vs fase promedio de OO/CC, no significativo. **D-E|** Registros de luminiscencia de dos poblaciones representativas de B. UDNL: Unidades normalizadas de luminiscencia sin la tendencia (*detrended*). Cada población de 100 nematodos adultos fue considerada una muestra biológica independiente (n).

Con el objetivo de analizar entonces qué sucedía con los nematodos que portaban el constructo *Psur-5::luc::gfp::PEST*, de vida media más corta, se repitió exactamente el mismo experimento bajo el LO/FC (15.5/17°C) y luego OO/CC (17°C). Los nematodos mostraron también una oscilación clara tanto bajo condiciones cíclicas como constantes, pero aún cuando la acrofase fue nocturna, la luminiscencia mostró un ligero avance de fase (ZT14 ± 0,3 h y CT14 ± 0,4 h, n = 23). Además, los ritmos fueron más inestables durante *free-running* (Figura 2.9). Estos resultados mostraron que a pesar de que la vida media fuera más corta, los ritmos de luminiscencia también eran robustos.

Además, también se registraron bajo el mismo foto/termo-período los nematodos que integraron espontáneamente los constructos *Psur-5::luc::gfp* y pRF4, y los resultados fueron comparables a los de la cepa con el arreglo extracromosomal (n = 12, Figura 2.9). Este resultado fue muy importante, ya que para realizar experimentos de *PCR* en tiempo real se necesitaban grandes cantidades de nematodos y no era posible realizarlo con las cepas no integradas, donde alrededor del 20 % de los animales no mostraban fluorescencia.

Con estos resultados, se decidió continuar los ensayos de luminiscencia posteriores con la cepa con el arreglo extracromosomal para *Psur-5::luc::gfp*.

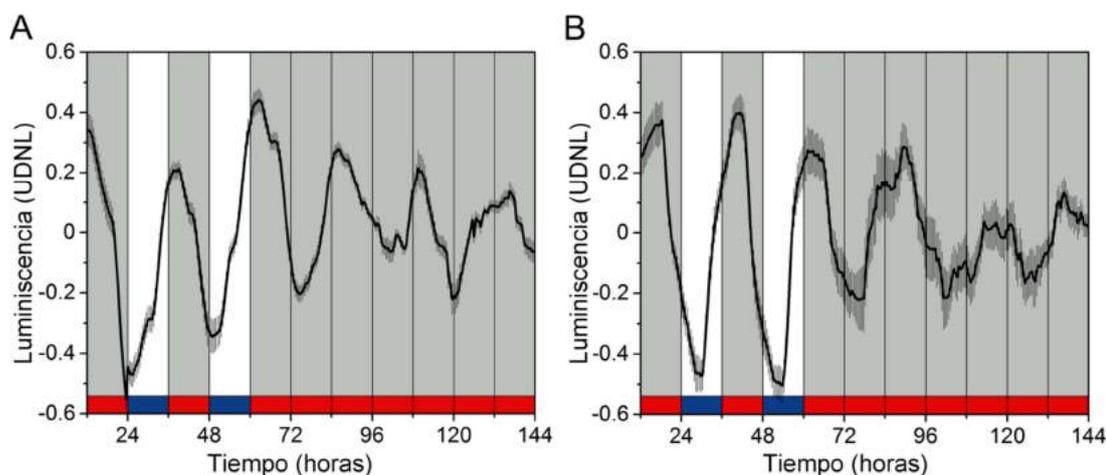


Figura 2.9| Luminiscencia emitida por poblaciones de 100 nematodos con el arreglo extracromosomal de *Psur-5::luc::gfp::PEST* o integrados para *Psur-5::luc::gfp*, bajo condiciones de entrenamiento y constantes. **A|** Luminiscencia promedio de los nematodos adultos con *Psur-5::luc::gfp::PEST*, bajo LO/FC y luego OO/CC (n = 23). **B|** Luminiscencia promedio de los nematodos adultos integrados espontáneamente con *Psur-5::luc::gfp*, bajo LO/FC y luego OO/CC (n = 12). La luminiscencia se muestra como promedio ± SEM. UDNL: Unidades normalizadas de luminiscencia sin la tendencia (*detrended*). Cada población de 100 nematodos adultos fue considerada una muestra biológica independiente (n).

Registros de luminiscencia de poblaciones de nematodos bajo condiciones constantes

La capacidad de los ritmos endógenos de oscilar bajo ausencia de toda señal ambiental es una propiedad fundamental de los ritmos circadianos. Para comprobar que efectivamente éste era el caso para los ritmos de luminiscencia, se repitieron los ensayos con poblaciones de 100 nematodos L4, en un luminómetro especialmente diseñado para registros de luminiscencia en experimentos circadianos, por lo que posee un control muy preciso de las condiciones constantes, tanto de oscuridad absoluta como de temperatura. Se llevó el mismo protocolo de entrenamiento y se realizaron diversos ensayos con poblaciones de nematodos a 20°C (mínima temperatura que aceptaba este tipo de luminómetros) y oscuridad constante. En estas condiciones, se encontraron oscilaciones circadianas robustas con un período promedio de $23,9 \pm 0,5$ h y una acrofase (pico de actividad) a CT $18,8 \pm 0,9$ h (con CT12 derivado de la fase de entrenamiento previa, ZT12). Estas oscilaciones se mantuvieron por al menos 4 días a 20°C, e incluso por varios ciclos más en algunas poblaciones, indicando que los nematodos individuales dentro de cada población se mantuvieron sincronizados entre sí por varios días (Figura 2.10).

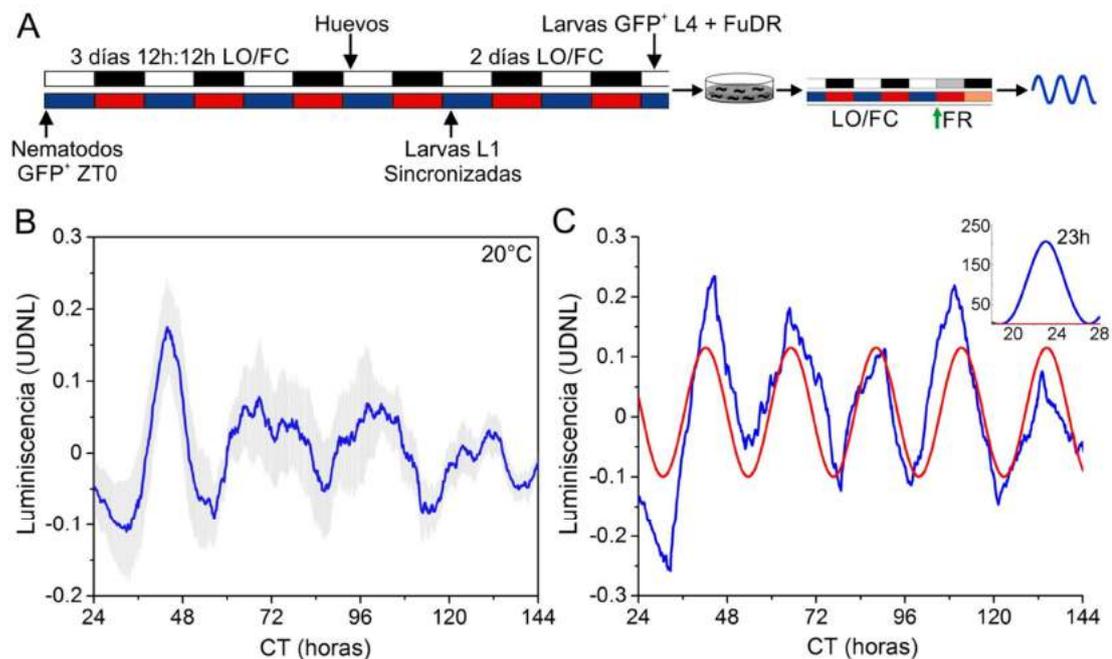


Figura 2.10| Luminiscencia emitida por poblaciones de 100 nematodos transgénicos con *Psur-5::luc::gfp* bajo condiciones constantes. A| Representación esquemática de las condiciones foto y termo-periódicas utilizadas y del experimento. Los nematodos fueron entrenados bajo el ciclo combinado 12 h:12 h LO/FC (400/0 lux, 18.5/20°C, ZT0, encendido de la luz y comienzo de la fase fría

de temperatura) sobre placas de NGM sembradas con *E. coli*. Al día 6, 100 nematodos transgénicos que expresaban *gfp* fueron seleccionados manualmente y transferidos al medio de luminiscencia y dejados por 72 h mas bajo el mismo ciclo para reforzar el entrenamiento después del cambio de medio. La luminiscencia fue medida bajo condiciones constantes (*free-running*, FR) por 6 días. La flecha verde indica el momento en que comenzó el registro de luz (ZT12). **B** | Registro de luminiscencia de poblaciones de 100 nematodos bajo oscuridad y 20°C. La señal mostrada corresponde al promedio \pm SEM (sombra gris, n = 12). **C** | Registro de luminiscencia de 1 población representativa de **B**. La línea roja muestra el mejor ajuste encontrado (Análisis de Cosinor; $R^2 = 0,61$). El gráfico mas pequeño dentro del principal muestra el periodograma LS ($P < 0,05$). UDNL: Unidades normalizadas de luminiscencia sin la tendencia (*detrended*). Cada población de 100 nematodos adultos fue considerada una muestra biológica independiente (n).

Compensación por temperatura y re-sincronización de los ritmos de luminiscencia

Para que el ritmo de luminiscencia de *sur-5* fuera considerado como verdaderamente circadiano, debía cumplir todavía con otras dos propiedades fundamentales: 1) compensación por temperatura, lo cual implica que el período bajo condiciones constantes debe mantenerse relativamente invulnerable a lo largo de un rango de temperatura que no afecte la fisiología de los nematodos, y 2) el ritmo debía ser capaz de ser re-sincronizado después de un cambio brusco en las condiciones ambientales.

Para testear la primera propiedad, se repitió exactamente el mismo experimento a dos ciclos de temperaturas mas altas, LO/FC (19.5/21°C) y LO/FC (23.5/25°C). Este último ciclo, como era de esperarse por los resultados mostrados durante el capítulo anterior, fue deletéreo para los nematodos ya que provocó la evaporación completa del medio al tercer día de registro y no fue posible estimar el período bajo condiciones constantes. Sin embargo, comparando el ciclo LO/FC (15.5/17°C) con el de LO/FC (19.5/21°C), fue posible encontrar una clara compensación por temperatura del ritmo entre 17°C y 21°C, con períodos de $25 \pm 0,4$ h y $24 \pm 0,3$ h, respectivamente, con un $Q_{10} = 1,1$ (Figura 2.11). Además, se detectó una pequeña diferencia de acrofase entre 17°C (ZT15,6 \pm 0,3 h) y 21°C (ZT16,9 \pm 0,5 h). Estos resultados también fueron consistentes con el período obtenido bajo 20°C durante el ensayo en placa de Petri (23,9 \pm 0,5 h).

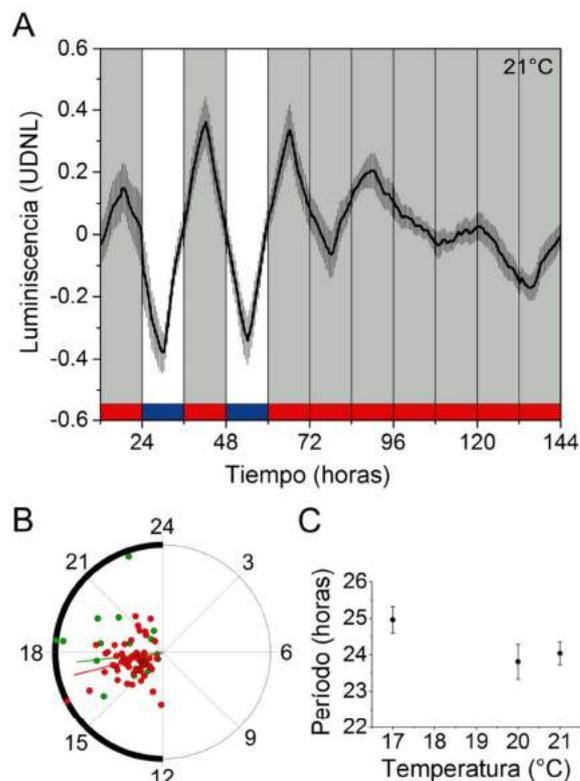


Figura 2.11 | Compensación por temperatura de los ritmos de luminiscencia. A | Luminiscencia promedio \pm SEM de los nematodos adultos bajo el ciclo LO/FC (19,5/21°C) y luego OO/CC (n = 21). **C |** Gráfico de *Rayleigh* que muestra las acrofases (máximo) de los registros de luminiscencia bajo LO/FC (n = 61, puntos rojos) y OO/CC (n = 21, puntos verdes). Las 40 poblaciones que no se muestran bajo FR fueron arrítmicas o mostraron *masking* (no mantuvieron la fase cuando fueron liberadas en FR). Test de Rayleigh, $P < 0,001$; *multi-sample test for equal median directions*, fase promedio de LO/FC vs fase promedio de OO/CC, no significativo. **B |** El período circadiano muestra una compensación por temperatura entre 17 a 21°C (ANOVA de una vía seguido de un test de Tukey de comparación entre grupos, no significativo). UDNL: Unidades normalizadas de luminiscencia sin la tendencia (*detrended*). Cada población fue considerada como una muestra biológica independiente (n).

Finalmente, para analizar si los ritmos podían re-sincronizados por los *Zeitgebers*, se realizó un experimento clásico de simulación de *jet lag*, donde los nematodos fueron entrenados al mismo ciclo LO/FC (15.5/17°C) por 4 días y luego se los sometió a un retraso de fase brusco mediante una extensión de la fase de oscuridad/temperatura alta de 6 h (el momento de encendido de la luz y el comienzo de la fase fría se corrieron desde las 9 am hasta las 3 pm). Notablemente, los nematodos fueron capaces de re-sincronizar rápidamente después del *jet lag* y mostraron un cambio de fase gradual durante el transcurso del segundo ciclo de sincronización. La respuesta correspondió a un verdadero re-entrenamiento del reloj y no a un enmascaramiento, ya que la fase del pico de luminiscencia se mantuvo bajo condiciones constantes para aquellas poblaciones que mostraron luz hasta el final del experimento (pico durante LO/FC1: $ZT16,3 \pm 0,3$ h; LO/FC2: $ZT23,8 \pm 0,2$ h; OO/CC: $CT22,6 \pm 0,6$ h; Figura 2.12).

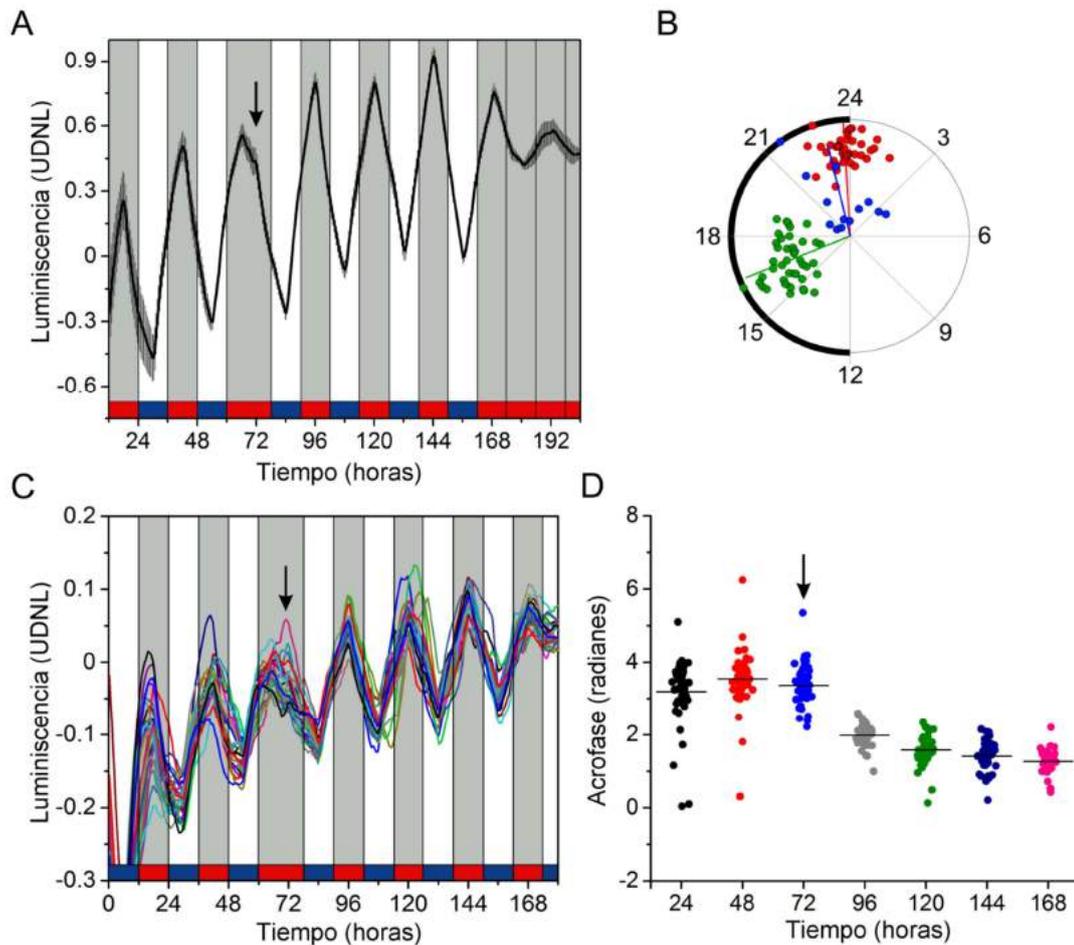


Figura 2.12 | Los ritmos de luminiscencia pueden ser re-sincronizados después de un cambio brusco en la fase de los *Zeitgebers*. **A |** Luminiscencia promedio \pm SEM de los nematodos adultos antes y después del cambio de fase de 6 h ($n = 13$). La flecha indica el momento donde se realizó el cambio en las condiciones ambientales. **B |** Gráfico de *Rayleigh* que muestra las acrofases (máximo) de los registros de luminiscencia bajo LO/FC1 ($n = 43$, puntos verdes), LO/FC2 ($n = 42$, puntos verdes), OO/CC ($n = 13$, puntos verdes). *Test* de Rayleigh, $P < 0,001$; ANOVA de una vía seguido de un *test* de Tukey de comparación entre grupos, acrofase promedio de LO/FC1 vs LO/FC2, $P < 0,001$; acrofase promedio de LO/FC2 vs OO/CC, no significativo. La luminiscencia se muestra como promedio \pm SEM. UDNL: Unidades normalizadas de luminiscencia sin la tendencia (*detrended*). Cada población de 100 nematodos adultos fue considerada como una muestra biológica independiente (n). **C |** Registros individuales de luminiscencia de cada una de las 43 poblaciones mostradas como un promedio en **A**. **D |** Acrofases a lo largo de los días de entrenamiento para mostrar el ajuste gradual de la fase durante los días posteriores al cambio de fase. UDNL: Unidades normalizadas de luminiscencia sin la tendencia (*detrended*). Cada población de 100 nematodos adultos fue considerada una muestra biológica independiente (n).

Hasta ahora, se demostró que los ritmos de luminiscencia de *sur-5* cumplen con las siguientes propiedades fundamentales de los ritmos circadianos: 1) muestran una oscilación robusta bajo condiciones constantes, con un período cercano a 24 h, 2) el período está bien

compensado por la temperatura en un rango entre 17°C y 21°C y finalmente, 3) responden a cambios en las condiciones foto y termo periódicas, siendo capaces de re-sincronizar frente a cambios de fases.

En mamíferos, la luz constante induce arritmicidad a nivel comportamental y fisiológico, por ejemplo por una desincronización de las neuronas del reloj central en los núcleos supraquiasmáticos (NSQ). Para analizar si los ritmos de luminiscencia de *sur-5* también respondían de esta manera, se sincronizaron poblaciones de nematodos bajo un ciclo LO/FC de 24 h seguido de varios días a luz y temperatura baja constantes (LL/FF). Se encontró que bajo LL/FF la ritmicidad cayó de manera significativa en comparación con OO/CC, de 50 % a 18 % (n = 101 bajo el ciclo clásico y n = 72 bajo LL/FF; Figura 2.13), mostrando que de alguna manera este mecanismo también está conservado en los nematodos.

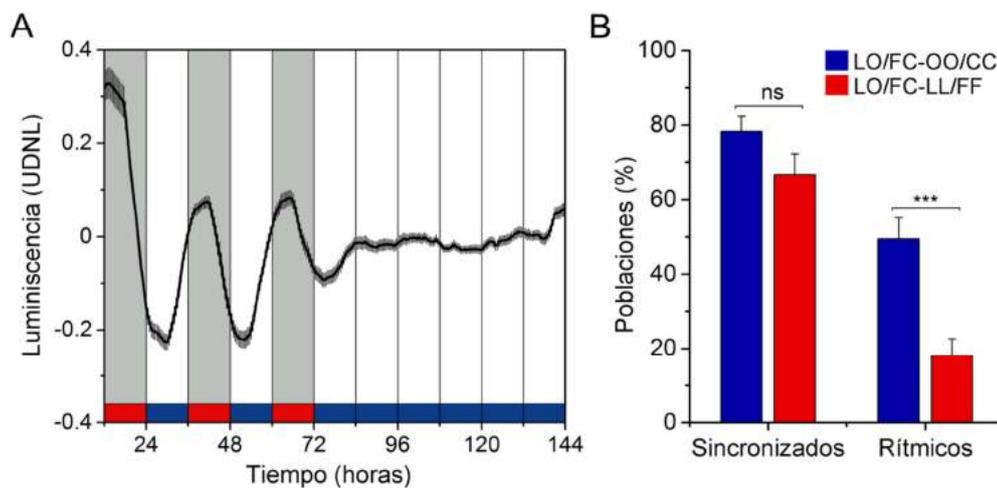


Figura 2.13| La luz y la temperatura baja constantes afectan severamente los ritmos de luminiscencia. **A|** Luminiscencia promedio \pm SEM de los nematodos adultos entrenado bajo LO/FC (15,5/17°C) y luego LL/FF (15,5°C, n = 36). **B|** Porcentaje de poblaciones sincronizadas (es decir, con el período y fase ajustadas por el *Zeitgeber* LO/FC) y rítmicas (circadianas bajo condiciones constantes) La luz y la temperatura baja constantes aumentaron la proporción de poblaciones arrítmicas (LO/FC-OO/CC n = 101; LO/FC-LL/FF n = 72; ***P < 0,001, *test* exacto de Fisher de dos colas. UDNL: Unidades normalizadas de luminiscencia sin la tendencia (*detrended*). Cada población de 100 nematodos adultos fue considerada una muestra biológica independiente (n).

Entrenamiento de los ritmos de luminiscencia a distintos ciclos T y a un ciclo esqueleto

Como se mencionó en la introducción, otra característica del reloj circadiano es su capacidad de ser entrenado a ciclos ambientales de distinta duración, algo que se conoce como entrenamiento a ciclos T y también, en algunos casos, a ciclos no continuos, denominados ciclos esqueleto. Para analizar si los ritmos de luminiscencia también reflejaban estas características circadianas, se realizaron tres experimentos distintos.

Con respecto al entrenamiento a ciclos de distintos períodos, se sincronizaron poblaciones transgénicas de nematodos bajo ciclos de luz/temperatura cortos (22 h) y largos (26): 4 días bajo LO/FC (15.5/17°C) 12 h: 12 h T = 24 seguido de 4 días en LO/FC (15.5/17°C) 11 h: 11 h T = 22 y, 4 días bajo LO/FC (15.5/17°C) 12 h: 12 h T = 24 seguido de 4 días en LO/FC (15.5/17°C) 13 h:13 h T = 26.

Durante el experimento bajo el ciclo T corto (LO/FC, 22 h, n = 60), un grupo de nematodos se sincronizó al período de los *Zeigebers* con un período de $22,5 \pm 0,1$ h (PC, período corto, n = 14, barra azul de la Figura 2.14A), mientras que el segundo mostró un período de $24,7 \pm 0,1$ h (PN, período normal, n = 29, barra azul de la Figura 2.14A), muy cercano del período de *free-running*. Las poblaciones PC fueron capaces de sincronizar al nuevo ciclo corto y mostraron un retraso de fase comparado con el ciclo T24 regular (LD/CW 24 h ZT $14,5 \pm 0,4$ h vs LD/CW 22 h ZT $16,7 \pm 0,3$ h, Figura 2.14B y C). Esta respuesta es consistente con un entrenamiento verdadero, de acuerdo a experimentos clásicos realizados en otros organismos (Aschoff 1965; Pittendrigh 1981b), ya que en ciclos T más cortos que 24 h, se espera que los *outputs* circadianos exhiban una fase más tardía, mientras que los ritmos enmascarados o dirigidos por el ciclo ambiental deberían mostrar una relación de fase similar relativa a la transición del *Zeitgeber*. Esto es exactamente lo que ocurre con el grupo NP, donde no se encontraron diferencias significativas entre las acrofases bajo T24 y T22 (LD/CW 24 h ZT $15 \pm 0,4$ h vs LD/CW 22 h ZT $16,3 \pm 0,5$ h, Figura 2.14D y E).

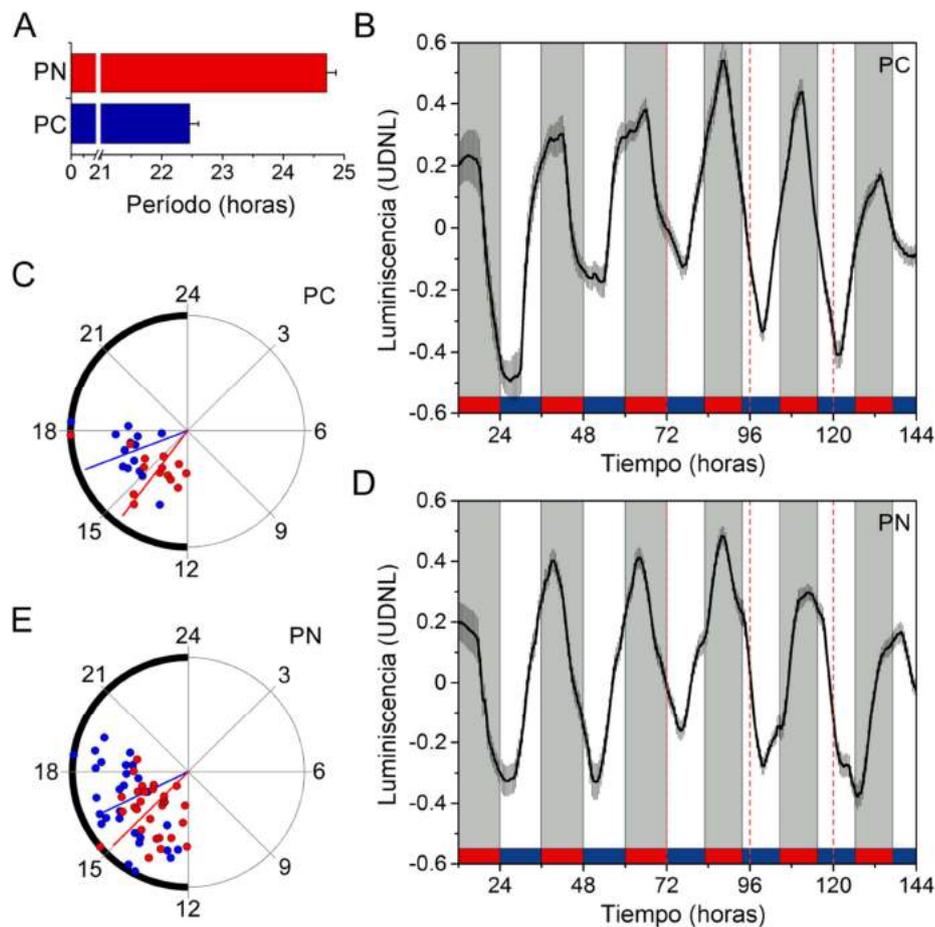


Figura 2.14 | Los ritmos de luminiscencia pueden ser entrenados a ciclos T de 22 h. **A** | Períodos promedio de las poblaciones de nematodos bajo el ciclo de 22 h (LO/FC, 11 h: 11h). La actividad del reportero en las poblaciones analizadas (n = 60) mostró un período corto (PC, barra azul, n = 14) o un período normal (PN, barra roja, n = 29). Las restantes 17 poblaciones fueron arrítmicas. **B-C** | Luminiscencia promedio y gráfico de Rayleigh que muestra las acrofases de las señales de lo nematodos de PC bajo T24 (puntos rojos) y T22 (puntos azules) (*test de Rayleigh* $P < 0,001$; LO/FC 24 h ZT14,5 \pm 0,4 h vs LD/CW 22 h ZT16,7 \pm 0,3 h, $P < 0,001$, *multi-sample test for equal median directions*). **D-E** | Luminiscencia promedio y gráfico de Rayleigh que muestra las acrofases de las señales de lo nematodos de PC bajo T24 (puntos rojos) y T26 (puntos azules) (*test de Rayleigh* $P < 0,001$; LO/FC 24 h ZT15 \pm 0,4 h vs LD/CW 22 h ZT16,3 \pm 0,5 h, no significativo, *multi-sample test for equal median directions*). La luminiscencia se muestra como promedio \pm SEM. UDNL: Unidades normalizadas de luminiscencia sin la tendencia (*detrended*). Cada población de 100 nematodos adultos fue considerada como una muestra biológica independiente (n). Las líneas rojas en los gráficos indican puntos de referencia de T24 en los ciclos T22.

Durante el experimento bajo el ciclo T largo (LO/FC, 26 h, n = 60), de manera similar, se encontraron dos grandes grupos de poblaciones. En el primero, los nematodos se sincronizaron a los *Zeigebers* con un período de 26,6 \pm 0,1 h (PL, período largo, n = 37, barra azul de la Figura 2.15A) y exhibieron un avance de fase entre T26 y T24 (LO/FC 24 h ZT16,3 \pm

0,4 h vs LO/FC 26 h ZT15,5 ± 0,4 h, Figura 2.15B y C), lo cual de nuevo es consistente con lo esperado por bibliografía para una verdadera respuesta circadiana (Aschoff 1965). El segundo grupo, fue incapaz de entrenar al ciclo de 26 h y mostró un período cercano a las condiciones de *free-running* de 24,6 ± 0,2 h (PN, período normal, n = 10, barra azul de la Figura 2.15A). En este caso, no se encontraron diferencias significativas entre las acrofases bajo T24 y T26 (LD/CW 24 h ZT16,3 ± 0,3 h vs LD/CW 22 h ZT16,5 ± 0,3 h, Figura 2.15D y E). Remarcablemente, el entrenamiento bajo el ciclo T de 26 h fue mas consistente y efectivo que bajo el ciclo de 22 h (alrededor del 62 % de las poblaciones siguieron el T26, en comparación con solo el 24 % que lograron entrenar con el T22). Esto es consistente con nuestros datos previos, ya que el período del ritmo bajo condiciones constantes a 17°C fue de 25 ± 0,4 h, el cual es mas cercano a 26 h que a 22 h.

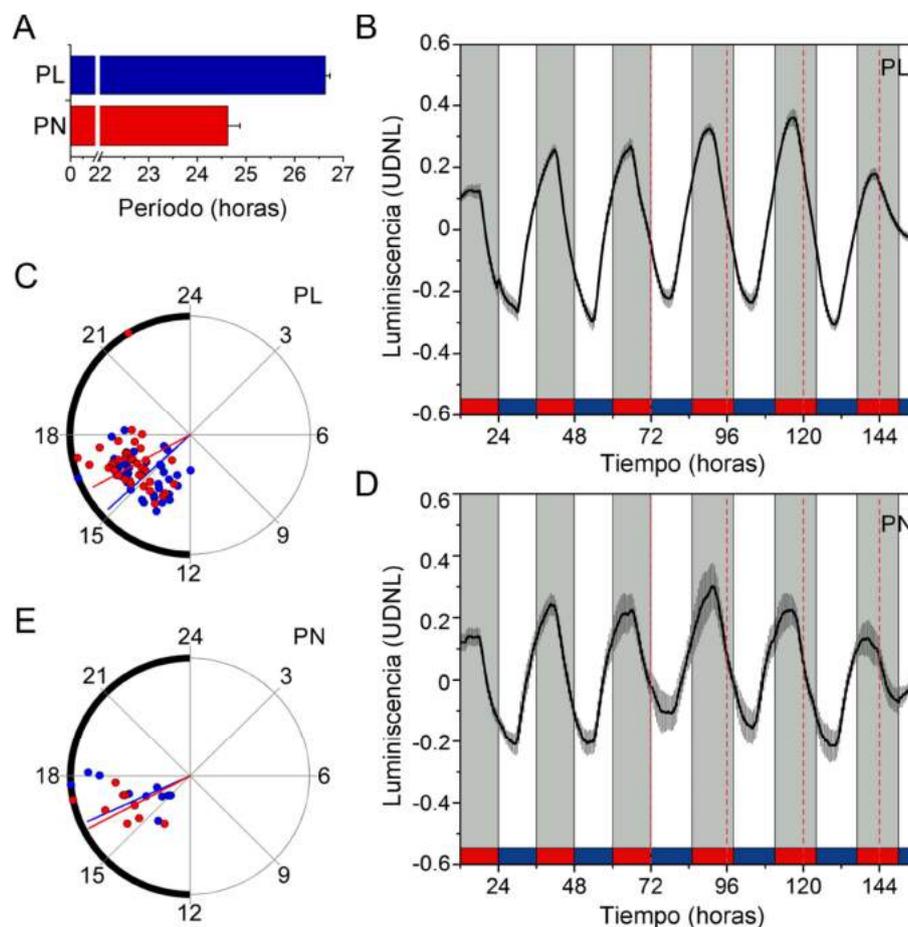


Figura 2.15] Los ritmos de luminiscencia pueden ser entrenados a ciclos T de 26 h. A] Períodos promedio de las poblaciones de nematodos bajo el ciclo de 26 h (LO/FC, 13 h: 13h). La actividad del reportero en las poblaciones analizadas (n = 60) mostró un período corto (PL, barra azul, n = 37) o un

período normal (PN, barra roja, $n = 10$). Las restantes 13 poblaciones fueron arrítmicas. **B-C** Luminiscencia promedio y gráfico de *Rayleigh* que muestra las acrofases de las señales de lo nematodos de PL bajo T24 (puntos rojos) y T22 (puntos azules) (*test de Rayleigh* $P < 0,001$; LO/FC 24 h $ZT16,3 \pm 0,4$ h vs LD/CW 22 h $ZT15,5 \pm 0,4$ h, $P = 0,01$, *multi-sample test for equal median directions*). **D-E** Luminiscencia promedio y gráfico de *Rayleigh* que muestra las acrofases de las señales de lo nematodos de PN bajo T24 (puntos rojos) y T26 (puntos azules) (*test de Rayleigh* $P < 0,001$; LO/FC 24 h $ZT16,3 \pm 0,3$ h vs LD/CW 22 h $ZT16,5 \pm 0,3$ h, no significativo, *multi-sample test for equal median directions*). La luminiscencia se muestra como promedio \pm SEM. UDNL: Unidades normalizadas de luminiscencia sin la tendencia (*detrended*). Cada población de 100 nematodos adultos fue considerada como una muestra biológica independiente (n). Las líneas rojas en los gráficos indican puntos de referencia de T24 en los ciclos T26.

Finalmente, se completó la caracterización circadiana del ritmo de *sur-5* mediante un análisis del mismo bajo un ciclo esqueleto de luz y temperatura, que consistió de 2 pulsos (2 h de luz y temperatura baja, $15,5^{\circ}\text{C}$), al inicio y la final del día circadiano (ZT0-2 y ZT10-12). Como se observa en la figura 2.16, alrededor del 50 % ($n = 48$) de las poblaciones fueron claramente capaces de sincronizar al nuevo ciclo esqueleto, con un período promedio de $23,9 \pm 0,3$ h (Figura 2.16D). La mayoría de las poblaciones también exhibieron algo de enmascaramiento en respuesta a los pulsos cortos, lo cual se puede evidenciar por los picos relativos que se observan en la señal justo después del momento de los pulsos. Alrededor del 30 % de estas poblaciones mostraron un entrenamiento verdadero al ciclo esqueleto y mantuvieron su fase luego de ser liberadas en condiciones constantes ($n = 15$) (Figura 2.16A y C). Además, se encontró una oscilación circadiana clara y robusta con un período promedio de $25,1 \pm 0,5$ h (periodograma LS) en aproximadamente 40% de las poblaciones (Figura 2.16D).

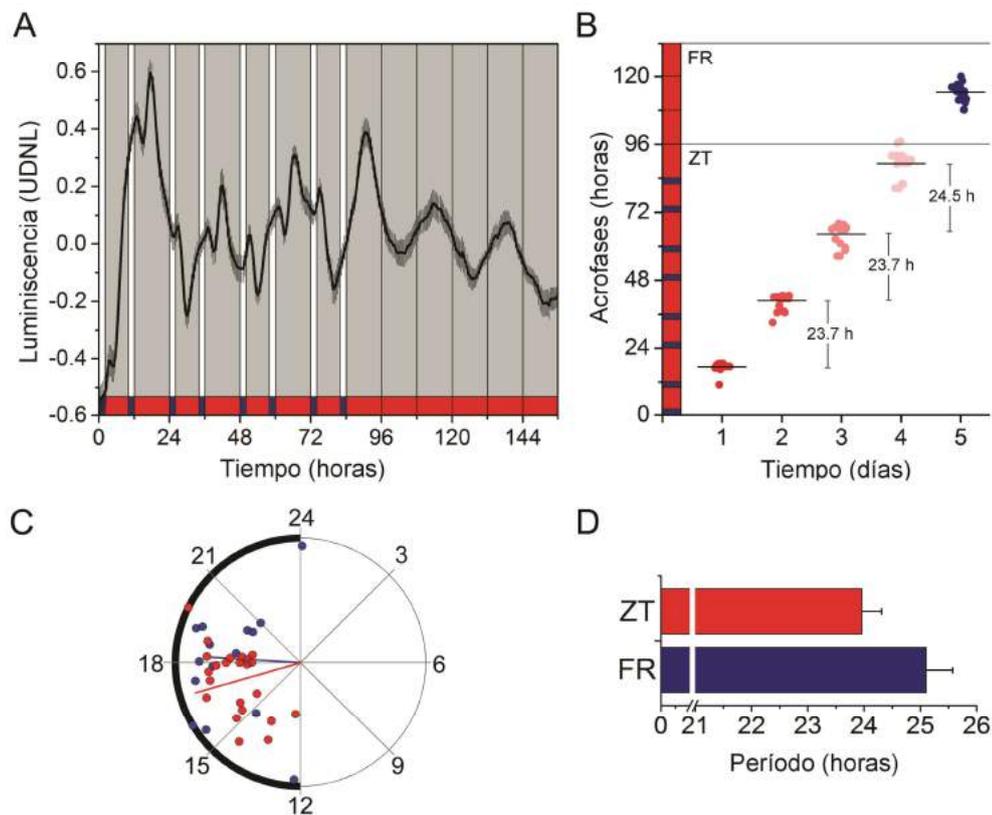


Figura 2.16] Los ritmos de luminiscencia pueden ser entrenados a ciclos esqueleto de luz y temperatura. Poblaciones de nematodos ($n = 48$) fueron entrenadas a un ciclo esqueleto clásico por 4 días (ZT, 2 h de pulso de luz y $15,5^{\circ}\text{C}$, a ZT0-2 y ZT10-12, esquematizados por las barras blancas y azules) seguido de 3 días bajo free running (FR, oscuridad y 17°C). **A]** Luminiscencia promedio \pm SEM de las poblaciones de nematodos entrenadas bajo este ciclo ($n = 15$). **B]** Gráfico de puntos que muestra las acrofases (máximos de luminiscencia) por día durante el ciclo esqueleto (ZT) y durante el primer día de *free-running* (FR, $n = 15$). El período de cada ciclo bajo ZT fue calculado como la media de las distancias entre las acrofases de cada población con una ventaja de 24 h, mientras que bajo CT se estimó por el método clásico de ajuste a un coseno por cosinor. **C]** Gráfico de *Rayleigh* que muestra las acrofases de las señales de los nematodos bajo ZT (puntos rojos) y FR (puntos azules) (*test de Rayleigh* $P < 0,001$; ZT $16,9 \pm 0,5$ h vs LD/CW 22 h ZT $18,24 \pm 0,7$ h, no significativo, *multi-sample test for equal median directions*). **D]** Períodos promedio de las oscilaciones luminiscentes bajo condiciones de ZT (barra roja, $n = 24$, período LS $23,9 \pm 0,3$ h) o de FR (barra azul, $n = 19$, período LS $25,1 \pm 0,5$ h). Solo 15 de las 19 poblaciones rítmicas bajo FR mostraron estar entrenadas y las poblaciones restantes fueron arrítmicas ($n = 29$). UDNL: Unidades normalizadas de luminiscencia sin la tendencia (*detrended*). Cada población de 100 nematodos adultos fue considerada como una muestra biológica independiente (n).

Discusión

En este capítulo se demostró que el método basado en el reportero luminiscente resultó muy sensible y no invasivo, y reveló ritmos robustos de luminiscencia a nivel poblacional *in vivo*, permitiendo demostrar muchas de las propiedades fundamentales de la ritmicidad circadiana en este poderoso organismo modelo.

Mediante el registro de luminiscencia de las poblaciones transgénicas, fue posible analizar y demostrar las tres propiedades fundamentales de los ritmos circadianos presentes en los ritmos de luminiscencia: oscilación con un período cercano a 24 h bajo condiciones constantes, entrenamiento del ritmo a un ciclo dual de luz y temperatura y capacidad de re-sincronización del reloj después de un cambio de fase en los *Zeitgebers*.

El ciclo dual de luz y temperatura, en una combinación particular de los estímulos ambientales, fue vital para poder obtener ritmos robustos, donde el pico de luminiscencia se encontró cerca de las 4 am y bajo la fase caliente de temperatura (ZT16), y el ritmo se mantuvo bajo condiciones constantes. Una característica muy peculiar de estos ritmos fue que la amplitud de la oscilación bajó notablemente al pasar de condiciones cíclicas a las condiciones constantes de entrenamiento. Sin embargo, esta respuesta no es producto de la caída de la señal a lo largo del tiempo en las poblaciones, ya que cuando las mismas son mantenidas durante varios días bajo ciclo LO/FC no se observó dicho cambio drástico en la amplitud. En este sentido, si la actividad del reportero reflejara la transcripción de *sur-5*, es posible que la luz o la temperatura provoquen una inducción en la expresión del gen durante condiciones variables. Por otro lado, parte de la caída drástica en la amplitud de estos ritmos durante *free-running* también se puede explicar por un efecto probable de desincronización de los ritmos de cada uno de los individuos dentro de la población, lo cual genera que al promediar las distintas fases, la oscilación resultante sea menos robusta. Este efecto fue muy visible en el experimento bajo condiciones constantes de oscuridad y 20°C, donde a medida que pasaron los días las oscilaciones mostraron una acrofase menos definida. Sin embargo, el hecho de que los registros pudieron ser seguidos por al menos 4 días en condiciones constantes, sugiere que los nematodos individuales estaban aún sincronizados entre sí, dentro de cada población. Es de destacar que la sensibilidad de la técnica utilizada fue esencial, ya que permitió el registro de datos durante varios días y por ende un análisis fiel y preciso de los parámetros matemáticos de las oscilaciones.

Por otro lado, se encontró una marcada dependencia de la acrofase en los ritmos de luminiscencia de *sur-5* con la temperatura del ciclo LO/FC (15,5/17°C ZT15,6 ± 0,3 h y 19,5/21°C ZT16,9 ± 0,5 h), reflejando algunos aspectos adaptativos del ritmo en relación al ambiente natural de los nematodos. Es interesante que una fuerte dependencia de la fase con la temperatura fue también descrita en la tolerancia circadiana a estrés abiótico en *C. elegans* (Kippert, et al. 2002), donde la fase del ritmo en un ciclo de luz-oscuridad se retrasaba a medida que la temperatura aumentaba. En este caso, los autores propusieron que esta respuesta podía ser una consecuencia del estrés *per se*, ya que temperaturas mas altas pueden causar un estrés hiper-osmótico mas temprano durante el día (Kippert, et al. 2002). En este sentido, una caracterización funcional del ritmo de luminiscencia será necesaria para elucidar qué mecanismos están detrás de la ritmicidad observada en la luminiscencia y desde allí que implicancias puede tener la dependencia de este ritmo con la temperatura. Interesantemente, estudios sobre el comportamiento de termotaxis muestran que *C. elegans* exhibe esta respuesta muy específica y asociada en realidad a la condiciones de disponibilidad de bacterias durante el crecimiento. Se ha demostrado que animales que fueron bien alimentados durante el crecimiento muestran atracción por la temperatura de crecimiento cuando son dejados en una condición de gradiente térmico sin bacterias. Sin embargo, si son crecidos en un ambiente pobre en bacterias y en hambruna, esto puede inducir el comportamiento opuesto, una respuesta aversiva a la temperatura de crecimiento. Estos resultados sugieren que el cambio en el estado de alimentación rápidamente estimula un *switch* entre la atracción y la aversión para la temperatura memorizada y que la adquisición de una nueva temperatura de memoria se establece mas lentamente cuando son sometidos a condiciones variables de crecimiento y alimentación (Mohri, et al. 2005). Dado que en nuestro esquema de crecimiento, los animales primero son entrenados y crecidos durante varios días en placa con bacterias hasta que alcanzan el estadio L4, y luego son transferidos a un medio axénico, sin bacterias, sería interesante estudiar si esta fase del ritmo de luminiscencia cambia si las condiciones de crecimiento son distintas o incluso poder analizar estos ritmos en un medio con bacterias, algo que se está tratando de poner a punto en el laboratorio para la realización de experimentos de ARN interferencia.

A través del reportero luminiscente fue posible el estudio de muchas otras características que subyacen a los mecanismos circadianos del reloj de *C. elegans*, que no habían sido antes estudiadas en profundidad antes. Entre ellas se puede mencionar a la

arritmicidad encontrada bajo condiciones de luz y temperatura baja constantes, la capacidad de entrenar estos ritmos a distintos ciclos T y la curiosa habilidad de los nematodos para sincronizarse a señales ambientales no continuas, como en el ciclo esqueleto de los *Zeitgebers*.

En el caso del entrenamiento a distintos ciclos T, se encontraron dos grupos de poblaciones bien definidos, uno que fue capaz de entrenar al nuevo ciclo y otro grupo de poblaciones donde los animales mostraron un período similar al de *free-running*, cercano a 24 h, y muy distinto del período del ciclo de entrenamiento impuesto. Además, bajo el ciclo de 22 h, los nematodos mostraron un retraso de fase, mientras que bajo T26 se evidenció un adelanto de fase, comparando las acrofases con el ciclo regular de 24 h anterior. Estos resultados son exactamente los esperados de acuerdo a lo reportado en bibliografía (Aschoff 1965) y sugieren que 22 y 26 h están muy cerca de los límites de entrenamiento para *C. elegans*, características que antes eran desconocidas sobre la biología circadiana de este animal. En este sentido, un estudio previo analizó ritmos de olfacción a 1-octanol en *C. elegans* bajo ciclos de temperatura de 3°C de variación en ciclos de T24 y T23. Mientras que en el ciclo de T24 los ritmos eran relativamente fáciles de observar, bajo T23 la respuesta era muy ruidosa y muy poco robusta (Olmedo, et al. 2012).

Finalmente, es de destacar la capacidad de los nematodos de entrenar al ciclo esqueleto discontinuo, donde solo recibieron pulsos de luz y frío que delimitaban al rango original de 12 horas bajo estas condiciones. Esta propiedad del reloj de *C. elegans* nunca fue estudiada con anterioridad y sugiere que probablemente sea una condición natural a la cual estén sometidos los nematodos en su nicho ecológico. Es posible pensar que los nematodos puedan llegar a desplazarse desde abajo del suelo hasta la superficie en busca de alimento a lo largo del día y que al estar dentro de las frutas y de las raíces de las plantas probablemente no reciban luz y temperatura constante durante muchas horas. En este sentido, recientemente se han realizado estudios poblacionales que muestran que *C. elegans* es una especie altamente dinámica y que posee un estilo de vida muy marcado por el ambiente fluctuante del suelo, donde la disponibilidad de comida varía azarosamente en tiempo y espacio (Felix y Duveau 2012; Frezal y Felix 2015). Se ha descrito que estos nematodos se desplazan desde el suelo hacia la superficie, donde son transportados por distintos insectos y pequeños animales en estadios larvales *dauers*, altamente resistentes, salen en búsqueda de condiciones óptimas de desarrollo. Estos *dauers* actúan como

colonizadores de pequeñas poblaciones que son aisladas en raíces de plantas y frutas en descomposición a lo largos del día, de manera que también deben estar en contacto con radiación solar. Cuando el alimento se acaba, nuevos *dauers* sobrevivientes de estas condiciones adversas salen al suelo a explorar de nuevo los alrededores y comenzar nuevos ciclos. Durante estos movimientos migratorios y el establecimiento de nuevas poblaciones activas, es posible que los nematodos estén en contacto con ciertas claves ambientales en determinados momentos del día, que sean sensadas y utilizadas por el reloj como estímulos sincronizadores.

Más allá de haber demostrado las principales características del sistema circadiano de *C. elegans*, aún resta por determinar la base de los mecanismos de sincronización por diferentes pautas ambientales.

Capítulo III:

Vías fóticas y térmicas involucradas en la sincronización del reloj

“There is certainly a universal and unconscious propensity to impose a rhythm even when one hears a series of identical sounds at constant intervals. John Iverson, a neuroscientist and an avid drummer, has pointed this out. We tend to hear the sound of a digital clock, for example, as "tick-tock, tick-tock" - even though it is actually "tick tick, tick tick”.

— Oliver Sacks. *Musicophilia: Tales of Music and the Brain*, 2007

Introducción

Circuitos neuronales involucrados en el sentido de temperatura

En 1975, Hedgecock y Russell descubrieron por primera vez un comportamiento notable en *C. elegans*, en el cual los animales recordaban la temperatura ambiente a la que habían sido previamente cultivados y migraban y se movían isotérmicamente alrededor de tal temperatura cuando eran dejados en una placa con un gradiente térmico (Hedgecock y Russell 1975). Dado que este comportamiento, llamado *thermotaxis*, es dependiente de la experiencia, es una gran herramienta para estudiar percepción sensorial, regulaciones a nivel de comportamiento, plasticidad neuronal y memoria, entre otras funciones.

El circuito neuronal que controla el sentido y la respuesta a la temperatura fue descubierto posteriormente gracias a una serie de experimentos con ablación láser (Mori y Ohshima 1995). En el nematodo, la temperatura es sensada principalmente por la neurona AFD, la cual se ha demostrado que responde a estímulos térmicos mediante registros de imágenes de calcio utilizando el sensor camaleón amarillo (Kimura, et al. 2004). Una neurona X, aún desconocida, transmite esta información río abajo a dos interneuronas, la AIY y la AIZ, las cuales controlan dos respuestas de *thermotaxis* opuestas, la migración hacia temperaturas más altas (movimiento termofílico) y la migración hacia temperaturas más bajas (movimiento criofílico), respectivamente. Luego, estas dos respuestas son integradas en la interneurona RIA.

Diversos estudios genéticos y fisiológicos mostraron que la neurona olfatoria AWC también está involucrada en el sentido de temperatura (Biron, et al. 2008). El primer indicio de esta respuesta fue hallado a través del mutante de EAT-16, que presenta una *thermotaxis* defectiva hacia temperaturas bajas. Se trata de un gen homólogo de las proteínas reguladoras de mamíferos de la señalización por proteína G (RGS), y la mutación solo puede ser rescatada expresando el ADN codificante para el gen en la neurona AWC (Bargmann, et al. 1993). Posteriormente se encontró también que la concentración de calcio en ambas neuronas, AWC y AFD, se incrementa frente a aumentos de temperatura (Biron, et al. 2008). Sin embargo, la neurona AWC responde a cambios de temperatura pero de manera mucho más estocástica que la AFD, y estas respuestas solo son exacerbadas y más uniformes cuando el rango de temperatura es más amplio (Bargmann, et al. 1993). Por lo tanto, se cree

que las propiedades de termorrecepción de las neuronas AFD y AWC son diferentes, pero aún no se ha logrado discriminar el proceso en detalle (Kimata, et al. 2012).

Recientemente, las neuronas ASI, previamente descritas como neuronas sensibles a feromonas, también fueron involucradas en la termorrecepción bajo condiciones inusuales de ensayo que incluyen una pendiente aguda de temperatura de 1°C/cm (Beverly, et al. 2011) (Figura 3.1).

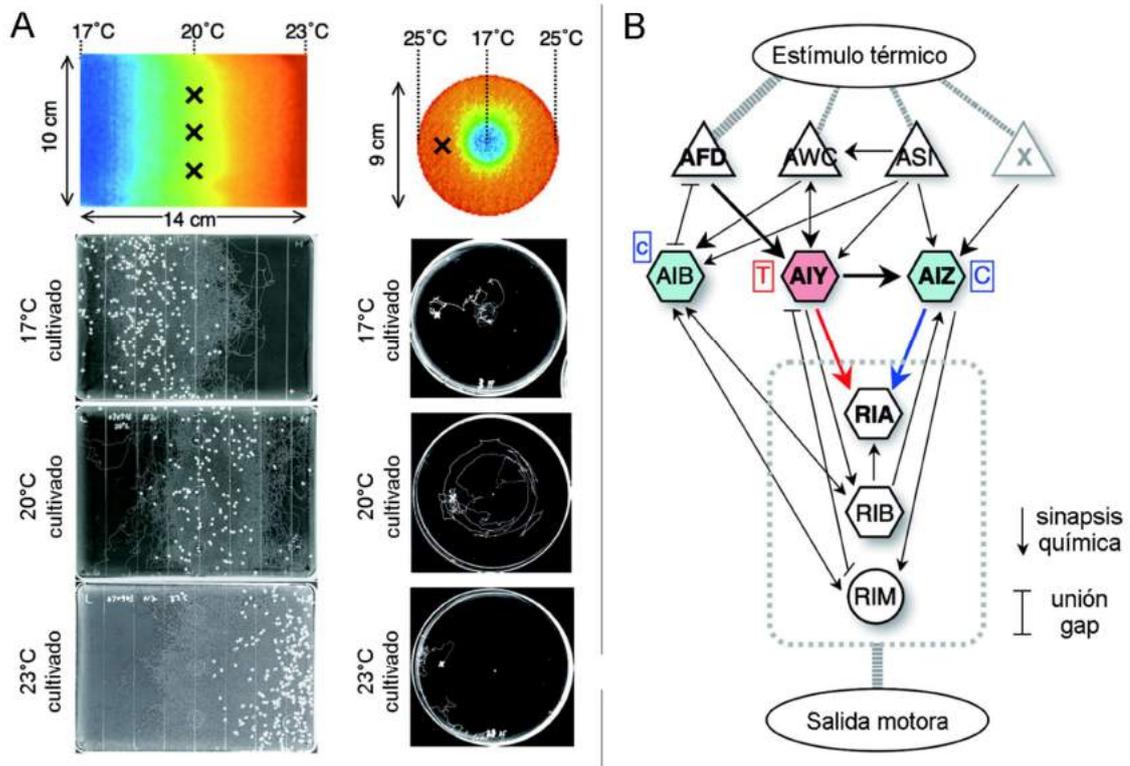


Figura 3.1| Comportamiento de termotaxis en *C. elegans* y circuito neuronal involucrado. A| *C. elegans* cultivado con comida a una temperatura particular y luego liberado en un gradiente térmico migra hacia la temperatura de crecimiento tanto en gradientes lineales (izquierda) como circulares (derecha). El punto de inicio del nematodo está indicado con la X. Los puntos blancos en las figuras del gradiente térmico lineal indican los puntos terminales del movimiento de nematodos individuales 1 h después del experimento. Se muestran además, recorridos típicos de los animales con líneas blancas en el gradiente térmico circular. B| Modelo actual del circuito neuronal involucrado en la termotaxis. Los estímulos térmicos son sentidos por las neuronas AFD, AWC, ASI y por una neurona aún no identificada X, la información es transmitida río abajo a las interneuronas AIY y AIZ y luego es integrada en la interneurona RIA. Las interneuronas AIY y AIZ media la migración del animal hacia temperaturas mas altas (termofílico, T) y a temperaturas mas bajas (criofílico, C y c), respectivamente. Imagen adaptada de Kimata, et al. 2012.

En este mismo trabajo, los animales cultivados a 15°C o 20°C son colocados en una placa con temperaturas de 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10°C más altas que la temperatura de crecimiento. Bajo estas condiciones, los animales *wild type* muestran un comportamiento criofílico robusto, mientras que animales mutantes de *tax-4*, un canal activado por nucleótidos cíclicos (GMPc) se mueven al azar. Los defectos en este mutante son rescatados expresando el ADN codificante de *tax-4* en diferentes combinaciones de neuronas AFD, AWC y ASI (Beverly, et al. 2011). Estos autores sugieren además que la degeneración en estas tres neuronas contribuye a la generación de un comportamiento robusto de movimiento en frío. Por otro lado, registros de imágenes de calcio muestran que la neurona ASI podría responder a cambios de temperatura y que el rango al cual responden cambia en ausencia de la AFD. Estos resultados podrían implicar la regulación de la temorrecepción de la ASI a través de una señal neuroendocrina desde la AFD (Beverly, et al. 2011).

Una cuestión muy interesante acerca de estas neuronas es que poseen memoria de temperatura. Estudios fisiológicos recientes muestran por ejemplo que la concentración de calcio en las neuronas AFD se incrementa transientemente en respuesta al calentamiento, solo por encima del umbral que fue establecido por la temperatura previa de cultivo. De esta manera, la neurona AFD de animales cultivados a 20°C responde solo al incremento de temperatura por encima de 19°C y en los animales crecidos a 15°C o 25°C, el umbral de respuesta de la AFD también está cerca de estas temperaturas (Kimura, et al. 2004). Cuando estímulos de diferentes temperaturas son utilizados, la AFD responde a ambos, calentamiento y enfriamiento, abriendo y cerrando canales iónicos, y es capaz de discriminar cambios de temperatura tan pequeños como 0,05°C (Clark, et al. 2006). Por la habilidad de la AFD para almacenar una memoria de temperatura, esta neurona es muy utilizada como modelo para comprender los mecanismos de memoria de células individuales y en la modulación de la fuerza sináptica para el establecimiento de estas memorias. En cuanto a la sensibilidad de la AWC, los registros de calcio muestran que también responde a cambios de temperatura y que la respuesta solo se dispara por encima de cierto umbral relacional también con las condiciones previas de cultivo, como en la AFD (Kuhara, et al. 2008) (Figura 3.2)

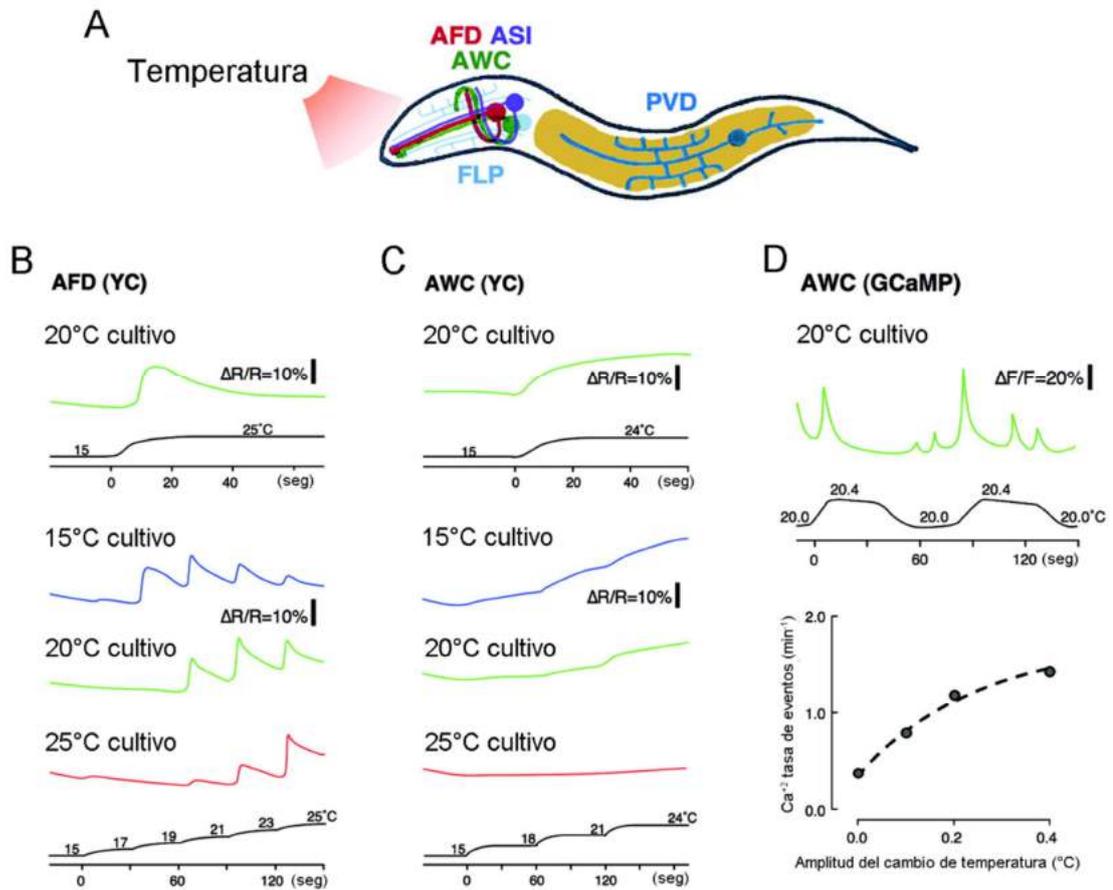


Figura 3.3 | Respuesta neuronal a un estímulo térmico. **A** | Sistema de termosensado de *C. elegans*. Neuronas y tejidos termosensibles, AFD, AWC y ASI en la cabeza y neuronas multidendríticas PVD y FLP que responden a la temperatura. Un mecanismo transcripcional mediado por HSF-1 en células no neuronales responde a la temperatura de cultivo y modifica la termotaxis. **B-D** | Respuestas fisiológicas en las neuronas termosensibles AFD (**B**) y AWC (**C**, **D**). Incrementos y disminuciones relativas de la concentración de Ca²⁺ intracelular medidas con el sensor camaleón amarillo (YC, $\Delta R/R$, B y C) y GCaMP (**D**). Las líneas de colores representan la tasa de cambio de YC y los cambios de fluorescencia de GCaMP. Los cambios de temperatura están indicados con la línea sólida negra. La tasa de eventos de Ca²⁺ son bajos cuando se aplican estímulos de temperaturas homogéneas, pero se incrementan a medida que aumenta la amplitud de los estímulos (**D**). Imagen adaptada de Kimata, et al. 2012.

Mecanismos moleculares en las neuronas de termorrecepción

El mecanismo molecular por el cual la neurona AFD es capaz de sensar temperatura se conoce con bastante detalle, e involucra tres guanilato ciclasas (GCY-8, GCY-18 Y GCY-23) y un canal iónico que responde a GMP cíclico, que consiste en dos subunidades, TAX-2 y TAX-4 (Komatsu, et al. 1996; Inada, et al. 2006). Sin embargo, no se conoce exactamente cuál el termorreceptor en la superficie de la membrana que inicia toda la respuesta.

Mutaciones en las distintas guanilato ciclasas producen distintas anormalidades en el comportamiento de respuesta a temperatura: mutaciones en el gen *gcy-8* causan defectos en la termotaxis mediada por AFD y mutaciones en *gcy-18* o en *gcy-23* cambian el rango de temperatura de la termotaxis hacia temperaturas más bajas o altas, respectivamente. Estos resultados indican que una regulación muy fina de los niveles de GMP cíclico es requerida para el correcto funcionamiento de la AFD. Además, la TTX-4/proteína quinasa C epsilon/eta y la TAX-6/calcineurina fueron identificados como reguladores negativos de la actividad y plasticidad de la AFD (Kuhara, et al. 2002; Okochi, et al. 2005). La DGK-3, una de las diacilglicerol quinasas de *C. elegans*, modifica la velocidad de adaptación de la AFD para una nueva temperatura de cultivo y regula la salida de AFD para el comportamiento de plasticidad mas que la termosensibilidad *per se* (Biron, et al. 2006). Finalmente, CMK-1, un homólogo de la quinasa CaMK I/IV, y CREB están involucrados río debajo de TAX-2/TAX-4 en la expresión génica inducida por la activación de la AFD (Kimata, et al. 2012).

En la neurona AWC, otra serie de moléculas están involucradas en la vía de sentido de temperatura, pero la información también es transmitida a través de una vía de señalización dependiente de proteína G que involucra G alfa (ODR-3), la guanilato ciclasa ODR-1, el regulador EAT-16 y el canal activado por GMP cíclico TAX-2/TAX-4 (Kuhara, et al. 2002; Biron, et al. 2006). Un homólogo del receptor acoplado a proteína G, STRTX-1, funciona como un posible sensor de temperatura en la AWC, pero su función todavía no está completamente elucidada. Por lo tanto, las neuronas ADF y AWC utilizan una vía de señalización basada en proteína G muy similar para el sentido de temperatura, la cual además es homóloga a la cascada de señalización presente en el mecanismo de visión de los mamíferos (Kimata, et al. 2012) (Figura 3.3).

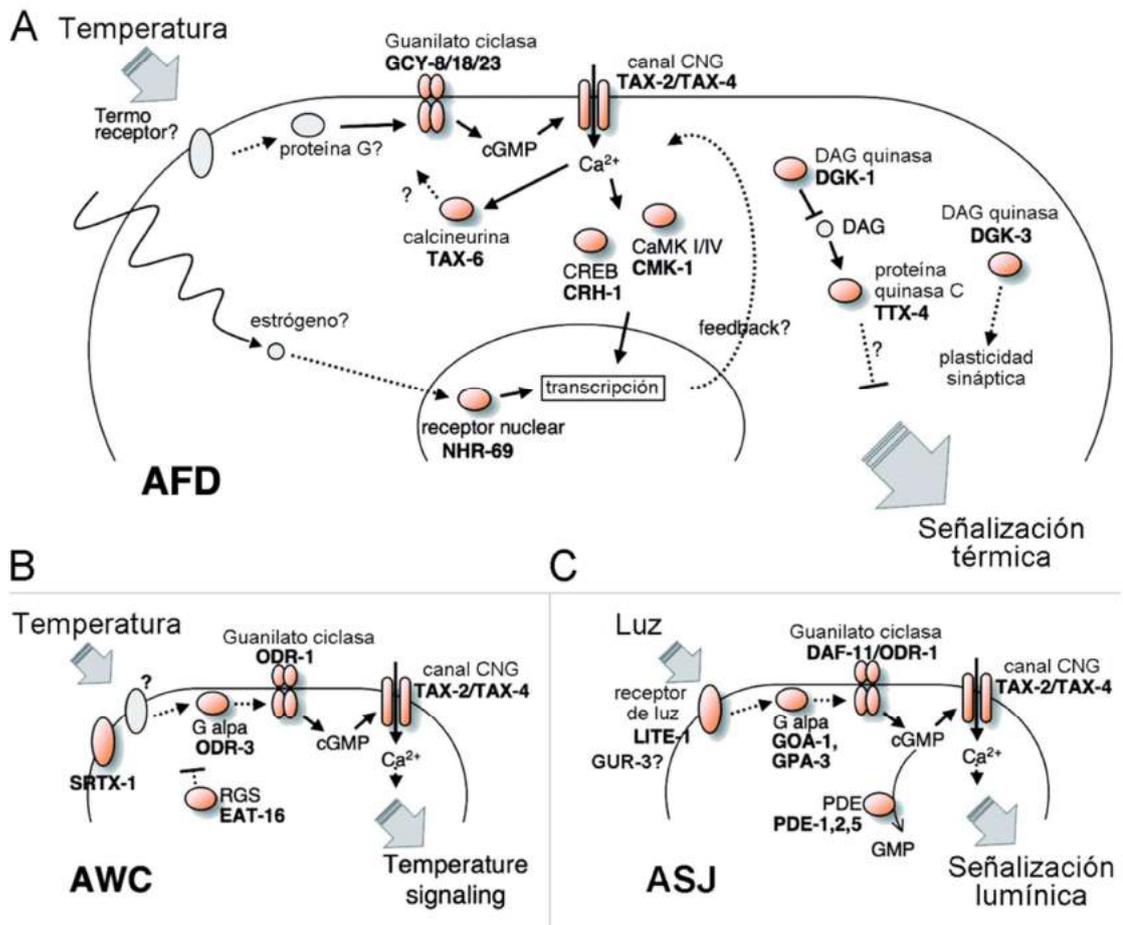


Figura 3.3| Mecanismos moleculares que intervienen en el sentido de temperatura y luz. A| Los estímulos térmicos son sentidos por receptores aún no identificados en el extremo sensorial de la neurona AFD; luego proteínas G no identificadas activan las guanilato ciclasas GCY-8, GCY-18 Y GCY-23, produciendo un aumento en la concentración de cGMP y regulando la apertura del canal CGN (*cyclic nucleotide gated channel*) TAX-2/TAX-4. Tax-6/calcineurina, DGK-1/DAG quinasa, TTX-4/proteína quinasa C y CMK-1/CaMK I/IV actúan como reguladores de la vía de señalización por temperatura. CRH-1/CREB y el receptor nuclear NHR-69 también regulan río abajo la transcripción mediada por temperatura. **A|** Un posible receptor SRTX-1 acoplado a proteína G regula la tasa de respuesta de la neurona AWC frente a cambios de temperatura. ODR-3/proteína G alfa activan la guanilato ciclasa ORD-1, generando cambios en la concentración de cGMP, lo que finalmente abre el canal TAX-2/TAX-4. EAT-16/RSG actúan como reguladores negativos de de la vía de señalización por temperatura en AWC. **C|** Modelo de la cascada de foto-transducción ejemplificado para la neurona ASJ. En este caso, dos receptores acoplados también a proteínas G, LITE-1 y GUR-3 actuarían como fotorreceptores, al menos dos proteínas G alfa, GOA-1 y GPA-3 podrían estar acopladas a las guanilato ciclasas DAF-11 y ODR-1 y estas generan un aumento en la concentración de cGMP que finalmente abre los canales TAX-2/TAX4. El aumento de Ca²⁺ intracelular induce una cascada de comportamiento río abajo como la fototaxis negativa. Imagen adaptada de Kimata, et al. 2012.

Mecanismos involucrados en el sensado de luz

En el año 2008, Edwards *et al* mostraron que a pesar de tratarse de un animal ciego, *C. elegans* era capaz de acelerar la velocidad de locomoción rápidamente en respuesta a pulsos de luz azul o de longitud de onda corta, con una respuesta máxima frente a la luz ultravioleta (Edwards, et al. 2008). Además, los autores mostraron que el nematodo utilizaba esta fototaxis negativa como un mecanismo protectorio para escapar de dosis altas de luz solar y así evitar daños asociados con mutaciones en el ADN. En el mismo sentido, se ha demostrado que la habilidad de sensar luz del nematodo es esencial para la supervivencia, ya que la exposición prolongada a la luz azul, UV-A y UV provoca parálisis y muerte en los animales (Ward, et al. 2008). Finalmente, se ha sugerido que este comportamiento podría entonces también proveer de un mecanismo potencial para retener a los nematodos debajo del suelo (Liu, et al. 2010).

La luz es sensada en el nematodo mediante un nuevo tipo de fotorreceptores, no canónicos, pertenecientes a la familia de los receptores gustativos de invertebrados (Gr). Al menos dos proteínas, LITE-1 y GUR-3, han sido asociados con esta respuesta, y la expresión ectópica de cualquiera de ellos en células no sensibles a la luz les confiere la capacidad de responder a ella (Figura 3.4) (Edwards, et al. 2008).

Recientemente se descubrió que GUR-3 funciona en realidad como un receptor de alta afinidad por peróxido de hidrógeno y que LITE-1 funciona además como un receptor de especies reactivas de oxígeno, mostrando también una baja afinidad por H_2O_2 (Bhatla y Horvitz 2015). Estos mismos autores sugieren entonces que la respuesta de LITE-1 a la luz solar puede estar mediada en realidad por la generación de especies reactivas de oxígeno por la luz, más que por la detección directa de fotones. Por otro lado, los autores sugieren que GUR-3 sería solo activado por luz muy brillante no natural, por lo que esta vía podría funcionar naturalmente en la detección ambiental de H_2O_2 y/o otras especies reactivas de oxígeno y no en la detección de luz natural.

Mediante técnicas de ablación laser, Ward *et al* determinaron que una combinación de 7 neuronas (ASJ, AWB, ASK, ASH, ASI, AWC y ADL) son necesarias para eliminar completamente la respuesta de fototaxis negativa mediada por la cabeza (Ward, et al. 2008). Todas estas neuronas son ciliadas y cuatro de ellas, ASJ, AWB, ASK y ASH, juegan un rol esencial en esta respuesta, ya que cuando son eliminadas, generan un defecto severo en la

respuesta del animal a la luz. La ablación de estas cuatro neuronas de manera individual o en diferentes combinaciones no genera efectos tan marcados, revelando la presencia de redundancia funcional en la respuesta fototáctica (Ward, et al. 2008) (Figura 3.4).

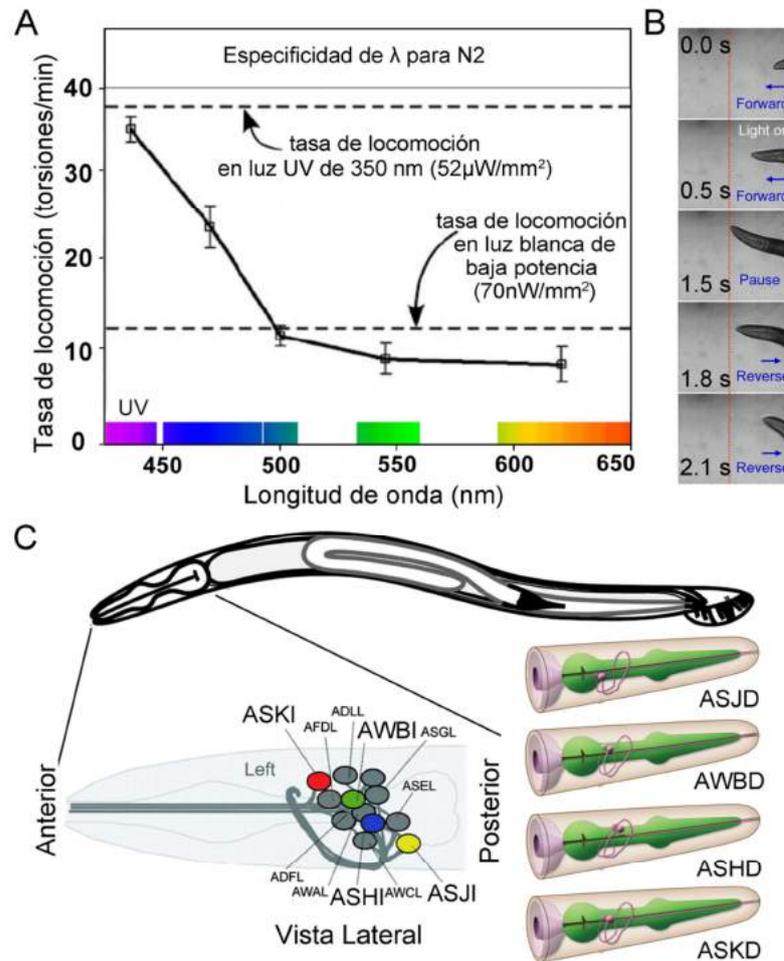


Figura 3.4| Comportamiento de fototaxis negativa en *C. elegans* y circuito neuronal involucrado. **A|** Tasas promedio de locomoción de nematodos en respuesta a estímulos lumínicos de diferentes longitudes de onda, aplicados mediante un pulso de luz en la cabeza. **B|** Secuencia de imágenes que muestran la respuesta de huida de un nematodo adulto que recibe un pulso de luz UV-A de 2 segundos en la cabeza mientras se está moviendo hacia adelante. En animal rápidamente responde frenando su movimiento hacia adelante e iniciando el movimiento en reversa. **C|** Representación esquemática de las neuronas que conforman el sistema de fotorrecepción del nematodo. Se muestra una vista lateral de la cabeza del nematodo, con las neuronas sensibles a la luz marcadas en colores: ASK izquierda (rojo), AWB izquierda (verde), ASH izquierda (azul) y ASJ izquierda (amarillo). A la derecha se muestra cada par de neuronas fotosensibles pero en un modelo en tres dimensiones. Imagen adaptada de Edwards, et al. 2008, Ward, et al. 2008 y de <http://www.wormatlas.org/>.

Se ha descrito también que mutantes de *tax-2* muestran defectos en la respuesta de huida a la luz, y el rescate bajo promotores específicos para ASJ, ASK o AWB solas no es

suficiente para revertir este fenotipo, lo cual sugiere que podría haber múltiples células fotorreceptoras que poseen funciones solapadas y que median la respuesta de fototaxis en *C. elegans*. Además, se ha descrito que un pulso de luz evoca una corriente de entrada en la neurona ASJ que se desencadena unos milisegundos después del estímulo con luz UV-A, azul o verde, con un efecto mucho más fuerte para la luz UV-A. Adicionalmente, esta corriente inducida por luz puede ser inhibida mediante el tratamiento de los nematodos con *L-cis-diltiazem*, un inhibidor específico de canales CNG que también bloquea este tipo de respuestas en conos y bastones del sistema de visión de los vertebrados (Ward, et al. 2008).

A partir de estos experimentos, se ha podido elucidar con cierto detalle el mecanismo molecular de la vía de fotorrecepción en la neurona ASJ, el cual se lleva a cabo mediante una cascada de señalización muy similar a la involucrada en la termorrecepción. En el caso de la luz, la cascada vía proteína G comienza con los receptores LITE-1/GUR-3, los cuales transducen la señal río abajo a dos guanilato ciclasas asociadas a la membrana, DAF-11 y ODR-1, que difieren de las fosfodiesterasas clásicas de vertebrados. Esto genera el aumento de los niveles de GMP cíclico, lo que provoca la apertura de los mismos canales activados por GMP cíclico conformados por TAX-2 y TAX-4 que participan en la termorrecepción, y finalmente generan la estimulación de la neurona por despolarización y la consecuente respuesta de fototaxis negativa (Ward, et al. 2008; Liu, et al. 2010) (ver Figura 3.3).

A pesar de que se conoce mucho acerca de los mecanismos moleculares y los circuitos neuronales involucrados en el sensado de luz y temperatura, existe muy poca información disponible acerca de la interacción entre estos y el sistema circadiano. Comprender cómo el reloj de *C. elegans* es capaz de sensar los *Zeitgebers* ambientales para regular sus comportamientos rítmicos es de gran relevancia, porque puede abrir las puertas indirectamente al descubrimiento de qué neuronas conforman el reloj central. Además, dada la gran redundancia existente en los mecanismos de foto y termorrecepción, sería muy interesante poder comprender cómo interaccionan estos sistemas para poner en hora al reloj y modular los patrones de las oscilaciones que se han descrito en varios niveles. En este capítulo se buscará entender cómo el ciclo dual de luz y temperatura es interpretado por el nematodo, mediante experimentos clásicos cambiando las condiciones ambientales. Además, con el objetivo de elucidar posibles vías fóticas y/o térmicas involucradas en la

sincronización del reloj central, se aprovecharán distintos mutantes disponibles en el CGC de componentes moleculares que están implicados en estos sistemas sensoriales.

Materiales y Métodos

Cepas de nematodos

En esta sección del trabajo se utilizaron las líneas con el arreglo extracromosomal *Psur-5::luc::gfp*; pRF4 y además se generaron nuevas líneas mediante microinyección de *Psur-5::luc::gfp* (50 o 100 ng/μl) y pRF4 (100 ng/μl) en los siguientes mutantes: TQ1101 *lite-1(xu7)*, MT21793 *lite-1(ce314) gur-3(ok2245)* y PR671 *tax-2(p671)*. Además, para la obtención del rescate total de PR671 *tax-2(p671)*, se inyectaron 10 ng/μl de *Ptax-2::tax-2(ADN genómico)::yfp* con 100 ng/μl de *Psur-5::luc::gfp*. Todas las cepas fueron adquiridas del *Caenorhabditis Genetics Center*.

Ensayo de luminiscencia en placa *multiwell* bajo LO/FC y condiciones constantes

Todos los ensayos fueron realizados como se describió en la sección de métodos generales. Para analizar la sincronización de la cepa N2 (*wild-type*) y para las cepas mutantes TQ1101 *lite-1(xu7)*, MT21793 *lite-1(ce314) gur-3(ok2245)* y PR671 *tax-2(p671)*, así como también para analizar del rescate total de PR671 *tax-2(p671)*, se utilizó el esquema 3,5 días bajo el ciclo de 24 h LO/FC 12 h: 12 h (0/400 lux; 15,5°C/17°C, ZT0, luz ON e inicio de la fase fría) y 4 días en condiciones de *free-running* (OO/CC, 17°C).

Para los ensayos de inversión de *Zeitgebers*, los nematodos fueron entrenados por 3,5 días bajo un ciclo de 24 h LO/CF 12 h: 12 h (0/400 lux; 17°C/15,5°C, ZT0, luz ON e inicio de la fase caliente) y 4 días en condiciones de *free-running* (OO/FF, 15,5°C).

Para los ensayos de entrenamiento solo a temperatura, los nematodos fueron entrenados por 3,5 días bajo un ciclo de 24 h FC 12 h: 12 h (15,5°C/17°C, ZT0, inicio de la fase fría) y 4 días en condiciones de *free-running* (CC, 17°C).

Análisis de Datos

Todos los datos fueron analizados como se describió durante la sección de métodos generales. En todos los caso un valor de $P < 0,05$ fue considerado como el mínimo para ser estadísticamente diferente. Los valores de significancia se denotaron como sigue: *** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,05$.

Resultados

Registros de luminiscencia de poblaciones de nematodos bajo un ciclo invertido LO/CF

Una pregunta que todavía queda pendiente es tratar de entender cómo *C. elegans* es capaz de sensor los *Zeitgebers* para generar la respuesta circadiana que se observa en los ritmos de luminiscencia. Para explorar los mecanismos que controlan la sincronización del reloj circadiano del nematodo, se estudió como la luz y la temperatura influenciaban las oscilaciones circadianas.

En el capítulo anterior se describió la sincronización de poblaciones de nematodos a un ciclo dual de luz y temperatura, el cual combinaba una fase de luz con temperatura baja y una de oscuridad con temperatura alta (LO/FC). El objetivo de ese entrenamiento era entonces tratar de mimetizar las condiciones del nicho ecológico de *C. elegans* y la profundidad del suelo en que éste habita, donde la luz y la temperatura están desfasadas y la amplitud térmica es baja y de alrededor de 2°C. Una pregunta que todavía queda pendiente es conocer si este ciclo de entrenamiento es realmente mejor que otro tipo de combinaciones, tales como el ciclo inverso, de luz y temperatura alta o incluso un entrenamiento solo bajo condiciones de temperatura variables, en ausencia completa de luz. Una tercera posibilidad sería un entrenamiento solo con estímulos lumínicos, el cual también se intentó, pero fue descartado, ya que no es realmente factible de realizar con total certeza, porque aún las incubadoras mas precisas de la actualidad tienen una variación de entre 0,25-0,5°C, y como se describió durante la introducción, *C. elegans* tiene uno de los sistemas de termorrecepción mas sensibles del mundo animal, que es capaz de detectar cambios tan pequeños como de 0,05°C.

Para poder estudiar si la relación de fases entre ambos *Zeitgebers* es importante para sincronizar a los nematodos, se mantuvo fijo el régimen lumínico y se invirtió completamente el ciclo de temperatura. En este caso, la fase de luz coincide con la fase de temperatura alta (LO/CF, 400-0 lux/15,5-17°C; en lugar de LO/FC). De esta manera, ZT0 indica el encendido de la luz y el inicio del rango de temperatura caliente (400 lux/17°C). Dado que la temperatura es muy importante para el desarrollo de los nematodos y que las neuronas sensibles a este *Zeitgeber* muestran mecanismos de memoria de la temperatura de crecimiento, las condiciones utilizadas para crecer y entrenar los nematodos antes de los

registros de luz hasta el estadio L4 se mantuvieron iguales, con el ciclo LO/FC (400-0 lux/15,5-17°C).

Al entrenar poblaciones de nematodos bajo este nuevo ciclo invertido, se obtuvieron resultados muy claros, que mostraron que los nematodos fueron mucho menos capaces de entrenar bajo estas condiciones y por el contrario, mostraron mayormente una respuesta del tipo enmascaramiento. Mientras que bajo el ciclo clásico LO/FC alrededor del 80% de las poblaciones se sincronizaron a las condiciones ambientales mostrando un período de 24 h, bajo el ciclo invertido este número cayó al 39%. Además, el 85% de las poblaciones fueron arrítmicas o mostraron un cambio abrupto de fase cuando fueron liberadas en condiciones constantes (oscuridad y 15,5°C). Remarcablemente, los ritmos de luminiscencia mostraron además dos poblaciones con diferentes fases, una cercana al final de la noche y la fase de temperatura baja (ZT19,9 ± 0,6 h), mientras que la otra estuvo cerca de la transición entre ambos *Zeitgebers* (ZT2,30 ± 0,4 h). Estos resultados sugieren que solamente una combinación precisa de ambas claves ambientales es capaz de entrenar realmente a los ritmos de luminiscencia de los nematodos (Figura 3.5).

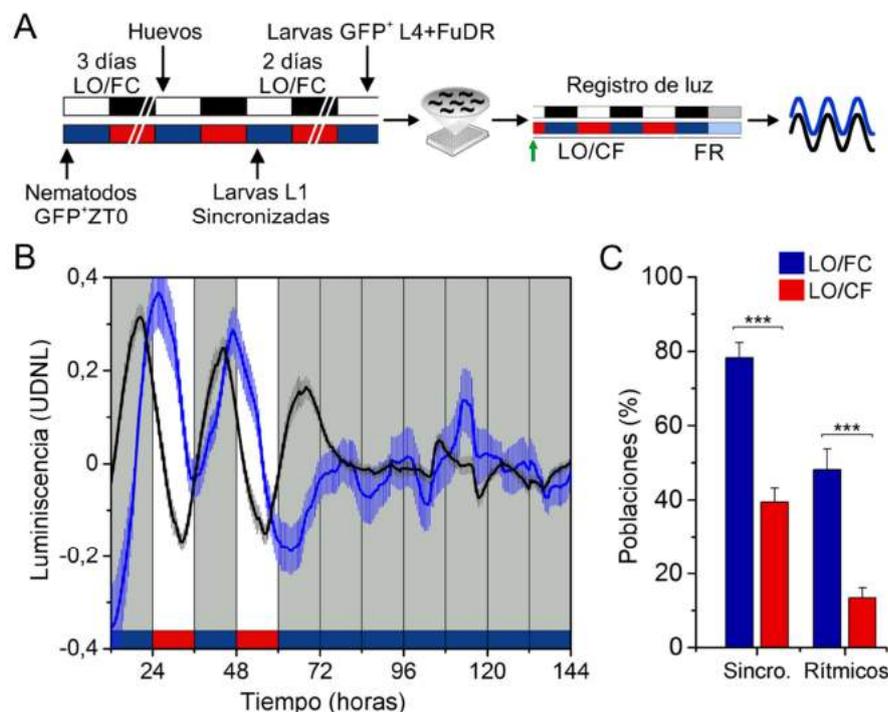


Figura 3.5| Sincronización de poblaciones de gusanos con *Psur-5::luc::gfp* bajo un ciclo invertido LO/CF. A| Representación esquemática de las condiciones foto y termo-periódicas utilizadas y del experimento. Las barras blancas/negras indican luz/oscuridad; las barras azules/rojas indican

temperatura baja/alta; las barras gris y anaranjadas indican noche subjetiva y temperatura alta subjetiva, respectivamente. Los nematodos fueron entrenados bajo el ciclo combinado 12 h:12 h LO/FC (400/0 lux, 18.5/20°C, ZT0, encendido de la luz y comienzo de la fase fría de temperatura) sobre placas de NGM sembradas con *E. coli*. Al día 6, 100 nematodos transgénicos que expresaban *gfp* fueron seleccionados manualmente y transferidos al medio de luminiscencia y se realizó el registro de luz bajo un nuevo paradigma de condiciones ambientales, consistente de LO/CF (400/0 lux, 17/15,5°C) y luego bajo condiciones constantes (*free-running*, FR, oscuridad y 15,5°C). La flecha verde indica el momento donde comenzó el registro de luz (ZT10). **B** Luminiscencia promedio de las poblaciones que mostraron *masking* y dos grupos bien definidos de acrofases (ZT19,9 ± 0.6 h, línea negra, n = 39; y ZT2,30 ± 0.4, línea azul, n = 17; Rayleigh test; P < 0,001). **C** Porcentaje de poblaciones sincronizadas (es decir, con su fase y período determinado por los *Zeitgebers*) y entrenadas (es decir, que mantuvieron su acrofase cuando se liberaron en condiciones constantes) bajo LO/FC (n = 101) y LO/CF (n = 165; ***P < 0,001; **P < 0,01, test exacto de Fisher de dos colas). La luminiscencia se muestra como promedio ± SEM. UDNL: Unidades normalizadas de luminiscencia sin la tendencia (*detrended*). Cada población de 100 nematodos adultos fue considerada como una muestra biológica independiente (n).

Registros de luminiscencia de poblaciones de nematodos bajo un ciclo de temperatura

Posteriormente, para comprender mejor la influencia de la temperatura en el entrenamiento del ritmo de luminiscencia, se repitió el mismo experimento pero esta vez solo con un ciclo de temperatura, manteniendo la oscuridad constante (12 h: 12 h, temperatura alta/baja, CF, $\Delta = 1,5 \pm 0,125^\circ\text{C}$; ZT0 corresponde al inicio de la fase de 15,5°C). Esta variación térmica fue suficiente para entrenar algunas poblaciones en ausencia de señales lumínicas y fue claramente mejor como entrenamiento para los nematodos que el ciclo invertido previo, y se encontró una fase con un pico de luminiscencia ligeramente diferente a la del entrenamiento con el *Zeitgeber* dual clásico (FC: ZT13,2 ± 0,7 h; LO y FC: ZT15,6 ± 0,3 h). Adicionalmente, el esquema de temperatura sola también tendió a enmascarar en lugar de entrenar los ritmos circadianos, ya que aún cuando alrededor del 60% de las poblaciones mostraron un ritmo de 24 h bajo las condiciones variables, la mayor parte perdieron su fase circadiana e inclusive su ritmicidad, al ser liberadas en condiciones constantes (Figura 3.6). Estos resultados sugieren que, bajo estas condiciones, la temperatura es un estímulo mucho más potente que la luz para sincronizar y entrenar al reloj del nematodo. Sin embargo, tanto la luz como la temperatura son requeridas de manera conjunta y en una combinación en particular, para obtener los ritmos circadianos robustos y entrenados antes encontrados.

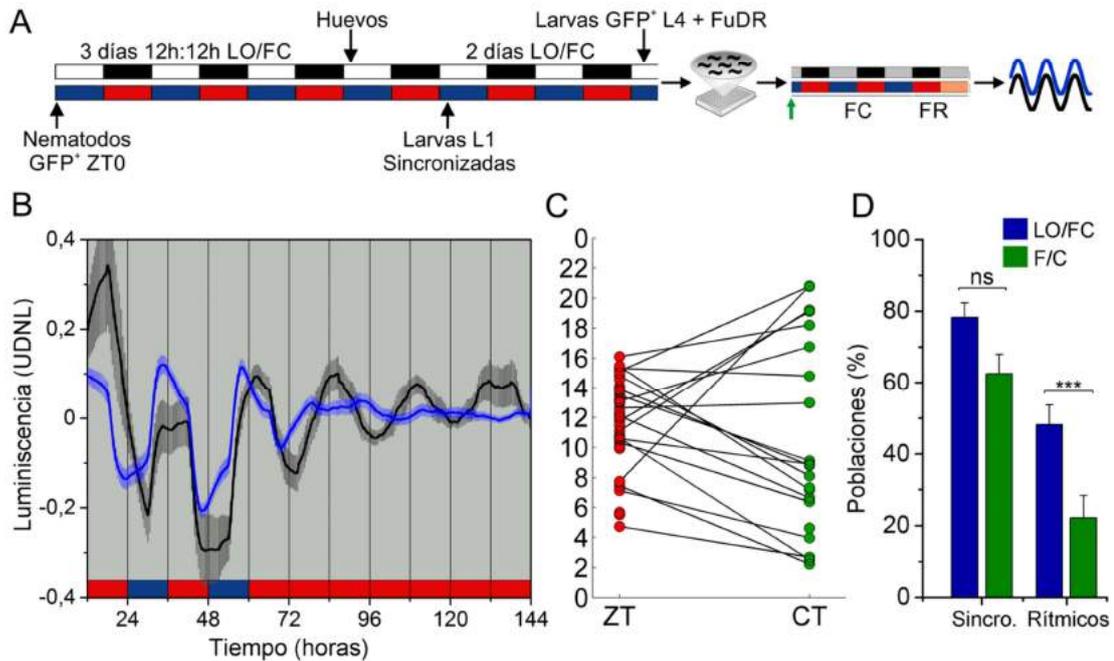


Figura 3.6| Sincronización de poblaciones de gusanos con *Psur-5::luc::gfp* bajo un ciclo invertido LO/CF. **A|** Representación esquemática de las condiciones foto y termo-periódicas utilizadas y del experimento. Las barras blancas/negras indican luz/oscuridad; las barras azules/rojas indican temperatura baja/alta; las barras gris y anaranjadas indican noche subjetiva y temperatura alta subjetiva, respectivamente. Los nematodos fueron entrenados bajo el ciclo combinado 12 h:12 h LO/FC (400/0 lux, 18.5/20°C, ZT0, encendido de la luz y comienzo de la fase fría de temperatura) sobre placas de NGM sembradas con *E. coli*. Al día 6, 100 nematodos transgénicos que expresaban *gfp* fueron seleccionados manualmente y transferidos al medio de luminiscencia y se realizó el registro de luz bajo un ciclo de temperatura, consistente de FC (15,5/17°C) y luego bajo condiciones constantes (*free-running*, FR, oscuridad y 15,5°C). La flecha verde indica el momento donde comenzó el registro de luz (ZT10). **B|** Luminiscencia promedio \pm SEM de las poblaciones entrenadas (línea negra, n = 19) y enmascaradas (línea azul, n = 35) bajo el ciclo FC. **C|** Gráfico de *Rayleigh* lineal que muestra las acrofases de las señales de los nematodos bajo ZT (puntos rojos, n = 45; *Rayleigh test*; $P < 0,01$, acrofase promedio $ZT13,2 \pm 0,7$ h) y condiciones constantes (CT, puntos azules, n = 24; *test de Rayleigh*, no significativo). Las 21 poblaciones remanentes fueron arrítmicas bajo condiciones constantes. **D|** Porcentaje de poblaciones sincronizadas (es decir, con su fase y período determinado por los *Zeitgebers*) y entrenadas (es decir, que mantuvieron su acrofase cuando se liberaron en condiciones constantes) bajo LO/FC (n = 101) y FC (n = 72; *** $P < 0,001$; *test exacto de Fisher* de dos colas). UDNL: Unidades normalizadas de luminiscencia sin la tendencia (*detrended*). Cada población de 100 nematodos adultos fue considerada como una muestra biológica independiente (n).

Registros de luminiscencia de nematodos mutantes para vías de sincronización

Para entender mejor cómo es que el reloj percibe las señales del ambiente, se analizó la expresión del reportero bioluminiscente en diferentes mutantes deficientes en termo- y/o

fotorrecepción. Particularmente, se enfocó la caracterización molecular de la vía a tres tipos de mutantes de pérdida de función:

1) *lite-1(xu7)*, que presenta una mutación puntual sin sentido en el gen *lite-1* que codifica para un fotorreceptor menos funcional, presentando un fenotipo de fototaxis negativa defectuosa (Liu, et al. 2010).

2) *lite-1(ce314); gur-3(ok2245)* que presenta una mutación puntual en *lite-1* la cual afecta un sitio de *splicing* alternativo de un intrón y una mutación en el gen *gur-3*, por delección de 1208 pb e inserción de 2 bases inmediatamente después del primer exón, lo que genera un codón de stop prematuro y una proteína no funcional por predicción bioinformática (generado por el *C. elegans Gene Knockout Consortium*). Este mutante posee los dos fotorreceptores afectados, presentando una respuesta de fototaxis negativa casi nula (Bhatla y Horvitz 2015).

3) *tax-2(p671)*, que presenta una mutación puntual sin sentido en el gen *tax-2* y por lo tanto codifica para una subunidad TAX-2 menos funcional y un canal TAX-2/TAX-4 afectado, mostrando un fenotipo defectivo para termotaxis y quemotaxis (Coburn y Bargmann 1996).

Al analizar los ritmos de luminiscencia en los mutantes *lite-1(xu7)* para el fotorreceptor LITE-1, se observó una caída notable en el porcentaje de poblaciones sincronizadas al ciclo LO/FC, que bajó del 78% en los nematodos *wild-type* al 48% en los mutantes. Sin embargo, esta mutación no afectó el número de poblaciones entrenadas, ya cuando los nematodos fueron liberados en condiciones constantes, la menor proporción de poblaciones sincronizadas fueron igualmente capaces que los *wild-type* de mantener la acrofase del ritmo de luminiscencia. Asimismo, y tal como se esperaba, la proporción de poblaciones rítmicas bajo condiciones constantes también se mantuvo igual. Esto es consistente con la hipótesis del rol de estos componentes en vías de sincronización del reloj central y no como parte del mecanismo molecular central, que es el que regula la ritmicidad bajo condiciones constantes (Figura 3.7).

A pesar de que LITE-1 juega un rol principal en la respuesta a la luz en el rango azul-violeta, la respuesta fótica residual puede ser explicada por el fenotipo relativamente sutil de todos los mutantes de LITE-1 (Edwards, et al. 2008) y también por el hecho de que el fotorreceptor GUR-3 se halla todavía intacto. Por otro lado, también podría suceder que parte de esta ritmicidad residual se deba a la capacidad intacta de estos nematodos para

senzar temperatura, que como se mostró antes, también es capaz de entrenar ella misma al reloj. Entonces, se realizó este mismo experimento pero con poblaciones del doble mutante *lite-1(ce314); gur-3(ok2245)*, que tal como se describió anteriormente, se esperaba que fuera totalmente incapaz de senzar la luz. Remarcablemente, la cepa doble mutante mostró una tendencia muy similar a la mutante de *lite-1(xu7)*, con alrededor de 46% de poblaciones sincronizadas bajo las mismas condiciones. Sin embargo, los mutantes *lite-1; gur-3* fueron menos capaces de entrenar a los *Zeitgebers* que el mutante simple (23% versus 35%) y presentaron una capacidad de entrenamiento significativamente menor que la cepa *wild-type* (23% versus 48%, Figura 3.8). Además, tampoco se observó diferencia significativa en la proporción de poblaciones rítmicas en estos mutantes, con lo cual el reloj central no estaba afectado en estos nematodos. Estos resultados concuerdan con la noción de una respuesta cooperativa entre diferentes fotorreceptores en el mecanismo de entrenamiento del reloj central por la luz. El 23% restante de las poblaciones que aún son capaces de entrenar al ciclo ambiental, pueden ser entonces explicadas por la respuesta residual antes mencionada a la temperatura.

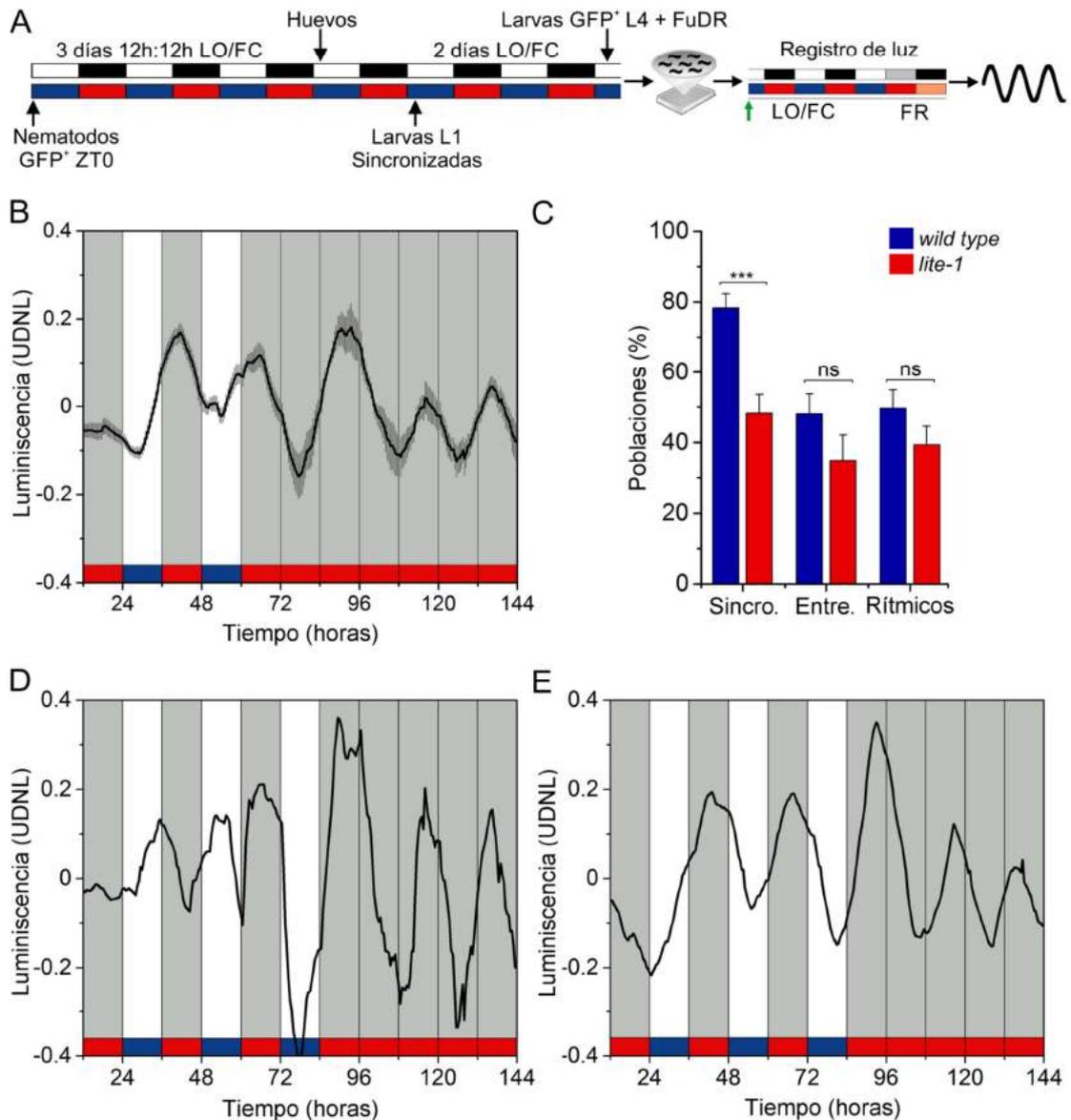


Figura 3.7| Sincronización de poblaciones mutantes *lite-1(xu7)* bajo el ciclo LO/FC. A| Representación esquemática de las condiciones foto y termo-periódicas utilizadas y del experimento. Los nematodos fueron entrenados bajo el ciclo combinado 12 h:12 h LO/FC (400/0 lux, 18.5/20°C, ZT0, encendido de la luz y comienzo de la fase fría de temperatura) sobre placas de NGM sembradas con *E. coli*. Al día 6, 100 nematodos transgénicos que expresaban *gfp* fueron seleccionados manualmente y transferidos al medio de luminiscencia y se realizó el registro de luz bajo el ciclo clásico LO/FC (15,5/17°C) y luego bajo condiciones constantes (*free-running*, FR, oscuridad y 17°C). La flecha verde indica el momento donde comenzó el registro de luz (ZT10). **B|** Luminiscencia promedio \pm SEM de las poblaciones mutantes de *lite-1* bajo el ciclo LO/FC. **C|** Porcentaje de poblaciones sincronizadas y entrenadas bajo LO/FC y rítmicas bajo FR, de la cepa *wild-type* (n = 101) y del mutante *lite-1(xu7)* (n = 89; ***P < 0,001; test exacto de Fisher de dos colas). **D-E|** Registros de luminiscencia de dos poblaciones representativas de B. UDNL: Unidades normalizadas de luminiscencia sin la tendencia (*detrended*). Cada población de 100 nematodos adultos fue considerada como una muestra biológica independiente (n).

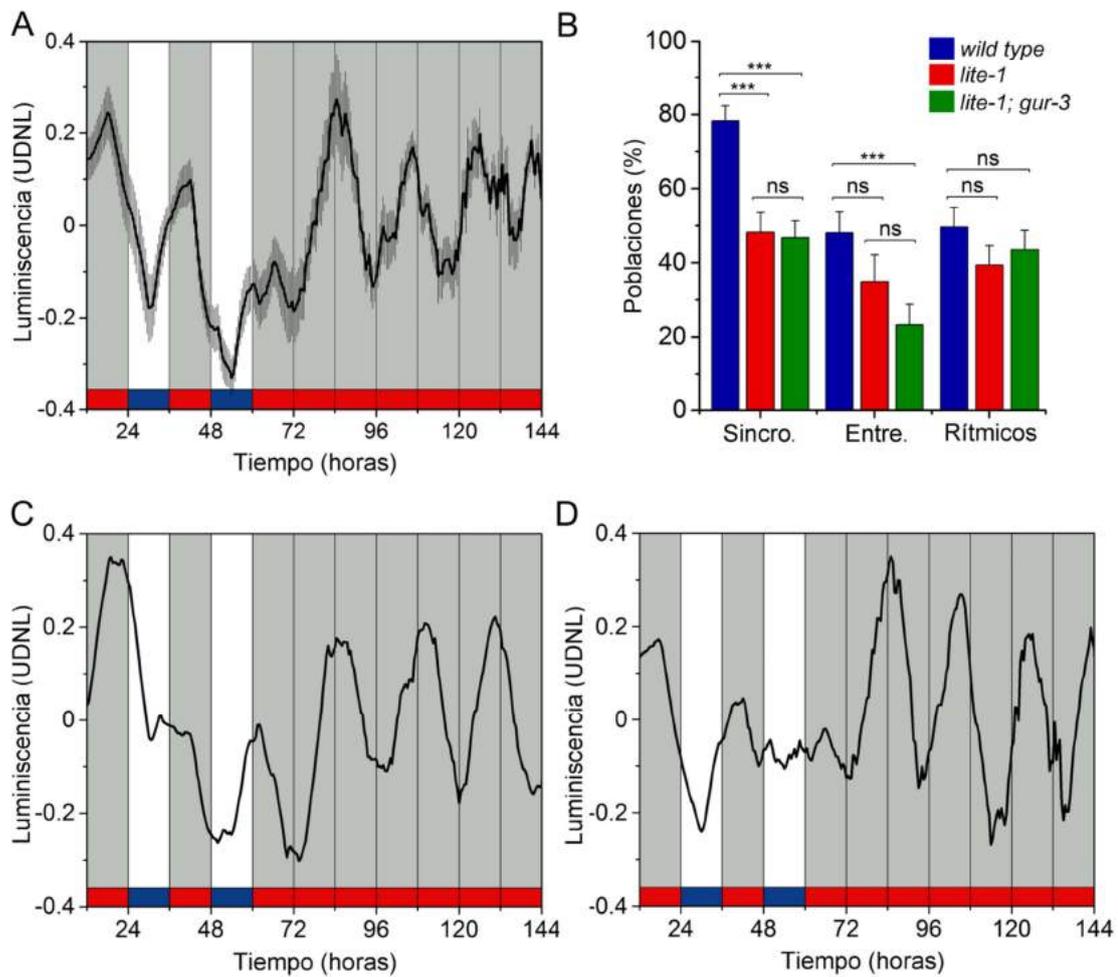


Figura 3.8| Sincronización de poblaciones mutantes *lite-1(ce314); gur-3(ok2245)* bajo el ciclo LO/FC. A| Luminiscencia promedio \pm SEM de las poblaciones mutantes de *lite-1(ce314); gur-3(ok2245)* bajo el ciclo LO/FC. **B|** Porcentaje de poblaciones sincronizadas y entrenadas bajo LO/FC y rítmicas bajo FR, de la cepa *wild-type* (n = 101) y del mutante *lite-1(ce314); gur-3(ok2245)* (n = 120; ***P < 0,001; *test* exacto de *Fisher* de dos colas). **C-D|** Registros de luminiscencia de dos poblaciones representativas de B. UDNL: Unidades normalizadas de luminiscencia sin la tendencia (*detrended*). Cada población de 100 nematodos adultos fue considerada una muestra biológica independiente (n).

Para el caso de los mutantes del canal *tax-2*, los ritmos de luminiscencia se vieron severamente afectados. La sincronización al ciclo LO/FC disminuyó a un 22% y la actividad del reportero basado en luciferasa no mantuvo una fase entrenada una vez que las poblaciones fueron transferidas a condiciones constantes (15% de entrenados). Esto sugiere un rol principal para el canal CNG TAX-2/TAX-4 en el entrenamiento de los ritmos circadianos. La aparente pérdida de ritmicidad del ritmo promedio poblacional bajo condiciones constantes se debe a una diferencia de fases entre poblaciones individuales. En

este sentido, la proporción de poblaciones individuales que demostraron ser rítmicas en condiciones constantes fue de nuevo similar entre los mutantes y la cepa *wild-type*.

Para corroborar que el fenotipo encontrado realmente se debía al canal TAX-2/TAX-4 defectuoso, se generó un rescate total de *tax-2* mediante la microyección de *Ptax-2::tax-2(ADN genómico)::yfp* y *Psur-5::luc::gfp*, en el *background* mutante *tax-2(p671)*. Cuando se analizaron poblaciones de estos nematodos bajo el ciclo LO/FC, el fenotipo defectivo de los mutantes fue rescatado completamente, recuperándose la sincronización en un 70% de las poblaciones y el entrenamiento en un 40% (Figura 3.9).

De acuerdo con estos resultados, la severa pérdida de ritmicidad bajo condiciones cíclicas en la cepa *tax-2(p671)* y de entrenamiento durante *free running*, añade más evidencias en apoyo de la noción de un entrenamiento dual por luz y temperatura del reloj del nematodo, ya que el canal CNG TAX-2/TAX-4 es un componente común de ambas cascadas de transducción de señales.

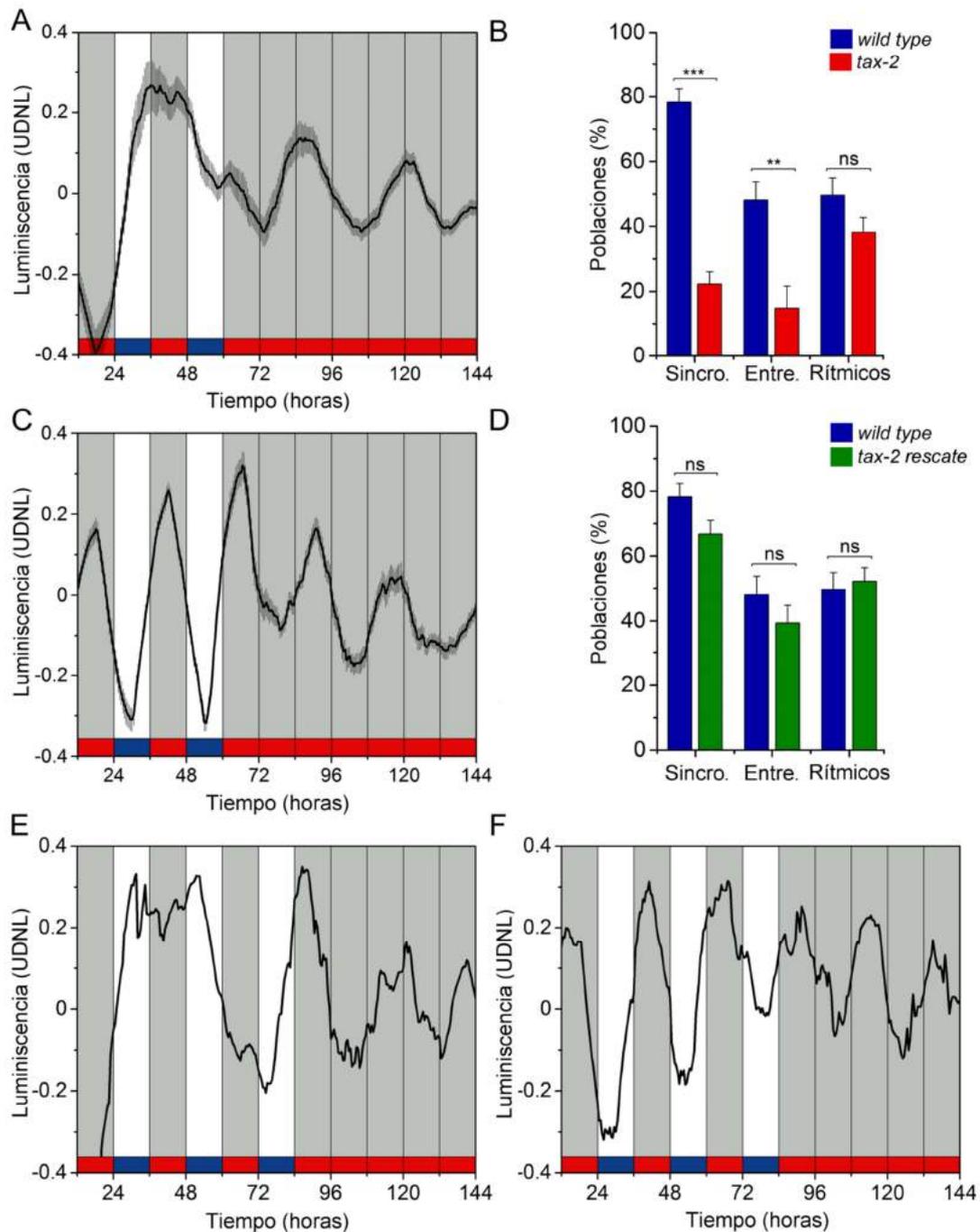


Figura 3.9] Sincronización de poblaciones mutantes *tax-2(p671)* y de su rescate bajo el ciclo LO/FC. A] Luminiscencia promedio \pm SEM de las poblaciones mutantes de *tax-2(p671)* bajo el ciclo LO/FC. B] Porcentaje de poblaciones sincronizadas y entrenadas bajo LO/FC y rítmicas bajo FR, de la cepa *wild-type* ($n = 101$) y del mutante *tax-2(p671)* ($n = 121$; ** $P < 0,01$, * $P < 0,001$; test exacto de Fisher de dos colas). C] Luminiscencia promedio \pm SEM del rescate de *tax-2(p671)* bajo el ciclo LO/FC. D] Porcentaje de poblaciones sincronizadas y entrenadas bajo LO/FC y rítmicas bajo FR, de la cepa *wild-type* ($n = 101$) y del rescate total del mutante *tax-2(p671)* ($n = 121$; ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$; test exacto de Fisher de dos colas). E-F] Registros de luminiscencia de dos poblaciones representativas del mutante *tax-2(p671)* (E) y del rescate (F).**

Discusión

Uno de los tantos aspectos importantes de la biología circadiana de *C. elegans* que aún se desconocen está relacionado con la forma en la cual los *Zeitgebers*, en este caso del ciclo dual de luz y temperatura, son sentidos e interpretados por las neuronas del nematodo y finalmente llevan a cabo la sincronización del reloj central. A partir de este punto, el reloj inducirá la expresión de muchos genes que regularán río abajo diversas salidas circadianas, como es el caso del ritmo de luminiscencia controlado por *sur-5*, que hemos encontrado en este trabajo.

Para lograr comprender algunos de estos aspectos, en este capítulo se aprovechó la sensibilidad y la robustez del ritmo de luminiscencia obtenido con el reportero antes desarrollado, para revelar cómo la luz y la temperatura pueden afectar estas oscilaciones, enfocándonos particularmente en la modulación de los momentos de mayor actividad del reportero bajo distintos estímulos ambientales. Además, en este punto fueron importantes tres parámetros de estos ritmos: la capacidad de sincronización de los mismos al ciclo ambiental; la capacidad de entrenamiento, es decir, que la fase determinada bajo condiciones ambientales también sea mantenida en ausencia de ellas y finalmente, la ritmicidad bajo condiciones constantes, todas propiedades fundamentales del reloj central.

Al analizar estos mismos ritmos variando las condiciones ambientales de luz y temperatura se encontraron resultados muy claros y evidentes que apoyan la noción de que para el reloj del nematodo ambos estímulos son muy importantes y, lo que es más interesante, son necesarios en una combinación de fases particular para lograr entrenarlo verdaderamente. Cuando en el ciclo de luz y temperatura baja, que se había elegido para lograr reproducir las condiciones del suelo donde *C. elegans* habita, se invirtió el ciclo de temperatura con respecto al de luz-oscuridad, se encontró que los nematodos no “entendieron” el nuevo paradigma y el reloj respondió con una respuesta clara de enmascaramiento. Solo un pequeño porcentaje de las poblaciones lograron entrenar al nuevo ciclo, mostrando una fase diferente en comparación con el ciclo LO/FC, que fue cercana a la transición entre ambos *Zeitgebers*.

Por otro lado, cuando este experimento se realizó en ausencia de luz, y solo en presencia del ciclo FC de temperatura, si bien esta condición fue mucho más fuerte como estímulo sincronizador (y logró entrenar a un porcentaje mayor de las poblaciones que el

ciclo de inversión), aún así no logró alcanzar los niveles logrados con el ciclo elegido inicialmente LO/FC. Esto demostró claramente que la temperatura es un *Zeitgeber* muy fuerte para el reloj del nematodo, algo que se podía presumir por la gran sensibilidad que presenta el animal frente a este estímulo. Este resultado es interesante en sí mismo, y abre las puertas para estudiar cómo la temperatura sola puede modular los ritmos de luminiscencia, a través del estudio de rangos de temperatura de diferente amplitud. Podría suceder, por ejemplo, que fuera posible una mayor eficiencia de entrenamiento con un ligero aumento del ciclo de temperatura (2 o 3°C). Una cuestión interesante acerca del ciclo de temperatura solo es que los nematodos presentaron un máximo de luminiscencia también en la fase más caliente del ciclo, aunque ligeramente avanzado con respecto al ciclo dual. Esto sugiere la idea de una cierta preferencia de los nematodos por la temperatura alta.

Al analizar los ritmos de luminiscencia en las poblaciones mutantes para distintos componentes de las vías de foto y termorrecepción, se encontraron diversos grados de sincronización y entrenamiento al ciclo dual de luz y oscuridad. Los mutantes de *tax-2(p671)* mostraron estar severamente afectados en la capacidad de entrenamiento a los *Zeitgebers* y por ende se puede afirmar que el canal TAX-2/TAX-4 cumple un rol principal en esta respuesta. Además, se encontró que solamente la mutación de ambos fotorreceptores, LITE-1 y GUR-3, es capaz de generar una disminución significativa tanto en la sincronización como en el entrenamiento del reloj, lo cual sugiere una función cooperativa de ambos fotorreceptores. La capacidad residual de entrenamiento en los mutantes dobles *lite-1;gur-3* (cuyas mutaciones debieran generar proteínas no funcionales) podría explicarse por su capacidad intacta de sensar temperatura. Resultados similares, en cuanto al rol de *tax-2*, fueron descritos previamente por van der Linden et al. (van der Linden, et al. 2010), quienes demostraron que una mutación en TAX-2 es capaz de abolir la expresión de diferentes transcritos entrenados bajo condiciones LO o FC (delta de 10°C). Esto indicaba que TAX-2 era necesario para la transducción de ambos *Zeitgebers*. Además, *tax-2* fue recientemente involucrado en la transducción de señales térmicas al reloj circadiano de *C. elegans* en ensayos de ritmos de actividad locomotora (Winbush, et al. 2015). A pesar de esto, no se había logrado describir hasta el momento un rol para *lite-1* en el entrenamiento de transcritos mediado por luz y, hasta lo que sabemos, no existía ningún estudio previo relacionando *gur-3* a las vías de entrada del reloj. En este punto, sería interesante poder

desglosar la función que cumple cada fotorreceptor en la vía de sincronización, ya que como se describió anteriormente, se ha reportado que ambos responden a la luz de manera diferencial. Para ello, sería importante evaluar al mutante simple *gur-3(ok2245)* bajo LO/FC, e incluso a los mutantes simples y dobles bajo distintas intensidades de luz. Además, como se ha descrito que LITE-1 y GUR-3 también son capaces de sensor H_2O_2 y/o otras especies reactivas de oxígeno, algo en lo que estamos especialmente interesados en el laboratorio, también será esencial entender si son capaces de percibir la luz directamente o si en realidad son estos subproductos de la luz los que son importantes para sincronizar al reloj.

La actividad residual del doble mutante *lite-1;gur-3*, así como también la del mutante de *tax-2*, podría indicar también que hay más componentes involucrados en esta vía. Además, dado que el canal CGN TAX-4/TAX-4 es un componente común de ambas vías de señalización para la luz y la temperatura, la afección más notoria de los ritmos encontrados en este mutante, junto con el hecho de que los ciclos de temperatura solos no fueron capaz de recapitular la fuerza del ciclo LO/FC, apoyan la hipótesis de que el ritmo de luminiscencia es el resultado de un entrenamiento dual y sinérgico de ambos *Zeitgebers*. En este sentido, será de gran importancia seguir caracterizando la vía de sincronización mediante el análisis de animales transgénicos con el reportero que presenten mutaciones adicionales, tales como el mutante doble *tax-2/tax-4*, y algunos mutantes que involucren solo la vía de termorrecepción, como el triple mutante *gcy-8/18/23*, que presenta guanilatos ciclasas defectivas que están exclusivamente involucradas en el sentido de temperatura en la neurona principal AFD. Todos estos mutantes están disponibles en el *Caenorhabditis Genetics Center*. Finalmente, por supuesto, sería interesante combinar más mutaciones, por ejemplo, mediante una cruce entre el mutante *gcy-8/18/23* y el doble mutante *lite-1;gur-3*, para tratar de generar un efecto similar al de un nematodo sin el canal *tax-2/tax-4* funcional.

En la naturaleza, la mayoría de los organismos, no solo *C. elegans*, están expuestos a ambos *Zeitgebers* al mismo tiempo y en relaciones de fase precisas entre ellos. El nematodo es un caso particularmente interesante para analizar la regulación dual del reloj, ya que como se describió durante la introducción, los mecanismos moleculares involucrados en las neuronas que sienten luz y temperatura son muy similares y comparten gran parte de los componentes. Por esta razón, resulta sorprendente que todos los intentos por estudiar ritmos circadianos en *C. elegans* fueron siempre bajo ciclos independientes, solo de luz o de temperatura (Kippert, et al. 2002; Simonetta, et al. 2009; Olmedo, et al. 2012; Herrero, et al.

2015; Winbush, et al. 2015), y lo que es más interesante, que el único estudio global de transcripción génica circadiana haya sido realizado con un delta de variación de 10°C (van der Linden, et al. 2010), algo que parece excesivo en relación a la sensibilidad del sistema del nematodo. Particularmente, el resultado general del análisis de transcripción es sumamente interesante, ya que después de analizar todo el transcriptoma de *C. elegans* bajo un entrenamiento en luz-oscuridad y otro en temperatura baja-alta, no se logró identificar ningún componente común entre ambos conjuntos de datos, algo que es esperado para el caso de los genes que son parte del reloj central. La explicación del resultado en este trabajo fue la existencia de dos relojes que funcionan en paralelo, pero nunca se tuvo en cuenta el posible efecto de enmascaramiento y por ende la pérdida de muchos de los potenciales genes circadianos bajo FC generado por un ciclo de 10°C grados de temperatura de variación. Por el contrario, los autores atribuyeron la falta de solapamiento de estos conjuntos a la posible existencia de dos relojes transcripcionales que podrían coexistir en el nematodo, uno regulado por luz y, otro regulado por la temperatura (van der Linden, et al. 2010).

Sea cual fuera la solución al problema del reloj central de *C. elegans*, está claro que el ritmo de luminiscencia muestra un efecto sinérgico de ambos *Zeitgebers* y una fuerte tendencia a una actividad tanto nocturna como asociada con la temperatura alta. Un efecto sinérgico similar, aunque con fases opuestas de los *Zeitgebers*, fue descrito también en moscas, donde una combinación de luz y temperatura refuerza el entrenamiento tanto a nivel molecular como comportamental (Yoshii, et al. 2009). Además, resulta interesante que *Drosophila melanogaster* muestra un ritmo fuerte de preferencia de temperatura, prefiriendo una temperatura más baja por la mañana y una alta al atardecer (la temperatura de preferencia se incrementa gradualmente desde la mañana (ZT1-3) hasta el atardecer (ZT10-12) y alcanza un máximo al atardecer a ZT10-12) (Kaneko, et al. 2012). Sería muy interesante estudiar entonces si el nematodo también exhibe este tipo de ritmos de preferencia de temperatura a lo largo del día, para terminar de entender la razón por la cual el ciclo dual genera el mayor entrenamiento.

Por otro lado, el efecto sinérgico encontrado con ambos *Zeitgebers* en nuestro caso podría sugerir que como las neuronas foto y termosensibles descritas hasta el momento son distintas (ASJ, AWB, ASK y ASH para la luz y AFD, AWC y ASI para la temperatura), en realidad exista algún mecanismo río abajo de estas neuronas donde podría confluir la

información generada por ambos estímulos. Al respecto, el circuito neuronal mas allá de las neuronas fotorreceptoras todavía no se conoce, y podría estar solapado en algún punto con el de temperatura, por ejemplo a nivel de las neuronas AIY/AIZ o mas abajo, en la neurona RIA. Evidencias a favor de ello provienen del descubrimiento de que otros sistemas sensoriales en el nematodo, tal como el quimiosensorial, utiliza la misma vía que el de termorrecepción a partir de las neuronas AIY y AIZ (Hobert 2003). Por otro lado, incluso podría existir algún termorreceptor (de los cuales se sabe también muy poco) en algunas de las neuronas de fotorrecepción, y que alguna de estas sea en realidad la neurona "X" aún no identificada, que es capaz también de sensor temperatura (Ver figura 3.1), generando entonces un circuito solapado entre ambos estímulos que pudieran sincronizar de manera sinérgica a las neuronas del reloj central, que por supuesto aún son desconocidas.

Capítulo IV:
**Regulación transcripcional de *sur-5* y
modulación farmacológica de los
ritmos de luminiscencia**

“You never change things by fighting the existing reality. To change something, build a new model that makes the existing model obsolete”.

— Richard Buckminster Fuller

Introducción

Mecanismos de regulación circadiana de la actividad transcripcional

Como se describió en la introducción general, los ritmos circadianos se encuentran en todos los organismos del planeta y la arquitectura molecular que conforma el reloj central está muy conservada entre diversas especies (Bell-Pedersen, et al. 2005; Rosbash, et al. 2007). Este mecanismo está basado en un *loop* de retroalimentación transcripcional-traducciona (TTFL), donde ciertos factores de transcripción inducen la expresión de genes reloj y las proteínas codificadas por estos genes luego actúan como represores, regulando negativamente su propia transcripción, creando de esta manera patrones de oscilación de expresión génica con un período cercano a 24 h (Harmer, et al. 2001). También se describió previamente que las oscilaciones circadianas están basadas en activadores transcripcionales llamados CLOCK/CYCLE en insectos y CLOCK/BMAL o NPAS2/BMAL en mamíferos. Estos factores de transcripción heterodiméricos pertenecen a una familia de proteínas denominada *bHLH/PAS* (del inglés *basic-helix-loop-helix*), las cuales tienen la propiedad de unirse, como homo o heterodímeros, a secuencias consenso de ADN conocidas como *E-box*, del tipo CANNTG. Estos elementos presentes en los promotores de diversos genes controlados por el reloj actúan en *cis* para modular la fase y la amplitud de los ritmos encontrados a nivel de ARNm en todos los organismos modelo.

En el reloj de mamíferos, se han descrito al menos tres tipos de elementos regulatorios transcripcionales: el elemento *E-box* CACTGT donde se une CLOCK/BMAL-1 al inicio del día; el elemento *D-box* TTATG[T/C]AA donde se unen DBP/E4BP4 durante la mitad del día y el elemento nocturno RRE [A/T]A[A/T]NT[A/G]GGTCA con el que interaccionan RevErBA/ROR durante la noche (Kumaki, et al. 2008).

En *Drosophila melanogaster* también existen diversos elementos regulatorios, de los cuales el más conocido y estudiado es un región de 69 pb río arriba del sitio de inicio de transcripción (TSS) del gen *per*, que dirige su expresión rítmica. Este *enhancer* está compuesto por dos *E-box* canónicos, pero las secuencias que flanquean a los mismos en la región 3' también contribuyen con la amplitud y la expresión tejido específica. El segundo elemento más estudiado es el que se encuentra en la región promotora del gen *timeless*

(*tim*), el cual posee dos elementos muy cercanos, un *E-box* canónico y un *TER-box*, que consiste en una variante de la secuencia consenso del *E-box* canónico (Paquet, et al. 2008).

Recientemente se descubrió que una región corta que contiene una repetición en tándem de dos elementos *E-box* (E1-E2), un *E-box* canónico o no canónico, seguido de otro elemento tipo *E-box*, separados por una región corta de 6/7 pares de bases, está conservada en muchos organismos, y parece ser la mínima secuencia requerida para la generación de una oscilación transcripcional autónoma de genes reloj y de genes controlados por el reloj, en insectos y mamíferos (Nakahata, et al. 2008; Paquet, et al. 2008) (Figura 4.1).

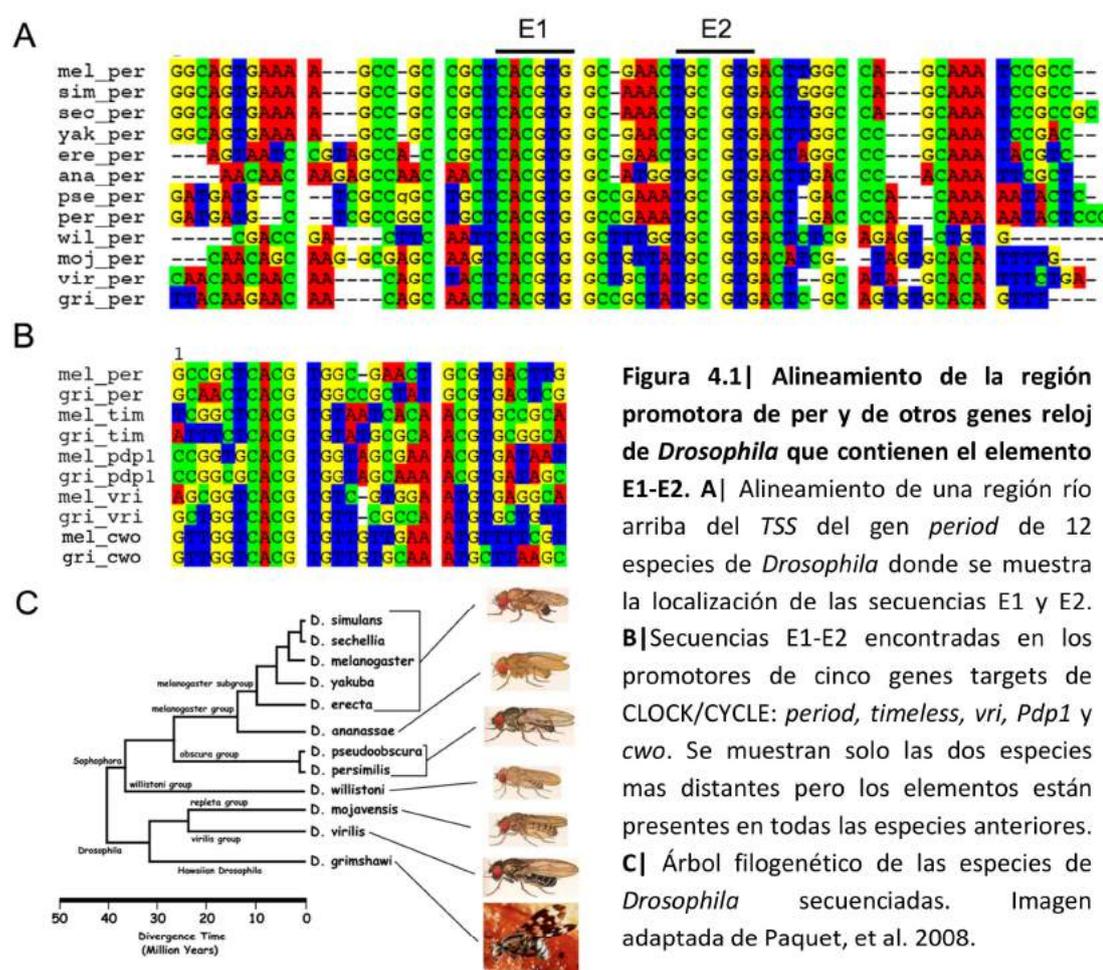


Figura 4.1| Alineamiento de la región promotora de *per* y de otros genes reloj de *Drosophila* que contienen el elemento E1-E2. **A|** Alineamiento de una región río arriba del TSS del gen *period* de 12 especies de *Drosophila* donde se muestra la localización de las secuencias E1 y E2. **B|** Secuencias E1-E2 encontradas en los promotores de cinco genes targets de CLOCK/CYCLE: *period*, *timeless*, *vri*, *Pdp1* y *cwo*. Se muestran solo las dos especies mas distantes pero los elementos están presentes en todas las especies anteriores. **C|** Árbol filogenético de las especies de *Drosophila* secuenciadas. Imagen adaptada de Paquet, et al. 2008.

Regulaciones postraduccionales del reloj: el rol de la caseína quinasa 1

Como se describió durante la introducción general, cuando el dímero CLOCK/BMAL1 activa la transcripción de PER y CRY en el núcleo de las neuronas reloj de mamíferos, estas

proteínas comienzan a translocarse y a acumularse en el citoplasma durante la noche. Cuando alcanzan ciertos niveles, forman heterodímeros PER/CRY, los cuales translocan de nuevo al núcleo e inhiben al heterodímero CLOCK/BMAL1, para reprimir su propia transcripción. Para que el ciclo comience de nuevo, es necesario que PER y CRY dejen de acumularse en el citoplasma y sean clarificadas del núcleo. Una serie de modificaciones postraduccionales entran entonces en juego para regular finamente estos procesos, mediante la modulación de las interacciones proteína-proteína, la entrada al núcleo, la exportación y la degradación (Harmer, et al. 2001).

En mamíferos, dos caseína quinasa 1 (CK1 ϵ y CK1 δ) pueden formar complejos e interactuar con PER y CRY (Lee, et al. 2001) generando la fosforilación y posterior degradación de PER mediada por proteasoma y por otro lado translocación nuclear. En el hámster dorado, una mutación por ganancia de función en el gen de la caseína quinasa 1 ϵ (conocido como CK1 ϵ^{tau}), resulta en una hiperfosforilación y subsecuente desestabilización de PER, con un acortamiento significativo del período de actividad locomotora de 24 a 20 h (Lowrey, et al. 2000; Meng, et al. 2008). Recientemente, se ha descrito que fenotípicamente estos mutantes muestran además un tamaño corporal reducido, que parece ser un efecto pleiotrópico del alelo *tau* (un alelo del gen de la caseína quinasa 1 ϵ), más que una consecuencia del acortamiento del período (Refinetti 2014).

Por otro lado, ratones homocigotas para una delección del exón 2 del gen de CK1 δ mueren en el período perinatal, pero su disrupción específica en el hígado muestra niveles mas elevados de PER y PER-CRY-CLOCK en el núcleo, durante el día (Etchegaray, et al. 2009). Adicionalmente, ritmos de luminiscencia de PER2::LUC de estas células del hígado, tienen un período dos horas mas largo que en ratones *wild-type*, y cultivos de fibroblastos de embriones deficientes para CK1 δ también recapitulan este fenotipo. Más recientemente se ha descrito que los ritmos de luminiscencia de PER2::LUC de núcleos supraquiasmáticos de ratones neonatos deficientes para CK1 δ , también muestran períodos mas largos con respecto a ratones *wild-type* (Etchegaray, et al. 2010), pero este efecto no se observa en NSQ de ratones deficientes para CK1 ϵ . En el mismo sentido, ratones mutantes homocigotas CK1 $\epsilon^{-/-}$ no presentan efectos significativos de cambio de período en la actividad de locomotora bajo *free running* (Etchegaray, et al. 2009).

Muchos compuestos farmacológicos que alargan el período de los ritmos también están asociados con la inhibición de la fosforilación de PER mediada por CK1 ϵ y CK1 δ

(Isojima, et al. 2009). Por ejemplo, la inhibición farmacológica de CK1 ϵ y CK1 δ mediante PF-4800567 y PF-670462, respectivamente, en fibroblastos con PER2::LUC de los NSQ de ratones, muestra también que solo CK1 δ está involucrado en la regulación del período en estos roedores (Meng, et al. 2010). Particularmente, el tratamiento con PF-670462 alarga significativamente el período de los ritmos de luminiscencia *in vitro* y de actividad locomotora *in vivo*, de manera dependiente de la concentración. Este efecto es además dependiente de la fase de administración de la droga, por una extensión selectiva de la duración del *feedback* transcripcional mediado por PER2 (Meng, et al. 2010).

En *Drosophila*, la vida media del heterodímero PER/TIM (análogo a PER/CRY) está regulada por la quinasa DOUBLETIME (homólogo de CK1 ϵ), que reduce la estabilidad monomérica de PER mediante fosforilación y posterior degradación (Price, et al. 1998). Moscas con el gen *dbt* no funcional acumulan PER hiperfosforilado y muestran períodos cortos (*dbt^S*) o largos (*dbt^L*) de actividad locomotora y cada una de estas mutaciones también muestran alteraciones de período correspondientes en las oscilaciones moleculares de *per* y *tim*. Una tercer mutación, denominada mutación inducida por el elemento P (*dbt^P*) está asociada con letalidad pupal y bloquea ritmos de moleculares de *per* y *tim* en las células del reloj central del cerebro de las larvas (Kloss, et al. 1998; Price, et al. 1998).

El rol de la caseína quinasa 1 está muy conservado también en otros organismos modelo. En el hongo *Neurospora crassa*, la interacción rítmica de CK1 con FRQ (*frequency*), uno de los componentes del reloj central, lleva a hiperfosforilación y degradación de ésta proteína (Querfurth, et al. 2011). Además, en el alga *Ostreococcus tauri*, CK1 también está involucrada en la determinación del período de las oscilaciones de CCA1::LUC (un gen reloj del linaje verde). En este caso, tanto la sobreexpresión de CK1 como su inhibición dependiente de fase, mediante PF-670462, provocan un alargamiento del período, indicando que la enzima estaría involucrada en regulaciones complejas en el reloj de este organismo (van Ooijen, et al. 2013).

Ritmos circadianos y metabolismo: la existencia de relojes metabólicos

Como se describió en la introducción general, aunque el TTFL representa un modelo muy conservado del oscilador circadiano, durante los últimos años se han descrito mecanismos postranscripcionales asociados con osciladores metabólicos que funcionan

como un mecanismo adicional de sensado del tiempo y que pueden ser, bajo algunas circunstancias, independientes de la transcripción. En este sentido se ha demostrado la existencia de relojes basados solamente en la actividad cíclica de algunas proteínas, como el caso de los genes *KaiA*, *KaiB* y *KaiC* de *Synechococcus elongatus* que se describió en la instrucción general, que junto con ATP conforman un ciclo de 24 h autosostenido solo mediante la alternancia de estados de fosforilación y desfosforilación de las proteínas codificadas por estos genes. Este ciclo está acoplado al TTFL en la bacteria y dirige río abajo la transcripción génica, pero bajo ciertas circunstancias puede funcionar también en ausencia total de transcripción (Kitayama, et al. 2008). Además, es el ciclo de síntesis y degradación de ATP lo que regula la oscilación, sugiriendo que el reloj podría estar acoplado a la actividad metabólica (Rust, et al. 2011). Una interdependencia de osciladores circadianos y metabólicos también ha sido sugerida mediante experimentos que muestran que la actividad de factores de transcripción del reloj es sensible al estado redox (Rutter, et al. 2001). Adicionalmente, se ha asociado también la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) a fluctuaciones periódicas en ciclos metabólicos. Por ejemplo, la peroxirredoxina, una proteína sensible al estado redox de la que también se habló durante la introducción, posee un grupo tiol dentro de su sitio activo que está involucrado en la transferencia de electrones desde ROS y muestra una oscilación de 24 h en glóbulos rojos, en ausencia total de transcripción (O'Neill y Reddy 2011) o cuando la transcripción es arrestada en el alga *Ostreococcus tauri* (O'Neill, et al. 2011). Ahora, se sabe que las peroxirredoxinas son capaces de exhibir estas oscilaciones autosostenidas en el estado redox en muchas especies desde procariotas hasta eucariotas, sugiriendo que es uno de los osciladores circadianos más conservados (Edgar, et al. 2012). Durante los últimos años, el interés por determinar si las peroxirredoxinas son ellas mismas un reloj funcional o representan el resabio de un oscilador primario metabólico ancestral ha despertado el interés de muchos científicos. Dado que los eucariotas divergieron de bacterias hace unos 1500 millones de años atrás, una especulación interesante es que la oxigenación de la atmósfera confirió una ventaja adaptativa a organismos que poseían un reloj basado en estado redox. Si esto fuera cierto, entonces organismos que todavía siguen viviendo en condiciones anaeróbicas, deberían haber tenido menos presión evolutiva para eliminar ROS y quizás sean los eslabones perdidos de una vida basada solo en un reloj metabólico. En mamíferos, las oscilaciones en las peroxirredoxinas se han propuesto como un mecanismo

de anticipación de la generación de ROS (Bass 2012). En este sentido, conocer más sobre el origen de relojes internos será central para nuestra futura comprensión de la conexión entre los sistemas circadianos y metabólicos, para entender si la aparición de los relojes circadianos estuvo inicialmente ligada al escape de la luz solar, evitando la generación de metabolitos tóxicos durante la respiración, o bien para eliminar los ciclos metabólicos ineficientes que rigen a ambos procesos.

Regulación circadiana del metabolismo

Las evidencias más fuertes acerca de que el período del reloj está genéticamente programado y está muy relacionado con las variables metabólicas provienen de experimentos realizados mediante el análisis del crecimiento y la reproducción, bajo condiciones en las cuales el reloj interno y el ciclo ambiental de luz son sistemáticamente desalineados (por ejemplo, mutantes de períodos largos o cortos son sometidos a fotoperíodos T largos y cortos). En plantas y bacterias, estos estudios sugieren una ventaja evolutiva de tener un período congruente con variaciones cíclicas terrestres de 24 h, ya que organismos *wild-type* son capaces de adaptarse y de crecer mejor frente a las mismas condiciones ambientales que organismos mutantes del reloj (Dodd, et al. 2005; Lambert, et al. 2016). Este desalineamiento podría generar procesos bioquímicos incompatibles, como por ejemplo, si las fases oxidativas y reductivas del ciclo metabólico están desfasadas. Al respecto, se ha demostrado que en *Saccharomyces cerevisiae* las tasas de mutación y de muerte se incrementan cuando los ciclos metabólicos están desalineados con la replicación del ADN (Chen, et al. 2007). Además, en *D. melanogaster* y en plantas, las células que conforman el reloj circadiano son directamente fotosensibles y en mamíferos, los criptocromos cumplen roles duales, como componentes del mecanismo del reloj y como agentes de reparación del ADN. El acoplamiento de la reparación del ADN con los ciclos circadianos podría contribuir a la regulación del envejecimiento en eucariotas superiores (Bass 2012).

A lo largo de los últimos años, numerosos estudios han reportado que muchos aspectos fisiológicos exhiben ritmicidad diaria, incluyendo la producción de distintos tipos de metabolitos circulantes e intracelulares, la producción y liberación de distintas hormonas metabólicas y el comportamiento de alimentación en diversos animales. Muchos de estos

ritmos son controlados, al menos en parte, por relojes circadianos (Green, et al. 2008). En *D. melanogaster*, por ejemplo, la alimentación está bajo control circadiano y la fase de este ritmo está controlada por relojes periféricos presentes en tejidos metabólicos (Xu, et al. 2008). Osciladores circadianos periféricos que se hallan en tejidos tales como el hígado, el tejido adiposo y el intestino en mamíferos, y que están controlados por el reloj central, también muestran control circadiano de diversas funciones fisiológicas y en la expresión y actividad de distintas hormonas y enzimas involucradas en el metabolismo (Froy 2011). El control fino del reloj sobre el metabolismo en los mamíferos, está claramente ejemplificado por estudios de *microarrays*, que revelaron que una gran proporción de los genes expresados a lo largo del día en diferentes órganos (del 3 al 20 %) tales como el hígado, el músculo esquelético y el tejido adiposo, están bajo regulación circadiana. Entre los genes identificados, muchos tienen roles en procesos de biosíntesis y metabólicos, incluyendo por ejemplo el metabolismo de lípidos y colesterol, la glicólisis y la gluconeogénesis, la fosforilación oxidativa y vías de detoxificación (Green, et al. 2008). Además, muchas enzimas limitantes de vías metabólicas están bajo regulación circadiana, indicando que la influencia del reloj en estos procesos es muy grande (Panda, et al. 2002a). En humanos, la síntesis y/o liberación de muchas hormonas está bajo control del reloj, tales como la insulina, el glucagón, la adiponectina, la leptina y la corticoesterona (Froy 2011).

Muchos otros invertebrados exhiben cambios diurnos en el metabolismo, por ejemplo, la anémona marina *Nematostella vectensis* posee un ritmo endógeno en la respiración bajo condiciones constantes, con un pico de consumo de oxígeno durante el día. (Maas, et al. 2016). El crustáceo antártico *Euphausia superba*, que forma parte del conocido krill, muestra ritmos en varias enzimas central del metabolismo aeróbico (Teschke, et al. 2011). Particularmente, en *C. elegans*, se han descrito diversas variables metabólicas bajo regulación circadiana: un trabajo realizado por nuestro laboratorio mostró que el consumo de bacterias, las contracciones faríngeas, la defecación y el consumo de oxígeno muestran variaciones diarias (Migliori, et al. 2011). Además, diversos estudios también reportaron diferencias en la tolerancia a estrés biótico y abiótico en el nematodo (Kippert, et al. 2002; Simonetta, et al. 2008; Romanowski, et al. 2011). Finalmente, como ya describió antes, también se han reportado oscilaciones en el estado redox de la proteína peroxirredoxina en el nematodo (Olmedo, et al. 2012).

Interacción entre el reloj circadiano y los ciclos metabólicos

Diversos mecanismos de interacción en ambos sentidos entre el sistema circadiano y los ciclos metabólicos les permiten a los organismos no solo anticipar las necesidades fisiológicas frente a cambios en los ciclos ambientales, sino también ajustar la fase de los ciclos internos en respuesta a estos cambios. Recientemente, muchos factores metabólicos centrales han sido cercanamente asociados con el mecanismo molecular central del reloj. Por ejemplo, los ciclos de transcripción generados por el TTFL regulan río abajo procesos metabólicos tales como la gluconeogénesis, la fosforilación oxidativa, el tráfico vesicular y la transcripción y traducción de muchos genes. Estos, a su vez, terminan modulando muchos ciclos metabólicos centrales, tales como los ciclos de producción y de hidrólisis de NADH, cofactor de muchas enzimas metabólicas; ciclos de producción de ROS, como los que intervienen en las oscilaciones de las peroxirredoxina y finalmente, también intervienen en la producción de la molécula energética mas importante para la célula, el ATP (Figura 4.2).

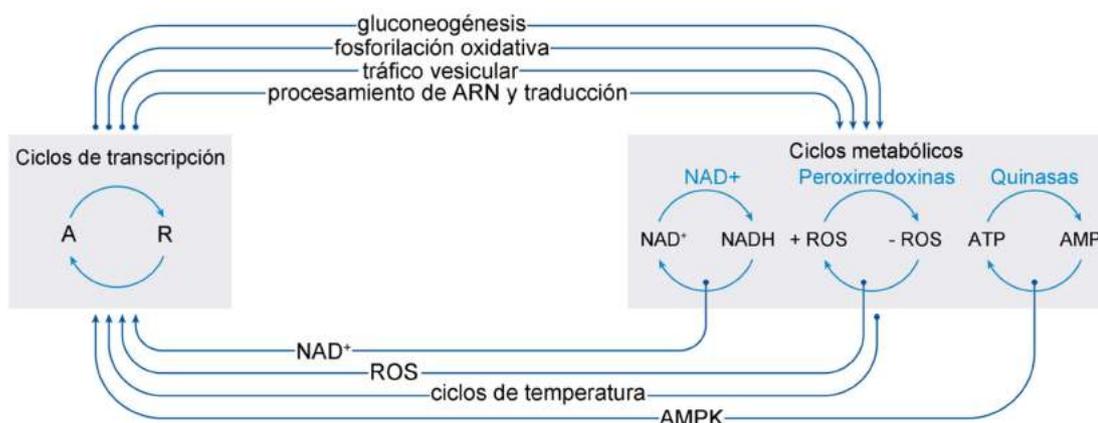


Figura 4.2| Interacción entre el reloj central y los sistemas metabólicos a nivel molecular y fisiológico. Los ciclos de transcripción regulados por activadores y represores en el TTFL controlan procesos fisiológicos y metabólicos celulares fundamentales. Esto puede ocurrir en varios tipos de tejidos y se coordina de manera tejido-específica a través de osciladores periféricos ubicados en distintos órganos. En sentido opuesto, los ciclos metabólicos afectan recíprocamente al reloj: los ciclos de biosíntesis de NAD⁺, el estado redox de las peroxirredoxinas y la alternancia de fosforilaciones y desfosforilaciones de las quinasas y fosfatas generan intermediarios activos que, junto con los ciclos de temperatura, proveen un *feedback* para regular la actividad transcripcional del reloj central. AMPK: proteína quinasa activada por AMP. Adaptada de Bass, 2012.

Muchos subproductos de los ciclos metabólicos también impactan sobre la actividad del reloj central. Un ejemplo de una señal química que acopla la función del reloj interno con el estado nutricional involucra a la quinasa AMP (AMPK), una proteína que se activa después

de un estado intracelular de restricción nutricional, normalmente señalado mediante niveles altos de AMP. La estimulación de este sensor nutricional lleva a la fosforilación y la subsecuente degradación por proteosoma del represor CRY en fibroblastos de ratón, generando ritmos alterados. Además, AMPK también es capaz de fosforilar CKI ϵ , resultado en una actividad incrementada de esta quinasa y la consecuente degradación mayor de PER2, lo cual genera un avance de fase en el patrón de expresión de genes reloj. Finalmente, se ha demostrado que AMPK también aumenta la actividad de SIRT1, incrementando los niveles intracelulares de NAD⁺, lo que resulta en una desacetilación y modulación de la actividad río debajo de *targets* de SIRT1 (Froy 2011; Bass 2012).

Por otro lado, el represor circadiano PER2 se une a muchos receptores nucleares de hormonas, mientras que CRY es capaz de interactuar con el receptor de glucocorticoides y de modular su función. Estos, a su vez, pueden regular la expresión de REV-ERB α , un represor de la transcripción de BMAL1. REV-ERB α es un factor de transcripción pro-adipogénico cuyos niveles se incrementan dramáticamente durante la diferenciación de los adipocitos. Agonistas de REV-ERB α han sido implicados en la protección contra consecuencias metabólicas adversas de dietas hipercalóricas que inducen obesidad en mamíferos (Bass 2012). ROR α , el cual regula la lipogénesis y el almacenamiento de lípidos en el músculo esquelético, es un regulador positivo de la expresión de BMAL1. Ratones deficientes en REV-ERB α y ROR α muestran defectos en la actividad locomotora circadiana y la expresión de genes (Froy 2011).

Finalmente, CLOCK y su homólogo NPAS2, se pueden unir a BMAL1 formando heterodímeros que interactúan con las secuencias *E-box*, pero solo en presencia de formas reducidas de NADH y NADPH. Las formas oxidadas, NAD⁺ y NADP⁺, inhiben la unión de CLOCK/NPAS2:BMAL1 con el ADN. Como el equilibrio redox NADP⁺/NADPH depende del estado metabólico celular, esta relación controla la fase de la expresión de genes circadianos. SIRT1, una histona desacetilasa dependiente de NAD⁺, interactúa con CLOCK y desacetila BMAL1 y PER2, inhibiendo la actividad del heterodímero CLOCK/BMAL1 y por ende la transcripción. PER2 desacetilado es luego fosforilado y degradado. Además, se ha demostrado que el heterodímero CLOCK/BMAL1 activa la expresión circadiana de NAMPT (*nicotinamide phosphoribosyltransferase*), una enzima limitante en la vía de síntesis del NAD⁺. Por lo tanto, SIRT1 inhibe la transcripción de NAMPT y de esa manera regula la síntesis circadiana de su propia coenzima, el NAD⁺ (Froy 2011; Bass 2012). Las oscilaciones en la

expresión de NAMPT resultan entonces en variaciones circadianas en los niveles de NAD^+ y por ende en la actividad de SIRT1. Las sirtuinas dependientes de NAD^+ , tales como SIRT1, han sido involucradas en el silenciamiento transcripcional y la estabilidad del genoma, y son factores claves en la respuesta de longevidad a la restricción calórica y en la modulación del daño oxidativo (Figura 4.3) (Rutter, et al. 2001).

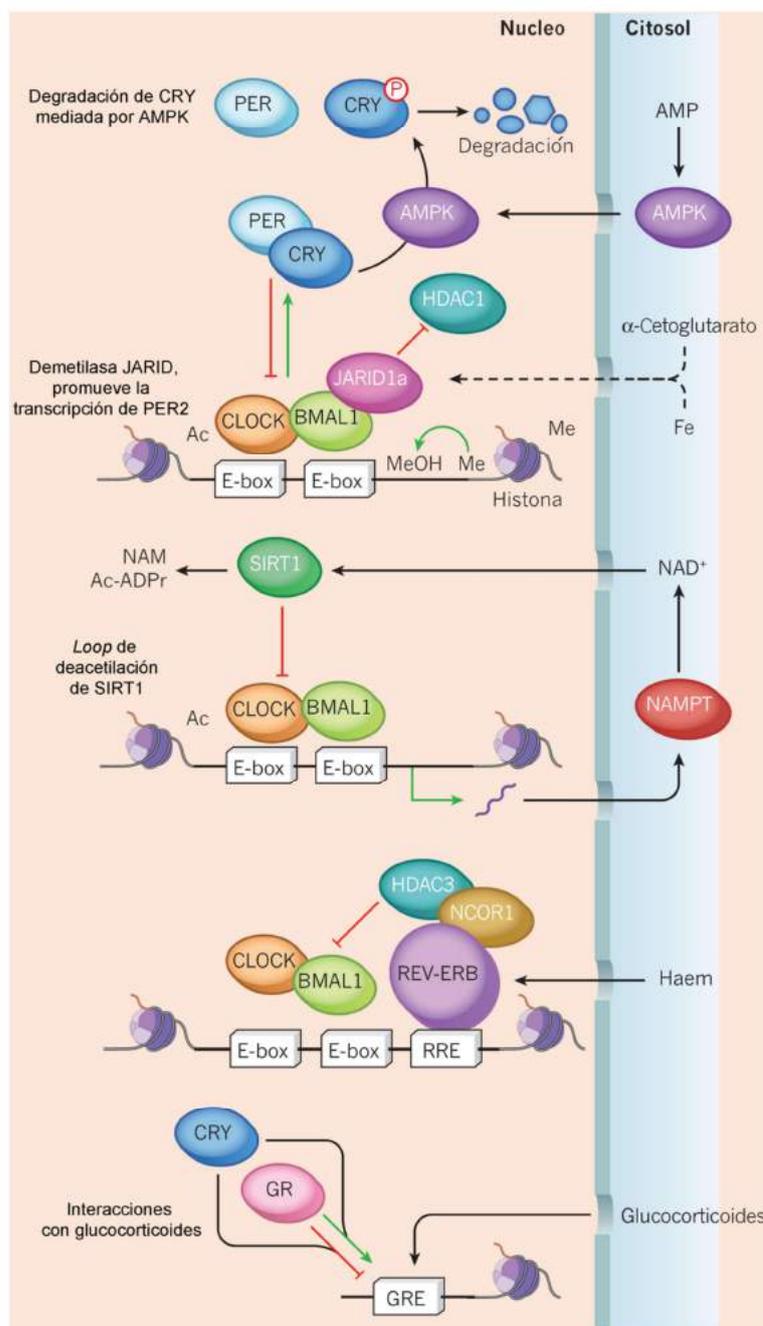


Figura 4.3| Links genómicos y epigenéticos entre los sistemas circadianos y metabólicos. Existen redes altamente dinámicas y de múltiples niveles de factores metabólicos involucrados en la

regulación circadiana del reloj. Por ejemplo, la proteína quinasa activada por AMP (AMPK) media la fosforilación de CRY y de esta manera controla la degradación proteolítica del brazo negativo del *loop* del oscilador central. En una vía dependiente de hierro y α -cetoglutarato, la histona demetilasa JARAD1a, bloquea la actividad de la metilasa HDAC1, y de esta manera activa el brazo positivo del oscilador central conformado por el complejo CLOCK/BMAL1 (el cual regula la transcripción de PER y CRY). La enzima SIRT1 dependiente de NAD^+ , inhibe al complejo CLOCK-BMAL1, el cual regula la transcripción de NAMPT (*nicotinamide phosphoribosyltransferase*) y de esta manera regula la producción de NAD^+ , su coenzima. El complejo represivo REV-ERB-HDAC3-NCOR1 es sensible a los niveles del grupo hemo, un cofactor sensible a gases, posiblemente aumentando su actividad represora y se une directamente a los de promotores de genes controlados por el reloj (RRE). La activación transcripcional y la represión de elementos responsivos a glucocorticoides (GREs) mediada por el receptor de glucocorticoides (GR) son moduladas por glucocorticoides y por CRY. Imagen adaptada de Bass, 2012.

En los capítulos anteriores se demostró que la luminiscencia controlada por *sur-5* muestra una clara oscilación que cumple con todas las propiedades fundamentales de la ritmicidad circadiana. Una cuestión que aún queda por ser develada es conocer a qué responden estos ritmos de luminiscencia. Dado que el objetivo final del trabajo era poder utilizar el reportero para analizar expresión génica *in vivo* de distintos promotores de genes de interés, durante este capítulo se buscará explorar si estos ciclos observados para *sur-5* pueden ser explicados efectivamente por una regulación circadiana de la transcripción del gen. Además, se aplicará el sistema reportero para un objetivo mas ambicioso, estudiar ritmos moleculares a nivel de un único nematodo, y analizar si estos pueden ayudar a revelar nuevos componentes del reloj central.

Materiales y Métodos

Cepas de nematodos

En esta sección del trabajo se utilizaron las líneas con el arreglo extracromosomal *Psur-5::luc::gfp*; pRF4 y la línea integrada espontáneamente a partir de este arreglo extracromosomal. Además, se microinyectaron los constructos *Psur-5 mutado::luc::gfp*; pRF4, a una concentración de 100ng/μl, en la cepa N2 (*wild-type*) y *Psur-5::luc::gfp*; *cc::RFP* (marcador), a una concentración de 50 ng/μl, en la cepa VC398 (*kin-20(ok505)*), ambas del *Caenorhabditis Genetics Center*.

Todos los ensayos de luminiscencia fueron realizados con las cepas portando los arreglos extracromosomales. La línea integrada espontáneamente con *Psur-5::luc::gfp*; pRF4 en el *background* N2 fue utilizada para realizar los ensayos de PCR en tiempo real y para las medidas de ATP endógeno.

Ensayo de luminiscencia

En este caso se realizaron tanto ensayos en placa de Petri bajo OO/CC, como ensayos en placas *multiwell* bajo LO/FC y condiciones constantes. Los protocolos utilizados fueron exactamente iguales a lo descrito en la sección de métodos generales, con las siguientes consideraciones:

Ensayo en placa de Petri bajo OO/CC

Para el caso de los ensayos con un solo nematodo, larvas L4 portando el *Psur-5::luc::gfp* fueron seleccionadas manualmente como se describió previamente pero comenzando a ZT10 y pasadas a 200 μl de buffer M9. Los nematodos se lavaron dos veces con M9 para remover todas las trazas de bacterias y se transfirieron a placas de Petri de 35 mm (Greiner Cellstar, Estados Unidos) que contenían en su interior un pequeño trozo de una placa *multiwell* transparente y de fondo plano de 3 x 3 *wells* para reducir el volumen de medio a utilizar y limitar el movimiento del nematodo en el centro de la placa. Un nematodo por *well* fue colocado con 200 μl del medio de luminiscencia y se añadió agua a los Wells circundantes para evitar la evaporación. El trozo de placa *multiwell* fue sellada con un film

óptico (*Microseal B PCR Plate Sealing Film*, Biorad, Estados Unidos) y se realizaron dos perforaciones pequeñas con una aguja de 25G estéril, para evitar la condensación. A ZT12 (21 h) las placas fueron colocadas en un luminómetro AB-2550 Kronos Dio (ATTO, Japón) y la luminiscencia fue monitoreada en oscuridad constante a 20°C (mínima temperatura que permite el equipo) durante 6 días. La señal emitida por los nematodos fue integrada por 4 minutos y registrada con un intervalo de 37 minutos.

Para el tratamiento con el inhibidor de CK1 δ/ϵ PF-670462 (Abcam, Estados Unidos), 5 μ M o 10 μ M de la droga fue disuelta en agua y añadida al medio de cultivo con cada nematodo individual justo antes de ZT12 y el mismo volumen de vehículo fue utilizado como control. A ZT12 (21 h) las placas fueron colocadas en un luminómetro AB-2550 Kronos Dio (ATTO, Japón) y la luminiscencia fue monitoreada en oscuridad constante a 20°C (mínima temperatura que permite el equipo) durante 6 días. La señal emitida por los nematodos fue integrada por 4 minutos y registrada con un intervalo de 37 minutos.

Ensayo de luminiscencia en placa *multiwell* bajo LO/FC y condiciones constantes

Las condiciones generales de entrenamiento para la mayor parte de los experimentos con ese formato fueron 3,5 días bajo el ciclo de 24 h LO/FC 12 h: 12 h (0/400 lux; 15,5°C/17°C, ZT0, luz *ON* e inicio de la fase fría) y 4 días en condiciones de *free-running* (OO/CC, 17°C). Estas condiciones se utilizaron para los ensayos con N2 con vehículo (agua) y tratamiento con ATP. Para el tratamiento con ATP, 1 mM de ATP (GE Healthcare, Estados Unidos) disuelto en agua y esterilizado por filtración fue añadido a ZT10 justo antes de empezar a registrar luminiscencia. Vehículo (agua) fue utilizado como control.

Ensayos de PCR en tiempo real

Poblaciones sincronizadas de nematodos integrados con el constructo *Psur-5::luc::gfp* fueron crecidas bajo el ciclo de 24 h LO/FC 12 h: 12 h (0/400 lux; 18,5°C/20°C, ZT0, luz *ON* e inicio de la fase fría) por 48 h y luego las larvas L4 de las placas de NGM sembradas, fueron colectadas comenzando a ZT3, lavadas para eliminar restos de bacterias y transferidas a 4 erlenmeyers de 1,5 L con 170 ml de medio de luminiscencia sin luciferina (0,5 gusanos/ μ l). Los nematodos fueron luego entrenados bajo el ciclo LO/FC 12 h: 12 h (0/400 lux; 15,5°C/17°C) en agitación a 110 rpm durante 3 días y luego fueron dejados en condiciones

constantes (oscuridad, 17°C) por dos días mas. Cuatro muestras biológicas independientes (n = 4) de 4000 adultos cada una fueron colectadas cada 4 h, comenzando a ZT3 bajo el ciclo LO/FC durante el último día de entrenamiento y durante *free-running*. Los nematodos fueron centrifugados para descartar el medio y congelados a -80°C en Trizol (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos). El ARN total fue extraído de las muestras mediante el método de Trizol de acuerdo a instrucciones del proveedor. 3 µg de ARN total fueron tratados con DNase I amplification grade (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos) y utilizados para realizar la síntesis de ADNc utilizando la *SuperScript II Reverse Transcriptase* (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos) con *primers* poli-T (20 pb de largo, Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos). La PCR en tiempo real fue realizada con *SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems, Estados Unidos) utilizando un *StepOne Real-Time PCR thermal cycler* (Applied Biosystems, Estados Unidos) siguiendo instrucciones del proveedor. La mix para *StepOne* (19µl) fue agregada a cada uno de los 48 pocillos de una placa de PCR y 1 µl de ADNc fue añadido como molde de la PCR. El programa de PCR fue 10 minutos a 95°C, 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 60 segundos a 60°C (medida única de fluorescencia), seguido de un análisis de curva de *melting* (60-95°C con una tasa de calentamiento de 0,3°C por segundo y medición continua de fluorescencia).

Los resultados fueron normalizados a los niveles de ARNm de tres genes de referencia constitutivos: *cdc-42*, *pmp-3* and *Y45F10D.4* (Hoogewijs, et al. 2008). Los *primers* utilizados para amplificar cada gen fueron:

Blanco	Secuencia Primer Directo	Secuencia Primer Reverso	Descripción
<i>sur-5</i>	CACCCAAGGTTTTGTTAC	TGAAGGTGTCGGATACAACG	supresor de la actividad de <i>let-60</i> Ras
<i>luc::gfp</i>	CTAGCCGGCCATACAAGTAATC	CGGAATACGAATTGGGAGAC	reportero
<i>Y45F10D.4</i>	GTCGCTTCAAATCAGTTCAGC	GTTCTTGTC AAGTATCCGACA	gen de referencia
<i>pmp-3</i>	GTTCCCGTGTTCACTCAT	ACACCGTCGAGAAGCTGTAGA	gen de referencia
<i>cdc-42</i>	CTGCTGGACAGGAAGATTACG	CTCGGACATTCTCGAATGAAG	gen de referencia

Las secuencias completas de los genes blancos fueron extraídas de *WormBase* (Version WS190) y los primers fueron diseñados con el software *Primer 3 Plus* (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) y cotejados para especificidad utilizando NCBI BLAST (Blastn). Para la puesta a punto de cada set de *primers* se construyó una curva estándar de 5 puntos (serie de diluciones seriadas 1/4) para cada gen

y se determinó la concentración de *primers* (0,1; 0,2; 0,3; 0,4 μ M) a la cual la eficiencia era mayor (ésta fue luego utilizada en las reacciones subsiguientes). Todos los oligos fueron sintetizados en Thermo Fisher Scientific (Estados Unidos).

Determinaciones de ATP *in vitro*

Poblaciones sincronizadas de nematodos integrados con el constructo *Psur-5::luc::gfp* fueron crecidas bajo el ciclo de 24 h LO/FC 12 h: 12 h (0/400 lux; 18,5°C/20°C, ZT0, luz *ON* e inicio de la fase fría) por 48 h y luego las larvas L4 de las placas de NGM sembradas, fueron colectadas comenzando a ZT3, lavadas para eliminar restos de bacterias y transferidas a 4 erlenmeyers de 1,5 L con 170 ml de medio de luminiscencia sin luciferina (0,5 gusanos/ μ l). Los nematodos fueron luego entrenados bajo el ciclo LO/FC 12 h: 12 h (0/400 lux; 15,5°C/17°C) en agitación a 110 rpm durante 3 días y luego fueron dejados en condiciones constantes (oscuridad, 17°C) por dos días mas. Cuatro muestras biológicas independientes (n = 4) de 3500 adultos cada una fueron colectadas cada 4 h, comenzando a ZT3 bajo el ciclo LO/FC durante el último día de entrenamiento y durante *free-running*. Los nematodos fueron centrifugados para descartar el medio y congelados en el mismo medio de luminiscencia pero sin D-luciferina. Los nematodos se rompieron luego por sonicación utilizando un equipo VCX 130PB Vibra-Cell ultrasonic processor (Sonics, Estados Unidos) en dos ciclos de 15 seg. A 40% de potencia y luego se centrifugaron a 14000 rpm durante 5 min para descartar restos celulares. Este paso libera todo el ATP endógeno disponible y genera una disrupción total de la actividad de la enzima de luciferasa de los nematodos transgénicos. La cantidad total de ATP fue cuantificada utilizando 30 μ l del extracto total de nematodos incubados con 6.2 μ l de una mix conteniendo: 9 μ g/ml de la enzima luciferasa comercial pura de *Photinus pyralis* (Sigma-Aldrich, Estados Unidos), 0.8 mg/ml de Coenzima A (Sigma-Aldrich, Estados Unidos), 1,6 mM de D-luciferina y 5 % de albúmina sérica bovina (BSA, Sigma-Aldrich, Estados Unidos). La luminiscencia fue medida en una placa de 96 wells blanca, de fondo plano (Greiner, Estados Unidos) con el *Berthold Centro LB 960 microplate luminometer* (Berthold Technologies, Alemania) dentro de una incubadora *E-30B* (Percival, Estados Unidos) a 20°C, con 1 segundo de integración por muestra y durante 3 minutos finales. El *software* Microwin 2000 4.43 (Mikrotek 2 Laborsysteme, Alemania) fue utilizado para adquirir los datos. La cantidad total de ATP fue calculada realizando una curva de

calibración con diferentes estándares de ATP puro y estos valores fueron normalizados a la cantidad total de proteína de cada muestra, que fue determinada mediante el método de Bradford. Finalmente, los datos fueron normalizados a la muestra con la relación de concentración de ATP/proteína mas alta.

Ensayo de toxicidad de PF-670462 por actividad locomotora

Para la realización de los experimentos de registro de actividad locomotora, poblaciones de gusanos N2 (*wild-type*) se crecieron bajo las mismas condiciones de entrenamiento antes mencionadas y se sincronizaron al mismo estadio de desarrollo utilizando el método de cloro antes descrito. Posteriormente, los embriones se resuspendieron en 3,5 ml de buffer M9, suplementado con Antibiótico-antimicótico 1X (Thermo Fisher Scientific) y 10 µg/ml de tobramicina (Tobrabiatic, Denver Farma) y se dejaron en agitación durante 24 horas a 50 rpm en un agitador tipo vaivén (Serie 2014, Decalab, Argentina) bajo las mismas condiciones de LO/FC (400 lux; 18.5/20°C, $\Delta = 1.5^{\circ}\text{C} \pm 0.25^{\circ}\text{C}$). A las 10 de la mañana del siguiente día (ZT1) las larvas que eclosionaron de los huevos se transfirieron a nuevas placas de NGM sembradas con *E. coli* HB101 (4000 L1s por placa) y se dejaron crecer hasta el estadio L4 por 48 horas en las mismas condiciones. A las 10 de la mañana (ZT1), se levantaron los nematodos de las placas, se lavaron con buffer M9 para descartar posibles restos de bacterias y poblaciones de 40 nematodos por *well* se transfirieron a placas de 96 *wells* transparente, de fondo plano (Greiner, Estados Unidos) conteniendo el medio de cultivo desarrollado para luminiscencia pero suplementado con leche descremada al 2 %. Las placas fueron cubiertas con cinta adhesiva para evitar la evaporación del medio y se realizaron dos orificios pequeños con aguja estéril de 25G para evitar la condensación.

El registro de la actividad locomotora de los nematodos se llevó a cabo mediante un sistema original desarrollado en nuestro laboratorio (Simonetta y Golombek 2007) con un equipo basado en haces infrarrojos WMicrotrackert (Phylum Technologies, Argentina), a 18°C y en oscuridad constante. Los datos del sistema de registro fueron adquiridos a intervalos de 1 minuto y agrupados de a 5 minutos para su procesamiento. Las condiciones fóticas y térmicas fueron controladas con una incubadora I-291PF (INGELAB, Argentina) y la temperatura fue monitoreada utilizando Termocrones *iButton DS1921H-F5* (Maxim

Integrated, Estados Unidos). Tubos fluorescentes *4xPhilips Daylight TL-D 18W/54-765 1SL* fueron utilizados como fuente de iluminación (CT = 6200K y CRI = 72 Ra8).

Análisis de Datos

Los datos fueron analizados como se describió en la sección de métodos generales, con las siguientes consideraciones:

Lo datos de PCR en tiempo en tiempo real fueron normalizados a los tres genes de referencia *cdc-42*, *pmp-3* and *Y45F10D.4* y analizados por el método de la curva estándar y finalmente normalizados a la muestra con el nivel máximo de expresión. Para determinar la significancia estadística, se realizó un ANOVA de una vía seguido de un *test* de Tukey de comparación múltiple para LO/FC y otro para OO/CC.

Para el tratamiento con ATP, un *test* de *Student* (*Student's t-test*) fue realizado para comparar las amplitudes de los ritmos con y sin ATP. Un análisis de correlación cruzada (*cross-correlation test*) fue realizado para evaluar las diferencias de acrofases entre las señales promedio obtenidas por luminiscencia, niveles de ARN mensajero y los niveles de ATP endógeno.

Para el caso del ensayo con el inhibidor PF-670462, se utilizó un ANOVA de una vía para analizar diferencias estadísticamente significativas entre el vehículo y el tratamiento con la droga.

Los datos crudos del sistema de registro de actividad locomotora fueron adquiridos a intervalos de 1 minuto y agrupados de a 5 minutos para los gráficos de actividad y el cálculo de la actividad total promedio \pm SEM. El ensayo de toxicidad fue analizado por ANOVA de una vía, seguido por un *test* de Dunnet de comparación de grupos.

En todos los caso un valor de $P < 0,05$ fue considerado como el mínimo para ser estadísticamente diferente. Los valores de significancia se denotaron como sigue: *** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,05$.

Análisis bioinformático del promotor de *sur-5*

La región promotora de 1052 pb de *sur-5* utilizada para los constructos fue analizada para la búsqueda de elementos regulatorios circadianos con las siguientes sintaxis IUPAC: E-box (CACGTG), D-box (TTATGYAA); RRE (WAWNTRGGTCA) y E1-E2 Box (CACGTG[7-

12nts]CAAGTG) (Kumaki, et al. 2008; Nakahata, et al. 2008; Ukai-Tadenuma, et al. 2008). El análisis de los elementos regulatorios fue realizado mediante jPREdictor v1.23 (Fiedler y Rehmsmeier 2006) utilizando los parámetros *default* y solo 1 diferencia fue permitida.

Alineamientos de proteínas y búsqueda de dominios conservados

La búsqueda de secuencias homólogas para los genes de caseína quinasas 1 $1\epsilon/\delta$ y de *period*, se realizó en un trabajo ya publicado por el laboratorio mediante la construcción de Modelos Ocultos de Markov (HMM) a partir de secuencias proteicas de los genes reloj de *Drosophila melanogaster*, *Mus musculus*, *Synechococcus elongatus*, *Neurospora crassa* y *Arabidopsis thaliana*. Las secuencias de nematodos fueron obtenidas de la base de datos Wormbase WS230 (<http://www.wormbase.org>).

El análisis de la homología mostrada por estas proteínas en *C. elegans*, se realizó utilizando la herramienta BlastP de NCBI, con las secuencias proteicas de CK1 ϵ/δ de mamíferos y *doubletime* de *Drosophila melanogaster*. En este caso, se buscaron las proteínas de mayor homología a Kin-20b, utilizando los organismos modelo *Drosophila melanogaster* (taxid:7227), *Mus musculus* (taxid:10090) y *Mesocricetus auratus* (taxid:10036), con un máximo de 10 secuencias target para acotar la búsqueda y un *expect threshold* de 0,1. Mediante este análisis se determinó el porcentaje de identidad y el *E-value* de homología entre las secuencias, el cual es mas significativo cuanto mas bajo es el valor obtenido, es decir, mas cercano a 0. Luego, se utilizó la herramienta online Clustal-Omega para alinear las secuencias encontradas (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Finalmente, se realizó un análisis de sitios activos y dominios de unión conservados entre KIN-20b y estas proteínas mediante UniProt (UniProtKB Identifier Q9MJK2, <http://www.uniprot.org/uniprot/Q9JMK2>).

El análisis de las isoformas LIN-42B y LIN-42C homólogas a *period* en *C. elegans* previamente publicadas (Romanowski, et al. 2014), fue realizado mediante un alineamiento con las proteínas correspondientes de *Drosophila melanogaster* (taxid:7227) y *Mus musculus* (taxid:10090) obtenidas de Genbank, utilizando Clustal-Omega. La conservación de los sitios de fosforilación de CK1 ϵ/δ de *period* en LIN-42B y C, fueron analizados a partir de información disponible en bibliografía (Fu 2008).

Resultados

Regulación circadiana transcripcional del gen *sur-5*

Para estudiar la transcripción de *sur-5*, se aprovechó la cepa integrada espontáneamente con el constructo *Psur-5::luc::gfp* y se realizaron análisis cuantitativos de expresión por PCR en tiempo real en un experimento de toma de muestras cada 4 horas bajo LO/FC (400-0 lux/15,5-17°C) y condiciones constantes (oscuridad y 17°C) (Figura 4.4). Los resultados mostraron una expresión rítmica significativa del gen *sur-5*, bajo condiciones cíclicas, con un máximo cercano a ZT15. Estos ritmos son mantenidos aún en ausencia de señales ambientales, indicando una regulación transcripcional circadiana del gen. Asimismo, la transcripción del reportero *luc::gfp* también demostró ser rítmica y con un avance de fase de 4 horas respecto del patrón de expresión del gen *sur-5 wild-type*. La expresión circadiana del reportero fue muy consistente con el patrón de oscilación de la luminiscencia, mostrando un avance de fase con respecto a ésta, lo cual era de esperarse si se tiene en cuenta el tiempo necesario para la traducción de la proteína luciferasa a partir del transcripto. Estos resultados, donde se observa una correlación directa entre los niveles transcripcionales del reportero y la luminiscencia *in vivo*, como así también con los niveles de ARN mensajero de *sur-5*, sugieren fuertemente que la regulación transcripcional circadiana de *sur-5* es la base de las oscilaciones de luminiscencia observadas. La diferencia de acrofases encontradas entre el gen *sur-5* y el reportero *luc::gfp* podrían reflejar diferencias regulatorias por las regiones promotoras y 3' UTR de ambos genes. Es importante remarcar que solo se utilizaron 1052 pb conteniendo la región promotora mínima del gen *sur-5* y un 3' UTR clásico de otro gen, *let-858*.

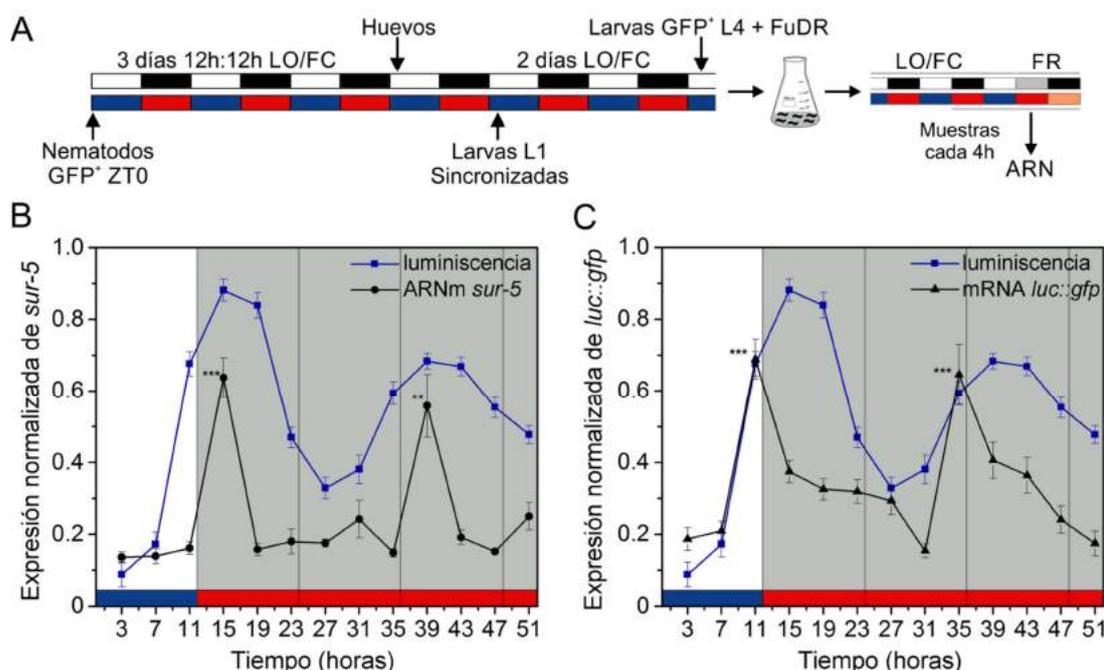


Figura 4.4| Regulación transcripcional del gen *sur-5* y del reportero *luc::gfp* bajo LO/CF y condiciones constantes. A| Representación esquemática de las condiciones foto y termo-periódicas utilizadas y del experimento. Las barras blancas/negras indican luz/oscuridad; las barras azules/rojas indican temperatura baja/alta; las barras gris y anaranjadas indican noche subjetiva y temperatura alta subjetiva, respectivamente. Los nematodos fueron entrenados bajo el ciclo combinado 12 h:12 h LO/FC (400/0 lux, 18.5/20°C, ZT0, encendido de la luz y comienzo de la fase fría de temperatura) sobre placas de NGM sembradas con *E. coli*. Al día 6, nematodos transgénicos que expresaban *gfp* fueron transferidos a erlenmeyers con el medio líquido de luminiscencia pero sin D-luciferina y se sincronizaron por 3 días mas bajo LO/FC (15,5/17°C) y finalmente fueron liberados en condiciones constantes (oscuridad, 17°C). Se tomaron muestras comenzando a ZT3 durante el tercer día bajo LO/FC y los dos últimos bajo OO/CC para realizar extracción de ARN total y PCR en tiempo real. **B-C|** Patrones de expresión del ARNm del gen *sur-5* *wild-type* (**B**) y del reportero *luc::gfp* (**C**) bajo LO/FC (n = 4; P < 0,001; ***P < 0,001; **P < 0,01 todos versus pico, ANOVA de una vía, seguido por un test de Dunnet de comparación de grupos) y *free running* (n = 4; P < 0,001; ***P < 0,001; **P < 0,01 todos versus pico, ANOVA de una vía, seguido por un test de Dunnet de comparación de grupos). Los niveles de expresión fueron normalizados a la expresión de tres genes de referencia constitutivos: *cdc-42*, *pmp-3* and *Y45F10D.4* (Hoogewijs, et al. 2008) y relativizados al valor de expresión máximo. Los datos se muestran como un promedio ± SEM de 4 muestras biológicas independientes (n). La línea azul representa la actividad del reportero en poblaciones transgénicas de 100 nematodos, obtenida bajo las mismas condiciones con fines comparativos (n = 28).

Regulación circadiana de los niveles de ATP endógenos

Por otro lado, los ciclos de actividad del reportero podrían también reflejar una regulación circadiana de variables metabólicas, que también son consideradas una salida robusta del reloj en varios organismos modelos, tal como se describió en la introducción. La

enzima luciferasa, codificada por el reportero, cataliza la oxidación de la D-luciferina en una reacción que utiliza ATP y oxígeno como sustrato. Éste último es capaz de atravesar la cutícula por difusión, por lo cual no debería ser un factor limitante. El otro sustrato, la D-luciferina, se administra en exceso al inicio de la reacción (1 mM) y su ingreso en el nematodo está asegurado de manera constante por la utilización del Tritón X-100 0,05% como agente permeabilizante. Sin embargo, el ATP para la reacción sí es producido por los nematodos, por lo que podría, en caso de ser limitante, modular la reacción de luminiscencia.

Para descartar que las oscilaciones observadas mediante el reportero reflejaran variaciones en los niveles de ATP endógeno, se analizó si estos estaban bajo regulación circadiana. Para ello, se realizó la determinación del contenido total de ATP relativo a la concentración de proteínas totales, en poblaciones de nematodos, de muestras obtenidas en el experimento anterior bajo LO/FC y FR. Se encontró un ritmo circadiano claro y significativo en los niveles endógenos de ATP, completamente en antifase con respecto al ritmo de bioluminiscencia (Figura 4.5). Este resultado no solamente mostró que la luz generada por los nematodos transgénicos no podía ser explicada directamente por variaciones en el ATP endógeno, sino que además fue indicativo de que la producción de esta molécula tan importante para la energía celular y por ende el metabolismo del nematodo, están fuertemente regulados por el reloj circadiano.

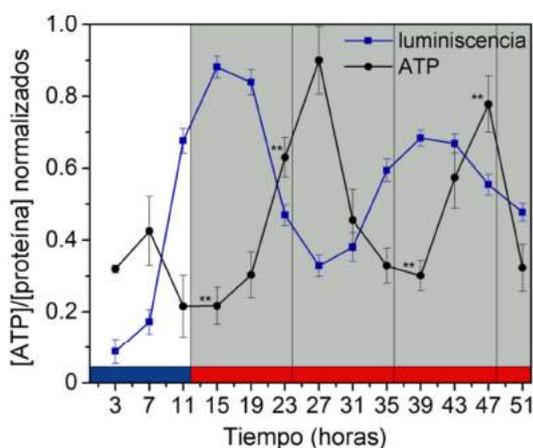


Figura 4.5| Variación del ATP endógeno total en poblaciones de nematodos bajo LO/CF y condiciones constantes. Las muestras fueron tomadas a partir del mismo experimento anterior, comenzando a ZT3 durante el tercer día bajo LO/FC y los dos últimos bajo OO/CC. Los nematodos fueron sonicados y posteriormente se determinó la concentración de ATP relativa a la concentración de proteína total. Los datos se muestran como un promedio (relativo al máximo valor) \pm SEM de 4 muestras biológicas independientes bajo LO/FC ($n = 4$, $***P < 0,01$ ZT15 vs ZT23, ANOVA de una vía,

seguido por un *test* de Dunnet de comparación de grupos) y *free running* (n = 4; **P < 0,01 ZT39 vs ZT47, ANOVA de una vía, seguido por un *test* de Dunnet de comparación de grupos). La línea azul representa la actividad del reportero en poblaciones transgénicas de 100 nematodos, obtenida bajo las mismas condiciones con fines comparativos (n = 28).

Para confirmar por otro método que la actividad del gen reportero no reflejaba directamente los niveles endógenos de ATP, se repitieron los registros de luminiscencia *in vivo* de poblaciones de nematodos, pero esta vez añadiendo un exceso de ATP exógeno (1 mM) en el medio líquido de registro. El objetivo de este experimento fue administrar niveles altos del sustrato, para asegurar que el mismo no fuera limitante para la reacción y ver si esto modificaba de alguna manera el patrón cíclico de luminiscencia. No se encontraron diferencias en el patrón de expresión rítmico de *sur-5*, pero las oscilaciones en condiciones constantes mostraron una amplitud mayor que las obtenidas en registros de poblaciones sin adición de ATP exógeno (Figura 4.6). Este resultado fue algo inesperado y entonces surgió la posibilidad de que en realidad fuera simplemente una mera casualidad, y que los animales no fueran capaces de incorporar el ATP exógeno.

Se ha reportado previamente que los niveles de ATP endógenos, y por ende la energía disponible, declinan alrededor de un 80% desde el día 0 del estadio adulto hasta el día 12, y esta caída se hace muy brusca a partir del 4to día de adultez, algo que está muy ligado al envejecimiento (Braeckman, et al. 2002; Collins, et al. 2008). Entonces, en línea con esta idea, si el ATP estuviera ingresando en los nematodos a través de la cutícula, y la caída del ATP endógeno pudiera ser detectada por el reportero, debería esperarse que la señal de luminiscencia fuera más alta y más estable a lo largo del tiempo en poblaciones tratadas con ATP exógeno en exceso. De esta manera, mientras que los animales con vehículo presentarían una caída constante del ATP con el envejecimiento, esto sería de alguna manera restaurado por el suplemento de ATP en el medio de cultivo. Para analizar si efectivamente este era el caso, se comparó simplemente la señal cruda de luminiscencia de nematodos con vehículo (agua) o tratados con ATP 1 mM, a lo largo del tiempo, en condiciones constantes (oscuridad, 20°C). Los resultados mostraron exactamente la respuesta esperada, y las poblaciones tratadas con ATP reflejaron una señal significativamente más alta y más estable de luminiscencia a lo largo del tiempo que el grupo control (Figura 4.7). Por lo tanto, la disminución de ATP endógeno reportada en la literatura también está relacionada con la caída rápida de la expresión de *sur-5* y de la señal de luminiscencia en los registros *in vivo*, pero esta molécula no es el factor limitante de la

reacción de luminiscencia, y los ritmos del reportero responden en realidad a variaciones en la transcripción de *sur-5*.

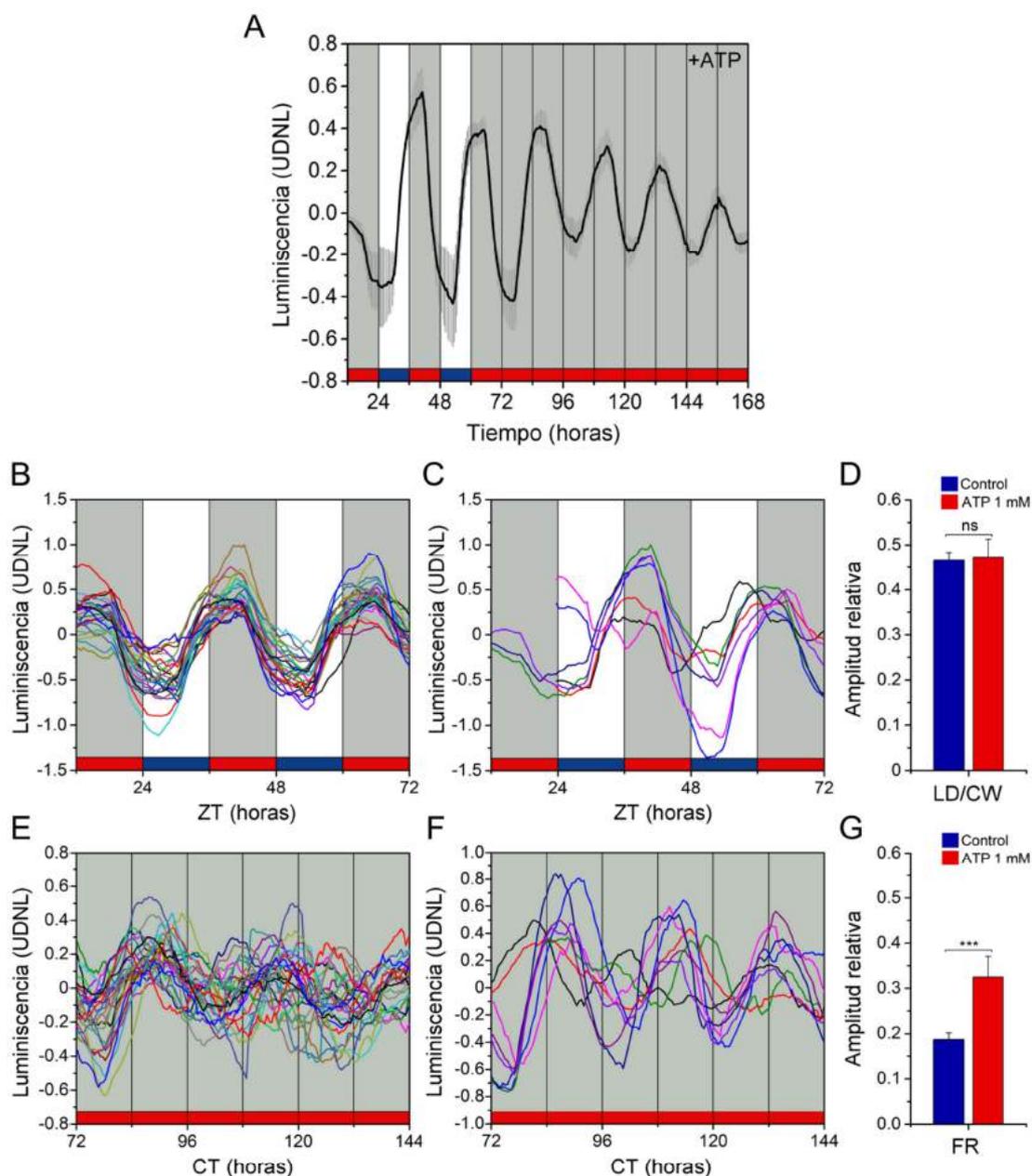


Figura 4.6] Registros de luminiscencia de nematodos transgénicos tratados *in vivo* con ATP 1 mM, bajo LO/CF y condiciones constantes. A] Registro de luminiscencia de poblaciones de nematodos bajo LO/FC y OO/CC, con la adición exógena de ATP 1 mM al inicio del experimento (ZT10; n = 8, promedio \pm SEM). B-C] Registros individuales de luminiscencia de poblaciones de nematodos sincronizados bajo LO/FC, sin (B, n = 26) y con la adición de ATP 1 mM (C, n = 8). D] La adición de ATP 1 mM no cambia el patrón general de la oscilación, ni la amplitud del ritmo bajo condiciones LO/FC (ns, control versus ATP 1 mM, *t*-test). E-F] Registros individuales de luminiscencia de poblaciones de nematodos bajo *free running*, sin (E, n = 26) y con la adición de ATP 1 mM (F, n = 8).

D] La adición de ATP 1 mM genera un aumento significativo de la amplitud del ritmo bajo condiciones constantes, con respecto a la condición control ($***P < 0,001$ control versus ATP 1 mM, *t-test*). UDNL: Unidades normalizadas de luminiscencia sin la tendencia (*detrended*). Cada población de 100 nematodos adultos fue considerada una muestra biológica independiente (n).

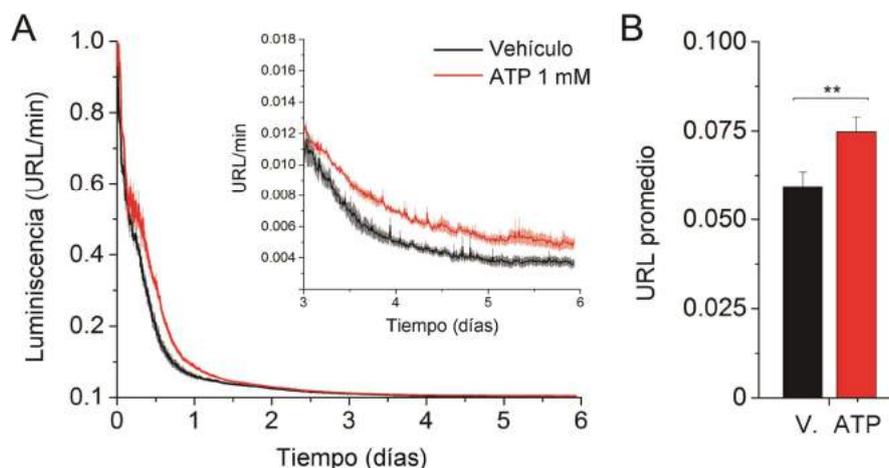


Figura 4.7] Los nematodos son capaces de incorporar ATP exógeno del medio y esto es reflejado por la señal de luminiscencia. A] Registro de luminiscencia crudos de poblaciones de nematodos bajo oscuridad y 20°C, tratadas con vehículo (agua, línea negra) o ATP 1 mM (línea roja) al inicio del experimento (ZT10; n = 4, promedio \pm SEM). El gráfico mas pequeño dentro del principal muestra en detalle la luminiscencia entre los días 3 y 6 del tratamiento. **B]** Niveles de luminiscencia promedio de todo el registro de las poblaciones tratadas con vehículo (agua, barra negra) o ATP 1 mM (barra roja) ($**P < 0,01$ vehículo versus ATP 1 mM, *t-test*). URL: Unidades relativas de luminiscencia. Cada población de 100 nematodos adultos fue considerada una muestra biológica independiente (n).

Mecanismos de regulación transcripcional del gen *sur-5*

A partir de los que conocemos acerca del funcionamiento general del reloj circadiano en otros organismos modelo, para que la expresión de un gen sea regulada de manera circadiana, son necesarios ciertos elementos en *cis* dentro la secuencia promotora o de la región codificante del gen. Entonces, se realizó un análisis bioinformático de la región promotora de *sur-5* clonada en *Psur-5::luc::gfp*, para buscar posibles secuencias conservadas del tipo *E-box*, que podrían ser el sitio de blanco de acción de factores de transcripción. Se encontraron tres elementos *E-box* candidatos en la región del promotora de *sur-5*: un elemento en tándem E1-E2 (-345), con la secuencia CAACTG(7N)CACGTT; un *E-box* canónico (-526), CACGTG; y un *E-box* no-canónico (-742), AACGTG (Figura 4.8A). Resulta interesante notar que uno de estos elementos consiste en una repetición directa de dos elementos símil *E-Box* (E1-E2), conservado en muchos organismos, y que como se describió durante la

introducción, constituye la mínima secuencia requerida para la generación de oscilaciones transcripcionales celulares autónomas en insectos y mamíferos (Nakahata, et al. 2008; Paquet, et al. 2008).

Con el objetivo de analizar si los elementos *E-box* encontrados en el reportero podían estar involucrados en la regulación circadiana transcripcional del gen, se inyectaron nematodos con una versión sintética mutada del promotor. En este caso, se invirtieron las dos bases centrales de cada *E-box* con el fin de tratar de alterar la posible interacción de proteínas reguladoras del tipo *bHLH* que pudieran estar uniéndose río arriba del sitio de inicio de la transcripción (TSS). De esta manera, no se alteró el contenido de GC de la región promotora de interés, ni tampoco la distancia de los elementos *E-box* con el TSS, mantiéndose la estructura y la integridad del promotor *wild-type* (Figura 4.8B). Usualmente, estas modificaciones llevan a cambios sutiles de fase y/o amplitud y pueden afectar los niveles de expresión del reportero, pero no necesariamente generan pérdida total de ritmicidad (Darlington, et al. 2000; Nakahata, et al. 2008; Liu, et al. 2016).

Al analizar los nematodos transgénicos con el constructo *Psur-5mut::luc::gfp*, se encontró que el porcentaje de sincronizados fue similar al mostrado por los nematodos transgénicos con el constructo *Psur-5::luc::gfp* (68 versus 75%) y tampoco se encontraron diferencias significativas en la cantidad de rítmicos bajo condiciones constantes (43 versus 50%) (Figura 4.8C y D). Los picos de luminiscencia fueron detectados a $ZT16,8 \pm 0,2$ h y $CT17,1 \pm 0,7$ h mediante un *test* de *Rayleigh* (versus $ZT15,6 \pm 0,3$ h y $CT16.8 \pm 0,7$ h mostrados por los animales con el promotor *wild-type*), y no se halló diferencia significativa entre ambas medias. El período promedio determinado por LS de las oscilaciones bajo condiciones constantes de oscuridad y 17°C fue de $24,5 \pm 0,7$ h ($n = 40$, versus $25 \pm 0,4$ h mostrado por los animales con el promotor *wild-type*). Estos resultados preliminares muestran que, al menos, estos cambios de bases no son suficientes para alterar de manera significativa los ritmos de luminiscencia de *sur-5* (es decir, la fase, la amplitud o la ritmicidad).

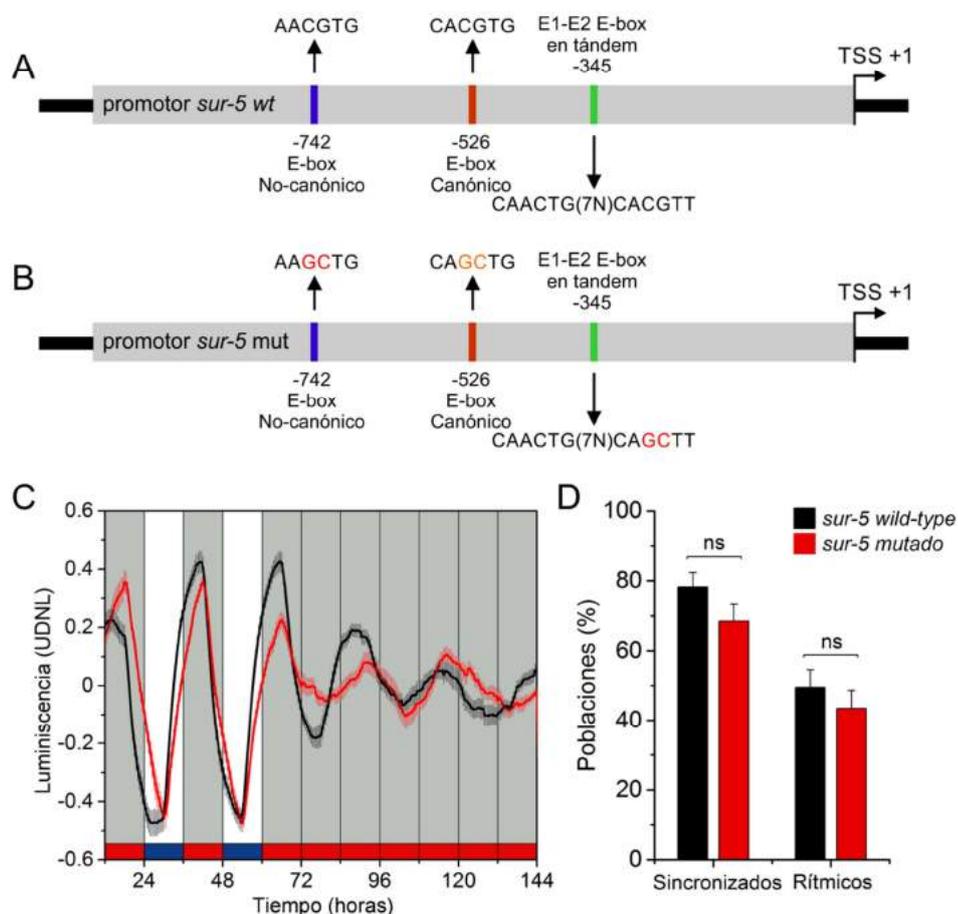


Figura 4.8] Secuencias regulatorias tipo E-box encontradas en la región promotora de *sur-5*. A-B] Representación esquemática mostrando las posiciones, secuencias y tipo de los elementos E-box, encontrados por bioinformática en el promotor *wild-type* clonado en el reportero *Psur-5::luc::gfp* (correspondiente a 1052 pb río arriba del TSS del gen *sur-5*, **A**) y los cambios de bases en el promotor sintético mutado (**B**). **C]** Registros de luminiscencia promedio \pm SEM de poblaciones de nematodos bajo LO/FC y OO/CC con *Psur-5::luc::gfp* (línea negra, n = 28) o *Psur-5mut::luc::gfp* (línea roja, n = 25). **D]** Porcentaje de poblaciones sincronizadas y rítmicas con ambos constructos (*sur-5 wild-type*, n = 77; *sur-5 mutado*, n = 92; *test exacto de Fisher* de dos colas) UDNL: Unidades normalizadas de luminiscencia sin la tendencia (*detrended*). Cada población de 100 nematodos adultos fue considerada una muestra biológica independiente (n).

Ritmos de luminiscencia de nematodos individuales bajo condiciones constantes

Después de ser capaces de registrar ritmos claros y robustos a nivel poblacional y de encontrar que estos respondían a una regulación circadiana de la actividad transcripcional del gen *sur-5*, un objetivo mucho más ambicioso era demostrar que el reportero también podía ser utilizado para realizar ensayos con animales individuales. En este punto, es importante remarcar que los registros individuales presentan grandes dificultades, ya que

los nematodos tienen un tamaño muy pequeño, tienen una tasa de motilidad muy elevada y una señal de luminiscencia mucho más baja que aquella emitida por una población de 100 nematodos, lo cual disminuye en gran medida la relación señal-ruido. Entonces, para poder llevar a cabo estos registros, se utilizó un protocolo de entrenamiento más corto, donde luego del crecimiento bajo el ciclo LO/FC (18,5/20°C), nematodos individuales L4 seleccionados por su alta expresión de *gfp*, fueron colocados en el medio de luminiscencia y registrados en el formato de placa de Petri (20°C y oscuridad) inmediatamente después, por 7 días. Es decir, se eliminaron los días adicionales de entrenamiento que en general recibían las poblaciones luego de ser pasadas al medio de luminiscencia. De esta manera, se sacrificaron días de refuerzo del entrenamiento después del cambio de medio, para aprovechar más los primeros días de registro, que son los más importantes porque presentan mayores niveles de luminiscencia (Comparar figura 4.9A con Figura 2.10A). Además, mientras que en los registros poblacionales se destacaban las primeras 12/24 horas de registro, en este caso se trató de conservar todos los primeros datos donde fuera posible. Por otro lado, se ajustó la adquisición de datos de manera tal que el tiempo de integración en cada *well* fue de 4 minutos, en lugar de 1 minuto utilizado para poblaciones. Esto permite tener mas sensibilidad, pero amplía el intervalo entre medidas a 37 minutos.

Mediante estos cambios, se detectaron ritmos circadianos robustos de luminiscencia por al menos 4 días bajo condiciones constantes en aproximadamente un 40% de los nematodos, con un período promedio de $24,5 \pm 0,2$ h y un pico nocturno cercano al encontrado en registros de poblaciones de nematodos (Figura 4.9B). Algunos nematodos individuales mostraron ritmos de luminiscencia robustos, pero con una fase claramente diurna, lo que reveló que no todos los animales estaban entrenados a las condiciones ambientales (Figura 4.9C). Debido al hecho de que las señales de registros individuales decaen más rápidamente, y a que los nematodos fueron transferidos a condiciones de libre curso inmediatamente luego del cambio de medio, esta falta de refuerzo en el entrenamiento podría explicar en parte la asincronía observada entre los individuos. Este resultado es interesante en sí mismo, porque apoya la noción de la caída de la amplitud en los ritmos poblacionales por un efecto de desincronización individual.

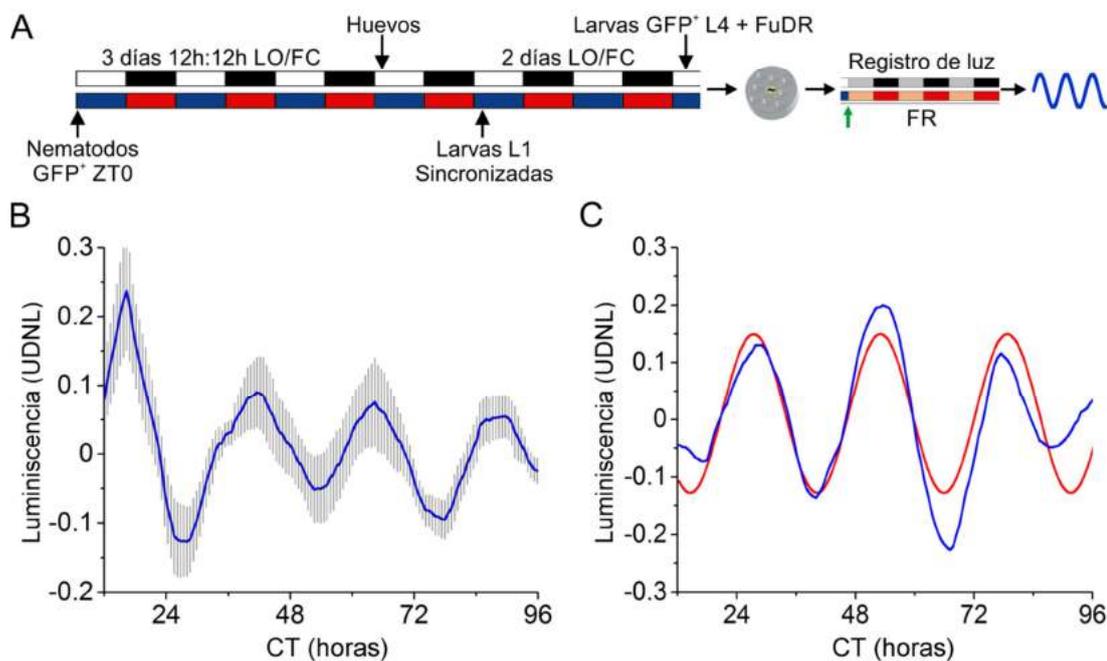


Figura 4.9] Ritmos de luminiscencia de nematodos individuales bajo condiciones constantes. A] Representación esquemática de las condiciones foto y termo-periódicas utilizadas. Las barras blancas/negras indican luz/oscuridad; las barras azules/rojas indican temperatura baja/alta; las barras gris y anaranjadas indican noche subjetiva y temperatura alta subjetiva, respectivamente. Los nematodos fueron entrenados bajo el ciclo combinado 12 h:12 h LO/FC (400/0 lux, 18.5/20°C, ZT0, encendido de la luz y comienzo de la fase fría de temperatura) sobre placas de NGM sembradas con *E. coli* hasta el estadio L4. Al día 6, nematodos transgénicos que expresaban *gfp* fueron transferidos a placas de Petri con el medio líquido de luminiscencia y a ZT12 fueron registrados en el luminómetro en condiciones constantes (oscuridad, 20°C). **B]** Registros de luminiscencia promedio \pm SEM de nematodos individuales bajo OO/CC con *Psur-5::luc::gfp* ($n = 12$). **C]** Registro de luminiscencia de un nematodo representativo con una acrofase diurna. La línea roja representa el mejor ajuste (análisis por Cosinor, $R^2 = 0,72$, período LS 24,4 h; acrofase CT1,8 h). UDNL: Unidades normalizadas de luminiscencia sin la tendencia (*detrended*).

Modulación farmacológica de los ritmos de luminiscencia por el inhibidor PF-670462

Tener la capacidad de registrar ritmos en nematodos individuales es muy ventajoso, ya que se puede analizar cómo responde cada individuo a la acción de compuestos que son capaces de alterar los ritmos circadianos. Este tipo de experimentos farmacológicos son muy difíciles de realizar en ensayos poblacionales, ya que si cada uno de los animales de esas poblaciones no están entrenados a los *Zeitgebers*, las respuestas pueden ser muy variables y se pueden obtener resultados muy ruidosos y difíciles de interpretar.

Como se describió durante la introducción, la caseína quinasa 1 juega un rol muy importante en la modificación a nivel postraducciona de proteínas del reloj central de muchos organismos modelo, tales como mamíferos (Loudon, et al. 2007; Etchegaray, et al. 2009; Isojima, et al. 2009; Lee, et al. 2009), la mosca *Drosophila melanogaster* (Kloss, et al. 1998; Price, et al. 1998), el hongo *Neurospora crassa* (Querfurth, et al. 2007) y el alga picoeucariota *Ostreococcus tauri* (van Ooijen, et al. 2013), aún cuando las proteínas que integran sus TTFL no están conservadas. Surgió entonces la hipótesis de que podría existir un mecanismo similar en *C. elegans*, a través de alguna quinasa que fuera capaz de regular el período de los ritmos circadianos de salida del reloj mediante su acción en el reloj central, aún desconocido. Si este fuera el caso, la modificación de la actividad de dicha quinasa podría tener un impacto indirecto en el período del ritmo de luminiscencia del reportero controlado por *sur-5*.

En un trabajo recientemente publicado por nuestro grupo, y en otros previos, se encontró que *C. elegans* posee una única proteína homóloga a la caseína quinasa $1\epsilon/\delta$ de mamíferos (la isoforma KIN-20b), la cual esté codificada por el gen *kin-20* (Banerjee, et al. 2005; Romanowski, et al. 2014). El análisis por BlastP de esta isoforma contra las proteínas CK1 ϵ de *Mesocricetus auratus* (taxid:10036), CK1 δ de *Mus musculus* (taxid:10090) y DOUBLETIME de *Drosophila melanogaster* (taxid:7227), todas involucradas en la fosforilación de PER y en la regulación del período de distintos *outputs* del reloj, reveló un alto grado de homología con todas estas proteínas. KIN-20b muestra un 79% de identidad (93% de cobertura, E = 0) con la CK1 ϵ de *M. auratus*, un 80% de identidad (93% de cobertura, E = 0) con la CK1 δ de *M. musculus* y un 76% de identidad (93% de cobertura, E = 2×10^{-172}) con DBT de *D. melanogaster*. Asimismo, un análisis de sitios activos y dominios de unión entre KIN-20b y estas proteínas mediante UniProt (UniProtKB Identifier Q9JMK2, <http://www.uniprot.org/uniprot/Q9JMK2>), reveló una conservación completa de todos los sitios funcionales y regulatorios (Figura 4.10).



Figura 4.10| Alineamiento realizado con Clustal-Omega de la isoforma KIN-20b con CK1ε de *M. auratus*, CK1δ de *M. musculus* y DBT de *D. melanogaster*. La región conservada de unión a nucleótidos importantes para la función de quinasa está marcada con un recuadro negro. El sitio conservado de unión K, se muestra con color rosa y recuadro rojo. El sitio activo conservado D, se muestra con color azul y recuadro rojo. Finalmente, el residuo conservado R, de color rosa y recuadrado en azul, corresponde al sitio que al ser mutado genera el acortamiento del período en el ritmo de actividad locomotora del hámster dorado CK1ε^{tau}.

Dado el alto grado de homología y conservación encontrado entre KIN-20b y la CK1 de mamíferos e insectos, se decidió analizar si PF-670642, un potente inhibidor selectivo de CK1ε/δ y un modulador farmacológico clásico del período circadiano en otras especies, era capaz de afectar también a los ritmos de luminiscencia de *sur-5*.

El tratamiento con PF-670462 indujo un alargamiento significativo del período en condiciones de oscuridad y temperatura constante (20°C), de manera dosis-dependiente (control, 24,5 ± 0,2 h; 5 μM PF-670462, 27,5 ± 0,4 h; 10 μM PF-670462, 30,9 h ± 0,5 h; Figura 4.11). Es muy importante remarcar que no se observaron efectos tóxicos con las

concentraciones de PF-670642 utilizadas, determinado mediante un ensayo de toxicidad en actividad locomotora con un dispositivo denominado WMicrotracker, previamente reportado para el estudio de efectos citotóxicos generados por fármacos (Bianchi, et al. 2015) (Figura 4.12).

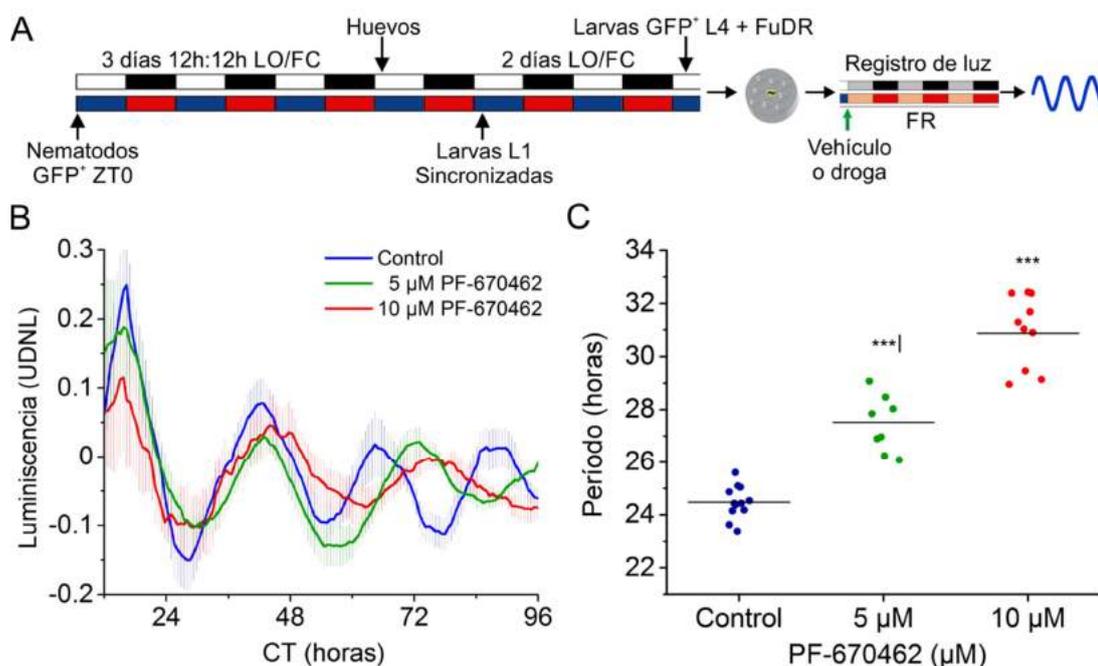


Figura 4.11| Modulación farmacológica por PF-670642 de los ritmos de luminiscencia de nematodos individuales bajo condiciones constantes. A| Representación esquemática de las condiciones foto y termo-periódicas utilizadas. Las barras blancas/negras indican luz/oscuridad; las barras azules/rojas indican temperatura baja/alta; las barras gris y anaranjadas indican noche subjetiva y temperatura alta subjetiva, respectivamente. Los nematodos fueron entrenados bajo el ciclo combinado 12 h:12 h LO/FC (400/0 lux, 18.5/20°C, ZT0, encendido de la luz y comienzo de la fase fría de temperatura) sobre placas de NGM sembradas con *E. coli* hasta el estadio L4. Al día 6, nematodos transgénicos individuales que expresaban *gfp* fueron transferidos a placas de Petri con el medio líquido de luminiscencia y justo antes del inicio del registro (ZT12) se les agregó vehículo (agua) o PF-670642. La luminiscencia se registró bajo condiciones constantes (oscuridad, 20°C). **B|** Registros de luminiscencia promedio \pm SEM de nematodos individuales bajo OO/CC con vehículo (agua, línea azul, n = 12), 5 μ M de PF-670462 (línea verde, n = 8) y 10 μ M de PF-670462 (línea roja, n = 10). **C|** Período promedio determinado por LS de los nematodos con vehículo (puntos azules, 24,5 \pm 0,2 h) o tratados con PF-670462 (5 μ M, puntos verdes, 27,5 \pm 0,4 h y 10 μ M, puntos rojas, 30,9 \pm 0,5 h). PF-670462 alarga significativamente el período circadiano del reportero (***P < 0,001 vs control; ANOVA de una vía, seguido por un test de Dunnet de comparación de grupos).

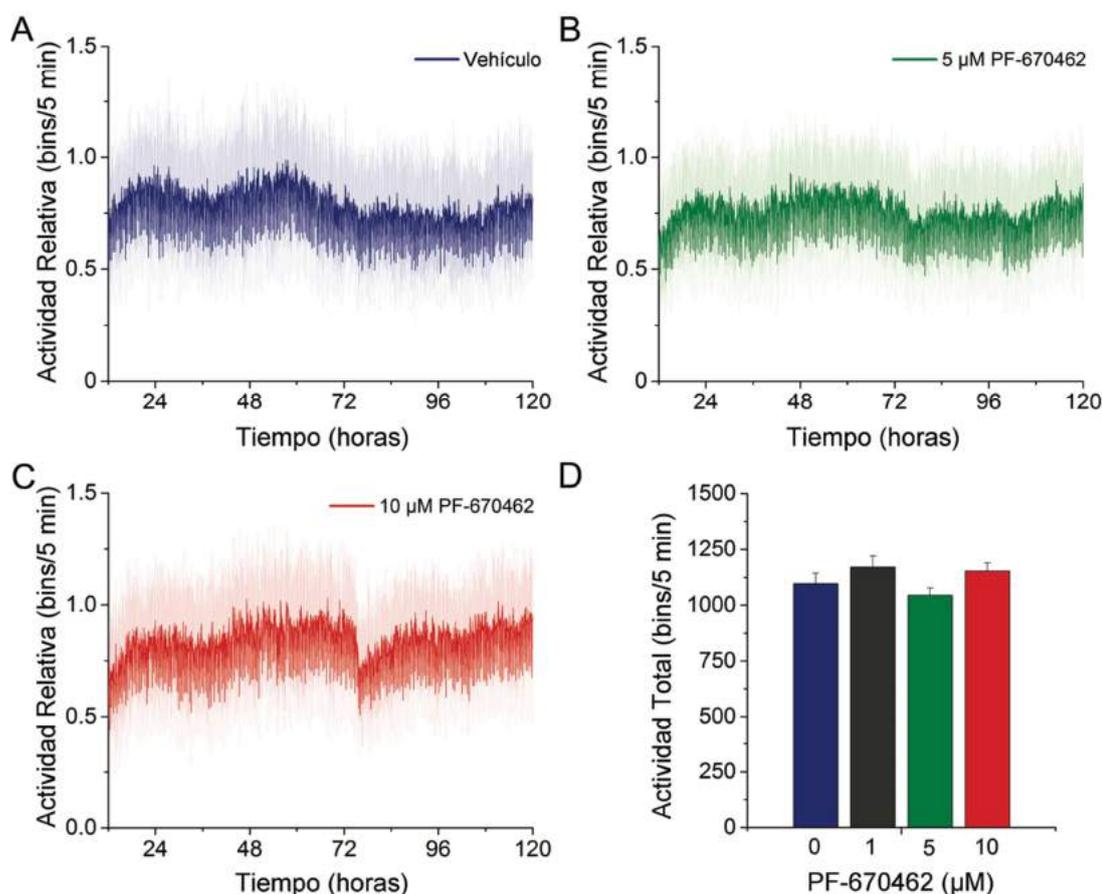


Figura 4.12| Ensayo de toxicidad de PF-670642 por actividad locomotora. A-C| Resultados de un ensayo de toxicidad que consiste en el registro de la movilidad total de poblaciones de nematodos adultos N2 (*wild-type*) a lo largo del tiempo. El mismo fue realizado con un dispositivo denominado WMicrotracker que contiene 4 haces infrarrojos por *well*, que son atravesados por los gusanos cuando estos se mueven en el medio líquido. Los gráficos muestran la actividad relativa promedio \pm SEM, de nematodos tratados con vehículo (A), 5 μ M (B) o 10 μ M (C) de PF-670462 bajo 18°C y oscuridad constante ($n = 24$ poblaciones por tratamiento, 50 nematodos/*well*). El ensayo fue realizado por un período de tiempo equivalente a la duración de un ensayo típico de luminiscencia con nematodos individuales. **D|** No se encontraron diferencias significativas en la actividad total del grupo control (vehículo, agua) y las diferentes concentraciones de PF-670462 (1 μ M, 5 μ M y 10 μ M) (todos vs control, ns, ANOVA de una vía, seguido por un *test* de Dunnet de comparación de grupos).

Ritmos de luminiscencia en nematodos individuales mutantes para *kin-20*

Para intentar caracterizar con mayor profundidad el cambio del período encontrado mediante el tratamiento con el inhibidor de CK1 ϵ/δ , se generaron líneas transgénicas con el constructo *Psur-5::luc::gfp* en un *background* mutante para el gen *kin-20*, disponible en el CGC. El mutante *kin-20(ok-505)* utilizado, generado por el *C. elegans Gene Knockout Consortium*, posee una mutación por sustitución compleja, que consiste en una delección de

2202 pb y una inserción en su lugar de 268 pb, afectando la secuencia codificante para todas las isoformas del gen, lo cual genera una pérdida total de la isoforma KIN-20b de interés (Figura 4.13). Dado que *kin-20* codifica para quinasas que cumplen funciones heterocrónicas esenciales en *C. elegans*, interviniendo en la morfogénesis del cuerpo, el desarrollo embrionario y de los estadios larvales, el crecimiento y la reproducción (Banerjee, et al. 2005), estos mutantes presentan un fenotipo muy característico. En primer lugar, muestran un desarrollo mucho más lento que nematodos *wild-type* y generan menos prole, pero aún cuando tardan más tiempo en crecer, pueden pasar por todos los estadios larvales y alcanzar el estadio adulto reproductivo sin problemas. Además poseen un fenotipo conocido como *dumpy*, caracterizado por una morfología más corta y más engrosada en los distintos estadios larvales.

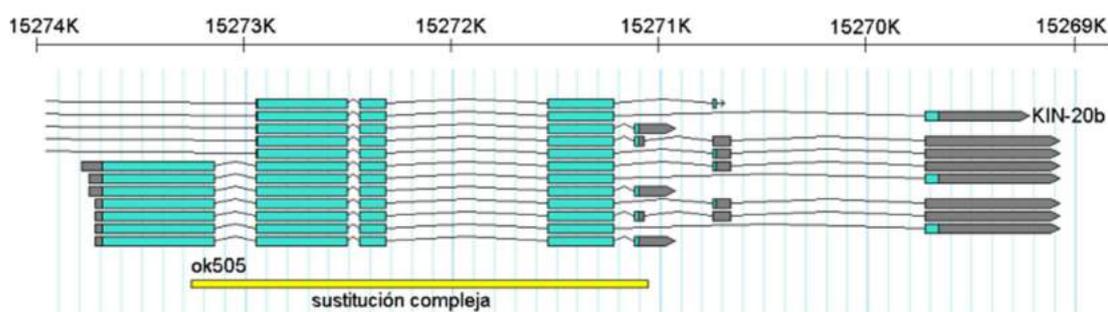


Figura 4.13 | Localización genómica de la isoforma KIN-20b codificada por *kin-20* y de la mutación en el mutante *kin-20(ok505)*. El gen *kin-20* de *C. elegans* codifica para 12 proteínas distintas, de las cuales se indica KIN-20b, la proteína de interés que presenta homología con otras CK1. Los exones se encuentran representados en verde (las líneas entre ellas representan los intrones) y en gris se muestran las secuencias regulatorias del tipo 3 y 5'UTR. Abajo, aparece representada la mutación de *kin-20(ok505)*, que corresponde a una delección de todo el fragmento mostrado en amarillo y el reemplazo por una secuencia heteróloga de 268pb. De esta manera, se pierden completamente los exones 2, 3 y 4 de todas las isoformas y parte del 1 en aquellas que lo contienen y la isoforma KIN-20b está totalmente ausente en este mutante. Imagen adaptada de www.wormbase.org.

Mediante un protocolo de entrenamiento más extendido (de 12 días de duración), fue posible sincronizar poblaciones transgénicas de *kin-20(ok-505)* con *Psur-5::luc::gfp* bajo el ciclo LO/FC de 18,5-20°C, hasta el estadio L4 en placas con comida. Luego, se monitorearon nematodos individuales que mostraron expresión alta del constructo bajo lupa de fluorescencia, desde estadio L4 o joven adulto, por 7 días. Los registros de luminiscencia de estos mutantes no solo mostraron ritmos robustos de luminiscencia bajo condiciones de oscuridad constante y 20°C por varios días, sino que además exhibieron un

período significativamente más largo con respecto a los animales *wild-type*, mayor a las 30 h ($30,8 \pm 0,9$ h) (Figura 4.14). Estos resultados son muy alentadores, y sugieren fuertemente la existencia de un mecanismo conservado de modulación postraduccional del reloj circadiano de *C. elegans*.

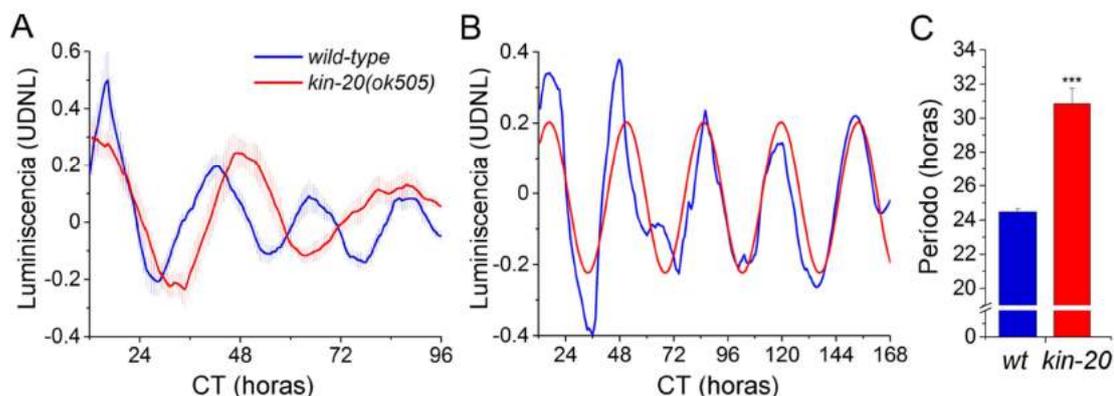


Figura 4.14| Registros de luminiscencia de animales *kin-20(ok-505)* con el reportero bajo condiciones constantes. A| Registros de luminiscencia promedio \pm SEM de nematodos individuales bajo OO/CC (20°C) de la cepa N2 (*wild-type*, $n = 12$) y VC398 (*kin-20(ok-505)*, $n = 12$). **B|** Registro de luminiscencia de una población representativa de *kin-20(ok-505)* de **A**. La línea roja representa el mejor ajuste encontrado (análisis por Cosinor, $R^2 = 0,65$; período LS 32,4 h; acrofase CT18.8 h). **C|** Períodos promedio de luminiscencia de ambas cepas (** $P < 0,001$, *wt* vs *kin-20(ok-505)*, *t*-test).

En otros organismos, las caseínas quinasas $1\epsilon/\delta$ y DBT modulan el período de los genes reloj mediante la fosforilación y posterior degradación de PERIOD (Kloss, et al. 1998; Price, et al. 1998; Meng, et al. 2008; Etchegaray, et al. 2009). En *C. elegans*, el reloj central aún es desconocido y todas las proteínas homólogas a componentes del reloj de otros organismos parecen cumplir solo funciones durante el desarrollo (Qin y Powell-Coffman 2004; Banerjee, et al. 2005; Tennessen, et al. 2006; Monsalve, et al. 2011; Temmerman, et al. 2011). Para que *kin-20* pueda regular el período de los ritmos de luminiscencia revelados por el reportero es necesaria la existencia de un homólogo de PER, que contenga además sitios conservados de fosforilación donde esta quinasa podría estar actuando, de la misma manera que las CK1 modulan la actividad de PERIOD. El mismo trabajo realizado por nuestro laboratorio antes mencionado (Romanowski, et al. 2014), y otros reportes (Jeon, et al. 1999; Tennessen, et al. 2006), sugieren que las proteínas de *C. elegans* que presentan mayor homología con PERIOD de mamíferos y *Drosophila melanogaster*, son las isoformas LIN-42B y C, codificadas por el gen *lin-42*. Mediante el análisis por construcción de modelos ocultos de Markov, se encontró que LIN-42B muestra una homología con un valor $E = 2.1 \times 10^{-7}$

³⁰ con PER de *D. melanogaster*; ambas proteínas poseen dominios PAS y un dominio reconocido como *Period Circadian Protein*, pero difieren bastante en tamaño: dmPER posee 1218 aminoácidos y ceLIN-42B solo 597. En el caso de mamíferos, ceLIN-42B muestra homología con mPER2 y mPER3, con $E = 2.90 \times 10^{-21}$ y $E = 5.50 \times 10^{-20}$, respectivamente. Finalmente, PER1 de mamíferos es homóloga a ceLIN-42c, con un $E = 7,50 \times 10^{-17}$ (Romanowski, et al. 2014).

Además, se ha reportado que en *D. melanogaster*, DOUBLETIME modula la actividad de dmPERIOD a través de dos dominios particulares: el dominio PerS y el dominio PerSD. Por otro lado, la fosforilación en los extremos N o C terminal de la proteína no tiene efecto sobre su actividad (Fu 2008; Kivimae, et al. 2008). En mamíferos, la fosforilación de PER2 S662 lleva a la subsecuente fosforilación del motivo S665/668/671/674, generando un represor más débil y de mayor estabilidad (Fu 2008). Mediante un alineamiento por Clustal-Omega (Sievers, et al. 2011) del servidor web EMBL-EBI, se alinearon y compararon las isoformas LIN-42By c de *C. elegans* con PERIOD de *D. melanogaster* y PERIOD2 de *M. musculus*, para buscar si estos sitios de fosforilación estaban conservados en *C. elegans*. Como se puede observar en los alineamientos, muchas posiciones de aminoácidos que son blancos de fosforilaciones en moscas y mamíferos se encuentran conservados en los posibles PERIOD de *C. elegans* (Figura 4.15). Esto sugiere que ceLIN-42 podría llegar a ser modulada por *kin-20* mediante fosforilación.



Figura 4.15 | Alineamiento parcial realizado con Clustal-Omega de las isoformas LIN-42By c de *C. elegans* con PERIOD de *D. melanogaster* y PERIOD2 de *M. musculus*. Arriba, se muestran los sitios conservados de fosforilación de los dominios PerS (recuadro rojo) y PerSD (recuadro negro) de dmPERIOD en *C. elegans*. Muchas de las serinas y treoninas blancos de fosforilación en la mosca se encuentran conservadas en LIN-42By c. Abajo, se muestran los sitios conservados de fosforilación de de mPERIOD en *C. elegans*. La serina 662 está sustituida por una treonina en *C. elegans*, que también puede ser blanco de fosforilaciones, la posición 668 está conservada y las posiciones 671 y 674 están ausentes en lin-42 del nematodo.

Discusión

Durante este capítulo, análisis complementarios de registros de luminiscencia *in vivo* y ensayos *in vitro* demostraron la regulación circadiana del metabolismo de *C. elegans* y revelaron un nuevo gen controlado por el reloj (*ccg*, siglas del inglés *Clock Controlled Gene*), *sur-5*, que no había sido asociado hasta el momento al sistema circadiano de los nematodos utilizando métodos clásicos. Se comprobó que los ritmos circadianos de luminiscencia antes encontrados se generan por una expresión rítmica del gen *sur-5* en los nematodos, bajo condiciones variables y constantes. El reportero transcripcional construido es capaz de copiar esta oscilación y el patrón de expresión del ARN mensajero es muy consistente con el mostrado por el gen endógeno. En un análisis más detallado, se encontró una diferencia en la acrofase entre el gen *sur-5* y el reportero, la cual podría ser consistente con la naturaleza transcripcional de esta fusión, donde solo se utilizó una región promotora mínima y un 3'UTR clásico de *let-858*. En este sentido, sería interesante estudiar el efecto de cambiar estas secuencias en el ritmo de salida, o incluso en analizar alguna fusión traduccional, para estudiar posibles mecanismos de regulación de *sur-5* a nivel postraduccional. Estos resultados son de gran relevancia, ya que nos permiten afirmar que el método elegido puede ser utilizado para estudiar la regulación transcripcional de cualquier gen de interés en el futuro.

El promotor de *sur-5* es comúnmente utilizado para expresar transgenes de manera ubicua y constitutiva a lo largo del desarrollo, pero no existen estudios anteriores a este trabajo que analicen el patrón de expresión de este gen bajo un esquema circadiano LO/FC en nematodos adultos. En nuestro caso, la elección de este promotor no estuvo relacionada con una posible homología a algún gen circadiano, sino que más bien fue el punto de partida para poder desarrollar el método, ya que se trataba de un promotor capaz de dirigir una expresión fuerte del constructo de interés y por ende fácil de detectar, sin necesidad de demasiada sensibilidad. Por supuesto, de aquí en adelante habrá que ver si las condiciones elegidas también son óptimas para el estudio transcripcional de otros genes, que se expresan solamente en algunas neuronas, por ejemplo.

Como se mencionó durante el capítulo 1, se ha descrito que *sur-5* regula negativamente al gen ras *let-60*, el cual actúa en una vía de transducción que controla la diferenciación de la vulva en *C. elegans*. Además, se sabe que *sur-5* actúa de manera

sinérgica con *lin-45*, generando la muerte larval, el movimiento desordenado y defectos en la puesta de huevos. Por otro lado, un análisis bioinformático muestra que este gen codifica para una proteína homóloga a la Acetil-Coenzima A sintetasa de *H. sapiens* (BlastP, 88% de cobertura, 40% de identidad, $E = 2 \times 10^{-162}$) y que además posee sitios predictivos de unión a ATP y AMP, aunque esta función bioquímica no ha sido caracterizada (Gu, et al. 1998). La Acetil-CoA sintetasa es una enzima evolutivamente conservada e involucrada en el metabolismo de lípidos, que participa en la generación de Acetil-CoA (una fuente de carbono para la síntesis y elongación de ácidos grasos) de una manera dependiente de ATP y acetato. Recientemente se ha descrito que a pesar de que los niveles de ARN mensajero no oscilan en mamíferos, la actividad de la Acetil-CoA sintetasa 1 (AceCS1) está bajo modulación circadiana a través de la acetilación por SIRT1 (Sahar, et al. 2014). La acetilación cíclica de AceCS1 genera niveles rítmicos de acetil-CoA tanto *in vivo* como en líneas celulares y, en consecuencia, la elongación rítmica de los ácidos grasos. De manera consistente, en este trabajo se encontró un ritmo circadiano robusto en los niveles endógenos de ATP en los nematodos, en antifase con los niveles de ARN mensajero del transcritto de *sur-5*. Estos resultados son muy alentadores y abren la puerta para estudiar en detalle cómo se lleva a cabo esta regulación circadiana metabólica. Es posible, por ejemplo, enfocarnos ahora en la regulación de los niveles de Acetil-CoA o incluso de NAD^+ bajo las condiciones de sincronización, ya que como se describió durante la introducción, los mismos son cíclicos por acción de SIRT1 en mamíferos, y podría suceder que esta acetilasa de histonas también esté conservada en *C. elegans*.

El patrón en antifase entre el ritmo circadiano de ATP y el de bioluminiscencia, demuestra que el reportero no refleja directamente el estado metabólico *in vivo* en nuestras condiciones de ensayo. Esto difiere de lo que había sido reportado previamente en ensayos cortos (Lagido, et al. 2008), y en nuestro caso, la luz correlaciona con los niveles de ARNm de *sur-5*. Además, la adición de un exceso de ATP no alteró el patrón rítmico de bioluminiscencia, apoyando la noción de que el factor limitante en la reacción es la cantidad de enzima disponible. Recientemente, un estudio reportó que la luminiscencia de nematodos transgénicos portando un constructo similar *sur-5::luc::gfp* también varía durante el desarrollo embrionario, pero en este caso, el ensayo se realizó con bacterias en el medio y el sustrato D-Luciferina era incorporado por los nematodos a través de la alimentación (Olmedo, et al. 2015). De esta manera, se obtuvieron oscilaciones de menos de

24 horas, que mostraban una forma mas bien cuadrada, donde la señal caía rápidamente entre los *moltings*, cuando los nematodos sufren un cambio de cutícula y dejan de alimentarse por la formación del *plug* en la cavidad bucal (ver Figura 1.3). Notablemente, tampoco se encontró en este trabajo una correlación de la luminiscencia con los niveles de ATP endógenos. Resulta muy interesante que el mismo reportero pueda responder a distintas cosas simplemente con cambios en las condiciones de medida, lo cual habla de la versatilidad y la sensibilidad del sistema y de la influencia directa de las condiciones de registro sobre el estado metabólico del organismo. En este sentido, en el laboratorio ya estamos intentando poner a punto registros de luz en presencia de bacterias, que nos permitan realizar por ejemplo ensayos de ARN interferencia por alimentación con bacterias que expresan el ARNdc de interés.

Consistentemente con la descripción de *sur-5* como un nuevo *ccg*, se encontraron mediante un análisis bioinformático tres elementos *E-box* candidatos en la región del promotora de *sur-5* (E1-E2 (-345), CAACTG(7N)CACGTT; *E-box* canónico (-526), CACGTG; y *E-box* no-canónico (-742), AACGTG). La primera prueba realizada para estudiar el efecto de estos sitios mediante la utilización del reportero con el promotor mutado portando una inversión de las dos bases centrales de cada elemento, no reveló cambios significativos en el ritmo de luminiscencia. Determinar si estos elementos cumplen una función conservada en *C. elegans* o si los nematodos poseen un mecanismo diferente de regulación transcripcional, como el presente en hongos o plantas, requerirá de más experimentos específicos. Al respecto, estamos pensando en una delección de todos los elementos o combinaciones de ellos, para eliminar completamente cualquier interacción con posibles proteínas regulatorias que pudieran existir, y en la construcción de nuevas versiones del reportero con el promotor truncado desde el extremo 5'.

Es necesario destacar también la factibilidad del sistema para ser adaptado al registro de nematodos individuales, algo que es muy difícil de realizarse con otros métodos convencionales tales como actividad locomotora o medidas bioquímicas, que requieren grandes números de individuos. Los ensayos de nematodos individuales resultaron útiles para revelar ritmos circadianos robustos en estudios a corto plazo y, notablemente, permitieron eliminar el efecto del promedio de señales de distintas fases, que resulta en pérdida de información debido a posibles desincronizaciones dentro de los individuos de la población. Sin embargo, los ritmos individuales mostraron más variabilidad y requirieron un

mayor número de réplicas biológicas, lo cual está relacionado posiblemente con una señal mas baja.

Una característica del reloj que fue revelada con los ensayos de un solo animal y no fue visible en ensayos poblaciones, fue la sensibilidad farmacológica de los ritmos de luminiscencia al inhibidor de CK1 ϵ/δ . En otros organismos, esta modulación es dependiente de la fase (Querfurth, et al. 2007; Etchegaray, et al. 2010; van Ooijen, et al. 2013), y dado que la administración de la droga siempre se realizó en el mismo horario (ZT12), es posible que si todos los individuos de las poblaciones no estuvieran exactamente sincronizados al momento de recibirla, se generaran efectos distintos en cada uno y por ende un resultado muy ruidoso. De hecho, esto mismo fue encontrado cuando la droga fue administrada en nematodos individuales, donde no todos respondieron de la misma manera y el alargamiento del período en la luz mostró claras variaciones inter-individuos. Consistente con esto, algunos nematodos mostraron fases diurnas durante los registros, lo cual apoya la idea de que no todos llegan a entrenarse verdaderamente a los *Zeitgebers*. En este punto, será necesario profundizar más en las condiciones de sincronización, y en las vías moleculares que están involucradas, para poder ajustar mas los *Zeitgebers* a lo que el reloj es capaz de interpretar y lograr entonces una mayor proporción de poblaciones e individuos entrenados.

La modulación del período de luminiscencia por el inhibidor PF-670462 y la recapitulación de este efecto en el mutante de *kin-20*, apoyan la noción de un mecanismo evolutivamente conservado de regulación postraduccional en la maquinaria molecular del reloj del nematodo. Esta respuesta nunca había sido estudiada con anterioridad y es la primera vez que estamos cerca de poder llegar al mecanismo central del reloj. En este sentido, un gran número de proteínas han sido descritas como posibles homólogos a los factores centrales del reloj de mamíferos e insectos, incluyendo a AHA-1, LIN-42b/b y TIM-1, que presentan diferentes grados de homología con CLOCK, PERIOD y TIMELESS, respectivamente (Hasegawa, et al. 2005; Romanowski, et al. 2014). Sin embargo, hasta el momento, se ha descrito que estos genes poseen roles a nivel del desarrollo en los nematodos (Chan, et al. 2003; Qin y Powell-Coffman 2004; Tennessen, et al. 2006; Monsalve, et al. 2011) y ninguno de ellos ha demostrado ser circadianamente rítmico a nivel de RNAm (van der Linden, et al. 2010; Olmedo, et al. 2012), al menos bajo ciclos clásicos de luz-oscuridad o temperatura. Para la existencia de un mecanismo conservado de TTFL

(Harmer, et al. 2001) con un lazo de retroalimentación negativa, al menos uno de estos genes debería ser cíclico. Incluso aunque no haya hasta el momento evidencia que indique que el homólogo de PER, LIN-42, es cíclico a nivel transcripcional bajo ciclos de LO o CF en ensayos de organismos completos (Edgar, et al. 2012; Olmedo, et al. 2012), existe la posibilidad de que solo cicle en un subconjunto de células o que sea regulado de manera postraduccional. Esto ha sido observado para el caso de las peroxirredoxinas, un marcador circadiano conservado en *C. elegans* y en todos los organismos modelo estudiados hasta el momento (Edgar, et al. 2012). Adicionalmente, la actividad de LIN-42 podría estar regulada mediante mecanismos citoplásmicos complejos que ocurren por una alternancia de compañeros de heterodimerización especie-específicos y que modulan la función de proteínas del reloj en otros organismos. Por ejemplo, se ha demostrado en mamíferos y *Drosophila* (Young y Kay 2001) que la heterodimerización de PER con una proteína específica determina la localización subcelular a lo largo del día, como así también su sensibilidad a CK1 ϵ . Además, algunas mutaciones en *Drosophila* son capaces de afectar específicamente los patrones de interacción de PER y TIM en el citoplasma, de alterar o bloquear la tasa de transporte al núcleo o incluso, de afectar la tasa de disociación del dímero PER/TIM, cambiando, de esta manera, el período de los ritmos (Young y Kay 2001). Una evidencia clara a favor de la posible función de *lin-42* en dentro del reloj central, proviene de la observación de que nematodos mutantes para este gen muestran un período de actividad locomotora ligeramente mas largo *in vivo* (Simonetta, et al. 2009).

El análisis bioinformático mostrado reveló que KIN-20b posee un alto nivel de homología con su contraparte en insectos y mamíferos, con una conservación completa de los sitios funcionales y regulatorios, lo cual indica que la proteína muy posiblemente sea el blanco de acción del inhibidor selectivo de CK1 ϵ/δ , PF-670642. La conservación de sitios regulatorios entre LIN-42b/c y PER, así como aquellos entre KIN-20b y CK1 ϵ/δ , es sugerente de la posibilidad de una fosforilación de LIN-42b/c mediada por KIN-20b, similar a lo encontrado en otras especies.

Resulta importante mencionar que la expresión de los reporteros fusionados traduccionalmente *plin-42::gfp* y *pkln-20::gfp*, colocaliza perfectamente en unas células denominadas *seam cells* en el nematodo y se ha demostrado también que el fenotipo precoz de fusión anormal de estas *seam cells* observado en mutantes *lin-42(n1089)*, es potenciado por ARN interferencia contra *kin-20* y *tim-1* (Banerjee, et al. 2005). Esto sugiere una posible

interacción *in vivo* entre algunas de las isoformas de LIN-42 y KIN-20. Las *seam cells* son un grupo de células (H0-H2, V1-6, T) que se encuentran a lo largo de la línea media apical de la hipodermis, y entre los extremos izquierdo y derecho de la nariz y la cola. Lo interesante de estas células, es que sufren una serie de divisiones asimétricas en cada uno de los 4 estadios larvales, para producir nuevas *seam cells* autorenovables y células diferenciadas de la hipodermis que forman la cutícula del L1, *dauers* y los adultos. Sin embargo, durante el desarrollo postembrionario, pueden actuar para producir además neuronas del ganglio lumbar (PLN, PVW y PVN), neuronas de la espiga de la cola (PHC), células de apoyo (Phso1, Phso2) y distintos tipos de cerdas sensoriales (*wormatlas*). Determinar cual es la razón por la cual tanto *lin-42* como *kin-20* se expresan en estas células y el rol preciso de LIN-42b/c y KIN-20b en el reloj circadiano de *C. elegans* requerirá mas experimentos a futuro. Para ello, será esencial analizar por ejemplo si KIN-20b es una quinasa capaz de fosforilar realmente LIN-42, y entender con mayor profundidad el efecto observado del alargamiento del período de luminiscencia en el mutante *kin-20(ok-505)*, mediante experimentos con ARNi para *kin-20* o la sobreexpresión del gen *wild-type* por microinyección.

Conclusión general

“Las ideas no duran mucho. Hay que hacer algo con ellas”.

— Santiago Ramón y Cajal. *Charlas de café*, 1932.

Conclusión general

Gran parte de nuestro conocimiento actual del reloj circadiano de *C. elegans* ha estado limitado a la descripción de comportamientos, o salidas del reloj, basados en métodos variables y no muy robustos, que no son aplicables a *forward genetic screenings* y a análisis *high-throughput*. En este trabajo, se desarrolló un método basado en un reportero luminiscente, no invasivo y muy sensible, que reveló ritmos transcripcionales de luminiscencia robustos e *in vivo*, tanto a nivel poblacional como individual. Este método permitió demostrar que el ritmo de expresión de *sur-5*, revelado indirectamente por luminiscencia, cumple con las siguientes propiedades fundamentales de la ritmicidad circadiana: oscila en condiciones constantes y con un período cercano a 24 h, por lo que es un ritmo verdaderamente circadiano; es capaz de sincronizarse al ciclo dual de los *Zeitgebers* y de mantener la fase bajo condiciones de FR, lo cual denota una verdadera capacidad de entrenamiento del reloj; muestra compensación por temperatura en el período; es capaz de entrenar a ciclos T de distintas duración y finalmente, también puede ser entrenado a un ciclo ambiental esqueleto, discontinuo. Hasta ahora, ningún método desarrollado para estudiar ritmos circadianos en *C. elegans* y en particular para medir expresión génica, había sido capaz de revelar todos los aspectos primordiales de la ritmicidad circadiana en este poderoso organismo modelo.

Los experimentos de bioluminiscencia poblacionales fueron particularmente útiles para analizar todas estas propiedades circadianas y los efectos de mutaciones en componentes de las vías de entrenamiento, que requieren varios días de registro para permitir un análisis preciso y fiel de los datos. En este sentido, este tipo de ensayos serán esenciales para futuros *forward genetic screenings* o estudios mediante ARN interferencia, para el descubrimiento de los componentes moleculares del reloj central de *C. elegans*, aún no dilucidados. Adicionalmente, los ensayos poblacionales pueden brindar mucha información acerca de factores involucrados en la sincronización social y el efecto de interacciones inter-individuos.

Por otro lado, los registros de nematodos individuales, sin bien resultaron más variables y requirieron un mayor número de réplicas, fueron de gran utilidad para analizar diferencias de fases mostradas por el reloj de cada nematodo y más importante, para observar el efecto farmacológico del inhibidor de CK1 ϵ/δ de una manera mucho más precisa.

Este tipo de estudios serán esenciales para medir respuestas más finas a estímulos ambientales o por ejemplo para estudiar el efecto de la falta de una única neurona (de las 302 que poseen los nematodos) en los circuitos neuronales sobre el reloj del nematodo, a través de la ablación neuronal por láser.

Aún cuando se han hallado diversos genes homólogos en *C. elegans* a otros genes reloj de organismos modelos, el mecanismo central del reloj del nematodo aún se desconoce y también las neuronas involucradas en generar estas oscilaciones. La expresión circadiana de genes centrales del reloj muestra diferentes fases en diferentes tejidos y puede sufrir un rápido decaimiento en ausencia de señales ambientales. Es posible que un enmascaramiento debido a la presencia de tejidos no cíclicos, o tejidos con fases diferentes, sea en parte responsable del hecho de que aún no se hayan descubierto ritmos en los ARN mensajeros de los genes reloj candidatos, en ensayos a nivel de organismos completos. Adicionalmente, muestras conteniendo un gran número de nematodos por punto horario pueden llevar a falsos negativos debido a un efecto de promediado de fases o a la pérdida de información valiosa entre los diferentes puntos horarios. En este sentido, el enfoque basado en el reportero luminiscente usado en este trabajo, que permite registrar ritmos en tiempo real y en animales intactos, constituye un método más sensible y confiable para revelar nuevos mecanismos y regulaciones transcripcionales del reloj central del nematodo. Esto es particularmente relevante en el caso de *C. elegans*, donde las salidas circadianas no parecen ser particularmente robustas y hay una marcada variabilidad entre individuos (Kippert, et al. 2002; Simonetta y Golombek 2007; Herrero, et al. 2015; Winbush, et al. 2015). Sería muy relevante, por ejemplo, aprovechar la emisión de luz de los nematodos transgénicos para *Psur-5::luc::gfp* para realizar videos en tiempo real mediante cámaras CCD o equipos que detecten fluorescencia *in vivo*, y poder analizar cómo son las oscilaciones de este gen en términos temporo-espaciales, y si existe algún subgrupo particular de células donde se genera dicha oscilación. De esta manera, mediante el estudio de *sur-5* o de otros genes de interés, será posible analizar en mayor detalle cuales son las áreas que están bajo regulación circadiana en el nematodo y aprovechar la gran cantidad de información disponible sobre el sistema nervioso y la morfo-fisiología general de este organismo, para empezar a entender las bases de estos comportamientos.

Conjuntamente con los esfuerzos por entender el reloj biológico de los nematodos, ha habido un creciente interés en estudiar como este organismo ciego es capaz de percibir

las señales de luz, así como las de temperatura. Brevemente, ambas vías de señalización están basadas en receptores de membrana acoplados a proteína G, que son capaces de percibir luz o temperatura y, al hacerlo, activan a una proteína G que transduce la señal a través de guanilato ciclasas específicas, aumentando los niveles de GMPc y activando finalmente el canal dependiente de nucleótidos cíclicos TAX-4/TAX-2 (Kimura, et al. 2004; Edwards, et al. 2008; Ramot, et al. 2008; Liu, et al. 2010) . Aunque los mecanismos detrás de la percepción de la luz y temperatura se encuentran descritos con cierta profundidad y los componentes moleculares más importantes de las cascadas han sido detallados, se conoce muy poco acerca del rol de estas vías en la sincronización del reloj de los nematodos.

Los resultados obtenidos en este trabajo proporcionan evidencia de que ambas, la luz y la temperatura, en una combinación particular, son *Zeitgebers* sinérgicos, necesarios para entrenar los ritmos robustos de luminiscencia observados para *sur-5*. En el ambiente natural de *C. elegans* y, particularmente debajo de la tierra, el aumento de temperatura está retrasado en fase con respecto a la salida del sol, llegando a su máximo hacia el final de la tarde (Monteith y Unsworth 2013). En este contexto, la proporción de horas con alta temperatura está concentrada hacia el final del día, cuando la radiación solar es mínima pero la tierra ha absorbido la mayor parte de ella. Esto podría explicar porqué la combinación de una temperatura baja con el comienzo del día, en un ciclo LO/FC, es una condición mucho más fuerte para entrenar al reloj de los nematodos.

Por otro lado, el reportero bioluminiscente permitió demostrar que las proteínas LITE-1, GUR-3 y TAX-2 están involucradas en las vías de sincronización fótica y térmica del oscilador central. El hecho de que los resultados no revelen una arritmicidad completa en las poblaciones mutantes puede ser una consecuencia de la naturaleza puntual de las mutaciones y también puede ser indicativo de que probablemente haya más componentes involucrados en las vías de entrenamiento, algo que tendrá que ser estudiado mediante la microinyección del reportero en nuevos *backgrounds* mutantes.

Una característica destacable de contar con un sistema de luminiscencia para medir ritmos de expresión en el nematodo, es la gran versatilidad de enfoques que se pueden llevar a cabo en el futuro para abordar preguntas relacionadas con los mecanismos subyacentes de biología circadiana de este organismo, que antes no podían ser abordadas por no contarse con una herramienta de estas características para registrar ritmos:

- La aplicación mas directa - y quizás la mas inmediata - es la utilización de otros promotores de genes de interés en el reportero y la generación de líneas transgénicas con las que sea posible estudiar la regulación circadiana de la expresión de, por ejemplo, genes como *lin-42*, *aha-1* o *tim-1* durante el estadio adulto.

- Un segundo enfoque que surge de los primeros experimentos es entender un poco más acerca del rol de *kin-20* en el reloj del nematodo y su posible interacción por fosforilación con LIN-42b/c, lo cual se podrá llevar a cabo como se describió antes mediante ensayos de ARNi para *kin-20* o de sobreexpresión de este gen en nematodos que porten el *Psur-5::luc::gfp*. Además, serán necesarios ensayos bioquímicos para probar esta interacción y la posible fosforilación de alguna isoforma de LIN-42.

- Un tercer enfoque puede estar relacionado con un análisis inverso, utilizando el reportero rítmico para tratar de descubrir componentes del reloj central que afecten de manera indirecta el ritmo de salida de *sur-5::luc::gfp*. Para ello, se está pensando en generar líneas transgénicas que porten este mismo reportero pero en *backgrounds* mutantes de *lin-42*, *aha-1* o *tim-1*, algunos de los cuales son viables a pesar de tener retrasos de desarrollo. Al respecto, como se dijo en capítulos anteriores, se podrían utilizar los mutantes *lin-42(mg152)* y *lin-42(n1089)*, que muestran un período de actividad locomotora ligeramente mas largo que nematodos *wild-type* (Simonetta, et al. 2009), como punto de partida.

- Por otro lado, el reportero luminiscente también mostró ser muy útil para revelar componentes involucrados en las vías de sincronización del reloj, algo que requerirá futuras caracterizaciones para poder completarse. Como se describió durante el capítulo 3, estamos especialmente interesados en comprender cómo actúan los fotorreceptores LITE-1 y GUR-3 para coordinar la respuesta de las neuronas sensibles a luz, encontrar cuáles son los termorreceptores y entender cómo el ciclo dual de luz y temperatura genera un efecto sinérgico en el entrenamiento. Para ello, será necesario generar nuevas líneas transgénicas con el reportero *Psur-5::luc::gfp* en nuevos mutantes disponibles o en cruzamientos de estos mutantes.

- Muy ligado con lo anterior, y también de gran relevancia, es la caracterización del circuito neuronal que está involucrado en el sensado de los *Zeitgebers*, y en la transmisión de estos estímulos río abajo, hasta llegar a las neuronas del oscilador central, que luego provocan las respuestas circadianas que normalmente medimos en el laboratorio. Al respecto, estamos pensando en dos estrategias para abordar este problema. La primera

está relacionada con la eliminación de neuronas específicas mediante distintos métodos: 1) ablación laser, pero esta metodología tiene la limitación de solo ser aplicable a ensayos de un solo nematodo (Bargmann y Avery 1995); 2) utilización de caspasas humanas expresadas bajo promotores específicos de distintos tipos neuronales, para generar la muerte programada de estas neuronas por apoptosis y ver el efecto en el ritmo de luminiscencia (Chelur y Chalfie 2007); 3) finalmente, algo más reciente, es el silenciamiento neuronal específico en cualquier estadio larval, mediante la expresión de canales de cloruro sensibles a histamina (HisCl1) provenientes de *D. melanogaster*, aunque esto nunca ha sido probado para estudios crónicos (Pokala, et al. 2014). La segunda estrategia, complementaria, está relacionada con el rescate del fenotipo mutante de algunos de los componentes caracterizados ya de estas vías, mediante su expresión localizada en cada uno de estos tipos neuronales de interés, en nematodos *knockouts* para estos genes que además porten el reportero controlado por *sur-5*.

- Otro aspecto que se quiere abordar es el tema de cómo la domesticación por los numerosos años de repiques de la cepa N2 en el laboratorio han generado cambios a nivel del genoma y han afectado los ritmos circadianos. Este aspecto es sumamente peculiar, ya que *C. elegans* es un organismo casi exclusivamente de laboratorio, que se viene cultivando en condiciones artificiales (muchas de las cuales no tienen un control cíclico de las condiciones ambientales) desde hace más de 10 años. Numerosos estudios muestran que aislamientos recientes de *C. elegans* son muy divergentes a nivel genómico con respecto a la cepa N2 proveniente del CGC (Koch, et al. 2000; Weber, et al. 2010; Vergara, et al. 2014) que se utiliza normalmente, y se cuenta con información disponible de *whole genome sequencing* de muchos de estos aislamientos. Sería interesante generar transgénicos con el reportero *Psur-5::luc::gfp* en algunos de estos aislamientos recientes, para analizar posibles cambios en el patrón de oscilaciones en estos animales con variaciones genéticas. Así se podrá estudiar, por ejemplo, si la variabilidad y la falta de robustez que se observa en algunos comportamientos rítmicos del nematodo están relacionadas con variaciones en algunas secuencias.

- Finalmente, algo sumamente más ambicioso y para desarrollar en un futuro mas lejano, sería llevar a cabo un *forward genetic screening*, mediante una mutagénesis generalizada por EMS de los nematodos transgénicos para *Psur-5::luc::gfp* y un *screening* por luminiscencia de su progenie, seguido por *whole genome sequencing*. O bien, mediante un

screening por RNAi en nematodos transgénicos para *Psur-5::luc::gfp* y análisis de luminiscencia. Este tipo de estrategias ya se han aplicado con éxito en otros organismos para encontrar nuevos componentes del reloj (Konopka y Benzer 1971; Vitaterna, et al. 1994; Allada, et al. 1998; Siepka y Takahashi 2005; Matsuo, et al. 2008; Vollmers, et al. 2008; Maier, et al. 2009; Zhang, et al. 2009; Kumar, et al. 2011).

En resumen, este trabajo revela nuevas características del reloj circadiano de *C. elegans* y abre nuevas posibilidades para el descubrimiento de los genes centrales y de las redes neuronales que conforman el reloj en este modelo, a través de *screening* genéticos. Estos estudios ayudarán a proveer información fundamental sobre su aún desconocido reloj molecular y contribuirán al entendimiento de los principios fundamentales de la cronobiología en éste y otros organismos.

Anexo:

**Ensayos preliminares del reportero
con promotores de otros genes de
interés**

“What we call the beginning is often the end
and to make an end is to make a beginning.
The end is where we start from”.

— T.S. Elliot. *Little Gidding*, 1942

Introducción

Genes homólogos del reloj central en *C. elegans*: *lin-42* y *aha-1*

En animales *wild-type*, *lin-42* restringe la diferenciación de las células de la hipodermis durante el desarrollo larval, en parte actuando como un regulador transcripcional negativo de ciertos microARNs, incluyendo a la familia *let-6*, que cumple un rol importante en distintas vías heterocrónicas (Jeon, et al. 1999; Pepper, et al. 2004; Abbott, et al. 2005; Tennessen, et al. 2006; McCulloch y Rougvie 2014; Perales, et al. 2014). También se ha descrito una función de *lin-42* mediando respuestas a claves ambientales, inhibiendo la formación de la larva *dauer* resistente a condiciones adversas (Tennessen, et al. 2010). Adicionalmente, *lin-42* está involucrado en la regulación del *molting*, coordinando otras actividades del desarrollo hipodermal, y se ha descrito que la mutación de ciertos alelos causa una asincronía en este ciclo y fallas en la muda (Monsalve, et al. 2011). En este sentido, se ha reportado que la expresión de *lin-42a* y *lin-42b* es cíclica durante el desarrollo, mostrando picos de ARNm durante los cuatro *moltings* con un período cercano a las 8 h a 20°C (Jeon, et al. 1999; Hendriks, et al. 2014; Edelman, et al. 2016). Estas oscilaciones son requeridas para generar *moltings* rápidos, rítmicos y eficientes y la sobreexpresión constitutiva de *lin-42a* in animales *wild-type* genera *moltings* desregulados y letargia (Monsalve, et al. 2011).

LIN-42 es un miembro particular de la vía molecular heterocrónica, ya que codifica para el homólogo de PERIOD de *D. melanogaster* y mamíferos (Jeon, et al. 1999; Tennessen, et al. 2006; Romanowski, et al. 2014) y por lo tanto podría relacionarse con otro mecanismo biológico de regulación temporal. Como se describió previamente, LIN-42 y PERIOD comparten muchas regiones de homología, incluyendo los dominios de interacción proteica PAS, y otros dominios mas pequeños (SYQ y LT) que han sido descritos como necesarios para la interacción con proteínas circadianas, como CLOCK y la caseína quinasa 1 ϵ , en moscas y mamíferos (Chang y Reppert 2003; Lee, et al. 2004; Sun, et al. 2010). Sin embargo, hasta ahora no se han encontrado ritmos circadianos en la expresión de *lin-42* bajo ciclos de luz/oscuridad o temperatura (van der Linden, et al. 2010; Olmedo, et al. 2012).

Interesantemente, mientras que PERIOD en otros organismos contiene ambos dominios PAS y SYQ/LT dentro de la misma proteína, el locus de *lin-42* es muy complejo, y

codifica para 7 isoformas (a-g), incluyendo proteínas no solapadas que poseen estos dominios por separado (Figura A.1). LIN-42B es la proteína mas larga y como se describió previamente, la que presenta mayor homología con PERIOD, conteniendo todos los dominios conservados (Romanowski, et al. 2014). En contraste, LIN-42A y LIN-42C no están solapadas y se expresan desde distintos promotores (Tennessen, et al. 2010). Mientras que LIN-42A contiene solo los dominios SYQ y LT, LIN-42C contiene solo los dominios PAS. Por lo tanto, es posible que solo algunas de las isoformas cumplan una función en el reloj circadiano, y la existencia de estas formas no solapadas proveen la oportunidad de investigar la función de los dominios PAS y SYQ/LT separadamente. Si bien es muy difícil poder analizar de manera específica la expresión de las distintas isoformas mediante PCR en tiempo real, lo cual puede ser una limitación para estudios circadianos, análisis mediante *RNA-seq* disponibles proveen una fuerte evidencia de la expresión de LIN-42A y B en el adulto, y experimentos de amplificación rápida de extremos de ADNc por RACE 3' también revelan la expresión de LIN-42C (*Wormbase*). Además, mutantes de desarrollo para alelos de *lin-42* que carecen del dominio PAS pueden ser rescatados con un fragmento genómico que contiene la unidad *lin-42c*, indicando que esta isoforma posee alguna función *in vivo*, pero este fragmento es ineficiente para rescatar mutaciones en el dominio LT (Tennessen, et al. 2006). En contraste, la expresión de *lin-42a* sí puede rescatar mutaciones que afectan a *lin-42a* o *lin-42c*, como en los mutantes *n1089* y *ok2395* (Tennessen, et al. 2006; Monsalve, et al. 2011). Estos resultados sugieren que los dominios SYQ y LT son claves para las funciones de LIN-42 en el desarrollo, mientras que las isoformas conteniendo el dominio PAS podrían jugar otros papeles regulatorios, aún desconocidos, por ejemplo en el reloj circadiano. Evidencia a favor de este argumento proviene de la observación de que los mutantes *n1089* que contienen la delección del dominio PAS, y el *mg152*, con un codón de stop prematuro predictivo que eliminaría la expresión de la mayor parte del dominio PAS, pero que aún conservan LIN-42A intacta, muestran un fenotipo heterocrónico distinto del *wild-type*. Además, como se describió en capítulos anteriores, un estudio realizado por nuestro laboratorio mediante actividad locomotora bajo ciclos de luz-oscuridad de 12 h: 12 h, relevó que los mutantes *lin-42(mg152)* y *lin-42(n1089)* muestran un alargamiento del período con respecto a nematodos *wild-type* (Simonetta, et al. 2009).

Recientemente, mediante la generación de un alelo nulo de *lin-42* que elimina las tres isoformas, y por experimentos de complementación con *lin-42a*, *b* y *c* por separado, se

demostró que todas las isoformas contribuyen a la regulación del desarrollo y al control de los *moltings* (Edelman, et al. 2016). Este mutante podría ser gran utilidad para poder estudiar en mayor profundidad la función de *lin-42* y desglosar el rol de cada una de las isoformas en el reloj circadiano del nematodo.

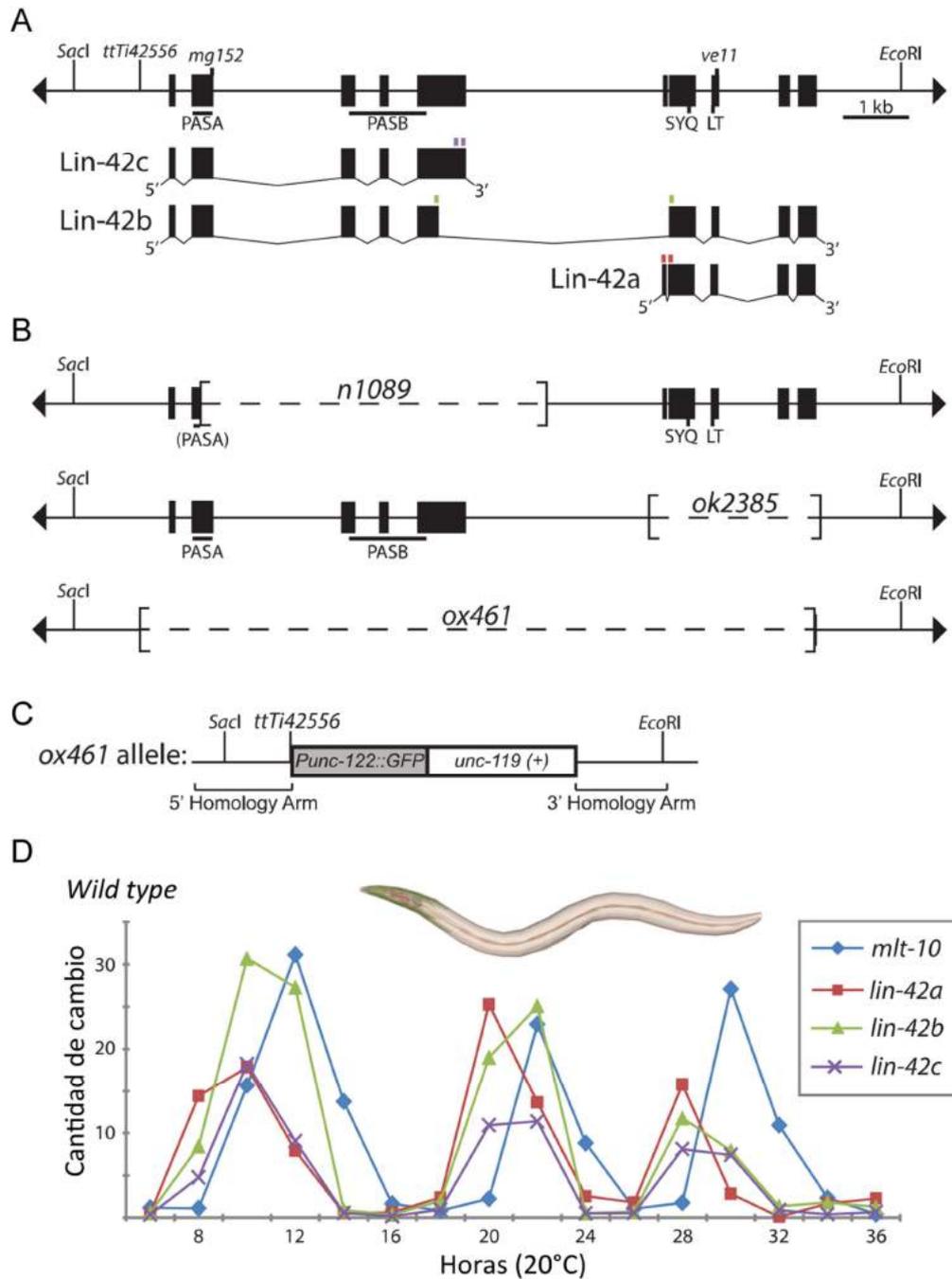


Figura A.1| Isoformas de *lin-42* y perfiles de expresión durante el desarrollo. A| Organización del locus de *lin-42* y unidades transcripcionales. La línea con las flechas en los extremos representa el ADN genómico del locus de *lin-42*, invertido de *Wormbase*. Abajo se muestran las tres unidades

transcripcionales codificadas por *lin-42*, donde las cajas negras representan exones y las líneas los intrones: *lin-42a*, *lin-42b* y *lin-42c*. *lin-42a* y *c* no están solapadas y se expresan de promotores distintos. Se indican además los dominios PAS, SYQ y LT y los sitios de mutación puntual de *mg152* y *v11*. **B** Mutantes de delección de *lin-42* (las delecciones se muestran entre corchetes). El mutante *n1089* presenta la mayor parte del dominio PAS deleccionado y el *ok2395* carece de los dominios SYQ y LT. **C** El mutante nulo *ox461* presenta una delección completa de la secuencia codificante de *lin-42* y en su lugar posee el constructo *Punc-122::gfp* y el *unc-119 (+)* de *C. briggsae*. Se indican además los brazos de homología utilizados para la recombinación homóloga. **D** El esquema superior muestra una representación tomada de *Wormbase* del patrón de expresión de una fusión *Plin-42bc::gfp* en el adulto, el cual ha sido observado en faringe, *seam cells* (línea central roja que recorre todo el cuerpo), y células laterales hipodérmicas a lo largo de todo el cuerpo, en la cabeza y en la cola (Jeon, et al. 1999). Esta expresión es detectable desde estadios de desarrollo tardíos hasta la adultez. Abajo, se muestra un experimento de PCR en tiempo real a lo largo del desarrollo que muestran como varían los niveles de *lin-42a* (rojo), *lin-42b* (verde) y *lin-42c* (violeta), relativos a la expresión de *mlt-10*, en animales *wild-type*. Los *primers* utilizados se muestran en **A** con el mismo código de colores. Para *lin-42a* y *lin-42b* se amplificó un intrón que es retenido en el ARNm maduro y los *primers* son específicos solo para estas isoformas, mientras que los *primers* para *lin-42c* también aplican a la isoforma b. Imagen adaptada de Edelman, et al. 2016.

AHA-1 es la única proteína de *C. elegans* que posee todos los dominios conservados y muestra una alta homología con los elementos positivos del *loop* central del reloj, CLOCK y CYCLE en *D. melanogaster* y CLOCK y BMAL1 en mamíferos (Romanowski, et al. 2014). AHA-1 posee 2 dominios PAS, un dominio bHLH, un dominio de translocación nuclear y un dominio denominado CIRCADIAN PROTEIN CLOCK/ARNT/BMAL/PAS, entre otros (Romanowski, et al. 2014). AHA-1 codifica para una proteína de 453 aminoácidos, que es capaz de formar heterodímeros con otras proteínas PAS como AHR-1, HIF-1 y CKY-1, y se hipotetiza que también homodímeros, para estimular la transcripción de muchos genes *targets* (Powell-Coffman, et al. 1998; Ooe, et al. 2007). Este también es el caso de CLOCK/ CYCLE en moscas y CLOCK/BMAL1 en mamíferos, donde los dímeros activan la transcripción de los elementos negativos del reloj y otros genes controlados por el reloj. Tal como en el caso de *lin-42*, el ARNm de *aha-1* no muestra oscilaciones circadianas bajo ciclos de luz/oscuridad o temperatura (van der Linden, et al. 2010).

Se ha reportado que el factor inducible por hipoxia, un complejo de transcripción heterodimérico, regula las respuestas celulares y sistémicas a bajos niveles de oxígeno durante el desarrollo en *C. elegans*, de una manera conservada a la de mamíferos. Este complejo está formado por HIF-1 y AHA-1, homólogos a las subunidades α y β del factor inducible por hipoxia (HIF) de mamíferos, respectivamente (Jiang, et al. 2001). La expresión de *hif-1* es inducida por hipoxia e inhibida en condiciones contrarias, y tanto *hif-1* como *aha-*

1 se expresan en la mayoría de las células y sus productos pueden ser inmunoprecipitados. Adicionalmente, se ha reportado que HIF-1 y AHA-1 interaccionan en el citoplasma y esto lleva a translocación nuclear del complejo, el cual funciona como factor de transcripción para inducir la expresión de todos los genes de la vía de respuesta a hipoxia en el nematodo.

En el desarrollo, los genes *ahr-1* y *aha-1*, codificantes para AHR-1 y AHA-1, son requeridos para dirigir la diferenciación de neuronas específicas. El reportero *ahr-1::gfp* se expresa en un subgrupo de neuronas, y animales mutantes para este gen muestran defectos específicos en la diferenciación neuronal, cambios en la expresión génica, migraciones celulares, conformaciones de exones y otros procesos neuronales aberrantes. En particular, se ha reportado que el heterodímero AHR-1::AHA-1 controla el desarrollo y la migración dorsal de la interneurona SDQR sensible al O₂, controlando la expresión de una serie de genes involucrados en esta vía (Qin y Powell-Coffman 2004). Por otro lado, también se ha reportado que la identificación celular y la conectividad precisa entre la interneurona BDU y la neurona mecano-receptora PLM en *C. elegans* está regulada por una vía Wnt, en un mecanismo donde el factor de transcripción AHA-1 funciona en ambas neuronas para inducir la expresión del gen codificante para el receptor transmembrana CAM-1. CAM-1 presente en BDU y PLM funciona como un antagonista de Wnt, conectando de esta manera la regulación transcripcional de AHA-1 con la modulación de la vía de señalización Wnt (Zhang, et al. 2013).

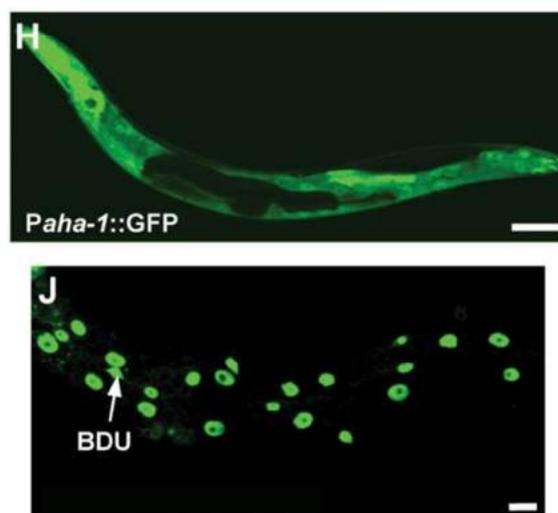


Figura A.2| Patrón de expresión de una fusión traduccional AHA-1::GFP en el adulto. H| Imagen de microscopía confocal de un adulto conteniendo la fusión traduccional, donde se muestra la expresión de *aha-1* en muchas células del nematodo, incluyendo hipodermis, células intestinales, faringe, y neuronas ASE, PLM, BDU, entre otras. Barra de escala, 100 μ m. **J|** *Paha-1::AHA-1::GFP* se localiza en

el núcleo. Las flechas indican el soma de las interneuronas BDU. Barra de escala, 10 μm . Imagen tomada de Zhang, et al. 2013.

Ritmos redox en *C. elegans*: regulación circadiana de las catalasas

Como se describió durante la introducción general, *C. elegans* presenta ritmos de tolerancia a estrés osmótico (ClNa) y oxidativo (H_2O_2), con máximos de tolerancia a ZT12 y ZT0 respectivamente (Simonetta, et al. 2008). El estrés oxidativo, particularmente, está íntimamente relacionado con el concepto de estado redox, ya que este tipo de estrés puede alterar el balance de oxidorreducción de las células, afectando directamente al metabolismo celular. En este sentido, existen diferentes enzimas y sistemas enzimáticos que regulan el ambiente redox celular (Sies 1997). Uno de estos sistemas es que está encargado de detoxificar el anión superóxido generado por el metabolismo oxidativo, el cual es primero transformado en peróxido de hidrógeno por la enzima superóxido dismutasa, y este producto en agua por la enzima catalasa y/o diferentes peroxirredoxinas (Figura A.3).

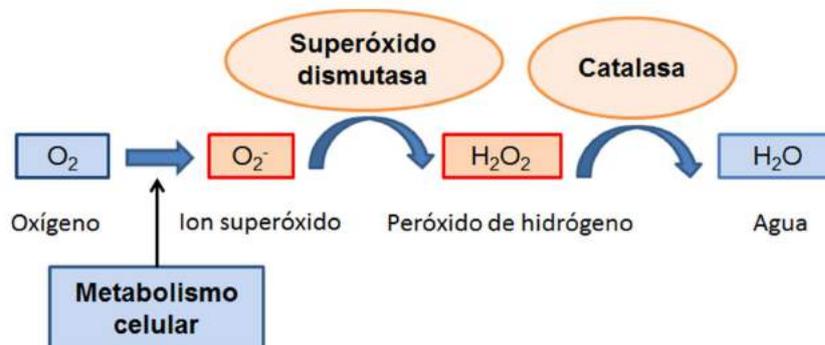


Figura A.3| Sistema enzimático de detoxificación SOD-CAT. En este sistema, el ion superóxido es reducido a H_2O a través de una serie de reacciones enzimáticas que involucran a la superóxido dismutasa (SOD) y a la enzima catalasa (CAT). El último paso de la reacción puede también ser catalizado por peroxirredoxinas (PRX).

El ambiente redox tiene un impacto de gran magnitud en la fisiología de los organismos desde el punto de vista de las consecuencias de la generación de ROS. El sistema circadiano le permite a los organismos anticipar cambios en su tasa metabólica y de esta manera emplear recursos energéticos, enzimas antioxidantes, *scavengers* de radicales libres (moléculas capaces de bloquear o neutralizar la acción de los radicales libres), etc. en el momento adecuado para maximizar la efectividad. Como se describió previamente, las tasas metabólicas fluctúan de manera circadiana en prácticamente todos los organismos

estudiados. Esto se relaciona con la actividad y el nivel de expresión de ARNm de diferentes enzimas clave, así como de la respiración mitocondrial.

C. elegans posee 3 genes de catalasas, 5 superóxido dismutasas y 3 peroxirredoxinas. En experimentos recientes realizados en el laboratorio y aún no publicados, se encontró que la actividad enzimática de la enzima catalasa muestra una regulación circadiana bajo ciclos de luz/oscuridad, con un máximo de actividad durante la fase de luz a ZT9, el cual tiende a mantenerse en condiciones constantes en el mismo horario. Una regulación similar en la actividad de las catalasas ha sido descrito en muchos otros organismos tales como mamíferos (Agapito, et al. 1999; Coto-Montes, et al. 2001; Hardeland, et al. 2003), *Drosophila melanogaster* (Hardeland, et al. 2003) y el pez cebra, *Danio rerio* (Hirayama, et al. 2007). En *C. elegans*, se ha reportado que solo la transcripción de *ctl-3* es rítmica bajo ciclos de LO mediante un estudio por *microarrays* (van der Linden, et al. 2010). Catalasa 3 es la menos estudiada de las tres enzimas antioxidantes en el nematodo, y solo se ha descrito que CTL-1 y CTL-2 exhiben ambas actividad catalasa *in vitro* y contribuyen al control del *life-span* en la vía de insulina mediada por DAF-2 (Taub, et al. 1999; Murphy, et al. 2003; Petriv y Rachubinski 2004). Además, CTL-2 es requerida para el desarrollo, para la puesta de huevos (Petriv y Rachubinski 2004) y para la morfología normal de los peroxisomas, siendo su expresión predominantemente peroxisomal en las células epiteliales del intestino (Togo, et al. 2000), mientras que CTL-1 se expresaría solo en el citosol de otras células (Taub, et al. 1999). En cuanto a CTL-3, existe un único reporte en el cual se muestra que una fusión transcripcional *Pctl-3::gfp* (conteniendo 657 pb río arriba del ATG de CTL-3) se expresa en células musculares de la faringe y somas de algunas neuronas (Petriv y Rachubinski 2004), con lo cual podría tener funciones muy distintas de las que involucran a las otras dos catalasas (Figura A.4).

La importancia de encontrar ritmos en la actividad de esta enzima en el nematodo radica en su función en la detoxificación del H₂O₂, una molécula que ha sido descrita como segundo mensajero en lo que se denominan cascadas de señalización redox (Forman, et al. 2010). Variaciones en la actividad enzimática podrían entonces estar ajustando los niveles de respuesta de estas cascadas de señalización o bien estar actuando simplemente en un efecto clásico como detoxificador de ROS. Como evidencias preliminares en el primer sentido, recientemente se encontró en el laboratorio que un cepa denominada GA800 que sobreexpresa las catalasas *ctl-1*, *ctl-2* y *ctl-3*, es significativamente mejor que la *wild-type*

para sincronizar y entrenar a ciclos de LO (datos no publicados). Esto podría indicar que el H_2O_2 estaría de alguna manera regulando al reloj central. Además, es interesante volver a mencionar que tanto LITE-1 como GUR-3, los fotorreceptores del nematodo, son capaces de sensor distintas especies de ROS, y GUR-3 muestra una alta afinidad por H_2O_2 (Bhatla y Horvitz 2015). Por otro lado, en cuanto a la función detoxificadora de las catalasas, esto podría estar relacionado con variaciones en la capacidad de tolerar estrés oxidativo proveniente del metabolismo celular o, del medio ambiente donde habitan los nematodos, lo cual ha sido previamente reportado en nuestro laboratorio (Simonetta, et al. 2008).

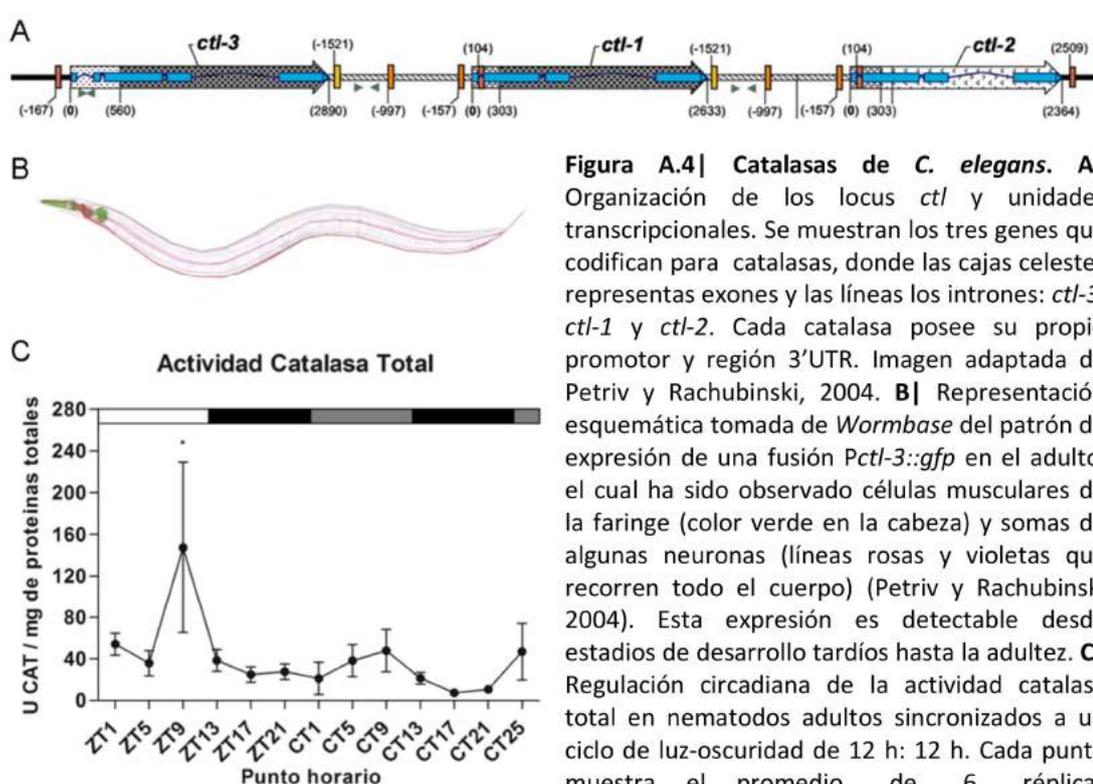


Figura A.4] Catalasas de *C. elegans*. **A]** Organización de los locus *ctl* y unidades transcripcionales. Se muestran los tres genes que codifican para catalasas, donde las cajas celestes representan exones y las líneas los intrones: *ctl-3*, *ctl-1* y *ctl-2*. Cada catalasa posee su propio promotor y región 3'UTR. Imagen adaptada de Petriv y Rachubinski, 2004. **B]** Representación esquemática tomada de *Wormbase* del patrón de expresión de una fusión *Pctl-3::gfp* en el adulto, el cual ha sido observado en células musculares de la faringe (color verde en la cabeza) y somas de algunas neuronas (líneas rosas y violetas que recorren todo el cuerpo) (Petriv y Rachubinski 2004). Esta expresión es detectable desde estadios de desarrollo tardíos hasta la adultez. **C]** Regulación circadiana de la actividad catalasa total en nematodos adultos sincronizados a un ciclo de luz-oscuridad de 12 h: 12 h. Cada punto muestra el promedio de 6 réplicas

réplicas biológicas independientes de una población de nematodos adultos. * $P < 0,05$; ANOVA de una vía, seguido de un test de comparaciones de Dunnet (grupo control: ZT1) (datos no publicados).

En otros organismos también existen evidencias que apoyan ambas funciones de las catalasas. Por ejemplo, se describió un rol para el H_2O_2 en el mecanismo de sincronización por luz del reloj biológico del pez *Danio rerio* (Hirayama, et al. 2007), donde un pulso de H_2O_2 es capaz de inducir la oscilación circadiana de genes reloj en la línea de cultivo celular Z3. Por otro lado, en este pez la actividad de la enzima catalasa es dependiente de la luz, con un máximo en la transición día-noche y actúa como un regulador negativo de la señalización por

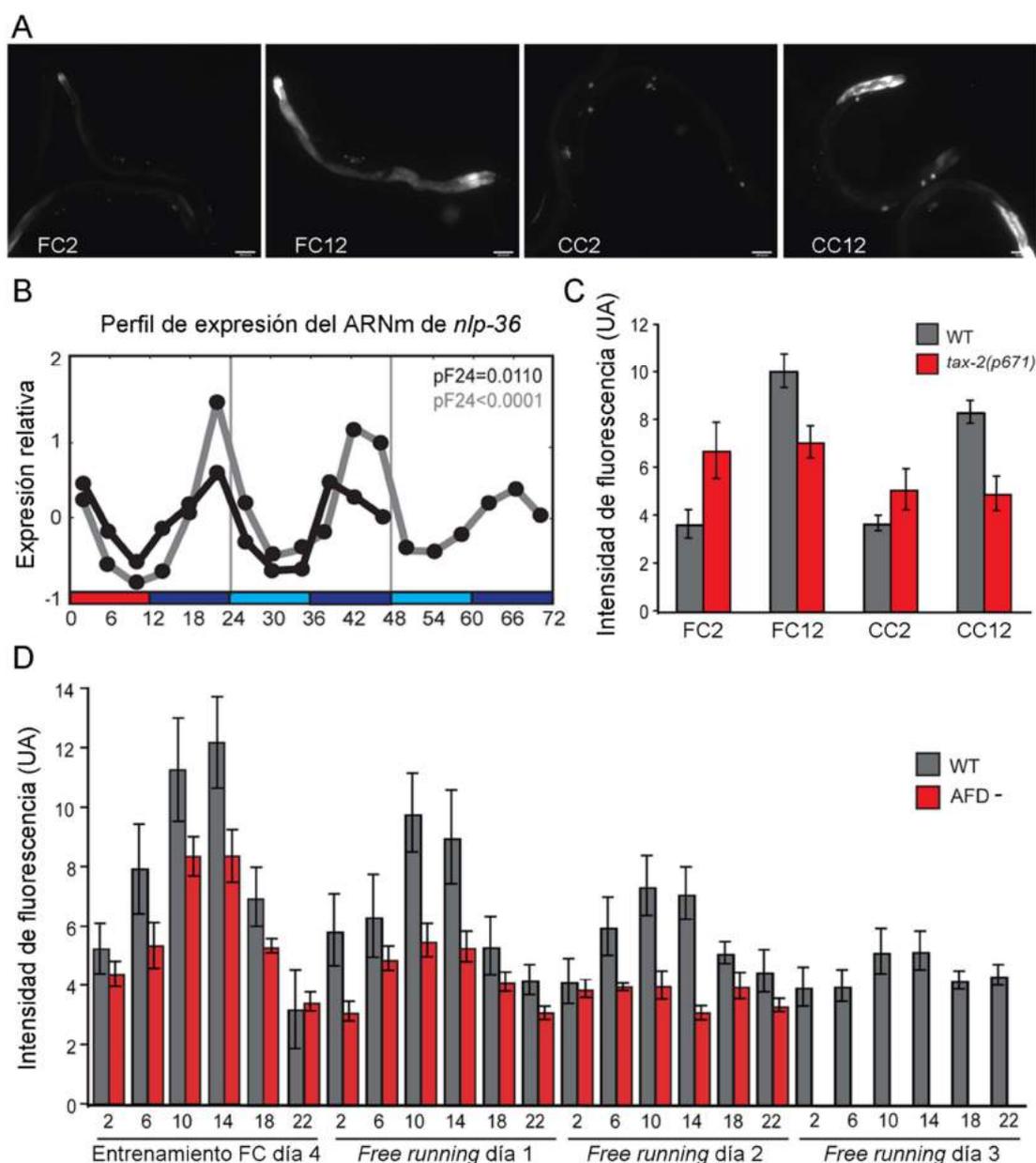
H₂O₂ al reloj (Hirayama, et al. 2007; Uchida, et al. 2010). Asimismo, estudios en diversos organismos modelo revelaron que el H₂O₂ es capaz de alterar los patrones de expresión y la fase de genes reloj, modulando y por ende sincronizando al reloj biológico (Qian, et al. 2012; Tamaru, et al. 2013; Tahara, et al. 2016). Además, esta interacción es bidireccional, ya que como se dijo previamente, muchos genes reloj modulan la homeostasis de ROS a través del control de la expresión de enzimas que están involucrados en estas vías y la respuesta frente a estrés oxidativo (Krishnan, et al. 2008; Lai, et al. 2012).

Neuropéptidos regulados por el reloj: el caso de NLP-36

En un estudio realizado por cromatografía líquida en dos dimensiones y espectrometría de masas, se descubrieron hace algunos años atrás alrededor de 60 péptidos pequeños y proteínas pequeñas tipo neuropéptidos en *C. elegans* cuya función en muchos casos es desconocida aún en la actualidad (Husson, et al. 2005). Algunos de los péptidos identificados muestran una gran similitud de secuencias con neuropéptidos de otros invertebrados, indicando que estas moléculas podrían cumplir funciones evolutivamente conservadas.

Uno de los péptidos recientemente identificados en *C. elegans* fue PDF (pigment-dispersing factor). En *D. melanogaster*, *pdf* se expresa en las neuronas laterales ventrales pequeñas (s-LNv) que forman parte del reloj central (Chang 2006; Nitabach y Taghert 2008) y su expresión es requerida para mantener adecuadamente los ritmos de actividad locomotora (Renn, et al. 1999) y el acoplamiento entre las neuronas del oscilador central (Peng, et al. 2003; Lin, et al. 2004). En *C. elegans*, existen dos genes codificantes para PDF (*pdf-1* y *pdf-2*) (Janssen, et al. 2009), similarmente a lo encontrado en el sistema PDH de crustáceos (Meelkop, et al. 2012a) y cuyos productos interactúan con versiones de receptores específicos para PDF que se generan mediante *splicing* alternativo (Janssen, et al. 2008). Además de jugar un rol en la reproducción del macho (Barrios, et al. 2012), en la regulación de la locomoción y en la puesta de huevos (Meelkop, et al. 2012b), recientemente nuestro grupo ha relevado que PDF-1 también cumple una función conservada como en la mosca, modulando la generación y la sincronización de los ritmos de actividad locomotora bajo ciclos de luz-oscuridad (Herrero, et al. 2015).

En el estudio transcriptómico circadiano realizado bajo ciclos de LO y de FC mencionado previamente, van der Linden *et al* reportaron que el pequeño neuropéptido NLP-36 (SMVARQIPQTVVADH) exhibe oscilaciones solo bajo ciclos de 10 grados de delta de temperatura (15-25°C), las cuales se mantienen bajo condiciones constantes (van der Linden, et al. 2010). Además, los autores monitorearon la expresión de *nlp-36 in vivo* mediante un reportero *Pnlp-36::gfp::pest* bajo ciclos de FC y CF, y encontraron que el gen mostraba una regulación circadiana de la expresión génica mediante la cuantificación de los niveles de fluorescencia por microscopía. Estos ritmos se mantenían por al menos dos días bajo condiciones de temperatura constante, pero mostraban cierta caída en la amplitud. Además, en nematodos crecidos bajo FC (15-25°C) y liberados en condiciones constantes de 25°C, la fase de estas oscilaciones puede ser alterada por un pulso de temperatura fría de 6 h, generando un retraso de fase, indicando que la regulación de *nlp-36* por temperatura está bajo control del reloj central (van der Linden, et al. 2010). Además, la expresión rítmica de *nlp-36* por temperatura en el intestino de los nematodos se ve significativamente afectada en mutantes de *tax-2*, durante condiciones de entrenamiento y de *free running*. Finalmente, la oscilación de *nlp-36* en ciclos de temperatura pierde significativamente la amplitud cuando la neurona AFD, que juega un rol principal en el sensado de este estímulo, es eliminada mediante la expresión de caspasas bajo el promotor específico *gcy-8* (van der Linden, et al. 2010) (Figura A.5). Más allá de esta caracterización circadiana, la función biológica de NLP-36 en *C. elegans* es totalmente desconocida.



A] Patrón de expresión de *gfp* en animales adultos con el constructo *Pnlp-36::gfp::pest* (el promotor contiene 3,5 Kb río arriba del TSS del gen) bajo condiciones de entrenamiento (FC, 15-25°C) y *free running* (CC, 25°C). Se observó expresión del gen en intestino y otras células no identificadas de la cabeza y de la cola en animales adultos. Magnificación de 100X. **B]** Perfil de expresión del ARNm de *nlp-36*, obtenido mediante extracción de ARN de poblaciones de gusanos y analizado mediante *microarrays*, en un ciclo invertido bajo condiciones de entrenamiento (CF, 25-15°C) y *free running* (FF, 15°C). La barra roja representa la fase caliente (25°C), la azul la fase fría (15°C) y la celeste corresponde a la fase caliente subjetiva. **C]** Cuantificación de la intensidad de la fluorescencia del intestino (UA, unidades arbitrarias) bajo el mismo ciclo 15/25°C mostrado en **A**, pero en animales *wild-type* o mutantes de *tax-2(p671)*. **D]** Ritmo de expresión del reportero controlado por *nlp-36* bajo condiciones de entrenamiento (FC, 15-25°C) y *free running* (CC, 25°C), de animales *wild-type* o con la neurona AFD genéticamente ablacionada. Imagen adaptada de van der Linden, et al. 2010.

El objetivo final de contar con un reportero que permite medir expresión génica *in vivo* es estudiar genes involucrados con el reloj circadiano de *C. elegans*, que nos permitan revelar, de manera directa o indirecta, nuevos componentes del reloj y llegar a descifrar la base molecular del oscilador endógeno de este organismo. Hasta ahora, se ha enfocado el trabajo a estudiar en detalle el ritmo controlado por *sur-5*, un gen que resultó de gran utilidad para analizar además muchas de las propiedades fundamentales del reloj de *C. elegans*. En este capítulo, el foco de atención estará puesto en el estudio de la regulación transcripcional de otros genes, utilizando como punto de partida un ciclo clásico de luz y oscuridad. Para ello, se generarán por microinyección líneas transgénicas estables de nematodos bioluminiscentes bajo el control de los promotores de *lin-42bc*, *aha-1*, *ctl-3* y *nlp-36*. *lin-42* es el gen candidato a ocupar el rol de PERIOD en el reloj de *C. elegans* y será esencial para ello analizar en detalle qué sucede con la expresión de éste gen bajo distintas condiciones ambientales, y comprender cómo están regulados el reloj circadiano y el desarrollo. Una situación similar es la que se presenta con *aha-1*, que actúa como factor de transcripción en distintas vías pero del cual se conoce aún menos de su posible función en el reloj. *ctl-3* es un gen de especial interés para nuestro grupo para continuar nuestra línea de investigación fundacional sobre la interacción entre el estado redox y el reloj, y es muy prometedor como transcripto cíclico bajo LO por datos preliminares del laboratorio y otros datos publicados. Finalmente, el neuropéptido NLP-36, es un candidato ideal para ser analizado en mas detalle por el sistema luminiscente, porque la función biológica del mismo es desconocida en el nematodo y porque se ha demostrado que está regulado solo por temperatura, con lo cual no se debería ver una oscilación bajo un ciclo de LO y puede ser una herramienta importante para desglosar la sincronización por ambos estímulos.

Materiales y Métodos

Cepa de nematodos

En esta sección del trabajo se utilizaron nematodos pertenecientes a la cepa N2 (*wild-type*), adquiridos del *Caenorhabditis Genetics Center* (Universidad de Minnesota, Estados Unidos, <http://cbs.umn.edu/cgc/home>).

Constructos moleculares

Las secuencias correspondientes a las regiones promotoras de los genes de interés se obtuvieron mediante la herramienta *ParaSite Biomart* de *Wormbase*, con la base de datos WS190. Se seleccionaron 3000 pb (o variantes si la estrategia de clonado así lo requería) río arriba del TSS conteniendo cada región promotora y estas secuencias se utilizaron para el diseño de los *primers* correspondientes *in silico*.

Construcción de *Plin-42::luc::gfp*

- Se amplificaron 3087 pb río arriba del TSS del gen de *lin-42* conteniendo la región promotora directamente a partir de ADN genómico de *C. elegans* adultos en una primer reacción de PCR. En una segunda reacción, se añadieron los sitios de restricción para PstI y BamHI y este fragmento fue clonado en pGEMT. Posteriormente, se ligó el promotor digerido con estas enzimas con el *backbone* pPD158.87-*luc::gfp* de 5629 pb, sin el promotor de *sur-5*. Esto dio como resultado el constructo pPD158.87::*Plin-42::luc::gfp*. Los *primers* utilizados para la PCR fueron:

Forward *lin-42*: 5'- AGAGATAGAGAGCGTCGGAGG-3'

Reverse *lin-42*: 5'- TTGGCTGATGGTGCCACGTTC-3'

Forward *lin-42*-PstI: 5'- AAAACTGCAGCCAGAGATAGAGAGCGTCGGAGG-3'

Reverse *lin-42*-BamHI: 5'- CGCGGATCCTTGGCTGATGGTGCCACGTTC-3'

Construcción de *Paha-1::luc::gfp*

• Se amplificaron 3000 pb río arriba del TSS del gen de *aha-1* conteniendo la región promotora directamente a partir de ADN genómico de *C. elegans* adultos en una primer reacción de PCR. En una segunda reacción, se añadieron los sitios de restricción para EcoRV y BamHI y este fragmento fue clonado en pGEMT. Posteriormente, se digirió el *backbone* de *Psur-5::luc::gfp* con PstI y BamHI, para liberar el promotor de *sur-5*, y se utilizó el fragmento Klenow para llevar a romo el extremo de PstI. Finalmente, se ligó el *backbone* pPD158.87-*luc::gfp* de 5629 pb con el promotor de *aha-1* digerido con EcoRV y BamHI. Esto dio como resultado el constructo pPD158.87::*Paha-1::luc::gfp*. Los *primers* utilizados para la PCR fueron:

Forward *aha-1*: 5'- GCGCATAATGCCTCAGTACA-3'

Reverse *aha-1*: 5'- TCTGAAAACCTATAAAGAAAAG-3'

Forward *aha-1*-EcoRV: 5'- CATGATGATATCGCGCATAATGCCTCAGTACA-3'

Reverse *aha-1*-BamHI: 5'- CGCGGATCCTCTGAAAACCTATAAAGAAAAG-3'

Construcción de *Pctl-3::luc::gfp*

• Se amplificaron 1926 pb río arriba del TSS del gen de *ctl-3* conteniendo la región promotora directamente a partir de ADN genómico de *C. elegans* adultos en una primer reacción de PCR. En una segunda reacción, se añadieron los sitios de restricción para PstI y XbaI y este fragmento fue clonado en pGEMT. Posteriormente, se ligó el promotor de digerido con estas enzimas con el *backbone* pPD158.87-*luc::gfp* de 5635 pb, sin el promotor de *sur-5*. Esto dio como resultado el constructo pPD158.87::*Pctl-3::luc::gfp*. Los *primers* utilizados para la PCR fueron:

Forward *ctl-3*: 5'- ATGGAATCCAGCTGACGG-3'

Reverse *ctl-3*: 5'- TTGAAGATTTACTGTTGAATTC-3'

Forward *ctl-3*-PstI: 5'- AAAACTGCAGCCATGGAATCCAGCTGACGG-3'

Reverse *ctl-3*-XbaI: 5'- CTAGTCTAGATTGAAGATTTACTGTTGAATTC-3'

Construcción de *Pnlp-36::luc::gfp*

• Se amplificaron 3048 pb río arriba del TSS del gen de *nlp-36* conteniendo la región promotora directamente a partir de ADN genómico de *C. elegans* adultos en una primer reacción de PCR. En una segunda reacción, se añadieron los sitios de restricción para PstI y

XbaI y este fragmento fue clonado en pGEMT. Posteriormente, se ligó el promotor de digerido con estas enzimas con el *backbone* pPD158.87-*luc::gfp* de 5635 pb, sin el promotor de *sur-5*. Esto dio como resultado el constructo pPD158.87::*Pnlp-36::luc::gfp*. Los *primers* utilizados para la PCR fueron:

Forward *nlp-36*: 5'- TTCTGGTTGTAGGCAAGCAAT-3'

Reverse *nlp-36*: 5'- GGAAATGTGGGAGATGTTGAA-3'

Forward *nlp-36*-PstI: 5'- AAAACTGCAGCCTTCTGGTTGTAGGCAAGCAAT-3'

Reverse *nlp-36*-XbaI: 5'- CTAGTCTAGAGGAAATGTGGGAGATGTTGAA-3'

Todos los *primers* utilizados fueron diseñados con el software online *primer3 PLUS* (<http://primer3plus.com/>) y sintetizados en Thermo Fisher Scientific (Estados Unidos) o en Genbiotech SRL (Argentina) y en todos los casos, las secuencias de los constructos fueron validadas por secuenciación por la técnica de Sanger en Macrogen (Corea). Todos los diseños de las estrategias para los clonados y las evaluaciones de las secuenciaciones se realizaron mediante el software CloneManager7 (Scientific & Educational Software, Estados Unidos).

Reacciones de PCR a punto final

Las reacciones de PCR fueron realizadas utilizando un termociclador *MasterCycler* (Eppendorf, Alemania). Todas las secuencias codificantes para las distintas proteínas se amplificaron utilizando *Platinum Taq DNA Polymerase* (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos) o *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase* (NEB, Estados Unidos). El programa de PCR utilizado fue de 2 minutos a 92°C y 35 ciclos de: 30 segundos a 92°C, 30 segundos a 55-65°C dependiendo de la temperatura de *melting* de cada *primer*, extensión específica para cada fragmento a 72°C y una extensión final de 5 minutos a 72°C.

Electroforesis desnaturalizante, revelado y aislamiento de ácidos nucleicos

Tanto las reacciones de PCR como las digestiones fueron corroboradas mediante electroforesis preparativa en geles de agarosa 0.8% (Genbiotech, Argentina), utilizando para la corrida buffer TAE 1X (Stock TAE 50X: Tris-Acetato 2 M, EDTA 0,05 M; Sigma-Aldrich, Estados Unidos) y como marcador de peso molecular *Ladder 1kb plus y 250 bp* (Thermo

Fisher Scientific, Estados Unidos). La tinción de ácidos nucleicos se realizó con *GelRed* 0,5X (Biotium stock 10000X, Estados Unidos), se analizó en un transiluminador UV (DyNA Light, Labnet International, Estados Unidos) y la imagen fue digitalizada mediante el programa *Kodak Digital Images* (Kodak, Estados Unidos).

La purificación de ácidos nucleicos lineales a partir de los geles de agarosa se llevó a cabo mediante la utilización del kit comercial *HiYieldTMGel/PCR DNA Mini Kit* (Real Biotech Corporation, Estados Unidos) y la purificación de los plásmidos se realizó mediante el kit de miniprep *illustra plasmidPrep Mini Spin Kit* (GE Healthcare, Estados Unidos), siguiendo en ambos casos los protocolos detallados por los proveedores. Todos los ácidos nucleicos fueron cuantificados por espectroscopía mediante *Nanodrop* (Thermo Scientific, Estados Unidos).

Todos los fragmentos amplificados mediante PCR fueron clonados primero mediante el kit pGEM-T Easy Vector (Promega, Estados Unidos) siguiendo las instrucciones del proveedor. El resto de los constructos antes descritos fueron generados mediante ligaciones estándares, utilizando la enzima *T4 DNA Ligase* con su respectivo buffer de reacción según las especificaciones del proveedor (Thermo Scientific, Estados Unidos). Los cálculos de relación de cantidad de masa de inserto/vector se realizaron mediante la herramienta *BioMath Calculators* disponible en la web (Promega, Estados Unidos). Todos los plásmidos resultantes fueron transformados en cepas de *E. coli* top10 electrocompetentes preparadas y transformadas mediante el protocolo estándar (Green y Sambrook 2012).

Generación de los animales transgénicos mediante microinyección

Los constructos fueron inyectados a una concentración de 100 ng/μl, con los marcadores pRF4 (*rol-6(su1006)*) o PBX (100 ng/μl) para el caso de *Plin-42::luc::gfp*, en la cepa N2 (*wild-type*). Todos los ensayos de luminiscencia fueron realizados con cepas transgénicas con los arreglos extracromosomales.

Microscopía de fluorescencia

Las imágenes de fluorescencia se realizaron montando nematodos de diferentes estadios seleccionados bajo una lupa de microscopía *SMZ100* (Nikon, Estados Unidos) en

pads de agarosa al 5% sobre portaobjetos. Los nematodos se inmovilizaron con 20 μ l de Azida 50 mM (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) y con un cubreobjetos. El patrón de expresión de cada constructo fue analizado mediante un microscopio *Axio Scope.A1* (Zeiss, Alemania) equipado con una fuente de luz *X-Cite 120Q* (EXFO, Canadá) y una cámara *Axiocam 506 mono* (Zeiss, Alemania).

Ensayos de PCR en tiempo real

Poblaciones sincronizadas de nematodos N2 fueron crecidas bajo el ciclo de 24 h LO 12 h: 12 h (0/400 lux; ZT0, luz ON) por 48 h. Si bien no fue programado un ciclo de temperatura, con estas condiciones la incubadora utilizada tenía una variación de medio grado de temperatura, mayor durante la fase de oscuridad. Las larvas L4 de las placas de NGM fueron colectadas comenzando a ZT3, lavadas para eliminar restos de bacterias y transferidas a nuevas placas de NGM rico con FuDR para evitar la eclosión de los huevos. Los nematodos fueron luego entrenados bajo el mismo ciclo durante 3 días y luego fueron dejados en condiciones constantes (oscuridad, 20°C) por dos días más. Cuatro muestras biológicas independientes (n = 4) de 4000 adultos cada una fueron colectadas cada 4 h, comenzando a ZT1 bajo el ciclo LO/FC durante el último día de entrenamiento y durante *free-running*. Los nematodos fueron levantados de las placas, lavados dos veces con M9 para eliminar restos de bacterias y congelados a -80°C en Trizol (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos). El ARN total fue extraído de las muestras mediante el método de Trizol de acuerdo a instrucciones del proveedor. 3 μ g de ARN total fueron tratados con DNase I amplification grade (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos) y utilizados para realizar la síntesis de ADNc utilizando la *SuperScript II Reverse Transcriptase* (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos) con *primers* poli-T (20 pb de largo, Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos). La PCR en tiempo real fue realizada con *SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems, Estados Unidos) utilizando un *StepOne Real-Time PCR thermal cycler* (Applied Biosystems, Estados Unidos) siguiendo instrucciones del proveedor. La mix para *StepOne* (19 μ l) fue agregada a cada uno de los 48 pocillos de una placa de PCR y 1 μ l de ADNc fue añadido como molde de la PCR. El programa de PCR fue 10 minutos a 95°C, 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 60 segundos a 60°C (medida única de fluorescencia), seguido de un análisis de curva de *melting*

(60-95°C con una tasa de calentamiento de 0,3°C por segundo y medición continua de fluorescencia).

Los resultados fueron normalizados a los niveles de ARNm de tres genes de referencia constitutivos: *cdc-42*, *pmp-3* and *Y45F10D.4* (Hoogewijs, et al. 2008). Los *primers* utilizados para amplificar cada gen fueron:

Blanco	Secuencia Primer Directo	Secuencia Primer Reverso	Descripción
<i>aha-1</i>	GTTTCGTGTTTCGGAAGATGG	TTTCATCTGCTGGATGTGC	Ortólogo del ARNT o factor inducible por hipoxia HIF-1 β y homólogo a CLOCK/BMAL1/CYCLE.
<i>lin-42bc</i>	CCGAAAAATGGAGCTAGTCG	CGAAAGTCTTCGCCATAACC	Homólogo a PERIOD. Funciones heterocrónicas.
<i>ctl-1+3</i>	CGTTGGGAATTTGGCTAGTG	TTCTTCTGGCAGAGCTGATG	Catalasa 3, función redox.
<i>nlp-36</i>	TGCTGATTACTTGGGAGCAC	GACCAAGCTTCATGTCGATG	Proteína tipo neuropéptido. Función desconocida.
<i>Y45F10D.4</i>	GTCGCTTCAAATCAGTTCAGC	GTTCTTGTC AAGTATCCGACA	gen de referencia
<i>pmp-3</i>	GTTCCCGTGTCATCACTCAT	ACACCGTCGAGAAGCTGTAGA	gen de referencia
<i>cdc-42</i>	CTGCTGGACAGGAAGATTACG	CTCGGACATTCTCGAATGAAG	gen de referencia

Las secuencias completas de los genes blancos fueron extraídas de *WormBase* (Version WS190) y los primers fueron diseñados con el software *Primer 3 Plus* (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) y cotejados para especificidad utilizando NCBI BLAST (Blastn). Para la puesta a punto de cada set de *primers* se construyó una curva estándar de 5 puntos (serie de diluciones seriadas 1/4) para cada gen y se determinó la concentración de *primers* (0,1; 0,2; 0,3; 0,4 μ M) a la cual la eficiencia era mayor (ésta fue luego utilizada en las reacciones subsiguientes). Todos los oligos fueron sintetizados en Thermo Fisher Scientific (Estados Unidos).

Ensayo de luminiscencia

Todos los registros de luminiscencia se realizaron en placas de Petri de 35 mm, a 20°C y en oscuridad constante, con 100 nematodos L4 y utilizando el medio óptimo de luminiscencia, tal como se describió en la sección de métodos generales.

Análisis de Datos

Los datos de luminiscencia fueron analizados como se explicó previamente.

Lo datos de PCR en tiempo en tiempo real fueron normalizados a los tres genes de referencia *cdc-42*, *pmp-3* and *Y45F10D.4* y analizados por el método de la curva estándar y finalmente normalizados a la muestra con el nivel máximo de expresión. Para determinar la significancia estadística, se realizó un ANOVA de una vía seguido de un test de Tukey de comparación múltiple para LO/FC y otro para OO/CC.

En todos los caso un valor de $P < 0,05$ fue considerado como el mínimo para ser estadísticamente diferente. Los valores de significancia se denotaron como sigue: *** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,05$.

Resultados y conclusiones

Constructos moleculares

Las secuencias de todos los constructos finales obtenidas por secuenciación en Macrogen, están disponibles para su visualización en las siguientes direcciones web:

Constructo	Link
	https://drive.google.com/open?id=0B7qiEW4I5y6SQkFv aFVfQkVoQW8
	https://drive.google.com/open?id=0B7qiEW4I5y6SSWx mUmZNVHoxUGM
	https://drive.google.com/open?id=0B7qiEW4I5y6SQWkt WXN3V3FFZUU
	https://drive.google.com/open?id=0B7qiEW4I5y6ScFNQ ekRNbW1fRkE

Genes homólogos del reloj central en *C. elegans*: *lin-42* y *aha-1*

En primera instancia, se analizó el patrón de oscilación de todos los genes por PCR en tiempo real, bajo un ciclo de luz/oscuridad (400/0 lux, ZT0: 9 am) de 12 h: 12 h a 18°C (la incubadora posee bajo esta condición una variación de 0,5°C). Se crecieron poblaciones de nematodos N2 bajo esta condición hasta estadio L4 en placas sembradas con bacterias y posteriormente se tomaron muestras cada 4 h, comenzando a ZT1 (10 am) para realizar las extracciones de ARN (Figura A.6A). Además de analizar los perfiles de expresión de las dos isoformas de *lin-42* b y c y de *aha-1*, también se analizó el patrón de expresión de *sur-5*, ya que hasta ahora solo se había estudiado los niveles de ARNm bajo el ciclo dual LO/FC. Cabe aclarar que estos resultados son preliminares, y se completarán con el análisis de estos genes nuevos también bajo el ciclo LO/FC y bajo un ciclo de temperatura sin luz.

Notablemente, los resultados mostraron que *sur-5* no muestra una expresión cíclica bajo condiciones de LO (Figura A.6B), algo que se podía esperar por los resultados del capítulo 3, donde se mostró que tanto la luz como la temperatura son importantes para generar la regulación circadiana en este gen. Esto también es una prueba adicional de que el

reloj del nematodo no interpreta todas las señales ambientales de la misma manera. Un resultado similar fue encontrado en el estudio transcriptómico circadiano realizado tanto bajo LO como FC (van der Linden, et al. 2010). Cabe aclarar, sin embargo, que este experimento se realizó manteniendo siempre a los nematodos en placas con comida durante la toma de muestra, mientras que en el caso del capítulo 3 esto fue realizado en el medio líquido de luminiscencia, a fin de validar los resultados bajo las mismas condiciones estrictas que durante los registros de luz. Esto podría llegar a producir cambios adicionales en el estado metabólico de los nematodos que habrá que analizar en medio líquido.

En relación a *lin-42*, se encontró que tampoco parece haber una oscilación circadiana del ARNm de las isoformas b y c juntas bajo el ciclo LO (Figura A.6C). Esto era exactamente lo esperado por bibliografía, ya que se ha reportado que ninguna isoforma de *lin-42* es cíclico bajo ciclos de LO ni FC (15/18°C) (van der Linden, et al. 2010; Olmedo, et al. 2012).

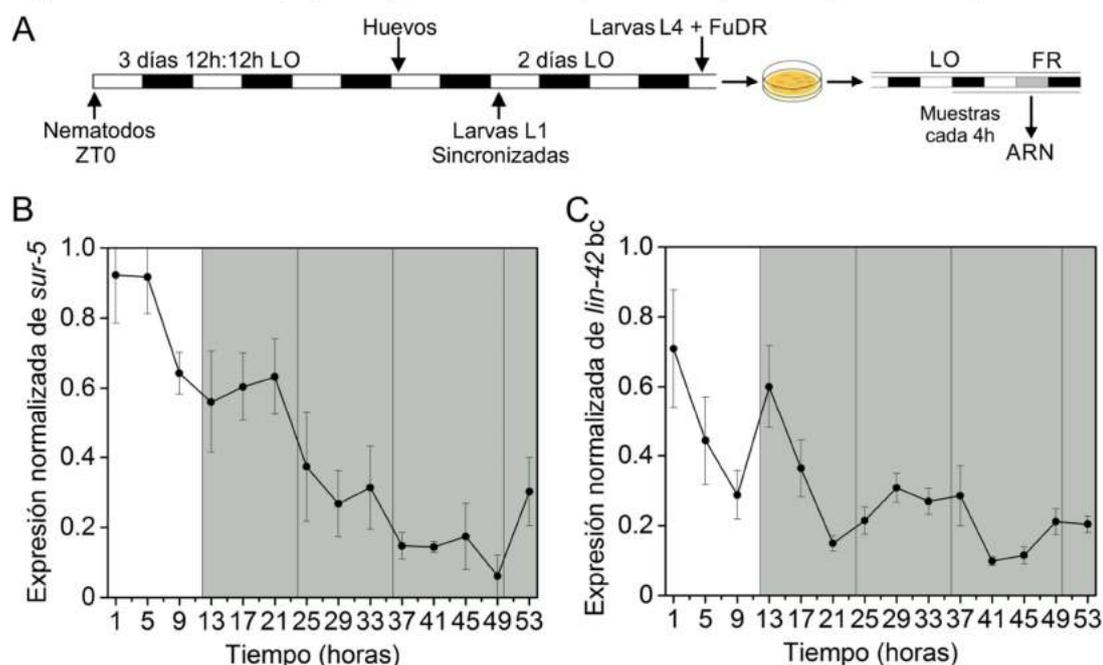


Figura A.6] Regulación transcripcional de *sur-5* y de *lin-42* bajo un ciclo de LO. **A]** Representación esquemática de las condiciones foto-periódicas utilizadas y del experimento. Las barras blancas/negras indican luz/oscuridad y la barra gris, noche subjetiva. Los nematodos *wild-type* fueron entrenados bajo el ciclo combinado 12 h:12 h LO (400/0 lux, 18 ± 0,5°C, ZT0, encendido de la luz) sobre placas de NGM sembradas con *E. coli*. Al día 6, poblaciones de nematodos fueron transferidos a nuevas placas con bacterias pero con la adición de FuDR y se sincronizaron por 3 días mas bajo LO y finalmente fueron liberados en condiciones constantes (oscuridad, 18°C). Se tomaron muestras comenzando a ZT1 durante el tercer día bajo LO y los dos últimos bajo OO para realizar extracción de ARN total y PCR en tiempo real. **B-C]** Patrones de expresión del ARNm de *sur-5* (**B**) y de *lin-42bc* (**C**) bajo estas condiciones (n = 3; *sur-5*, LO y OO, ns, ANOVA de una vía, seguido por un test de Dunnet de comparación de grupos; *lin-42*, LO P < 0,05; OO, ns, ANOVA de una vía, seguido por un test de

Dunnet de comparación de grupos). Los niveles de expresión fueron normalizados a la expresión de tres genes de referencia constitutivos: *cdc-42*, *pmp-3* and *Y45F10D.4* (Hoogewijs, et al. 2008) y relativizados al valor de expresión máximo. Los datos se muestran como un promedio \pm SEM de 3 muestras biológicas independientes (n).

Similarmente con lo publicado en bibliografía, los nematodos con el constructo *Plin-42::luc::gfp* mostraron expresión del constructo desde estadios embrionarios y a lo largo del desarrollo, con una expresión muy clara en el adulto en las *seam cells* antes descritas, en hipodermis a lo largo de todo el cuerpo y en la faringe. A pesar de que distintos experimentos de *RNAseq* y *microarrays* disponibles en *Wormbase* muestran una expresión casi nula de *lin-42* en el estadio adulto con respecto al desarrollo, la expresión del gen fue claramente detectable en adultos de varios días (Figura A.7). Esto puede ser muy importante para el análisis mediante luminiscencia.



Figura A.7| Microscopía de fluorescencia de nematodos transgénicos con el constructo *Plin-42-luc::gfp*. **A|** Embrión y nematodo de estadio L2. **B|** Nematodo de estadio L4. **C|** Nematodo joven adulto. Se observa expresión en la faringe y en las *seam cells* (líneas punteada que recorre el centro de todo el nematodo). Barra de escala, 50 μ m.

Se realizaron entonces los primeros registros preliminares de luminiscencia de una de las líneas con mayor expresión de *gfp in vivo*, bajo condiciones constantes (OO, 20°C) en el luminómetro de placa de Petri. En la señal cruda se puede observar una oscilación durante el primer día, que probablemente se deba a la variación en la expresión de *lin-42* durante al pasaje de L4 a adulto, y luego la señal muestra una caída contante pero detectable por al menos 7 días (Figura A.8).

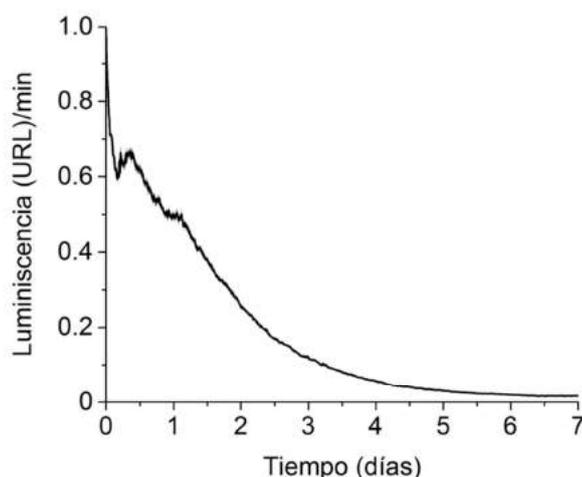


Figura A.8 | Luminiscencia emitida por nematodos transgénicos con el constructo *Plin-42::luc::gfp*. La luminiscencia fue registrada a partir de 100 nematodos L4 de la línea que mostraba mayor expresión bajo lupa de fluorescencia, bajo OO (oscuridad y 20°C. La señal fue integrada durante 1 minuto y medida en intervalos de 10 minutos. Los datos corresponden al promedio \pm SEM (n = 8). URL: Unidades relativas de luminiscencia.

Cuando se analizó el patrón de expresión de *aha-1* bajo el ciclo de LO mediante PCR en tiempo real, se observó a una tendencia circadiana tanto bajo condiciones de entrenamiento como constantes. A pesar de que la estadística para LO no fue significativa porque el error es muy grande en los primeros puntos, existe una oscilación de 24 h visible y con un pico durante el día (ZT9). Bajo condiciones constantes, la acrofase muestra un adelanto de fase hacia CT1 (25 horas en la escala del gráfico), también durante el día subjetivo, y en este caso supera la significancia estadística (Figura A.9). Si bien son resultados preliminares que necesitarán ser reconfirmados con un número mayor de réplicas biológicas, son muy alentadores e indicarían que al menos la expresión de *aha-1* podría ser cíclica.

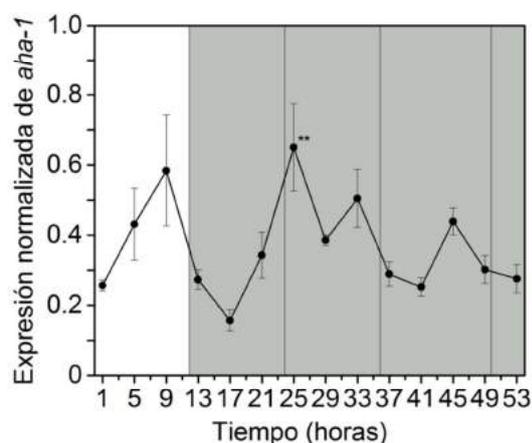


Figura A.9| Regulación transcripcional de *aha-1* bajo un ciclo de LO. Patrón de expresión del ARNm de *aha-1* bajo un ciclo de luz/oscuridad (400/0 lux, ZT0: 9 am) de 12 h: 12 h a $18^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ ($n = 3$; LO, $P = 0,07$; OO, $P < 0,01$, $**P < 0,01$, T25 vs T41, ANOVA de una vía, seguido por un test de Dunnet de comparación de grupos). Los niveles de expresión fueron normalizados a la expresión de tres genes de referencia constitutivos: *cdc-42*, *pmp-3* and *Y45F10D.4* (Hoogewijs, et al. 2008) y relativizados al valor de expresión máximo. Los datos se muestran como un promedio \pm SEM de 3 muestras biológicas independientes (n).

Se generaron entonces las líneas transgénicas con el reportero *Paha-1::luc::gfp*, para registrar luminiscencia *in vivo*. En este caso, se observó expresión también desde huevo hasta adulto, siendo muy fuerte en la región de la faringe y neuronas en la cabeza. Asimismo, se observó un patrón tenue de expresión de fluorescencia en hipodermis a lo largo de todo el nematodo y en adultos de varios días también fue posible visualizar intestino marcado (Figura A.10). Esto es consistente con lo antes descrito por bibliografía, aunque en general la expresión no parece ser tan consistente con la fusión transcripcional.



Figura A.10| Microscopía de fluorescencia de nematodos transgénicos con el constructo *Paha-1-luc::gfp*. **A|** Embriones y nematodo de estadio L2. **B|** Nematodo de estadio joven adulto. **C|** Nematodo adulto de varios días. Se observa expresión en la faringe y neuronas de la cabeza, hipodermis e intestino (C). Barra de escala, 50 μm .

Finalmente, se realizaron los primeros registros de la luminiscencia de una de las líneas con mayor expresión de *gfp in vivo*, entrenados los nematodos bajos LO (0/400 luz, $18 \pm 0,5^\circ\text{C}$) y luego monitoreados bajo condiciones constantes (OO, 20°C). Notablemente, la señal de 100 nematodos L4 fue estable durante mas días que para el caso de *sur-5* y *lin-42*, siendo posible registrar por hasta 10 días (Figura A11). Además, se observan algunas oscilaciones en los datos crudos durante los primeros días, que deberán ser analizadas con mayor detalle extrayendo la tendencia de los datos y suavizando.

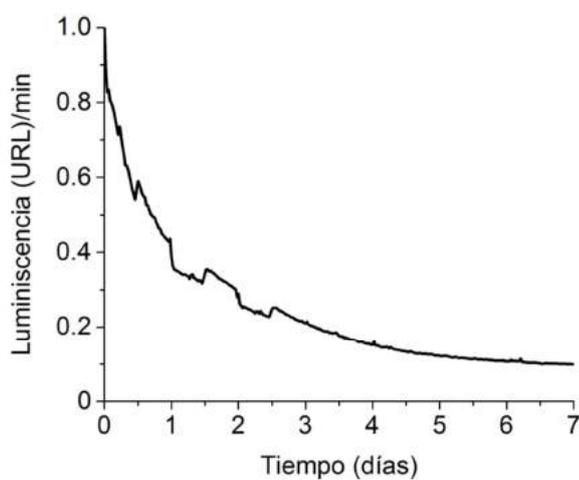


Figura A.11| Luminiscencia emitida por nematodos transgénicos con el constructo *Paha-1::luc::gfp*. La luminiscencia fue registrada a partir de 100 nematodos L4 de la línea que mostraba mayor expresión bajo lupa de fluorescencia, bajo OO (oscuridad y 20°C). La señal fue integrada durante 1 minuto y medida en intervalos de 10 minutos. Los datos corresponden al promedio \pm SEM ($n = 15$). URL: Unidades relativas de luminiscencia.

Los resultados preliminares del análisis de ambos genes reloj parecen evidenciar que bajo un ciclo clásico de luz/oscuridad de 12h : 12 h, la expresión del ARNm de *lin-42* b y c juntos no parece estar bajo regulación circadiana, mientras que sí se evidencia un patrón cíclico de 24 h para el caso de *aha-1*. Además, los registros de luminiscencia muestran la versatilidad del reportero para realizar fusiones transcripcional con promotores de cualquier gen de interés, ya que bajo el control de estos promotores más débiles las señales son detectables por mas de 7 días a partir de poblaciones de 100 nematodos.

Es interesante remarcar que en mamíferos, los tres genes *period* (1, 2 y 3) muestran oscilaciones circadianas, con picos diurnos durante ZT4-10 en los núcleos supraquiasmáticos (Ko y Takahashi 2006), y el homólogo en *D. melanogaster* *dmpperiod*, también está bajo regulación circadiana pero muestra una acropase nocturna cercana a ZT13-14 en la cabeza

(Claridge-Chang, et al. 2001). En *C. elegans*, las isoformas de *lin-42* a, b y c muestran oscilaciones ultradianas de menos de 24 h durante el desarrollo, pero el gen no parece estar regulado de manera circadiana en el adulto bajo LO o FC (van der Linden, et al. 2010; Olmedo, et al. 2012). Además, *C. elegans* no posee ninguna proteína homóloga a *CRY*, quien conforma el heterodímero PER::CRY para regular negativamente el *loop* en mamíferos, pero sí presenta homología con *TIMELESS*, la contraparte de *CRY* en *D. melanogaster*. Tanto *cry* como *tim* oscilan de manera circadiana en estos organismos, con acrofases entre ZT8-14 en los NSQ de mamíferos (Ko y Takahashi 2006) y ZT15-16 en la cabeza de las moscas (Claridge-Chang, et al. 2001). En *C. elegans*, el homólogo *tim-1* no está del todo caracterizado de manera circadiana, pero el único estudio transcriptómico realizado muestra que no parece oscilar bajo LO o FC (van der Linden, et al. 2010).

En cuanto a *aha-1*, los resultados preliminares obtenidos son alentadores, y la oscilación deberá ser confirmada mediante nuevos ensayos. Interesantemente, Van der Linden *et al* utilizaron dos sondas para estudiar cada uno de los genes homólogos al reloj en estudios poblaciones de *C. elegans*, y bajo LO/OO una de ellas mostró una oscilación estadísticamente significativa. Sin embargo, los autores no discutieron mucho acerca de este resultado.

Para poder comprender mas acerca de la función de estos genes en el reloj del nematodo, será necesario seguir caracterizando la regulación transcripcional de los mismos a través de ensayos de PCR en tiempo real y luminiscencia, bajo LO, FC y LO/FC. Siempre cabe la posibilidad de que las extracciones de ARN de estudios poblaciones sean poco informativas y tengan mucho error, ya que involucran grandes cantidades de gusanos, para lo cual será esencial poder realizar videos en tiempo real de los nematodos con los reporteros correspondientes *in vivo* y analizar si existen pequeños grupos de células que muestren expresión rítmica de estos genes, como es el caso de *D. melanogaster*. Por supuesto, cabe además la posibilidad de que existan regulaciones circadianas en estos genes a nivel del *splicing* alternativo, algo que se está comenzando a caracterizar con mucho detalle en plantas (Sanchez, et al. 2010; Bertoni 2012; Perez-Santangelo, et al. 2013; Romanowski y Yanovsky 2015) o incluso a nivel postraducciona, para lo cual será necesario utilizar fusiones traduccionales con *gfp*. Finalmente, podría ocurrir que el reloj del nematodo no esté conservado tal como hipotetizamos, y que el reloj de PER/TIM haya sido reemplazado por otros componentes novedosos.

Ritmos redox en *C. elegans*: regulación circadiana de las catalasas

Como se describió durante la instrucción, estudios preliminares del laboratorio muestran que la actividad total de la catalasa en los nematodos está bajo regulación circadiana en ciclos LO, con lo cual se analizó si también el ARNm mostraba dicha regulación. Al analizar la expresión de los genes para catalasa 1 y 3 juntas, las cuales son muy difíciles de diferenciar por el nivel de homología que poseen, se encontró una clara regulación circadiana de *ctl-1+ctl-3*, con un pico durante la fase diurna a ZT9, la cual se mantiene bajo condiciones constantes pero muestran un ligero avance de fase (Figura A.12). Van der Linden *et al*, mostraron mediante el estudio por *microarrays* que solo *ctl-3* es rítmica bajo LO, pero no bajo ciclos de temperatura (van der Linden, et al. 2010), lo cual sería consistente con su posible rol en la degradación del H₂O₂ generado por la luz. Además, el ritmo de las catalasas también es consistente con el encontrado para la actividad total mostrada durante la introducción, que presenta un pico en ZT9, también durante el día. Es probable que el pico a ZT9 bajo LO en el ARNm sea en realidad un pico a ZT5, tal como se observa en OO (CT5), sobre todo por el error apreciable en ZT5.

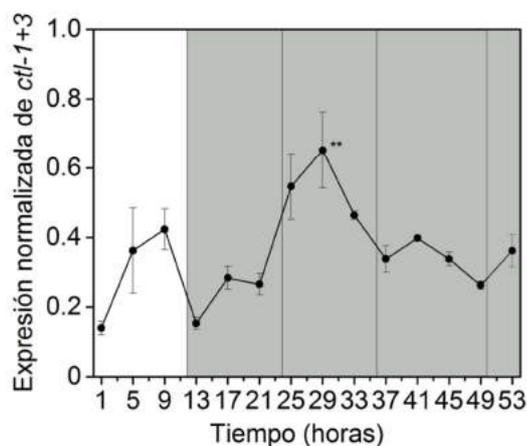


Figura A.12 | Regulación transcripcional de *ctl-1+3* bajo un ciclo de LO. Patrón de expresión del ARNm de *ctl-1+3* bajo un ciclo de luz/oscuridad (400/0 lux, ZT0: 9 am) de 12 h: 12 h a 18 ± 0,5°C (n = 3; LO, P < 0,05; OO, P < 0,001; *P < 0,05, T29 vs T41, ANOVA de una vía, seguido por un *test* de Dunnet de comparación de grupos). Los niveles de expresión fueron normalizados a la expresión de tres genes de referencia constitutivos: *cdc-42*, *pmp-3* and *Y45F10D.4* (Hoogewijs, et al. 2008) y relativizados al valor de expresión máximo. Los datos se muestran como un promedio ± SEM de 3 muestras biológicas independientes (n).

En este caso, se generaron nematodos transgénicos con el constructo *Pctl-3::luc::gfp*, ya que es probable entonces que sea este gen el que contribuya principalmente al ritmo observado en el ARNm y la actividad. Los animales transgénicos mostraron fluorescencia en la faringe y neuronas del ganglio de la cabeza, en los cordones ventrales y dorsales a lo largo de todo el cuerpo, otras neuronas adicionales no identificadas y el ganglio de la cola (Figura A.13). Además, ésta línea transgénica también produce luz detectable por al menos 7 días bajo condiciones de oscuridad y 20°C (Figura A14).

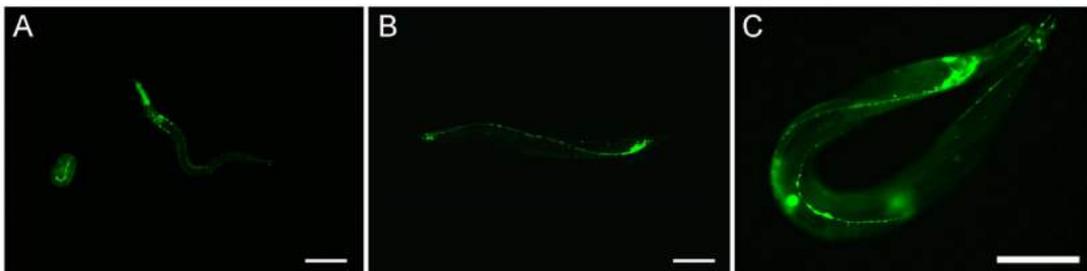


Figura A.13 | Microscopía de fluorescencia de nematodos transgénicos con el constructo *Pctl-3-luc::gfp*. **A** | Embrión y nematodo de estadio L3. **B** | Nematodo de estadio joven adulto. **C** | Nematodo adulto de varios días, que contiene ya embriones. Se muestra con mayor detalle la faringe y ganglio de la cabeza, los cordones dorsales y ventrales que recorren todo el cuerpo, otros axones neuronales, y el ganglio de la cola. Barra de escala, 50 μ m.

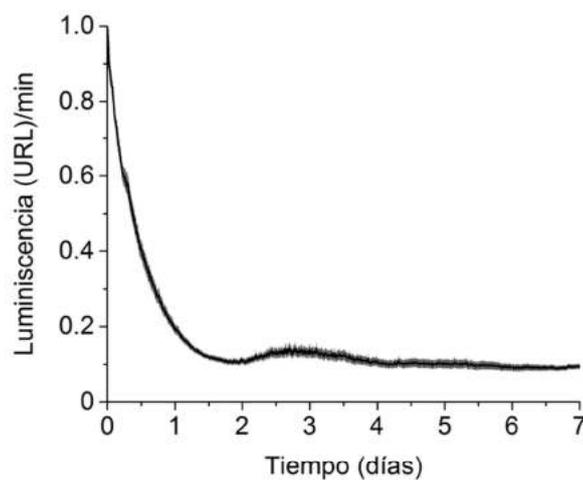


Figura A.14 | Luminiscencia emitida por nematodos transgénicos con el constructo *Pctl-3::luc::gfp*. La luminiscencia fue registrada a partir de 100 nematodos L4 de la línea que mostraba mayor expresión bajo lupa de fluorescencia, bajo OO (oscuridad y 20°C). La señal fue integrada durante 1 minuto y medida en intervalos de 10 minutos. Los datos corresponden al promedio \pm SEM ($n = 8$). URL: Unidades relativas de luminiscencia.

La regulación circadiana de la expresión de *ctl-3* y de la actividad catalasa total, apoyan la noción de un estado redox controlado fuertemente por el reloj en el nematodo. Además, otros experimentos sin publicar del laboratorio también muestran que la expresión de *sod-3*, uno de los genes codificantes para la enzima superóxido dismutasa, encargada de convertir el ión superóxido en H_2O_2 , está regulada de manera circadiana, con un pico a ZT9/CT9. Asimismo, como se describió en capítulos anteriores, el estado de oxidación de las peroxirredoxinas también está bajo el control del reloj en *C. elegans* (Edgar, et al. 2012; Olmedo, et al. 2012). Esto abre las puertas para investigar cómo se regula el estado redox mediante la aplicación del sistema reportero bajo ciclos de LO con el reportero *Pctl-3::luc::gfp*. Se podría evaluar por ejemplo si los nematodos son capaces de sincronizarse por pulsos de H_2O_2 tal como se mencionó durante la introducción, y comprobar si los fotorreceptores son entonces en realidad sistemas sensibles a especies reactivas de oxígeno generadas por la luz y son estas señales redox las que necesita el reloj para sensar el tiempo. Además, será relevante analizar si los niveles de H_2O_2 varían de manera circadiana en experimentos poblacionales mediante ensayos enzimáticos en distintos puntos horarios. Finalmente, sería ideal poder analizar el estado redox *in vivo* de los nematodos, para lo cual contamos con una cepa transgénica con el sensor *Hyper* (Back, et al. 2012). Este sensor consiste de una YFP modificada con dos dominios regulatorios del factor de transcripción OxyR (OxyR-RD), que al ser oxidado por el H_2O_2 , sufre un cambio conformacional por la formación de un puente disulfuro (reversible por glutaredoxina-1 y glutatión) y esto genera un cambio cuantificable en la fluorescencia. Todos estos experimentos serán esenciales para comprender cómo interaccionan el estado redox y el reloj, y porqué la cepa GA800 que sobre-expresa las catalasas es significativamente mejor que la cepa *wild-type* en el entrenamiento bajo ciclos LO en experimentos de actividad locomotora.

Neuropéptidos regulados por el reloj: el caso de NLP-36

Finalmente, se evaluó el caso de *nlp-36* bajo el ciclo de luz/oscuridad (400/0 lux, ZT0: 9 am) de 12 h: 12 h a $18 \pm 0,5$ °C. Como se dijo anteriormente, este gen fue descrito como no rítmico bajo LO, por lo que era un buen control negativo a considerar para los estudios de

PCR en tiempo real. Efectivamente, tal como se esperaba, el gen resultó constitutivo bajo estas condiciones (Figura A.15).

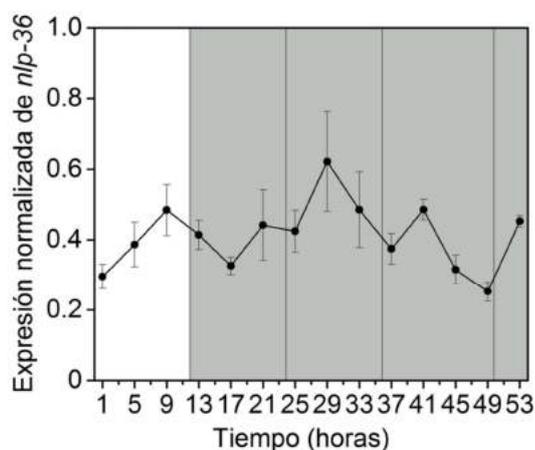


Figura A.15 | Regulación transcripcional de *nlp-36* bajo un ciclo de LO. Patrón de expresión del ARNm de *nlp-36* bajo un ciclo de luz/oscuridad (400/0 lux, ZT0: 9 am) de 12 h: 12 h a $18 \pm 0,5^\circ\text{C}$ ($n = 3$; LO y OO, ns, ANOVA de una vía, seguido por un test de Dunnet de comparación de grupos). Los niveles de expresión fueron normalizados a la expresión de tres genes de referencia constitutivos: *cdc-42*, *pmp-3* and *Y45F10D.4* (Hoogewijs, et al. 2008) y relativizados al valor de expresión máximo. Los datos se muestran como un promedio \pm SEM de 3 muestras biológicas independientes (n).

Por último, se microinyectaron nematodos con el constructo *Pnlp-36::luc::gfp*, y el análisis de las primeras líneas muestra que su expresión es muy fuerte en el intestino, y en neuronas de la cabeza y de la cola, consistente con lo publicado previamente (van der Linden, et al. 2010) (Figura A.16).



Figura A.16 | Microscopía de fluorescencia de nematodos transgénicos con el constructo *Pnlp-36::luc::gfp*. A) Embrión y nematodo de estadio L4. B) Nematodo adulto. C) Nematodo joven adulto, donde se observa con mayor las células marcadas de la cabeza y la cola. Barra de escala, 50 μm .

Finalmente, los datos crudos del registro de luminiscencia *in vivo* bajo condiciones constantes (oscuridad y 20°C) mostraron un patrón totalmente diferente de luz, la cual muestra una oscilación durante el primer día que quizás esté relacionada también con un

cambio de expresión en el pasaje de L4 a adulto, y luego una señal estable que se mantiene prácticamente constante (Figura A.17). Esto podría significar que se trata de un neuropéptido esencial en la regulación de alguna función durante el estadio adulto, por ejemplo durante el envejecimiento o el *life span*. Además, estos resultados muestran que el reportero es capaz de revelar las distintas regulaciones en la expresión de los distintos genes *in vivo*, y que será una herramienta muy útil para la caracterización no solo de los genes mostrados en este anexo, sino de cualquier gen de interés en el nematodo que se quiera estudiar en el futuro, para cronobiología o para cualquier otra área de investigación.

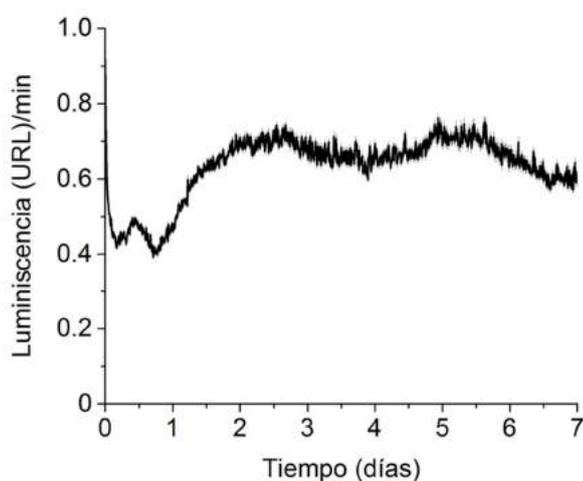


Figura A.17| Luminiscencia emitida por nematodos transgénicos con el constructo *Pnlp-36::luc::gfp*. La luminiscencia fue registrada a partir de 100 nematodos L4 de la línea que mostraba mayor expresión bajo lupa de fluorescencia, bajo OO (oscuridad y 20°C). La señal fue integrada durante 1 minuto y medida en intervalos de 10 minutos. Los datos corresponden al promedio \pm SEM ($n = 8$). URL: Unidades relativas de luminiscencia.

Bibliografía

Bibliografía

Circadian clocks : role in health and disease.

- Abbott, A. L., E. Alvarez-Saavedra, E. A. Miska, N. C. Lau, D. P. Bartel, H. R. Horvitz y V. Ambros. 2005. The let-7 MicroRNA family members mir-48, mir-84, and mir-241 function together to regulate developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Cell* **9**:403-414.
- Agapito, M. T., I. Redondo, R. Plaza, S. Lopez-Burillo, J. M. Recio y M. I. Pablos. 1999. Relationships between melatonin, glutathione peroxidase, glutathione reductase, and catalase. Endogenous rhythms on cerebral cortex in *Gallus domesticus*. *Adv Exp Med Biol* **460**:377-381.
- Albertson, D. G. y J. N. Thomson. 1976. The pharynx of *Caenorhabditis elegans*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **275**:299-325.
- Altun, Z. F. y D. H. Hall. 2012. Handbook of *C. elegans* Anatomy. *en* WormAtlas, <http://www.wormatlas.org/hermaphrodite/hermaphroditehomepage.htm>.
- Allada, R., N. E. White, W. V. So, J. C. Hall y M. Rosbash. 1998. A mutant *Drosophila* homolog of mammalian Clock disrupts circadian rhythms and transcription of period and timeless. *Cell* **93**:791-804.
- Antoch, M. P., E. J. Song, A. M. Chang, M. H. Vitaterna, Y. Zhao, L. D. Wilsbacher, A. M. Sangoram, D. P. King, L. H. Pinto y J. S. Takahashi. 1997. Functional identification of the mouse circadian Clock gene by transgenic BAC rescue. *Cell* **89**:655-667.
- Asai, M., S. Yamaguchi, H. Isejima, M. Jonouchi, T. Moriya, S. Shibata, M. Kobayashi y H. Okamura. 2001. Visualization of mPer1 transcription in vitro: NMDA induces a rapid phase shift of mPer1 gene in cultured SCN. *Curr Biol* **11**:1524-1527.
- Aschoff, J. 1965. Circadian clocks; proceedings. North-Holland Pub. Co., Amsterdam,.
- Aschoff, J. W., R. 1962b. Über Phasenbeziehungen zwischen biologischer Tagesperiodik und Zeitgeberperiodik. *. Z vergl Physiol* **46**:115-128.
- Ashmore, L. J. y A. Sehgal. 2003. A fly's eye view of circadian entrainment. *J Biol Rhythms* **18**:206-216.
- Back, P., W. H. De Vos, G. G. Depuydt, F. Matthijssens, J. R. Vanfleteren y B. P. Braeckman. 2012. Exploring real-time in vivo redox biology of developing and aging *Caenorhabditis elegans*. *Free Radic Biol Med* **52**:850-859.
- Baker, C. L., J. J. Loros y J. C. Dunlap. 2012. The circadian clock of *Neurospora crassa*. *FEMS Microbiol Rev* **36**:95-110.
- Banerjee, D., A. Kwok, S. Y. Lin y F. J. Slack. 2005. Developmental timing in *C. elegans* is regulated by kin-20 and tim-1, homologs of core circadian clock genes. *Dev Cell* **8**:287-295.
- Barak, S., E. M. Tobin, C. Andronis, S. Sugano y R. M. Green. 2000. All in good time: the Arabidopsis circadian clock. *Trends Plant Sci* **5**:517-522.
- Bargmann, C. I. 2006. Chemosensation in *C. elegans*. *WormBook*:1-29.
- Bargmann, C. I. y L. Avery. 1995. Laser killing of cells in *Caenorhabditis elegans*. *Methods Cell Biol* **48**:225-250.
- Bargmann, C. I., E. Hartwig y H. R. Horvitz. 1993. Odorant-selective genes and neurons mediate olfaction in *C. elegans*. *Cell* **74**:515-527.
- Barrière, A. y M.-A. Félix. 2006. Isolation of *C. elegans* and related nematodes. *en* T. C. e. R. Community, editor. *Wormbook*, <http://www.wormbook.org>.
- Barrios, A., R. Ghosh, C. Fang, S. W. Emmons y M. M. Barr. 2012. PDF-1 neuropeptide signaling modulates a neural circuit for mate-searching behavior in *C. elegans*. *Nat Neurosci* **15**:1675-1682.
- Bass, J. 2012. Circadian topology of metabolism. *Nature* **491**:348-356.
- Bell-Pedersen, D., V. M. Cassone, D. J. Earnest, S. S. Golden, P. E. Hardin, T. L. Thomas y M. J. Zoran. 2005. Circadian rhythms from multiple oscillators: lessons from diverse organisms. *Nat Rev Genet* **6**:544-556.
- Bertoni, G. 2012. Circadian rhythms require proper RNA splicing. *Plant Cell* **24**:3856.

- Beverly, M., S. Anbil y P. Sengupta. 2011. Degeneracy and neuromodulation among thermosensory neurons contribute to robust thermosensory behaviors in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci* **31**:11718-11727.
- Bhatla, N. y H. R. Horvitz. 2015. Light and hydrogen peroxide inhibit *C. elegans* Feeding through gustatory receptor orthologs and pharyngeal neurons. *Neuron* **85**:804-818.
- Bianchi, J. I., J. C. Stockert, L. I. Buzzi, A. Blazquez-Castro y S. H. Simonetta. 2015. Reliable Screening of Dye Phototoxicity by Using a *Caenorhabditis elegans* Fast Bioassay. *PLoS One* **10**:e0128898.
- Biron, D., M. Shibuya, C. Gabel, S. M. Wasserman, D. A. Clark, A. Brown, P. Sengupta y A. D. Samuel. 2006. A diacylglycerol kinase modulates long-term thermotactic behavioral plasticity in *C. elegans*. *Nat Neurosci* **9**:1499-1505.
- Biron, D., S. Wasserman, J. H. Thomas, A. D. Samuel y P. Sengupta. 2008. An olfactory neuron responds stochastically to temperature and modulates *Caenorhabditis elegans* thermotactic behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**:11002-11007.
- Blaxter, M. y D. R. Denver. 2012. The worm in the world and the world in the worm. *BMC Biol* **10**:57.
- Blumenthal, T. 2004. Operons in eukaryotes. *Brief Funct Genomic Proteomic* **3**:199-211.
- Blumenthal, T. 2005. Trans-splicing and operons. *WormBook*:1-9.
- Blumenthal, T. 2012. Trans-splicing and operons in *C. elegans*. *WormBook*:1-11.
- Blumenthal, T. y K. S. Gleason. 2003. *Caenorhabditis elegans* operons: form and function. *Nat Rev Genet* **4**:112-120.
- Bourlat, S. J., C. Nielsen, A. D. Economou y M. J. Telford. 2008. Testing the new animal phylogeny: a phylum level molecular analysis of the animal kingdom. *Mol Phylogenet Evol* **49**:23-31.
- Braeckman, B. P., K. Houthoofd, A. De Vreese y J. R. Vanfleteren. 2002. Assaying metabolic activity in ageing *Caenorhabditis elegans*. *Mech Ageing Dev* **123**:105-119.
- Brandes, C., J. D. Plautz, R. Stanewsky, C. F. Jamison, M. Straume, K. V. Wood, S. A. Kay y J. C. Hall. 1996. Novel features of *Drosophila* period Transcription revealed by real-time luciferase reporting. *Neuron* **16**:687-692.
- Brenner, S. 1974. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **77**:71-94.
- Bretscher, A. J., E. Kodama-Namba, K. E. Busch, R. J. Murphy, Z. Soltesz, P. Laurent y M. de Bono. 2011. Temperature, oxygen, and salt-sensing neurons in *C. elegans* are carbon dioxide sensors that control avoidance behavior. *Neuron* **69**:1099-1113.
- Brinster, R. L., J. M. Allen, R. R. Behringer, R. E. Gelinas y R. D. Palmiter. 1988. Introns increase transcriptional efficiency in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**:836-840.
- Brown, S. A., E. Kowalska y R. Dallmann. 2012. (Re)inventing the circadian feedback loop. *Dev Cell* **22**:477-487.
- Buchman, A. R. y P. Berg. 1988. Comparison of intron-dependent and intron-independent gene expression. *Mol Cell Biol* **8**:4395-4405.
- Bunning, E. 1973. *The Physiological Clock: Circadian rhythms and biological chronometry*. English Universities Press, London.
- Burkewitz, K., K. P. Choe, E. C. Lee, A. Deonarine y K. Strange. 2012. Characterization of the proteostasis roles of glycerol accumulation, protein degradation and protein synthesis during osmotic stress in *C. elegans*. *PLoS One* **7**:e34153.
- Cassada, R. C. y R. L. Russell. 1975. The dauerlarva, a post-embryonic developmental variant of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* **46**:326-342.
- Ceriani, M. F., T. K. Darlington, D. Staknis, P. Mas, A. A. Petti, C. J. Weitz y S. A. Kay. 1999. Light-dependent sequestration of TIMELESS by CRYPTOCHROME. *Science* **285**:553-556.
- Cermakian, N. y P. Sassone-Corsi. 2000. Multilevel regulation of the circadian clock. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**:59-67.
- Claridge-Chang, A., H. Wijnen, F. Naef, C. Boothroyd, N. Rajewsky y M. W. Young. 2001. Circadian regulation of gene expression systems in the *Drosophila* head. *Neuron* **32**:657-671.

- Clark, D. A., D. Biron, P. Sengupta y A. D. Samuel. 2006. The AFD sensory neurons encode multiple functions underlying thermotactic behavior in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci* **26**:7444-7451.
- Close, D. M., S. S. Patterson, S. Ripp, S. J. Baek, J. Sanseverino y G. S. Sayler. 2010. Autonomous bioluminescent expression of the bacterial luciferase gene cassette (*lux*) in a mammalian cell line. *PLoS One* **5**:e12441.
- Coburn, C. M. y C. I. Bargmann. 1996. A putative cyclic nucleotide-gated channel is required for sensory development and function in *C. elegans*. *Neuron* **17**:695-706.
- Collins, J. J., C. Huang, S. Hughes y K. Kornfeld. 2008. The measurement and analysis of age-related changes in *Caenorhabditis elegans*. *WormBook*:1-21.
- Corish, P. y C. Tyler-Smith. 1999. Attenuation of green fluorescent protein half-life in mammalian cells. *Protein Eng* **12**:1035-1040.
- Corsi A. K., W. B., Chalfie M. 2015. Transparent window into biology: A primer on *Caenorhabditis elegans*. *en* D. S. E. A., editor. *The C. elegans Research Community, WormBook*. WormBook, ed, <http://www.wormbook.org>.
- Coto-Montes, A., J. A. Boga, C. Tomas-Zapico, M. J. Rodriguez-Colunga, J. Martinez-Fraga, D. Tolivia-Cadreacha, G. Menendez, R. Hardeland y D. Tolivia. 2001. Physiological oxidative stress model: Syrian hamster Harderian gland-sex differences in antioxidant enzymes. *Free Radic Biol Med* **30**:785-792.
- Chan, R. C., A. Chan, M. Jeon, T. F. Wu, D. Pasqualone, A. E. Rougvié y B. J. Meyer. 2003. Chromosome cohesion is regulated by a clock gene paralogue TIM-1. *Nature* **423**:1002-1009.
- Chang, D. C. 2006. Neural circuits underlying circadian behavior in *Drosophila melanogaster*. *Behav Processes* **71**:211-225.
- Chang, D. C. y S. M. Reppert. 2003. A novel C-terminal domain of *drosophila* PERIOD inhibits dCLOCK:CYCLE-mediated transcription. *Curr Biol* **13**:758-762.
- Chelur, D. S. y M. Chalfie. 2007. Targeted cell killing by reconstituted caspases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:2283-2288.
- Chen, Z., E. A. Odstrcil, B. P. Tu y S. L. McKnight. 2007. Restriction of DNA replication to the reductive phase of the metabolic cycle protects genome integrity. *Science* **316**:1916-1919.
- Daan, S. 2010. *The Circadian Clock*. *en* U. Albrecht, editor. *Protein Reviews Springer-Verlag*, New York.
- Daan, S. y J. Aschoff. 2011. The entrainment of circadian systems. pp. 7-34 *en* J. S. Takahashi, F. W. Turek y R. Y. Moore, editores. *Circadian clocks*. Kluwer Academic/Plenum, New York.
- Darlington, T. K., L. C. Lyons, P. E. Hardin y S. A. Kay. 2000. The period E-box is sufficient to drive circadian oscillation of transcription in vivo. *J Biol Rhythms* **15**:462-471.
- De Candolle, A. P. 1832. *Physiologie Végétale*. *en* J. Bechet, editor., Paris.
- De Mairan, J. J. 1729. *Observation Botanique* pp. pp. 35-36 *Histoire de L'Academie royale des sciences*, Paris.
- DeCoursey, P. J. 1986. Light-sampling behavior in photoentrainment of a rodent circadian rhythm. *J Comp Physiol A* **159**:161-169.
- Dodd, A. N., N. Salathia, A. Hall, E. Kevei, R. Toth, F. Nagy, J. M. Hibberd, A. J. Millar y A. A. Webb. 2005. Plant circadian clocks increase photosynthesis, growth, survival, and competitive advantage. *Science* **309**:630-633.
- Dowse, H. B. 2013. Maximum entropy spectral analysis for circadian rhythms: theory, history and practice. *J Circadian Rhythms* **11**:6.
- Duerr, J. S. 2006. *Immunohistochemistry*. *WormBook*:1-61.
- Duhanel Du Monceau, D. 1759. *La Physique Des Arbres. Seconde Partie*. *en* H. L. Guerin y L. F. Delatour, editores., Paria.
- Dunlap, J. C., J. J. Loros y P. J. DeCoursey. 2004. *Chronobiology : biological timekeeping*. Sinauer Associates, Sunderland, Mass.
- Edelman, T. L., K. A. McCulloch, A. Barr, C. Frokjaer-Jensen, E. M. Jorgensen y A. E. Rougvié. 2016. Analysis of a *lin-42/Period* Null Allele Implicates All Three Isoforms in Regulation of *Caenorhabditis elegans* Molting and Developmental Timing. *G3 (Bethesda)*.

- Edgar, R. S., E. W. Green, Y. Zhao, G. van Ooijen, M. Olmedo, X. Qin, Y. Xu, M. Pan, U. K. Valekunja, K. A. Feeney, E. S. Maywood, M. H. Hastings, N. S. Baliga, M. Mellow, A. J. Millar, C. H. Johnson, C. P. Kyriacou, J. S. O'Neill y A. B. Reddy. 2012. Peroxiredoxins are conserved markers of circadian rhythms. *Nature* **485**:459-464.
- Edwards, S. L., N. K. Charlie, M. C. Milfort, B. S. Brown, C. N. Gravlin, J. E. Knecht y K. G. Miller. 2008. A novel molecular solution for ultraviolet light detection in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Biol* **6**:e198.
- Eldridge, M. L., J. Sanseverino, A. C. Layton, J. P. Easter, T. W. Schultz y G. S. Saylor. 2007. *Saccharomyces cerevisiae* BLYAS, a new bioluminescent bioreporter for detection of androgenic compounds. *Appl Environ Microbiol* **73**:6012-6018.
- Elhai, J. y C. P. Wolk. 1988. Conjugal transfer of DNA to cyanobacteria. *Methods Enzymol* **167**:747-754.
- Etchegaray, J. P., K. K. Machida, E. Noton, C. M. Constance, R. Dallmann, M. N. Di Napoli, J. P. DeBruyne, C. M. Lambert, E. A. Yu, S. M. Reppert y D. R. Weaver. 2009. Casein kinase 1 delta regulates the pace of the mammalian circadian clock. *Mol Cell Biol* **29**:3853-3866.
- Etchegaray, J. P., E. A. Yu, P. Indic, R. Dallmann y D. R. Weaver. 2010. Casein kinase 1 delta (CK1delta) regulates period length of the mouse suprachiasmatic circadian clock in vitro. *PLoS One* **5**:e10303.
- Evans, T. C. 2006. Transformation and microinjection. *en WormBook*, editor. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.108.1, <http://www.wormbook.org>.
- Felix, M. A. y C. Braendle. 2010. The natural history of *Caenorhabditis elegans*. *Curr Biol* **20**:R965-969.
- Felix, M. A. y F. Duveau. 2012. Population dynamics and habitat sharing of natural populations of *Caenorhabditis elegans* and *C. briggsae*. *BMC Biol* **10**:59.
- Fiedler, T. y M. Rehmsmeier. 2006. jPREdictor: a versatile tool for the prediction of cis-regulatory elements. *Nucleic Acids Res* **34**:W546-550.
- Fire, A., S. W. Harrison y D. Dixon. 1990. A modular set of lacZ fusion vectors for studying gene expression in *Caenorhabditis elegans*. *Gene* **93**:189-198.
- Fire, A., J. , W. Ahnn, B. Kelly, S. Harfe, J. Kostas, M. Hsieh y H. a. S. Xu. 1998. GFP applications in *C. elegans*. pp. 153-168 *en* M. C. a. S. Kain, editor. *GFP Strategies and Applications*. John Wiley & Sons, New York.
- Forman, H. J., M. Maiorino y F. Ursini. 2010. Signaling functions of reactive oxygen species. *Biochemistry* **49**:835-842.
- Frand, A. R., S. Russel y G. Ruvkun. 2005. Functional genomic analysis of *C. elegans* molting. *PLoS Biol* **3**:e312.
- Frezal, L. y M. A. Felix. 2015. The Natural History Of Model Organisms: *C. elegans* outside the Petri dish. *Elife* **4**.
- Froy, O. 2011. The circadian clock and metabolism. *Clin Sci (Lond)* **120**:65-72.
- Fu, Y. H. 2008. Oscillating per-cision. *PLoS Biol* **6**:e192.
- Gegear, R. J., A. Casselman, S. Waddell y S. M. Reppert. 2008. Cryptochrome mediates light-dependent magnetosensitivity in *Drosophila*. *Nature* **454**:1014-1018.
- Gietz, R. D. y R. A. Woods. 2002. Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol* **350**:87-96.
- Gilestro, G. F. 2012. Video tracking and analysis of sleep in *Drosophila melanogaster*. *Nat Protoc* **7**:995-1007.
- Golden, S. S. y S. R. Canales. 2003. Cyanobacterial circadian clocks--timing is everything. *Nat Rev Microbiol* **1**:191-199.
- Golden, S. S., M. Ishiura, C. H. Johnson y T. Kondo. 1997. Cyanobacterial Circadian Rhythms. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **48**:327-354.
- Golden, S. S. y L. A. Sherman. 1983. A hybrid plasmid is a stable cloning vector for the cyanobacterium *Anacystis nidulans* R2. *J Bacteriol* **155**:966-972.
- Golden, S. S. y L. A. Sherman. 1984. Optimal conditions for genetic transformation of the cyanobacterium *Anacystis nidulans* R2. *J Bacteriol* **158**:36-42.

- Golombek, D. A. 2002. Cronobiología Humana. Ritmos y relojes biológicos en la salud y en la enfermedad. Universidad Nacional de Quilmes.
- Golombek, D. A. 2007. Cronobiología Humana. Ritmos y relojes Biológicos en la salud y en la enfermedad. Universidad Nacional de Quilmes.
- Golombek, D. A. y R. E. Rosenstein. 2010. Physiology of circadian entrainment. *Physiol Rev* **90**:1063-1102.
- Granados-Fuentes, D., L. M. Prolo, U. Abraham y E. D. Herzog. 2004. The suprachiasmatic nucleus entrains, but does not sustain, circadian rhythmicity in the olfactory bulb. *J Neurosci* **24**:615-619.
- Green, C. B., J. S. Takahashi y J. Bass. 2008. The meter of metabolism. *Cell* **134**:728-742.
- Green, M. R. y J. Sambrook. 2012. Molecular cloning : a laboratory manual. 4th edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Greer, L. F., 3rd y A. A. Szalay. 2002. Imaging of light emission from the expression of luciferases in living cells and organisms: a review. *Luminescence* **17**:43-74.
- Grewal, P. S. 1991. Influence of Bacteria and Temperature On the Reproduction of *Caenorhabditis Elegans* (Nematoda: Rhabditidae) Infesting Mushrooms (*Agaricus bisporus*). *Nematologica* **37**:72-82.
- Grima, B., E. Chelot, R. Xia y F. Rouyer. 2004. Morning and evening peaks of activity rely on different clock neurons of the *Drosophila* brain. *Nature* **431**:869-873.
- Gu, T., S. Orita y M. Han. 1998. *Caenorhabditis elegans* SUR-5, a novel but conserved protein, negatively regulates LET-60 Ras activity during vulval induction. *Mol Cell Biol* **18**:4556-4564.
- Gupta, R. K., S. S. Patterson, S. Ripp, M. L. Simpson y G. S. Saylor. 2003. Expression of the *Photobacterium luminescens* lux genes (luxA, B, C, D, and E) in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* **4**:305-313.
- Hall, J. C. 2005. Systems Approaches to Biological Rhythms in *Drosophila*. *en* M. W. Young, editor. *Methods in Enzymology, Circadian Rhythms*. Elsevier Academic Press, San Diego, California.
- Hardeland, R., A. Coto-Montes y B. Poeggeler. 2003. Circadian rhythms, oxidative stress, and antioxidative defense mechanisms. *Chronobiol Int* **20**:921-962.
- Harmer, S. L., J. B. Hogenesch, M. Straume, H. S. Chang, B. Han, T. Zhu, X. Wang, J. A. Kreps y S. A. Kay. 2000. Orchestrated transcription of key pathways in *Arabidopsis* by the circadian clock. *Science* **290**:2110-2113.
- Harmer, S. L., S. Panda y S. A. Kay. 2001. Molecular bases of circadian rhythms. *Annu Rev Cell Dev Biol* **17**:215-253.
- Hasegawa, K., T. Saigusa y Y. Tamai. 2005. *Caenorhabditis elegans* opens up new insights into circadian clock mechanisms. *Chronobiol Int* **22**:1-19.
- Hasegawa, Y. y M. Arita. 2014. Circadian clocks optimally adapt to sunlight for reliable synchronization. *J R Soc Interface* **11**:20131018.
- Hastings, J. W. 1989. Chemistry, clones, and circadian control of the dinoflagellate bioluminescent system. The Marlene DeLuca memorial lecture. *J Biolumin Chemilumin* **4**:12-19.
- Hedgecock, E. M. y R. L. Russell. 1975. Normal and mutant thermotaxis in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**:4061-4065.
- Hendriks, G. J., D. Gaidatzis, F. Aeschmann y H. Grosshans. 2014. Extensive oscillatory gene expression during *C. elegans* larval development. *Mol Cell* **53**:380-392.
- Herrero, A., A. Romanowski, E. Meelkop, C. S. Caltart, L. Schoofs y D. A. Golombek. 2015. Pigment-dispersing factor signaling in the circadian system of *Caenorhabditis elegans*. *Genes Brain Behav* **14**:493-501.
- Hirayama, J., S. Cho y P. Sassone-Corsi. 2007. Circadian control by the reduction/oxidation pathway: catalase represses light-dependent clock gene expression in the zebrafish. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:15747-15752.
- Hobert, O. 2003. Behavioral plasticity in *C. elegans*: paradigms, circuits, genes. *J Neurobiol* **54**:203-223.

- Hoffmann, K. 1969. Zum Einfluß der Zeitgeberstärke auf die Phasenlage der synchronisierten circadianen Periodik. *Z Vergl Physiol.* **62**:93-110.
- Hoogewijs, D., K. Houthoofd, F. Matthijssens, J. Vandesompele y J. R. Vanfleteren. 2008. Selection and validation of a set of reliable reference genes for quantitative sod gene expression analysis in *C. elegans*. *BMC Mol Biol* **9**:9.
- Huang, T. C., J. Tu, T. J. Chow y T. H. Chen. 1990. Circadian Rhythm of the Prokaryote *Synechococcus* sp. RF-1. *Plant Physiol* **92**:531-533.
- Husson, S. J., E. Clynen, G. Baggerman, A. De Loof y L. Schoofs. 2005. Discovering neuropeptides in *Caenorhabditis elegans* by two dimensional liquid chromatography and mass spectrometry. *Biochem Biophys Res Commun* **335**:76-86.
- Ikeda, M., T. Sugiyama, C. S. Wallace, H. S. Gompf, T. Yoshioka, A. Miyawaki y C. N. Allen. 2003. Circadian dynamics of cytosolic and nuclear Ca²⁺ in single suprachiasmatic nucleus neurons. *Neuron* **38**:253-263.
- Inada, H., H. Ito, J. Satterlee, P. Sengupta, K. Matsumoto y I. Mori. 2006. Identification of guanylyl cyclases that function in thermosensory neurons of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **172**:2239-2252.
- Isojima, Y., M. Nakajima, H. Ukai, H. Fujishima, R. G. Yamada, K. H. Masumoto, R. Kiuchi, M. Ishida, M. Ukai-Tadenuma, Y. Minami, R. Kito, K. Nakao, W. Kishimoto, S. H. Yoo, K. Shimomura, T. Takao, A. Takano, T. Kojima, K. Nagai, Y. Sakaki, J. S. Takahashi y H. R. Ueda. 2009. CKlepsilon/delta-dependent phosphorylation is a temperature-insensitive, period-determining process in the mammalian circadian clock. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**:15744-15749.
- Janssen, T., S. J. Husson, M. Lindemans, I. Mertens, S. Rademakers, K. Ver Donck, J. Geysen, G. Jansen y L. Schoofs. 2008. Functional characterization of three G protein-coupled receptors for pigment dispersing factors in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem* **283**:15241-15249.
- Janssen, T., S. J. Husson, E. Meelkop, L. Temmerman, M. Lindemans, K. Verstraelen, S. Rademakers, I. Mertens, M. Nitabach, G. Jansen y L. Schoofs. 2009. Discovery and characterization of a conserved pigment dispersing factor-like neuropeptide pathway in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurochem* **111**:228-241.
- Jarrell, T. A., Y. Wang, A. E. Bloniarz, C. A. Brittin, M. Xu, J. N. Thomson, D. G. Albertson, D. H. Hall y S. W. Emmons. 2012. The connectome of a decision-making neural network. *Science* **337**:437-444.
- Jeon, M., H. F. Gardner, E. A. Miller, J. Deshler y A. E. Rougvié. 1999. Similarity of the *C. elegans* developmental timing protein LIN-42 to circadian rhythm proteins. *Science* **286**:1141-1146.
- Jiang, H., R. Guo y J. A. Powell-Coffman. 2001. The *Caenorhabditis elegans* hif-1 gene encodes a bHLH-PAS protein that is required for adaptation to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:7916-7921.
- Johnson, C. H., J. A. Elliott y R. Foster. 2003. Entrainment of circadian programs. *Chronobiol Int* **20**:741-774.
- Jose, A. M., J. J. Smith y C. P. Hunter. 2009. Export of RNA silencing from *C. elegans* tissues does not require the RNA channel SID-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**:2283-2288.
- Kaneko, H., L. M. Head, J. Ling, X. Tang, Y. Liu, P. E. Hardin, P. Emery y F. N. Hamada. 2012. Circadian rhythm of temperature preference and its neural control in *Drosophila*. *Curr Biol* **22**:1851-1857.
- Kaneko, M. y G. M. Cahill. 2005. Light-dependent development of circadian gene expression in transgenic zebrafish. *PLoS Biol* **3**:e34.
- Kaneko, M., N. Hernandez-Borsetti y G. M. Cahill. 2006. Diversity of zebrafish peripheral oscillators revealed by luciferase reporting. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:14614-14619.
- Kelly, W. G., S. Xu, M. K. Montgomery y A. Fire. 1997. Distinct requirements for somatic and germline expression of a generally expressed *Caenorhabditis elegans* gene. *Genetics* **146**:227-238.

- Kessin, R. H., G. G. Gundersen, V. Zaydfudim y M. Grimson. 1996. How cellular slime molds evade nematodes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:4857-4861.
- Kimata, T., H. Sasakura, N. Ohnishi, N. Nishio y I. Mori. 2012. Thermotaxis of *C. elegans* as a model for temperature perception, neural information processing and neural plasticity. *Worm* **1**:31-41.
- Kimura, K. D., A. Miyawaki, K. Matsumoto y I. Mori. 2004. The *C. elegans* thermosensory neuron AFD responds to warming. *Curr Biol* **14**:1291-1295.
- Kiontke, K. y W. Sudhaus. 2006. Ecology of *Caenorhabditis* species. *en* T. C. e. R. Community, editor. Wormbook, <http://www.wormbook.org>.
- Kippert, F., D. S. Saunders y M. L. Blaxter. 2002. *Caenorhabditis elegans* has a circadian clock. *Curr Biol* **12**:R47-49.
- Kitayama, Y., T. Nishiwaki, K. Terauchi y T. Kondo. 2008. Dual KaiC-based oscillations constitute the circadian system of cyanobacteria. *Genes Dev* **22**:1513-1521.
- Kivimae, S., L. Saez y M. W. Young. 2008. Activating PER repressor through a DBT-directed phosphorylation switch. *PLoS Biol* **6**:e183.
- Kloss, B., J. L. Price, L. Saez, J. Blau, A. Rothenfluh, C. S. Wesley y M. W. Young. 1998. The *Drosophila* clock gene double-time encodes a protein closely related to human casein kinase Iε. *Cell* **94**:97-107.
- Ko, C. H. y J. S. Takahashi. 2006. Molecular components of the mammalian circadian clock. *Hum Mol Genet* **15 Spec No 2**:R271-277.
- Koch, R., H. G. van Luenen, M. van der Horst, K. L. Thijssen y R. H. Plasterk. 2000. Single nucleotide polymorphisms in wild isolates of *Caenorhabditis elegans*. *Genome Res* **10**:1690-1696.
- Komatsu, H., I. Mori, J. S. Rhee, N. Akaike y Y. Ohshima. 1996. Mutations in a cyclic nucleotide-gated channel lead to abnormal thermosensation and chemosensation in *C. elegans*. *Neuron* **17**:707-718.
- Kondo, T. y M. Ishiura. 1994. Circadian rhythms of cyanobacteria: monitoring the biological clocks of individual colonies by bioluminescence. *J Bacteriol* **176**:1881-1885.
- Kondo, T., C. A. Strayer, R. D. Kulkarni, W. Taylor, M. Ishiura, S. S. Golden y C. H. Johnson. 1993. Circadian rhythms in prokaryotes: luciferase as a reporter of circadian gene expression in cyanobacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**:5672-5676.
- Kondratova, A. A. y R. V. Kondratov. 2012. The circadian clock and pathology of the ageing brain. *Nat Rev Neurosci* **13**:325-335.
- Konopka, R. J. y S. Benzer. 1971. Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **68**:2112-2116.
- Kramer, J. M., R. P. French, E. C. Park y J. J. Johnson. 1990. The *Caenorhabditis elegans* rol-6 gene, which interacts with the *sqt-1* collagen gene to determine organismal morphology, encodes a collagen. *Mol Cell Biol* **10**:2081-2089.
- Krishnan, N., A. J. Davis y J. M. Giebultowicz. 2008. Circadian regulation of response to oxidative stress in *Drosophila melanogaster*. *Biochem Biophys Res Commun* **374**:299-303.
- Krupp, J. J., J. C. Billeter, A. Wong, C. Choi, M. N. Nitabach y J. D. Levine. 2013. Pigment-dispersing factor modulates pheromone production in clock cells that influence mating in *Drosophila*. *Neuron* **79**:54-68.
- Kuhara, A., H. Inada, I. Katsura y I. Mori. 2002. Negative regulation and gain control of sensory neurons by the *C. elegans* calcineurin TAX-6. *Neuron* **33**:751-763.
- Kuhara, A., M. Okumura, T. Kimata, Y. Tanizawa, R. Takano, K. D. Kimura, H. Inada, K. Matsumoto y I. Mori. 2008. Temperature sensing by an olfactory neuron in a circuit controlling behavior of *C. elegans*. *Science* **320**:803-807.
- Kuhlman, S. J., J. E. Quintero y D. G. McMahon. 2000. GFP fluorescence reports Period 1 circadian gene regulation in the mammalian biological clock. *Neuroreport* **11**:1479-1482.
- Kumaki, Y., M. Ukai-Tadenuma, K. D. Uno, J. Nishio, K. H. Masumoto, M. Nagano, T. Komori, Y. Shigeyoshi, J. B. Hogenesch y H. R. Ueda. 2008. Analysis and synthesis of high-amplitude cis-elements in the mammalian circadian clock. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**:14946-14951.

- Kumar, V., K. Kim, C. Joseph, L. C. Thomas, H. Hong y J. S. Takahashi. 2011. Second-generation high-throughput forward genetic screen in mice to isolate subtle behavioral mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108 Suppl 3**:15557-15564.
- Lagido, C., J. Pettitt, A. Flett y L. A. Glover. 2008. Bridging the phenotypic gap: real-time assessment of mitochondrial function and metabolism of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *BMC Physiol* **8**:7.
- Lagido, C., J. Pettitt, A. J. Porter, G. I. Paton y L. A. Glover. 2001. Development and application of bioluminescent *Caenorhabditis elegans* as multicellular eukaryotic biosensors. *FEBS Lett* **493**:36-39.
- Lai, A. G., C. J. Doherty, B. Mueller-Roeber, S. A. Kay, J. H. Schippers y P. P. Dijkwel. 2012. CIRCADIAN CLOCK-ASSOCIATED 1 regulates ROS homeostasis and oxidative stress responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**:17129-17134.
- Lambert, G., J. Chew y M. J. Rust. 2016. Costs of Clock-Environment Misalignment in Individual Cyanobacterial Cells. *Biophys J* **111**:883-891.
- Leclerc, G. M., F. R. Boockfor, W. J. Faught y L. S. Frawley. 2000. Development of a destabilized firefly luciferase enzyme for measurement of gene expression. *Biotechniques* **29**:590-591, 594-596, 598 passim.
- Lee, C., J. P. Etchegaray, F. R. Cagampang, A. S. Loudon y S. M. Reppert. 2001. Posttranslational mechanisms regulate the mammalian circadian clock. *Cell* **107**:855-867.
- Lee, C., D. R. Weaver y S. M. Reppert. 2004. Direct association between mouse PERIOD and CKIepsilon is critical for a functioning circadian clock. *Mol Cell Biol* **24**:584-594.
- Lee, H., R. Chen, Y. Lee, S. Yoo y C. Lee. 2009. Essential roles of CKIdelta and CKIepsilon in the mammalian circadian clock. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**:21359-21364.
- Lee, H., M. K. Choi, D. Lee, H. S. Kim, H. Hwang, H. Kim, S. Park, Y. K. Paik y J. Lee. 2012. Nictation, a dispersal behavior of the nematode *Caenorhabditis elegans*, is regulated by IL2 neurons. *Nat Neurosci* **15**:107-112.
- Lee, L. W., H. W. Lo y S. J. Lo. 2010. Vectors for co-expression of two genes in *Caenorhabditis elegans*. *Gene* **455**:16-21.
- Lehmann, M., D. Gustav y C. G. Galizia. 2011. The early bee catches the flower - circadian rhythmicity influences learning performance in honey bees, *Apis mellifera*. *Behav Ecol Sociobiol* **65**:205-215.
- Levine, J. D., P. Funes, H. B. Dowse y J. C. Hall. 2002. Resetting the circadian clock by social experience in *Drosophila melanogaster*. *Science* **298**:2010-2012.
- Lewis, J. A. y J. T. Fleming. 1995. Basic culture methods. pp. 3-29 *Caenorhabditis elegans: Modern Biological Analysis of an Organism*. Academic Press, San Diego, CA, USA.
- Lewis, J. A., C. H. Wu, J. H. Levine y H. Berg. 1980. Levamisole-resistant mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans* appear to lack pharmacological acetylcholine receptors. *Neuroscience* **5**:967-989.
- Lin, Y., G. D. Stormo y P. H. Taghert. 2004. The neuropeptide pigment-dispersing factor coordinates pacemaker interactions in the *Drosophila* circadian system. *J Neurosci* **24**:7951-7957.
- Liu, J., A. Ward, J. Gao, Y. Dong, N. Nishio, H. Inada, L. Kang, Y. Yu, D. Ma, T. Xu, I. Mori, Z. Xie y X. Z. Xu. 2010. *C. elegans* phototransduction requires a G protein-dependent cGMP pathway and a taste receptor homolog. *Nat Neurosci* **13**:715-722.
- Liu, T. L., L. Newton, M. J. Liu, S. H. Shiu y E. M. Farre. 2016. A G-Box-Like Motif Is Necessary for Transcriptional Regulation by Circadian Pseudo-Response Regulators in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **170**:528-539.
- Liu, Y., S. S. Golden, T. Kondo, M. Ishiura y C. H. Johnson. 1995. Bacterial luciferase as a reporter of circadian gene expression in cyanobacteria. *J Bacteriol* **177**:2080-2086.
- Loros, J. J. y J. C. Dunlap. 2001. Genetic and molecular analysis of circadian rhythms in *Neurospora*. *Annu Rev Physiol* **63**:757-794.

- Loudon, A. S., Q. J. Meng, E. S. Maywood, D. A. Bechtold, R. P. Boot-Handford y M. H. Hastings. 2007. The biology of the circadian Ck1epsilon tau mutation in mice and Syrian hamsters: a tale of two species. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **72**:261-271.
- Lowrey, P. L., K. Shimomura, M. P. Antoch, S. Yamazaki, P. D. Zemenides, M. R. Ralph, M. Menaker y J. S. Takahashi. 2000. Positional syntenic cloning and functional characterization of the mammalian circadian mutation tau. *Science* **288**:483-492.
- Maas, A. E., I. T. Jones, A. M. Reitzel y A. M. Tarrant. 2016. Daily cycle in oxygen consumption by the sea anemone *Nematostella vectensis* Stephenson. *Biol Open* **5**:161-164.
- Maier, B., S. Wendt, J. T. Vanselow, T. Wallach, S. Reischl, S. Oehmke, A. Schlosser y A. Kramer. 2009. A large-scale functional RNAi screen reveals a role for CK2 in the mammalian circadian clock. *Genes Dev* **23**:708-718.
- Matsuo, T., K. Okamoto, K. Onai, Y. Niwa, K. Shimogawara y M. Ishiura. 2008. A systematic forward genetic analysis identified components of the *Chlamydomonas* circadian system. *Genes Dev* **22**:918-930.
- McCulloch, K. A. y A. E. Rougvié. 2014. *Caenorhabditis elegans* period homolog lin-42 regulates the timing of heterochronic miRNA expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**:15450-15455.
- McIntire, S. L., E. Jorgensen y H. R. Horvitz. 1993a. Genes required for GABA function in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **364**:334-337.
- McIntire, S. L., E. Jorgensen, J. Kaplan y H. R. Horvitz. 1993b. The GABAergic nervous system of *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **364**:337-341.
- McNally, K., A. Audhya, K. Oegema y F. J. McNally. 2006. Katanin controls mitotic and meiotic spindle length. *J Cell Biol* **175**:881-891.
- Meelkop, E., H. G. Marco, T. Janssen, L. Temmerman, M. P. Vanhove y L. Schoofs. 2012a. A structural and functional comparison of nematode and crustacean PDH-like sequences. *Peptides* **34**:74-81.
- Meelkop, E., L. Temmerman, T. Janssen, N. Suetens, I. Beets, L. Van Rompay, N. Shanmugam, S. J. Husson y L. Schoofs. 2012b. PDF receptor signaling in *Caenorhabditis elegans* modulates locomotion and egg-laying. *Mol Cell Endocrinol* **361**:232-240.
- Meighen, E. A. 1993. Bacterial bioluminescence: organization, regulation, and application of the lux genes. *FASEB J* **7**:1016-1022.
- Mello, C. y A. Fire. 1995. DNA transformation. *Methods Cell Biol* **48**:451-482.
- Mello, C. C., J. M. Kramer, D. Stinchcomb y V. Ambros. 1991. Efficient gene transfer in *C.elegans*: extrachromosomal maintenance and integration of transforming sequences. *EMBO J* **10**:3959-3970.
- Meng, Q. J., L. Logunova, E. S. Maywood, M. Gallego, J. Lebiecki, T. M. Brown, M. Sladek, A. S. Semikhodskii, N. R. Glossop, H. D. Piggins, J. E. Chesham, D. A. Bechtold, S. H. Yoo, J. S. Takahashi, D. M. Virshup, R. P. Boot-Handford, M. H. Hastings y A. S. Loudon. 2008. Setting clock speed in mammals: the CK1 epsilon tau mutation in mice accelerates circadian pacemakers by selectively destabilizing PERIOD proteins. *Neuron* **58**:78-88.
- Meng, Q. J., E. S. Maywood, D. A. Bechtold, W. Q. Lu, J. Li, J. E. Gibbs, S. M. Dupre, J. E. Chesham, F. Rajamohan, J. Knafels, B. Sneed, L. E. Zawadzke, J. F. Ohren, K. M. Walton, T. T. Wager, M. H. Hastings y A. S. Loudon. 2010. Entrainment of disrupted circadian behavior through inhibition of casein kinase 1 (CK1) enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**:15240-15245.
- Morrow, M., M. Brunner y T. Roenneberg. 1999. Assignment of circadian function for the *Neurospora* clock gene frequency. *Nature* **399**:584-586.
- Migliori, M. L., A. Romanowski, S. H. Simonetta, D. Valdez, M. Guido y D. A. Golombek. 2012. Daily variation in melatonin synthesis and arylalkylamine N-acetyltransferase activity in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J Pineal Res* **53**:38-46.
- Migliori, M. L., S. H. Simonetta, A. Romanowski y D. A. Golombek. 2011. Circadian rhythms in metabolic variables in *Caenorhabditis elegans*. *Physiol Behav* **103**:315-320.
- Millar, A. J., I. A. Carre, C. A. Strayer, N. H. Chua y S. A. Kay. 1995a. Circadian clock mutants in *Arabidopsis* identified by luciferase imaging. *Science* **267**:1161-1163.

- Millar, A. J., S. R. Short, N. H. Chua y S. A. Kay. 1992. A novel circadian phenotype based on firefly luciferase expression in transgenic plants. *Plant Cell* **4**:1075-1087.
- Millar, A. J., M. Straume, J. Chory, N. H. Chua y S. A. Kay. 1995b. The regulation of circadian period by phototransduction pathways in *Arabidopsis*. *Science* **267**:1163-1166.
- Miyashiro, T. y E. G. Ruby. 2012. Shedding light on bioluminescence regulation in *Vibrio fischeri*. *Mol Microbiol* **84**:795-806.
- Monsalve, G. C., C. Van Buskirk y A. R. Frand. 2011. LIN-42/PERIOD controls cyclical and developmental progression of *C. elegans* molts. *Curr Biol* **21**:2033-2045.
- Monteith, J. L. y M. H. Unsworth. 2013. Transient Heat Balance. pp. 273-287 *Principles of environmental physics : plants, animals, and the atmosphere* Elsevier/Academic Press, Amsterdam ; Boston.
- Morgan, L. W., A. V. Greene y D. Bell-Pedersen. 2003. Circadian and light-induced expression of luciferase in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet Biol* **38**:327-332.
- Mori, I. y Y. Ohshima. 1995. Neural regulation of thermotaxis in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **376**:344-348.
- Morise, H., E. Miyazaki, S. Yoshimitsu y T. Eki. 2012. Profiling nematode communities in unmanaged flowerbed and agricultural field soils in Japan by DNA barcode sequencing. *PLoS One* **7**:e51785.
- Motohashi, T., H. Tabara y Y. Kohara. 2006. Protocols for large scale in situ hybridization on *C. elegans* larvae. *WormBook*:1-8.
- Mrosovsky, N. 1999. Masking: history, definitions, and measurement. *Chronobiol Int* **16**:415-429.
- Murphy, C. T., S. A. McCarroll, C. I. Bargmann, A. Fraser, R. S. Kamath, J. Ahringer, H. Li y C. Kenyon. 2003. Genes that act downstream of DAF-16 to influence the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **424**:277-283.
- Myers, E. M., J. Yu y A. Sehgal. 2003. Circadian control of eclosion: interaction between a central and peripheral clock in *Drosophila melanogaster*. *Curr Biol* **13**:526-533.
- Nakahata, Y., M. Yoshida, A. Takano, H. Soma, T. Yamamoto, A. Yasuda, T. Nakatsu y T. Takumi. 2008. A direct repeat of E-box-like elements is required for cell-autonomous circadian rhythm of clock genes. *BMC Mol Biol* **9**:1.
- Nguyen, M., A. Alfonso, C. D. Johnson y J. B. Rand. 1995. *Caenorhabditis elegans* mutants resistant to inhibitors of acetylcholinesterase. *Genetics* **140**:527-535.
- Nikhil, K. L., L. Abhilash y V. K. Sharma. 2016. Molecular Correlates of Circadian Clocks in Fruit Fly *Drosophila melanogaster* Populations Exhibiting early and late Emergence Chronotypes. *J Biol Rhythms* **31**:125-141.
- Nitabach, M. N. y P. H. Taghert. 2008. Organization of the *Drosophila* circadian control circuit. *Curr Biol* **18**:R84-93.
- Nott, A., S. H. Meislin y M. J. Moore. 2003. A quantitative analysis of intron effects on mammalian gene expression. *RNA* **9**:607-617.
- O'Hagan, R. y M. Chalfie. 2006. Mechanosensation in *Caenorhabditis elegans*. *Int Rev Neurobiol* **69**:169-203.
- O'Neill, J. S. y A. B. Reddy. 2011. Circadian clocks in human red blood cells. *Nature* **469**:498-503.
- O'Neill, J. S., G. van Ooijen, L. E. Dixon, C. Troein, F. Corellou, F. Y. Bouget, A. B. Reddy y A. J. Millar. 2011. Circadian rhythms persist without transcription in a eukaryote. *Nature* **469**:554-558.
- Okochi, Y., K. D. Kimura, A. Ohta y I. Mori. 2005. Diverse regulation of sensory signaling by *C. elegans* nPKC-epsilon/eta TTX-4. *EMBO J* **24**:2127-2137.
- Olmedo, M., M. Geibel, M. Artal-Sanz y M. Meroz. 2015. A High-Throughput Method for the Analysis of Larval Developmental Phenotypes in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **201**:443-448.
- Olmedo, M., J. S. O'Neill, R. S. Edgar, U. K. Valekunja, A. B. Reddy y M. Meroz. 2012. Circadian regulation of olfaction and an evolutionarily conserved, nontranscriptional marker in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**:20479-20484.

- Ooe, N., K. Saito, K. Oeda, I. Nakatuka y H. Kaneko. 2007. Characterization of *Drosophila* and *Caenorhabditis elegans* NXF-like-factors, putative homologs of mammalian NXF. *Gene* **400**:122-130.
- Panda, S., M. P. Antoch, B. H. Miller, A. I. Su, A. B. Schook, M. Straume, P. G. Schultz, S. A. Kay, J. S. Takahashi y J. B. Hogenesch. 2002a. Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock. *Cell* **109**:307-320.
- Panda, S., J. B. Hogenesch y S. A. Kay. 2002b. Circadian rhythms from flies to human. *Nature* **417**:329-335.
- Paquet, E. R., G. Rey y F. Naef. 2008. Modeling an evolutionary conserved circadian cis-element. *PLoS Comput Biol* **4**:e38.
- Peng, Y., D. Stoleru, J. D. Levine, J. C. Hall y M. Rosbash. 2003. *Drosophila* free-running rhythms require intercellular communication. *PLoS Biol* **1**:E13.
- Pepper, A. S., J. E. McCane, K. Kemper, D. A. Yeung, R. C. Lee, V. Ambros y E. G. Moss. 2004. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-46* affects developmental timing at two larval stages and encodes a relative of the scaffolding protein gephyrin. *Development* **131**:2049-2059.
- Perales, M., S. Portoles y P. Mas. 2006. The proteasome-dependent degradation of CKB4 is regulated by the *Arabidopsis* biological clock. *Plant J* **46**:849-860.
- Perales, R., D. M. King, C. Aguirre-Chen y C. M. Hammell. 2014. LIN-42, the *Caenorhabditis elegans* PERIOD homolog, negatively regulates microRNA transcription. *PLoS Genet* **10**:e1004486.
- Perez-Santangelo, S., R. G. Schlaen y M. J. Yanovsky. 2013. Genomic analysis reveals novel connections between alternative splicing and circadian regulatory networks. *Brief Funct Genomics* **12**:13-24.
- Peschel, N. y C. Helfrich-Forster. 2011. Setting the clock - by nature: circadian rhythm in the fruitfly *Drosophila melanogaster*. *FEBS Lett* **585**:1435-1442.
- Petersen, C., P. Dirksen, S. Prah, E. A. Strathmann y H. Schulenburg. 2014. The prevalence of *Caenorhabditis elegans* across 1.5 years in selected North German locations: the importance of substrate type, abiotic parameters, and *Caenorhabditis* competitors. *BMC Ecol* **14**:4.
- Petriv, O. I. y R. A. Rachubinski. 2004. Lack of peroxisomal catalase causes a progeric phenotype in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem* **279**:19996-20001.
- Pittendrigh, C. S. 1960. Circadian rhythms and the circadian organization of living systems. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **25**:159-184.
- Pittendrigh, C. S. 1966. The circadian oscillation in *Drosophila pseudoobscura* pupae: a model for the photoperiodic clock. *Z. Pflanzenphysiol* **54**:275-307.
- Pittendrigh, C. S. 1981b. Biological Rhythms. pp. 95-124 *en* J. Aschoff, editor. *Handbook of Behavioral Neurobiology*. Plenum Press, New York.
- Pittendrigh, C. S., Daan, S. 1976a. A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. I. The stability and lability of spontaneous frequency. *J. Comp. Physiol* **106**:223-252.
- Plautz, J. D., M. Kaneko, J. C. Hall y S. A. Kay. 1997. Independent photoreceptive circadian clocks throughout *Drosophila*. *Science* **278**:1632-1635.
- Pokala, N., Q. Liu, A. Gordus y C. I. Bargmann. 2014. Inducible and titratable silencing of *Caenorhabditis elegans* neurons in vivo with histamine-gated chloride channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**:2770-2775.
- Powell-Coffman, J. A., C. A. Bradfield y W. B. Wood. 1998. *Caenorhabditis elegans* orthologs of the aryl hydrocarbon receptor and its heterodimerization partner the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:2844-2849.
- Press, W. H. 1992. Numerical recipes in FORTRAN : the art of scientific computing. 2nd edition. Cambridge University Press, Cambridge England ; New York, NY, USA.
- Price-Lloyd, N., M. Elvin y C. Heintzen. 2005. Synchronizing the *Neurospora crassa* circadian clock with the rhythmic environment. *Biochem Soc Trans* **33**:949-952.
- Price, J. L., J. Blau, A. Rothenfluh, M. Abodeely, B. Kloss y M. W. Young. 1998. double-time is a novel *Drosophila* clock gene that regulates PERIOD protein accumulation. *Cell* **94**:83-95.

- Qian, H., B. Hu, S. Yu, X. Pan, T. Wu y Z. Fu. 2012. The effects of hydrogen peroxide on the circadian rhythms of *Microcystis aeruginosa*. *PLoS One* **7**:e33347.
- Qin, H. y J. A. Powell-Coffman. 2004. The *Caenorhabditis elegans* aryl hydrocarbon receptor, AHR-1, regulates neuronal development. *Dev Biol* **270**:64-75.
- Querfurth, C., A. Diernfellner, F. Heise, L. Lauinger, A. Neiss, O. Tataroglu, M. Brunner y T. Schafmeier. 2007. Posttranslational regulation of *Neurospora* circadian clock by CK1a-dependent phosphorylation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **72**:177-183.
- Querfurth, C., A. C. Diernfellner, E. Gin, E. Malzahn, T. Hofer y M. Brunner. 2011. Circadian conformational change of the *Neurospora* clock protein FREQUENCY triggered by clustered hyperphosphorylation of a basic domain. *Mol Cell* **43**:713-722.
- Ralph, M. R. y M. Menaker. 1988. A mutation of the circadian system in golden hamsters. *Science* **241**:1225-1227.
- Ramot, D., B. L. MacInnis, H. C. Lee y M. B. Goodman. 2008. Thermotaxis is a robust mechanism for thermoregulation in *Caenorhabditis elegans* nematodes. *J Neurosci* **28**:12546-12557.
- Rankin, C. H. 2002. From gene to identified neuron to behaviour in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Rev Genet* **3**:622-630.
- Rechsteiner, M. y S. W. Rogers. 1996. PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem Sci* **21**:267-271.
- Reddy, A. B., M. D. Field, E. S. Maywood y M. H. Hastings. 2002. Differential resynchronisation of circadian clock gene expression within the suprachiasmatic nuclei of mice subjected to experimental jet lag. *J Neurosci* **22**:7326-7330.
- Refinetti, R. 2014. Relationship between circadian period and body size in the tau-mutant golden hamster. *Can J Physiol Pharmacol* **92**:27-33.
- Renn, S. C., J. H. Park, M. Rosbash, J. C. Hall y P. H. Taghert. 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.
- Riddle, D. L. 1997. *C. elegans* II. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, N.Y.
- Robinson, A. F. 1994. Movement of Five Nematode Species through Sand Subjected to Natural Temperature Gradient Fluctuations. *J Nematol* **26**:46-58.
- Romanowski, A., M. J. Garavaglia, M. E. Goya, P. D. Ghiringhelli y D. A. Golombek. 2014. Potential conservation of circadian clock proteins in the phylum Nematoda as revealed by bioinformatic searches. *PLoS One* **9**:e112871.
- Romanowski, A., M. L. Migliori, C. Valverde y D. A. Golombek. 2011. Circadian variation in *Pseudomonas fluorescens* (CHAO)-mediated paralysis of *Caenorhabditis elegans*. *Microb Pathog* **50**:23-30.
- Romanowski, A. y M. J. Yanovsky. 2015. Circadian rhythms and post-transcriptional regulation in higher plants. *Front Plant Sci* **6**:437.
- Rosato, E. 2007. *Circadian rhythms : methods and protocols*. Humana Press, Totowa, N.J.
- Rosato, E., E. Tauber y C. P. Kyriacou. 2006. Molecular genetics of the fruit-fly circadian clock. *Eur J Hum Genet* **14**:729-738.
- Rosbash, M., S. Bradley, S. Kadener, Y. Li, W. Luo, J. S. Menet, E. Nagoshi, K. Palm, R. Schoer, Y. Shang y C. H. Tang. 2007. Transcriptional feedback and definition of the circadian pacemaker in *Drosophila* and animals. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **72**:75-83.
- Rust, M. J., S. S. Golden y E. K. O'Shea. 2011. Light-driven changes in energy metabolism directly entrain the cyanobacterial circadian oscillator. *Science* **331**:220-223.
- Rutter, J., M. Reick, L. C. Wu y S. L. McKnight. 2001. Regulation of clock and NPAS2 DNA binding by the redox state of NAD cofactors. *Science* **293**:510-514.
- Sahar, S., S. Masubuchi, K. Eckel-Mahan, S. Vollmer, L. Galla, N. Ceglia, S. Masri, T. K. Barth, B. Grimaldi, O. Oluyemi, G. Astarita, W. C. Hallows, D. Piomelli, A. Imhof, P. Baldi, J. M. Denu y P. Sassone-Corsi. 2014. Circadian control of fatty acid elongation by SIRT1 protein-mediated deacetylation of acetyl-coenzyme A synthetase 1. *J Biol Chem* **289**:6091-6097.

- Saigusa, T., S. Ishizaki, S. Watabiki, N. Ishii, A. Tanakadate, Y. Tamai y K. Hasegawa. 2002. Circadian behavioural rhythm in *Caenorhabditis elegans*. *Curr Biol* **12**:R46-47.
- Sanchez, S. E., E. Petrillo, E. J. Beckwith, X. Zhang, M. L. Rugnone, C. E. Hernando, J. C. Cuevas, M. A. Godoy Herz, A. Depetris-Chauvin, C. G. Simpson, J. W. Brown, P. D. Cerdan, J. O. Borevitz, P. Mas, M. F. Ceriani, A. R. Kornblihtt y M. J. Yanovsky. 2010. A methyl transferase links the circadian clock to the regulation of alternative splicing. *Nature* **468**:112-116.
- Siepkka, S. M. y J. S. Takahashi. 2005. Forward genetic screens to identify circadian rhythm mutants in mice. *Methods Enzymol* **393**:219-229.
- Sievers, F., A. Wilm, D. Dineen, T. J. Gibson, K. Karplus, W. Li, R. Lopez, H. McWilliam, M. Remmert, J. Soding, J. D. Thompson y D. G. Higgins. 2011. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol* **7**:539.
- Simonetta, S. H. y D. A. Golombek. 2007. An automated tracking system for *Caenorhabditis elegans* locomotor behavior and circadian studies application. *J Neurosci Methods* **161**:273-280.
- Simonetta, S. H., M. L. Migliori, A. Romanowski y D. A. Golombek. 2009. Timing of locomotor activity circadian rhythms in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One* **4**:e7571.
- Simonetta, S. H., A. Romanowski, A. N. Minniti, N. C. Inestrosa y D. A. Golombek. 2008. Circadian stress tolerance in adult *Caenorhabditis elegans*. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* **194**:821-828.
- Smith, R. M. y S. B. Williams. 2006. Circadian rhythms in gene transcription imparted by chromosome compaction in the cyanobacterium *Synechococcus elongatus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:8564-8569.
- Stinchcomb, D. T., J. E. Shaw, S. H. Carr y D. Hirsh. 1985. Extrachromosomal DNA transformation of *Caenorhabditis elegans*. *Mol Cell Biol* **5**:3484-3496.
- Sulston, J., M. Dew y S. Brenner. 1975. Dopaminergic neurons in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J Comp Neurol* **163**:215-226.
- Sulston, J. E. y H. R. Horvitz. 1977. Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* **56**:110-156.
- Sulston, J. E., E. Schierenberg, J. G. White y J. N. Thomson. 1983. The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* **100**:64-119.
- Sun, W. C., E. H. Jeong, H. J. Jeong, H. W. Ko, I. Edery y E. Y. Kim. 2010. Two distinct modes of PERIOD recruitment onto dCLOCK reveal a novel role for TIMELESS in circadian transcription. *J Neurosci* **30**:14458-14469.
- Sundaram, M. V. 2006. RTK/Ras/MAPK signaling. *WormBook*:1-19.
- Syntichaki, P. y N. Tavernarakis. 2004. Genetic models of mechanotransduction: the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Physiol Rev* **84**:1097-1153.
- Szittner, R., G. Jansen, D. Y. Thomas y E. Meighen. 2003. Bright stable luminescent yeast using bacterial luciferase as a sensor. *Biochem Biophys Res Commun* **309**:66-70.
- Tahara, Y., A. Yokota, T. Shiraishi, S. Yamada, A. Haraguchi, A. Shinozaki y S. Shibata. 2016. In vitro and in vivo Phase Changes of the Mouse Circadian Clock by Oxidative Stress. *J Circadian Rhythms* **14(1)**: 4:1-7.
- Takahashi, N., Y. Hirata, K. Aihara y P. Mas. 2015. A hierarchical multi-oscillator network orchestrates the Arabidopsis circadian system. *Cell* **163**:148-159.
- Tamaru, T., M. Hattori, Y. Ninomiya, G. Kawamura, G. Vares, K. Honda, D. P. Mishra, B. Wang, I. Benjamin, P. Sassone-Corsi, T. Ozawa y K. Takamatsu. 2013. ROS stress resets circadian clocks to coordinate pro-survival signals. *PLoS One* **8**:e82006.
- Tanoue, S., P. Krishnan, B. Krishnan, S. E. Dryer y P. E. Hardin. 2004. Circadian clocks in antennal neurons are necessary and sufficient for olfaction rhythms in *Drosophila*. *Curr Biol* **14**:638-649.
- Taub, J., J. F. Lau, C. Ma, J. H. Hahn, R. Hoque, J. Rothblatt y M. Chalfie. 1999. A cytosolic catalase is needed to extend adult lifespan in *C. elegans* daf-C and clk-1 mutants. *Nature* **399**:162-166.

- Tehrani, G. A., S. Mirzaahmadi, M. Bandehpour y B. Kazemi. 2014. Coexpression of luxA and luxB genes of *Vibrio fischeri* in NIH3T3 mammalian cells and evaluation of its bioluminescence activities. *Luminescence* **29**:13-19.
- Temmerman, L., E. Meelkop, T. Janssen, A. Bogaerts, M. Lindemans, S. J. Husson, I. Beets y L. Schoofs. 2011. *C. elegans* homologs of insect clock proteins: a tale of many stories. *Ann N Y Acad Sci* **1220**:137-148.
- Tenessen, J. M., H. F. Gardner, M. L. Volk y A. E. Rougvie. 2006. Novel heterochronic functions of the *Caenorhabditis elegans* period-related protein LIN-42. *Dev Biol* **289**:30-43.
- Tenessen, J. M., K. J. Opperman y A. E. Rougvie. 2010. The *C. elegans* developmental timing protein LIN-42 regulates diapause in response to environmental cues. *Development* **137**:3501-3511.
- Teschke, M., S. Wendt, S. Kawaguchi, A. Kramer y B. Meyer. 2011. A circadian clock in Antarctic krill: an endogenous timing system governs metabolic output rhythms in the euphausiid species *Euphausia superba*. *PLoS One* **6**:e26090.
- Thain, S. C., G. Murtas, J. R. Lynn, R. B. McGrath y A. J. Millar. 2002. The circadian clock that controls gene expression in *Arabidopsis* is tissue specific. *Plant Physiol* **130**:102-110.
- Togo, S. H., M. Maebuchi, S. Yokota, M. Bun-Ya, A. Kawahara y T. Kamiryo. 2000. Immunological detection of alkaline-diaminobenzidine-negative peroxisomes of the nematode *Caenorhabditis elegans* purification and unique pH optima of peroxisomal catalase. *Eur J Biochem* **267**:1307-1312.
- Tomchik, S. M. y R. L. Davis. 2008. Cyclic AMP imaging sheds light on PDF signaling in circadian clock neurons. *Neuron* **58**:161-163.
- Tomita, J., M. Nakajima, T. Kondo y H. Iwasaki. 2005. No transcription-translation feedback in circadian rhythm of KaiC phosphorylation. *Science* **307**:251-254.
- Ukai-Tadenuma, M., T. Kasukawa y H. R. Ueda. 2008. Proof-by-synthesis of the transcriptional logic of mammalian circadian clocks. *Nat Cell Biol* **10**:1154-1163.
- van der Linden, A. M., M. Beverly, S. Kadener, J. Rodriguez, S. Wasserman, M. Rosbash y P. Sengupta. 2010. Genome-wide analysis of light- and temperature-entrained circadian transcripts in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Biol* **8**:e1000503.
- Van Leeuwen, W., Hagendoorn, M.J.M., Ruttink, T. et al. . doi:10.1007/BF02824024. 2000. The use of the luciferase reporter system for in planta gene expression studies. *en Plant Molecular Biology Reporter*,
- van Ooijen, G., M. Hindle, S. F. Martin, M. Barrios-Llerena, F. Sanchez, F. Y. Bouget, J. S. O'Neill, T. Le Bihan y A. J. Millar. 2013. Functional analysis of Casein Kinase 1 in a minimal circadian system. *PLoS One* **8**:e70021.
- Varshney, L. R., B. L. Chen, E. Paniagua, D. H. Hall y D. B. Chklovskii. 2011. Structural properties of the *Caenorhabditis elegans* neuronal network. *PLoS Comput Biol* **7**:e1001066.
- Vergara, I. A., M. Tarailo-Graovac, C. Frech, J. Wang, Z. Qin, T. Zhang, R. She, J. S. Chu, K. Wang y N. Chen. 2014. Genome-wide variations in a natural isolate of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *BMC Genomics* **15**:255.
- Vidal-Gadea, A., K. Ward, C. Beron, N. Ghorashian, S. Gokce, J. Russell, N. Truong, A. Parikh, O. Gadea, A. Ben-Yakar y J. Pierce-Shimomura. 2015. Magnetosensitive neurons mediate geomagnetic orientation in *Caenorhabditis elegans*. *Elife* **4**.
- Vitaterna, M. H., D. P. King, A. M. Chang, J. M. Kornhauser, P. L. Lowrey, J. D. McDonald, W. F. Dove, L. H. Pinto, F. W. Turek y J. S. Takahashi. 1994. Mutagenesis and mapping of a mouse gene, Clock, essential for circadian behavior. *Science* **264**:719-725.
- Vollmers, C., S. Panda y L. DiTacchio. 2008. A high-throughput assay for siRNA-based circadian screens in human U2OS cells. *PLoS One* **3**:e3457.
- Ward, A., J. Liu, Z. Feng y X. Z. Xu. 2008. Light-sensitive neurons and channels mediate phototaxis in *C. elegans*. *Nat Neurosci* **11**:916-922.
- Ward, S., N. Thomson, J. G. White y S. Brenner. 1975. Electron microscopical reconstruction of the anterior sensory anatomy of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J Comp Neurol* **160**:313-337.

- Weber, K. P., S. De, I. Kozarewa, D. J. Turner, M. M. Babu y M. de Bono. 2010. Whole genome sequencing highlights genetic changes associated with laboratory domestication of *C. elegans*. *PLoS One* **5**:e13922.
- Welsh, D. K., T. Imaizumi y S. A. Kay. 2005. Real-time reporting of circadian-regulated gene expression by luciferase imaging in plants and mammalian cells. *Methods Enzymol* **393**:269-288.
- Wes, P. D. y C. I. Bargmann. 2001. *C. elegans* odour discrimination requires asymmetric diversity in olfactory neurons. *Nature* **410**:698-701.
- White JG, S. E., Thomson JN, Brenner S. 1986. The structure of the nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*. **314**.
- White, J. G., E. Southgate, J. N. Thomson y S. Brenner. 1976. The structure of the ventral nerve cord of *Caenorhabditis elegans*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **275**:327-348.
- White, J. G., E. Southgate, J. N. Thomson y S. Brenner. 1986. The structure of the nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **314**:1-340.
- Wijnen, H. y M. W. Young. 2006. Interplay of circadian clocks and metabolic rhythms. *Annu Rev Genet* **40**:409-448.
- Wilsbacher, L. D., S. Yamazaki, E. D. Herzog, E. J. Song, L. A. Radcliffe, M. Abe, G. Block, E. Spitznagel, M. Menaker y J. S. Takahashi. 2002. Photic and circadian expression of luciferase in *mPeriod1-luc* transgenic mice *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:489-494.
- Wilson, T. y J. W. Hastings. 1998. Bioluminescence. *Annu Rev Cell Dev Biol* **14**:197-230.
- Winbush, A., M. Gruner, G. W. Hennig y A. M. van der Linden. 2015. Long-term imaging of circadian locomotor rhythms of a freely crawling *C. elegans* population. *J Neurosci Methods* **249**:66-74.
- Wood, W. B. 1988. *The Nematode Caenorhabditis elegans*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Xu, K., X. Zheng y A. Sehgal. 2008. Regulation of feeding and metabolism by neuronal and peripheral clocks in *Drosophila*. *Cell Metab* **8**:289-300.
- Yamaguchi, S., H. Isejima, T. Matsuo, R. Okura, K. Yagita, M. Kobayashi y H. Okamura. 2003. Synchronization of cellular clocks in the suprachiasmatic nucleus. *Science* **302**:1408-1412.
- Yamaguchi, S., M. Kobayashi, S. Mitsui, Y. Ishida, G. T. van der Horst, M. Suzuki, S. Shibata y H. Okamura. 2001. View of a mouse clock gene ticking. *Nature* **409**:684.
- Yamazaki, S., R. Numano, M. Abe, A. Hida, R. Takahashi, M. Ueda, G. D. Block, Y. Sakaki, M. Menaker y H. Tei. 2000. Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science* **288**:682-685.
- Yamazaki, S. y J. S. Takahashi. 2005. Real-time luminescence reporting of circadian gene expression in mammals. *Methods Enzymol* **393**:288-301.
- Yochem, J. y R. K. Herman. 2003. Investigating *C. elegans* development through mosaic analysis. *Development* **130**:4761-4768.
- Yoo, S. H., S. Yamazaki, P. L. Lowrey, K. Shimomura, C. H. Ko, E. D. Buhr, S. M. Sieppka, H. K. Hong, W. J. Oh, O. J. Yoo, M. Menaker y J. S. Takahashi. 2004. *PERIOD2::LUCIFERASE* real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:5339-5346.
- Yoshii, T., S. Vanin, R. Costa y C. Helfrich-Forster. 2009. Synergic entrainment of *Drosophila*'s circadian clock by light and temperature. *J Biol Rhythms* **24**:452-464.
- Young, M. W. y S. A. Kay. 2001. Time zones: a comparative genetics of circadian clocks. *Nat Rev Genet* **2**:702-715.
- Yu, S., L. Avery, E. Baude y D. L. Garbers. 1997. Guanylyl cyclase expression in specific sensory neurons: a new family of chemosensory receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:3384-3387.
- Zhang, E. E., A. C. Liu, T. Hirota, L. J. Miraglia, G. Welch, P. Y. Pongsawakul, X. Liu, A. Atwood, J. W. Huss, 3rd, J. Janes, A. I. Su, J. B. Hogenesch y S. A. Kay. 2009. A genome-wide RNAi screen for modifiers of the circadian clock in human cells. *Cell* **139**:199-210.
- Zhang, J., R. E. Campbell, A. Y. Ting y R. Y. Tsien. 2002. Creating new fluorescent probes for cell biology. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**:906-918.

- Zhang, J., X. Li, A. R. Jevince, L. Guan, J. Wang, D. H. Hall, X. Huang y M. Ding. 2013. Neuronal target identification requires AHA-1-mediated fine-tuning of Wnt signaling in *C. elegans*. *PLoS Genet* **9**:e1003618.
- Zielinski, T., A. M. Moore, E. Troup, K. J. Halliday y A. J. Millar. 2014. Strengths and limitations of period estimation methods for circadian data. *PLoS One* **9**:e96462.