



Lamberti, Melisa Luciana

# Regulación de los ritmos circadianos en el nematodo *C. elegans* : mecanismos moleculares y conservación evolutiva



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:*

Lamberti, M. L. (2023). *Regulación de los ritmos circadianos en el nematodo C. elegans: mecanismos moleculares y conservación evolutiva. (Tesis de doctorado). Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Argentina. Disponible en RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes <http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/4015>*

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

## **Regulación de los ritmos circadianos en el nematodo *C. elegans*: mecanismos moleculares y conservación evolutiva**

**TESIS DOCTORAL**

**Melisa Luciana Lamberti**

melisalamberti@gmail.com

### **Resumen**

Los ritmos circadianos son oscilaciones endógenas que poseen todos los organismos, desde procariontas hasta seres humanos, que les permite adaptarse a la naturaleza cíclica del planeta. Los ritmos circadianos son regulados por un reloj central, que se base en un *loop* de retroalimentación transcripcional traduccional (TTFL). Los genes involucrados en el reloj central son ampliamente conservados entre diferentes organismos. El nematodo *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) es un gran modelo experimental para el estudio de los ritmos biológicos. A excepción de la proteína CRY (CRIPTOCHROME), el nematodo posee todas las proteínas homologas que intervienen en el mecanismo molecular del reloj circadiano de mamíferos y *Drosophila*. En este trabajo nos centramos en investigar un grupo de proteínas conservadas evolutivamente, específicamente las proteínas LIN-42, KIN-20 y AHA-1. Mediante la medición de los ritmos circadianos a través de un sistema basado en luminiscencia en nematodos mutantes para las proteínas LIN-42, KIN-20 y AHA-1. Demostramos que una disminución en la expresión de LIN-42 produce un alargamiento del periodo endógeno y disminuye la capacidad de los nematodos de ser entrenados a un ciclo dual de luz y temperatura. Una disminución tanto en la proteína KIN-20, como en la proteína AHA-1, produce un alargamiento del periodo de luminiscencia. Además, se demuestra que tanto *lin-42*, como *aha-1* presentan ritmos transcripcionales, los cuales ciclan en contrafase a lo largo del día, por su parte, *kin-20* no presenta ritmos transcripcionales. También, demostramos que las proteínas LIN-42 y KIN-20 co-expresan en las células neuronales, faringe y *seam cells*; una disminución en la expresión de KIN-20 genera una disminución en la expresión de LIN-42. Finalmente, este trabajo también demuestra que una disminución de KIN-20 y de ambas proteínas LIN-42::KIN-20, produce un cambio en el periodo circadiano solo a través de las células neuronales. En conjunto, estos resultados presenten en esta

tesis sugieren que LIN-42, KIN-20 y AHA-1 son proteínas evolutivamente conservadas que intervienen en la regulación del reloj central del nematodo. Estos hallazgos permiten ampliar el conocimiento del reloj molecular circadiano del nematodo *C. elegans*.

## **Abstract**

Circadian rhythms are endogenous oscillations that are present in all organisms, from prokaryotes to humans, which allow them to adapt to the cyclical nature of the planet. Circadian rhythms are regulated by a central clock, which is based on a transcriptional translational feedback loop (TTFL). The genes involved in the central clock are widely conserved among different organisms. The nematode *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) is a powerful experimental model for the study of biological rhythms. With the exception of the CRY (CRIPTOCHROME) protein, the nematode presents all the homologous proteins involved in the molecular mechanism of the mammalian and *Drosophila* circadian clock. In this work we focus on investigating a group of evolutionarily conserved proteins, specifically the LIN-42, KIN-20 and AHA-1 protein. By measuring circadian rhythms through a system based on luminescence in mutant nematodes for the LIN-42, KIN-20 and AHA-1 proteins. We show that a decrease in the expression of LIN-42 produces a lengthening of the endogenous period and decreases the ability of nematodes to be entrained to a dual cycle of light and temperature. A depletion in KIN-20 and AHA-1 proteins produces a lengthening of the luminescence period. In addition, it is shown that both *lin-42* and *aha-1* present transcriptional rhythms, which cycle in antiphase throughout the day, while *kin-20* does not present transcriptional rhythms. Also, we show that LIN-42 and KIN-20 proteins co-express in neuronal cells, pharynx and seam cells; a decrease in the expression of KIN-20 generates a decrease in the expression of LIN-42. Finally, this work also demonstrates that a decrease in KIN-20 and both LIN-42::KIN-20 proteins produces a change in the circadian period only through neuronal cells. Taken together, these results presented in this thesis suggest that LIN-42, KIN-20 and AHA-1 are evolutionarily conserved proteins involved in the regulation of the nematode central clock. These findings allow us to expand our knowledge of the circadian molecular clock of the *C. elegans* nematode.

# Regulación de los ritmos circadianos en el nematodo *C. elegans*: mecanismos moleculares y conservación evolutiva

---

**Autora:** Melisa Luciana Lamberti

**Director:** Diego Andrés Golombek

**Co-directora:** María Laura Migliori

Departamento de Ciencia y Tecnología

Universidad Nacional de Quilmes

2023

*“A lo largo de muchos años de ser objeto de la incomprensión de los demás, llegue a entender que la vida de un devoto de la ciencia está inevitablemente llena de interminables luchas. El verdadero científico tiene que moldear su vida como una ardiente ofrenda, considerando pérdida y ganancia, éxito y fracaso, como una sola cosa”*

ParamahanSa Yogananda

A mis abuelas, abuelos, mi papá y mi mamá

# Índice

Contenido	Página
<b>Lista de Abreviaturas</b>	6
<b>Agradecimientos</b>	8
<b>Objetivos</b>	
Objetivos generales	10
Objetivos específicos	10
<b>1. Introducción General</b>	11
Antecedentes históricos de los estudios cronobiológicos	13
Propiedades del reloj biológico	15
Organismos modelos en el estudio de la cronobiología	19
Organización del sistema circadiano	22
Bases moleculares del reloj circadiano	26
Modelo de estudio <i>Caenorhabditis elegans</i>	29
Ecología de <i>Caenorhabditis elegans</i>	32
El sistema nervioso de <i>Caenorhabditis elegans</i>	34
Ritmos circadianos en <i>Caenorhabditis elegans</i>	37
<b>2. Materiales y Métodos Generales</b>	42
Condiciones de cultivo	43
Ensayo de luminiscencia en el nematodo adulto	44
Cruces de cepas	48
<b>3. Capítulo 1. Rol de la proteína LIN-42 en los ritmos circadianos de <i>C. elegans</i></b>	
Introducción	53
Materiales y Métodos	67
Resultados	75
Discusión	97
<b>4. Capítulo 2. Rol de la proteína KIN-20 en los ritmos circadianos de <i>C. elegans</i></b>	
Introducción	106
Materiales y Métodos	112
Resultados	121
Discusión	141
<b>5. Capítulo 3. Modulación de los ritmos circadianos del <i>C. elegans</i> a través de las proteínas LIN-42 y KIN-20</b>	
Introducción	147
Materiales y Métodos	153
Resultados	158
Discusión	173
<b>6. Anexo. Rol de AHA-1 en los ritmos circadianos de <i>C. elegans</i></b>	
Introducción	178
Materiales y Métodos	181
Resultados	184
Discusión	189
<b>7. Conclusión General</b>	193
<b>Bibliografía</b>	203

## Lista de Abreviaturas

AMe	médula accesoria
ADNc	ADN complementario
ADNdc	ADN doble cadena
AID	<i>Auxin inducible degron</i>
ARNi	ARN interferencia
ARNm	ARN mensajero
AVP	arginina vasopresina
BFP	Proteína fluorescente azul (del inglés, <i>Blue Fluorescent Protein</i> )
bHLH	del inglés, basic-Helix-Loop-Helix
CCG	Gen controlado por el reloj (del inglés, <i>Clock Controlled Gen</i> )
CEM	Neuronas específicas del macho en <i>C. elegans</i> (del inglés <i>cephalic neuron in male</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> )
CK1ε	Proteína CASEIN KINASE 1 ε
CKBD	Dominio de unión de la caseína quinasa (del inglés, <i>casein kinase binding domain</i> )
CLK	Proteína CLOCK
CRY	Proteína CRYPTOCHROME
CT	Tiempo circadiano (del inglés, <i>Circadian Time</i> )
CYC	Proteína CYCLE
DBT	Proteína DOUBLE TIME
DD	Condiciones constantes de oscuridad (del inglés <i>dark:dark</i> )
DIC	contraste de interferencia diferencial
DNs	neuronas dorsales de <i>Drosophila</i> (del inglés, <i>dorsal neurons</i> )
FR	Condiciones constantes (del inglés, <i>Free running</i> )
FuDR	5-fluorodeoxyuridina
GFP	Proteína fluorescente verde (del inglés, <i>Green Fluorescent Protein</i> )
GRP	péptido liberador de gastrina
HSN	Neuronas motoras del Hermafrodita (del inglés, <i>Hermaphrodite specific motor neurons</i> )
IGL	lámina intergeniculada lateral
LD	Ciclo de luz:oscuridad (del inglés <i>light:dark</i> )
LN <sub>s</sub>	neuronas laterales de <i>Drosophila</i> (del inglés, <i>lateral neurons</i> )
LO/FC	Ciclo de luz-oscuridad y temperatura baja-alta
LO/FC	Ciclo de luz-oscuridad y temperatura baja-alta
NGM	Medio de crecimiento de nematodos (del inglés, <i>Nematode Growth Medium</i> )
NMJs	Uniones de las neuronas musculares (del inglés <i>neuromuscular junctions</i> )
NSQ	núcleo supraquiasmático
OO/CC	Oscuridad y temperatura alta constante
PAS	del inglés, <i>Per-Arnt-Single</i>
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés, <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
PDP1ε	del inglés <i>Par domain protein 1ε</i> de <i>Drosophila</i>
Per	Proteína PERIOD
PRC	Curva de respuesta de fase (del inglés, <i>Phase response curve</i> )
PRX	Peroxirredoxina
PVT	núcleo paraventricular hipotalámico
REV-ERBs	del inglés, <i>orphan nuclear receptors</i>
RFP	Proteína fluorescente roja (del inglés, <i>Red Fluorescent Protein</i> )
RIP	Interneurona del <i>C. elegans</i> (del inglés, <i>Ring/Pharynx interneuron</i> )
RORs	del inglés, <i>retinoid acid receptor-related orphan receptor</i>
RT-PCR	PCR de transcripción reversa (del inglés, <i>reverse transcription PCR</i> )
TIM	Proteína TIMELESS
TRH	tracto retinohipotalámico
TTFL	del inglés transcription-translation feedback loop
UNDL	Unidades normalizadas de luminiscencia sin la tendencia (detrended, inglés)

UV	Ultra-Violeta
VC	Neurona del cordón ventral del <i>C. elegans</i> (del inglés, <i>ventral cord motor neuron</i> )
VIP	péptido intestinal vasoactivo
VRI	Proteína VRILLE de <i>Drosophila</i>
WT	Cepa salvaje (del inglés, <i>Wild-type</i> )
ZT	Tiempo del <i>Zeitgeber</i> (del inglés, <i>Zeitgeber Time</i> )

## **Agradecimientos**

En primer lugar, quiero agradecer a mi familia, que me apoyaron, acompañaron y contuvieron durante todos los años que lleve a cabo mi doctorado. Especialmente a mi papá, Jorge y a mi mamá, Mabel. A mis hermanas, Lau y Fer, y mi hermano Eze. A mis cuñados, Gon y Ari. A mis sobrinos, Exe y Fede, y sobrinas, Ren y Vale.

A mis amigas, que siempre estuvieron a mi lado acompañándome, aconsejándome y escuchándome, Sole, Nati, Jesi, Kari, Miri, Mery, Ayu, Agus, Flor, Coty.

A mis compañeros y amigos del laboratorio, con los cuales compartí el día a día en el laboratorio, los cuales me escucharon, ayudaron y enseñaron: Juli, Lau T., Nacho, Cami, Manu, Fran, Guido, Vicky, Lau M., Ro, Nati, Juan, Santi, Pato, Jose, Sole, Andre, Ivi, Lean, Nacho S., Male, el Flaco, Fer B., Ferchu. Especialmente agradecer a Diego y Euge, quienes me dieron la oportunidad de realizar mi doctorado, me ayudaron en toda la planificación de mi tesis doctoral y por haber puesto su confianza en mí.

Agradecer a Claire, quien sin su ayuda y colaboración esta tesis no hubiera sido posible, y a sus becarias, Lise, Myriam, Vicky.

Agradecer a la UNQ, por darme el espacio para formarme profesionalmente, tanto en mi Licenciatura como en mi Doctorado, dando el financiamiento necesario para desarrollar mi investigación, de igual manera agradecer al CONICET y AGENCIA, los cuales me dieron el apoyo económico para realizar mi tesis doctoral.

Especialmente quiero dedicar esta tesis a mis abuelas, Pocha y Hortensia, a mis abuelos, Antonio y Sandalio.

Eternamente agradecida a las personas que me acompañaron durante estos años.

# **.Objetivos.**

---

### **Objetivos Generales**

- Estudiar el rol de proteínas homologas a genes reloj (LIN-42, KIN-20 y AHA-1) de otros organismos modelos en los ritmos circadianos del nematodo adulto.
- Estudiar los ritmos transcripcionales de las proteínas homologas a genes reloj.
- Analizar la función de las proteínas reloj en tejidos específicos.

### **Objetivos Específicos**

- Estudiar la regulación circadiana de la expresión génica del gen *sur-5* bajo ciclos de luz/oscuridad y temperatura en líneas mutantes para la proteína LIN-42, KIN-20 y AHA-1.
- Evaluar el efecto del rescate del fenotipo mutante *lin-42* y *kin-20* sobre la sincronización y ritmicidad circadiana.
- Analizar el efecto de la sobreexpresión de LIN-42 y KIN-20 sobre la sincronización y ritmicidad circadiana.
- Estudiar los ritmos transcripcionales del gen *lin-42*, *kin-20* y *aha-1*, bajo condiciones cíclicas y constates.
- Estudiar localización de LIN-42b y KIN-20b en el nematodo adulto.
- Analizar la co-expresión de LIN-42b y KIN-20b en el nematodo adulto.
- Estudiar la regulación de LIN-42 mediada por la proteína KIN-20.
- Estudiar la regulación de los ritmos circadianos dependiente de LIN-42 y KIN-20 en las células neuronales y en las *seam cells*.

# .Introducción General.

---

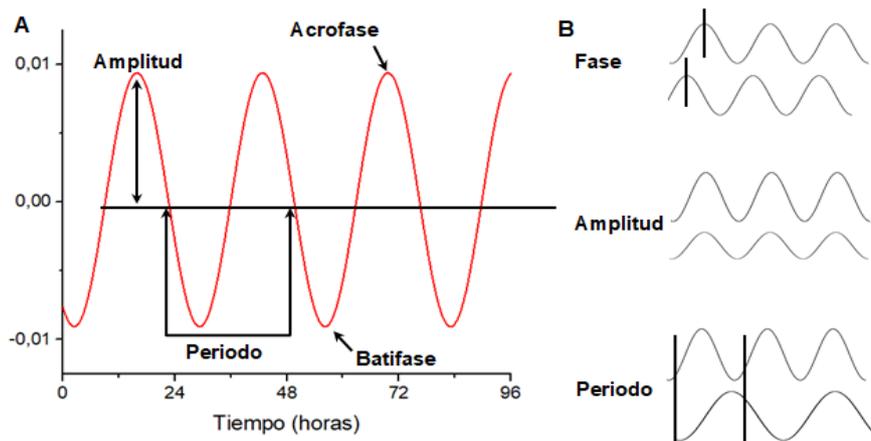


A través de millones de años de evolución, la selección natural ha favorecido que todos los organismos estudiados –desde procariotas hasta los seres humanos– posean un reloj endógeno que les permite anticiparse a la naturaleza cíclica del planeta generando así ventajas adaptativas y garantizando la supervivencia de las especies. La capacidad de los animales de conocer la época del año en la que se encuentran les permite programar adecuadamente gran parte de sus procesos fisiológicos y de comportamiento. La migración de ciertas aves y peces, el ocultamiento de las ardillas en sus madrigueras, la memoria temporal de las abejas anticipando el horario de alimentación y la reproducción en la época más adecuada para la supervivencia de las crías son algunos ejemplos que demuestran esta naturaleza predictiva que permite a los individuos anticiparse a los cambios ambientales.

La cronobiología es la ciencia que estudia la adaptación de los seres vivos a las variaciones cíclicas del ambiente que ocurren como consecuencia de los movimientos de nuestro planeta. De allí su nombre del griego *Kronos*= tiempo, *bios*=vida, *logos*=ciencia. La rotación de la Tierra alrededor de su propio eje produce variaciones en la intensidad de la luz y la temperatura ambiental cada 24 horas. Así, durante el día aumenta la iluminación y la temperatura ambiental, mientras que por la noche ambas disminuyen. Además, la translación de la Tierra alrededor del sol produce alteraciones en el ambiente que se manifiestan como las estaciones del año (primavera, verano, otoño e invierno). Los seres vivos surgieron y se desarrollaron en el planeta bajo estos estímulos cíclicos ambientales.

Los ritmos biológicos pueden clasificarse según su frecuencia en circadianos, infradianos y ultradianos. Los ritmos circadianos (del latín *circa*, alrededor del, y *dies*, día) son aquellos que presentan una variación a lo largo del día con un período cercano a 24 horas, como por ejemplo el ciclo sueño – vigilia y la temperatura corporal. Los ritmos infradianos (del latín *infra*, debajo del, y *dies*, día) tienen un período mayor a las 24 hs, y ejemplo de ellos son el ciclo menstrual y el ciclo de hibernación. Mientras que los ritmos ultradianos (del latín *ultra*, más allá, y *dies*, día) presentan un período menor a las 24 hs, como por ejemplo el ciclo cardíaco y el respiratorio.

Para caracterizar un ritmo biológico se pueden definir una serie de parámetros: período, amplitud y fase (Figura 1.1). El período se define como la duración de un ciclo, o sea, el tiempo que transcurre entre dos sucesos idénticos; la amplitud es la intensidad de la variable que registramos, es decir, la distancia que existe entre el valor medio y el valor más alto que alcanza la variable a lo largo del período; la frecuencia es la cantidad de ciclos por unidad de tiempo (o sea, la inversa del período); y la fase nos dice en qué momento del ciclo temporal está situada la variable en estudio, y ésta puede definirse como la *acrofase*, momento en que la onda llega a su punto máximo, o la *batifase*, momento en el que la onda está en su nivel mínimo.



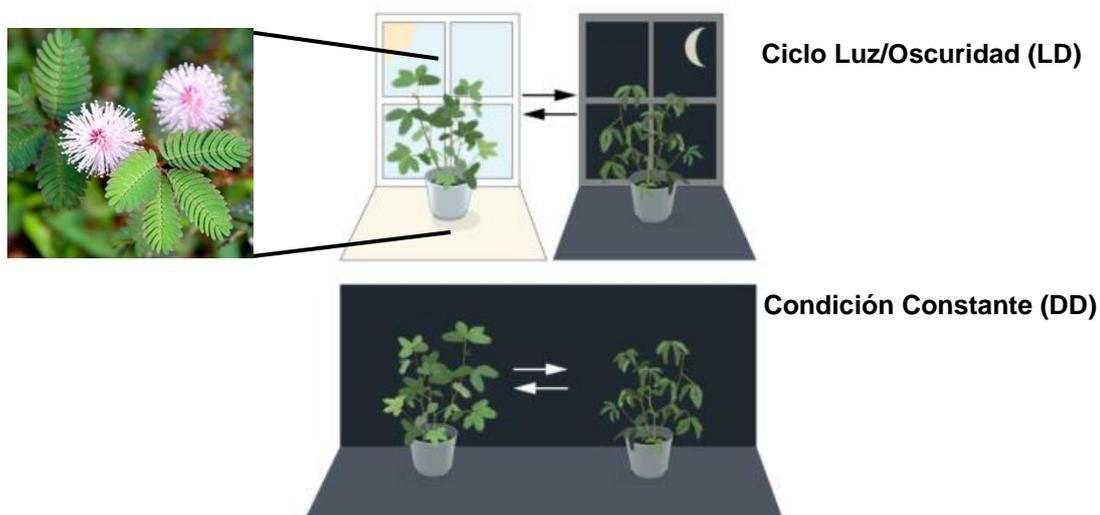
**Figura 1. 1. Parámetros característicos de un ritmo.** (A) Características de un ritmo biológico tomado como una onda sinusoidal. (B) Ejemplos de ritmos biológicos con diferentes amplitudes, períodos y fase (acrofase).

## Antecedentes históricos de los estudios cronobiológicos

Durante muchos años se observó que diferentes organismos mostraban cambios cíclicos en sus actividades fisiológicas. En la antigüedad, médicos egipcios observaron variaciones periódicas en la salud y en los síntomas de personas con ciertas patologías, y establecieron momentos del día en que esos síntomas se agudizaban. Con el tiempo, estas bases de la medicina egipcia fueron tomadas por filósofos, naturalistas y médicos griegos, tales como Aristóteles, Hipócrates y Diocles, que a su vez realizaron sus propios aportes. Para ellos, la naturaleza cíclica de los síntomas tenía una estrecha relación con los astros. Por ejemplo, Aristóteles menciona en su libro "Sobre la Generación de los Animales", que el organismo femenino podía ser influenciado por la Luna. Pero las primeras observaciones reportadas de los ritmos biológicos se remontan al siglo IV a. C., cuando el naturalista Andróstenes, que acompañaba a Alejandro Magno en sus conquistas, describió los ritmos diarios de apertura y cierre de las hojas del árbol de tamarindo (*Tamarindus indicus*).

Hasta el siglo XVIII se creía que los organismos modificaban su comportamiento como una respuesta pasiva a cambios en los ciclos astronómicos. Sin embargo, Jean-Jacques d'Ortous de Mairan [1] realizó un experimento que sugería la presencia de un reloj endógeno con un período cercano a las 24 horas. El científico francés estudio el movimiento foliar de la planta *Mimosa pudica*, llevando a cabo los primeros estudios cronobiológicos. Observó que las hojas de la planta se mantenían abiertas durante el día y se retraían durante la noche. Para demostrar que ese movimiento no era una respuesta pasiva al ciclo ambiental, De Mairan llevo a cabo un nuevo experimento: colocó la maceta en una caja dentro de la cual no llegaba la luz solar, y observó que las hojas de la *Mimosa* aún se seguían moviendo (Figura 1.2). Este trabajo fue crucial ya que demostró que la planta *Mimosa pudica* era capaz de mantener el movimiento

rítmico de las hojas aún en ausencia de estímulos ambientales, y fue la prueba preliminar de la presencia de un reloj biológico.



**Figura 1. 2. Primer experimento Cronobiológico** fue realizado por De Mairan, quien demostró que la planta *Mimosa pudica* mantiene el movimiento cíclico de sus hojas aun en condiciones constantes, sin ningún estímulo ambiental, lo que sugiere que existe un reloj interno.

Por otro lado, también las observaciones de Linneo —contemporáneo a De Mairan— contribuyeron a la cronobiología. Linneo tenía un amplio conocimiento de los ritmos de apertura y cierre de las flores de muchas especies de plantas, así construyó un reloj floral en el que diferentes especies florecían a diferentes horas del día [2]. Estudios posteriores, realizados por Pfeffer a finales del siglo XIX, demostraron que las plantas mantienen las variaciones fisiológicas en condiciones constantes pero con un periodo diferente a 24h [3].

Los primeros trabajos científicos que evidenciaron ritmos biológicos en la fisiología humana fueron realizados por Sanctorius, quien a comienzos del siglo XVII construyó una gran balanza en la cual se pesaba en cada una de sus comidas; así, durante 30 años anotó su peso y los cambios en sus variables fisiológicas y observó ritmos mensuales en su peso corporal, y en la turbidez de la orina. En 1845, Briton J. Davy describió ritmos diarios y anuales en su temperatura corporal, y desde entonces dicha variable ha sido utilizada como marcador del sistema circadiano humano. Por otro lado, estudios realizados por el fisiólogo alemán L. Landois demostraron que los ritmos de temperatura no son producidos por la ingesta de alimentos. Además, describió un sencillo experimento cronobiológico de inversión del ciclo, donde, se pudo invertir la típica curva térmica que el mismo describió [3].

Otras observaciones acerca de ritmos biológicos fueron realizadas en aves. Es el caso del científico alemán Gustav Kramer quien, a fines de la década del 40 del siglo XX, fue el primero en utilizar el término reloj biológico. El estudio de las aves migratorias le permitió observar que las mismas utilizan la posición

cambiante del Sol como referencia para mantener constante su dirección de migración, ello las obliga a disponer de un reloj biológico que modifique continuamente la referencia solar a lo largo del día [4]. Además, investigaciones realizadas por Karl von Frisch, etólogo alemán y premio Nobel de Fisiología, demostraron que las abejas poseen una memoria de tiempo, siendo capaces de anticiparse unos minutos antes a la entrega de comida. Los trabajos realizados contribuyeron a la idea de osciladores sincronizados por el horario de alimentación.

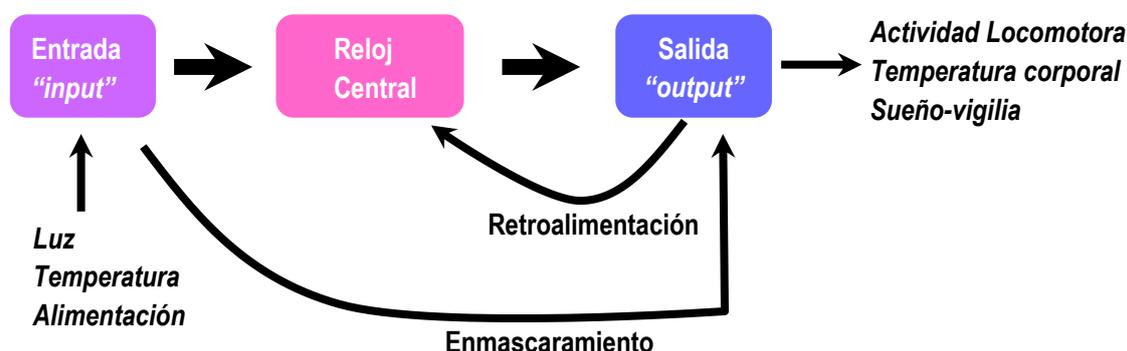
Recién a mediados del siglo XX distintos trabajos científicos contribuyeron al nacimiento oficial de la cronobiología como disciplina científica. Las investigaciones realizadas por Colin S. Pittendrigh y Jürgen Aschoff fueron de gran aporte en el estudio de los ritmos circadianos, es por eso que son considerados los padres de la cronobiología moderna. Ambos desarrollaron las bases conceptuales y los principios básicos que rigen el comportamiento de los ritmos biológicos. Pittendrigh focalizó sus estudios en la mosca de la fruta *Drosophila Melanogaster*, llegando a descubrir una de las propiedades principales de los ritmos circadianos, luego conocida como “compensación por temperatura” [5, 6]. Por su parte, Aschoff fue pionero en el estudio de ritmos en humanos, en los que registro la temperatura corporal y el ciclo de sueño-vigilia, generando así las bases sobre la cronobiología médica, y fue quien impulso el término *Zeitgeber* (o “dador de tiempo”), utilizado para señalar a los ciclos ambientales capaces de poner en hora los relojes biológicos, como la luz o la temperatura [7, 8].

Por otra parte, estudios realizados por Franz Halberg y Alain Reinberg contribuyeron al campo de la Cronofarmacología. Halberg demostró que los efectos tóxicos de drogas y fármacos varían de forma circadiana [9, 10]. A comienzos del siglo XX, el biólogo y genetista Curt Richter [11] realizó importantes contribuciones en el campo de los ritmos circadianos, en particular identificó el hipotálamo como posible localización del reloj biológico central en mamíferos. Posteriormente, se fueron identificando diferentes grupos neuronales localizadas sobre el quiasma óptico, más tarde conocidos como el núcleo supraquiasmático [12-16]. Además, estudios realizados por Michael Young en *D. melanogaster* demostraron las bases moleculares del reloj biológico en estos animales [17], que junto con los experimentos de Jeff Hall y Michael Rosbash les valieron el premio Nobel de Fisiología o Medicina en 2017.

## **Propiedades del reloj biológico**

Vivimos en un planeta que gira con un período de 24 horas y, en consecuencia, prácticamente todos los seres vivos que lo habitan presentan ritmos diarios en todas las funciones fisiológicas, bioquímicas y de comportamiento. Los ritmos biológicos son endógenos, es decir se generan en ausencia de cambios externos y requieren del buen funcionamiento del reloj endógeno o central (del griego *endo*=dentro, y *gen*=generación, que se origina o nace en el interior). Sin embargo, la persistencia de los ritmos circadianos en condiciones ambientales constantes no implica que esos ritmos sean independientes de las variaciones ambientales, ya que algunos cambios en el ambiente modulan el período o la fase de estos ritmos. A estos

cambios se los denomina agentes sincronizadores (*Zeitgeber* o *input*). El principal agente ambiental sincronizador del reloj biológico es el ciclo de luz-oscuridad [18, 19], pero también existen otros tales como el ciclo de temperatura [20], el ciclo de alimentación [18] y el ciclo de estimulación social [21, 22]. El agente sincronizador pone en hora al reloj central, pero también existen mecanismos de acoplamiento entre el reloj y los ritmos que controla (salida del reloj u *output*) [14, 23, 24]. En ciertas ocasiones, el *zeitgeber* puede modificar directamente a los ritmos, pasando por alto el reloj central, en un proceso que se llama enmascaramiento [25]. Además, existen mecanismos de retroalimentación entre los ritmos circadianos y el reloj central (Figura 1.3).



**Figura 1. 3. Principales componentes del sistema circadiano**, compuesto por tres componentes principales, los estímulos de entrada que sincronizan al reloj central y este genera el acoplamiento de las señales de salida del reloj.

Por otro lado, el reloj biológico tiene un mecanismo de compensación por temperatura [26]. Esta propiedad se evalúa mediante el coeficiente  $Q_{10}$ , el cual indica el nivel de cambio de la velocidad de cualquier proceso biológico en un rango de  $10^{\circ}\text{C}$ . Los ritmos circadianos poseen un  $Q_{10}$  de 0,8 - 1,4, por lo que se considera que el reloj interno sigue funcionando de forma precisa independientemente de los cambios en la temperatura corporal [27, 28].

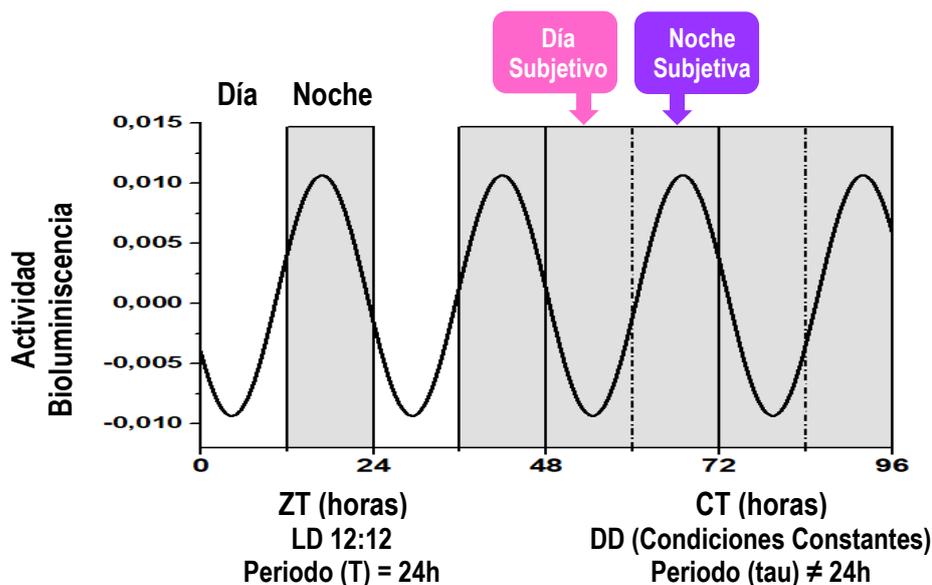
Así, para que un proceso pueda definirse como circadiano debe cumplir con las tres propiedades fundamentales definidas por Colin Pittendrigh en 1960 [6]:

1. **Carácter endógeno** de los ritmos, es decir la capacidad de un organismo determinado de generar ritmos por sí mismo, sin necesidad de cambios externos.

2. **Capacidad de ser sincronizados por un *Zeitgeber***, permitiendo así que los organismos que se encuentran bajo condiciones ambientales rítmicas adopten el valor del periodo dado por el medio ambiente con una relación de fase estable.

3. **Capacidad de mantener el período endógeno independientemente de la temperatura**, es decir que compensan sus variaciones.

A continuación, se mencionan algunas de las definiciones comúnmente utilizadas en cronobiología. Cuando un organismo se mantiene bajo condiciones ambientales constantes se dice que está en “libre curso” o *free running (FR)*, de esta forma el organismo manifiesta sus ritmos endógenos (Figura 1.4). Bajo estas condiciones, los organismos presentan un pequeño desfasaje cada día en el inicio de su actividad, generando así un periodo endógeno diferente de 24 horas. El periodo del ritmo en libre curso se identifica con la letra griega *tau* ( $\tau$ ). El valor que toma *tau* es único para cada animal y es característico de la especie, tomando valores entre 23 y 28 horas, siendo más preciso en las especies nocturnas que en las diurnas.



**Figura 1. 4. Representación de un ritmo de actividad** sometido a un ciclo T de luz/oscuridad de 12:12 (12 horas de luz, 12 horas de oscuridad) y transferido posteriormente a condiciones constantes de oscuridad, DD.

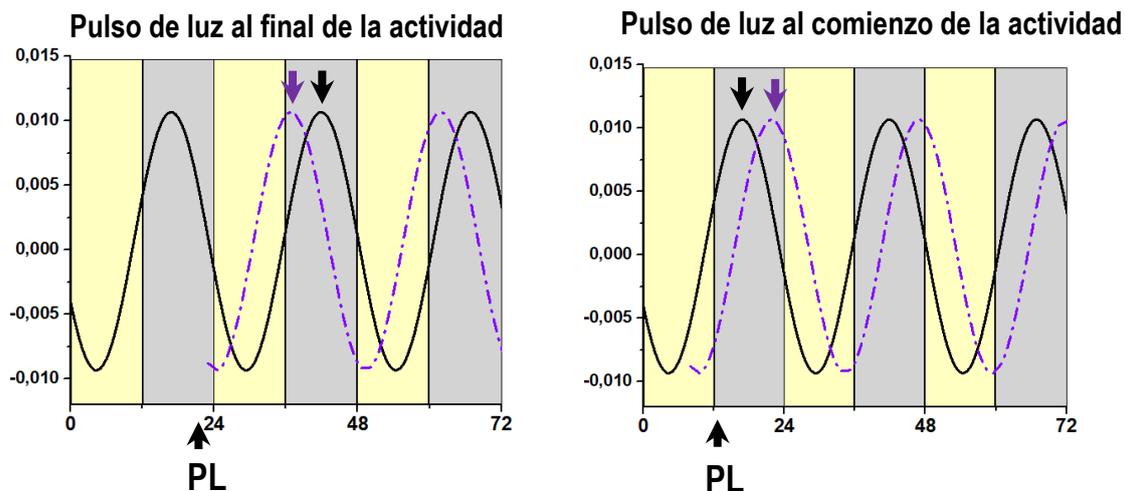
Otros factores que caracterizan al ritmo en FR es la duración de la fase de actividad ( $\alpha$ ,  $\alpha$ ) y la fase de reposo ( $\rho$ ,  $\rho$ ) de un organismo. Ambas son complementarias, y por lo tanto la suma de las mismas corresponden al valor del periodo del ciclo completo.

Otras nomenclaturas utilizadas en el estudio de los ritmos circadianos que hacen referencia a la medición del tiempo en condiciones cíclicas ambientales son: *Zeitgeber Time (ZT)* o “dador de tiempo” y *Circadian Time (CT)* o “tiempo circadiano”. Así, ZT0 se define como el momento del comienzo del día, marcado por una clave temporal como por ejemplo el encendido de las luces, y CT0 indica el momento de inicio del día subjetivo. Por otro lado, otra característica a analizar es la fase de un ritmo bajo ciertas condiciones ambientales. Se determina la fase que tiene el organismo en estudio durante la condición cíclica ambiental (ZT) y se compara con la fase en condiciones constantes (CT), si el ritmo circadiano mantiene la fase en condiciones constantes (CT) diremos que el organismo está sincronizado. Ahora bien, si el organismo en estudio tiene una fase clara bajo condiciones ambientales (ZT), pero no la mantiene bajo condiciones constantes diremos que el animal esta enmascarado.

En condiciones constantes (CT), el periodo (*tau*) puede variar por diferentes causas que provocan su alteración como la intensidad de luz, la historia rítmica previa (post-efecto) y otros factores como la edad del individuo.

Una de las Reglas de Aschoff es que los animales diurnos tienen en general un *tau* mayor a 24 horas, mientras que en animales nocturnos el *tau* es menor a 24 horas. Además, en muchas especies se observó que el *tau* varía continuamente con la intensidad de la luz (animales nocturnos alargan el valor de *tau* cuando se incrementa la intensidad de la luz, mientras que animales diurnos lo acortan cuando la intensidad de la luz aumenta). Por otro lado, puede existir un fenómeno denominado “post efecto” del ciclo ambiental previo, el cual genera una modificación en el valor de *tau*. Esto es, cuanto más alejado sea el fotoperiodo (período T) de *tau*, un mayor post-efecto se observa. Además, el envejecimiento de los organismos modifica el valor de *tau* de un modo general: a medida que el animal envejece el ritmo endógeno se acelera.

Otra característica propia de cada organismo es la curva de respuesta de fase. La misma nos muestra cómo varía la fase de un ritmo circadiano respecto del momento circadiano en el que un estímulo es aplicado. Cuando un organismo entrenado a un ciclo ambiental y luego mantenido en condiciones constantes es expuesto a un pulso de luz corto a diferentes momentos del período de 24 h, el reloj biológico mostrará distintos tipos de cambios de fase. Brevemente, cuando el pulso de luz se aplica durante el día subjetivo (aquel momento en que el animal se comporta como si fuera de día) tiene un efecto nulo sobre el inicio de la actividad. En cambio, cuando el pulso de luz se aplica durante la noche subjetiva del animal (cuando el reloj endógeno indica que debería ser de noche) habitualmente provoca un cambio de fase brusco del ritmo en libre curso. Así, durante la primera mitad de la noche subjetiva los pulsos de luz generan un retraso de fase en el ritmo biológico, mientras que durante la segunda mitad de la noche subjetiva generan un avance de fase en el ritmo (Figura 1.5). Este fenómeno explica lo mencionado anteriormente, cuanto más alejado está el ciclo T del *tau* del animal en estudio, mayor será el post-efecto que tenga.



**Figura 1. 5. Modificación de la fase por un pulso de luz:** un pulso de luz (PL) dependiendo el momento que sea dado generara un adelanto o retraso de fase en el animal en estudio. Si el PL se da al final de la actividad (primer gráfico) genera un adelanto de la fase, mientras que un PL al comienzo de la actividad (segundo gráfico) genera un retraso de fase.

## Organismos modelos en el estudio de la cronobiología

Existe un inmenso número de organismos que habitan el planeta Tierra, los cuales evolucionaron y se adaptaron a los cambios cíclicos del medio ambiente. Es por eso que en casi todos ellos se han encontrado ritmos circadianos en muchas de sus variables fisiológicas, bioquímicas y de comportamiento. Estos estudios cronobiológicos han sido estudiados en diferentes sistemas modelos, tales como cianobacterias, hongos, plantas y animales. Estos sistemas nos ayudan a poder descifrar y entender los mecanismos moleculares del reloj circadiano. A continuación, se mencionan algunos de los organismos modelos más utilizados en cronobiología, así como los principales hallazgos que aportaron cada uno de ellos.

Las Cianobacterias son el modelo principal para el estudio de los ritmos circadianos en procariontas. Algunas de las características que favorecieron el estudio de los ritmos en este modelo son el pequeño tamaño de su genoma, la fácil manipulación genética [29, 30] y la utilización de reporteros bioluminiscentes para observar la expresión de genes reporteros en tiempo real, permitiendo el análisis de ritmos robustos y de fácil análisis [31] (Figura 1.6 a). Los primeros estudios realizados en este organismo permitieron descubrir oscilaciones circadianas en la fotosíntesis y fijación del nitrógeno [32-34]. Las cianobacterias son los únicos organismos procarionta del que se conoce un reloj circadiano completo.

Por otro lado, *Neurospora crassa* es un hongo filamentoso muy caracterizado cronobiológicamente, y fue uno de los primeros organismos eucariotas en ser utilizado como modelo en cronobiología. Su rápido crecimiento, su sencillo mantenimiento en el laboratorio y el conocimiento de su secuencia genómica lo convirtieron en un organismo modelo [35]. El primer hallazgo de un ritmo biológico en *Neurospora crassa* fue en 1959, se observó que el crecimiento y la formación de las conidias en condiciones ambientales

constantes de luz, temperatura y humedad tienen un periodo endógeno de 22.5 horas, aunque pueden ser entrenados a 24h y tienen compensación por temperatura [36]. El método que es usualmente utilizado para estudiar ritmos en *N. crassa* consiste en cultivar a los hongos en tubos de vidrio, donde es sencillo observar la formación de conidios en forma de bandas [37]. Estos conidios son de color naranja debido a los pigmentos carotenoides, y su proceso de producción está controlado por el reloj circadiano, alcanzando un máximo justo antes del amanecer [38]. El fenotipo de las bandas de esporas generó una herramienta clave para el estudio de los ritmos en estos organismos (Figura 1.6b).

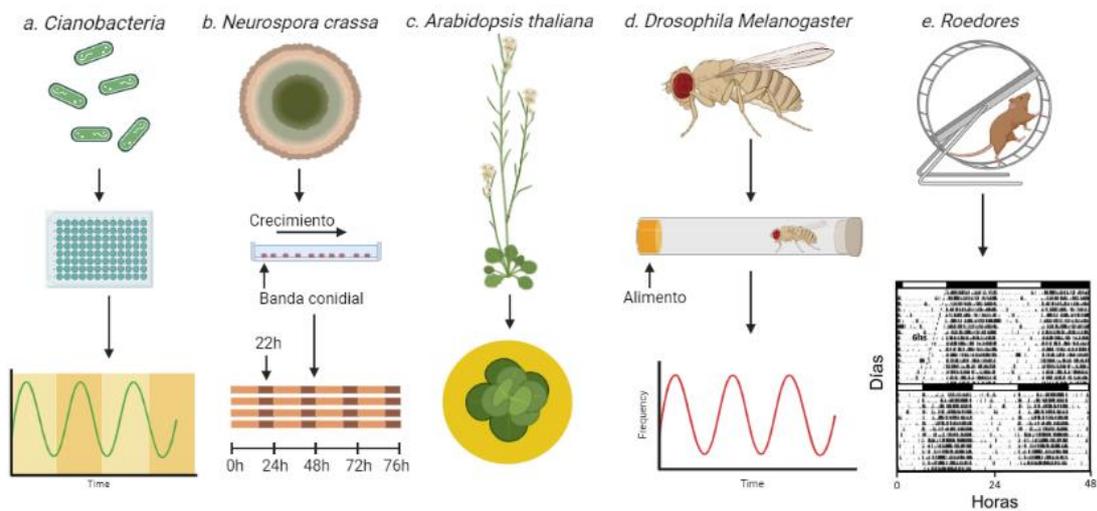
La planta dicotiledónea *Arabidopsis thaliana* es un modelo muy utilizado en el estudio de los ritmos circadianos. Desde las primeras observaciones realizadas por De Mairan, se conoce que el movimiento de las hojas de la planta Mimosa es controlado por un reloj circadiano. Hoy en día, además, se sabe que las plantas presentan ritmos circadianos en procesos tales como la elongación del tallo, la apertura y cierre de los estomas, la germinación, la actividad fotosintética, la apertura de las flores, la tolerancia al estrés, la expresión génica y la fosforilación de proteínas [39]. Si bien los primeros estudios mostraron que las plantas poseen ritmos biológicos robustos y de fácil observación, recién en la década de 1990 se las volvió a utilizar como modelo en cronobiología. Esto fue posible gracias al desarrollo de un reportero basado en el gen de la enzima luciferasa, creando así un sistema reportero que permitió el monitoreo de la expresión de numerosos genes en tiempo real, y en plantas individuales [40]. Posteriormente, esta herramienta permitió identificar genes involucrados en los ritmos circadianos de las plantas, como *toc1-1* (por sus siglas en inglés *timing of cab1 expression*) [41-43] (Figura 1.6 c).

La mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* es el principal organismo modelo utilizado en genética clásica, y desde hace varios años en cronobiología [44]. Algunas ventajas que proporciona *D. melanogaster* como sistema experimental son su pequeño tamaño, su fácil manipulación, su ciclo de vida corto (que tarda en condiciones de laboratorio a 25°C alrededor de 10 días en completarse), su abundante descendencia, su genoma totalmente secuenciado y la disponibilidad de herramientas genéticas para su estudio.

Para descubrir las bases moleculares que gobiernan los ritmos circadianos en estos animales, los principales comportamientos que se midieron fueron la eclosión de las moscas adultas (desde el estadio de pupa) y la actividad locomotora. La eclosión es un evento que puede ser monitoreado en una población, y tiene un pico durante las primeras horas de la mañana. De esta manera, se encontraron los primeros genes involucrados en los ritmos circadianos que fueron mapeados y eventualmente clonados [45-47]. En este organismo se identificaron casi todos los genes involucrados en los ritmos circadianos como *per* (*period*), *tim* (*timeless*) [48], *clk* (*clock*) [49] y *cyc* (*cycle*) [50], y hoy se sabe que forman parte del principal *loop* transcripcional que maneja los ritmos circadianos en estos animales. Posteriormente se identificaron numerosas proteínas que intervienen en los ritmos biológicos, tales como *Cryptochrome* (*cry*) [51] o la quinasa *double-time* (*dbt*) [52, 53]. El uso de la actividad locomotora es el método más utilizado para medir

los ritmos circadianos y hacer un *screening* de posibles genes reloj en las moscas, ya que permite tomar registro del movimiento en tiempo real de muchos individuos al mismo tiempo, en un espacio reducido y con costos relativamente bajos. Así, se encontraron patrones de reposo y actividad, incluso homologables a ciclos de sueño y vigilia tal como se pueden observar en humanos [54]. Bajo ciclos de LD 12h:12h, las moscas exhiben picos de actividad durante la mañana y la noche, anticipando el encendido y al apagado de las luces [55, 56]. En condiciones constantes (DD), el pico de la mañana desaparece y solo persiste el pico de la noche, con un periodo de 23.8 h (Figura 1.6d).

Por otra parte, los roedores son los modelos mamíferos más utilizados en el estudio de la cronobiología, por tener una amplia semejanza con el reloj molecular de los seres humanos. Entre los más estudiados se encuentra el ratón común *Mus musculus* y el hámster dorado (*Mesocricetus auratus*). El primer hámster dorado mutante de un gen reloj se halló por casualidad registrando la actividad locomotora en rueda bajo condiciones constantes de oscuridad. Durante el experimento se observó que uno de los animales tenía un periodo de actividad locomotora más corto (22 h), en comparación con el *wild-type* (24 h) [57]. Luego se encontró que la mutación natural pertenecía al mutante *tau*, que codificaba para la proteína *caseína quinasa 1 epsilon* (CK1ε) [58]. Otro importante descubrimiento para la cronobiología fue el mutante para el gen *clock* [59], en el que se observó que bajo condiciones constantes la actividad locomotora de los mutantes tenían un periodo más largo que los animales *wild-type*. Sin embargo, el gen fue clonado e identificado recién en 1997 [59]. El registro de la actividad locomotora en rueda es la variable más utilizada para estudiar la salida del reloj, pero no la única. También se utiliza la determinación de ritmos de temperatura corporal, de alimentación, de secreción hormonal, ritmos metabólicos y de expresión genética. Con los avances de la ingeniería genética se logró secuenciar completamente el genoma del ratón y utilizar nuevas técnicas genéticas para el estudio de los ritmos en roedores, permitiendo convertirlo en uno de los modelos más usados en cronobiología [60] (Figura 1.6 e).



**Figura 1. 6. Modelos para el estudio de la cronobiología:** **a. *Cyanobacteria*:** es un modelo unicelular, el reportero luciferasa es utilizado para el estudio de promotores en placas de 96 wells, permitiendo analizar distintos mutantes del componente oscilatorio. **b. *Neurospora crassa*:** produce esporas asexuales bajo el control del reloj biológico. Este proceso de formación en banda de las conidias es tomado como una salida del reloj circadiano. **c. *Arabidopsis thaliana*:** los ritmos de bioluminiscencia por la fusión de promotores con luciferasa puede ser visualizado por muchos días en condiciones constantes. **d. *Drosophila melanogaster*:** el modelo utilizado es el movimiento diario de vuelo de moscas en un tubo con un haz infrarojo. Los números de cortes en el haz son monitoreados electrónicamente para determinar los patrones circadianos de actividad locomotora. **e. *Roedores*:** Actividad locomotora en rueda es medida en condiciones constantes y en forma de actograma. Los momentos de actividad son mostrados con barras negras, proveen la información del periodo y la fase del animal en estudio.

## Organización del sistema circadiano

### Anatomía del sistema circadiano en vertebrados: mamíferos

La organización funcional del sistema circadiano en los mamíferos consiste en una vía de entrada del agente sincronizador, las conexiones de entradas (aférentes) que sincronizan al oscilador central con el ambiente y las conexiones de salida (eferentes) que permiten que el oscilador module las respuestas del organismo, acoplado el período y la fase de los distintos osciladores del organismo [61, 62].

El principal oscilador central del sistema circadiano en mamíferos reside en los núcleos supraquiasmáticos, (NSQ) [12, 63, 64]. Los NSQ están conformados por un pequeño grupo de neuronas localizadas en el hipotálamo ventral anterior, sobre el quiasma óptico, rostral a las comisuras supraópticas y ventrolateral al tercer ventrículo. Sus neuronas son las más pequeñas del hipotálamo y se ha estimado que el número de neuronas que forman parte del oscilador es de alrededor de 16000, a las que se debe sumar un importante número de células gliales [65]. Los NSQ ha sido divididos en dos regiones principales, una región dorsomedial que secreta arginina vasopresina (AVP) y neurofisisina, y una región ventrolateral

que contiene el péptido intestinal vasoactivo (VIP) y el péptido liberador de gastrina (GRP) en sus neuronas [66].

El experimento que demostró que los NSQ son el principal oscilador del sistema circadiano se basó en que su lesión bilateral en ratas produjo una desorganización del patrón circadiano de varias conductas y parámetros fisiológicos [67]. Otros experimentos también realizados en ratas demostraron que trasplantes de tejido hipotalámico conteniendo los NSQ en animales lesionados restablecen los ritmos circadianos de estos últimos, induciendo la ritmicidad del donante al receptor [67, 68]. Además, la estimulación eléctrica o química de los NSQ produce adelantos o retrasos en la hora que inicia el lapso de actividad (cambios de fase) durante el ciclo circadiano, similares a los provocados por pulsos de luz cuando se aplica en oscuridad constante. A nivel celular, las neuronas del oscilador central presentan ritmos circadianos en su actividad eléctrica, metabólica y en la expresión génica que además persisten cuando los experimentos se realizan en condiciones de iluminación constante; estos resultados se observaron tanto en cultivos celulares *in vitro*, así como también en células o neuronas extraídas del NSQ [69, 70]. La capacidad de generar un patrón circadiano de actividad es inherente a cada una de las neuronas del NSQ, aunque las interacciones sinápticas dentro del núcleo parecen participar hasta cierto grado en el acoplamiento de los osciladores individuales [71].

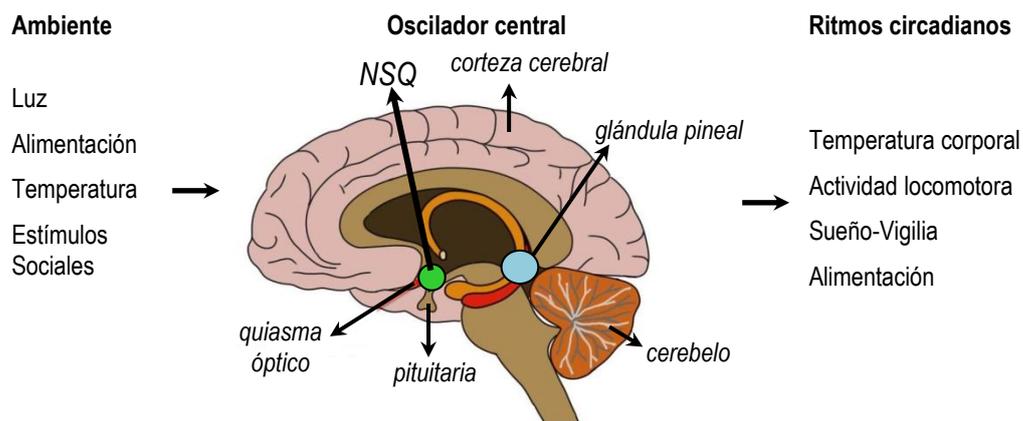
Las vías de entrada (aférentes) que sincronizan al oscilador central con el ambiente son de dos tipos, fóticas y no fóticas. La vía fótica tiene sus receptores en la retina, los que responden al nivel general de iluminación y se activan por medio de cambios químicos en un fotopigmento específico: la melanopsina [72], que se encuentra en células ganglionares y no forma parte de los fotorreceptores clásicos de las retinas (conos y bastones). La retina se conecta con los NSQ por medio del tracto retinohipotalámico (TRH) [13]. El mismo está formado por axones que se proyectan desde las células ganglionares de la retina hasta el oscilador central, y transmitiendo información lumínica a través del neurotransmisor glutamato y PACAP. El TRH también se conecta con la lámina intergeniculada lateral (IGL) y de ahí con los núcleos supraquiasmáticos, liberando allí el neurotransmisor GABA, encefalinas y neuropéptido Y [3]. Por otro lado, la vía no fótica, que se dirige desde el mesencéfalo hasta los *núcleos del rafe* medio, proyecta directamente hacia los NSQ y los núcleos del rafe dorsal lo hacen indirectamente vía una proyección a los IGL, donde libera fundamentalmente serotonina. Estas conexiones nerviosas pueden ser la base de la sincronización por medio del alimento o la actividad motora, participando en el inicio y mantenimiento del sueño y las etapas de éste [73, 74].

Por otra parte, las vías de salida (eferentes) conectan el NSQ con el área preóptica del hipotálamo, y se encargan de modular los ritmos circadianos en la temperatura corporal, la ingesta de agua y la conducta sexual [19]. Otra de estas vías es la conexión del NSQ con la glándula pineal. Los NSQ se conectan con el núcleo paraventricular hipotalámico (PVT), del cual salen fibras nerviosas que siguen por el cordón interomediolateral de la médula espinal hasta el ganglio cervical superior, de donde surgen nuevas fibras que se conectan con la glándula pineal (Figura 1.7).

La glándula pineal, en aves y reptiles, posee fotoreceptores, que permiten obtener una señal directa de un estímulo lumínico. En estas especies la ablación de la glándula pineal elimina los ritmos circadianos. Sin embargo, en los mamíferos la misma no está expuesta de manera directa a la iluminación ambiental, ni parece jugar el papel principal en el mantenimiento de los ritmos circadianos [75]. Tanto en aves como en reptiles y mamíferos, la glándula pineal secreta la hormona melatonina, una indolamina cuyo precursor en su síntesis es el neurotransmisor serotonina. Ambas moléculas (melatonina y serotonina) se forman a partir del aminoácido triptófano que se encuentra en los alimentos con proteínas. La concentración en la sangre de la melatonina y la N-acetiltransferasa, la enzima que sintetiza la melatonina, varía a lo largo del día, aumentando la concentración de ambas durante el período de oscuridad, independientemente de que el organismo que se registre sea diurno o nocturno [76, 77]. La melatonina ejerce fundamentalmente una influencia inhibitoria sobre la secreción de las hormonas del eje hipotálamo-hipofisario [78], las cuales controlan la secreción de la mayor parte de las hormonas del cuerpo, por lo que las variaciones en la producción de melatonina modulan en gran medida la fisiología del organismo. Aunque la lesión de la glándula pineal no elimina los ritmos circadianos en los mamíferos, la influencia de la melatonina sobre el resto del cuerpo plantea la posibilidad de que dicha glándula sea un intermediario entre el sustrato anatómico de los ritmos circadianos y la expresión de estos ritmos en los mamíferos.

Además del NSQ, se han encontrado variaciones circadianas en muchos tejidos y órganos, tales como hígado, riñón, corazón, músculo, e incluso en otras áreas cerebrales. Algunos de estos órganos tienen oscilaciones circadianas y otros presentan oscilaciones ultradianas con períodos de 6-8 horas. Estudios realizados en fibroblastos de mamíferos demostraron que los mismos mantienen las oscilaciones en la expresión de genes reloj por largo tiempo en cultivos celulares tratados con un shock de suero [79]. Adicionalmente, estudios de imágenes en tiempo real en cultivos celulares primarios utilizando animales con reporteros bioluminiscentes demostraron que la mayoría de los órganos (incluyendo hígado, riñón y músculo) contienen ritmos circadianos [80].

Por lo tanto, los NSQ, la glándula pineal y otras estructuras funcionarían como coordinadores o marcapasos de las actividades circadianas de las distintas células y tejidos del organismo [81]. Además, los relojes periféricos son tan buenos como el reloj central del NSQ, y en general se sabe que los relojes periféricos utilizan esencialmente los mismos componentes moleculares del NSQ [82, 83]. Por tal motivo, actualmente se acepta la idea de que existen, además de los NSQ, otros posibles osciladores en el sistema nervioso y diversos osciladores periféricos [71, 84, 85].



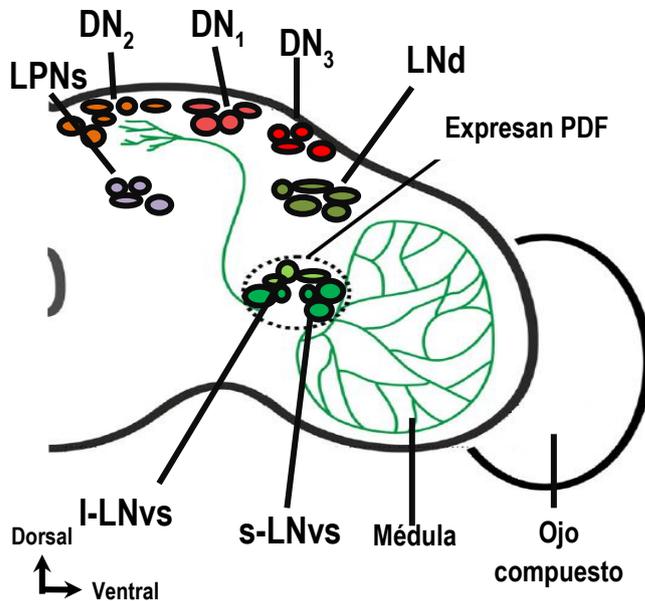
**Figura 1.7. Anatomía de sistema circadiano de Mamíferos;** El sistema está formado por un oscilador central, el núcleo supraquiasmático (NSQ), las vías de entrada (ambiente), las vías de salida (ritmos fisiológicos). Las señales que sincronizan al oscilador central, son enviadas vía eléctrica y humoral a osciladores periféricos que se encuentran en otras regiones del cerebro y en órganos periféricos. Finalmente, el sistema genera ritmos fisiológicos de temperatura corporal, actividad locomotora, sueño-vigilia, alimentación.

### Anatomía del sistema circadiano en Invertebrados

Los primeros estudios de ritmos circadianos en invertebrados fueron realizados en organismos no tradicionales como cucarachas y grillos [86-88]. De esta forma se pudo determinar que el reloj biológico de insectos está anatómicamente y funcionalmente conectado a órganos fotorreceptivos, que le permiten sincronizarse al ciclo de luz-oscuridad ambiental. Además, posee varios mecanismos de salida que controlan funciones endocrinas, metabólicas y de comportamiento, y su oscilador central está compuesto por poblaciones de neuronas con diferentes morfologías, fisiología y contenido en neurotransmisores [89]. En una gran variedad de insectos (escarabajos, cucarachas, grillos y moscas) el reloj circadiano central se localiza en una región específica del cerebro denominada *médula accesoria* (AME), ubicada en la base del lóbulo óptico [89]. Diversos estudios indican que la AME por sí sola es capaz de controlar los ritmos comportamentales en estos organismos.

En la actualidad, un modelo muy utilizado para el estudio de los ritmos circadianos en invertebrados es la mosca *D. melanogaster*, y constituyó uno de los primeros animales donde se descubrió la ubicación específica del reloj circadiano [90]. Aproximadamente, 150 neuronas del cerebro de las moscas fueron identificadas por intervenir en los ritmos circadianos de estos organismos. Las mismas se dividen en grupos (o *clusters*) y se encuentran ubicadas espacialmente en siete grupos principales. En base a su posición anatómica se dividen en: 3 grupos de neuronas dorsales (DN y DN1-3; del inglés, *Dorsal Neurons*) y 4 grupos de neuronas laterales (LNds, LPNs, l-LNvs y s-LNvs; del inglés, *Lateral Neurons*). Las neuronas laterales ventral, (l-LNvs y s-LNvs; del inglés, *large and small ventral lateral neurons*), son las más estudiadas circadianamente de *D. melanogaster*, ya que expresan el factor de dispersión de pigmento (PDF; del inglés, *Pigment-Dispersing Factor*), un neurotransmisor importante para la sincronización de las neuronas involucradas en los ritmos y para las vías aferentes del reloj de las moscas [91-98] (Figura 1.8).

Las neuronas LNv son importantes para la anticipación de la mañana, por lo que se las llama células M (del inglés, *Morning*), mientras que las LNd/DN1 son importantes para la anticipación de la tarde, por lo que se conocen como células E (del inglés, *Evening*) [99, 100].



**Figura 1. 8. Anatomía del sistema circadiano de *D. melanogaster*:** Se representa un esquema del cerebro de *Drosophila*. El sistema circadiano está compuesto por 7 grupos de neuronas: las neuronas dorsales, DN1-3; las neuronas laterales ventral, I-LNvs, s-LNvs, que liberan PDF (*peptid dispers factor*), dorsales (LNd) y posteriores (LPNs). Imagen modificada de Krzeptowski W, et al. 2018

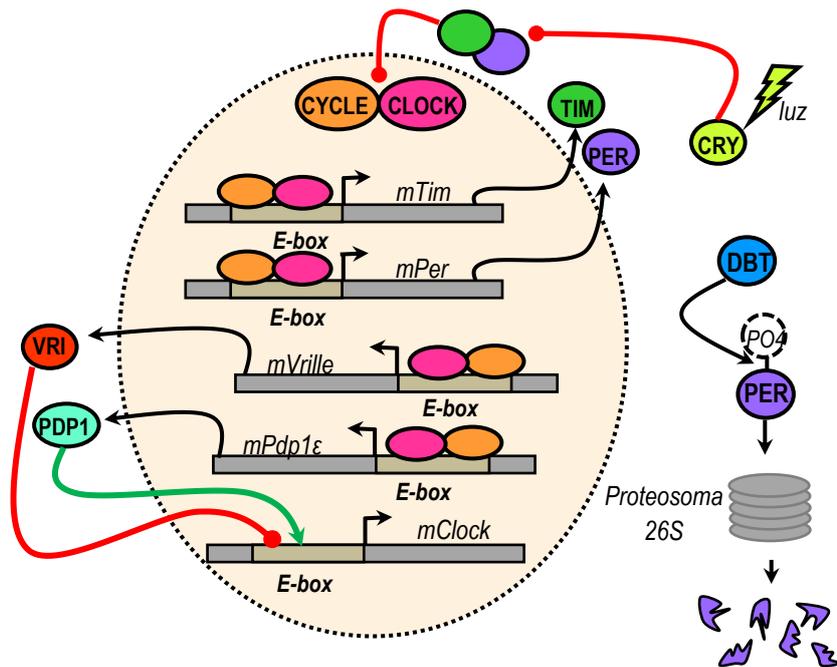
## Bases moleculares del reloj circadiano

Los ritmos circadianos son manejados por un reloj molecular que permite sincronizar los procesos biológicos con el tiempo y los cambios cíclicos del ambiente. Los componentes moleculares del reloj están conservados en diferentes especies, y su mecanismo molecular se basa en la transcripción y traducción cíclica de genes reloj, donde factores de transcripción activan la expresión de sus propios represores, generando un ciclo de retroalimentación negativa (TTFL; del inglés, *Transcription-Translation Feedback Loop*) [101]. Además, es importante destacar que las proteínas y genes reloj regulan la expresión rítmica de otros genes denominados ccgs (del inglés, *Clock Controlled Genes*) [102].

Los componentes del reloj molecular que generan las oscilaciones circadianas han sido descritos tanto en mamíferos como en *D. melanogaster*. Como se mencionó anteriormente, el modelo del reloj a nivel molecular está basado en dos ciclos de transcripción y retroalimentación interconectados que funcionan en conjunto para generar la expresión cíclica de los genes.

Los principales elementos del reloj molecular de mamíferos son las proteínas CLOCK y BMAL1, y en *D. melanogaster* las proteínas CLOCK (CLK) y CYCLE (CYC); todas ellas han sido identificadas como activadores transcripcionales. En las moscas, CLK y CYC forman un heterodímero y activan la expresión de los genes *per* y *tim*, los cuales codifican sus propias proteínas represoras PER y TIM produciendo el primer ciclo de retroalimentación. El heterodímero CLK/CYC también regula su propia expresión vía el segundo ciclo transcripcional por *vri* (*vri*) y *Pdp1ε* (del inglés, *Par domain protein 1ε*). Ambas proteínas VRI y PDP1ε se unen a una región del promotor de *clk*, mientras VRI inhibe, PDP1ε activa la transcripción

de *Clk*. Adicionalmente, dicho ciclo de retroalimentación transcripcional es regulado post-transcripcionalmente por numerosas proteínas citoplasmáticas, como quinasas, que juntas generan ritmos circadianos endógenos a nivel de mARNs y proteínas del oscilador molecular. Por otro lado, CLK/CYC regulan la expresión de genes involucrados en procesos fisiológicos y celulares. El reloj circadiano de las moscas también posee su propio fotorreceptor CRY (del inglés, *Cryptochrome*) que interviene en el entrenamiento circadiano por luz [103, 104] (Figura 1.9).



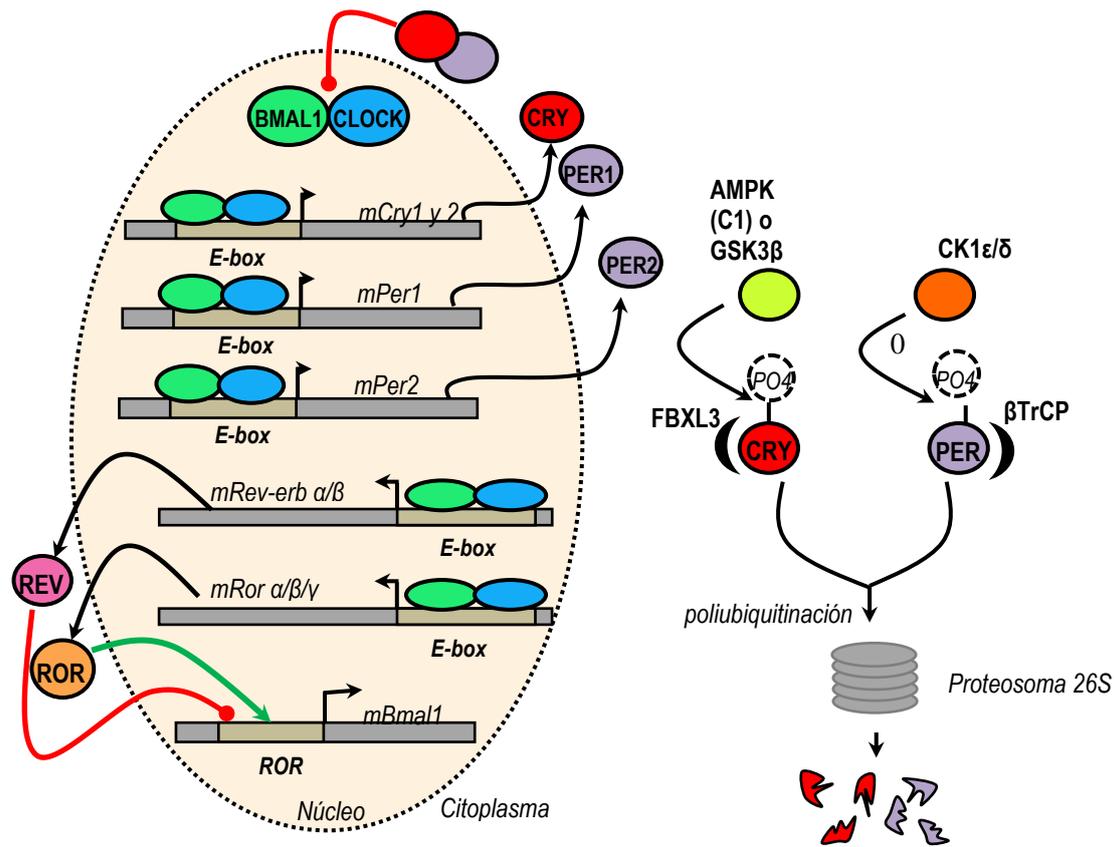
**Figura 1. 9. Esquema del reloj molecular de *Drosophila*:** Transcripción rítmica de *per* y *tim* por activación de las proteínas CLOCK/CYCLE (CLK-CYC) y posteriormente son inhibidas por TIMELESS/PERIOD (PER-TIM), que constituyen el ciclo negativo. La expresión de *Clk* es regulada por VRILLE/PAR DOMAIN PROTEIN 1ε (VRI y PDP1ε), generando un efecto negativo y positivo, respectivamente. La luz activa a CRYPTOCHROME (CRY), donde fosforila a TIM y lo lleva a degradación vía proteosoma. Esquema modifica de Krzeptowski W, et al. 2018.

En mamíferos, los genes *clock* y *bmal1* (o *mop3*) codifican proteínas de la familia bHLH-PAS (*basic helix-loop-helix; Per-Arnt-Single-minded*). El heterodímero CLOCK:BMAL1 inicia la transcripción de los genes *per* y *cry* al unirse específicamente a una región del ADN denominada E-box, -E-box (5'-CACGTG-3') y E'-box (5'-CACGTT-3')- en los promotores de sus genes blanco [105-107], y luego las proteínas PER1, PER2, CRY1 y CRY2 funcionan como elementos negativos del reloj [108-110]. PER y CRY se unen formando heterodímeros que regulan negativamente su propia transcripción interactuando con el complejo CLOCK-BMAL1 [105, 111-113].

La degradación de las proteínas PER y CRY es requerida para reiniciar el ciclo de transcripción, siendo éste un paso clave para el reseteo del periodo del reloj. El primer mutante del reloj circadiano en mamíferos fue el mutante *tau* en hámster, el cual tiene un periodo de actividad locomotora de 20 h en condiciones constantes, en comparación con la cepa *wild-type* que presenta un periodo de 24 h en libre

curso [114]. Esa disminución en el período se debe a una mutación en la enzima *caseína quinasa 1 epsilon* (CK1e), la cual participa en la fosforilación de la proteína PER [58]. Otra caseína quinasa, CK1δ, fue hallada más tarde, y se comprobó que la misma también fosforila a PER. Hoy se cree que ambas quinasas fosforilan a PER promoviendo su ubiquitinación por βTrCP y posterior degradación vía proteosoma 26S [115-118]. Similarmente a PER, ratones mutantes con periodos de actividad locomotora más largo que la cepa *wild-type* ayudaron a descifrar los mecanismos de degradación de la proteína CRY. Se ha demostrado que uno de los mecanismos por el cual se produce un periodo más largo en ratones es por una mutación en el gen *fbx/3* [119, 120]. La proteína FBXL3 genera la poliubiquitinación de CRY y posterior degradación vía proteosoma [120]. Interesantemente, CRY1 y CRY2 son marcados por ubiquitinación por un único evento de fosforilación. CRY1 es fosforilado por AMPK1 y CRY2 por una cascada de DYRK1A/GSK-3β [121-123] (Figura 1.10).

Las proteínas que actúan como elementos negativos del reloj circadiano, en particular PERs, determinan la fase del reloj. En la noche, cuando los niveles de PER son bajos, una administración aguda de luz induce la transcripción de PER1 y PER2 [124-126]. Con una exposición de luz en la noche temprana, se observa un retraso en la fase de la actividad locomotora y esto corresponde con que la luz induce el incremento de ambas proteínas PER1 y PER2 en los NSQ [127]. En la segunda mitad de la noche solo los niveles de PER1 se incrementan con la exposición a la luz, y esto corresponde con la fase de la noche cuando la luz produce un avance de la fase [127]. Estos cambios de fase que se observan (retraso, cuando la luz se administra en la noche temprana, y avance cuando se administra en la noche tardía) son suficientes para entrenar a un animal a un ciclo de luz:oscuridad (LD:DD), este método de entrenamiento por pulso de luz es lo que se conoce como entrenamiento por ciclo esqueleto.



**Figura 1. 10. Esquema del reloj molecular de mamíferos:** El heterodímero de CLOCK:BMAL1 (círculos celestes y verdes) se unen al DNA en los sitios E-box e inician la transcripción de los RNA. El resultado, las proteínas PER y CRY (círculos violetas y rojos) se dimerizan en el citoplasma y translocan al núcleo donde inhiben las proteínas CLOCK:BMAL1 donde inician su transcripción. Esquema modifica de Buhr, et al. 2013.

En el segundo ciclo, CLOCK/BMAL1 regulan su propia transcripción por la expresión de otros dos genes, *ror α/β/γ* y *rev-erb α/β*, que codifican para las proteínas RORs (del inglés, *Retinoid Acid Receptor-Related Orphan Receptor*) y REV-ERBs (del inglés, *Orphan Nuclear Receptors*), respectivamente. Ambas, RORs y REV-ERBs, regulan la expresión de BMAL1; mientras que RORs actúa como activador, la proteína REV-ERBs actúa como represor. Al igual que en *D. melanogaster*, las proteínas CLOCK/BMAL1 también regulan la expresión de ccgs [103, 104, 128] (Figura 1.10).

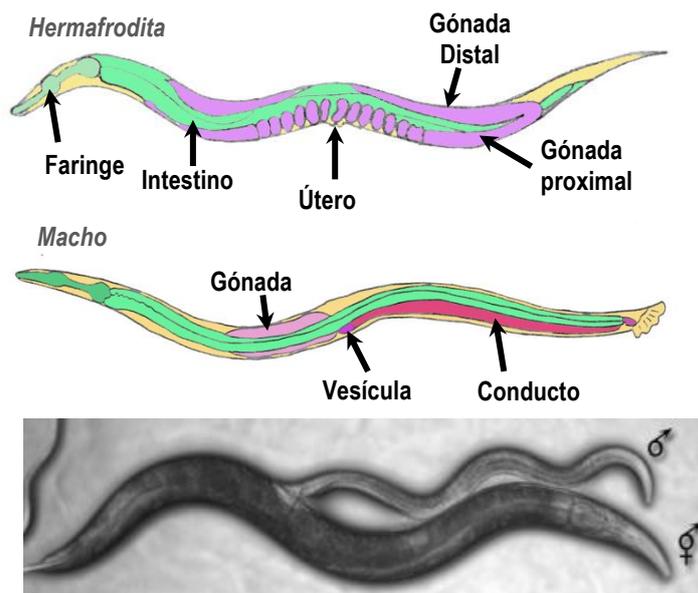
## Modelo de estudio *Caenorhabditis elegans*

*Caenorhabditis elegans* es un pequeño nematodo de vida libre cuyo hábitat está siempre asociado al suelo. Se aisló de diferentes regiones del mundo, predominantemente de zonas húmedas [129, 130], y se alimenta de microbios, principalmente bacterias.

Es un importante modelo animal desde 1970, cuando fue propuesto como sistema experimental por el científico Sydney Brenner [131], y desde entonces ha sido utilizado para investigación en diferentes áreas incluyendo genómica, biología celular, neurobiología y envejecimiento. Algunas ventajas que presenta *C.*

*C. elegans* como modelo de estudio son: su corto ciclo de vida, su genoma compacto y secuenciado, su desarrollo estereotípico, facilidad de propagación y su pequeño tamaño (mide 1 mm como adulto). El cuerpo del adulto es anatómicamente simple y está compuesto de 1000 células somáticas. *C. elegans* es un poderoso modelo para realizar cruces genéticos. Otra ventaja que presentan estos nematodos como modelo experimental es su corto ciclo de vida (3-4 semanas bajo condiciones óptimas de temperatura y alimento). En el laboratorio, usualmente crece en placas de Petri con medio sólido NGM (del inglés, *Nematode Growth Medium*) suplementado con *Escherichia coli* como fuente de alimento (las cepas más utilizadas de bacterias son la HB101 y OP50). Se puede observar fácilmente con lupa y microscopios de bajo aumento. Todas estas características lo hacen un modelo económico para su utilización en investigación, además de no requerir grandes equipamientos ni espacio para su mantención.

Por otro lado, al ser un animal transparente es muy utilizado para ensayos de microscopía y para estudios de desarrollo. La anatomía de *C. elegans* ha sido ampliamente identificada, y se pudo conocer el linaje celular completo [131-135].



**Figura 1. 11. Esquema anatómico de los nematodos hermafroditas y machos:** a. Los nematodos hermafroditas se pueden distinguir fácilmente la faringe, el intestino, la gónada distal, la gónada proximal y el útero. El macho es reconocido por su punta en forma de flecha. b. Imagen tomada con microscopio de un hermafrodita y un macho copulando. Esquema e imagen modificados del worm atlas: <https://wormatlas.org/>.

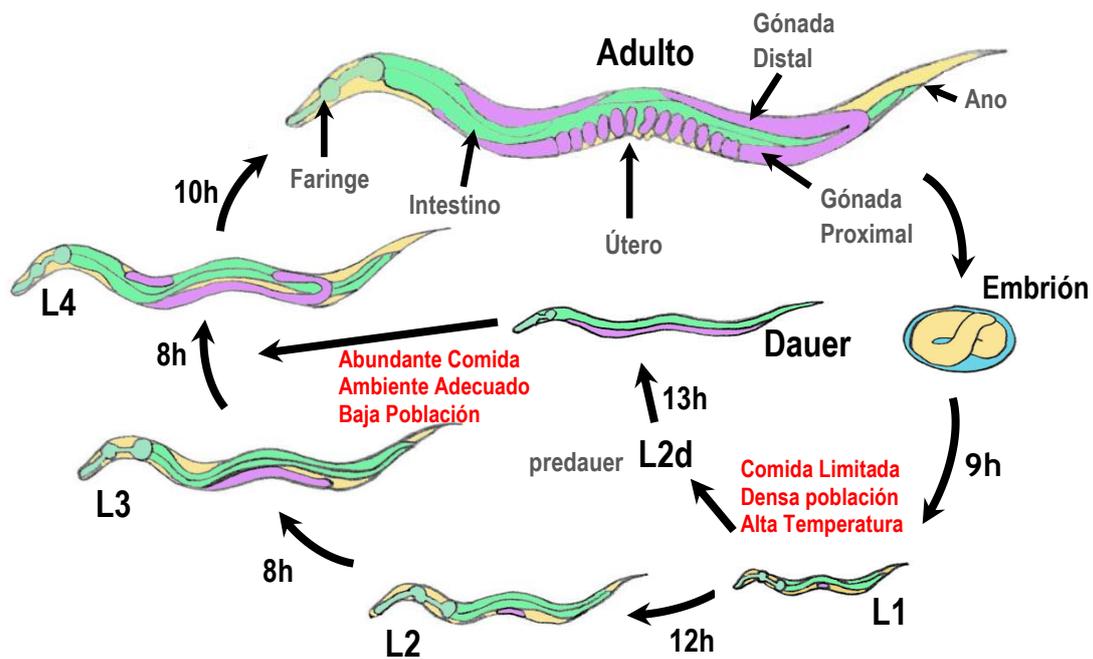
*C. elegans* presenta dos sexos: hermafroditas (XX) y machos (X0). En su hábitat natural la frecuencia de generación de machos es muy baja (0,1%) debido a la línea germinal de hermafroditas, y hay mayor frecuencia (hasta de un 50%) a través del apareamiento. La auto-fecundación de animales hermafroditas homocigotas produce la generación de una progenie idéntica en su genoma, y el apareamiento con los machos permite la mantención de cepas mutantes, así como las mutaciones móviles entre cepas, generando diversidad biológica (Figura 1.11).

Los mutantes pueden ser obtenidos por mutaciones químicas, genéticas (como es el caso de la tecnología de CRISPR) [136], y por exposición a radiación ionizante [137, 138]. Las cepas de nematodos

(en particular el estadio larval L1) pueden ser congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  por un periodo largo de tiempo. Debido a las numerosas ventajas que presenta el modelo en estudio, y que mencionamos anteriormente, *C. elegans* es un animal utilizado para estudiar diferentes comportamientos, tales como locomoción, alimentación, defecación, puesta de huevos, formación de estadio *dauer*, respuesta sensorial al tacto, olor, gusto, temperatura y otros comportamientos más complejos como el comportamiento social, aprendizaje, memoria, apareamiento masculino y periodos del sueño [139-141].

El ciclo de vida de *C. elegans* comprende un estadio embrionario, 4 estadios larvales (L1-L4) y el estadio adulto. Una vez que sucede el proceso de puesta de huevos (estado de gastrulación, aproximadamente 30 células), los nematodos eclosionan y posteriormente pasan por los 4 estadios larvales y por último entran al estadio adulto. Los embriones se convierten en gusanos semiadultos en: 5 días a  $15^{\circ}\text{C}$ , 3,5 días a  $20^{\circ}\text{C}$  y 2,5 días a  $25^{\circ}\text{C}$ . En estadio adulto *C. elegans* vive entre 3 y 4 semanas, luego muestra signos de envejecimiento. El final de cada etapa larval se marca con un cambio de cutícula (muda o *molt*), donde se sintetiza una nueva, específica de la etapa. Durante ese proceso el bombeo faríngeo cesa y el animal entra en un breve letargo [142] (Figura 1.12).

Al final del estadio L2, los animales pueden entrar a un estadio alternativo llamado "larva *dauer*", debido a las condiciones del ambiente no favorables. Los principales factores ambientales que estimulan la formación de la larva *dauer* son la presencia de feromonas (un indicio de alta densidad de población), ausencia de alimento y temperaturas altas (usualmente mayores a  $25^{\circ}\text{C}$ ). Bajo esas condiciones, se dispara la formación de un estadio larval intermedio, denominado L2d, morfológicamente diferente a la larva L2. La larva L2d tiene el potencial de formar un estadio *dauer* o una larva L3, dependiendo de la persistencia, o no, de los parámetros ambientales desfavorables [143]. Si el ambiente no favorable continúa la larva L2d se transforma en larva *dauer*. Este estadio se caracteriza por no mostrar signos de envejecimiento, y en el cual la alimentación se detiene indefinidamente y la locomoción se reduce notablemente. El estado *dauer* termina cuando el animal se encuentra nuevamente en condiciones favorables, después de una hora de exposición a su fuente de alimento, la larva *dauer* tarda de dos a tres horas en comenzar a alimentarse nuevamente, y después de aproximadamente diez horas muda al estadio de larva L4 (Figura 1.12).



**Figura 1. 12. Esquema del ciclo de vida del *C. elegans*:** Se observa el ciclo de vida del nematodo, pasando del estadio embrionario, por los 4 estadios larvales (L1-L4) y llegando finalmente al estadio adulto, donde puede vivir por 3 semanas. Además, se identifican las diferentes anatomías que se pueden observar en el estadio adulto. Esquema modificado del worm atlas: <https://wormatlas.org/>.

En conclusión, *C. elegans* es un fantástico modelo para investigación. Como ya fue mencionado, sus múltiples ventajas, tales como su pequeño tamaño, su gran número de descendía, la poca cantidad de equipamiento requerido para su crecimiento y mantenimiento (lupas, microscopio e incubadoras), la amplia disponibilidad de mutantes existentes en el *Caenorhabditis Genetics Center* (CGC), entre otras, hacen del nematodo un ideal modelo de estudio para las diferentes áreas de la biología.

## Ecología de *Caenorhabditis elegans*

La ecología de *C. elegans* ha sido estudiada ampliamente; su hábitat natural, su reproducción, el crecimiento poblacional, la migración hacia nuevos territorios, su alimentación, su relación con otros organismos, así como también los depredadores que posee. Entender su hábitat natural permite generar nuevos conocimientos en el estudio de las diferentes áreas en las cuales se utiliza al nematodo como modelo.

La cepa *wild-type* de referencia comúnmente utilizada en el laboratorio es la N2, y fue aislada de Bristol, Inglaterra. La misma fue cultivada en condiciones de laboratorio por muchos años antes de ser congelada, por lo tanto, puede diferir de la cepa que se encuentra en la naturaleza, ya que fue modificada por la domesticación. *E. coli* es utilizada como fuente de comida, no por ser su alimento natural, sino porque crece y se reproduce perfectamente bien alimentándose de esta bacteria. Por muchos años, la única información que se sabía sobre el hábitat natural del *C. elegans* era que vivía en el compost y en humus

ricos (el humus es la materia que queda de la descomposición de los restos vegetales como hojas o flores) [144]. Posteriormente, esta idea fue modificada cuando se comenzaron los estudios de nuevas poblaciones aisladas de *C. elegans*, para el estudio de la biología evolutiva y la ecológica. A su vez dichas investigaciones generaron nuevas herramientas para la investigación del sistema inmune, desarrollo, estudio de su genoma y comportamiento.

*C. elegans* fue aislado de diferentes partes del mundo, pero como se mencionó antes, preferentemente en áreas con un clima húmedo [129, 130]. Esta especie es encontrada en compost y en suelo rico [144], y se presenta mayoritariamente en su estado de no alimentación o larva *dauer* [145, 146]. Mas recientemente se han encontrado ejemplares de *C. elegans* en material de plantas en descomposición, como frutas y tallos herbáceos [147] (Figura 1.13). Estos sustratos en estadios tardíos de descomposición proveen abundantes bacterias que los nematodos utilizan para alimentarse.

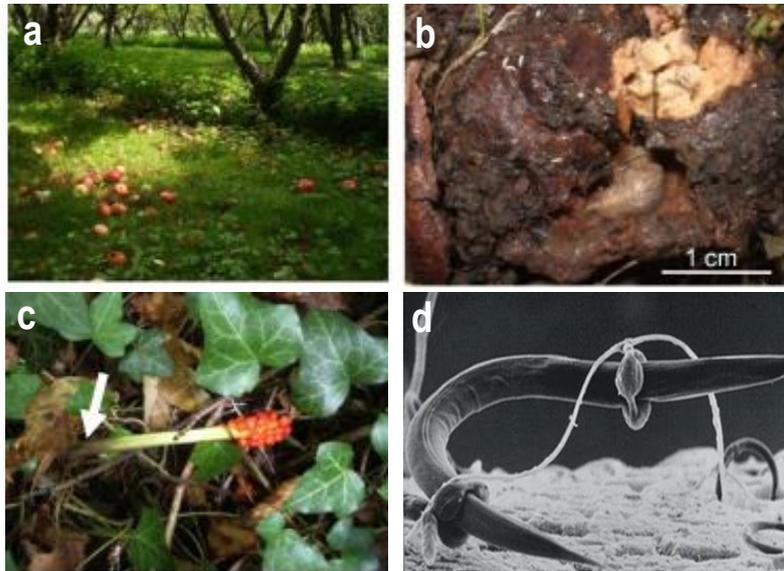
La densidad de la población de *C. elegans* sufre fluctuación dependiendo del ambiente en el que se encuentra. El ciclo de colonización del nematodo comienza con la aparición de un ambiente óptimo y el hallazgo de comida, esto es, cuando una larva *dauer* encuentra una fruta o un tallo en descomposición y reanuda su crecimiento, produciendo así una colonia de  $10^4$  nematodos alimentados con diferentes estadios del ciclo de vida [147].

Las áreas con alimento son mayormente escasas, por esto las larvas *dauers* son las que predominan en el suelo y se mantienen explorando ambientes vecinos para poder encontrar un nuevo sitio de colonización. Durante el comportamiento exploratorio, la gran mayoría de los nematodos falla, por lo que las larvas *dauer* despliegan una locomoción activa denominada nictación, donde se paran sobre su cola y agitan su cuerpo en el aire. También, pueden formar una columna y nictación en grupo [147]. Este comportamiento las ayuda para encontrar otros animales invertebrados (isópodos, caracoles y babosas) hospedadores que puedan usar para dispersarse, y así encontrar su alimento. Conjuntamente, esta fisiología y comportamiento del estadio de las larvas *dauers* juega un rol importante en *C. elegans* en la resistencia al estrés, la dispersión a grandes distancias, y posiblemente en su capacidad de sobrevivir a las épocas de frío. Se ha observado que las poblaciones naturales de *C. elegans* varían según la época del año: se encuentra una alta población en el otoño y disminuye en el invierno en su hábitat natural [146, 148].

*C. elegans* comparte su microhabitat con artrópodos, invertebrados y otros microorganismos (bacterias y hongos), y además también conviven con otros nematodos como *Oscheius*, *Pristionchus*, *Panagrellus* y otras especies de *Caenorhabditis*, como *Caenorhabditis briggsae* [129, 147]. También se lo encuentra compartiendo frutas en estado de descomposición con otros modelos experimentales como *D. melanogaster* y *S. cerevisiae* [149-152].

Como se ha mencionado, la dieta de *C. elegans* se basa en bacterias y en pequeños organismos eucariotas [147, 153], los cuales no han sido del todo caracterizados, pero como es de esperar estos nematodos también son fuente de alimento de microorganismos y especies depredadoras, como ácaros, otros nematodos –como *Pristionchus spp.*, y hongos nematófagos (Figura 1.13) [147, 154-156]. Además,

*C. elegans* interactúan constantemente con una variedad de parásitos obligatorios y facultativos, como hongos, microsporidios (hongos parásitos de animales), bacterias y virus [144, 147, 153, 157-159]. Estos parásitos infectan al hospedador por dos de las zonas más expuestas del nematodo, la cutícula y el intestino.



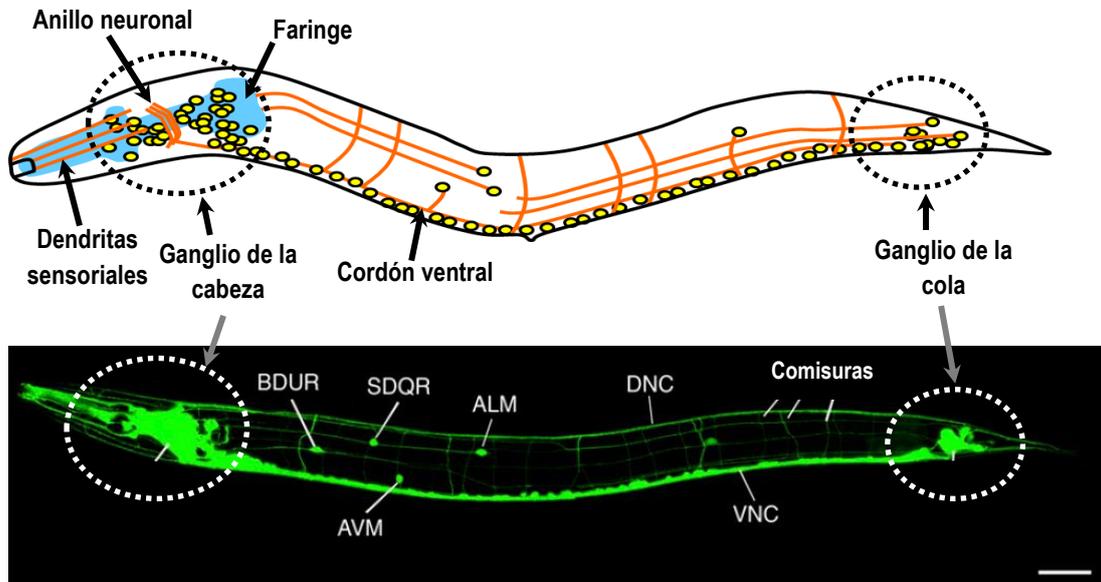
**Figura 1. 13. Hábitat natural del *C. elegans*:** Se observa los frutos caídos en estado de descomposición donde crece el *C. elegans* (a), como así también en el compost (b) y en el tallo de diferentes plantas y hongos (c). d. Imagen de un hongo nematófago atrampando a un nematodo. Imágenes modificadas de Félix MA, Duveau F, 2012.

## El sistema nervioso de *Caenorhabditis elegans*

El sistema nervioso del hermafrodita adulto está conformado por 302 neuronas, que representan aproximadamente un tercio del total de las células somáticas (959) [160, 161]. Se lo divide en dos sistemas independientes: un sistema nervioso somático (formado por 282 neuronas), localizado en el anillo neuronal de la cabeza, el ganglio de la cola, y a lo largo del cordón ventral (que constituye el principal tracto axónico longitudinal), y un sistema nervioso faríngeo (constituido por 20 neuronas). Ambos sistemas están comunicados por un solo par de interneuronas denominadas RIP (del inglés, *Ring Pharynx Interneuron*) [133, 160, 162, 163], y se sabe que ambos difieren en su topología. En el sistema nervioso somático, las neuronas generalmente están distribuidas entre la hipodermis y el músculo que está en la pared del cuerpo del nematodo, estas secciones están separadas por una lámina basal. Por el contrario, las neuronas de la faringe se ubican directamente entre los músculos de la faringe, sin una lámina intermedia que las separe.

La mayoría de las neuronas de *C. elegans* se desarrollan durante la embriogénesis, con la excepción de 80 neuronas (principalmente motoneuronas) que se desarrollan post-embriónariamente. Los cuerpos neuronales que forman parte de la cabeza y la cola se agrupan en un número de ganglios, y en particular los ganglios de la cabeza se distribuyen alrededor de la faringe (Figura 1.14). En *C. elegans* existen 56 células de sostén neuronal (incluyendo las células gliales), que están asociadas solamente con el sistema nervioso somático. Las neuronas se comunican a través de aproximadamente 6.400 sinapsis químicas, 900 uniones del tipo gap y 1.500 uniones neuromuscular (NMJs) (del inglés, *Neuromuscular Junctions*). Estas

uniones son reproducibles en un 75% de la población de los nematodos (Durbin, 1987). Para facilitar su estudio, las 302 neuronas del hermafrodita adulto han sido agrupadas en 118 clases distintas, dependiendo de su topología y de sus patrones de conexiones sinápticas [160]. 39 clases pertenecen a neuronas sensoriales, 27 clases son motoneuronas, y las restantes interneuronas y neuronas que cumplen dos funciones, llamadas neuronas polimodales.



**Figura 1. 14. Sistemas nervioso de *C. elegans*:** a. Representación esquemática del sistema nervioso de *C. elegans*, mayoritariamente las células se encuentran localizadas en el ganglio de la cabeza cerca del anillo neuronal, Imagen modifica de Fang-Yen C, et al 201. b. Foto de microscopia de fluorescencia de un ematodo adulto que expresa un marcador pan neuronal Prgef-1-GFP(evls111); Bars, 50 mm. Se observa el condón ventral dorsal y ventral (DNC y VNC, respectivamente) y neuronas ventrales (ALM, AVM, BDU y SDQ). Imagen tomada del paper Chisholm, et al. 2016.

Las neuronas sensoriales constituyen un tercio dentro de las 118 clases diferentes que se encuentran en el nematodo adulto. Las mismas son importantes en el comportamiento de exploración, quimiotaxis, termotaxis y aerotaxis, así como también en la conducta de evasión y huída generada por el escape a estímulos nocivos. Además, intervienen en la percepción de señales ambientales como los estímulos mecánicos (tacto), temperatura, muchos productos químicos volátiles y solubles en agua, sustancias nocivas, osmolaridad ambiental, niveles de oxígeno, pH y luz [164, 165]. Las neuronas sensoriales mandan dendritas a la punta de la nariz, dado que es una región muy enriquecida en receptores. Los axones de estas neuronas se unen formando un gran haz axonal, el anillo axonal neuronal, donde hacen sinapsis con las interneuronas.

Las interneuronas constituyen aproximadamente la mitad de las 118 clases existentes. Estas tienen la función de procesar la información, recibir el *inputs* desde una o varias clases de neuronas, y generan *outputs* en otras. Las neuronas que comandan el circuito motor se conectan a las neuronas motoras localizadas en el cordón ventral.

Por otro lado, las neuronas motoras se reconocen por la presencia de uniones neuromusculares. Hay 113 neuronas motoras que controlan diferentes comportamientos en *C. elegans*, tales como el fenómeno de arrastre para poder desplazarse, el nado, así como la movilidad del sistema alimentario y reproductivo. Cuando los nematodos se mueven sobre una superficie sólida, la locomoción de avance de los mismos es ocasionalmente interrumpida con giros y movimientos de reversa, estos cambios en la dirección del movimiento ocurren con una frecuencia predecible [166]. Las neuronas polimodales tienen una doble funcionalidad, pueden actuar como funciones neuromotoras y sensoriales; interneuronas y motoras o interneuronas y sensorial [160].

Por otro parte, los nematodos machos tienen un sistema nervioso más numeroso, compuesto por 437 neuronas (79 neuronas adicionales y 36 células de soporte). Gran parte de las neuronas extras son células específicas del macho que están involucradas en el apareamiento, y por lo tanto se ubican en la sección posterior del cuerpo de los nematodos [167-169]. En el macho, las 4 neuronas cefálicas (CEM) (del inglés, *Cephalic Neuron in Male*) están localizadas en la cabeza como parte cefálica del mismo.

Los nematodos hermafroditas solo poseen dos clases de neuronas específicas, las HSN (del inglés, *Hermaphrodite specific motor neurons*), un grupo de neuronas motoras, las cuales también son generadas en los machos pero mueren durante los estadios tempranos del desarrollo, y las neuronas VC (del inglés, *Ventral Cord Motor Neuron*), ubicadas en el cordón ventral específicas de hermafroditas.

Mediante micrografía electrónica todas las neuronas de *C. elegans* fueron identificadas, y su linaje descrito. Si bien el hermafrodita adulto fue el primero en el que se caracterizó completamente todo su conectoma [160], en la actualidad también se conoce el conectoma del macho adulto. Así, se identificaron todas las sinapsis en estos animales tanto químicas como eléctricas (uniones *gap*), y la morfología de cada una de las neuronas. Casi todas las neuronas de *C. elegans* tienen una morfología simple monopolar o bipolar, y mayoritariamente las ramificaciones tienen simples trayectorias idénticas en todos los nematodos. Algunas neuronas motoras, incluidas VC4 y HSN, generan la formación de varias ramificaciones simples a medida que llegan a los músculos de destino.

Los somas de las neuronas de *C. elegans* son pequeños, y su citoplasma contiene un núcleo compacto, un retículo endoplasmático rugoso (RER), varias mitocondrias, pequeños grupos de vesículas sinápticas y uno o más cuerpos de Golgi. La mayor parte del núcleo neuronal está lleno de eucromatina (y una modesta cantidad de heterocromatina), y uno o más nucléolos redondos pequeños. Utilizando microscopía de contraste de interferencia diferencial (DIC) se pudo observar que los núcleos neuronales se pueden distinguir fácilmente como pequeños óvalos punteados (Figura 1.15).

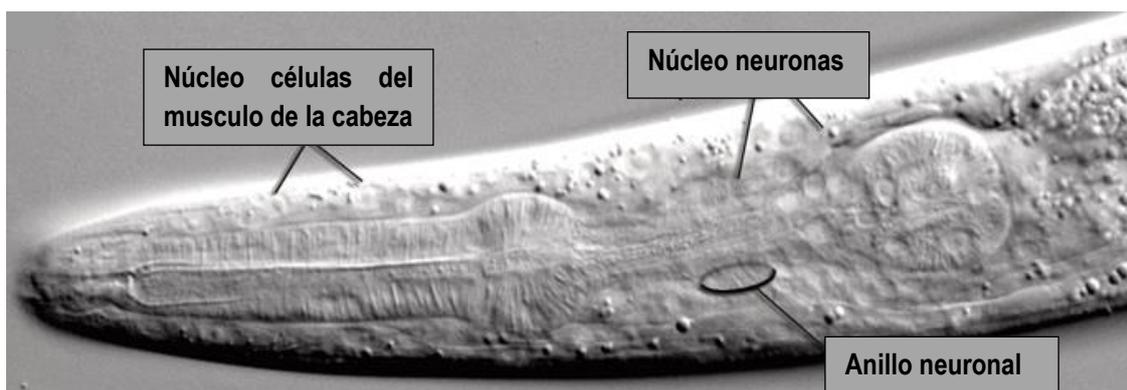


Figura 1. 15. Observación al microscopio de las neuronas del *C. elegans*: Foto de microscopía real de Nomarski (DIC) de la cabeza de un nematodo adulto joven. Magnificación 600X. Imagen tomada del *worm atlas*.

### Ritmos circadianos en *Caenorhabditis elegans*

Los ritmos circadianos (24 horas) son oscilaciones endógenas que suceden en todos los animales por adaptación a los ciclos diarios del ambiente, por lo que es de esperar que todos los organismos que habitan el planeta posean un reloj biológico interno. Muchas de las proteínas y mecanismos moleculares que gobiernan los procesos circadianos han sido fuertemente conservados en diferentes especies. En cronobiología, muchos organismos modelos han sido utilizado para su estudio, la mosca *D. melanogaster* y el ratón *Mus musculus* son algunos ejemplos. Otro modelo recientemente utilizado para el estudio de los ritmos circadianos por sus múltiples ventajas como modelo animal es el nematodo *Caenorhabditis elegans*.

Diferentes ritmos biológicos han sido caracterizados en este nematodo. Se encontraron ritmos robustos en diferentes variables fisiológicas y de comportamiento, tales como en la actividad locomotora [170, 171], en la resistencia a estrés hiperosmótico [172], en el estado de oxidación de la enzima peroxirredoxina (PRX) [173], en el comportamiento de actividad olfatoria [173], en la expresión de múltiples transcritos [174], en el ritmos de defecación y bombeo de la faringe [175-177], en los niveles de melatonina [178], en la tolerancia a estrés osmótico y oxidativo [179], en la capacidad de defensa frente a *Pseudomonas* [180].

En *C. elegans* existen diferentes *outputs* que permiten medir sus ritmos biológicos, y uno de los más utilizados es el registro de la actividad locomotora en medio líquido. Desde hace unos años se ha descrito una de las metodologías que permite el registro automatizado de los animales (individuales o de una población) [181]. Además, mediante esta metodología se pueden llevar a cabo registros de actividad por más de 20 días. De esta forma, se ha demostrado que los ritmos de nematodos adultos cumplen con las tres propiedades básicas de los sistemas circadianos: pueden ser sincronizados por un agente externo, como la luz y la temperatura; mantienen los ritmos bajo condiciones constantes (DD), con un periodo cercano a 24 horas a 18°C; y su periodo endógeno es independiente de la temperatura, es decir que compensa sus variaciones (con un  $Q_{10}=0,96-1.09$  entre 15 y 25°C) [170, 171]. Por otro lado, se han

realizado registros de la actividad locomotora de nematodos jóvenes adultos en medio sólido [182]. Los mismos mostraron que *C. elegans* tiene un periodo endógeno de actividad locomotora de 24,2 horas.

Actualmente, estudios realizados en nuestro laboratorio permitieron el desarrollo de una nueva metodología –un sistema reportero basado en bioluminiscencia–, capaz de medir ritmos circadianos en nematodos adultos en medio líquido. Este sistema está basado en la expresión de la enzima luciferasa bajo el control del promotor del gen *sur-5*, y así este gen se está utilizando como un marcador de la salida del reloj o *output*. Este original sistema reportero permite el registro de nematodos individuales y también poblacional, tanto bajo ciclos de luz/oscuridad y temperatura como en condiciones constantes, por periodos de una semana. El uso de este sistema permitió medir ritmos robustos en nematodo adultos en medio líquido, donde la expresión del promotor de *sur-5* resultó ser rítmica y con un periodo cercano a 25 horas bajo condiciones constantes [183]. Otros estudios también demostraron ritmos de luminiscencia del promotor de *sur5* durante el desarrollo en animales individuales [184].

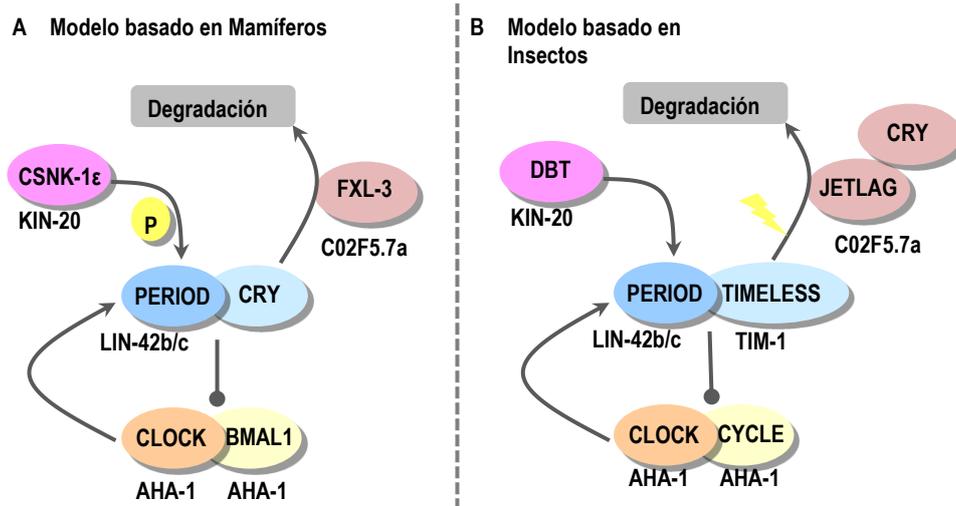
Hasta el momento, todos los estudios realizados en *C. elegans* sugieren que los nematodos poseen ritmos circadianos en su metabolismo y comportamiento, pero todavía se conoce muy poco sobre los genes y neuronas que están involucrados en la regulación de los ritmos circadianos en estos animales.

*C. elegans* es un animal multicelular muy primitivo en el cual se han encontrado genes homólogos a otros genes reloj de organismos modelos. Por ejemplo, se hallaron genes homólogos que están involucrados en el reloj molecular de mamíferos (*Mus musculus*), plantas (*Arabidopsis thaliana*), cianobacterias (*Synechococcus elongatus*), hongos (*Neurospora crassa*) y moscas (*Drosophila melanogaster*) [185, 186] (tabla 1 y Figura 1.16). Sin embargo, se sabe que todos estos genes cumplen funciones diferentes en el nematodo. Por ejemplo, el gen *lin-42* (homólogo al gen *per*) interviene en el desarrollo post-embrionario de los nematodos [187, 188]; y *tim-1* (homólogo al gen *tim*), participa en la regulación de la cohesión cromosomal [189]. Además, el gen *aha-1*, que codifica para la proteína AHA-1, tiene similar identidad a CYCLE (*D. melanogaster* CYCLE, dCYC) y BMAL1, y es requerido para la adaptación a condiciones de hipoxia [190, 191].

Proteínas <i>C. elegans</i>	Funciones en <i>C. elegans</i>	Proteínas Reloj	Identidad
<b>LIN-42</b>	Regula el tiempo del ciclo de cambio de muda durante el desarrollo post-embrionario	dPERIOD	34%
		mPERIOD	28%
<b>TIM-1</b>	Regulación de la cohesión cromosomal	dTIMELESS	23%
		mTIMELESS	37%
<b>AHA-1</b>	Regulación respuestas celular y sistémicas en la hipoxia durante el desarrollo o el progreso tumoral	dCYCLE	41%
		mBMAL1	41%
<b>KIN-20</b>	Proteína caseína quinasa, interviene en el desarrollo de las seam cell	dDOUBLE-TIME	76%
		mCK1 $\epsilon/\delta$	79%
<b>KIN-19</b>	Proteína caseína quinasa, interviene en la traducción de señales Wnt	dDOUBLE-TIME	65%
		mCK1 $\epsilon/\delta$	73%
<b>ATF-2</b>	Familia de ATF (factor transcripcional dependiente de AMP cíclico)	dVRILLE	60%
<b>GSK-3</b>	Glucógeno sintasa quinasa 3, fosforila $\beta$ -cateína para prevenir que ingrese al núcleo	dSHAGGY	73%

Tabla 1. Genes homólogos a los genes reloj de *D. melanogaster* y mamíferos. Datos modificados del paper Hasegawa K, et al. 2005.

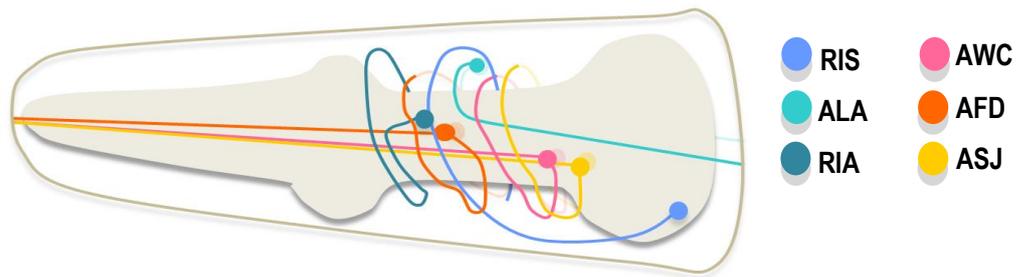
Adicionalmente, dos proteínas –KIN-19 y KIN-20– presentan una fuerte identidad en su secuencia con DOUBLE-TIME (DBT) de *D. melanogaster* [192], y son homólogas a la proteína caseína quinasa 1 $\epsilon$  de mamíferos [52]. Ambas, participan en la cascada de señalización de Wnt (del inglés, *Wingless*). Esta cascada en *C. elegans* cumple un rol en el desarrollo, donde interviene en la localización y la migración específicas de las células [193]. Por el contrario, no se ha encontrado una proteína homóloga a la proteína CRYPTOCHROME (CRY) [194], que es un componente crucial en el ciclo de retroalimentación transcripcional de ratones [195, 196], y en el sistema fotorreceptor específico de *D. melanogaster* [197].



**Figura 1. 16. Proteínas homologas entre *C. elegans*, *Mus musculus* y *Drosophila melanogaster*:** Esquema de las 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.

Por otro lado, además de los genes de *C. elegans* homólogos a genes reloj de otros organismos, también se han encontrado las neuronas que intervienen en los procesos de sueño o letargo y captación de la luz y temperatura. Bajo condiciones óptimas de crecimiento, los estadios de sueño de *C. elegans* son momentos de quietud muy cortos que transcurren durante el desarrollo, y en menor medida durante el estadio adulto. Contrariamente, si las condiciones de vida no son las mejores, los momentos de sueño se ven incrementados en periodos más largos, como sucede en la larva *dauer* [141]. Las neuronas que intervienen en este proceso fisiológico son RIS y RIA, y durante condiciones no fisiológicas para la sobrevivencia del nematodo (como por ejemplo después de un estrés celular fuerte) la neurona ALA puede inducir al sueño independientemente de RIS [198, 199]. Estudios recientes han demostrado que la vía de entrada termosensorial a través de la neurona AFD actúa como un controlador bidireccional del sueño, y a bajas temperaturas promueve el movimiento o el despertar de los nematodos, mientras que a temperaturas cálidas promueven el sueño [200].

Por otra parte, las neuronas sensoriales AFD, AWC y ASI se encuentran involucradas en la respuesta termosensorial de los nematodos. La AFD es la principal neurona que modula la termotaxis, mientras que AWC y ASI tienen un papel menor en dicho proceso; la neurona ASJ interviene también en el proceso de fototaxis, a través de un receptor fotosensible llamado LITE-1 (Figura 1.17).



**Figura 1. 17. Localización de las neuronas sensoriales y del sueño:** Esquema de la localización de las neuronas termosensoriales, AFD y AWC; neuronas fotosensoriales ASJ; y las neuronas que intervienen en el sueño o letargo del nematodo, RIS, ALA y RIA. Imagen modificada del *worm atlas*.

En *C. elegans*, tanto la luz como la temperatura pueden actuar como agentes sincronizadores de los ritmos circadianos [183]. Se cree que estos *zeitgebers* podrían ser sentidos por las neuronas sensoriales, las cuales tienen receptores específicos tanto de temperatura (TAX2, TAX4) como de luz (LITE-1 y GUR-3)[183]. Mutaciones en esos receptores producen modificaciones en el porcentaje de nematodos adultos entrenados [183], lo que sugiere que ambas vías son necesarias para entrenar el reloj molecular del *C. elegans*.

Sin embargo, estos resultados solo han dado un indicio de la relación que existe entre las neuronas sensoriales, los genes homólogos y los ritmos circadianos en *C. elegans*. Todavía queda por elucidar cuáles son los genes centrales que gobiernan los ritmos circadianos en estos nematodos, y en qué neuronas se encuentra el mecanismo del reloj molecular.

# **.Materiales y Métodos Generales.**

---

## Condiciones de cultivo

Los nematodos fueron crecidos y mantenidos en placas de Petri de 90 mm (Greiner Cellstar, Estados Unidos) de diámetro con medio NGM (por sus siglas en inglés: *Nematode Growth Medium*) agar sembradas con *E. coli* [131], pero con la cepa HB101. Los nematodos se mantuvieron bajo un ciclo dual de luz:oscuridad (LO,  $\sim 150 \mu\text{mol}/\text{m}^2.\text{s}/0 \mu\text{mol}/\text{m}^2.\text{s}$ ) y temperatura caliente:fría (CF,  $18.5/20^\circ\text{C}$ ,  $\Delta=1,5 \pm 0,25^\circ\text{C}$ ) de 12h:12h. La luz y la temperatura son los principales *Zeitgeber* (o sincronizadores) descriptos para los ritmos circadianos, donde *Zeitgeber time* 0 o ZT0 (9 am) indica el encendido de las luces y el inicio de la temperatura baja. Asimismo, *Circadian time* (CT) hace referencia al horario durante las condiciones constantes o de *free running* (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* (*Maxin 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 los ensayos de luminiscencia, poblaciones de nematodos fueron sincronizadas al mismo estadio larval L4. Para ello, animales adultos fueron pasados a 3 placas de NGM agar con bacterias y colocadas bajo el ciclo de LO/FC antes descripto. Cuando las placas se encontraban con abundantes nematodos hermafroditas adultos con huevos (aproximadamente a los 4 días) se sincronizaron mediante el método de cloro (Lewis y Fleming 1995) con el fin de romper la cutícula del nematodo y obtener los huevos. Posteriormente, los embriones se resuspendieron en 3,5 ml de *buffer* M9 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  42 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  22mM, NaCl 85,5 mM,  $\text{MgSO}_4$  1 mM), suplementado con Antibiótico-antimicótico 1X (Thermo Fisher Scientific) y 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de tobramicina (Tobrabiotic, Denver Farma), y se dejaron en agitación *over night* (ON) a 50 rpm en un agitador de tipo vaivén (Serie 2014, Decalab, Argentina) bajo las mismas condiciones de LO/FC (400 lux;  $18.5/20^\circ\text{C}$ ,  $\Delta=1,5 \pm 0,25^\circ\text{C}$ ). Al día siguiente, las larvas que eclosionaron de los huevos se transfirieron a nuevas placas de Petri de 90 mm con NGM agar y sembradas con *E. coli* HB101 (4000 L1s por placa), y se dejaron crecer hasta el estadio larval L4 por 48 hs bajo las mismas condiciones de crecimiento. Al día siguiente, los nematodos L4 que expresaban 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), que no permite el calentamiento de la placa. Todos los experimentos que se llevaron a cabo se realizaron en un laboratorio con temperatura constante a  $18^\circ\text{C}$  y con luz blanca de intensidad baja en la lupa de microscopía, con el fin de no alterar la fase correspondiente del ciclo de la incubadora (luz ON,  $18.5^\circ\text{C}$ ). Cada placa fue expuesta solo 15 min a la luz azul para prevenir efectos a largo plazo sobre el entrenamiento o la viabilidad.

## Ensayo de luminiscencia en el nematodo adulto

Los ensayos de luminiscencia se realizaron en placas de Petri de 90 mm (Greiner Cellstar, Estados Unidos), a 20°C y en condiciones constantes, o en placas *multiwell* (96 wells) 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 rojo fenol (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos) suplementado con Antibiótico-antimicótico 1X (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos), 40 uM de 5-fluoro-2'-deoxiuridina (FUdR, Sigma-Aldrich, Estados Unidos) para evitar el desarrollo de nuevos embriones, 5 mg/ml de colesterol (Sigma-Aldrich, Estados Unidos), 10 ug/ml de tobramicina (Tobrabortic, Denver Farma, Argentina), 1 mM de D-luciferina (Gold Biotechnology, Estados Unidos) y 0,05 % de Tritón X-100 (Sigma-Aldrich, Estados Unidos), para aumentar la permeabilidad de la cutícula al sustrato D-luciferina.

## Ensayo de luminiscencia en placa de Petri bajo condiciones constantes

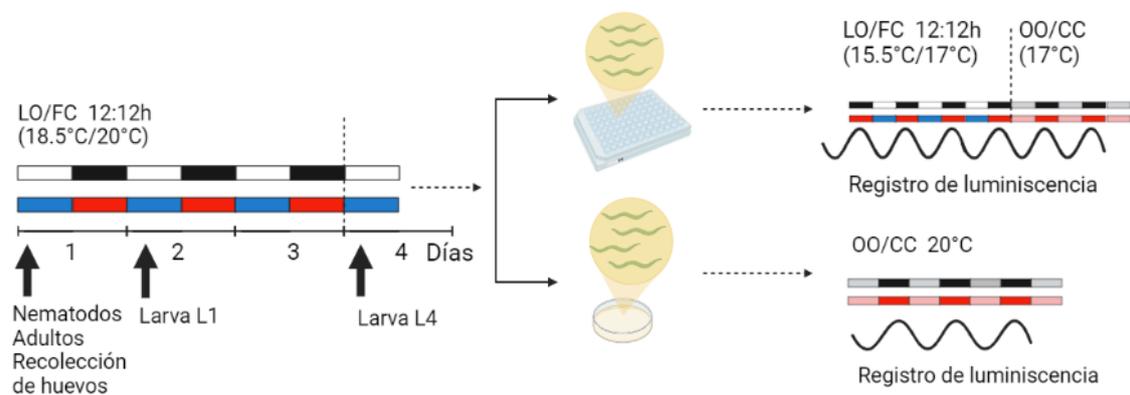
Para este ensayo, se tomaron 8 poblaciones de 100 nematodos en el estadio L4 crecidos como se describió previamente (cada población fue considerada como una réplica biológica independiente, n=8) y fueron seleccionados manualmente mediante la técnica de picado bajo lupa de fluorescencia y pasados a 200 ul de *buffer* M9. Los nematodos fueron lavados dos veces con *buffer* M9 para remover todas las trazas de bacterias que pudieron haber quedado en el medio y se transfirieron a placas de Petri de 35 mm (Greiner Cellstar, Estados Unidos) que poseen una adaptación de una porción de placa de 96 wells, generando así una mini placa de 9 wells, con 200 ul de medio de luminiscencia, colocado en el centro de la placa de 9 wells. Además, los wells restantes fueron llenados con 200 ul de agua destilada, y toda la placa fue sellada con film óptico (Microseal B PCR Plate Sealing Film, Biorad, Estados Unidos) para evitar la evaporación y contaminación del medio de cultivo. Se realizaron dos orificios por well con una aguja 25G estéril, para favorecer el acceso de oxígeno y evitar la condensación. Posteriormente, a ZT12 (21 h) las placas fueron colocadas en el equipo de luminiscencia *AB-2550 Kronos Dio* (ATTO, Japón) y dejadas por 7 días bajo condiciones constantes (OO/CC; oscuridad:20°C). La luminiscencia fue monitoreada en oscuridad constante a 20°C (mínima temperatura que permite el equipo) durante 7 días. La señal emitida por la población de nematodos fue integrada por 1 minuto y registrada con un intervalo de 10 minutos (figura 2.1)

Para los ensayos con nematodos individuales, se colocó un nematodo en el estadio L4 por well, crecidos como se describió previamente (cada población fue considerada como una réplica biológica independiente, n=8). Para ello, los nematodos fueron seleccionados manualmente mediante la técnica de picado bajo lupa de fluorescencia y pasados a 200 ul de *buffer* M9. Los mismos fueron lavados dos veces con *buffer* M9 y transferidos a placas de Petri de 35 mm (Greiner Cellstar, Estados Unidos) que poseen una adaptación de una placa de 96 wells, previamente descrita, con 200 ul de medio de luminiscencia colocado en el centro de la placa. Los wells restantes fueron llenados con 200 ul de agua destilada y toda la placa fue sellada

con film óptico (Microseal B PCR Plate Sealing Film, Biorad, Estados Unidos) para evitar la evaporación y contaminación del medio de cultivo. Luego, se realizaron dos orificios pequeños por *well* con una aguja 25G estéril, para favorecer el acceso de oxígeno y evitar la condensación. Posteriormente, a ZT12 (21h) las placas fueron colocadas en el equipo de luminiscencia *AB-2550 Kronos Dio* (ATTO, Japón) y fueron dejadas por 7 días bajo condiciones constantes (OO/CC; oscuridad:20°C). La luminiscencia fue monitoreada en oscuridad constante a 20°C durante 7 días. La señal emitida por la población de nematodos fue integrada por 4 minutos y registrada con un intervalo de 30 minutos.

### **Ensayo de luminiscencia en placa *multiwells* bajo condiciones cíclicas**

Para este ensayo, poblaciones de 100 nematodos cada una en estadio L4 (cada población fue considerada como réplica biológica) fueron seleccionadas manualmente y pasadas a 200 ul de *buffer* M9 mediante la técnica de picado bajo lupa de fluorescencia como se describió previamente. Las poblaciones de nematodos se lavaron dos veces con *buffer* M9 para remover las trazas de bacterias y se resuspendieron en 200 ul de medio de luminiscencia. Luego, se transfirieron a una placa de 96 *wells* blanca, de fondo plano (Greiner, Estados Unidos). Se selló la misma con film óptico (Microseal B PCR Plate Sealing Film, Biorad, Estados Unidos) y se realizaron dos perforaciones con aguja de 25G estéril, para evitar la condensación y generar el intercambio de oxígeno. Posteriormente, a ZT12 (21h) del mismo día, se colocó la placa en un luminómetro *Berthold Centro LB 60 microplate luminometer* (Berthold Technologies, Alemania) dentro de una incubadora de pozo modelo *G291PF* (INGELAB, Argentina), con tubos LED a 400 lux, para controlar las condiciones de luz y temperatura. El *software Microwin 2000 software 4.43* (Mikrotek 2 Laborsysteme, Alemania) fue utilizado para adquirir los datos. El mismo fue programado para permitir 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 durante 3 días bajo un ciclo dual de 24 h LO/FC 12h:12h (~150  $\mu\text{mol}/\text{m}^2.\text{s}$ ; 15,5°C : 0  $\mu\text{mol}/\text{m}^2.\text{s}$ ; 17°C), donde el ZT0 es el encendido de la luz y el comienzo de la fase fría) y luego 4 días en condiciones de *free-running* (OO/CC, 17°C). Este ciclo fue elegido porque bajo estas condiciones los nematodos viven por más días que a 18,5°C/20°C, lo cual permite una señal de luminiscencia sostenida por más tiempo que a altas temperaturas. La señal emitida por los nematodos fue integrada por 10 segundos y registrada con un intervalo de 30 min (Figura 2.1)



**Figura 2. 1. Esquema del protocolo utilizado para el ensayo de luminiscencia.** Nematodos en primer día de adulto se sincronizaron por el método de cloro (Lewis y Fleming 1995) y los huevos obtenidos se recolectaron y dejaron en agitación a 50 rpm durante toda la noche a un ciclo dual de luz y temperatura (LO:FC, 12h:12h, luz on:18,5°C::luz off: 20°C). Al día siguiente las larvas L1 que eclosionaron de los huevos fueron pasadas a placas de Petri con medio NGM agar y bacterias E. Coli HB101. A los dos días, los nematodos en estadio L4 transgénicos fueron seleccionados por el método de picado. Para los ensayos de luminiscencia, los nematodos se colocaron en placas *multi well* y se registró la luminiscencia por 3 días en condiciones de LO/FC, y luego 4 días en condiciones constantes. Para los ensayos en condiciones contantes, los nematodos se introdujeron en las placas de Petri de 35 mm y se midió la luminiscencia por 7 días en condiciones constantes.

## 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 bajo ciclo dual por 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 por el Dr. Carlos Caldart y la Dra. Eugenia Goya 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 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 horas (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 9.0* (Estados Unidos). Todos los datos fueron presentados con 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.

Si bien el *software* diseñado permite calcular el período circadiano por cuatro métodos distintos: periodogramas de autocorrelación, FFT-NLLS (*Fast Fourier Non-Linear Least Square algorithm*), MESA [201] y LS (*Lomb-Scargle*) [202], evaluando dentro de un rango de 18 a 37 h. Finalmente, se eligió informar los resultados mediante el algoritmo LS, porque este periodograma permite 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 [203]. Con el período obtenido se estimó la acrofase (momento de mayor actividad) de cada señal, la amplitud con 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  $\geq 0,5$  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* tenían una diferencia de menos a 4,5 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 ajustada a las condiciones del *Zeitgeber* (24 h), sobre el total de poblaciones testeadas; “Porcentaje de rítmicos bajo” *free-running* indica el número de poblaciones rítmicas bajo condiciones constantes, sobre el total de poblaciones sincronizadas. Finalmente, el “Porcentaje de entrenados” indica el número de poblaciones que retienen su acrofase circadiana cuando son liberadas en condiciones constantes, sobre el total de poblaciones rítmicas. Un *test* de ANOVA de 2 vías fue realizado para comparar las proporciones de poblaciones sincronizadas, rítmicas y entrenadas en todos los experimentos.

El análisis de acrofase fue realizado mediante estadística circular (*test de Rayleigh*), donde las horas son graficadas en horario ZT en un círculo que va desde ZT0 a ZT24 (ZT0- 9 am encendido de las luces, ZT12- 21 pm apagado de las luces) y se analizó estadísticamente la distribución de los máximos de actividad de las distintas poblaciones, indicadas como puntos fuera del gráfico. Para comparar estadísticamente las medias de distribución de acrofase bajo LO/FC y OO/CC se realizó un *test* de ANOVA de 1 vía comparando con la cepa *wild-type*.

Para los análisis estadísticos, se utilizó el *software GraphPad Prism 7*, utilizando *t-test*, *test* ANOVA de 1 vía, ANOVA de 2 vías y comparaciones múltiples. En cada gráfico se indica el estudio estadístico utilizado. En todos los casos 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. Para todos los datos se realizó un estudio de normalidad.

## Cruces de cepas

### Generación y mantenimiento de machos

La generación espontánea de machos ocurre naturalmente a una tasa muy baja (0,05 a 0,1 %) (Brenner, S. 1973). Sin embargo, la misma puede aumentarse exponiendo las larvas L4 a altas temperaturas, ya que un aumento en la temperatura se ve asociado a un aumento en la probabilidad de errores en la disyunción del cromosoma X, lo que conlleva a la generación de gametos aneuploides. La unión de uno de estos gametos a otro portador de X dará lugar a un organismo macho XO.

Se tomaron 3 placas de con aproximadamente 12 hermafroditas en estadio L4 y se los expuso a 37°C durante 1h para la generación de machos. Luego del choque térmico, se colocaron las placas nuevamente en la incubadora con el ciclo habitual de luz y temperatura (LO/FC, 18.5/20 °C, 12 h: 12h). Pasados los 3 días se analizó su progenie en busca de machos (se espera un aumento de la tasa de generación de machos, pudiendo alcanzar hasta 10% de la progenie). Posteriormente, los machos se mantuvieron por cruces consecutivos con hermafroditas de su misma cepa.

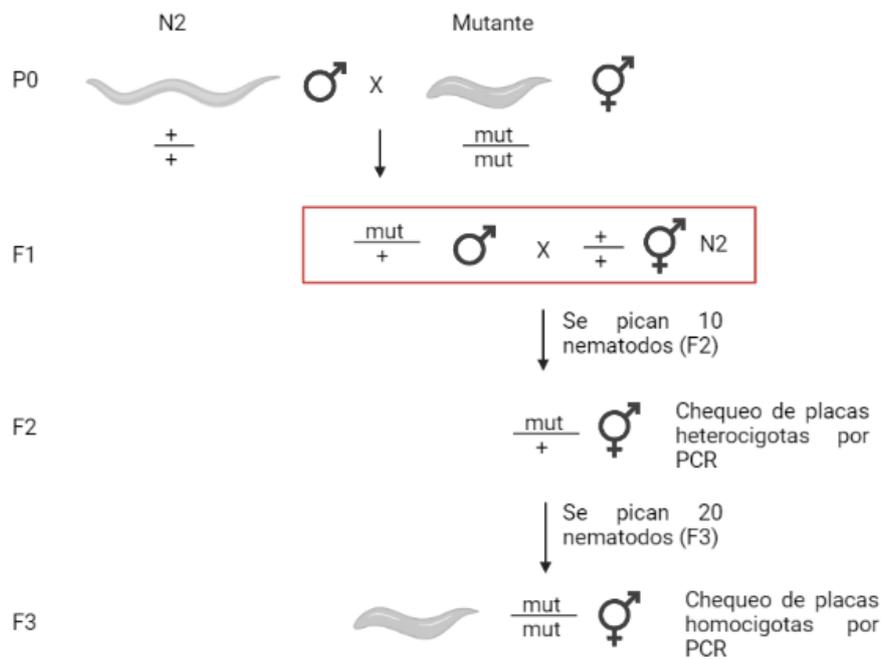
### Cruzamiento para la limpieza de cepas mutantes

Todas las cepas mutantes contienen mutaciones no deseadas, producto del proceso mutagénico aleatorio o bien por proceso mutagénico dirigido por CRISPR. Por lo tanto, es necesario “limpiar” (remover las mutaciones no deseadas) las cepas mutantes, ya que un fenotipo resultante de un animal no curado o limpio puede ser engañoso. Este proceso es llamado “*outcross*”, y se menciona en cada cepa generada la cantidad de *outcross* que se realizaron como por ejemplo #3OC (3 *outcross*).

Para el proceso de limpieza se generaron 3 o más cruces consecutivos con la cepa salvaje N2 Bristol (Figura 2.2). Primero, se tomaron los hermafroditas mutantes en estadio L4 y se cruzamos en machos N2 en una proporción 1:3 (P0) en placas “*honey moon*” (son placas de Petri NGM con una gota de comida, bacteria *E. coli* HB101), los machos fueron picados y pasados previamente a una placa de transferencia sin comida para asegurarse de estar picando solo machos y no llevarse ninguna hermafrodita. Pasados los 3 días, de la progenie (F1) se tomaron los machos (ya que necesariamente provienen del cruce del hermafrodita mutante con el macho *wild-type*) y se los cruzó con otra hermafrodita *wild-type*.

Luego, se tomaron 10 hermafroditas en estadio L4 (F2) y se pasaron a placas individuales de NGM con comida, luego se esperó a que alcancen la adultez y pongan huevos. Seguidamente, se analizaron las placas por PCR a punto final (50 % son heterocigotas). Para ello, se levantaron los nematodos (F3) desde

la placa con 100ul de medio de lisis (buffer de lisis (0.05 M KCl, 0.01 M Tris ph=8.2, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.45 % Twenn20, 0.01 % Gelatina) y proteinasa K, en una proporción 100 ul de buffer de lisis + 0,1 ul de proteinasa K 20 ng/ul) o bien se picaron (forma de levantar los nematodos con el pick) 15 nematodos y se colocaron en 25 ul de medio de lisis. Se realizó la lisis en termociclador con el siguiente esquema de ciclado: 96°C durante 2 h, 60°C durante 20 min. Posteriormente, se genotipo cada una de las lisis tomando 2 ul de cada muestra en PCR a punto final con los *primers* específicos para genotipar la mutación deseada y a la cepa *wild-type*. De las placas que dieron heterocigota para la mutación, se tomaron 20 nematodos L4 heterocigotas (F3) y se pasaron a placas individuales con NGM y bacteria. Se chequearon las placas por PCR en punto final y finalmente, se seleccionó aquellos que provienen de organismos homocigotas para la mutación (aproximadamente un 25 % de homocigotas mutantes). El proceso se repitió una vez más partiendo del homocigota mutante generado en el primer *outcross*, completando así 4 cruces mediante 2 rondas.



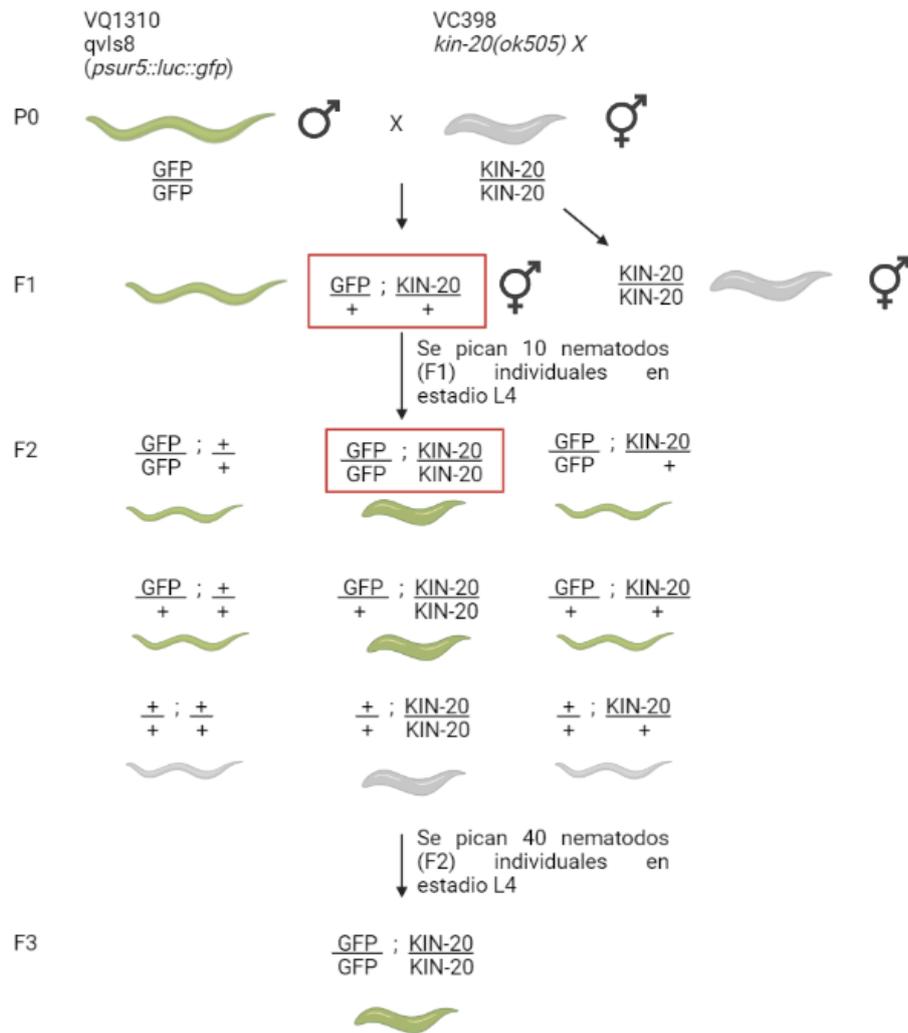
**Figura 2. 2. Esquema del proceso de un *outcross*.** Un *outcross* implica dos cruces de la cepa mutante (*mut/mut*) con la cepa *wild type* (N2 o  $\frac{+}{+}$ ). En primer lugar, se cruzan los hermafroditas mutantes con los machos N2, de la progenie (F1) se toman los machos (*mut/+*) y se los cruza con la hermafrodita N2. Se seleccionan nematodos hermafroditas heterocigotas de la F2, los cuales se autofecundan y de su progenie (F3) se seleccionan los nematodos hermafroditas homocigotas mutantes por PCR.

### Cruzamiento entre cepas mutantes

Para la obtención de cepas con dos mutaciones se realizaron los cruces generando los machos de una de las cepas y cruzándola con las hermafroditas de la segunda cepa mutante. Daremos como ejemplo el cruce de la cepa *kin-20(ok505)* con la cepa VQ1310 [*qvl8 (psur5::luc::gfp)*]. Primero, se realizaron machos

de la cepa VQ1310, como se menciona en la sección “generación y mantenimiento de machos”. Se tomaron machos en estadio L4 de la cepa VQ1310, y se pasaron a una placa NGM sin comida, para asegurarse que solo se tomen machos y ninguna hermafrodita. Luego, 12 machos fueron pasados a placa “*honey moon*” con 6 hermafroditas de la cepa *kin-20(ok505)* (P0). Pasados los 3 días, se tomaron 10 hermafroditas (F1) heterocigotas con fenotipo *wild-type* y GFP positivos, y se pasaron a placas individuales de NGM con bacteria. Se esperó que alcancen la adultez y pongan huevos, se tomaron de una sola placa F1 unos 40 nematodos hermafroditas en estadio L4 (F2), y se pasaron a placas NGM individuales con bacteria. Al cabo de 3 días, se chequearon las placas (F2) con la descendencia (F3) y se seleccionaron las placas que poseían el 100% de nematodos GFP positivos para el promotor *sur-5* y el 100% de nematodos con fenotipo *dumpy*, mutación *kin-20(ok505)*. Posteriormente se chequeo la mutación *kin-20(ok505)* por PCR. Se levantaron los nematodos (F3) desde la placa (F2) con 100ul de medio de lisis (buffer de lisis (0.05 M KCl, 0.01 M Tris ph=8.2, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.45 % Twenn20, 0.01 % Gelatina) y proteinasa K, en una proporción 100 ul de buffer de lisis + 0,1 ul de proteinasa K 20 ng/ul) o bien se picaron 15 nematodos (F3) y se colocaron en 25 ul de medio de lisis. Se realizó la lisis en termociclador con el siguiente esquema de ciclado: 96°C durante 2 h, 60°C durante 20 min. Posteriormente, se genotipo cada una de las lisis tomando 2 ul de cada muestra en PCR a punto final con los *primers* específicos para genotipar la mutación *kin-20(ok505)* y a la cepa *wild-type*. Finalmente, se seleccionó aquellos que provienen de organismos homocigotas mutantes (aproximadamente un 12 % de homocigotas mutantes). De esta manera se generó la cepa VQ1355 (*kin-20(ok505)X*, #50C; *qvl8*) (Figura 2.3) (Ver tabla de *primers*).

Cuando la presencia del alelo mutante se asocia a la manifestación de un fenotipo evidente, el seguimiento de cada uno de los cruces se realizó mediante la observación de ese fenotipo, como por ejemplo la expresión de GFP, RFP o YFP en una región específica del nematodo. El seguimiento se realizó bajo lupa de fluorescencia.

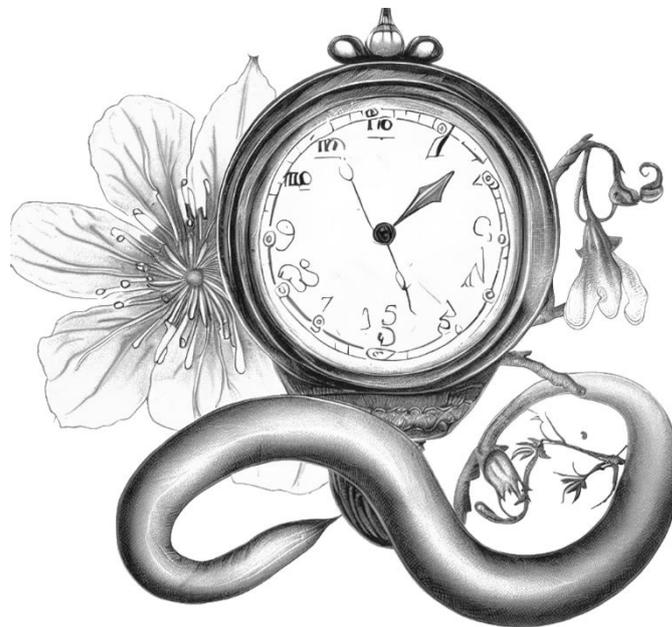


**Figura 2. 3. Cruce de nematodos mutantes.** Esquema representativo de un cruce entre dos cepas mutantes. Se genera el cruce entre los nematodos machos de la cepa VQ1310 con los nematodos hermafroditas de la cepa *kin-20(ok505)* en una relación 3:1 (P0). Luego, la descendencia F1 generada por el cruce será heterocigota para ambas mutaciones. Se toman 10 nematodos hermafroditas de la F1 y se pasan a placas individuales. Las hermafroditas F1 dejarán como descendencia los nematodos F2, donde un 12% de la descendencia será homocigota para ambas mutaciones (marcado con un rectángulo rojo). Se pican 40 nematodos hermafroditas de la F2 y se pasan a placas individuales. A los 3 días, la descendencia (F3) es chequeada, la placa que contenga 100% de los nematodos GFP positivos y 100% *dumpy* positivos será la placa homocigota para ambas mutaciones. Posteriormente, se realiza el chequeo por PCR para confirmar la cepa homocigota.

# .Capítulo 1.

---

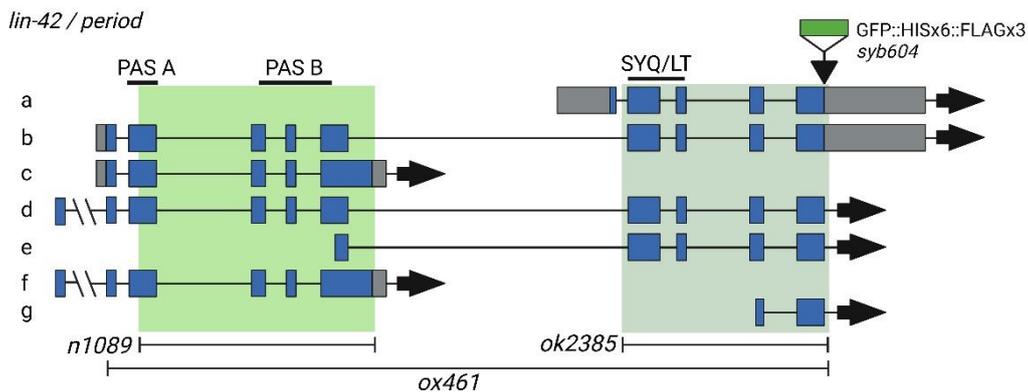
## Rol de la proteína LIN-42 en los ritmos circadianos de *C. elegans*



## Introducción

En años recientes se ha propuesto al nematodo *C. elegans* como modelo experimental para el estudio de los ritmos biológicos. Casi todas las proteínas que intervienen en el mecanismo molecular del reloj circadiano de mamíferos y de *D. melanogaster* tienen sus proteínas homólogas en el nematodo, con la notable excepción de la proteína CRY (CRYPTOCHROME). PERIOD (PER) es una de las principales proteínas que interviene en los ritmos circadianos de mamíferos y moscas; su homólogo en *C. elegans* es la proteína LIN-42. PER posee dos dominios importantes para su funcionamiento: el dominio PAS (*Period/Ant/Sim*) de interacción proteica, y los dominios SYQ/LT (Ser-Tyr-Gln y Leu-Thr), necesarios para la interacción con otras proteínas reloj, incluyendo CLOCK, CRY y Caseína quinasa 1ε en moscas y mamíferos [204-206]. En humanos y *D. melanogaster*, el dominio PAS de la proteína PER es requerido para mantener los patrones de expresión en la oscilación de los genes circadianos [207-209]. PER tiene aproximadamente 260 aminoácidos de longitud y contiene dos regiones repetidas de 50 aminoácidos, conocidas como PAS A y PAS B [210, 211]. La región con más similitud entre LIN-42 y PER es la región PAS B. Esta última región contiene el dominio de localización citoplasmático CLD (del inglés, *Cytoplasmic Localization Domain*) [212].

Por su parte, la proteína LIN-42 posee 7 isoformas diferentes (isoformas A-F). Las más estudiadas por su mayor relevancia en el nematodo son las isoformas A, B y C. LIN-42B y LIN-42C son transcritos por el mismo promotor, y un *splicing* alternativo en el exón 5 determina la formación de cada isoforma [213]. En el caso de LIN-42C, el *splicing* en el exón 5 es empalmado con el exón 6, generando la unión hasta el exón 9, que está localizado aproximadamente 3 KB aguas abajo [213]. LIN-42A es transcrito por un segundo promotor y superpuesto por el exón 6 a través del exón 9 de LIN-42B. Así, las secuencias de LIN-42C y LIN-42A son compensadas por la secuencia de LIN-42B (Figura 3.1). Cada una de las isoformas posee un dominio diferente: LIN-42A contiene el dominio SYQ/LT, LIN-42C contiene el dominio PAS, y LIN-42B posee ambos dominios [213].



**Figura 3. 1. Isoformas de LIN-42.** Se observan los esquemas de las secuencias de las isoformas de *lin-42a*, *b* y *c*. *lin42b* posee la secuencia más larga, conteniendo al dominio PAS y SYQ/LT. *lin42a* posee el dominio SYQ/LT. *lin42c* codifica el dominio PAS. Los nematodos mutantes *lin42(n1089)* tiene una delección en el dominio PAS, mientras que los mutantes *lin-42(ok2385)* tiene una delección en el dominio SYQ/LT. Los nematodos *lin-42(ox461)* poseen una *full* delección de *lin-42*, y carecen tanto del dominio PAS como del SYQ/LT.

Los primeros estudios sobre la proteína LIN-42 de *C. elegans* consideraban que LIN-42C contenía la región más importante para su función, ya que el dominio PAS tiene mayor homología con la proteína PER. Sin embargo, la importancia de los dominios SYQ y LT presentes en LIN-42A fue posteriormente reconsiderada. Se ha encontrado que la expresión de LIN-42A puede rescatar mutaciones que afectan a LIN-42C o LIN-42A. Por el contrario, la expresión de LIN-42C solo puede rescatar una mutación que afecte a esta misma isoforma [213]. Así, para mantener el funcionamiento de LIN-42, las diferentes isoformas pueden también regularse unas a otras para generar la expresión y el funcionamiento adecuado de LIN-42.

La proteína LIN-42 ha sido ampliamente estudiada en *C. elegans* y se ha demostrado que participa en el desarrollo de las células hipodermales –llamadas *seam cells*–, en la migración de las células somáticas de la gónada, en el desarrollo de las células precursoras de la vulva, y en el desarrollo de mioblastos [213]. Además, interviene en la formación de una estructura denominada *alae*, que se forma a partir de la fusión de las *seam cells* en el último estadio del desarrollo del nematodo [214, 215]. Por otro lado, LIN-42 cumple una función importante en la coordinación temporal de los cambios de muda [216], así como en los estadios de sueño –llamados letargos– que ocurren entre los períodos de cambio de muda [216, 217]. Además, se ha encontrado que LIN-42 regula globalmente la biogénesis de los miARN (microARN), actuando como un represor transcripcional de la producción de los miARN primarios en *C. elegans*, como por ejemplo *let-7* y *lin-4* [218-220]; asimismo, es importante para la regulación del proceso del estadio *dauer*, actuando como un regulador negativo de ese estadio [221].

A pesar de que no se han encontrado patrones de expresión circadiana a nivel del ARN mensajero en LIN-42 [174], al menos bajo ciclos clásicos de luz-oscuridad o temperatura y en extracciones de ARN total, hay evidencias a favor del posible rol de LIN-42 en el reloj central de *C. elegans*. En un trabajo

publicado por nuestro grupo se mostró que nematodos mutantes para este gen muestran un período más largo de actividad locomotora en comparación con la cepa *wild-type* [171].

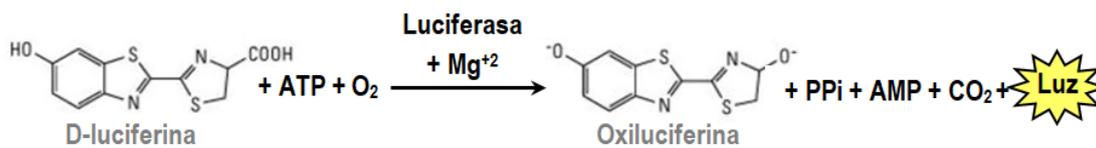
Por otro lado, en nuestro laboratorio se ha desarrollado un sistema reportero basado en bioluminiscencia, el cual permitió demostrar la existencia de ritmos circadianos robustos de expresión génica tanto en poblaciones como en ensayos de un solo nematodo, bajo condiciones ambientales constantes [183]. Este sistema, junto con el registro de la actividad locomotora también desarrollado por nuestro grupo de laboratorio [181], nos permiten avanzar en la comprensión de las bases moleculares del reloj biológico de los nematodos. A partir de todo lo expuesto, en este capítulo se utilizará el sistema reportero luminiscente para comprender mejor la función de la proteína LIN-42 en los ritmos circadianos de *C. elegans* en el estadio adulto.

### **Antecedentes del sistema reportero bioluminiscente en *C. elegans***

La bioluminiscencia es un proceso natural que sucede en ciertos organismos y que se basa en la emisión de luz visible por una serie de reacciones de catálisis enzimática que son llevadas 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, y en una extensa diversidad de animales marinos, como el plancton (Wilson y Hastings 1998). En procariotas, las más estudiadas provienen de las bacterias marinas *Vibrio harveyi* y *Photorhabdus luminescens*, ambas codificadas por los genes *lux*. Por otro lado, entre los eucariotas, las luciferasas más estudiadas y ampliamente utilizadas son las que provienen de la luciérnaga *Photinus pyralis*, codificada por el gen *luc* [222].

Si bien en la naturaleza se pueden encontrar alrededor de 30 sistemas independientes de formación de luz, todos ellos tienen algo en común: todas las luciferasas 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, genera la energía necesaria para la excitación [223].

El sistema de *Photinus pyralis* es el más utilizado hoy en día para investigación, y está compuesto 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 oxígeno y ATP como sustratos y de  $\text{Mg}^{+2}$  como cofactor. En resumen, la reacción de luciferasa utiliza como sustratos luciferina, ATP y oxígeno para producir oxiluciferina, AMP, fosfato (PPi), dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) y luz (Figura 3.2).



**Figura 3. 2. Reacción de la Luciferasa.** Reacción catalizada por la enzima de la luciérnaga codificada por el gen *luc* para la generación de bioluminiscencia.

Una ventaja que poseen las luciferasas como reporteros para medir la actividad transcripcional en el tiempo circadiano es que poseen una vida media relativamente corta, de solo unas pocas horas o incluso minutos [224]. Además, han sido ampliamente utilizadas en vectores de expresión y en construcciones fusionadas con otros productos génicos tales como la proteína verde fluorescente GFP (del inglés, *Green Fluorescent Protein*), siendo empleadas en un gran número de investigaciones para la búsqueda de promotores que estén regulados bajo el reloj circadiano, o para dirigir la expresión génica de manera cíclica en numerosos organismos [225]. Si bien las luciferasas tienen una vida media muy corta, se han generado variantes de las mismas para lograr reducirla aún más. Por ejemplo, es posible fusionar su marco de lectura con ciertos dominios proteicos capaces de desestabilizarla y marcarla para su degradación. El más utilizado es el dominio PEST, una región de 41 aminoácidos rica en prolina, glutamina, serina y treonina, que se localiza en la superficie de la proteína por su carácter hidrofílico y genera que ésta sea rápidamente degradada en el citoplasma celular [226].

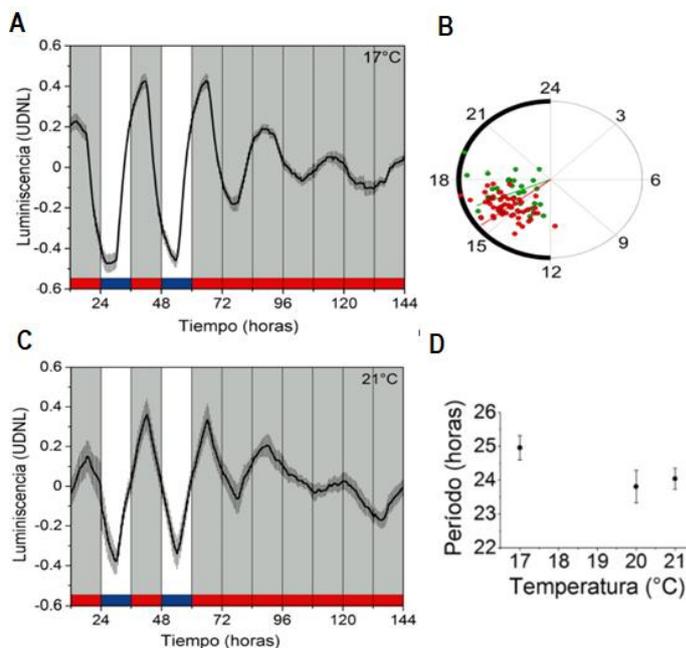
La bioluminiscencia presenta ciertas ventajas en comparación con la fluorescencia, tales como la vida media corta que presenta la enzima luciferasa, la disponibilidad comercial de los constructos de luciferasa, el no requerir la iluminación exógena y tener un ruido de fondo muy bajo. Todo eso ha permitido su utilización en el estudio de los ritmos circadianos en distintos organismos como cianobacterias (*Synechococcus*) [227], plantas (*Arabidopsis*) [228], insectos (*Drosophila*) [229], hongos (*Neurospora*) [230], peces (*Zebrafish*) [231, 232] y roedores (*Mus musculus*) [233-235].

Recientemente, un modelo animal en el que se ha aplicado la bioluminiscencia como sistema reportero para diversos estudios es el nematodo *C. elegans*. Los primeros trabajos que utilizaron una línea de *C. elegans* bioluminiscente probaron mediante ensayos de corto tiempo los efectos de exposición a temperatura elevada, a metales pesados y al 3-5 DCPC [236]; posteriormente los mismos autores describieron la generación de nematodos bioluminiscentes mediante la generación de un vector que expresa luciferasa fusionada a GFP, bajo el promotor del gen *sur-5*. En este trabajo, se mostró que los niveles de fluorescencia y luminiscencia del reportero *in vivo* correlacionan directamente con la cantidad de ATP endógeno de los nematodos, y no con posibles cambios de actividad transcripcional del gen *sur-5* [237].

Por otro lado, un estudio realizado en 2015 analizó la expresión *in vivo* del gen *sur-5* durante los estadios del desarrollo de *C. elegans*, desde huevo hasta joven adulto, utilizando el vector *psur5::luc::gfp* [184]. En este trabajo se realizaron estudios poblacionales (20 nematodos en estadio L1, en placas de 96 *wells*) y se midió la expresión del promotor *sur-5* durante todo el tiempo de desarrollo, en un medio líquido con 10 g/l de peso seco de *E. coli* OP50 y D-luciferasa 100µM. Bajo estas condiciones, 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*, momento en el que se genera el cese de la ingesta y el bombeo faríngeo. Los autores proponían que la D-luciferasa ingresaba solo a través de las bacterias que los nematodos utilizaban para alimentarse, mostrando una señal constante y alta, excepto durante los *moltings*, cuando la señal caía a cero. Adicionalmente, también se mostró en ese trabajo 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 [184].

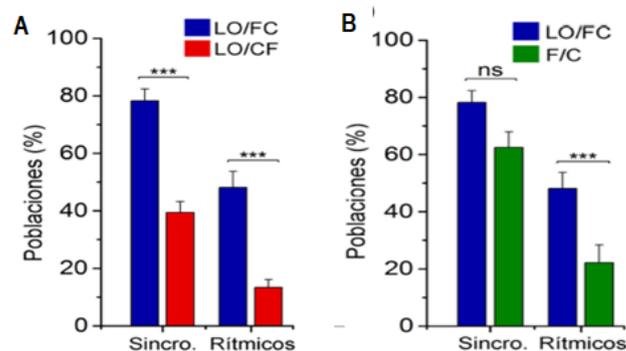
En un artículo publicado en 1998 se demostró que *sur-5* regula negativamente al gen *ras let-60*, el cual actúa en la vía de señalización involucrada en el control de la diferenciación de la vulva en el nematodo; mutaciones en el gen *sur-5* no generan ningún fenotipo visible [238]. Además, se reportó que *sur-5* actúa de manera sinérgica con *lin-45*, controlando la muerte larval, el movimiento y la puesta de huevos [238]. Por otro lado, la proteína SUR-5 tiene cierto grado de homología con la enzima Acetil-Coenzima A sintetasa humana (BlastP, 88% de cobertura, 40% de identidad,  $E = 2 \times 10^{-162}$ ), así como también sitios predictivos de unión a ATP/GTP y AMP [238]. Con la utilización de una fusión traduccional SUR-5::GFP, con una secuencia artificial de direccionamiento a núcleo (NLS), se observó que la proteína se expresa en la mayoría de las células somáticas de *C. elegans*, hipodermis, células musculares, neuronas, células de la faringe y en algunas regiones de la gónada, intestino y células excretoras. Además, la expresión de GFP se puede visualizar en todos los estadios del desarrollo del nematodo, desde el embrión hasta el estadio adulto [238].

Más recientemente, se ha utilizado el reportero de bioluminiscencia para el estudio de los ritmos circadianos en *C. elegans*. Un trabajo realizado en nuestro laboratorio utilizó la expresión de luciferasa para medir *in vivo* los ritmos circadianos del promotor *sur-5* en el estadio adulto de *C. elegans* [183]. El promotor de este gen es ampliamente utilizado dentro de la comunidad de *C. elegans*, debido a que dirige la expresión de cualquier transgén de forma ubicua y fuerte a lo largo de todos los estadios larvales de *C. elegans* (L1-L4) y durante el estadio adulto. En cuanto a la regulación circadiana de este gen, se comprobó que *sur-5* puede ser sincronizado por un ciclo de luz/oscuridad y temperatura; a su vez, se demostró que la expresión del gen *sur-5* se mantiene bajo condiciones ambientales constantes con un período endógeno de  $25 \pm 0.4$  h a 17°C (Figura 3.3 A) [183]. Por otro lado, se realizaron experimentos para comprobar que el período circadiano de *sur-5* mantiene una compensación frente a cambios en la temperatura. Para ello, se crecieron poblaciones de nematodos a 17°C, 20°C y 21°C, y se midió el período endógeno para cada una de las temperaturas estudiadas, arrojando un coeficiente  $Q_{10} = 1.1$  (Figura 3.3 D) [183].



**Figura 3.3. Compensación por temperatura de los ritmos de luminiscencia.** a. Luminiscencia emitida promedio  $\pm$  SEM de los nematodos adultos bajo un ciclo de LO/FC y luego en OO/CC (n=28). b. Gráfico de *Rayleigh* que muestra las acrofases (fase máxima) de los registros de luminiscencia bajo LO/FC (n=58, puntos rojos) y OO/CC (n=28, puntos verdes). Las 30 poblaciones no mostradas fueron arrítmicas en FR. *Test* de *Rayleigh*,  $p < 0,001$ . c. Luminiscencia promedio  $\pm$  SEM de nematodos adultos bajo un ciclo de LO/FC (19,5/21°C) y luego en OO/CC (n=21). d. El período circadiano muestra una compensación por temperatura entre 17°C y 21°C (ANOVA de una vía y *test* de *Tukey* de comparación entre grupos, no significativo). UDNL: Unidades normalizadas de luminiscencia sin la tendencia. Figuras tomadas del trabajo Goya et al. 2016.

Además, se logró sincronizar a los nematodos bajo distintas temperaturas ( $T=22\text{ °C}$  y  $T=26\text{ °C}$ ) y bajo un ciclo esqueleto, en el cual los animales se mantenían en oscuridad constante y se sincronizaban por pulsos de luz de dos horas [183]. En el mismo trabajo se obtuvieron resultados que mostraron que tanto la luz como la temperatura son *Zeitgebers* necesarios para entrenar los ritmos robustos de luminiscencia observados para *sur-5* (Figura 3.4) [183].



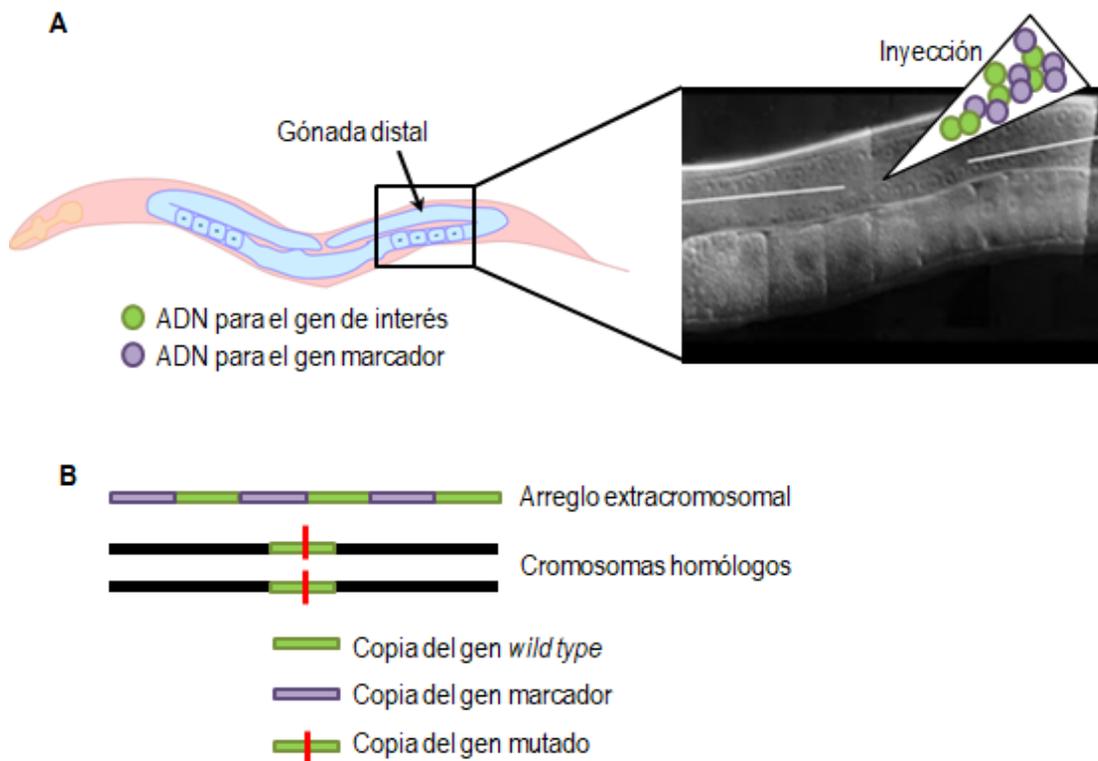
**Figura 3.4. Sincronización de poblaciones de nematodos bajo un ciclo de LO/FC invertido.** a. Porcentaje de poblaciones sincronizadas (con fase y periodo determinado por el *Zeitgeber*) y Rítmicas (mantienen la acrofase cuando se liberan en condiciones constantes) bajo LO/FC (n=101) y LO/CF (n=165),  $***p < 0,001$ ,  $**p < 0,01$ , *test* exacto de Fisher de dos colas). b. Porcentaje de poblaciones sincronizadas y entrenadas bajo LO/FC (n=101) y FC (n=72),  $***p < 0,001$ , *test* exacto de Fisher de dos colas. Datos tomados de tesis doctoral Goya, 2016.

En resumen, gracias al sistema reportero *psur-5::luc::gfp* se demostró que animales individuales –o poblaciones de nematodos– expresan ritmos de aproximadamente 24 h que pueden ser entrenados por ciclos de luz/oscuridad y temperatura. El sistema reportero basado en luminiscencia para estudiar ritmos de expresión génica *in vivo* en *C. elegans* permitió el comienzo de la tesis doctoral aquí presentada.

### **Manipulación genética en *C. elegans*: principios básicos de microinyección**

La facilidad que ofrece el nematodo *C. elegans* para su manipulación genética es una de las ventajas por las cuales es muy utilizado como modelo animal en investigación. Usando técnicas de ingeniería genética se puede identificar la localización de una mutación que genera un fenotipo determinado, y posteriormente usar esa información para identificar el producto del gen afectado. Además, se pueden generar cepas que poseen múltiples mutaciones por cruces entre mutantes y de esta forma estudiar la interacción genética.

Una de las técnicas más utilizadas para la generación de nematodos transgénicos es la microinyección. La misma es relativamente sencilla de llevar a cabo: una mezcla de ADN que contiene un gen de interés y un gen que codifica para un marcador celular autónomo es microinyectada dentro de la gónada de un nematodo joven adulto hermafrodita [239]. En general, la mezcla de ADN inyectada genera la formación espontánea de un minicromosoma compuesto de muchas copias de esas moléculas de ADN [239] (Figura 3.5). La microinyección se realiza en la gónada distal del nematodo [240, 241], la cual contiene un núcleo central de citoplasma que es compartido por muchos núcleos de células germinales. De esta forma, el ADN inyectado puede ser heredado a la progenie. Además, la inyección directamente en el núcleo del ovocito puede inducir a la integración cromosomal del arreglo de ADN, pero esta técnica es relativamente muy difícil de realizar [242]. Por otro lado, los ADN inyectados experimentan una recombinación homóloga entre sí bastante efectiva, por lo que no es necesario vincularlos físicamente antes de la inyección [240]. Por esta razón, la microinyección es más efectiva si los ADN utilizados tienen regiones que comparten homología de secuencia en sus *backbones*, aunque también puede ocurrir una recombinación no homóloga [241]. Además, el ADN se puede inyectar de forma circular o lineal, y esto no afecta los resultados ni la eficiencia de la técnica (Figura 3.5).



**Figura 3. 5. Representación esquemática de la microinyección en *C. elegans*.** **a.** Plásmidos que contienen el gen de interés (círculos verdes, que representan la copia del gen *wild-type*) y el gen marcador (círculos violetas) se mezclan en un tubo y se inyectan en una pequeña cantidad en la gónada distal del nematodo joven adulto. **b.** En la generación de la F1, se produce la formación de minicromosomas, denominados arreglos extracromosomales. Cada arreglo puede contener múltiples copias de cada tipo del ADN inyectado. Las copias endógenas del gen en los cromosomas, representados en verde, portan una mutación de pérdida de función (línea roja), la cual es rescatada por las copias del gen *wild-type* introducido en el arreglo extracromosomal. Imagen modificada de Yochem y Herman.

En general, los animales transgénicos producidos por microinyección llevan un largo arreglo extracromosomal que contiene múltiples copias de los vectores co-inyectados. Los arreglos extracromosomales son heredables a las progenies, pero solo una fracción de la primera generación (F1) contiene el transgen y puede transmitir el arreglo a través de muchas generaciones subsecuentes, generalmente sin modificar la expresión o la heredabilidad. Sin embargo, los arreglos heredables contienen diversos grados de inestabilidad y herencia incompleta; para remediar este problema existe la posibilidad de integrar los arreglos al cromosoma del nematodo.

Como se mencionó anteriormente, para la generación de animales transgénicos se microinyecta una mezcla de ADN que contiene el gen de interés y un gen que codifica para un marcador de selección. Los marcadores de co-inyección inducen un fenotipo dominante y pueden ser transformados en cualquier cepa de nematodos, siempre que no interfiera el fenotipo del huésped con el fenotipo del marcador. Existen otros marcadores de selección que pueden rescatar mutaciones letales o no letales, pero requieren el uso

de cepas mutantes específicas. Para muchos experimentos de rescate de un fenotipo no es requerida una inyección con un marcador de selección, pero es usualmente utilizado como un control efectivo de la transformación. Existen diferentes tipos de marcadores comerciales de transformación. Entre los más utilizados se encuentra el plásmido pRF4, que genera una mutación en el colágeno (*rol-6(su1006)*), la cual induce un fenotipo llamado *roller*, donde los animales tienen un movimiento circular fácilmente observable bajo lupa [240, 243]. Este marcador presenta algunas desventajas: es difícil de distinguir en cepas que tienen un fenotipo *dumpy* (*dpy*), en el cual los nematodos se observan más gordos y cortos, o en cepas con un fenotipo *uncoordinated* (*unc*), en donde los nematodos son más cortos y tienen una movilidad reducida y diferente a la forma sinusoidal típica. Además, el fenotipo *roller* afecta a los nematodos machos, volviéndolos menos eficientes en el apareo.

Otros marcadores muy utilizados son aquellos que expresan proteínas fluorescentes bajo promotores tejido-específicos [238, 244, 245]. Por ejemplo, el plásmido *psur-5::GFP* expresa la proteína GFP bajo el promotor *sur-5*, que, como fue mencionado, representa un promotor ubicuo que se expresa en casi todo el nematodo [238]; el plásmido *pmyo-2::mcherry* (expresión de mCherry en la faringe); el plásmido *pcc::RFP* (expresión de RFP en *coelomocytes*, 3 pares de células específicas adyacentes a la musculatura somática); y el plásmido *punc-119::GFP* (marcador pan-neuronal, de todo el sistema nervioso). Todos estos plásmidos pueden ser inyectados en la cepa N2 (*wild-type*). Por otro lado, existe un segundo grupo de marcadores de co-inyección que son utilizados para rescatar el fenotipo de un gen mutado en la cepa inyectada, de manera que el plásmido con el gen marcador y la construcción de interés se co-inyectan en la cepa que porta esa mutación. Un ejemplo de ese sistema es la cepa *pha-1*, basada en la mutación *pha-1(e2123)* sensible a temperatura. Esa mutación es letal en embriones y causa un crecimiento normal a 15°C pero 100% de letalidad a 25°C. En este caso, los animales transgénicos se seleccionan co-inyectando 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 F2 de 15°C a 25°C [245]. Otro ejemplo es el gen marcador *unc-119*, que confiere el rescate al mutantes *unc-119(ed3)* [246, 247].

Si bien esta técnica tiene la ventaja de ser relativamente fácil, rápida y eficiente para la expresión de genes en tejidos somáticos, donde se pueden generar entre 3 y 6 líneas transgénicas independientes en 7-10 días con pocas gónadas inyectadas, presenta algunas desventajas. Por un lado, los patrones de expresión podrían no parecerse a la expresión endógena del gen, especialmente para los genes expresados en la línea germinal y, por otro, los transgénicos con arreglos repetitivos pueden ser silenciados en las células germinales [248]. Además, a veces se observa la expresión transgénica suprimida en los tejidos somáticos [241]. Así, un rescate de un mutante nulo no puede asegurar la expresión adecuada del gen rescatado. Es difícil predecir y controlar los niveles de expresión de diferentes arreglos extracromosomales, por eso la expresión de un transgén puede variar en una misma cepa, ya que el mismo no es transmitido por igual a la progenie dando como resultados animales *mosaicos* [241]. A veces, los

arreglos pueden generar un efecto de ARN de interferencia (ARNi), suprimiendo así la función de un gen endógeno [249].

Los arreglos extracromosomales pueden ser integrados al cromosoma de los nematodos para ayudar a reducir la inestabilidad y variabilidad genética. Un método muy utilizado es la irradiación gamma o por UV para inducir la ruptura del ADN cromosomal, y posteriormente la ligación del arreglo al cromosoma durante la reparación del ADN (WormBook, <http://www.wormbook.org>). También, la coinyección del ADN transgénico con un oligonucleótido de ADN de simple cadena estimula la integración al azar y la supresión de la formación del arreglo [240]. La principal ventaja de este enfoque es que una línea integrada puede derivarse directamente de los animales inyectados, pero la eficiencia de la transformación se reduce en aproximadamente 10 veces [240]. Otro método actualmente empleado para la integración del arreglo extracromosomal en el genoma de *C. elegans* es mediante CRISPR/Cas9. Así, el arreglo y el genoma se cortan en una secuencia específica, resultando en la integración sitio-específico [250]. Otra metodología recientemente desarrollada es la integración luego de la microinyección. Mediante este método se genera la ruptura en la doble cadena del ADN genómico después de la inyección del arreglo (6 h) por una activación lumínica a través de un mini generador de oxígeno expresado en la línea germinal (miniSOG), evitando de esta forma establecer primero la línea transgénica para luego generar la integración del arreglo [251]. Si bien en todos los casos se logra la integración del arreglo extracromosomal al genoma, CRISPR/Cas9 tiene algunas ventajas en comparación con UV y miniSOG. Estas dos últimas generan mutaciones secundarias que deben ser eliminadas, y además el sitio de integración no puede ser seleccionado, sino que lo que ocurre es una integración al azar.

Adicionalmente, una técnica muy utilizada en *C. elegans* son los cruces entre dos cepas mutantes para poder generar de esta forma un doble mutante. Para la generación de los cruces se debe tener en cuenta la posición del gen mutante en el genoma y el cromosoma en el que se encuentra. En ambos sexos del nematodo, hermafroditas y machos, el genoma se encuentra repartido en cinco pares de autosomas (I, II, III, IV y V) y uno o dos cromosomas X. Todos los cromosomas son holocéntricos (sin centrómero) por lo que durante la división celular los microtúbulos del huso mitótico se unen en toda su longitud [252].

Como en otros invertebrados, el sexo se determina por el cociente entre cromosomas X y autosomas. Ambos sexos son diploides para los cinco autosomas, pero mientras los hermafroditas poseen un par de cromosomas X (XX), los machos solo tienen uno (X0), es decir, no hay cromosoma Y. Esto hace que la mayoría de la descendencia producida por auto-fertilización sea hermafrodita, mientras que la descendencia de una fertilización cruzada da lugar a machos y hermafroditas en una proporción similar entre ambos, ya que la mitad de los espermatozoides producidos por el macho no tienen cromosoma X [253]. Además, la generación de machos se puede obtener produciendo un estrés al hermafrodita mutante, como por ejemplo un shock de alta temperatura (37 °C) por un corto de tiempo. Una vez obtenidos los

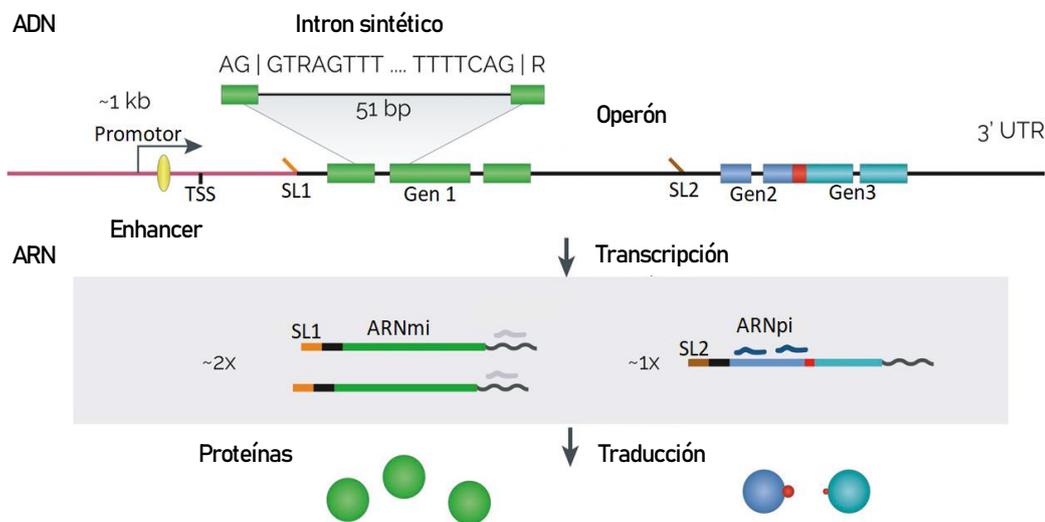
machos de la cepa mutante, se cruzan con otras hermafroditas mutantes para otro gen deseado. De esta forma, se obtendrán generaciones con ambas mutaciones, y generaciones con cada una de las mutaciones. En cada uno de los hermafroditas mutantes se chequea la mutación por PCR o visualmente cuando tienen un fenotipo de fácil identificación.

### **Estructura del transgen en *C. elegans***

El genoma de *C. elegans* es relativamente compacto (*C. elegans sequencing Consortium* 1998), y posee *enhancers* localizados a pocas kilobases (Kb) del codón de inicio del gen [254]. Dicha proximidad entre los elementos que regulan la transcripción hace que sea relativamente simple generar un promotor corto que pueda expresar el transgen. Si bien los *enhancers* se encuentran muy cercanos al codón de inicio del gen, existen algunos que se pueden localizar a 10 kb río arriba del sitio de comienzo de la transcripción [255]. Además, algunos intrones pueden contener sitios de *enhancers* [256]. Por otro lado, el 70% de los genes de *C. elegans* sufren *trans-splicing*, un proceso donde el 5' del ARNm es reemplazado en una reacción de *splicing* por una secuencia de 22 nucleótidos (nt) que pueden ser del tipo SL1 o SL2 [257].

Por último, muchos de los genes (15% de todos los genes del nematodo) se encuentran organizados en operones y son cotranscritos por un mismo promotor, similar a los operones bacterianos [257, 258]. Estos operones se transcriben como pre-ARNm policistrónico que son procesados a monocistrones mientras se transcriben, por clivaje y poliadenilación del extremo 3' de cistron, a través de un mecanismo de *trans splicing*. Estos operones pueden contener entre 2 y 8 secuencias codificantes, que están separadas por una región ICR (del inglés, *Intercistronic Región*) de alrededor de 100-200 pb, la cual posee sitios internos de unión a ribosomas y una zona rica en el nucleótido U que se utiliza para reclutar ribonucleoproteínas pequeñas nucleares de SL2 que procesan el extremo 5' del cistron río abajo [257]. Con la utilización de ICRs se han generado vectores bi o tri-cistrónicos que permiten la expresión de varias proteínas en tándem bajo un mismo promotor [259].

El *splicing* de los intrones es característico de la transcripción y la exportación nuclear del ARNm en las células eucariotas [260]. En *C. elegans* el *cis-splicing* alternativo de los intrones modifica la expresión génica a muchos niveles, como la transcripción, la poliadenilación o, la exportación del ARN mensajero, así como la eficiencia de traducción y la vida media [261]. Si bien la expresión de genes sin intrones es posible, la inclusión de intrones sintéticos mejora la expresión [256]. En estos animales, los intrones tienen algunas características particulares: son relativamente cortos (aproximadamente 60 nt) y tienen un alto número de sitios de *splicing* [258]. Por este motivo, los fluoróforos utilizados como marcadores usualmente incluyen tres intrones cortos sintéticos en la región codificante del gen (ORF) llamados AI (del inglés, *Artificial Introns*), y algunos de los ejemplos más relevantes incluyen el gen *lacZ* [244], *gfp* [242] y *mcherry* [262]. Actualmente, muchos vectores que contienen genes reporteros con intrones se utilizan en el *kit* para expresión en *C. elegans* de Andrew Fire (*Fire Lab, C. elegans Vector Kit, Addgene*) (Figura 3.6).



**Figura 3. 6. Esquema de la estructura del transgen en *C. elegans*.** Estructura del transgen marcando los elementos regulatorios más comunes. El promotor contiene la región regulatoria en 1 kb aguas arriba de la secuencia de inicio (TSS, *transcriptional start site*), la misma es frecuentemente removida en el ARNm maduro por una reacción de *trans-splicing*. Intrones sintéticos cortos son rutinariamente incluidos para estimular la expresión del gen. La expresión bicistrónica puede lograrse uniendo genes con una secuencia intergénica de operón. Los genes en el operón se dividen en dos ARN durante la transcripción. Los genes separados por secuencias (marca roja) se dividen en dos proteínas durante la traducción y se expresan en una relación estequiométrica con péptidos cortos agregado a ambas proteínas. Los ARN pequeños (ARNpi y ARNmico) pueden reprimir la transcripción y la traducción mediante una complementariedad de bases con la secuencia primaria. La optimización de codones se usa con frecuencia para mejorar la expresión transgénica y eliminar la pequeña homología de ARN. Imagen modificada de Nance, J y Frøkjær-Jensen, C.

## Conceptos básicos de Cronobiología

Algunos de los conceptos básicos de la cronobiología serán nuevamente descritos para realizar una revisión de los mismos. Como se mencionó en la introducción general, para que un proceso biológico pueda ser identificado como un ritmo circadiano debe cumplir tres parámetros específicos: 1) poseer una oscilación con un período endógeno cercano a 24 h en condiciones constantes o de *free running* (t) ; 2) poder ser sincronizado por un agente ambiental (*Zeitgeber*) 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 ( $Q_{10} \approx 1$ ) [263].

Además, las oscilaciones biológicas pueden ser representadas como una onda sinusoidal definida por tres parámetros: período, amplitud y acrofase (punto máximo de la oscilación). También, otra nomenclatura definida para los ritmos biológicos es el tiempo ZT (*Zeitgeber Time*), donde ZT=0 es el momento de inicio del estímulo ambiental –como el encendido de las luces, o la disminución de la temperatura–, y ZT=12 es el momento en el cual se termina el estímulo ambiental –como el apagado de las luces, o el aumento de la temperatura–. En condiciones constantes o de *free running* se define el tiempo

circadiano o CT (*Circadian Time*), donde CT=0 es el comienzo del día subjetivo, y CT=12 es el comienzo de la noche subjetiva, ya que en esas condiciones el día y la noche no están marcados por el estímulo ambiental (Figura 1. 4).

Por otro lado, en esta tesis se utilizarán los términos: 1) porcentaje de nematodos sincronizados, definido como la cantidad de nematodos que siguen al período del *Zeitgeber* sobre el total de la población analizada; 2) porcentaje de nematodos rítmicos, definido como la cantidad de nematodos que poseen un ritmo en condiciones constantes de luz y temperatura sobre el total de nematodos sincronizados y 3) porcentaje de nematodos entrenados, definido como la población de nematodos que mantiene la fase en condiciones constantes de luz y temperatura sobre el total de nematodos rítmicos. Por otra parte, los nematodos que poseen un ritmo bajo condiciones constantes, pero con una fase distinta a la fase en condiciones cíclicas se consideran enmascarados, es decir que el estímulo ambiental modificó directamente el comportamiento circadiano (como la actividad locomotora) pasando por alto al reloj central.

Como se mencionó antes, PER es una de las principales proteínas que interviene en los ritmos circadianos de mamíferos y moscas, y en *C. elegans* el homólogo a PER es la proteína LIN-42. En este capítulo, se utilizará el sistema reportero basado en luminiscencia antes descrito para encontrar una relación entre la proteína LIN-42 y los ritmos circadianos de poblaciones de nematodos adultos sincronizadas a un ciclo dual de luz y temperatura.

### Objetivos del presente capítulo:

- Estudiar los ritmos de luminiscencia del gen *sur-5* en nematodos mutantes para la proteína LIN-42, *lin-42(ox461)*, *lin-42(n1089)*, *lin-42(ok2385)*, bajo condiciones cíclicas (LO/FC) y constantes (OO/CC).
- Analizar los ritmos de luminiscencias en nematodos rescatados para la mutación *lin-42(ox461)*, bajo condiciones cíclicas (LO/FC) y constantes (OO/CC).
- Analizar los ritmos de luminiscencias en cepas que sobre-expresan *lin-42b*, *lin-42a* y *lin-42c*, bajo condiciones cíclicas (LO/FC) y constantes (OO/CC).
- Estudiar los ritmos transcripcionales el gen *lin-42*, bajo condiciones cíclicas (LO/FC) y constantes (OO/CC).

## Materiales y Métodos

### Cepas de nematodos

Los nematodos transgénicos utilizados en este trabajo fueron generados por la técnica de microinyección estándar [240, 241], mediante una colaboración con el laboratorio de la Dra. Claire Bénard, del Département des sciences biologiques, Université du Québec à Montréal, Canada. La cepa N2 Bristol (*wild-type*), y los mutantes *lin-42(n1089)* (cepa MT2257) y *lin-42(ok2385)* (cepa RB1543) fueron obtenidos del *Caenorhabditis Genetics Center* (CGC, Universidad de Minnesota, Estados Unidos, <https://cgc.umn.edu>). El mutante *lin-42(ox461)* (cepa RB1890) *full delección* fue cedido por el laboratorio de Ann Rougvie [264].

La integración del arreglo extracromosomal *psur5::luc::gfp* al genoma de *C. elegans* se realizó a partir de la cepa N2 (que porta este mismo arreglo extracromosomal) (línea VQ1296: N2, qvEx294 (*psur5::luc::gfp*)) por radiación UV. Además, en esta sección del trabajo se utilizaron diferentes líneas transgénicas que contienen el reportero *psur5::luc::gfp* pero en marcos mutantes de *lin-42*. Las cepas VQ1312 [*lin-42(ox461)* #5OC (*outcross*)], VQ1311 [*lin-42(n1089)* #3OC], y VQ1327 [*lin-42(ok2385)* #3OC], fueron cruzadas con la cepa VQ1310 [*qvl8* (*psur5::luc::gfp*)], se obtuvieron las cepas: VQ1354 [*lin42(ox461)* #5OC, *qvl8*], VQ1326 [*lin-42(n1089)* #3OC, *qvl8*], VQ1353 [*lin-42(ok2385)* #3OC, *qvl8*]. Las mutaciones fueron seguidas por PCR a punto final. Para genotipar la cepa VQ1354 se utilizaron los pares de *primers* Fw\_ox461\_ext/ Rv\_ox461\_ext (ambos *primers* hibridan por fuera de la mutación), dando un amplicón de 356pb en la cepa mutante y sin amplicón en la cepa *wild-type*. Además, se utilizaron los pares de *primers* Fw\_ox461\_ext/ Rv\_ox461\_int (el Fw hibrida por fuera de la mutación (ext: externo) y el Rv hibrida en la región donde se realizó la delección (int: interno)), dando de 626 pb en la cepa *wild-type* y sin amplicón en la cepa mutante.

Fw\_ox461\_ext: 5'-CGGTTACGCATTGAAAGACA-3'

Rv\_ox461\_ext: 5'-CAATTCATCCCGGTTTCTGT-3'

Rv\_ox461\_int: 5'-AACGTGGCCTATCCAATCTC-3'

Para genotipar la cepa VQ1353 se utilizaron los pares de *primers* Fw\_ok2385\_ext/ Rv\_ok2385\_ext, dando un amplicón de 544pb en la cepa mutante y sin amplicón en la cepa *wild-type*. Además, se utilizaron los pares de *primers* Fw\_ok2385\_ext/ Rv\_ok2385\_int, dando de 626 pb en la cepa *wild-type* y sin amplicón en la cepa mutante.

Fw\_ok2385\_ext: 5'-CGGTTACGCATTGAAAGACA-3'

Rv\_ok2385\_ext: 5'-AGTCCCTTTTGCCTGGATCT-3'

Rv\_ok2385\_int: 5'-AACGTGGCCTATCCAATCTC-3'

Para genotipar la cepa VQ1311 se utilizaron los pares de *primers* Fw\_n1089\_ext/ Rv\_n1089\_ext, dando un amplicón de 338 pb en la cepa mutante y sin amplicón en la cepa *wild-type*. Además, se utilizaron los pares de *primers* Fw\_n1089\_ext/ Rv\_n1089\_int, dando de 384 pb en la cepa *wild-type* y sin amplicón en la cepa mutante.

Fw\_n1089\_ext: 5'-AGACTGCTGCAGGGCAGTGT-3'

Rv\_n1089\_ext: 5'-GCACCTTCACATTACCCCACG-3'

Rv\_n1089\_int: 5'-GTTGCGAGCAGCCACTCTCTC-3'

El mutante *lin-42(ox461)* fue rescatado con el arreglo extracromosomal *plin-42b/c::isoforma b::gfp::unc-4*. Para ello, el arreglo fue insertado en nematodos de la cepa N2 (Bristol, *wild-type*) por microinyección, VQ1384 [*qvEx400 (plin-42 b/c::lin-42b::gfp:unc-54, pBB107)*] y luego se realizaron cruzamientos entre VQ1384 y la cepa mutante de *lin-42* que posee la delección completa y el reportero *psur5::luc::gfp* integrado, generando la cepa VQ1484 (*lin-42(ox461)* II #50C; *qvls8; qvEx400 (plin-42b/c::isoforma b::gfp::unc-54; pBB107)*). El arreglo *plin-42b/c::isoforma b::gfp::unc-4* fue cedido por el laboratorio de Ann Rougvie [264].

Para la sobre-expresión de *lin-42c* y *lin-42a* se utilizaron los arreglos *plin-42 b/c::lin-42 c::gfp::unc54, plin-42 a::lin-42 a::gfp::unc54*, cedido por el laboratorio de Ann Rougvie [264]. Los constructos que expresan las isoformas b, c y a bajo el promotor de *lin-42* correspondiente, fueron inyectados en la cepa N2 (cepa Bristol) generando las cepas: VQ1384 [*qvEx400 (plin-42 b/c::lin-42b::gfp:unc-54, pBB107)*], VQ1366 [*qvEx385 (plin-42 b/c::lin-42c::gfp::unc54, pBB107)*] y VQ1368 [*qvEx387 (plin-42 a::lin-42a::gfp::unc54, pBB107)*]. Posteriormente, cada una de las cepas generadas fueron cruzadas con la cepa control (VQ1310 [*qvls8 (psur-5::luc::gfp; punc-122::RFP)*]), dando lugar a la generación de las cepas: DG3 [*qvEx400 (plin-42b/c::lin-42b::gfp:unc-54, pBB107); qvls8 (psur-5::luc::gfp; punc-122::RFP)*], DG6 [*qvEx387 (plin-42 a::lin-42a::gfp::unc54, pBB107); qvls8 (psur-5::luc::gfp; punc-122::RFP)*] y DG8 [*qvEx385 (plin-42 b/c::lin-42c::gfp::unc54, pBB107); qvls8 (psur-5::luc::gfp; punc-122::RFP)*].

Por otro lado, se registró el ritmo del promotor de *lin-42* utilizando el plásmido *plin-42::luc::gfp::pest* inyectado en la cepa N2 Bristol, generando la cepa VQ1324 (*qvEx361 (plin-42::luc::gfp::pest, pCFJ90)*).

## Constructos moleculares

Los constructos moleculares utilizadas en este trabajo fueron generados mediante técnicas de ingeniería genética, y cada uno de los pasos fue controlado mediante electroforesis preparativa en geles de agarosa (estos resultados no fueron incluidos en la presente tesis por motivos de extensión). Además, los amplicones obtenidos por PCR a punto final, así como los constructos finales, fueron corroborados mediante secuenciación en Macrogen (Corea).

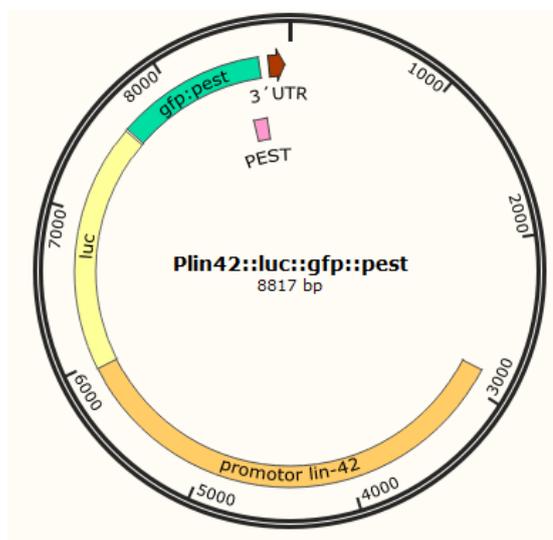
- **Generación del plásmido PEST**

Para la generación del vector *plin-42::luc::gfp::pest*, se realizó la amplificación de la región promotora del gen *lin-42* por PCR, utilizando como molde de reacción la construcción *plin-42::luc::gfp* previamente generada en nuestro laboratorio. Los *primers* utilizados fueron:

Fw-HindIII: 5'- CCCAAGCTTAGAGATAGAGAGCGTCGGAGGGTG -3'

Rv-BamHI: 5'- CGCGGATCCTTGGCTGATGGTGCCACGTTC -3'

El amplicón obtenido de 3105 pb fue clonado en pGEM-T utilizando el kit pGEM-T Easy Vector (Promega, Estados Unidos) siguiendo las instrucciones del proveedor, y luego la secuencia fue validada por secuenciación en Macrogen. La construcción obtenida fue digerida con las enzimas de restricción HindIII y BamHI, para liberar la región correspondiente al promotor de *lin-42*. Finalmente, el producto obtenido se ligó en el vector previamente generado en nuestro laboratorio (*psur5::luc::gfp::pest*) digerido con las mismas enzimas de restricción. De esta forma se generó la construcción *plin-42::luc::gfp::pest* (8838pb) (Figura 3.7).



**Figura 3. 7. Esquema de la construcción PEST.** *plin-42::luc::gfp::pest*. Las Figuras de las construcciones genéticas se realizaron utilizando el programa *snap gene* 3.3.1.

Los *primers* utilizados en este trabajo fueron diseñados mediante el *software* CloneManager7 (Scientific & Educational Software, Estados Unidos), y sintetizados en Genbiotech SRL (Argentina). En todos los casos, las secuencias de los constructos fueron validadas por secuenciación por la técnica de Sanger en Macrogen (Corea). Todas las estrategias de clonado, y las evaluaciones de las secuenciaciones,

fueron realizadas *in silico* mediante el *software* CloneManager7 (Scientific & Educational Software, Estados Unidos) y el *software* SnapGene 2016 (GSL Biotech LLC, Estados Unidos).

### **Reacción 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 5 minutos a 95°C y 35 ciclos de: 30 segundos a 95°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 de ácidos nucleicos, revelado y aislamiento de los amplicones**

Las reacciones de PCR y las digestiones fueron corroboradas mediante electroforesis preparativa en geles de agarosa 0.8 % (Genbiotech, Argentina), en presencia de *buffer* TAE 1X (Stock TAE 50X: Tris-Acetato 2 M, EDTA 0,05 M; Sigma-Aldrich, Estados Unidos), tinción con *GelRed* 0,5X (Biotium stock 10000X, Estados Unidos) y utilizando el marcador de peso molecular *Ladder* 1kb *plus* y 250 bp (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos); se analizó en un transiluminador UV (DyNA Light, Labnet International, Estados Unidos) . Las imágenes de cada electroforesis se digitalizaron 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* por lisis alcalina *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 [265].

## Generación de nematodos transgénicos mediante microinyección

Los animales transgénicos fueron generados por la técnica de microinyección estándar [241], mediante una colaboración y estadía en el laboratorio de la Dra. Claire Bénard, del *Département des Sciences Biologiques, Université du Québec à Montréal*, Canadá. 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 en la cepa N2 (*wild-type*) a una concentración de 50 o 100 ng/μl, con los marcadores pcFJ90 y pBB101 (100 ng/μl) –ambos expresan RFP en la faringe del nematodo– y un el plásmido pBSK (50 o 100 ng/μl) para completar la *mix* de inyección.

## Integración del arreglo extracromosomal por radiación UV

Como se mencionó antes, unos de los métodos más utilizados para la integración de una construcción genética en el genoma de *C. elegans* es la integración por radiación UV. La misma permite integrar al genoma un arreglo extracromosomal previamente inyectado en el nematodo.

Para la integración del constructo *psur5::luc::gfp* al genoma de *C. elegans*, se utilizaron nematodos en estadio L4 que poseían *psur5::luc::gfp* junto con el marcador *cc::rfp*, el cual permite la observación de los celomocitos –3 pares de células que se encuentran distribuidas en toda la extensión del cuerpo del nematodo– en rojo. Para ello, se prepararon 4 placas de Petri de 35 mm con medio NGM sin bacterias *E. Coli OP50*, y posteriormente en cada una de las placas se colocaron 5 nematodos en estadio L4 que poseían el arreglo extracromosomal. Luego, se expuso cada placa a un pulso de UV de 300 μjoules (x100) por 30 segundos, utilizando el equipo *Stratagene UV Stratalinker 2400* (254nm, Estados Unidos). Finalmente, los nematodos fueron colocados individualmente en placas de Petri de 35 mm con medio NGM más *E. Coli OP50*, generando así un total de 20 placas con nematodos irradiados; 10 placas se colocaron en la incubadora a 20°C, y las restantes a 15°C. Luego de dos días, se realizó el chequeo de huevos muertos en cada una de las placas, ya que la presencia de un alto número de huevos muertos es un indicador de que la radiación fue exitosa. Posteriormente, se dejaron crecer los nematodos por 2 semanas hasta lograr una sobrepoblación de los mismos. Luego, en cada una de las placas se realizó un corte en el medio NGM que contenía abundantes nematodos y se lo colocó en una nueva placa de Petri de 35 mm con medio NGM más *E. Coli OP50*, generando un total de 10 placas las cuales se denominaron *placas maestras*. Los cortes se realizaron solo en las placas colocadas a 20°C, dejando de reserva las placas que se encontraban a 15°C. Al día siguiente, se tomaron 15 nematodos de cada *placa maestra* que poseían

alta expresión del transgén y no tenían una expresión mosaico, y se colocaron individualmente en nuevas placas de Petri de 35 mm con medio NGM más *E. Coli* OP50, generando un total de 150 placas. Luego, las mismas se colocaron a 20°C y se dejaron crecer las poblaciones hasta la segunda generación (F2). Por último, de las placas que poseían un 100% de nematodos fluorescentes se seleccionaron 3 nematodos en estadio adulto joven y se los colocó individualmente en nuevas placas de Petri de 35 mm con medio NGM más *E. Coli* OP50. Finalmente, se obtuvo una sola placa que contenía 100% de nematodos fluorescentes en su descendencia. Así, se generó la línea transgénica integrada con la construcción *psur5::luc::gfp* y *cc::red*.

Luego, se realizaron 5 cruces entre la línea integrada y la cepa N2 (*wild-type*). Este procedimiento es necesario para limpiar la línea irradiada de posibles mutaciones generadas por la exposición UV. Actualmente se sabe que 5 cruces entre una línea integrada y la cepa N2 son suficientes para limpiar todas las mutaciones no deseadas [266].

### **Ensayo de luminiscencia**

Los registros de luminiscencia bajo ciclos duales de luz/oscuridad y temperatura (15.5°C/17°C, 12h:12h) fueron realizados en placas *multiwells*. Los ensayos de luminiscencia bajo condiciones constantes (oscuridad/ 20°C) fueron realizados en placas de Petri de 90 mm. En todos los casos se utilizó el medio de luminiscencia descripto en la sección de materiales y métodos generales.

- ***Ensayo de luminiscencia en placa de Petri bajo condiciones constantes***

Los ensayos bajo condiciones constantes se realizaron como se describe en la sección de materiales y métodos generales. En todos los ensayos se utilizaron poblaciones de nematodos.

- ***Ensayo de luminiscencia en placa multiwell bajo LO/FC y FR***

Los ensayos bajo condiciones cíclicas de luz/oscuridad y temperatura (15.5°C/17°C, 12h:12h) fueron realizados en todos los casos con poblaciones de nematodos. Se utilizaron poblaciones de 100 nematodos cuando se trabajó con las cepas mutantes, y poblaciones de 50 nematodos cuando los registros se realizaron con las cepas rescatadas y con las cepas de sobre-expresión.

- ***Análisis de Datos***

Los datos fueron analizados como se describe en la sección de materiales y métodos generales. Para todos los casos se realizó un análisis de la varianza y un *test* de normalidad D'Agostino y Pearson *test*; si pasaban el *test* de normalidad se realizó un *test* de *Student* (*Student's t-test*) para la comparación de los cambios de períodos, si los datos no pasaban el *test* de normalidad se realizó un *test* no paramétrico, Mann Whitney *test*. Se realizó un *test* Watson-Wheeler en *R Studio* para el análisis del cambio de fase, y

las acrofases fueron analizadas por un *test* de *Rayleigh* utilizando el programa *El Temps* (versión 1.313; <http://www.el-temps.com>). Para el análisis de los porcentajes de nematodos sincronizados, rítmicos y entrenados se utilizó un ANOVA de dos vías. En todos los casos un valor de  $P < 0,05$  fue considerado como el mínimo para ser estadísticamente diferente. Para todos los análisis estadísticos se utilizó el programa *GraphPad Prism 7*.

### Ensayo PCR en tiempo real

Poblaciones de nematodos adultos, cepa N2 (Bristol), fueron sincronizadas por la técnica de Cloro y NaOH. Los huevos fueron recolectados y mantenidos en agitación en medio M9 durante toda la noche. Al día siguiente, las larvas L1 fueron pasadas a placas NGM con bacterias (*E. Coli* HB101), 64 placas con 4000 nematodos cada placa. Los nematodos fueron crecidos bajo un ciclo dual de luz y temperatura 12 h: 12 h (~150  $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$ :18.5 °C/0  $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$ :20 °C) por 48h. Luego, las larvas L4 fueron recolectadas a ZT4, lavadas con buffer M9, para remover los restos de bacteria, y pasadas a 4 Erlenmeyer de 500ml, con 130 ml de medio de luminiscencia sin luciferina (aproximadamente 64000 nematodos por Erlenmeyer). Los nematodos fueron entrenados bajo un ciclo dual de luz y temperatura 12 h: 12 h (~150  $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$ :15.5 °C/0  $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$ :17 °C) en agitación 110 rpm durante 2 días y luego fueron dejados 2 días más en condiciones constantes (oscuridad, 17 °C). Cuatro muestras biológicas independientes (n=4) de ~4000 nematodos cada una fueron recolectados cada 4 h, comenzando a ZT1 en el segundo día bajo condiciones cíclicas y bajo condiciones constantes. Los nematodos fueron pasados a falcón de 15ml, se esperó hasta que decantaran y se les sacó el medio de luminiscencia. Luego, se les agregó 200  $\mu\text{l}$  de Trizol (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos) y fueron pasados a eppendorf de 1,5 ml y congelados a -80°C.

El ARN total fue extraído de las muestras mediante el método de Trizol de acuerdo a instrucciones del proveedor. 2  $\mu\text{g}$  de RNA total fueron tratados con DNase I amplification grade (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos) y utilizados para realizar la síntesis de ADNc utilizando MLLV transcriptasa reversa (PB-L, Argentina) 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 3.0 (PB-L, Argentina) utilizando un termociclador QuantStudio 3 (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos). La mix fue agregada (9  $\mu\text{l}$ ) en cada uno de los 96 pocillos de la placa de PCR y 1  $\mu\text{l}$  de ADNc fue añadido como molde de PCR. El programa de PCR fue 10 minutos a 95 °C, 45 ciclos de 15 segundos a 95 °C y 60 segundos a 60 °C, 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 del gen de referencia Y45F10D.4. Los *primers* utilizados para amplificación de *lin-42b/c* y Y45F10D.4 fueron:

Fw-*lin42b/c*: 5'-CCGAAAATGGAGCTAGTCG-3'  
Rv-*lin42b/c*: 5'-CGAAAGTCTTCGCCATAACC-3'

Fw-Y45f10D.4: 5'-GTCGCTTCAAATCAGTTCAGC-3'  
Rv-Y45f10D.4: 5'-GTTCTTGCAAGTGATCCGACA-3'

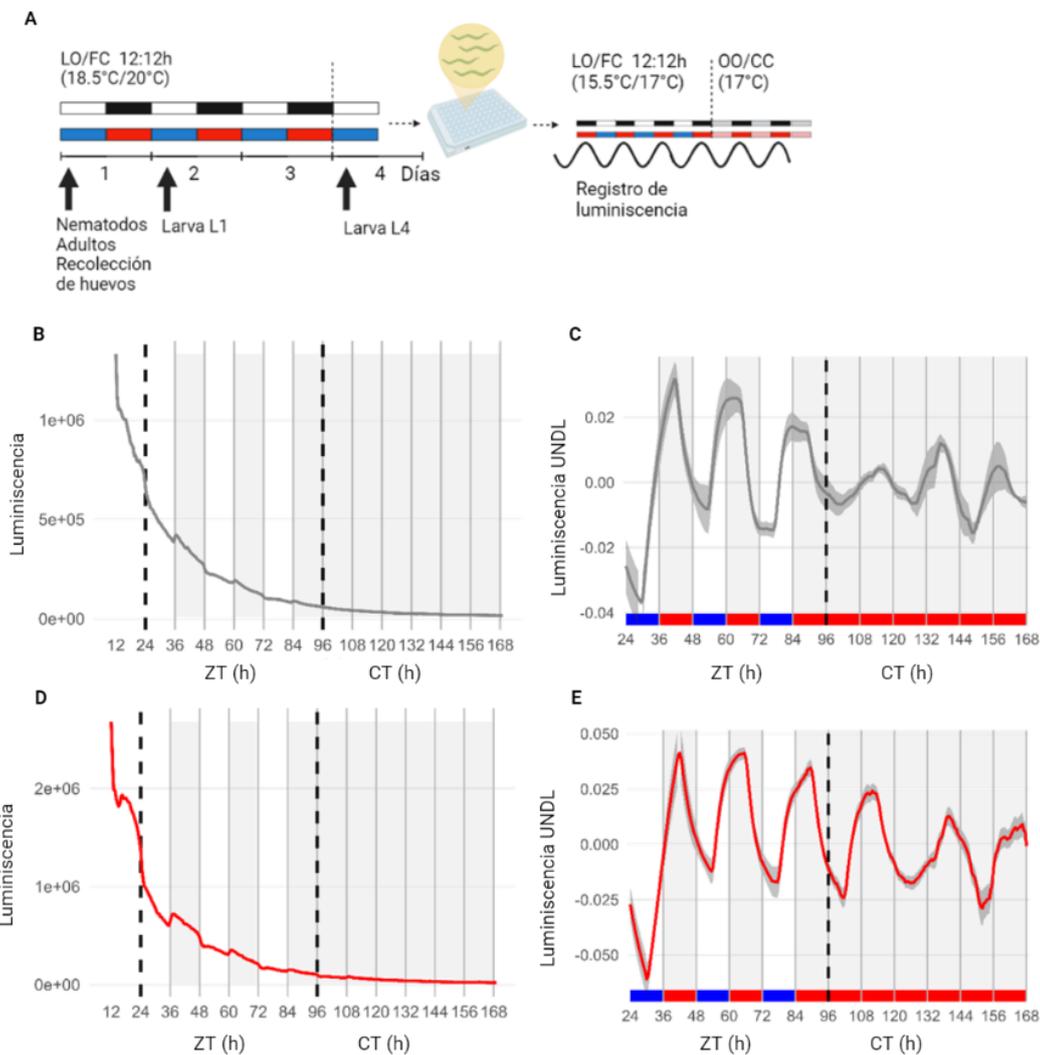
Las secuencias completas de los genes blanco fueron extraídas del *WormBase* y los *primers* fueron diseñados con el *CloneManager* y fueron revisados para la especificidad utilizando NCBI BLAST (Blastn). Para la puesta a punto de cada set de *primers* se utilizaron tres diluciones 1/10 de ADNc para cada gen y se determinó la concentración adecuada de *primers* (0.2  $\mu$ M, 0.4  $\mu$ M y 0.6  $\mu$ M) para la cual la eficiencia era mayor. Todos los oligos fueron sintetizados en Macrogen (Corea).

## Resultados

### Registro de luminiscencia de poblaciones de nematodos integrados por radiación UV

Para estudiar los ritmos circadianos del nematodo a través del sistema basado en luminiscencia, se integró el constructo *psur5::luc::gfp* al genoma de *C. elegans*, dicho constructo posee el marcador *cc::rfp*, (ver sección de materiales y métodos). Se observó que los nematodos que portaban el constructo *psur5::luc::gfp* integrado en el genoma no poseían ningún problema morfológico ni de desarrollo. En los registros de luminiscencia, mostraron una oscilación robusta con un período endógeno cercano a las 24h. Luego se compararon los registros de luminiscencia de la cepa integrada por radiación UV con los registros de una cepa registrada previamente en nuestro laboratorio la cual posee una integración espontánea del mismo constructo, además dicha cepa posee el marcador de fenotipo tipo *roller*, lo cual dificulta la movilidad de los nematodos [183].

En primer lugar, se llevaron a cabo registros de luminiscencia bajo condiciones cíclicas (LO/FC) y constantes (OO/CC), tanto de la línea integrada por radiación UV como de la cepa integrada espontáneamente. Se utilizó un esquema de 3 días bajo el ciclo LO/FC 12 h:12 h (~150  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ :15.5°C/0  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ :17°C) y 4 días en condiciones de *free-running* (OO/CC, 17°C) (Figura 3.8 a). En la Figura 3.8 se observa el gráfico de los datos crudos y los datos tratados para la cepa integrada por radiación UV (b y c) y para la cepa integrada espontáneamente (d y e).



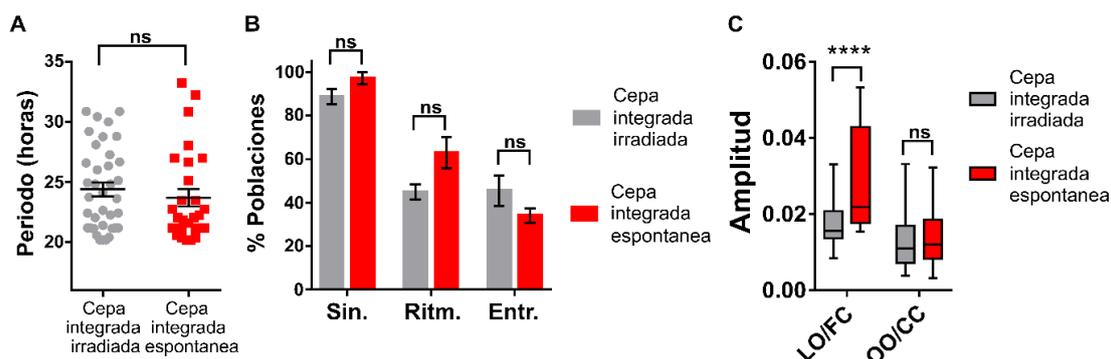
**Figura 3. 8. Datos de luminiscencia bajo condiciones cíclicas y constantes.** **a.** Esquema del protocolo del registro de luminiscencia bajo condiciones cíclicas. **b y d.** Datos crudos de luminiscencia para la cepa integrada por radiación UV y para la cepa integrada espontáneamente, respectivamente, bajo un ciclo dual de luz y temperatura (LO/FC 15.5°C/17°C) por 3 días y bajo condiciones contantes por 4 días más (OO/CC 17°C). **c y e.** Datos tratados con suavizado (*smooth* de 12h) y sin tendencia (*detrend* de 24h) para la cepa integrada por radiación UV y para la cepa integrada espontáneamente, respectivamente.

Al analizar los nematodos transgénicos con el constructo *psur-5::luc::gfp* integrado por radiación UV, se encontró que el porcentaje de sincronizados fue similar al mostrado por los nematodos transgénicos con el constructo *psur-5::luc::gfp* integrado espontáneamente ( $88.75 \pm 3.37\%$  versus  $97.22 \pm 2.77\%$  respectivamente). Además, no se encontraron diferencias significativas en la cantidad de “rítmicos” entre ambas cepas ( $44.97 \pm 3.44\%$  versus  $62.88 \pm 7.22\%$  para la cepa integrada espontáneamente). De igual manera, no se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de “entrenados” entre ambas cepas ( $45.54 \pm 7.05\%$  versus  $33.97 \pm 3.31\%$  para la cepa integrada espontáneamente) (Figura 3.9 a). Estos

resultados indicaran que la cepa integrada por radiación tiene la misma capacidad de ser entrenada por un ciclo dual de luz y temperatura, que la cepa integrada espontáneamente.

Al analizar los resultados del período endógeno entre las dos cepas estudiadas, no se observaron diferencias significativas entre las mismas. La cepa integrada por radiación mostró un período promedio de las oscilaciones para el gen *sur-5* de  $24.4 \pm 0.56$  h (versus  $23.7 \pm 0.72$  h para la cepa integrada espontáneamente), y no se halló diferencia significativa entre ambas medias para la población de nematodos rítmicos (Figura 3.9 b).

Adicionalmente se compararon los valores de la amplitud de las oscilaciones del gen *sur-5* analizando las unidades normalizadas de luminiscencia sin la tendencia (UNDL). La cepa integrada por radiación mostró un valor en condiciones cíclicas (LO/FC) de  $0.017 \pm 0.00090$  UNDL (versus  $0.028 \pm 0.0025$  UNDL para la cepa integrada espontáneamente) y se encontró una diferencia significativa entre ambas cepas. Sin embargo, la diferencia entre las amplitudes desaparece bajo condiciones constantes (OO/CC) ( $0.013 \pm 0.0013$  UNDL para la cepa integrada por radiación versus  $0.014 \pm 0.0014$  UNDL para la cepa integrada espontáneamente) (Figura 3.9 c).

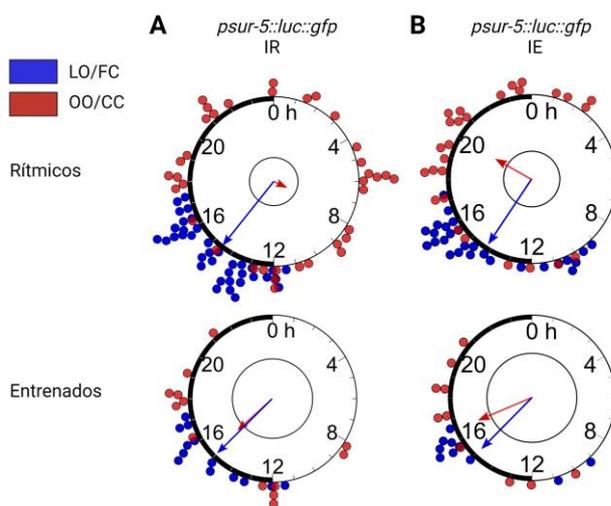


**Figura 3. 9. Ensayos de luminiscencia bajo condiciones cíclicas y constantes.** a. Porcentaje de nematodos sincronizados (porcentaje de nematodos que responden al ciclo LO /FC), rítmicos (porcentaje de nematodos que mantienen un ritmo bajo OO/CC) y entrenados (porcentaje de nematodos que mantienen la fase bajo condiciones constantes); no se encontraron diferencias entre la cepa integrada por irradiación (n=4) y la cepa integrada espontáneamente (n=3). *Test* de Fisher, ns. b. Período promedio de la población de nematodos rítmicos de la cepa integrada por radiación UV,  $24.4 \pm 0.56$  h (n=37) y la cepa integrada espontáneamente  $23.7 \pm 0.72$  h (n=27), no se encontraron diferencia entre los períodos, Mann-Whitney *test*, ns: no significativo. c. Promedio de la amplitud del ritmo de luminiscencia, cepa integrada por radiación UV ( $0.017 \pm 0.00090$  UNDL (LO/FC),  $0.013 \pm 0.0013$  UNDL (OO/CC) n=37) y cepa integrada espontáneamente ( $0.028 \pm 0.0025$  UNDL (LO/FC),  $0.014 \pm 0.0014$  UNDL (OO/CC) n=27), se encontró una diferencia significativa en la amplitud bajo condiciones cíclicas, contrariamente no se observó una diferencia bajo condiciones constantes, ANOVA de 2 vías, comparación múltiple, \*\*\*\*p <0,0001.

Por otro lado, se analizó la variación de las acrofases (punto máximo de luminiscencia) y su significancia en un gráfico de *Rayleigh* entre las cepas estudiadas, tanto bajo condiciones cíclicas (LO/FC) como constantes (OO/CC). Para el análisis de la significancia se tomó como un valor significativo un R mayor a 0.5.

Además, analizando la población de nematodos rítmicos, bajo condiciones cíclicas (LO/FC), de ambas cepas mostraron una fase con un pico de luminiscencia durante la noche (ZT14.55 ± 0.27 h en la cepa integrada por UV versus ZT14.23 ± 0.45 h para la cepa integrada espontáneamente) (Figura 3.10 a y b, puntos azules). Sin embargo, bajo condiciones constantes la cepa integrada por radiación UV (IR) mostró una acrofase diurna de CT 7.85 ± 0.85 h; R=0.07 (versus CT 19.89 ± 0.74h; R= 0.48) (Figura 3.10 a y b, puntos rojos).

La población de nematodos entrenados bajo condiciones cíclicas ambas cepas mostraron una fase con un pico de luminiscencia durante la noche (LO/FC ZT14.84 ± 0.42 h versus LO/FC ZT14.98 ± 0.71 h para la cepa integrada espontáneamente (IE)) (Figura 3.10 a y b, puntos azules). Bajo condiciones constantes, las poblaciones entrenadas de ambas cepas mostraron una fase con un pico de luminiscencia durante la noche subjetiva (CT14.39 ± 0.91 h versus 16.46 ± 0.96 h para la cepa integrada espontáneamente), en ambos casos se superó la significancia estadística (Figura 3.10 a y b, puntos rojos).



**Figura 3. 10. Acrofase de las cepas integradas bajo condiciones cíclicas y constantes.**

Gráficos de *Rayleigh* para la población de nematodos rítmicos, ambas cepas tienen una acrofase significativa y poseen una acrofase nocturna en condiciones cíclicas (LO/FC) en horario ZT (a y b, puntos azules), cepa integrada por radiación UV (IR) y cepa integrada espontáneamente (IE). Gráfico de *Rayleigh* de las acrofases en condiciones constantes (OO/CC) puntos rojos para la cepa integrada por radiación UV (a) y la cepa integrada espontáneamente (b). Gráfico de *Rayleigh* de las acrofases de la población de los nematodos entrenados bajo condición cíclica (a y b, puntos azules) y bajo condiciones constantes (a y b, puntos rojos), para

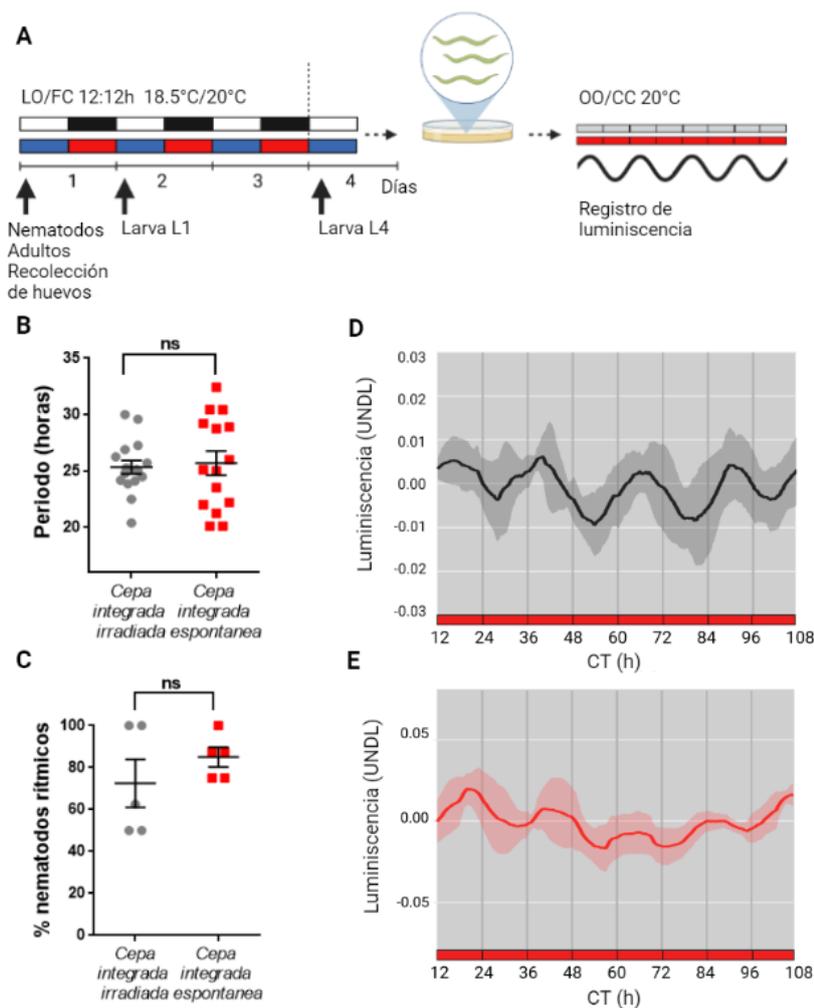
Cepa	Ciclo	R	h	SEM	n
Integrada por UV	LO/FC	0,90	14,55	0,27	37
	OO/CC	0,07	7,85	0,85	37
Integrada espontáneamente	LO/FC	0,81	14,23	0,45	27
	OO/CC	0,48	19,89	0,74	27

Cepa	Ciclo	R	h	SEM	n
Integrada por UV	LO/FC	0,90	14,84	0,42	16
	OO/CC	0,54	14,39	0,91	16
Integrada espontáneamente	LO/FC	0,82	14,98	0,71	10
	OO/CC	0,68	16,46	0,96	10

Se compararon las acrofases en cada condición usando el *test* de Watson-Wheeler para ver homogeneidad de muestras circulares. Al comparar las acrofases de los nematodos rítmicos bajo condiciones cíclicas no dio diferencias significativas ( $p=0.17$ ) entre ambas cepas. Por el contrario, en condiciones constantes no se puede comparar, ya que el *test* de *Rayleigh* no superó la significancia. Para la población de nematodos entrenados no hubo diferencias significativas entre las cepas estudiadas ni bajo condiciones cíclicas ( $p=0.32$ ) ni bajo condiciones constantes ( $p=0.71$ ).

Para corroborar los resultados y dado que en condiciones constantes los ritmos deberían continuar, ya que es una propiedad fundamental de los ritmos circadianos, se decidió llevar a cabo registros de

luminiscencia de la línea integrada por radiación UV bajo condiciones constantes (oscuridad y 20°C) (ver Materiales y Métodos) (Figura 3.11a). El período promedio de las oscilaciones bajo condiciones constantes fue de  $25.34 \pm 0.6$  h ( $n=16$ ) para la línea integrada por radiación UV, y  $25.7 \pm 1.06$  ( $n=15$ ) para la cepa integrada espontáneamente. Como se muestra en la Figura 3.11b, no se hallaron diferencias significativas en el período promedio entre ambas cepas. Por otro lado, tampoco se encontraron diferencias significativas en la cantidad de poblaciones rítmicas bajo condiciones constantes (72.5 versus 85%). Estos resultados sugieren que la construcción generada no se integró en una región del genoma que afecte el reloj circadiano de *C. elegans* (Figura 3.11 c). Los ritmos transcripcionales del gen *sur-5* de luminiscencia demostraron una oscilación bajo condiciones constante para ambas cepas estudiadas (Figura 3.11 d y e).



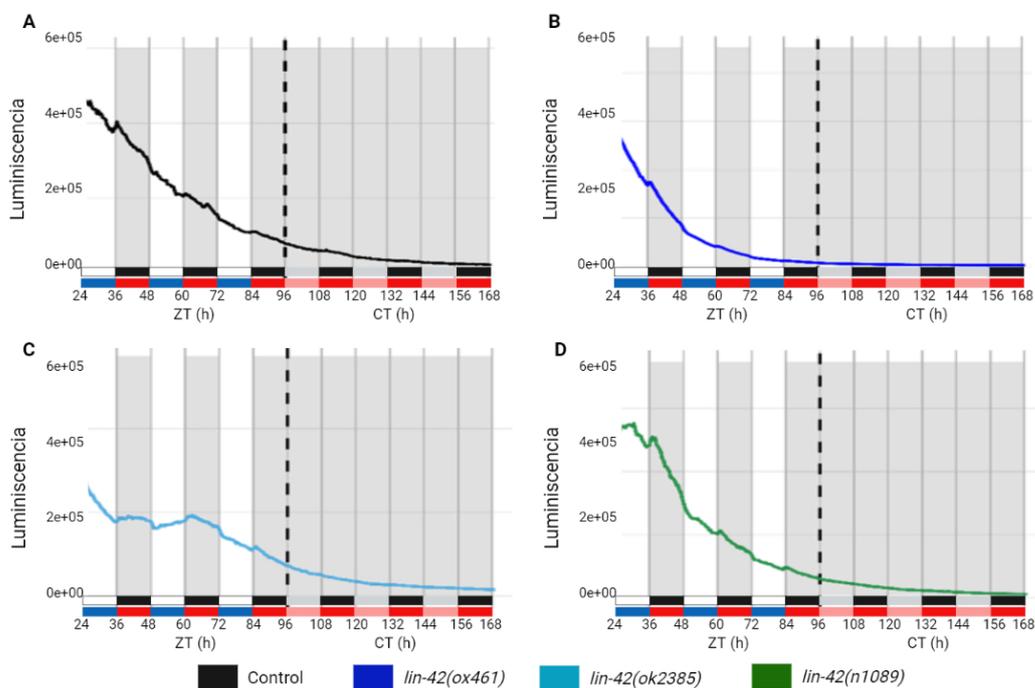
**Figura 3. 11. Ensayo de luminiscencia bajo condiciones constantes.** a. Esquema del protocolo del registro de luminiscencia bajo condiciones constantes. b. Período promedio de la cepa integrada por radiación UV ( $25,34 \pm 0,59$  h,  $n=16$ ) y la cepa integrada espontáneamente ( $25,7 \pm 1,06$  h,  $n=15$ ); no se hallaron diferencias significativas entre ambas cepas, *t test* no apareado. c. Porcentaje de nematodos rítmicos. Cepa integrada por radiación UV:  $72,5 \pm 11,46$  ( $n=5$ ); cepa integrada espontáneamente:  $85 \pm 4,67$  h ( $n=5$ ). No se encontraron diferencias significativas entre ambas cepas, *t test* no apareado. Registro de luminiscencia promedio  $\pm$  SEM de la cepa integrada por radiación UV (línea negra) (d) y la cepa integrada espontáneamente (línea roja) (e).

En conjunto, los resultados obtenidos mostraron que la integración por radiación UV del constructo *psur5::luc::gfp* en el genoma del *C. elegans* no afectó los ritmos de luminiscencia de *sur-5* en poblaciones de nematodos sincronizados a un ciclo dual de luz y temperatura. Por lo tanto, la cepa integrada por radiación UV se utilizará en este trabajo como cepa control de los experimentos al analizar los mutantes para las proteínas candidatas, como por ejemplo proteínas involucradas en el reloj molecular del nematodo.

### Registros de luminiscencia de nematodos mutantes para *lin-42* bajo condiciones de LO/FC y OO/CC

Para entender con mayor profundidad el rol de la proteína LIN-42 en el sistema circadiano de *C. elegans*, se generaron líneas transgénicas que contienen el reportero *psur5::luc::gfp* pero en marcos mutantes para el gen *lin-42*, *lin-42(n1089)*, *lin-42(ok2385)* y *lin-42(ox461)*. Los registros de luminiscencia bajo condiciones cíclicas y constantes se llevaron a cabo con poblaciones de aproximadamente 50 nematodos.

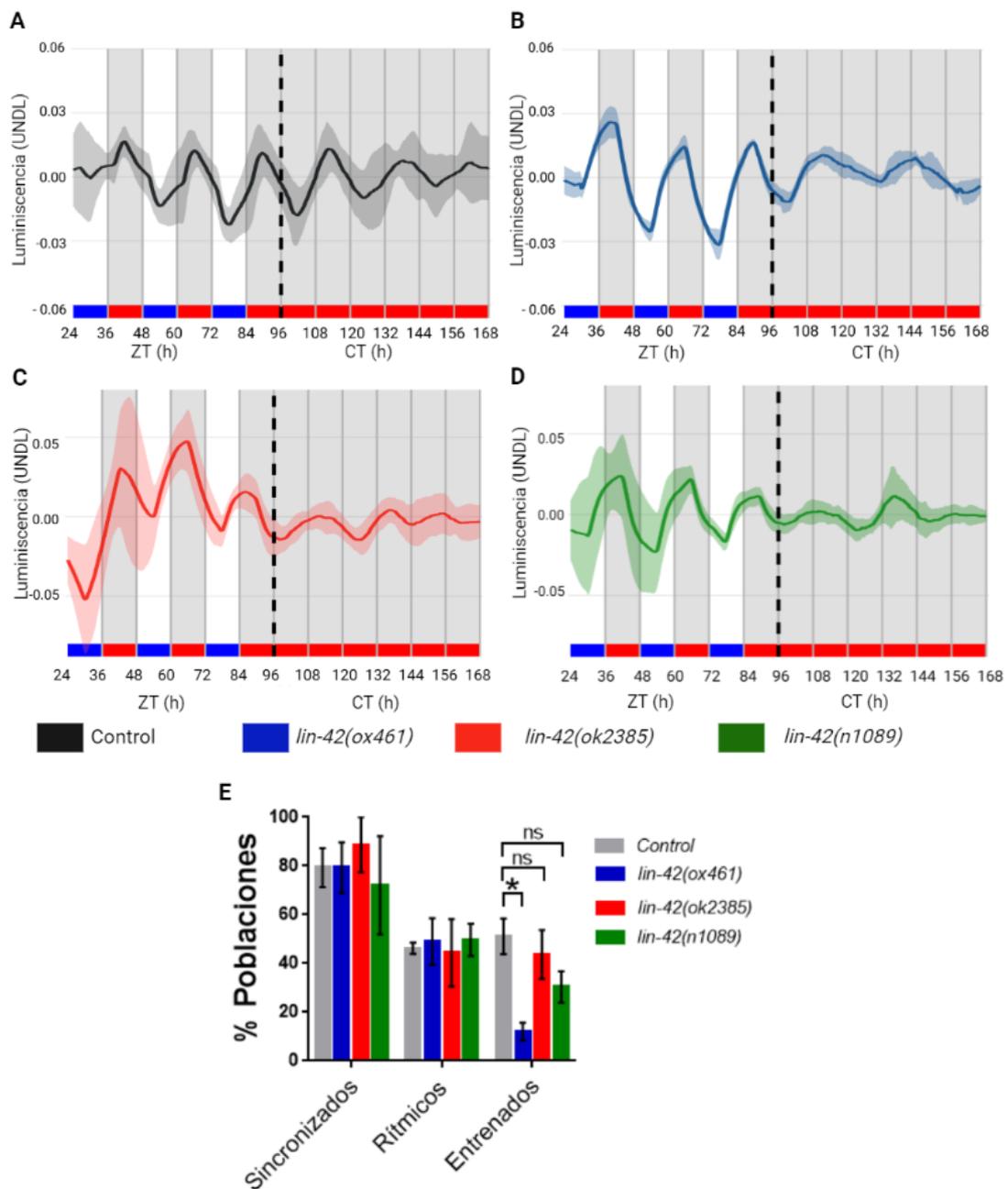
En los datos crudos de luminiscencia, se observa una caída de la luminiscencia a medida que van pasando los días, esto puede deberse al envejecimiento de los nematodos; también se puede observar un incremento de la luminiscencia en la fase nocturna bajo LO/FC (Figura 3.12). Posteriormente, los datos crudos fueron tratados como se detalla en la sección de materiales y métodos.



**Figura 3. 12. Datos crudos de luminiscencia bajo condiciones cíclicas y constantes.** Gráficos representativos de la luminiscencia bajo condiciones cíclicas (LO/FC) y bajo condiciones constantes (OO/CC), para la cepa control (a), para las cepas mutantes de LIN-42: *lin-42(ox461)* (b), *lin-42(ok2385)* (c) y *lin-42(n1089)* (d).

Se graficaron los datos procesados para la población de nematodos entrenados para las cepas mutantes de LIN-42 y para la cepa control (Figura 3.13 a-d). Se observó que tienen un ritmo robusto bajo condiciones cíclicas (LO/FC) con un aumento claro de la luminiscencia durante la fase de oscuridad y alta temperatura. La amplitud de la luminiscencia decae bajo condiciones constantes (OO/CC) y hay un cambio de período marcado en las cepas mutantes de LIN-42.

Por otro lado, al analizar los nematodos transgénicos con el reportero *psur5::luc::gfp* se encontró que el porcentaje de sincronizados para los mutantes *lin-42(ox461)*, *lin-42(ok2385)* y *lin-42(n1089)* fue similar al control, (80% para *lin-42(ox461)*, 87% para *lin-42(ok2385)* y 77% para *lin-42(n1089)* versus 79% del control). Tampoco se encontraron diferencias significativas en la cantidad de rítmicos bajo las mismas condiciones (49% para *lin-42(ox461)*, 45% para *lin-42(ok2385)* y 54% para *lin-42(n1089)* versus 46% para el control). Sin embargo, se halló una diferencia significativa en el porcentaje de nematodos entrenados para el mutante *lin-42(ox461)* (9% versus 51% del control); asimismo, no se encontraron diferencias para los mutantes *lin-42(n1089)* y *lin-42(ok2385)* en comparación con la cepa control (28% para *lin-42(n1089)* y 37% para *lin-42(ok2385)*) (Figura 3.13e). Esta diferencia encontrada nos estaría indicando que los nematodos *lin-42(ox461)* tienen un defecto en la capacidad de ser entrenados bajo un ciclo de dual de luz y temperatura. Por su parte, los nematodos *lin-42(n1089)* y *lin-42(ok2385)* aparentan tener una deficiencia de ser entrenados al ciclo LO/FC, ya que presentan una disminución en el porcentaje de nematodos entrenados pero esta diferencia no es significativa con respecto a la cepa control.

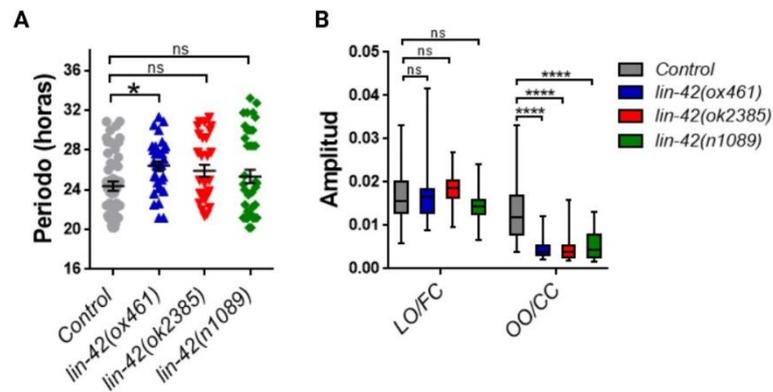


**Figura 3. 13.** Gráficos representativos de la oscilación de luminiscencia bajo condiciones cíclicas (LO/FC) y bajo condiciones constantes (OO/CC) para la cepa control (a), y las cepas mutantes, *lin-42(ox461)* (b), *lin-42(ok2385)* (c), *lin-42(n1089)* (d). e. Gráficos del porcentaje de nematodos sincronizados, nematodos rítmicos y nematodos entrenados, para la cepa control (n=6) y las cepas mutantes de la proteína LIN-42 (n=3 para cada cepa). Se observó una diferencia significativa en la población de nematodos entrenados para la cepa *lin-42(ox461)*, test de Fisher, \*p=0,038.

Al estudiar los ritmos de luminiscencia de las poblaciones rítmicas (o sea, que mantienen ritmos circadianos bajo condiciones constantes), *lin-42(ox461)* mostró un período promedio endógeno significativamente más largo con respecto a los animales control ( $26.41 \pm 0.47$  h, n=32 versus  $24.36 \pm 0.46$  h, n=51 del control). En contraste, *lin-42(n1089)* ( $25.34 \pm 0.67$  h, n=40) y *lin-42(ok2385)* ( $25.91 \pm 0.60$  h,

n=30) no mostraron diferencias significativas en el período promedio con respecto al control (Figura 3.14a). Los resultados obtenidos nos indican que *lin-42(ox461)* afecta más fuertemente los ritmos circadianos de luminiscencia en comparación con *lin-42(n1089)* y *lin-42(ok2385)*.

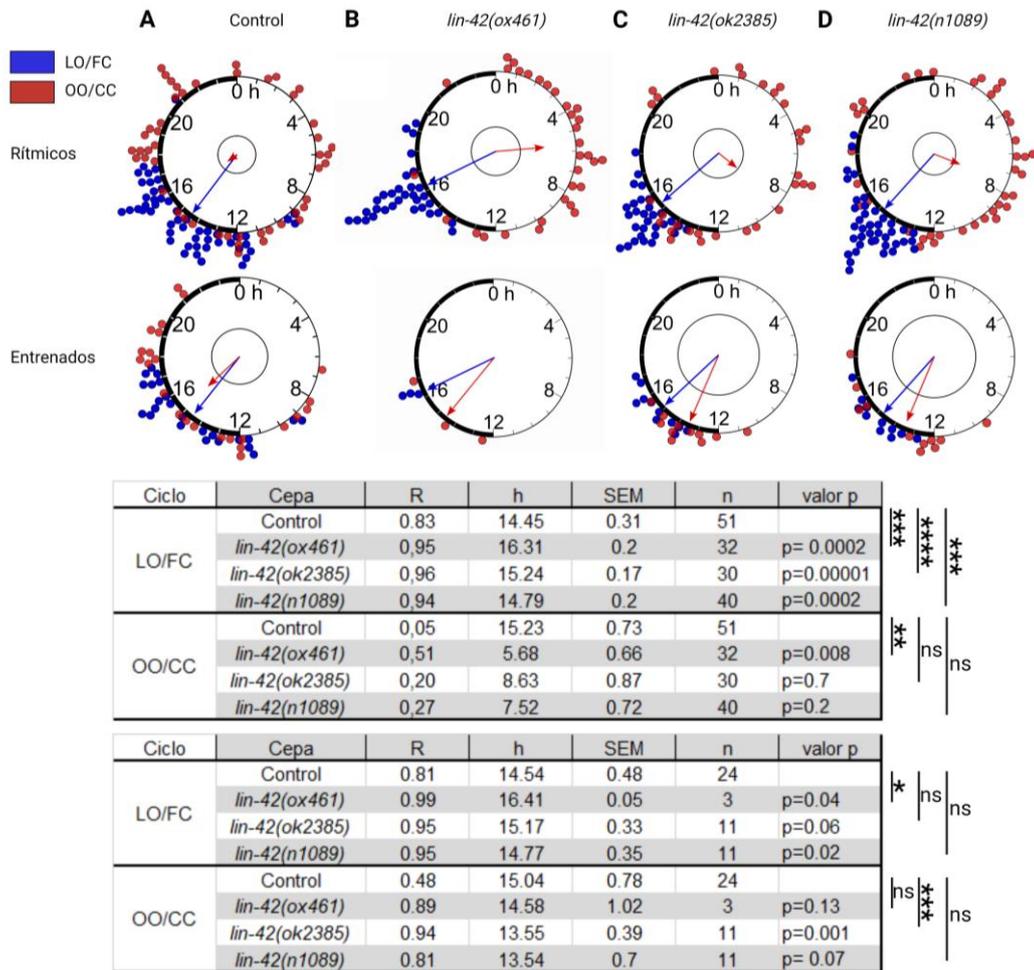
Al analizar la amplitud de la oscilación de luminiscencia, no se encontraron diferencias significativas bajo condiciones cíclicas (LO/FC) (control:  $0.016 \pm 0.0009$  UNDL, n=51; *lin-42(ox461)*:  $0.017 \pm 0.001$  UNDL, n=32; *lin-42(ok2385)*:  $0.018 \pm 0.0007$  UNDL, n=30; *lin-42(n1089)*:  $0.015 \pm 0.0005$  UNDL, n=40) (Figura 3.14 b). Bajo condiciones constante (OO/CC) la amplitud de la oscilación de luminiscencia para la cepa control fue mayor que para las cepas mutantes de LIN-42 (control:  $0.013 \pm 0.0010$  UNDL, n=51; *lin-42(ox461)*:  $0.004 \pm 0.00003$  UNDL, n=32; *lin-42(ok2385)*:  $0.005 \pm 0.0007$  UNDL, n=30; *lin-42(n1089)*:  $0.005 \pm 0.0005$  UNDL, n=40) (Figura 3.14 b). La amplitud de los ritmos de luminiscencia disminuye al pasar de las condiciones cíclicas (LO/FC) a las condiciones constantes (OO/CC) en todas las cepas estudiadas.



**Figura 3. 14. Análisis del periodo endógeno y la amplitud para las cepas mutantes de LIN-42.** a. Periodo endógeno promedio en la población de nematodos rítmicos para la cepa control, *lin-42(ox461)*, *lin-42(ok2385)* y *lin-42(n1089)*, Kruskal-Wallis test no paramétrico, \* $p=0,0140$ . b. Amplitud bajo condiciones cíclicas (LO/FC) y bajo condiciones constantes (OO/CC) para la población de nematodos rítmicos, ANOVA de 2 vías, \*\*\*\* $p<0,0001$ .

Finalmente, se analizaron las acrofases de los registros de luminiscencia bajo condiciones cíclicas (LO/FC) y constantes (OO/CC). Se encontró que todas las cepas mutantes para la proteína LIN-42 tienen un retraso de fase significativo respecto al control (*lin-42(ox461)*  $p=0.0002$ , *lin-42(ok2385)*  $p=0.00001$ , *lin-42(n1089)*  $p=0.0002$ , test Watson-Wheeler, que evalúa homogeneidad entre medidas circulares). Por el contrario, bajo condiciones constantes no se pueden comparar las acrofases por no tener la cepa control un *Rayleigh* significativo ( $R>0,5$ ), (Figura 3.15). Para las poblaciones de nematodos entrenadas al ciclo LO/FC, la cepa *lin-42(ox461)* mostró un corrimiento de fase significativo ( $p=0.04$ ), exhibiendo un retraso en la acrofase. Sin embargo, las cepas *lin-42(ok2385)* y *lin-42(n1089)* no mostraron un cambio de fase significativo ( $p=0.06$  y  $p=0.02$ , respectivamente). En las condiciones de OO/CC, solo la cepa *lin-42(ok2385)* tuvo un adelanto significativo de fase ( $p=0.001$ ), las cepas *lin-42(ox461)* y *lin-42(ok2385)* no mostraron una variación significativa con respecto a la cepa control ( $p=0.13$  y  $p=0.07$ , respectivamente) (Figura 3.15). Estos resultados indicarían que la mutación en los alelos *ox461*, *ok2385*, *n1089* generan un adelanto de

fase bajo condiciones cíclicas, mientras que bajo condiciones constantes existe una dispersión amplia de las acrofases tanto para la cepa control como para las cepas mutantes.

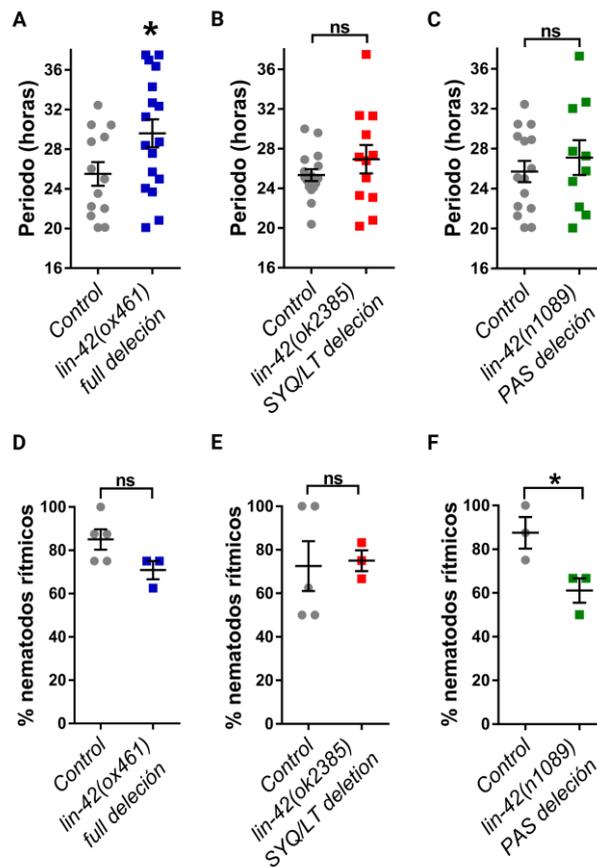


**Figura 3. 15. Acrofase de la población de nematodos mutantes.** Gráficos de Rayleigh para las acrofases de la población de nematodos rítmicos y entrenados bajo condiciones cíclicas (LO/FC) (puntos azules) y bajo condiciones constantes (OO/CC) (puntos rojos) para las cepas control (a), *lin-42(ox461)* (b), *lin-42(ok2385)* (c) y *lin-42(n1089)* (d). Comparación cepas mutantes vs control en cada condición (LO/FC y OO/CC) utilizando Watson-Wheeler test, \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001; \*\*\*\*p<0,0001.

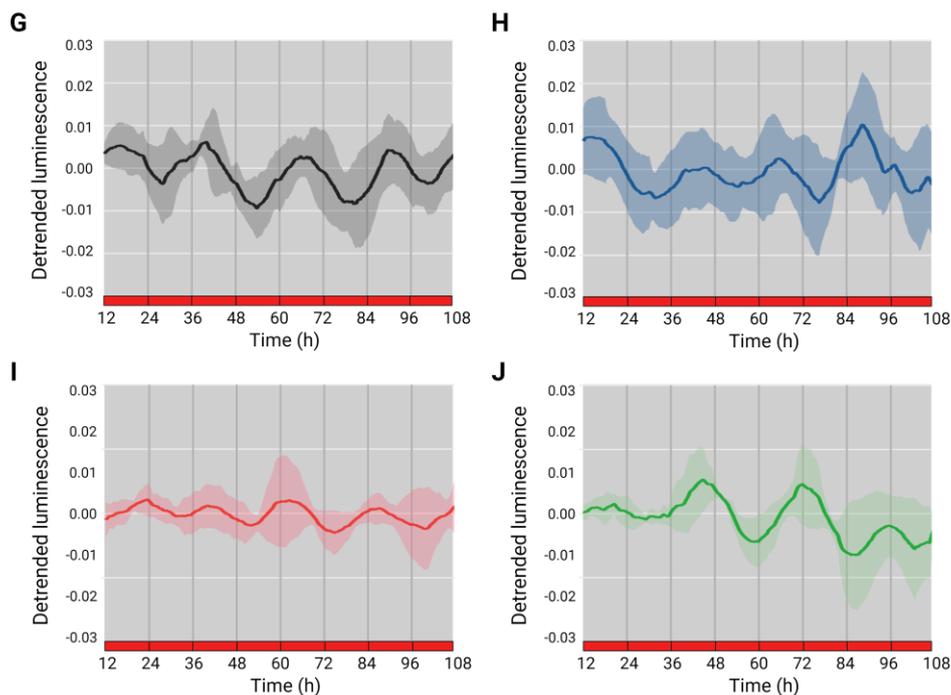
### Registros de luminiscencia de nematodos mutantes para *lin-42* bajo condiciones constantes (FR)

Para corroborar los resultados obtenidos bajo condiciones cíclicas (LO/FC) seguidas de condiciones constantes (OO/CC), se registraron las mismas cepas mutantes solo bajo condiciones constantes (OO/CC, 20°C). Los resultados obtenidos mostraron que el mutante *lin-42(ox461)* tiene un período significativamente más largo en comparación con la cepa control ( $29.59 \pm 1.41$  h, n=17 versus  $25.51 \pm 1.2$  h, n=13 del control) (Figura 3.16a). Sin embargo, los mutantes *lin-42(ok2385)* y *lin-42(n1089)* no mostraron diferencias significativas en el período promedio con la cepa control (Figura 3.16 b y c). Por el contrario, al analizar el

porcentaje de rítmicos se observó que los mutantes *lin-42(ox461)* y *lin-42(ok2385)* no mostraron diferencias significativas con respecto a la cepa control (Figura 3.16 d y e), pero sí se encontraron diferencias significativas en el mutante *lin-42(n1089)* ( $61.11 \pm 5.57\%$ ,  $n=3$  versus  $87.5 \pm 7.27\%$ ,  $n=3$  del control) (Figura 3.16 f). En la Figura 3.16 se muestran los resultados obtenidos de los registros de luminiscencia bajo condiciones constantes para todas las cepas estudiadas. Se observa que todas las cepas mantienen un ritmo de luminiscencia robusto bajo condiciones constantes, con un aumento de la expresión de *sur-5* durante la fase nocturna para todas las cepas estudiadas.



**Figura 3. 16. Ensayos de los mutantes LIN-42 bajo condiciones constantes.** a, b y c. Gráficos del promedio del periodo en horas de las cepas mutantes para la proteína LIN-42 con el arreglo extracromosomal *psur5::luc::gfp*: a. mutante *lin-42(ox461)* full deleción, periodo de  $29,59 \pm 1,41$  ( $n=17$ ), el cual fue significativamente más largo que el periodo de la cepa control:  $25,51 \pm 1,2$  ( $n=13$ ), *t test* no apareado,  $*p=0,0432$ . b. mutante *lin-42(ok2385)* deleción del dominio SYQ/LT,  $26,94 \pm 1,43$  ( $n=12$ ), no dio diferencias significativas en comparación con la cepa control  $25,34 \pm 0,59$  ( $n=16$ ), *t test* no apareado. c. mutante *lin-42(n1089)* deleción del dominio PAS, periodo de  $27,1 \pm 1,741$  ( $n=10$ ), no dio diferencias significativas comparándolo con la cepa control  $25,7 \pm 1,06$  ( $n=15$ ), *t test* no apareado. d, e, f.



**Figura 3. 16. Ensayos de los mutantes LIN-42 bajo condiciones constantes.** Gráficos del porcentaje de nematodos rítmicos: **d.** mutante *lin-42(ox461)* full deleción,  $70,83 \pm 4,16$  ( $n=3$ ,  $n$  experimental), cepa control  $85 \pm 4,67$  ( $n=5$ ), diferencia no significativa, *t test* no apareado. **e.** mutante *lin-42(ok2385)* deleción del dominio SYQ/LT,  $75 \pm 4,81$  ( $n=3$ ), cepa control  $72,5 \pm 11,46$  ( $n=5$ ), diferencia no significativa, *t test* no apareado. **f.** mutante *lin-42(n1089)* deleción del dominio PAS,  $61,11 \pm 5,557$  ( $n=3$ ), cepa control  $87,5 \pm 7,21$  ( $n=3$ ), *t test* no apareado,  $*p=0,0443$ . Gráfico de la luminiscencia promedio  $\pm$  SEM de los nematodos rítmicos para la cepa control (**g**) y para los mutantes de LIN-42: *lin-42(ox461)* (**h**), *lin-42(ok2385)* (**i**), *lin-42(n1089)* (**j**), bajo condiciones constantes.

A continuación, las tablas 3.1 y 3.2 muestran un resumen de los resultados obtenidos para cada variable estudiada (porcentaje de poblaciones sincronizadas, rítmicas y entrenadas, período endógeno (*tau*) y amplitud). Cada uno de los experimentos tiene su control con la cepa VQ1310 (*qvl8 [psur5::luc::gfp]*). Los datos de las acrofases se encuentran en la tabla de la Figura 3.15.

Cepa	Genotipo	LO/FC (15°C, 17°C) y OO/CC (17°C)			Tau (h)	LO/FC	OO/CC
		% Sincronizados	% Rítmicos	% Entrenados			
VQ1310	qvis8 (psur5::luc::gfp)	88,75 ± 3,37 (n=4)	44,97 ± 3,44	45,54 ± 7,05	24,40 ± 0,56 (37)	0,017 ± 0,00090 (n=37)	0,013 ± 0,00013 (n=37)
VQ1296	qvEx294 (psur5::luc::gfp)	97,22 ± 2,77 (n=3)	62,88 ± 7,22	33,97 ± 3,31	23,70 ± 0,72 (27)	0,028 ± 0,0025 (n=27)	0,014 ± 0,00014 (n=27)
VQ1310	qvis8 (psur5::luc::gfp)	79,31 ± 7,98 (n=6)	46,21 ± 2,34 (n=6)	51,10 ± 7,30 (n=6)	24,36 ± 0,46 (n=51)	0,016 ± 0,0009 (n=51)	0,013 ± 0,0001 (n=51)
VQ1354	lin-42(ox461), qvis8	79,33 ± 10,40 (n=3)	49,00 ± 9,54 (n=3)	12,00 ± 3,61 (n=3)	26,41 ± 0,47 (32)	0,016 ± 0,001 (n=32)	0,004 ± 0,00003 (n=32)
VQ1353	lin-42(ok2385), qvis8	88,67 ± 11,33 (n=3)	44,33 ± 13,78 (n=3)	43,67 ± 10,04 (n=3)	25,91 ± 0,60 (n=30)	0,018 ± 0,001 (n=30)	0,005 ± 0,00006 (n=30)
VQ1326	lin-42(n1089), qvis8	72,00 ± 20,11 (n=3)	49,67 ± 6,64 (n=3)	30,33 ± 6,49 (n=3)	25,34 ± 0,67 (n=40)	0,014 ± 0,0005 (n=40)	0,005 ± 0,00004 (n=40)

**Tabla 3. 1. Datos obtenidos bajo condiciones cíclicas (LO/FC) y bajo condiciones constantes (FR).** Se muestra los datos obtenidos para el porcentaje de nematodos Sincronizados, Rítmicos y Entrenados; el periodo endógeno (*tau*), el n total y la amplitud de la luminiscencia.

Cepa	Genotipo	Tau (h)	n (Total)	% Rítmicos
VQ1310	qvis8 (psur5::luc::gfp)	25,34 ± 0,6	16	72,5 ± 11,46 (n=5)
VQ1296	qvEx294 (psur5::luc::gfp)	25,7 ± 1,06	15	85 ± 4,67 h (n=5)
VQ1310	qvis8 (psur5::luc::gfp)	25,51 ± 1,2	13	85 ± 4,67 (n=5)
VQ1354	lin-42 (ox461), qvis8	29,59 ± 1,41	17	70,83 ± 4,16 (n=3)
VQ1310	qvis8 (psur5::luc::gfp)	25,34 ± 0,6	16	72,5 ± 11,46 (n=5)
VQ1353	lin-42 (ok2385), qvis8	26,94 ± 1,43	12	75 ± 4,81 (n=3)
VQ1310	qvis8 (psur5::luc::gfp)	25,7 ± 1,06	15	87,5 ± 7,21 (n=3)
VQ1326	lin-42 (n1089), qvis8	27,1 ± 1,741	10	61,11 ± 5,55 (n=3)

**Tabla 3. 2. Datos obtenidos bajo condiciones constantes (FR).** Se muestra los datos obtenidos para el periodo endógeno (*tau*), el n total y el porcentaje de nematodos Rítmicos.

## Rescate de LIN-42

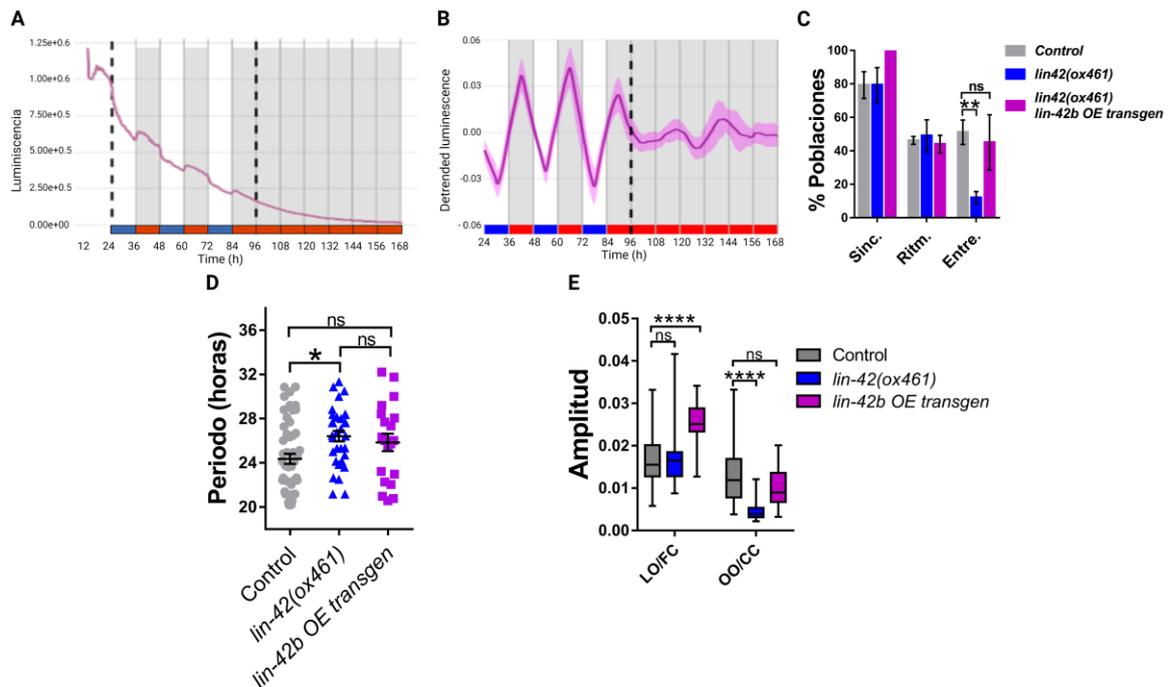
Los resultados mostrados anteriormente sugieren que LIN-42 estaría involucrada en mantener la funcionalidad del reloj circadiano de *C. elegans*. Para confirmar esos resultados, realizamos un experimento de rescate del fenotipo mutante *lin-42* para la línea que mostró un fenotipo más claro (*lin-42(ox461)*), línea rescatada VQ1484 (*lin-42(ox461)* II #5OC; *qvl8*; *qVEx400 (plin-42b/c::isoforma b::gfp::unc-54; pBB107)*).

Se llevaron a cabo registros de luminiscencia de la línea VQ1484 bajo un ciclo dual de luz:oscuridad y temperatura (LO/FC 12:12 h 15,5/17°C) (ver sección Materiales y Métodos). Se graficaron los datos crudos del registro de luminiscencia *in vivo* para la cepa *lin-42(ox461)* rescatada (cepa VQ1484) (Figura 3.17 A), observándose un decaimiento de la señal de luminiscencia a lo largo de los días. Además, se puede observar un aumento de la señal durante la fase nocturna. Posteriormente, se graficaron los datos crudos de la señal sin la tendencia (*detrended*) (Figura 3.19 B), y se encontró un ritmo robusto de luminiscencia bajo condiciones cíclicas (LO/FC) y bajo condiciones constantes (OO/CC), con una marcada fase nocturna en ambas condiciones.

Al analizar la población de nematodos sincronizados, rítmicos y entrenados, se encontró que el porcentaje de poblaciones sincronizadas fue de  $79.30 \pm 7.98\%$  (n=6) para la cepa control,  $79.33 \pm 10.39\%$  (n=3) para *lin-42(ox461)* y  $100 \pm 0.0\%$  (n=3) para la cepa rescatada. No se encontraron diferencias significativas entre los porcentajes de nematodos sincronizados, esto indicaría que las cepas estudiadas tienen un ritmo bajo condiciones cíclicas (LO/FC) y pueden sincronizarse a los estímulos externos de luz y temperatura. Al analizar el porcentaje de poblaciones rítmicas, los resultados mostraron valores de  $46.20 \pm 2.34\%$  (n=6) para la cepa control,  $49.0 \pm 9.53\%$  (n=3) para la cepa *lin-42(ox461)* y  $44 \pm 5.30\%$  (n=3) para la línea rescatada. El porcentaje de poblaciones rítmicas no arrojó diferencias significativas entre las cepas, o sea no se observaron diferencias significativas en la cantidad de nematodos que mantienen el ritmo de luminiscencia bajo condiciones constantes (OO/CC). Para el porcentaje de nematodos entrenados se encontró una diferencia significativa entre la cepa control ( $51.09 \pm 7.30\%$  (n=6)) versus *lin-42(ox461)* ( $12.0 \pm 3.60\%$  (n=3)). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre el control y la cepa rescatada ( $45.0 \pm 16.58\%$  (n=3)) (Figura 3.17 c). Esto indicaría que los ritmos de luminiscencia de los nematodos que sobre-expresan la proteína LIN-42 son entrenados por el ciclo dual de luz/oscuridad y temperatura, al igual que la cepa control.

Al analizar los períodos endógenos se encontró que *lin-42(ox461)* rescatada (*lin-42b* transgén, VQ1484) tiene un período endógeno similar al control ( $25.85 \pm 0.79$  h *lin-42b* transgén versus  $24.36 \pm 0.46$  h control) (Figura 3.19 d). Previamente se había demostrado que la cepa *lin-42(ox461)* mostraba un período endógeno significativamente más largo ( $26.41 \pm 0.47$  h). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre *lin-42(ox461)* versus *lin-42b* transgén, esto indicaría que no se trata de un rescate total sino de un rescate parcial.

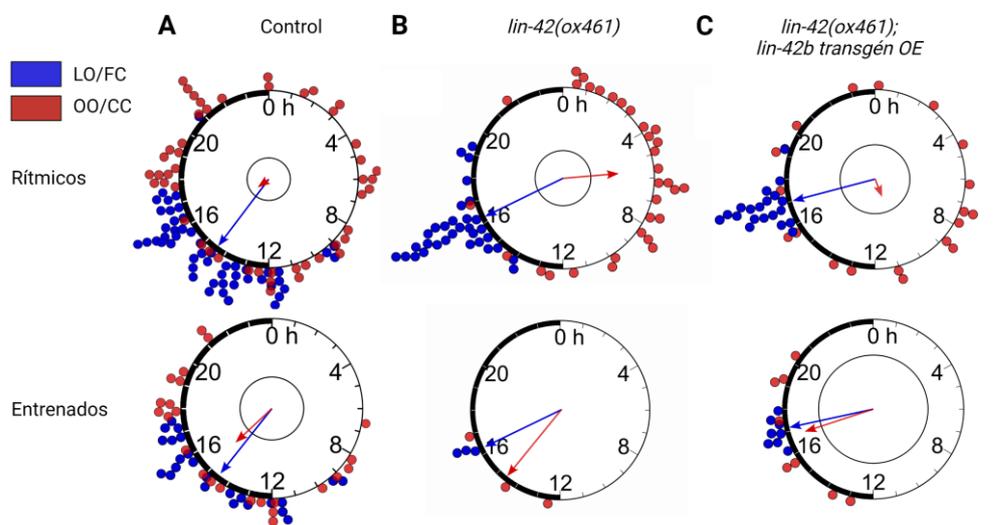
Al analizar la amplitud de los ritmos de luminiscencia del gen *sur-5* de las poblaciones rítmicas, se observó que la cepa *lin-42(ox461)* rescatada mostró una mayor amplitud bajo condiciones cíclicas (LO/FC) (control:  $0.016 \pm 0.0009$  UNDL,  $n=51$ ; *lin-42(ox461)*:  $0.017 \pm 0.001$  UNDL,  $n=32$ ; *lin-42(ox461)* rescatada:  $0.025 \pm 0.001$  UNDL,  $n=20$ ). Por el contrario, bajo condiciones constantes (OO/CC), la cepa *lin-42(ox461)* mostró una disminución marcada en la amplitud del ritmo de luminiscencia de *sur-5* (control:  $0.013 \pm 0.001$  UNDL,  $n=51$ ; *lin-42(ox461)*:  $0.004 \pm 0.0003$  UNDL,  $n=32$ ; *lin-42(ox461)* rescatada:  $0.010 \pm 0.001$  UNDL,  $n=20$ ) (Figura 3.19 e).



**Figura 3. 17. Ritmos transcripcionales del gen *sur-5* en la cepa *lin-42(ox461)*; *lin-42b* transgén.** a. Gráfico representativo de los datos crudos de luminiscencia de la cepa *lin-42(ox461)* rescatada en LO/FC y OO/CC. b. Gráfico representativo de los ritmos transcripcionales de *sur-5* medidos por la luminiscencia sin la tendencia (*detrend*) en LO/FC y OO/CC para *lin-42(ox461)* rescatada, *lin-42(ox461)*; *lin-42b* transgén OE (*over-expression*). c. Porcentaje de nematodos sincronizados, rítmicos y entrenados, para la cepa control, *lin-42(ox461)* y *lin-42(ox461)* rescatada. Se observó una diferencia significativa en la población de nematodos entrenados para la cepa *lin-42(ox461)*, ANOVA de dos vías, Dunnett's multiple comparisons test, \*\* $p=0,0052$ . d. Promedio del periodo endógeno para la población de nematodos rítmicos para la cepa control, *lin-42(ox461)* y *lin-42(ox461)* rescatada. ANOVA de una vía, Tukey's multiple comparisons test, \* $p=0,0135$ . e. Amplitud promedio para la población de nematodos rítmicos en LO/FC y OO/CC, para las cepas control, *lin-42(ox461)* y *lin-42(ox461)* rescatada, ANOVA de dos vías, Dunnett's multiple comparisons test, \*\*\*\* $p=0,0001$ .

Por último, se compararon las acrofases entre las poblaciones rítmicas de las cepas estudiadas. En la población de nematodos rítmicos se encontró, bajo condiciones LO/FC, se encontró que las cepas *lin-42b* transgén (ZT  $17.03 \pm 0.15h$ ) y *lin-42(ox461)* (ZT  $16.31 \pm 0.2h$ ) muestran un retraso de fase versus la cepa control (ZT  $14.45 \pm 0.31h$ ) (Figura 3. 18 A). Para las poblaciones entrenadas, también se observó un

retraso de fase en comparación con la cepa control (*lin-42(ox461)* rescatada, ZT 17.09 ± 0.17 h; *lin-42(ox461)*, ZT 16.41 ± 0.05 h; control, ZT 14.54 ± 0.48h) (Figura 3. 18b). Bajo condiciones constantes OO/CC, las acrofases independientes tienen una dispersión muy grande, generando que los *tests* de *Rayleigh* no den significativos (R<0.5), por lo tanto, bajo estas condiciones no se puede realizar una comparación entre las cepas estudiadas (Figura 3. 18 A). Para la población de nematodos entrenados no se encontraron diferencias significativas entre las acrofases de las cepas *lin-42(ox461)* y *lin-42(ox461)* rescatada versus la cepa control (Figura 3. 18 B).



Ciclo	Cepa	R	h	SEM	n	valor p
LO/FC	Control	0,83	14,45	0,31	51	
	<i>lin-42(ox461)</i>	0,95	16,31	0,2	32	p=0,0002
	<i>lin-42(ox461); lin-42b transgén OE</i>	0,98	17,03	0,15	20	p=0,000006
OO/CC	Control	0,05	15,23	0,73	51	
	<i>lin-42(ox461)</i>	0,51	5,68	0,66	32	p=0,008
	<i>lin-42(ox461); lin-42b transgén OE</i>	0,17	10,75	1,09	20	p=0,6

Tabla 1

Ciclo	Cepa	R	h	SEM	n	valor p
LO/FC	Control	0,81	14,54	0,48	24	
	<i>lin-42(ox461)</i>	0,99	16,41	0,05	3	p=0,04
	<i>lin-42(ox461); lin-42b transgén OE</i>	0,99	17,09	0,17	8	p=0,02
OO/CC	Control	0,48	15,04	0,78	24	
	<i>lin-42(ox461)</i>	0,89	14,58	1,02	3	p=0,13
	<i>lin-42(ox461); lin-42b transgén OE</i>	0,79	16,81	0,86	8	p=0,33

Tabla 2

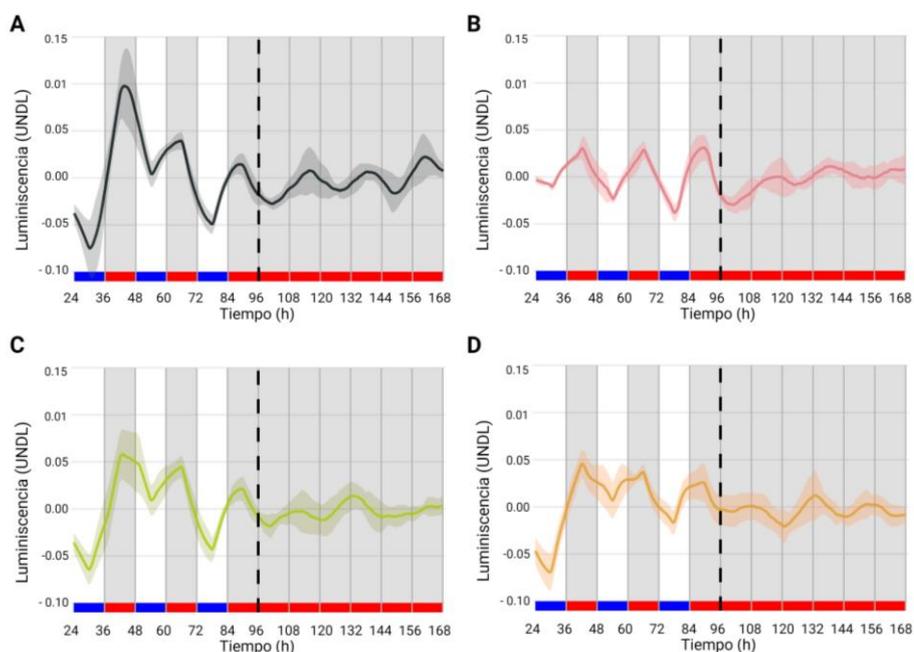
**Figura 3. 18. Acrofase de la población de nematodos rescatados.** Gráficos de *Rayleigh* para las acrofases de la población de nematodos rítmicos y entrenados bajo condiciones cíclicas (LO/FC, puntos azules) y bajo condiciones constantes (OO/CC, puntos rojos), control (A), *lin-42(ox461)* (B), *lin-42(ox461); lin-42b transgén OE* (C). Watson-Wheeler test, \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001; \*\*\*\*p<0,0001. Tabla 1-2. Acrofases para la población de nematodos rítmicos y entrenados, respectivamente.

En resumen, la sobre-expresión de la isoforma b de *lin-42* en el mutante *lin-42(ox461)* (cepa VQ1484) rescató la mutación de la secuencia que contiene los dominios PAS y CKBD (SYQ/LT).

## Sobre-expresión del gen *lin-42*

Como la pérdida de LIN-42 genera un alargamiento del período endógeno y una disminución en el porcentaje de poblaciones entrenadas, al menos bajo las condiciones de luz/oscuridad y temperatura ensayadas en este trabajo, decidimos estudiar el efecto de la sobre-expresión de las proteínas LIN-42b, LIN-42c y LIN-42a sobre los ritmos de luminiscencia de *sur-5*, utilizando las cepas: DG3 [*qvEx400 (plin-42b/c::lin-42b::gfp::unc-54, pBB107)*; *qvls8 (psur-5::luc::gfp; punc-122::RFP)*], DG6 [*qvEx387 (plin-42a::lin42a::gfp::unc54, pBB107)*; *qvls8 (psur-5::luc::gfp; punc-122::RFP)*] y DG8 [*qvEx385 (plin-42b/c::lin42c::gfp::unc54, pBB107)*; *qvls8 (psur-5::luc::gfp; punc-122::RFP)*]. Se realizaron registros de luminiscencia de las cepas DG3, DG6 y DG8, durante 3 días bajo condiciones cíclicas (LO/FC 12h:12h) y 4 días más bajo condiciones constantes (OO/CC), como ya se ha descrito anteriormente (ver “Materiales y Métodos”).

Los resultados obtenidos muestran que todas las cepas estudiadas tienen un ritmo robusto de luminiscencia del gen *sur-5*. Al igual que la cepa control, tienen un aumento de la luminiscencia durante la fase nocturna en condiciones cíclicas (LO/FC) (Figura 3.19 a, b, c, d).

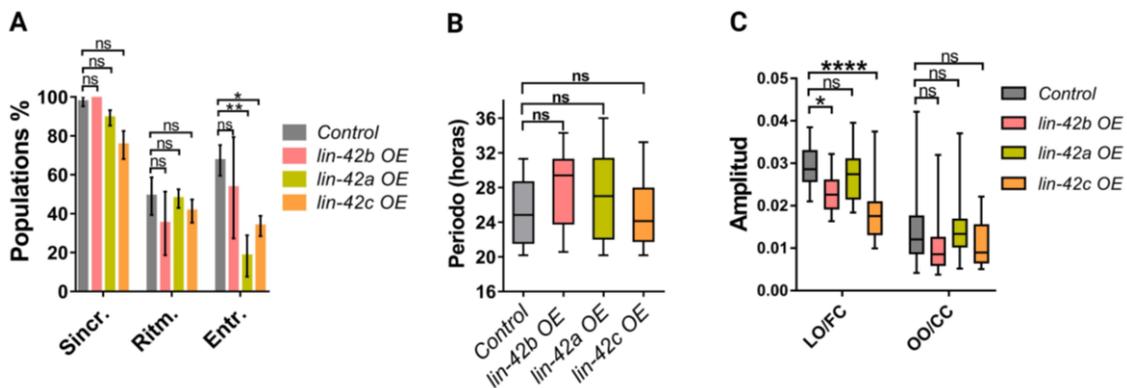


**Figura 3. 19. Ritmo transcripcional de *sur-5* en las cepas que sobre-expresan *lin-42*.** Gráfico representativo de los ritmos transcripcionales de *sur-5* medidos por la luminiscencia sin la tendencia (*detrend*) en LO/FC y OO/CC para la cepa control (A), y las cepas que sobre-expresan las isoformas de *lin-42*: *lin-42b* (B), *lin-42a* (C) y *lin-42c* (D).

Las cepas estudiadas no presentan una alteración en la capacidad de ser sincronizadas por un ciclo dual de luz/oscuridad y temperatura, ya que no se encontraron diferencias significativas entre el porcentaje de poblaciones sincronizadas en comparación con la cepa control (*lin-42b*:  $100 \pm 0.0\%$ ,  $n=3$ ; *lin-42a*:  $89.25 \pm 3.94\%$ ,  $n=4$ ; *lin-42c*:  $75.33 \pm 7.22\%$ ,  $n=3$ ; versus control:  $97.60 \pm 2.40\%$ ,  $n=5$ ). Además, no se

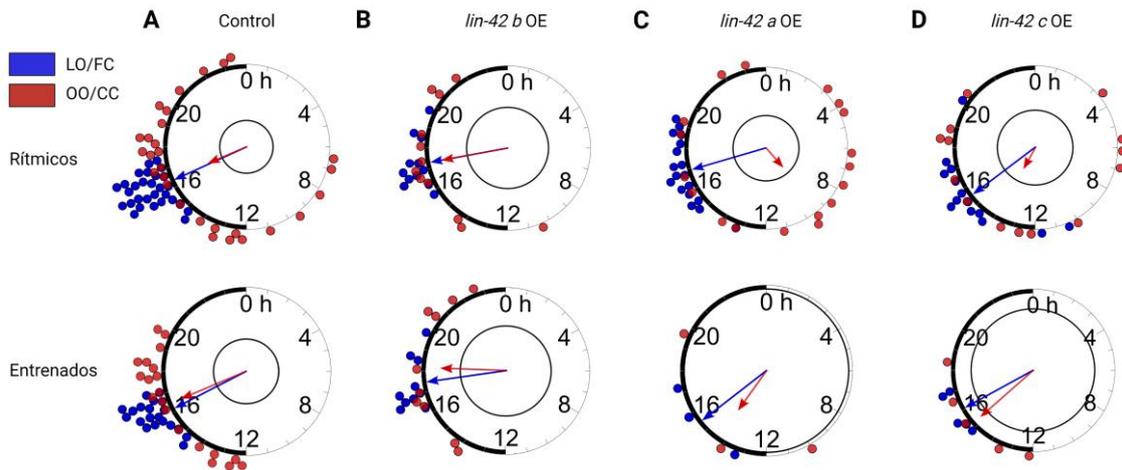
encontraron diferencias significativas en el porcentaje de poblaciones rítmicas (*lin-42b*:  $35 \pm 16.7\%$ ,  $n=3$ ; *lin-42a*:  $47.75 \pm 4.77\%$ ,  $n=4$ ; *lin-42c*:  $41.33 \pm 5.92\%$ ,  $n=3$ ; versus control:  $49 \pm 9.37\%$ ,  $n=5$ ) (Figura 3.20 a). Al analizar el porcentaje de poblaciones entrenadas se observó una diferencia significativa entre la cepa *lin-42 a* OE (*over-expression*) ( $18.25 \pm 10.63\%$ ,  $n=4$ ) versus la cepa control ( $67.40 \pm 7.85\%$ ,  $n=5$ ); de igual forma, el porcentaje de poblaciones entrenadas varió significativamente entre la cepa *lin-42c* OE ( $33.66 \pm 5.20\%$ ,  $n=3$ ) versus la cepa control. No se encontraron diferencias entre la cepa *lin-42b* OE ( $53.33 \pm 26.03\%$ ,  $n=3$ ) versus el control (Figura 20 a). Estos resultados sugieren que la sobre-expresión de *lin-42b* no afecta la capacidad de los nematodos de ser entrenados por un estímulo dual de luz/oscuridad y temperatura. Sin embargo, la sobre-expresión de *lin-42a* y *lin-42c* sí afecta la capacidad del nematodo de ser entrenado.

Al analizar el período de luminiscencia en condiciones constantes en los mutantes *lin-42b* ( $27.93 \pm 1.29h$ ), *lin-42a* ( $27.01 \pm 1.22h$ ) y *lin-42c* ( $24.97 \pm 0.96h$ ), no se observaron diferencias significativas en comparación con la cepa control ( $25.09 \pm 0.69h$ ) (Figura 3.20 b). La amplitud de la oscilación de la luminiscencia bajo en condiciones cíclicas (LO/FC) para *lin-42 a* ( $0.027 \pm 0.001$  UNDL,  $n=18$ ) no mostró diferencias significativas versus el control ( $0.029 \pm 0.0008$  UNDL,  $n=29$ ). Por su parte, las cepas *lin-42 c* ( $0.019 \pm 0.002$  UNDL,  $n=14$ ) y *lin-42b* ( $0.023 \pm 0.001$  UNDL,  $n=12$ ) arrojaron diferencias significativas versus el control (Figura 3.20 c). Bajo condiciones constantes (OO/CC), *lin-42b* ( $0.011 \pm 0.002$  UNDL,  $n=12$ ), *lin-42a* ( $0.014 \pm 0.002$  UNDL,  $n=18$ ) y *lin-42c* ( $0.011 \pm 0.001$  UNDL,  $n=14$ ) no mostraron diferencias significativas versus el control ( $0.015 \pm 0.0016$ ,  $n=29$ ) (Figura 3.20 c).



**Figura 3. 20. Sobre-expresión de *lin-42 b, c* y *a*.** a. Porcentaje de poblaciones sincronizadas, rítmicas y entrenadas para las cepas control, *lin-42b* OE, *lin-42a* OE y *lin-42c* OE. Se observó una diferencia significativa en la población de nematodos entrenados para la cepa *lin-42a* OE y *lin-42c* OE, ANOVA de dos vías, Dunnett's multiple comparisons test, \*\* $p=0.0011$ , \* $p=0.047$ . b. Períodos de luminiscencia promedio en condiciones constantes de las poblaciones rítmicas estudiadas: cepas control, *lin-42b* OE, *lin-42a* OE y *lin-42c* OE. ANOVA de una vía, Dunnett's multiple comparisons test, ns. c. Amplitud promedio para la población de nematodos rítmicos en LO/FC y OO/CC, para las cepas control, *lin-42b* OE, *lin-42a* OE, *lin-42c* OE, ANOVA de dos vías, Sidak's multiple comparisons test, \*\*\*\* $p<0.0001$ ; \* $p=0.0255$ .

Por otro lado, las cepas *lin-42a* OE y *lin-42c* OE mostraron un cambio de fase versus la cepa control bajo condiciones cíclicas (LO/FC); contrariamente, *lin-42b* OE no presentó un cambio de fase bajo estas condiciones. En condiciones constantes (OO/CC) no se encontraron diferencias significativas entre las cepas estudiadas versus la cepa control (Figura 3.21 a, b, c). Además, se puede observar que las cepas *lin-42a* OE y *lin-42c* OE tienen una disminución en la cantidad de nematodos que mantienen la fase bajo condiciones constantes (FR, *free running*).



Ciclo	Cepa	R	h	SEM	n	valor p
LO/FC	Control	0.98	16.32	0.12	29	
	<i>lin-42 b</i> OE	0.96	17.34	0.29	12	p=0.070
	<i>lin-42 a</i> OE	0.92	16.91	0.34	18	p=0.024
	<i>lin-42 c</i> OE	0.83	15.54	0.58	14	p=0.009
OO/CC	Control	0.48	16.41	0.72	29	
	<i>lin-42 b</i> OE	0.73	17.34	0.81	12	p=0.53
	<i>lin-42 a</i> OE	0.19	9.37	1.15	18	p=0.070
	<i>lin-42 c</i> OE	0.27	13.97	1.23	14	p=0.67

ns\* \*\*

Tabla 1

Ciclo	Cepa	R	h	SEM	n	valor p
LO/FC	Control	0.98	16.22	0.15	20	
	<i>lin-42 b</i> OE	0.96	17.49	0.32	10	p=0.041
	<i>lin-42 a</i> OE	0.91	15.53	0.91	3	p=0.14
	<i>lin-42 c</i> OE	0.53	14.32	2.12	3	p=0.37
OO/CC	Control	0.81	16.44	0.52	20	
	<i>lin-42 b</i> OE	0.74	18.17	0.86	10	p=0.77
	<i>lin-42 a</i> OE	0.97	16	0.37	5	p=0.14
	<i>lin-42 c</i> OE	0.84	15.22	0.95	5	p=0.56

\* ns ns ns

Tabla 2

**Figura 3. 21. Acrofase de las cepas *lin-42 b, a, c* OE.** Gráficos de Rayleigh para las acrofases de la población de nematodos rítmicas y entrenados bajo condiciones cíclicas (LO/FC, puntos azules) y bajo condiciones constantes (OO/CC, puntos rojos), control (A), *lin-42b* OE (B), *lin-42a* OE (C), *lin-42c* OE (D). Watson-Wheeler test, \*p<0,05; \*\*p<0,01. Tabla 1-2. Datos de las acrofases para la población de nematodos rítmicos y entrenados, respectivamente.

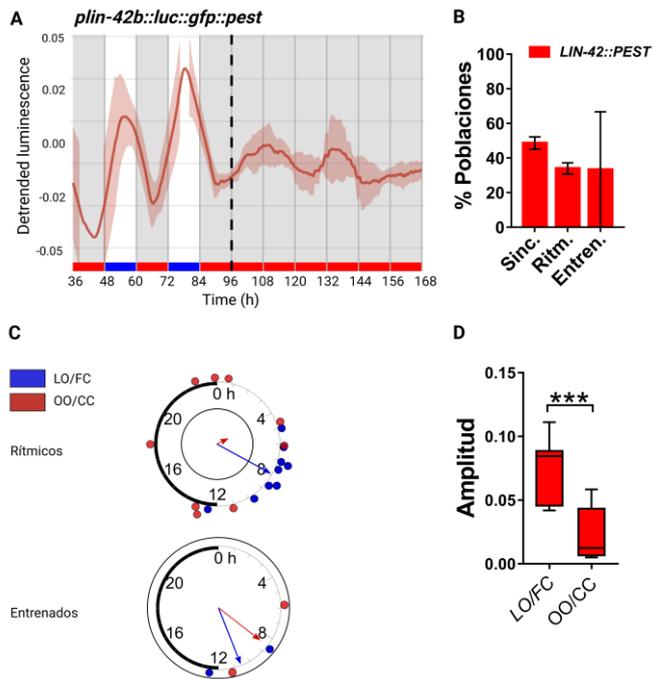
Estos resultados indican que un aumento en la expresión de *lin-42b*, *lin-42c* y *lin-42a*, no afecta el período de luminiscencia de *sur-5* en condiciones constantes.

## Ritmo transcripcional del gen *lin-42b*

Con el fin de estudiar los patrones de expresión de LIN-42 *in vivo*, se desarrolló una línea de nematodos (VQ1324) que contienen el arreglo extracromosomal *plin-42::luc::gfp::pest* (ver sección “materiales y métodos”). El dominio PEST permite la degradación rápida de las proteínas vía proteosoma, acortando la vida media a 1 h.

Los resultados mostraron que nematodos con el constructo *plin-42::luc::gfp::pest* tienen un ritmo de luminiscencia robusto bajo condiciones cíclicas (LO/FC) y bajo condiciones constantes (OO/CC); se puede observar un aumento de la luminiscencia durante la fase diurna, que corresponde a la fase fría del ciclo (15,5 °C) (Figura 3.22 A). El porcentaje de poblaciones sincronizadas, rítmicas y entrenadas fue de 48.66 ± 3.52 % (n=3), 34 ± 3.21 % (n=3) y 33.33 ± 33.33 % (n=3) respectivamente (Figura 3.22 B). Estos resultados indican que los nematodos pueden ser sincronizados bajo un ciclo dual de luz/oscuridad y temperatura.

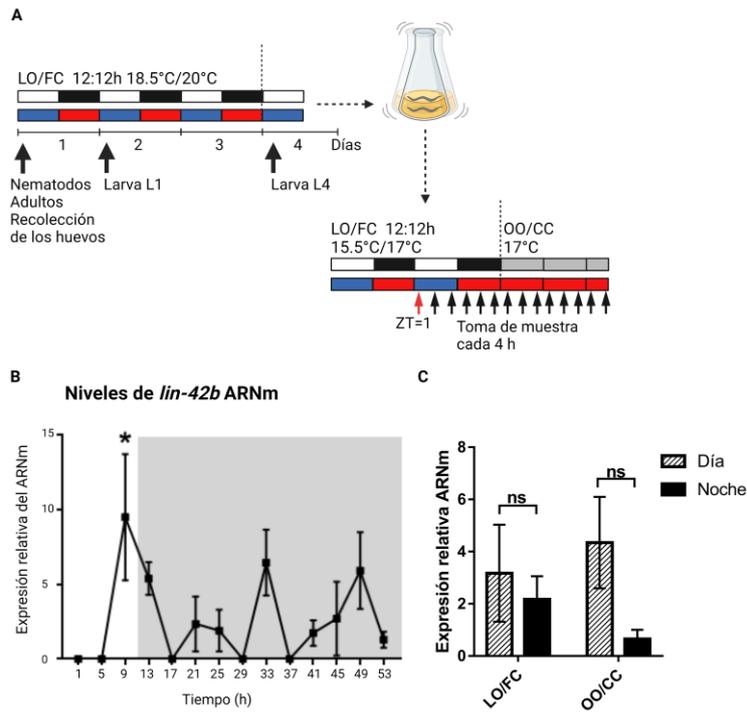
Bajo condiciones constantes, las poblaciones rítmicas expresando el constructo LIN42::PEST mostraron un período de luminiscencia endógeno de 24,59 ± 1,14 h (n=9), dicho resultado demuestra que la actividad del promotor de *lin-42* tiene un ritmo circadiano durante el estadio adulto. Al analizar los ritmos de luminiscencia se encontró que, bajo condiciones de LO/FC, la población de nematodos rítmicos tienen una acrofase promedio claramente diurna, ZT 7.94 ± 0.66 h (n=9) (puntos azules). Asimismo, bajo condiciones constantes la acrofase se mantiene durante el día subjetivo para la población de nematodos rítmicos, con un pico de actividad de luminiscencia a CT 3.21 ± 1.75 h (n=9) (puntos rojos) (Figura 3.22 c). La población de nematodos entrenados fue muy baja, se encontró un pico de actividad bajo condiciones cíclicas (LO/FC) y bajo condiciones constantes (OO/CC), durante la fase diurna, ZT: 10.57 ± 1.37 h (n=2) y CT: 8.58 ± 1.72 h (n=2). La amplitud en condiciones cíclicas arrojó un valor de 0.072 ± 0.0083 UNDL (n=9) y en condiciones constantes de 0.022 ± 0.0068 UNDL (n=9), las amplitudes son significativamente diferentes. La diferencia entre las amplitudes, como ya se ha observado anteriormente, puede deberse a una disminución en la expresión del constructo por un envejecimiento de los nematodos (Figura 3.22 D).



**Figura 3. 22. Ritmo transcripcional del promotor *lin-42b::PEST*.** a. Gráfico representativo del ritmo de luminiscencia sin la tendencia (*detrend*) del promotor de *lin-42b* bajo condiciones LO/FC y OO/CC. b. Porcentaje de nematodos sincronizados, rítmicos y entrenados, para *plin42::luc::gfp::pest*. c. Gráfico de *Rayleigh* de las acrofases para la población de nematodos rítmicos en LO/FC ( $R=0.87$ ) y OO/CC ( $R=0.06$ ) y para la población de nematodos entrenados LO/FC ( $R=0.87$ ) y OO/CC ( $R=0.79$ ). d. Amplitud promedio para la población de nematodos rítmicos en LO/FC y OO/CC, para *plin42::luc::gfp::pest*, *t-test* no pareado,  $***p=0,0003$ .

Adicionalmente, medimos los niveles de ARNm para *lin-42b* bajo condiciones cíclicas (LO/FC) y bajo condiciones constantes (OO/CC), se realizó la toma de muestra cada 4 h, empezando en ZT:1 (10 h), seguidamente se realizó la extracción de ARN total (ver en Materiales y métodos) (Figura 3.23 a).

Al analizar los niveles de expresión del ARNm de *lin-42b* durante la fase cíclica, se encontró un pico de expresión a ZT=9 h (que corresponde a la fase diurna del ciclo). Sin embargo, bajo condiciones constantes no se encontró ninguna diferencia significativa entre los diferentes puntos horarios. Al analizar los ritmos de expresión con *MetaCycle* en *R studio*, no se encontró un ritmo significativo (Figura 3.23 b). Posteriormente, se decidió analizar la diferencia en los niveles promedio del ARNm para *lin-42b* durante el día y la noche, bajo condiciones cíclicas y bajo condiciones constantes. Para ello, se tomaron los niveles de expresión del ARNm durante el día y la noche, y se realizó un promedio de la expresión bajo LO/FC y OO/CC (Figura 3.23 c). No se encontraron diferencias significativas en los niveles de expresión del ARNm del gen *lin-42* durante la fase cíclica, tampoco se observaron diferencias significativas bajo condiciones constantes.



**Figura 3. 23. Ritmos de expresión del ARNm del gen *lin-42b*.** a. Esquema de la toma de muestra del ARNm, los nematodos se crecieron bajo el ciclo dual de luz y temperatura. Los huevos fueron recolectados de nematodos adultos. Luego, las larvas L1 fueron crecidas en placas de Petri NGM con comida. En el estadio L4 los nematodos fueron pasados a 4 Erlenmeyer (n=4) con medio de luminiscencia sin luciferina, se dejaron en agitación durante un día y al día siguiente se comenzó la toma de muestra en ZT=1 (flecha roja). Se tomó muestra cada 4 h durante un día bajo condiciones LO/FC y un día más bajo condiciones constantes OO/CC. Se repitieron los dos primeros puntos del día subjetivo. b. Niveles promedio de expresión del ARNm de *lin-42b* (n=4) cada 4 h bajo LO/FC y OO/CC, horario ZT. ANOVA de una vía, Turkey's multiple comparisons test, \*p=0.0310. c. Promedio de la expresión del ARNm para el día y la noche ajo condiciones LO/FC y OO/CC. ANOVA de 2 vías, Sidak's multiple comparisons test, ns.

## Discusión

El nematodo *C. elegans* es un modelo experimental práctico y versátil para la investigación en general, ya que su mantenimiento en el laboratorio es simple y poco costoso. Además, es un animal totalmente transparente, tiene un ciclo de vida corto y su genoma se encuentra secuenciado. En particular, es ampliamente utilizado en el estudio de las neurociencias, ya que tiene un sistema nervioso compacto y simple formado por 306 neuronas de las cuales se conocen todo su conectoma. Por lo tanto, es un modelo atractivo para ser utilizado en el área de la Cronobiología.

Diferentes investigaciones han arrojado evidencias de que *C. elegans* posee múltiples comportamientos circadianos, incluyendo ritmos de actividad locomotora bajo condiciones cíclicas y constantes [171], en el estado de oxidación de la enzima peroxirredoxina (PRX) [173], en el comportamiento de actividad olfatoria [173], defecación y bombeo de la faringe [175-177], en los niveles de melatonina [178], entre otros. Además, en nuestro laboratorio se ha estudiado la participación del neuropéptido PDF (del inglés: *Pigment-dispersing factor*) en la generación y sincronización de los ritmos circadianos en el nematodo [267]. Otro estudio reciente nuestro demostró que el promotor del gen *sur-5* posee ritmos robustos a lo largo del día [183]. Gracias a la implementación de un sistema reportero basado en bioluminiscencia se logró llevar a cabo ritmos luminiscentes bajo períodos prolongados de tiempo, y de forma continua. Así, se encontró que la expresión del gen *sur-5* tiene un período endógeno cercano a las 24 h, que puede ser sincronizado por ciclos duales de luz/oscuridad y temperatura (LO/FC) [183]. Además, se demostró que el período endógeno se mantiene bajo un rango de temperaturas fisiológicas.

Estos resultados alentadores abren la puerta para proponer al nematodo *C. elegans* como un modelo óptimo para ser utilizado en cronobiología. Sin embargo, queda por abordar el estudio sobre qué proteínas están involucradas en la generación de los ritmos circadianos en estos animales. Conocer cuáles son los mecanismos moleculares que gobiernan los ritmos de salida del reloj biológico de *C. elegans* nos permitirá seguir avanzando en la cronobiología de estos animales.

Un estudio exhaustivo de bioinformática realizado por nuestro laboratorio y otros grupos nos permitió encontrar los genes candidatos para ser investigados [185, 268]. Se encontraron en el nematodo genes homólogos a las proteínas del reloj central de mamíferos y *Drosophila*. Dentro de las proteínas encontradas, LIN-42 fue la de mayor relevancia, ya que es homóloga a la proteína PER (PERIOD). PER cumple funciones muy importantes en el mantenimiento del ritmo circadiano en diferentes organismos [269-271]. Como ya se mencionó, PER tiene aproximadamente 260 aminoácidos de longitud y posee dos dominios importantes para su funcionamiento: el dominio PAS (Period/Ant/Sim) de interacción proteica, y los dominios SYQ/LT (Ser-Tyr-Gln y Leu-Thr), también llamado CKBD (por sus siglas en inglés, "*Casein Kinase Binding Domain*"), necesarios para la interacción con otras proteínas reloj incluyendo CLOCK, CRY y Caseína quinasa 1 $\epsilon/\delta$  en moscas y mamíferos [204-206]. El dominio PAS contiene dos regiones repetidas de 50 aminoácidos,

conocidas como PAS A y PAS B [210, 211]. Además, la región PAS contiene el dominio de localización citoplasmático CLD [212]. En humanos y *D. melanogaster*, el dominio PAS de la proteína PER es requerido para mantener los patrones de expresión en la oscilación de los genes circadianos [207-209].

Estudios realizados en el nematodo demostraron que la proteína LIN-42 cumple funciones importantes, como por ejemplo en la coordinación temporal de los cambios de muda durante el desarrollo [216], así como en los estadios de sueño –llamados letargos– que ocurren entre los períodos de cambio de muda [216, 217]. Adicionalmente, estudios realizados por nuestro laboratorio arrojaron evidencias de que una mutación en *lin-42* produce alteraciones en los ritmos de actividad locomotora de los nematodos [171], pero hoy en día su función en el reloj biológico de *C. elegans* no ha sido estudiada en profundidad.

En el presente capítulo de tesis se utilizó el reportero luminiscente para continuar estudiando el rol de la proteína LIN-42 en el sistema circadiano de *C. elegans*. En primer lugar, se generó una línea transgénica que contiene el reportero *psur5::luc::gfp* integrado al genoma de los nematodos mediante radiación UV, y se la comparó de manera circadiana con una línea previamente caracterizada en el laboratorio que se integró espontáneamente con el constructo *psur5::luc::gfp*. Los resultados obtenidos mostraron que bajo condiciones cíclicas de LO/FC y bajo condiciones constantes (OO/CC, 17°C) ambas cepas arrojaron valores similares en el porcentaje de poblaciones sincronizadas, rítmicas y entrenadas. Tampoco se encontraron diferencias significativas en el período de luminiscencia endógeno: ambas cepas tienen un período endógeno cercano a las 24 h y un pico de actividad de luminiscencia del promotor *sur-5* durante la fase nocturna. Estos resultados son consistentes con lo reportado previamente por nuestro laboratorio, donde se ha observado que nematodos crecidos bajo un ciclo de luz/oscuridad tienen un ritmo circadiano de actividad locomotora con un período endógeno cercano a las 24 h y con un pico de actividad durante la fase nocturna del ciclo [171].

Por otro lado, una propiedad fundamental de los ritmos circadianos es la capacidad de continuar ciclando en ausencia de señales ambientales externas. Para comprobar que efectivamente éste era el caso para los ritmos de luminiscencia de ambas cepas integradas (espontánea y por radiación UV), se repitieron los ensayos en condiciones constantes (oscuridad y 20°C), utilizando un luminómetro diferente que posee un control muy preciso de las condiciones constantes, tanto de oscuridad como de temperatura. Al comparar los ritmos de luminiscencia de las cepas en estudio, no se observaron diferencias significativas en el período promedio de luminiscencia endógeno, ni en el porcentaje de nematodos rítmicos.

Una particularidad de estos experimentos es la baja proporción de poblaciones en la cual la luminiscencia muestra una clara correlación de fases antes y después de que los nematodos fueran liberados en oscuridad y temperatura alta constante, indicando que en la mayoría de las poblaciones registradas no hay un entrenamiento verdadero, sino una respuesta de tipo enmascaramiento. Además, se observó una baja en la amplitud del ritmo de luminiscencia muy marcada en condiciones constantes, lo cual

puede deberse a que los estímulos de luz y temperatura podrían estar activando la transcripción de *sur-5*. A pesar de la caída de la señal bajo condiciones constantes, se pudo encontrar una oscilación marcada y determinar las variables de la oscilación, como el período, la acrofase y la amplitud.

Para estudiar el rol de la proteína LIN-42 en el sistema circadiano de *C. elegans*, se utilizó la cepa integrada por radiación UV como cepa control de los experimentos. Al registrar las diferentes cepas mutantes de *lin-42*, se encontró un cambio marcado en el período endógeno para *lin-42(ox461)*, con un período significativamente más largo en comparación con el control; también mostró una disminución en el porcentaje de nematodos entrenados. Si bien las poblaciones rítmicas no variaron con respecto a la cepa control, la cantidad de nematodos que mantuvieron la acrofase en condiciones constantes es ampliamente más baja que la cepa control. El cambio en la acrofase bajo condiciones constantes puede deberse al cambio en el período observado.

En resumen, una disminución en la expresión total de LIN-42 podría generar una desaceleración del reloj circadiano del nematodo, provocando un período endógeno mayor a 24 h, y una mayor proporción de nematodos enmascarados. En otros modelos experimentales, como roedores, se encontró que la supresión de *mPer1* y *mPer2* abole por completo la función del reloj circadiano [272]. Por otro lado, en *Drosophila* mutaciones en sitios específicos de la proteína PER generan alteraciones en el ritmo de actividad locomotora endógeno, produciendo alargamiento o acortamiento del período, por ejemplo, una mutación en la Ser589 modificada por Asn/Ala en PER genera una desestabilización en la proteína y produce un ritmo comportamental ~19 h [45, 273], similarmente una mutación en la Ser596 por modificación con una Ala en PER, produce una desestabilización de la proteína y una disminución del ritmo comportamental de ~16 h [274]. Contrariamente, una mutación en Ser47 por una Ala en la proteína PER, genera un alargamiento del ritmo comportamental de ~30 h, estabilizando la proteína [272, 274-277]. En ratas, una mutación en la Ser478 por una Ala, produce un alargamiento del ritmo de comportamiento de ~1 h [278]. En humanos, una mutación en la Ser662 por una Gly, conlleva a un avance de la fase del ritmo de la actividad locomotora de ~4 h [279] (Tabla 3.1). Estos datos sugieren que una modificación en los sitios de fosforilación de PER produce un cambio en el período en diferentes organismos, dando cuenta de la importancia de la regulación post-traducciona de PER para el mantenimiento correcto de los ritmos circadianos.

Tabla 3.3 Fenotipos circadianos en resultado de mutaciones en Per en Drosophila, humanos y ratones			
Especie/ mutación	Proteína mutada	Fenotipo circadiano	Impacto en la Estabilidad de PER
<i>Drosophila/period</i>	PER Ser589 ---- Asn/Ala	~19h ritmo comportamiento	desestabiliza
<i>Drosophila/period</i>	PER Ser47 ---- Ala	~30h ritmo comportamiento	estabiliza
<i>Drosophila/period</i>	PER Ser596 ---- Ala	~16h ritmo comportamiento	desestabiliza
<i>Humanos/Per2 FASPS</i>	PER Ser662 ---- Gly	~4h avance de fase en los ritmos comportamentales	---
<i>Ratas/Per2</i>	PER2 Ser478 ---- Ala	~1h más largo el ritmico comportamental	estabiliza

**Tabla 3.3.** Datos de los fenotipos circadianos de mutaciones en PER en diferentes organismos. Cuadro modificado del *paper* Narasimamurthy R, et al., 2021.

El mutante *lin-42(ox461)* posee una delección total del gen *lin-42*, y por lo tanto no contiene el dominio PAS ni el dominio de unión SYQ/LT (también llamado CKBD, “Casein Kinase Binding Domain”). Nuestros resultados indican que LIN-42 estaría involucrada en mantener la funcionalidad del reloj circadiano, y que ambos dominios, tanto PAS como SYQ/LT, serían necesarios para la función circadiana de LIN-42. Esto da pie a estudiar las quinasas, en particular KIN-20, como se hará en el capítulo siguiente.

Los dominios PAS y SYQ/LT son requeridos para mantener los ritmos circadianos en mamíferos y *Drosophila* [269-271]. En el nematodo se ha reportado evidencia de que la región SYQ/LT es más importante para el desarrollo del nematodo que el dominio PAS [213]. El fenotipo aberrante de arresto larval durante el desarrollo en el mutante *lin-42(ve11)*, el cual posee una mutación en el dominio SYQ/LT, puede ser rescatado por la sobre-expresión de la isoforma *a*, que codifica el dominio SYQ/LT. También la sobre-expresión de la isoforma *a* puede rescatar al mutante *lin-42(n1089)*, que tiene una delección en la isoforma *c*, que codifica para el dominio PAS. Los nematodos rescatados presentan un desarrollo normal, sin un arresto larval y con una puesta de huevos similar a la cepa *wild-type* [213].

Por lo tanto, decidimos estudiar el rol de los dominios PAS y SYQ/LT en los ritmos circadianos de luminiscencia del promotor *sur-5* en el nematodo adulto, y para ello utilizamos los mutantes *lin-42(ok2385)*, el cual tiene una delección en el dominio SYQ/LT, y *lin-42(n1089)*, el cual posee una delección en el dominio PAS.

Al estudiar las cepas *lin-42(ok2385)* y *lin-42(n1089)* no se observaron cambios significativos en el período de luminiscencia, ni en el porcentaje de nematodos sincronizados, rítmicos y entrenados. Sin embargo, se observó un retraso de fase para ambas cepas mutantes de *lin-42*. Estos resultados nos indicarían que una deficiencia en el gen *lin-42* afecta la fase del ritmo bajo condiciones cíclicas. Bajo condiciones constantes no se pueden sacar conclusiones ya que las acrofases son muy dispersas (*test* de Rayleigh  $R < 0,5$ ).

El gen *lin-42* posee 7 isoformas diferentes (isoformas a-f). Las más estudiadas, por su mayor relevancia en el nematodo, son las isoformas a, b y c. Las diferentes isoformas se generan por *splicing* alternativo y cada una de ellas posee un dominio diferente: *lin-42a* contiene el dominio SYQ/LT, *lin-42c* contiene el dominio PASA y PASB, y *lin-42b* que posee ambos dominios [213]. *lin-42(ox461)* tiene una delección completa en el gen de *lin-42*, lo que significa que no contiene las isoformas a, b y c, es decir no tiene el dominio PASA/PASB ni el dominio SYQ/LT. Nuestros resultados indican un efecto importante en la cepa *lin-42(ox461)*, con un fenotipo circadiano significativo, que puede deberse a que no expresa ninguna de las 3 isoformas. Por el contrario, en los mutantes *lin-42(n1089)* y *lin-42(ok2385)*, la baja expresión de una de las isoformas de *lin-42* puede llegar a ser compensado por la expresión del resto de las isoformas que se mantienen intactas en el nematodo. En otras palabras, las diferentes isoformas pueden también regularse unas a otras para generar la expresión y el funcionamiento adecuado de LIN-42, y solo en el caso que no se encuentren expresadas las 3 isoformas se genera una alteración en los ritmos del nematodo adulto.

Además, se ha demostrado que el mutante nulo *lin-42(ox461)* muestra un arresto larval, retraso en el tiempo de desarrollo, efectos en el cambio de muda y una menor puesta de huevos, en todos los casos con un fenotipo más marcado que los mutantes *lin-42(n1089)* y *lin-42(ok2385)*. En comparación, *lin-42(n1089)* tiene un fenotipo más leve que el mutante *lin-42(ok2385)*, donde se observa que los animales tienen un arresto larval y defectos en el cambio de muda, este fenotipo aberrante no es encontrado en *lin-42(n1089)* [214, 216, 264]. De estos resultados se puede deducir que la *isoforma a*, que posee el dominio SYQ/LT y se encuentra expresada en el mutante *lin-42(n1089)* pero no está expresada en el mutante *lin-42(ok2385)*, tenga mayor relevancia a la hora de mantener los ritmos en el desarrollo que la región PAS, presente en la *isoforma c*. Una de las hipótesis desarrolladas es que la región SYQ/LT actúe como un bloqueador de los activadores transcripcionales, como ocurre con PER con el heterodímero BMAL-1/CRY. Por otro lado, el dominio PAS podría estar involucrado en la mejora del funcionamiento de la región SYQ/LT o permitiendo el acceso de otras proteínas *target* [264].

El fenotipo más marcado del mutante *lin-42(ox461)* en el arresto larval y en el cambio de muda previamente reportados [264], coincide con los resultados encontrados en el presente trabajo, ya que el mutante nulo muestra un mayor efecto sobre los ritmos circadianos de luminiscencia del promotor *sur-5*. Extrañamente, no se encontró un cambio significativo en los ritmos de luminiscencia del promotor *sur-5* del nematodo mutante *lin-42(ok2385)*, el cual presenta problemas marcados en el desarrollo [264]. Además, se ha reportado que nematodos de la cepa *lin-42(n1089)* tienen un período endógeno más largo que el de la cepa N2 en los ritmos de actividad locomotora [171]; sin embargo, no hemos encontrado un efecto en los ritmos circadianos de luminiscencia del promotor *sur-5* en el mutante *lin-42(n1089)*. Esto puede deberse a que la dispersión en los períodos endógenos para los nematodos sea demasiado amplia como para poder

distinguir una diferencia significativa, así, es necesario tener un cambio de período de varias horas para poder encontrar un cambio significativo.

Para corroborar que el fenotipo encontrado en el mutante *lin-42(ox461)* realmente se debía a una delección total del gen *lin-42*, se generó un rescate con una sobre-expresión del locus *lin-42b* (cepa VQ1484). Se realizó el rescate con la *isoforma b* ya que posee la mayor homología con *Period* de mamíferos y *Drosophila*. Estudios previos mostraron que el mutante nulo puede ser rescatado eficazmente con la *isoforma b* [264]. Cuando se analizaron poblaciones de estos nematodos bajo el ciclo LO/FC y luego bajo condiciones constantes (oscuridad y 17 °C), el fenotipo defectivo de los mutantes fue rescatado parcialmente. La cepa de rescate mostró un período endógeno cercano a las 24 horas, y un porcentaje de nematodos entrenados similar a la cepa control. Si bien la cepa de rescate tiene un período endógeno cercano a 24 horas, no mostró diferencias significativas con la cepa *lin-42(ox461)*, lo que podría deberse a una expresión ligeramente diferente del transgén en comparación con la cepa de tipo salvaje. Esto ocurre normalmente con los rescates genómicos de *C. elegans* mutantes, debido a la expresión mosaico del arreglo extracromosomal que se forman en las líneas transgénicas generadas por microinyección (WormBook, <http://www.wormbook.org>).

La sobre-expresión de *lin-42b*, *lin-42a* y *lin-42c* no afecta el período endógeno en el ritmo transcripcional del gen *sur-5*. La sobre-expresión de *lin-42a* y *lin-42c* genera un cambio de fase y una disminución en la población de nematodos entrenados, estos resultados son controversiales, ya que una disminución en la expresión de *lin-42a* y *lin-42c*, no produce un cambio en la acrofase, ni en la población de nematodos entrenados. Estos resultados indican que un aumento en los niveles basales de LIN-42 no afecta los ritmos de luminiscencia de *sur-5* en poblaciones de nematodos sincronizadas a un ciclo dual de luz/oscuridad y temperatura.

En otros modelos experimentales, tales como moscas y mamíferos, se ha demostrado que tanto PER como el ARNm *Per* oscilan a lo largo del día. En particular, en ratones tanto la expresión del ARNm *Per* como de la proteína PER es cíclica, teniendo un pico de expresión en la mitad de la noche [280]. En *Drosophila*, el ARNm *Per* tiene un pico de expresión durante el día y PER durante la noche [49, 281-283]. Similarmente a lo que sucede en *Drosophila*, en ratas se ha demostrado que el ARNm *Per* tiene un pico de expresión durante el día, y la expresión de PER tiene un pico durante la noche, teniendo un desfase de 4 h entre la transcripción del ARNm y la expresión de la proteína [284].

En *C. elegans*, los niveles de ARNm de *Lin-42* y de la proteína LIN-42 oscilan durante la etapa del desarrollo, teniendo un pico de expresión en los cambios de muda [187]. Sin embargo, la oscilación de *lin-42* en el estadio adulto no ha sido estudiada hasta el momento. Para ello, determinamos la expresión del promotor de *lin-42* utilizando el arreglo extracromosomal *plin-42::luc::gfp::pest*. Los resultados obtenidos mostraron que la expresión del promotor de *lin-42* es rítmica y con un período cercano a las 24 h con un

pico de expresión durante el día bajo condiciones cíclicas (LO/FC). Sin embargo, al estudiar los ritmos transcripcionales de *lin-42b* a través de la expresión del ARNm, no observamos un ritmo ni bajo condiciones cíclicas, ni bajo condiciones constantes, solo se encontró un pico significativo durante la fase diurna bajo condiciones cíclicas. Esta diferencia entre la oscilación transcripcional del promotor y el ARNm de *lin-42b*, puede deberse a que los niveles de ARNm de *lin-42* disminuyen ampliamente en el estadio adulto en comparación con la etapa del desarrollo [187], esta disminución marcada puede generar una dificultad para ver una oscilación en el estadio adulto. Por otro lado, se observó una baja cantidad de nematodos sincronizados para el gen reportero *lin-42*. Esto puede deberse a la baja expresión del constructo *plin-42::luc::gfp::pest*, que produce una disminución en la detección del equipo, ya que *lin-42* es solo expresado en algunas regiones del nematodo adulto, como las *seam cell*, la faringe, neuronas y células somáticas [187]. Por lo tanto, es de esperar que, en el estadio adulto (en el cual se llevaron a cabo los experimentos) los niveles de expresión de luciferasa bajo el promotor de *lin-42* sean bajos y afecten así la detección en el luminómetro.

En conclusión, una delección completa de *lin-42* genera una alteración de los ritmos circadianos de luminiscencia para el promotor *sur-5* en el nematodo adulto, produciendo un alargamiento del período endógeno y un aumento en la cantidad de nematodos con ritmos enmascarados. La sobre-expresión de la isoforma *b* en el *lin-42(ox461)* recobra los valores normales del período endógeno del ritmo de luminiscencia y el porcentaje normal de nematodos entrenados. Por el contrario, una delección solo en uno de los dominios, PAS o SYQLT, no afecta los ritmos de luminiscencia para el promotor *sur-5*. El aumento de los niveles basales de *lin-42* no afecta los ritmos transcripcionales del gen *sur-5*. Si bien, el ARNm de *lin-42b* parece no tener una oscilación en el estadio adulto, el promotor de *lin-42* tiene un ritmo de luminiscencia claro bajo condiciones cíclicas y bajo condiciones constantes, con un período endógeno cercano a las 24 h y con un pico de actividad marcado durante la fase diurna (Figura 3.24). En base a estos resultados, podemos decir que la proteína PERIOD es un componente esencial del reloj que se ha mantenido evolutivamente conservado en los diferentes organismos, desde mamíferos hasta el nematodo *C. elegans*.

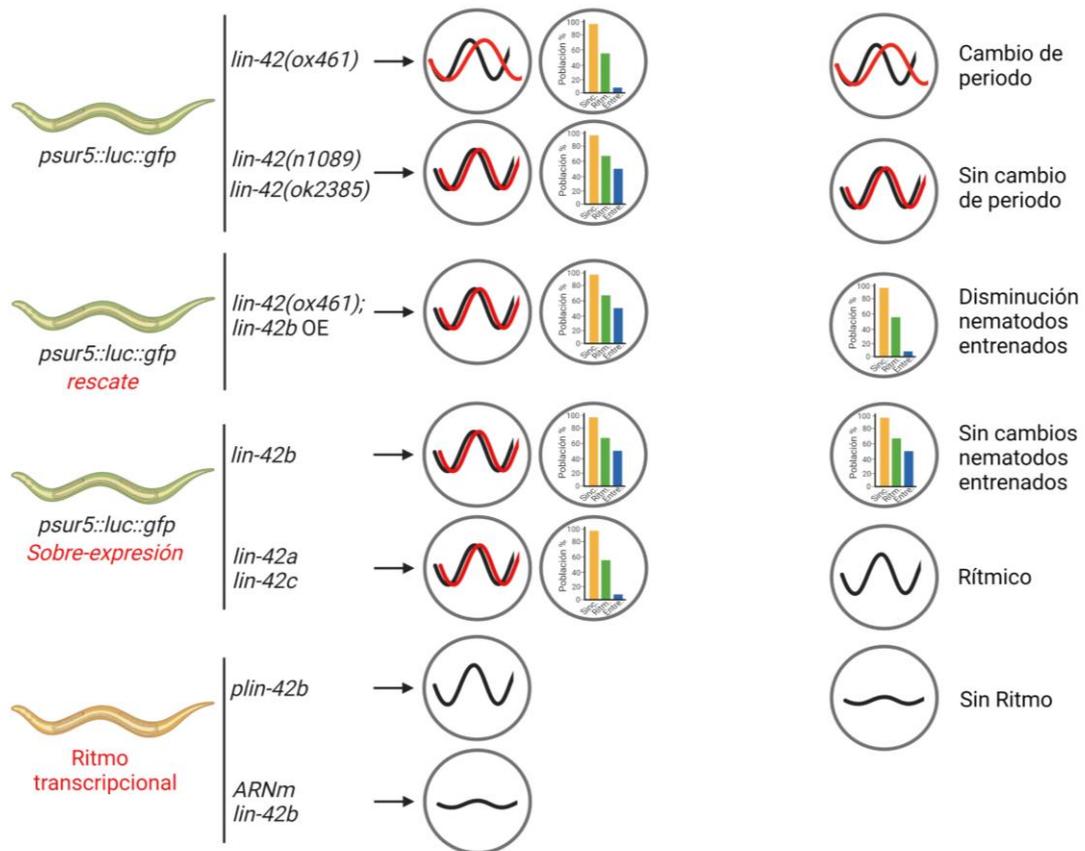
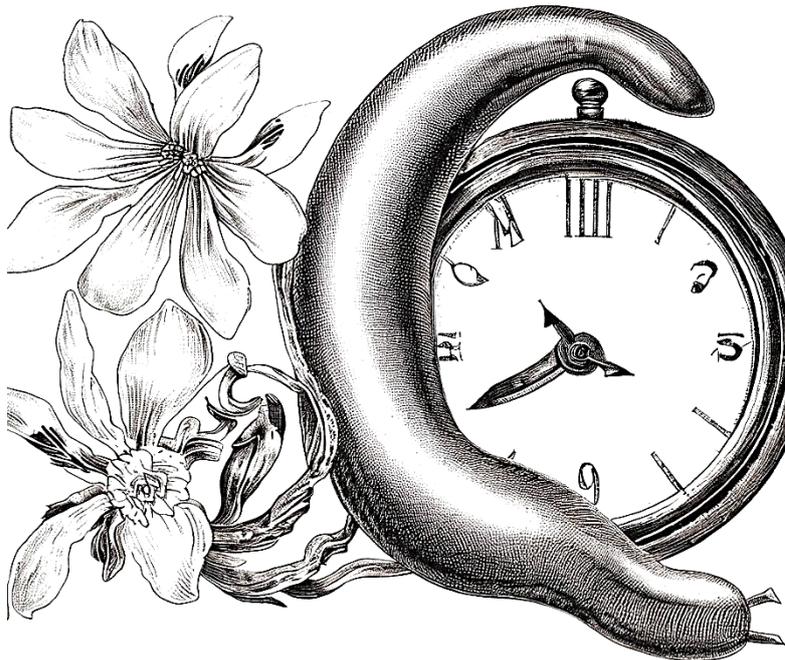


Figura 3. 24. Resumen de los resultados del Capítulo 1.

# .Capítulo 2.

---

## Rol de la proteína KIN-20 en los ritmos circadianos de *C. elegans*



## Introducción

Los osciladores circadianos regulan un amplio número de funciones fisiológicas, tales como el sueño y el metabolismo, en la mayoría de los organismos –desde bacterias hasta humanos– [271]. Estos osciladores generan cambios diarios (llamados ritmos circadianos) en diferentes procesos bioquímicos, fisiológicos y comportamentales.

Los cambios diarios están regulados por un reloj central, y el mecanismo molecular que regula estos cambios contiene elementos positivos y negativos que forman un *loop* de retroalimentación a nivel transcripcional y traduccional (TTFL, *Transcription Translation Feedback Loop*) [285]. Además del TTFL, la regulación post-transcripcional de las proteínas reloj desempeña un papel importante en ajustar la maquinaria molecular circadiana [286-288]. Estas modificaciones tienen un rol esencial en la regulación, localización celular y actividad transcripcional de las proteínas reloj, así como también en la interacción con otras proteínas. Además, las modificaciones post-transcripcionales de las proteínas reloj están implicadas en la regulación de los *input* y *output* del reloj circadiano [289-291].

La función de varias proteínas reloj de mamíferos, tales como CLOCK, BMAL-1, PER y CRY, están reguladas por la fosforilación a través de diferentes quinasas [286-288]. La primera vez que tomó relevancia la fosforilación de las proteínas reloj en el sistema circadiano de mamíferos fue con el mutante *tau*, que genera un fenotipo de periodo corto en los *hámsteres sirios* [292]. El mutante *tau* tiene una mutación en la enzima caseína quinasa 1 $\epsilon$  (CK1 $\epsilon$ ) la cual fosforila a PER. El fenotipo de periodo corto observado en el mutante *tau*, de 22 h en la cepa heterocigota y de 20 h en el mutante homocigota, es debido a una baja tasa de fosforilación de PER mediada por la CK1 $\epsilon$ . Diversos defectos en la fosforilación de proteínas reloj han sido implicados en desordenes en el sueño en humanos. Una mutación sin sentido en el gen *per2* está asociada con el síndrome de adelanto de la fase de sueño. La mutación en *per2* hace que la fosforilación de la proteína sea menos eficiente en comparación con la proteína *wild-type* [293, 294]. Además, se ha demostrado *in vitro* que una mutación en *per2* produce una disminución en la capacidad de PER de ser fosforilado. Adicionalmente, un polimorfismo en *per3* sobre la región de unión a CK1 $\epsilon$  está asociado con el síndrome de retraso de la fase de sueño [295]. CK1 $\epsilon$  interacciona y fosforila específicamente a PER1, PER2 y PER3, y de esa forma las regula de manera diferencial [286-288, 296, 297]. Cuando CK1 $\epsilon/\delta$  interacciona con PER1-2 y las fosforila, induce la rápida degradación de las proteínas vía proteosoma. Contrariamente, la fosforilación mediada por CK1 $\epsilon/\delta$  sobre PER3 genera que esta se transloque hacia el núcleo [58].

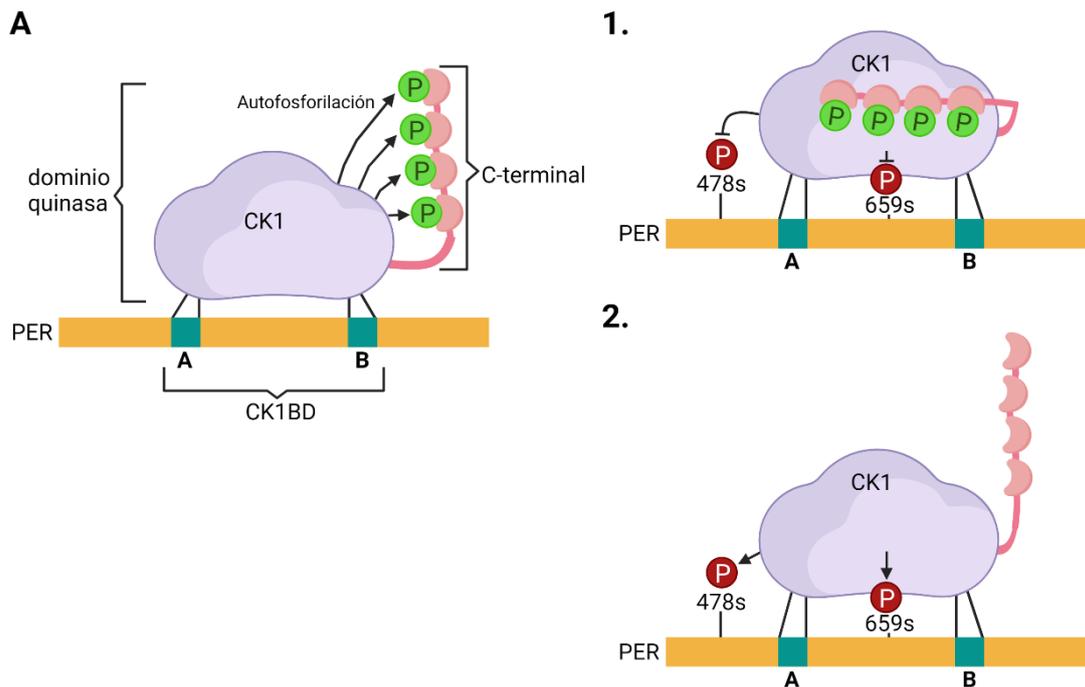
En *Drosophila*, la proteína DBT tiene amplia homología con CK1 $\epsilon/\delta$  de mamíferos [52, 53]. Una mutación al azar en DBT, genera un periodo circadiano largo y un comportamiento arrítmico [298]. En la siguiente tabla 4.1 se presentan las mutaciones encontradas en CK1 y sus efectos en el fenotipo circadiano de mamíferos y moscas.

Tabla 4. 1		Fenotipos circadianos en resultado de mutaciones en CK1 en <i>Drosophila</i> , humanos y ratones		
Especie/ mutación	Proteína mutada	Fenotipo circadiano	Impacto en la Estabilidad de PER	
<i>Drosophila</i> /CK1 $\delta/\epsilon$ - <i>doubletime</i>	<i>doubletime</i> Met47 ---- Ile	~27h ritmo comportamiento	estabiliza	
<i>Drosophila</i> /CK1 $\delta/\epsilon$ - <i>doubletime</i>	<i>doubletime</i> Pro47---- Ser	~18h ritmo comportamiento	desestabiliza	
<i>Hamster</i> /CK1 $\epsilon$ <i>tau</i>	CK1 $\epsilon$ Arg178 ---- Cys	~20h ritmo comportamiento	desestabiliza	
<i>Mouse</i> /CK1 $\epsilon$ <i>tau</i>	CK1 $\epsilon$ Arg178 ---- Cys	~20h ritmo comportamiento	desestabiliza	
Humanos/CK1 $\delta$ FASPS	CK1 $\delta$ Thr44---- Ala	~4h avance de fase en los ritmos comportamentales	---	

**Tabla 4. 1.** Datos de los fenotipos circadianos de mutaciones en CK1 en diferentes organismos. Cuadro modificado del *paper* Narasimamurthy R et al., 2021.

Además, se ha demostrado que solo PER monomérico es sustrato para DBT; cuando PER está formando un dímero no puede ser fosforilado por DBT, por ejemplo, cuando las proteínas PER y TIM interactúan, PER es estable y se produce su translocación al núcleo. De igual forma, PER de mamíferos puede generar dímeros PER-PER o PER-CRY; cuando PER está formado un dímero es escasamente fosforilado por CK1 [296]. Adicionalmente, se ha demostrado que la CK1 es una proteína constitutiva: tanto los niveles del ARNm de DBT en *Drosophila* como los niveles de la proteína CK1 $\epsilon$  en el cerebro del hámster se mantienen constantes a lo largo del día [53, 58].

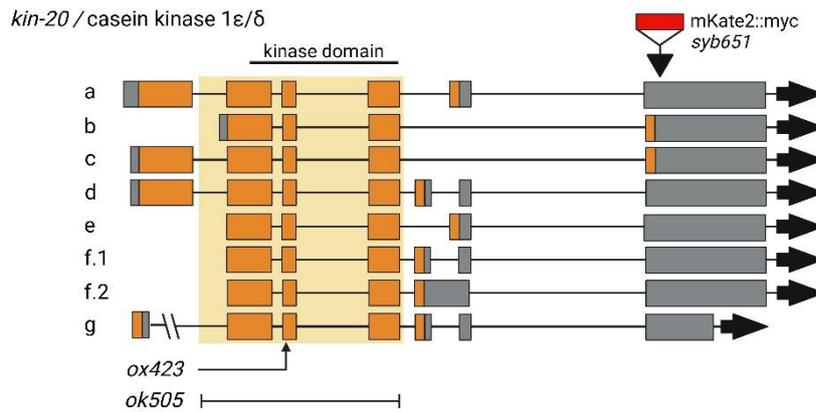
CK1 $\epsilon/\delta$  posee un dominio caseína quinasa (CK), dominio catalítico, y un dominio C-terminal (CTDs, por sus siglas en inglés, *RNA polymerase C-terminal domain*, dominio C-terminal ARN polimerasa). Se ha demostrado que estas regiones CTD son importantes para el correcto funcionamiento catalítico de la CK1. Efectivamente, la CK1 puede ser autofosforilada en el dominio CTD, produciendo una inhibición de la función catalítica de la CK1 sobre las proteínas sustrato [299-301] (Figura 4. 1). Es decir, que CK1 es inactivada cuando el sitio CTD es completamente autofosforilado [302]. Un estudio reciente ha reportado que la autoinhibición de la actividad catalítica de CK1 $\epsilon/\delta$ , por la autofosforilación, determina el periodo de los ritmos circadianos en mamíferos [303].



**Figura 4. 1. Mecanismo de Autofosforilación de CK1.** A. CK1 interacciona con PER a través del dominio CK1BD (A-B). CK1 se puede autofosforilar por su sitio catalítico en la región C-terminal, cuando la región C-terminal está altamente fosforilada se bloquea la actividad quinasa de CK1 (1), si la región C-terminal no está fosforilada CK1 esta activa, y fosforila a PER en el sitio 478S o en sitio S659 (2). Imagen modificada el *paper* Rajesh Narasimamurthy et al. 2021.

Algunos estudios realizados con inhibidores farmacológicos para CK1 –como CK1 $\delta$  (PF670462 IC<sub>50</sub>= 13 nM) y CK1 $\epsilon$  (PF4800567, IC<sub>50</sub>= 32nM)– demostraron que el inhibidor de CK1 $\epsilon$  tiene un efecto leve en el cambio de periodo, mientras que el inhibidor de CK1 $\delta$  produce un alargamiento del periodo [304], dando idea de que CK1 $\delta$  es la principal quinasa que gobierna el periodo circadiano en mamíferos. Esto sugiere que las quinasas CK1 $\epsilon$  y CK1 $\delta$  tienen un rol en la determinación del periodo circadiano en mamíferos; sin embargo, no queda claro cómo se produce la regulación de estas proteínas.

En *C. elegans*, la proteína KIN-20 tiene alta homología con la proteína CK1 $\epsilon/\delta$  de mamíferos y con DBT de moscas [185, 213]. KIN-20 tiene 7 isoformas (isoforma A-G) que poseen diferentes 5' y 3'UTRs, con patrones de variación de *splicing* y longitud. Además, la secuencia interna (exón 2-4) de todas las isoformas es compartida, dicha región posee el dominio quinasa. Esto genera que haya tres pares de isoformas (A/E, C/B y D/F/G) que comparten los exones 2-5. Además, uno de los miembros de los pares (isoforma A, C y D) comparte el exón 1, mientras que los otros miembros (E, B y F) inician su transcripción con un codón inicial AUG en el nucleótido 6 en el exón 2. La isoforma G no comparte el exón 1 con ninguna de las otras isoformas (Figura 4.2) [305].



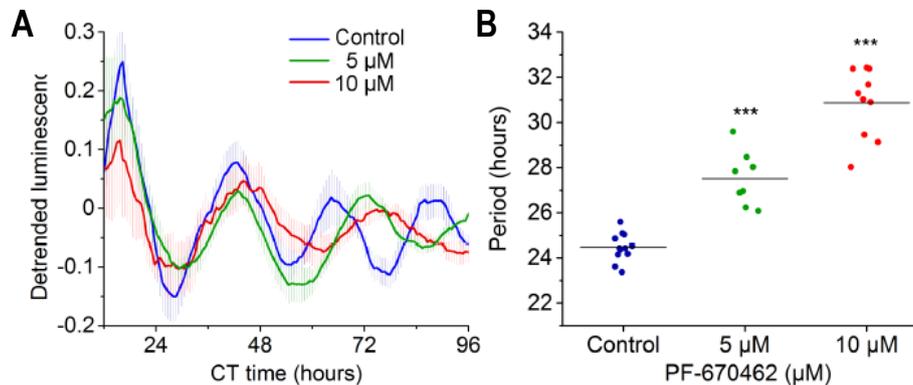
**Figura 4. 2. Isoformas de KIN-20.** Se observan los esquemas de las secuencias de las isoformas de KIN-20. KIN-20 posee 7 isoformas (a, b, c, d, e, f.1, f.2, g), los exones 2-4 son compartidos en todas las isoformas, las isoformas A, C y D comparten el exón 1, el resto de las isoformas su transcripción empieza a partir del exón 2, la isoforma G tiene un exón 1 diferentes al resto de las isoformas. Se indica también dos de los mutantes utilizados en este trabajo (*ok505*). Figura modificada de *Worm Base*: <https://wormbase.org>.

La proteína KIN-20 interviene en el desarrollo del nematodo y en la formación de las *seam cell*, pero no participa en la generación de la estructura denominada *alae*, la cual, como fue mencionado, se forma en el último estadio del desarrollo a partir de la fusión de las *seam cell* [305, 306]. Experimentos de RNAi contra KIN-20 mostraron una alteración en el tiempo del desarrollo de *C. elegans* [305]. Por otro lado, estudios recientes demostraron que KIN-20 regula la expresión de LIN-42 y algunos microRNAs tales como *let-7* y *lin-4*, activándolos por vía postranscripcional [306]. Contrariamente, LIN-42 inhibe la expresión del microRNA *let-7* [218-220]. Esto indicaría que las proteínas KIN-20 y LIN-42 modulan la expresión de los microRNAs por diferentes vías. Adicionalmente, se ha encontrado que nematodos mutantes de KIN-20 tienen disminuida la expresión de LIN-42 en los estadios L3 y L4, lo que indicaría que KIN-20 actuaría activando la expresión de LIN-42 en esos estadios del desarrollo [306]. Además, se observó que KIN-20 se expresa durante todos los estadios del desarrollo; de las 6 isoformas, la isoforma B es la que posee mayor expresión en todos los estadios del desarrollo de *C. elegans* [306].

Por otra parte, la proteína KIN-20 participa en la vía de señalización *Wnt* (*Wingless*). Esta vía – conservada en diferentes especies– controla varios procesos como el crecimiento celular, oncogénesis y desarrollo [307, 308]. Los ligandos involucrados en la vía de señalización *Wnt* forman complejos con receptores de la familia *Fizzled* [307, 309], y la señal es traducida por la proteína *dishevelled* (DSH). DSH inhibe a la enzima glucógeno sintetasa-3-quinasa (GSK-3), homóloga a la proteína SHAGGY (SGG) que interviene en los ritmos circadianos de *Drosophila*. Cuando la proteína WNT no se encuentra presente, la enzima GSK-3 fosforila a la catenina  $\beta$  para su posterior degradación vía proteosoma [310]. Por el contrario, cuando WNT está presente, la proteína DSH inhibe a GSK-3 generando un aumento en los niveles de catenina  $\beta$ . Luego, la catenina  $\beta$  ingresa al núcleo y se une con factores de transcripción de la familia

TCF1/LEF1 (*T cell factor- Lymphoid enhancer factor*). La vía de señalización *Wnt* cumple un rol en el desarrollo del *C. elegans*, donde interviene en la ubicación específicas y la migración de los diferentes tipos celulares [193].

Si bien se ha estudiado ampliamente la función de KIN-20 durante el desarrollo de *C. elegans*, se encuentra escasamente estudiado cuál es su rol en los ritmos circadianos del nematodo adulto. Estudios previos realizados en nuestro laboratorio demostraron que estos ritmos se ven afectados con la incorporación de un inhibidor específico de la CK1 $\epsilon/\delta$  [183]. El inhibidor PF-670462 es un modulador farmacológico del periodo circadiano en varias especies; el tratamiento con PF-670462 en nematodos adultos induce un alargamiento del periodo en los ritmos transcripcionales de *sur-5* bajo condiciones constantes, y este efecto es dosis dependiente (control: 24.5 h  $\pm$  0.2; 5 $\mu$ M PF-670462: 27.5 h  $\pm$  0.4; 10 $\mu$ M PF-670462: 30.9 h  $\pm$  0.5) (Figura 4.3).



**Figura 4. 3.** Ensayos de luminiscencia revelan un ritmo robusto bajo condiciones constantes que puede ser modulado farmacológicamente por la aplicación del inhibidor específico de CK1 $\epsilon/\delta$ . Los nematodos fueron crecidos bajo un ciclo dual de luz y temperatura (LO:FC, 12 h:12 h, 18.5°C/20°C), en placas de Petri de NGM con *E. coli* (HB101). Luego, los nematodos en estadio L4 GFP positivos fueron seleccionados individualmente y transferidos al medio de luminiscencia líquido, la señal fue monitoreada en condiciones constantes (oscuridad y 20°C) durante 7 días. **A.** Actividad de luminiscencia promedio en ensayos con un nematodo bajo condiciones constantes con vehículo (agua; línea azul; n=12), 5  $\mu$ M PF-670462 (línea verde; n=8), 10  $\mu$ M PF-670462 (línea roja; n=10). **B.** Promedio del periodo de la actividad del reportero bajo condiciones constantes (puntos azules, 24.5  $\pm$  0.2 h; n=12) y tratados (puntos verdes, 27.5  $\pm$  0.4, n=8 y puntos rojos, 30.9  $\pm$  0.5, n=10). PF-670462 demuestra un alargamiento del periodo circadiano significativo (\*\*\*) ( $P < 0.001$  vs vehículo; ANOVA de una vía con *test de Dunnett's*).

Los estudios previos arrojaron indicios de que KIN-20 estaría implicada en la regulación de los ritmos circadianos del nematodo. En el presente capítulo nos proponemos investigar con mayor profundidad el rol de KIN-20 en los ritmos circadianos del nematodo adulto, centrándonos en ritmos de luminiscencia en cepas mutantes para la proteína KIN-20.

### **Objetivos del presente capítulo**

- Estudiar la regulación circadiana de la expresión génica del gen *sur-5* bajo ciclos de luz/oscuridad y temperatura en líneas mutantes para la proteína KIN-20.
- Evaluar el efecto del rescate del fenotipo mutante *kin-20* sobre la sincronización y ritmicidad circadiana.
- Evaluar el efecto de la sobreexpresión de distintas isoformas de KIN-20 sobre la sincronización y ritmicidad circadiana.
- Estudiar los ritmos transcripcionales el gen *kin-20* bajo ciclos de luz/oscuridad y temperatura.

## Materiales y Métodos

### Cepas de nematodos

Los nematodos transgénicos utilizados en este trabajo fueron generados por la técnica de microinyección estándar [240, 241], mediante una colaboración con el laboratorio de la Dra. Claire Bénard, del *Département des sciences biologiques, Université du Québec à Montréal*, Canada. La cepa N2 Bristol (*wild-type*), y el mutante *kin-20(ok505)* fue obtenido del *Caenorhabditis Genetics Center* (CGC, Universidad de Minnesota, Estados Unidos, <https://cgc.umn.edu>). El mutante *kin-20(ox423)* fue cedido por el laboratorio de Erik M. Jorgensen [311].

La cepa *kin-20(ok505)* posee una delección de 2.2 kb en la secuencia del gen que remueve casi toda la secuencia de la proteína, y la cepa *kin-20(ox423)* posee una mutación puntual (Q344stop) la cual produce un codón de stop en el exón 3 del gen *kin-20*. Ambas cepas fueron cruzadas con la cepa VQ1310 (*qvl8 [psur5::luc::gfp]*). Los métodos de cruzamiento se encuentran detallados en la sección “Materiales y Métodos: cruce de cepas mutantes”. Luego del cruce, se chequearon las placas que eran 100% GFP positivas para el promotor *sur-5* y homocigotas para la mutación *kin-20(ok505)*, genotipando por PCR a punto final. La cepa generada se denominó VQ1355 (*kin-20(ok505) X, #50C; qvl8*) (Ver tabla de *primers*).

Para genotipar la mutación *ok505*, se utilizó un *primer* Fw\_KIN20ext (que hibrida afuera de la mutación) y dos *primers* Rvs, uno que hibrida afuera de la mutación (Rv\_KIN20ext) y otro dentro (Rv\_KIN20int). Los amplicones obtenidos a partir de la cepa *wild-type* fueron de: 2.451 pb (Fw\_KIN20ext; Rv\_KIN20ext) y 644 pb (Fw\_KIN20ext; Rv\_KIN20int). Los amplicones obtenidos a partir de la cepa *kin-20(ok505)* fueron de: 518 pb (Fw\_KIN20ext; Rv\_KIN20ext), y no se obtuvo amplificación con los *primer* Fw\_KIN20ext y Rv\_KIN20int. A continuación, se detallan las secuencias de los *primers* utilizados:

Fw\_KIN20ext: 5'-CCGGTTATTCGTTCAAAAGCA-3'

Rv\_KIN20ext: 5'-CAGGCACAGCTAGCATCTTC-3'

Rv\_KIN20int: 5'-TGTTCCGCACGTTATTCCATC-3'

Para la cepa *kin-20(ox423)*, se siguió la mutación por el marcador *oxIs12 [punc-47::GFP, lin-15(+)]*, que expresa GFP en las neuronas RMEL/R, RIS, AVL, DVB y PVT. Se seleccionó la placa que contenía 100% de nematodos positivos para GFP en las regiones de expresión de *sur-5*, y 100% de nematodos GFP positivos en las neuronas mencionadas anteriormente. DG1 (*oxIs12 [punc-47::GFP, lin-15(+)]*; *kin-20(ox423) X; qvl8*) se denominó a la cepa generada (Ver tabla de cepas).

La cepa *kin-20(ok505)* fue rescatada con la sobre-expresión de la *isoforma b* (*pkin-20::isoforma b::rfp*), la cual tiene mayor homología con CK1ε/δ. Para ello, el arreglo *pkin-20::isoforma b::rfp* fue insertado en nematodos de la cepa N2 (*wild-type*) por microinyección, y luego se realizaron cruzamientos entre esta

línea y la cepa *kin-20(ok505)* que posee la delección completa del dominio quinasa y el reportero *psur5::luc::gfp* integrado, la cepa generada fue VQ1539 (*kin-20(ok505)* X #3OC; *qvl8*; *qvEx390* (*pkin-20::isoform b::rfp*; *pBB107*) (Ver tabla de cepas).

La cepa *kin-20(ox423)* (EG5202: *oxIs12* [*punc-47::GFP*, *lin-15(+)*]; *kin-20(ox423)* X), fue rescatada por la expresión de las isoformas a, c y d de *kin-20* en el genoma (EG9581: *oxSi1087* [*pkin-20::RFP::kin-20::kin-20UTR*, Cb *unc-119(+)* \**ttTi5605*] II ; *oxIs12* [*punc-47::GFP*, *lin-15(+)*] *kin-20(ox423)* X). Ambas cepas fueron cedidas por Erik M. Jørgensen [311]. Posteriormente, se cruzó la cepa EG9581 con la cepa VQ1310, de esa forma se generó la cepa DG2 (*oxSi1087* [*pkin-20::rfp::kin-20::kin-20UTR*, Cb *unc-119(+)* \**ttTi5605*] II ; *oxIs12* [*punc-47::GFP*, *lin-15(+)*] *kin-20(ox423)* X; *qvl8*) (Ver tabla de cepas).

Además, se realizó la sobreexpresión de las isoformas b, d y c de *kin-20*. Las construcciones *pkin20::isoforma b::RFP*, *pkin20::isoforma d::RFP*, *pkin20::isoforma c::RFP* fueron microinyectadas en la cepa N2 generando las cepas: VQ1371 [*qvEx389* (*pkin20::isoforma b::RFP*, *pBB101*)], VQ1299 [*qvEx350* (*pkin20::isoforma d::RFP*, *pCFJ90*)] y VQ1319 [*qvEx359* (*pkin20::isoforma c::RFP*, *pCFJ90*)]. Posteriormente, todas las cepas generadas se cruzaron con la cepa VQ1310 (*qvl8* [*psur5::luc::gfp*]), dando lugar a las cepas DG4 [*qvEx389* (*pkin20::isoforma b::RFP*, *pBB107*); *qvl8*], DG5 [*qvEx350* (*pkin20::isoforma d::RFP*, *pCFJ90*); *qvl8*] y DG7 [*qvEx359* (*pkin20::isoforma c::RFP*, *pCFJ90*); *qvl8*] (Ver tabla de cepas).

Por último, para medir la expresión del promotor de *kin-20* *in vivo*, se desarrolló una línea de nematodos que contiene el arreglo extracromosomal *pkin-20::luc::gfp::pest*. Para ello, se microinyectó el arreglo mencionado en la cepa N2, generando la línea VQ1320 [*qvEx360* (*pkin20::luc::gfp::pest*, *pCFJ90*)] (Ver tabla de cepas).

## Constructos moleculares

Las construcciones moleculares utilizadas en este Capítulo fueron obtenidas mediante técnicas de ingeniería genética, y cada uno de los pasos fueron controlados mediante electroforesis preparativa en geles de agarosa (estos resultados no fueron incluidos en la presente tesis por motivos de extensión). Además, cada uno de los amplicones obtenidos por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) a punto final, así como las construcciones finales, fueron corroborados mediante secuenciación en Macrogen (Corea).

- **Construcción de *pkin-20::isoforma d::RFP***

La secuencia conteniendo la región correspondiente a la isoforma d de la proteína KIN-20 fue obtenida por PCR a partir de ADN genómico de nematodos adultos utilizando los siguientes *primers* (en gris se marca la secuencia agregada de las enzimas de restricción, ER):

Fw-XbaI: 5'- GCTCTAGACTGGAGGGTGTCTGTCCCGATTG -3'

Rv-KpnI-SacI: 5'- GGGGTACCCGAGCTCGGTAAAATGGCAAGTCAAATTTG -3'

El amplicón obtenido de 1502 pb fue clonado en pGEM-T utilizando el kit pGEM-T Easy Vector (Promega, Estados Unidos) siguiendo las instrucciones del proveedor, y luego secuenciado por la empresa Macrogen (Corea del sur). Posteriormente, la construcción obtenida se digirió con las enzimas de restricción XbaI y KpnI para liberar la secuencia correspondiente a la isoforma d de la proteína KIN-20, y finalmente se la ligó en el vector comercial *punc-122::RFP: punc-122::dsRed (coel::RFP* Plasmid #8938, Addgene, Estados Unidos) previamente digerido con las mismas enzimas de restricción. Así, se generó el vector *punc-122::isoforma d::RFP* (7,3 kb), con la adhesión de la secuencia de RFP en el extremo terminal de la isoforma d.

Por otro lado, se amplificaron 2,6 Kb río arriba del codón de inicio de la transcripción del gen de *kin-20* conteniendo la región promotora. La amplificación se realizó por PCR a partir del Fósido WRM0617dH07, utilizando los *primers*:

Fw-XbaI: 5'- GCTCTAGAGCTAAAACGTGGCAAAAATCAGAGAG -3'

Rv-SphI: 5'- ACATGCATGCGATGAGATCAGTGCGACTAGACG -3'

Posteriormente, se clonó la secuencia del promotor de *kin-20* en pGEM-T utilizando el kit pGEM-T Easy Vector (Promega, Estados Unidos) siguiendo las instrucciones del proveedor, y luego la secuencia fue validada por secuenciación en Macrogen (Corea del Sur). La construcción obtenida fue digerida con las enzimas de restricción SphI y XbaI, para liberar el promotor de *kin-20*, rindiendo un producto de 2647pb. Finalmente, el producto obtenido se ligó en el plásmido previamente generado (*punc-122::isoforma d::RFP* (7,3 kb)) digerido con las mismas enzimas de restricción. De esta forma se generó la construcción *pkin-20::isoforma d::RFP* (8337pb) (Figura 4.4 a).

- **Construcción de *pkin-20::isoforma c::RFP***

La secuencia conteniendo la región correspondiente a la isoforma c de la proteína KIN-20 fue obtenida por PCR a partir de ADN genómico de nematodos adultos utilizando los siguientes *primers*:

Fw-XbaI: 5'-GCTCTAGACTGGAGGGTGTCTGTCCCGATTG -3'

Rv-SacI: 5'-CGAGCTCTATGTGCGACGTTGATTTGG -3'

El amplicón obtenido de 1544 pb fue clonado en pGEM-T utilizando el kit pGEM-T Easy Vector (Promega, Estados Unidos) siguiendo las instrucciones del proveedor, y luego la secuencia fue validada por secuenciación en Macrogen (Corea del sur). Posteriormente, la construcción obtenida se digirió con las enzimas de restricción XbaI y SacI para liberar la secuencia correspondiente a la isoforma c de la proteína KIN-20, y finalmente se la ligó en el vector *pkin-20::isoforma d::RFP* (8337pb), previamente digerido con las mismas enzimas de restricción. De esta manera, se generó la construcción *pkin-20::isoforma c::RFP* (8385pb) (Figura 4.3 b) reemplazando la secuencia correspondiente a la isoforma d por la isoforma c.

- **Construcción de *pkin-20::isoforma b::RFP***

La secuencia conteniendo la región correspondiente a la isoforma b de la proteína KIN-20 fue obtenida por PCR anidada utilizando como molde la secuencia de la isoforma c ya que ambas comparten gran parte de su secuencia (solo difieren en 118 pb). Para ello, se llevaron a cabo 3 reacciones de PCR consecutivas, es decir el producto de la primera reacción de PCR fue utilizado como molde para la segunda reacción, y así sucesivamente. Los *primers* utilizados fueron:

Fw1: 5'-CCACCGCACCGCTGGTTTCTTCAAGAAAGCGGAGATGG -3'

Fw2: 5'-TGACAACAACCCACCTCTCGGATCCATCAACCGTCAGCCA  
CCGCACCGCTGGTTTCTTC -3'

Fw3-XbaI: 5'- GCTCTAGAACCATCCATCTGACAACAACCCACCTCTCG -3'

Rv1-SacI: 5'- CGAGCTCGATAATGTCGACGTTGATTTG -3'

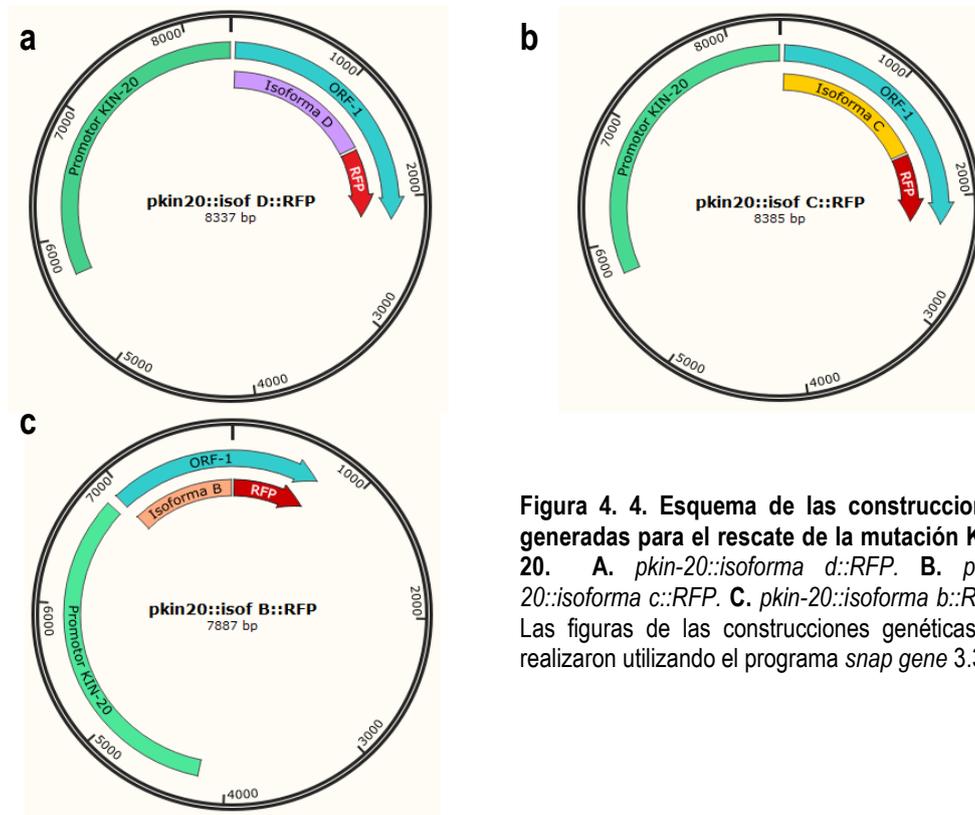
El amplicón final obtenido de 1045 pb fue clonado en pGEM-T utilizando el kit pGEM-T Easy Vector (Promega, Estados Unidos) siguiendo las instrucciones del proveedor, y luego la secuencia fue validada por secuenciación en Macrogen (Corea del Sur). Posteriormente, la secuencia correspondiente a la isoforma b de la proteína KIN-20 fue clonada en el plásmido *pkin-20::isoforma d::RFP* utilizando el *kit* de clonado Gibson Assembly (NEB, Estados Unidos). Para ello, se amplificó por PCR la secuencia correspondiente a la isoforma b clonada en pGEM-T utilizando *primers* que poseen sitios de homología al plásmido vector (*pkin-20::isoforma d::RFP*, coloreados en gris). Los *primers* utilizados fueron:

Fw: 5'- ATTTTTGCCACGTTTTAGCTCTAGAACCATCCATCTGAC -3'

Rv: 5'- TGGCGACCGGTACCCGAGCTCGATAATGTCGACGTTGATTTG -3'

Finalmente, el amplicón obtenido correspondiente a la isoforma b fue clonado en el plásmido *pkin-20::isoforma d::RFP* previamente digerido con las enzimas de restricción XbaI y SacI (eliminando así la

secuencia de la isoforma d) utilizando el Kit de Gibson Assamly, siguiendo las instrucciones del proveedor. De esta forma se generó la construcción *pkln-20::isoforma b::RFP* (7887pb) (Figura 4.4 c).



**Figura 4. 4. Esquema de las construcciones generadas para el rescate de la mutación KIN-20. A. *pkln-20::isoforma d::RFP*. B. *pkln-20::isoforma c::RFP*. C. *pkln-20::isoforma b::RFP*. Las figuras de las construcciones genéticas se realizaron utilizando el programa *snap gene* 3.3.1.**

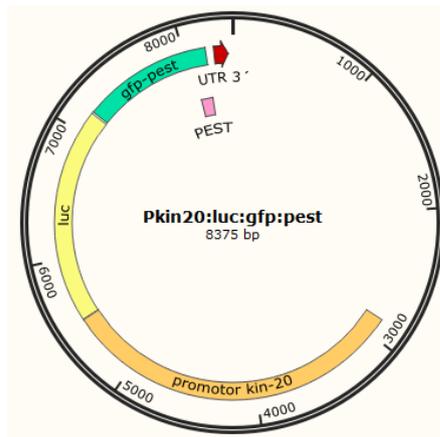
- **Construcción de *pkln-20::luc::gfp::PEST***

Para la generación de *pkln-20::luc::gfp::pest*, se digirió el vector *psur5::luc::gfp::pest* (construido previamente en el laboratorio) con las enzimas de restricción HindIII y BamHI. Por otro lado, se amplificó por PCR la secuencia correspondiente al promotor del gen *kin-20* utilizando como molde de reacción la construcción *pkln-20::isoforma d::RFP*, y a los *primers* utilizados se les agregó secuencias de homología para el vector (coloreadas en gris):

Fw: 5'- GCTAACAACTTGGAAATGAAATAGATGAGATCAGTGCGACTAG -3'

RV: 5'- TGTTTTTGGCGTCTTCCATGGCTAAAACGTGGCAAAAATC -3'

Por último, el vector digerido y el producto de PCR fueron adicionados a la mix del Kit de clonado Gibson Assamly (NEB, Estados Unidos) siguiendo las instrucciones del proveedor. De esta forma se generó la construcción *pkln-20::luc::gfp::pest* (8375 pb) (Figura 4.5).



**Figura 4. 5. Esquema de la construcción PEST.** *pkin-20::luc::gfp::pest*. La figura de la construcción genética se realizó utilizando el programa *snap gene* 3.3.1.

Los *primers* utilizados en este trabajo fueron diseñados mediante el *software* CloneManager7 (Scientific & Educational Software, Estados Unidos), y sintetizados en Genbiotech SRL (Argentina). En todos los casos, las secuencias de los constructos fueron validadas por secuenciación mediante la técnica de Sanger en Macrogen (Corea). Todas las estrategias de clonado, y las evaluaciones de las secuenciaciones, fueron realizadas *in silico* mediante el *software* CloneManager7 (Scientific & Educational Software, Estados Unidos) y el *software* SnapGene 2016 (GSL Biotech LLC, Estados Unidos).

### Reacción de PCR a punto final

Los ensayos de PCR se realizaron utilizando Platinum Taq DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos), en un ciclador térmico para tubos (Eppendorf, Alemania) y en un volumen final de 10  $\mu$ l. El programa de PCR utilizado fue de 5 minutos a 95°C y 35 ciclos de: 30 segundos a 95°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 de ácidos nucleicos, revelado y aislamiento de los amplicones

Tanto las reacciones de PCR como las digestiones fueron corroboradas mediante electroforesis preparativa en geles de agarosa 0.8 % (Genbiotech, Argentina), en presencia de *buffer* TAE 1X (Stock TAE 50X: Tris-Acetato 2 M, EDTA 0,05 M; Sigma-Aldrich, Estados Unidos) y utilizando el 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) y se analizó en un transiluminador UV (DyNA Light, Labnet International, Estados Unidos). Las imágenes de cada electroforesis se digitalizaron 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 *HiYieldTM Gel/PCR DNA Mini Kit* (Real Biotech Corporation, Estados Unidos) y la purificación de los plásmidos se realizó mediante el kit de *miniprep* por lisis alcalina *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).

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 mediante electroporación en *Escherichia coli* cepa Top10 según protocolos estándar [312].

### **Generación de nematodos transgénicos mediante microinyección**

Los animales transgénicos fueron generados por la técnica de microinyección estándar [241], mediante una colaboración y estadía en el laboratorio de la Dra. Claire Bénard, del *Département des Sciences Biologiques, Université du Québec à Montréal, Canadá*. 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 en la cepa N2 (*wild-type*) a una concentración de 50 o 100 ng/μl, con los marcadores pcFJ90 o pBB101 (100 ng/μl) –ambos expresan RFP en la faringe del nematodo– y con el plásmido pBSK (50 o 100 ng/μl) para completar la *mix* de inyección.

### **Ensayo de luminiscencia**

Los registros de luminiscencia bajo ciclos duales de luz/oscuridad y temperatura (15,5°C/17°C, 12h:12h) fueron realizados en placas *multiwells*. Los ensayos de luminiscencia bajo condiciones constantes (oscuridad/ 20°C) fueron realizados en placas de Petri de 90 mm. En todos los casos se utilizó el medio de luminiscencia descrito en la sección de materiales y métodos generales.

- **Ensayo de luminiscencia en placa de Petri bajo condiciones constantes**

Los ensayos bajo condiciones constantes se realizaron como se describe en la sección de materiales y métodos generales. Dependiendo del ensayo, se utilizaron poblaciones de nematodos, o nematodos individuales.

- **Ensayo de luminiscencia en placa multiwell bajo condiciones cíclicas**

Los ensayos bajo condiciones cíclicas de luz/oscuridad y temperatura (15,5°C/17°C, 12 h:12 h) fueron realizados en todos los casos con poblaciones de nematodos. Se utilizaron 100 nematodos por *well* cuando se trabajó con las cepas mutantes, y poblaciones de 50 nematodos cuando los registros se realizaron con las cepas rescatadas y las cepas de sobre-expresión.

- **Análisis de Datos**

Los datos fueron analizados como se describe en la sección de materiales y métodos generales. Para todos los casos se realizó un análisis de la varianza y un *test* de normalidad D'Agostino y Pearson *test*, si pasaban el test de normalidad se realizó un *test* de *Student* (*Student's t-test*) para la comparación de los cambios de periodos, si los datos no pasaran el test de normalidad se realizó un test no paramétrico, Mann Whitney *test*. Se realizó un *test* Watson-Wheeler en R Studio para el análisis del cambio de fase, y las acrofases fueron analizadas por un *test* de *Rayleigh* utilizando el programa *El Temps* (versión 1.313). Para el análisis de los porcentajes de nematodos sincronizados, rítmicos y entrenados se utilizó un ANOVA de dos vías. En todos los casos un valor de  $P < 0,05$  fue considerado como el mínimo para ser estadísticamente diferente. Para todos los análisis estadísticos se utilizó el programa *GraphPad Prism 7*.

## **Ensayos de PCR en tiempo real**

Poblaciones de nematodos adultos, cepa N2 (Bristol), fueron sincronizadas por la técnica de Cloro e NaOH. Los huevos fueron recolectados y mantenidos en agitación en medio M9 durante toda la noche. Al día siguiente, las larvas L1 fueron pasadas a placas NGM con bacterias (*E. Coli* HB101); se utilizaron 64 placas con 4000 L1 por placa. Los nematodos fueron crecidos bajo un ciclo dual de luz/oscuridad y temperatura 12 h: 12 h (~150  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ :18.5 °C/0  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ :20 °C) por 48 hs. Luego, las larvas L4 fueron recolectadas a ZT4 (1 pm), lavadas con *buffer* M9 para remover los restos de bacteria, y pasadas a 4 Erlenmeyer de 500 ml con 130 ml de medio de luminiscencia sin luciferina (aproximadamente 64000 nematodos por Erlenmeyer). Los nematodos fueron entrenados bajo un ciclo dual de luz/oscuridad y temperatura 12 h: 12 h (~150  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ :15.5 °C/0  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ :17 °C) en agitación 110 rpm durante 2 días, y luego fueron dejados 2 días más en condiciones constantes (oscuridad, 17 °C). Cuatro muestras

biológicas independientes (n=4) de ~4000 nematodos cada una fueron recolectadas cada 4 h, comenzando a ZT1 (10 am) en el segundo día bajo condiciones cíclicas y bajo condiciones constantes. Los nematodos fueron pasados a falcón de 15 ml, se esperó hasta que decanten y se les saco el medio de luminiscencia. Luego, se agregó 200 ul de Trizol (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos) y fueron pasados a tubos eppendorf de 1,5 ml y congelados a -80°C.

El ARN total fue extraído de las muestras mediante el método de Trizol de acuerdo con las instrucciones del proveedor. 2 ug de ARN total fueron tratados con *DNAse I amplification grade* (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos) y utilizados para realizar la síntesis de ADNc utilizando MLLV transcriptasa reversa (PB-L, Argentina) 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 3.0* (PB-L, Argentina) utilizando un termociclador *QuantStudio 3* (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos). 9 µl de la *mix* fue agregado en cada uno de los 96 pocillos de la placa de PCR, y 1 µl de ADNc fue añadido como molde de PCR. El programa de PCR fue 10 minutos a 95 °C, 45 ciclos de 15 segundos a 95 °C y 60 segundos a 60 °C, 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 del gen de referencia Y45F10D.4. Los *primers* utilizados para amplificación de *kin-20b* y Y45F10D.4 fueron:

Fw\_*kin-20b*: 5'-CTGGAAGTCAAGATACGCC-3'

Rv\_*kin-20b*: 5'-CGGGAGAGTTCCACGATTAAG-3'

Fw\_Y45f10D.4: 5'-GTCGCTTCAAATCAGTTCAGC-3'

Rv\_Y45f10D.4: 5'-GTTCTTGCAAGTGATCCGACA-3'

Las secuencias completas de los genes blanco fueron extraídas del *WormBase*, y los *primers* fueron diseñados con el programa *CloneManager* y fueron revisados para la especificidad utilizando NCBI BLAST (Blastn). Para la puesta a punto de cada *set* de *primers* se construyó una curva estándar de 3 puntos (serie de diluciones seriadas 1/10) para cada gen y se determinó la concentración adecuada de *primers* (0,2; 0,4; 0,6 µM) a la cual la eficiencia era mayor. Todos los oligos fueron sintetizados en Macrogen (Corea).

## Resultados

### Registros de luminiscencia de nematodos mutantes para *kin-20* bajo condiciones de LO/FC y OO/CC

Para entender el rol de KIN-20 en el sistema circadiano del nematodo adulto, se estudió los ritmos de luminiscencia de dos cepas mutantes diferentes para el gen *kin-20*: *kin-20(ok505)* que posee una deleción de 2.2 kb en la secuencia del gen que remueve casi toda la secuencia de la proteína (Figura 4.2), y *kin-20(ox423)* que posee una mutación puntual (Q344stop) la cual produce un codón de stop en el exón 3 del gen *kin-20* generando una proteína no funcional con un fenotipo similar a la cepa *kin-20(ok505)* [311] (Figura 4.2). Ambas cepas mutantes presentan un fenotipo fácilmente observable con lupa o microscopio de bajo aumento: muestran una locomoción disminuida, retención de los huevos en la gónada proximal y tiempo de desarrollo más prolongado en comparación con la cepa N2. Por otro lado, estos mutantes presentan un fenotipo muy marcado llamado *dumpy*, en el cual los nematodos se caracterizan por tener un aspecto morfológico más corto y más engrosado en los distintos estadios larvales (Figura 4.6).



**Figura 4. 6.** Imagen de nematodos *wild-type* y nematodos mutantes *kin-20(ok505)* con el fenotipo *dumpy*. Imágenes tomadas con la lupa de microscopía SMZ100 Nikon.

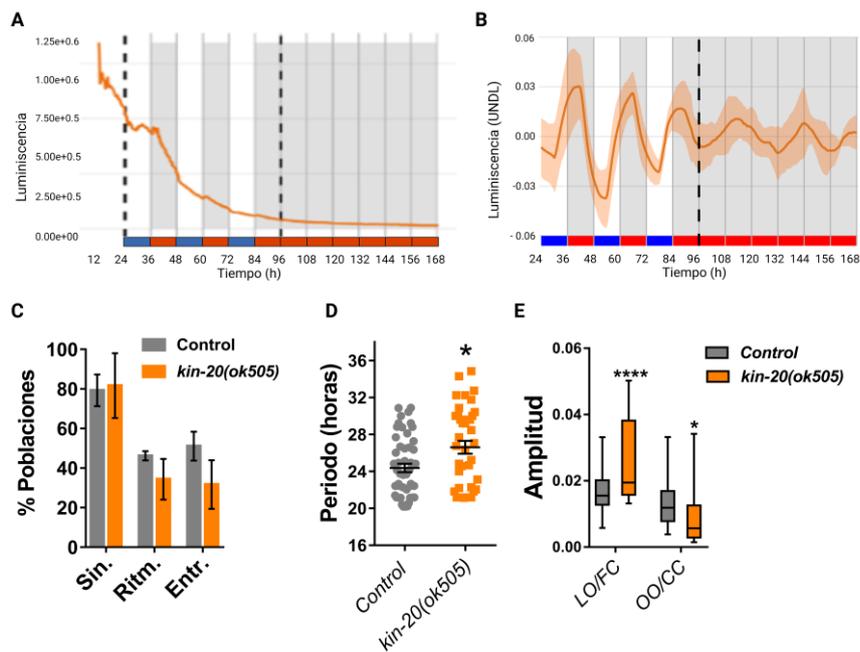
Los datos crudos de luminiscencia, bajo condiciones cíclicas (LO/FC) y bajo condiciones constantes (OO/CC), correspondientes a la cepa VQ1355 [*kin-20(ok505)* X, #5OC; *qvl8*] mostraron una caída de la señal a lo largo del tiempo en las poblaciones, típico de los registros de luminiscencia de nematodos. Durante la fase de oscuridad se observó un incremento en la cantidad de luminiscencia (Figura 4.7 A). Al graficar los datos procesados, se observó un ritmo de luminiscencia robusto bajo condiciones cíclicas (LO/FC) con un aumento claro de la señal durante la fase de oscuridad y alta temperatura. La amplitud de la luminiscencia decayó bajo condiciones constantes (OO/CC), y se observó un aumento significativo en el periodo endógeno en comparación con la cepa control (Figura 4.7 B).

Al analizar los porcentajes de nematodos sincronizados, rítmicos y entrenados, no se encontraron diferencias significativas entre *kin-20(ok505)* versus el control. El porcentaje de sincronizados fue de  $81.66 \pm 16.37 \%$  ( $n=3$ ) para la cepa mutante versus  $79.31 \pm 7.98 \%$  ( $n=6$ ) del control. El porcentaje de rítmicos arrojó valores de  $34.33 \pm 10.27 \%$  ( $n=3$ ) para la línea mutante versus  $46.21 \pm 2.34 \%$  ( $n=6$ ) del control. En el caso del porcentaje de entrenados el mutante dio un valor de  $31.66 \pm 12.25 \%$  ( $n=3$ ) versus  $51.10 \pm 7.30$

% (n=6) para la cepa control. Estos resultados estarían indicando que la cepa *kin-20(ok505)* tiene la capacidad de sincronizar o entrenar al ciclo LO/FC de manera similar a la cepa control (Figura 4.7 C).

En condiciones constantes, la cepa *kin-20(ok505)* mostró un alargamiento del periodo significativo ( $26.61 \pm 0.69$  h, n=39 versus  $24.36 \pm 0.46$  h, n=51 del control) para los ritmos de luminiscencia de *sur-5* en las poblaciones de nematodos rítmicas (Figura 4.7 D). Estos resultados nos indican que la ausencia de la proteína KIN-20 genera una modificación en el periodo endógeno.

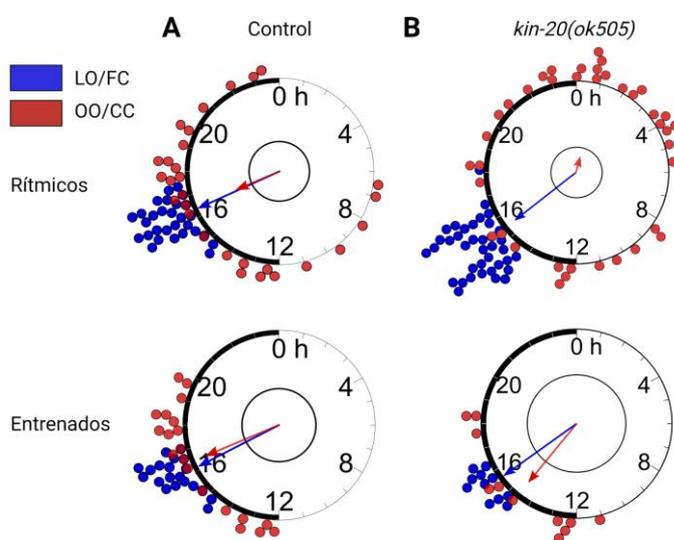
Por otro lado, la amplitud de los ritmos de luminiscencia decae al pasar de condiciones cíclicas a condiciones constantes, tanto para *kin-20(ok505)* como para la cepa control. Bajo ciclos LO/FC la amplitud fue significativamente superior en *kin-20(ok505)* ( $0.026 \pm 0.0019$  UNDL, n=39 versus  $0.016 \pm 0.00085$  UNDL, n=51 control) en la población de nematodos rítmicos. Sin embargo, esta diferencia se invierte bajo condiciones constantes OO/CC: *kin-20(ok505)*:  $0.0085 \pm 0.0013$  UNDL, n=39 versus  $0.013 \pm 0.00099$  UNDL, n=51 control (Figura 4.7 F). Esta caída marcada en la amplitud de la señal de luminiscencia observada tanto en la línea mutante como en la cepa control, puede deberse al envejecimiento de los nematodos.



**Figura 4. 7. Datos de luminiscencia bajo condiciones ciclicas y constantes de *kin-20(ok505)*.** **A.** Datos crudos de luminiscencia para la cepa *kin-20(ok505)* bajo un ciclo dual de luz y temperatura (LO/FC 15.5°C/17°C) por 3 días y bajo condiciones contantes por 4 días más (OO/CC 17°C). **B.** Datos suavizados (*smooth* de 12h) y sin tendencia (*detrend* de 24h) para la cepa mutante. **C.** Porcentaje de nematodos sincronizados, rítmicos y entrenados; no se encontraron diferencias entre *kin20(ok505)* y la cepa control. ANOVA de 2 vías, comparación múltiple. Sidak's multiple comparisons test. **D.** Periodos promedio de la población de nematodos rítmicos de la cepa *kin-20(ok505)*  $26.61 \pm 0.69$  h (n=39) versus el control  $24.36 \pm 0.45$  h (n=51), Mann Whitney test, \*p=0.018. **E.** Amplitud promedio del ritmo de luminiscencia para la población de nematodos rítmicos, *kin-20(ok505)*:  $0.026 \pm 0.0019$  UNDL, n=39 (LO/FC);  $0.0085 \pm 0.0013$  UNDL, n=39 (OO/CC) versus el control:  $0.016 \pm 0.00085$  UNDL, n=51 (LO/FC);  $0.013 \pm 0.00099$  UNDL, n=51 (OO/CC). Se encontró una amplitud significativamente superior en la cepa mutante bajo condiciones ciclicas, esta diferencia se revierte bajo condiciones constantes. ANOVA de 2 vías, comparación múltiple, \*\*\*\*p < 0.0001, \*p= 0.0130.

Los picos de luminiscencia (acrofases) en las poblaciones de nematodos rítmicas fueron encontrados a ZT  $15.49 \pm 0.12$  h para la cepa *kin-20(ok505)*, n = 39 (versus  $14.45 \pm 0.31$  h, n = 51 para la cepa control) mediante un *test de Rayleigh*. Se halló un retraso de fase significativo para la cepa mutante (p=0.0000085, Watson-Wheeler test) bajo LO/FC (Figura 4. 8 A-B). Sin embargo, bajo condiciones constantes (OO/CC) los test de *Rayleigh* no fueron significativos para ninguna de las cepas estudiadas, por lo tanto, no fue posible comparar las acrofases (Figura 4. 8 A-B).

Al analizar las poblaciones de nematodos entrenadas al ciclo LO/FC, *kin-20(ok505)* mostró un corrimiento de fase significativo (p=0.012, Watson-Wheeler test), exhibiendo un retraso en la acrofase (*kin-20(ok505)*): CT  $15.65 \pm 0.18$  h, n = 11; versus CT  $14.54 \pm 0.48$  h, n = 24). Ambas cepas mostraron un test de *Rayleigh* significativo (R>0.5). Contrariamente, no se encontraron diferencias significativas entre las acrofases bajo condiciones constantes (OO/CC) (Figura 4. 8 A-B).



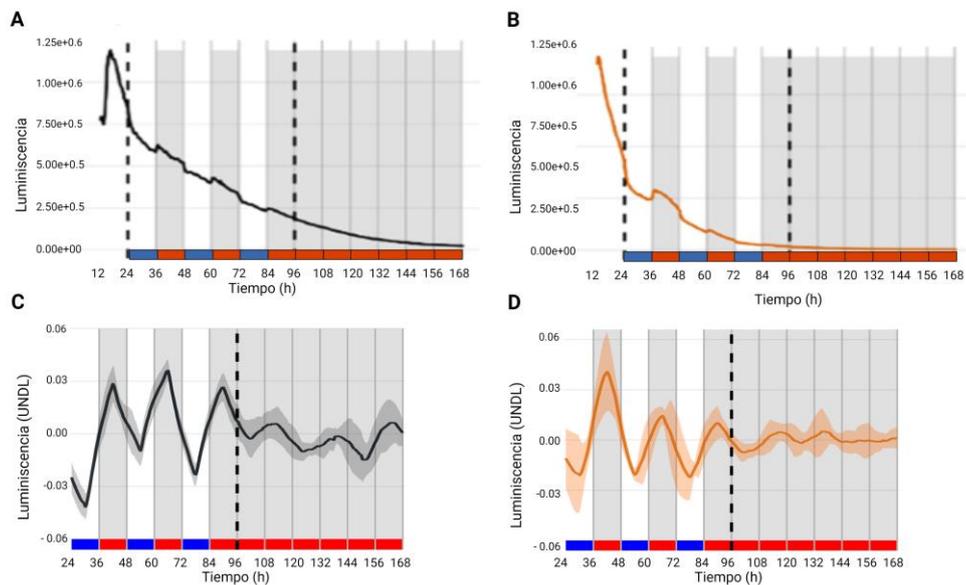
**Figura 4. 8. Acrofases de la población de nematodos *kin-20(ok505)*.** **A.** Gráficos de *Rayleigh* que muestran las acrofases de las señales de las poblaciones de nematodos rítmicos y entrenados bajo condiciones cíclicas (LO/FC, puntos azules) y bajo condiciones constantes (OO/CC, puntos rojos) para la cepa control. **B.** Gráficos de *Rayleigh* que muestran las acrofases de las señales de las poblaciones de nematodos rítmicos y entrenados en condiciones LO/FC (puntos azules) y OO/CC (puntos rojos) para *kin-20(ok505)*. Watson-Wheeler test, \*\*\*\* $p < 0,0001$ ; \* $p < 0,05$ . Se detallan los valores obtenidos para las acrofases para los nematodos rítmicos (Tabla 1) y para los nematodos entrenados (Tabla 2).

	Ciclo	Cepa	R	h	SEM	n	valor p	
Tabla 1	LO/FC	Control	0.83	14.45	0.31	51		****
		<i>kin-20(ok505)</i>	0.97	15.49	0.12	39	0.00000885	
	OO/CC	Control	0.047	15.23	0.73	51		ns
		<i>kin-20(ok505)</i>	0.21	22.83	0.76	39	0.13	
Tabla 2	LO/FC	Control	0.81	14.54	0.48	24		*
		<i>kin-20(ok505)</i>	0.98	15.65	0.18	11	0.012	
	OO/CC	Control	0.48	15.04	0.78	24		ns
		<i>kin-20(ok505)</i>	0.79	14.55	0.73	11	0.15	

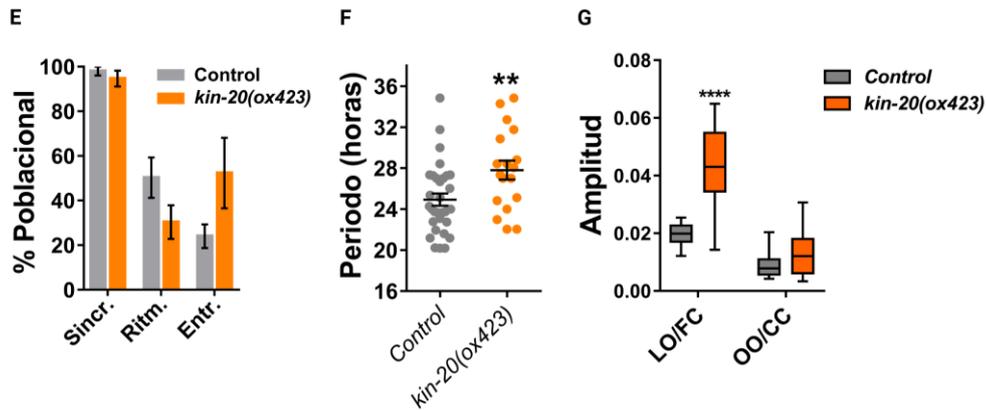
Con el objetivo de analizar con mayor detalle el rol del dominio quinasa de la proteína KIN-20, se utilizó la cepa *kin-20(ox423)*, la cual posee una mutación puntual en el dominio quinasa, generando una proteína no funcional. Se registró la cepa DG1 [*oxIs12 [punc-47::GFP, lin-15(+)] kin-20(ox423) X; qvIs8*], bajo condiciones cíclicas y condiciones constantes, los datos crudos de luminiscencia muestran una caída de la señal a lo largo del tiempo en las poblaciones, típico de los registros de luminiscencia de nematodos. Durante la fase de oscuridad y alta temperatura se observó un incremento en la cantidad de la luminiscencia (Figura 4.9 A y C). Se observó una caída de la amplitud de la señal bajo condiciones constantes, pero manteniendo los ritmos de luminiscencia, con un aumento en la cantidad de la luminiscencia durante la noche subjetiva (Figura 4.9 B y D). El porcentaje de poblaciones sincronizadas de la cepa DG1 no mostró diferencias significativas con el control, lo que significa que *kin-20(ox423)* puede ser sincronizada bajo un estímulo dual de luz y temperatura. Del total de la población analizada de *kin-20(ox423)*, el  $94.66 \pm 3.53$  %,  $n = 3$  (versus  $98 \pm 2$  % del control,  $n = 4$ ) se sincronizaron al ciclo de luz-oscuridad y temperatura. De esa población, el  $30.33 \pm 7.51$  %,  $n = 3$  (versus  $50.25 \pm 9$  % del control,  $n = 4$ ), mantuvieron los ritmos bajo condiciones constantes, y de esa población el  $52,33 \pm 15,77$  %,  $n = 3$  (versus

24 ± 5,26 % del control, n = 4) mantuvieron la acrofase bajo condiciones constantes (Figura 4.9 E). El periodo de las poblaciones rítmicas fue de 27.81 ± 0.92 h (n = 18) (versus 24.93 ± 0.60 h del control (n = 32)), lo que significa que la cepa mutante DG1 muestra un alargamiento significativo del periodo endógeno (Figura 4.9 F).

Por otro lado, la amplitud de la señal de luminiscencia dio significativamente diferente en condiciones cíclicas para las poblaciones de nematodos rítmicos, donde la cepa mutante mostró una amplitud mayor a la cepa control (0.043 ± 0.0038 UNDL, n=18 versus 0.020 ± 0.0006 UNDL, n=32), dicha diferencia se pierde bajo condiciones constantes (0.0130 ± 0.0018 UNDL, n=18 versus 0.0089 ± 0.00073 UNDL, n=32) (Figura 4.9 H). Estos resultados muestran que la mutación Q344stop en la región quinasa de *kin-20* produce una proteína truncada no funcional que altera los ritmos de luminiscencia del gen *sur-5*.

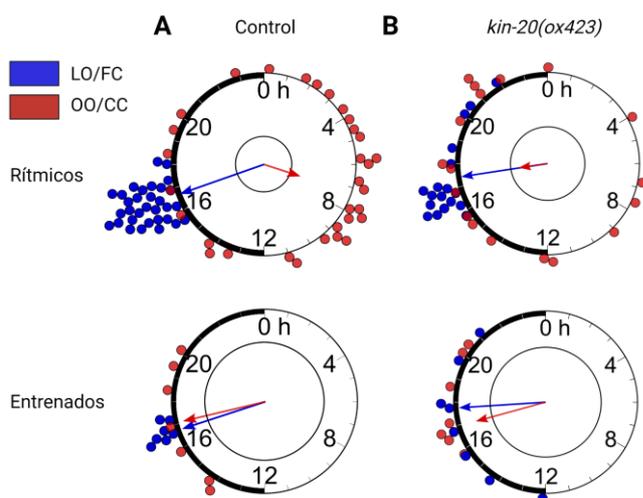


**Figura 4. 9. Datos de luminiscencia bajo condiciones cíclicas y bajo condiciones constantes en *kin-20(ox423)*.** **A-B.** Datos crudos de luminiscencia para la cepa control (**a**) y *kin-20(ox423)* (**b**) bajo un ciclo dual de luz/oscuridad y temperatura (LO/FC 15.5 °C/17 °C) por 3 días y bajo condiciones constantes por 4 días más (OO/CC 17 °C). **C-D.** Datos tratados con suavizado (*smooth* de 12h) y sin tendencia (*detrend* de 24h) para el control (**c**) y *kin-20(ox423)* (**d**).



**Continuación Figura 4. 9. Datos de luminiscencia bajo condiciones cíclicas y bajo condiciones constantes en *kin-20(ox423)*.** **E.** Porcentaje de nematodos sincronizados, rítmicos y entrenados; no se encontraron diferencias entre *kin20(ox423)* y la cepa control. ANOVA de 2 vías, Sidak's multiple comparisons test. **F.** Período promedio de las oscilaciones correspondientes a las poblaciones de nematodos rítmicos de *kin-20(ox423)*  $27.81 \pm 0.92$  h (n = 18) versus el control  $24.93 \pm 0.60$  h (n = 32), t-test no pareado,  $**p=0.0075$ . **G.** Promedio de la amplitud del ritmo de luminiscencia para la población de nematodos rítmicos, *kin-20(ox423)*:  $0.043 \pm 0.0038$  UNDL, n = 18 (LO/FC);  $0.0130 \pm 0.0018$  UNDL, n = 18 (OO/CC) versus el control:  $0.020 \pm 0.0006$  UNDL, n = 32 (LO/FC);  $0.0089 \pm 0.00073$  UNDL, n = 32 (OO/CC). Se encontró una amplitud significativamente superior en la cepa mutante bajo condiciones cíclicas, esta diferencia se pierde bajo condiciones constantes. ANOVA de 2 vías, comparación múltiple,  $****p < 0.0001$ ,  $*p = 0.0130$ .

Al analizar las acrofases de las poblaciones rítmicas, no se encontraron diferencias entre la cepa *kin-20(ox423)* (ZT  $17.46 \pm 0.37$  h, n = 18) versus el control (ZT  $16.7 \pm 0.10$  h, n = 32) bajo condiciones cíclicas. Bajo condiciones constantes, *kin-20(ox423)* mostró un cambio de fase significativo en comparación con la cepa control (CT  $17.43 \pm 1.07$  h, n = 18 vs CT  $7.1 \pm 0.76$  h, n = 32 del control), *test de Rayleigh* (Figura 4.10 A-B). Bajo condiciones cíclicas, la población de nematodos entrenados mostró un pico de luminiscencia significativo a ZT  $17.76 \pm 0.54$  h (n = 8) para *kin-20(ox423)* versus la cepa control, ZT  $16.86 \pm 0.11$  h (n = 7) (Figura 4.10 A-B). No se hallaron diferencias significativas entre *kin-20(ox423)* (CT  $17.01 \pm 0.91$  h, n = 8) versus la cepa control (CT  $17.1 \pm 0.82$  h, n = 7) bajo condiciones constantes (Figura 4.10 A-B). Estos resultados nos indicarían que *kin-20(ox423)* genera un cambio de fase bajo condiciones constantes tomando la población de nematodos rítmicos.



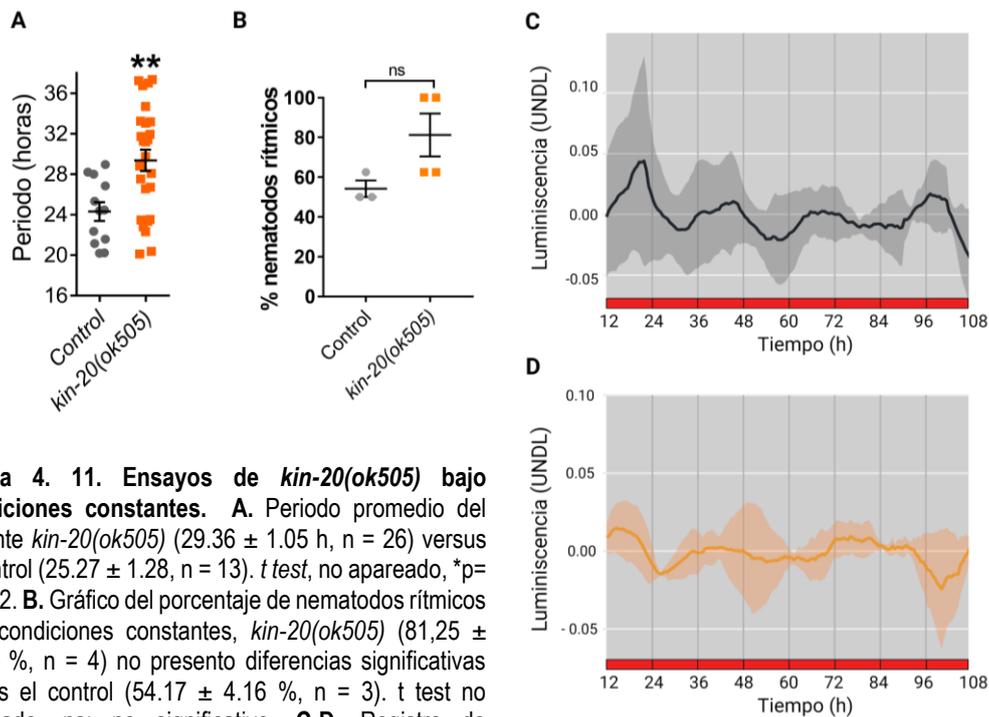
**Figura 4. 10. Acrofases de *kin-20(ox423)*.**

**A.** Gráficos de *Rayleigh* para las acrofases de la población de nematodos rítmicos y entrenados bajo condiciones cíclicas (LO/FC, puntos azules) y bajo condiciones constantes (OO/CC, puntos rojos) para la cepa control. **B.** Gráficos de *Rayleigh* de las acrofases para la población de nematodos rítmicos y entrenados en condiciones LO/FC (puntos azules) y OO/CC (puntos rojos) para *kin-20(ox423)*. *Watson-Wheeler test*, \* $p > 0.05$ . Se detallan los valores obtenidos para las acrofases para los nematodos rítmicos (Tabla 1) y para los nematodos entrenados (Tabla 2).

	Ciclo	Cepa	R	h	SEM	n	valor p	
Tabla 1	LO/FC	Control	0.98	16.7	0.10	32		ns
		<i>kin-20(ox423)</i>	0.91	17.46	0.37	18	0.94	
	OO/CC	Control	0.35	7.1	0.76	32		*
		<i>kin-20(ox423)</i>	0.28	17.43	1.07	18	0.028	
Tabla 2	LO/FC	Control	0.81	14.54	0.48	24		*
		<i>kin-20(ok505)</i>	0.98	15.65	0.18	11	0.012	
	OO/CC	Control	0.48	15.04	0.78	24		ns
		<i>kin-20(ok505)</i>	0.79	14.55	0.73	11	0.15	

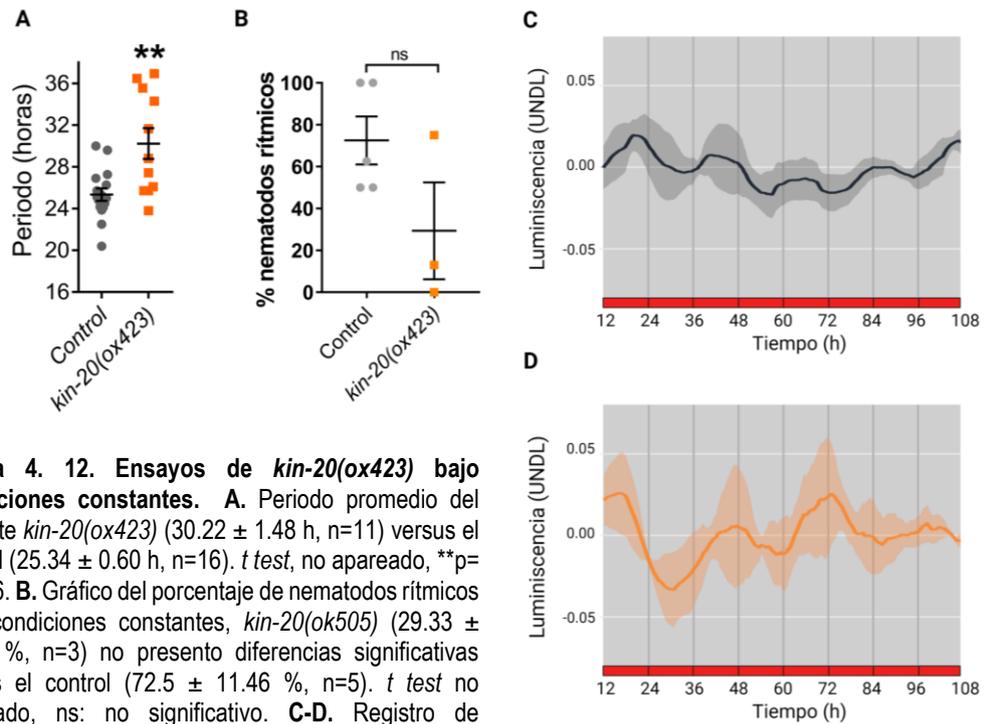
### Registros de luminiscencia de *kin-20* mutante bajo condiciones constantes

Para corroborar que los mutantes de KIN-20, tanto *kin-20(ok505)* como *kin-20(ox423)*, tienen la capacidad de continuar oscilando sin un estímulo externo, se repitieron los ensayos poblaciones solo en condiciones constantes OO/CC (oscuridad y 20°C). Los resultados obtenidos mostraron que *kin-20(ok505)* tiene un alargamiento del periodo endógeno en los ritmos de luminiscencia ( $29.36 \pm 1.05$  h,  $n = 26$  versus  $25.27 \pm 1.28$  h,  $n=13$ , del control) (Figura 4.11 A). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en la cantidad de nematodos rítmicos bajo las condiciones ensayadas ( $81,25 \pm 10,83$  %,  $n=4$  versus  $54,17 \pm 4,16$  %,  $n=3$  del control) (Figura 4.11 B). Al igual que la cepa control (Figura 4.11 C), se observó que *kin-20(ok505)* mantiene un ritmo robusto bajo condiciones constantes, con un aumento de la señal de luminiscencia durante la noche subjetiva (Figura 4.11 D).



**Figura 4. 11. Ensayos de *kin-20(ok505)* bajo condiciones constantes.** **A.** Periodo promedio del mutante *kin-20(ok505)* ( $29.36 \pm 1.05$  h,  $n = 26$ ) versus el control ( $25.27 \pm 1.28$ ,  $n = 13$ ). *t* test, no apareado,  $*p = 0,0242$ . **B.** Gráfico del porcentaje de nematodos rítmicos bajo condiciones constantes, *kin-20(ok505)* ( $81,25 \pm 10,83$  %,  $n = 4$ ) no presenta diferencias significativas versus el control ( $54.17 \pm 4.16$  %,  $n = 3$ ). *t* test no apareado, ns: no significativo. **C-D.** Registro de luminiscencia promedio (UNDL)  $\pm$  SEM de nematodos poblacionales del control (c) y *kin-20(ok505)* (d).

Posteriormente, se analizó la cepa mutante *kin-20(ox423)* bajo condiciones constantes (oscuridad, 20 °C). Se encontró un aumento significativo en el periodo endógeno de la cepa *kin-20(ox423)* ( $30.22 \pm 1.48$  h,  $n = 11$ ) versus la cepa control ( $25.34 \pm 0.60$  h,  $n = 16$ ) (Figura 4.12 A). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de nematodos rítmicos entre la cepa *kin-20(ox423)* ( $29.33 \pm 23.14$  %,  $n=3$ ) y la cepa control ( $72.5 \pm 11.46$  %,  $n=5$ ) (Figura 4.12 B). Se observó que tanto *kin-20(ox423)* como la cepa control, tienen un ritmo de luminiscencia robusto bajo condiciones constantes, con un aumento en la señal de luminiscencia durante la noche subjetiva (Figura 4.12 C-D). Estos resultados indicarían que una delección específica en la región quinasa de la proteína KIN-20 produce una alteración en los ritmos transcripcionales del gen *sur-5*.



**Figura 4. 12. Ensayos de *kin-20(ox423)* bajo condiciones constantes.** **A.** Periodo promedio del mutante *kin-20(ox423)* ( $30.22 \pm 1.48$  h,  $n=11$ ) versus el control ( $25.34 \pm 0.60$  h,  $n=16$ ). *t test*, no apareado,  $**p=0,0066$ . **B.** Gráfico del porcentaje de nematodos rítmicos bajo condiciones constantes, *kin-20(ok505)* ( $29.33 \pm 23.14$  %,  $n=3$ ) no presenta diferencias significativas versus el control ( $72.5 \pm 11.46$  %,  $n=5$ ). *t test* no apareado, ns: no significativo. **C-D.** Registro de luminiscencia promedio (UNDL)  $\pm$  SEM de nematodos poblacionales del control (c) y *kin-20(ox423)* (d).

A continuación, se muestran las tablas 4.2 y 4.3 con un resumen de los resultados obtenidos para las cepas *kin-20(ok505)* y *kin-20(ox423)*, para cada variable estudiada (porcentaje de poblaciones sincronizadas, rítmicas y entrenadas, periodo endógeno ( $\tau$ ) y amplitud. Los datos de las acrofases se encuentran en la tabla de la Figura 4.8 (*kin-20(ok505)*) y Figura 4.10 (*kin-20(ox423)*).

Cepa	Genotipo	LO/FC (15°C, 17°C) y OO/CC (17°C)			Tau (h)	LO/FC	OO/CC
		% Sincronizados	% Rítmicos	% Entrenados			
VQ1310	<i>qvIs8 (psur5::luc::gfp)</i>	79.31 ± 7.98 (n=6)	46.21 ± 2.34 (n=6)	51.10 ± 7.30 (n=6)	24.36 ± 0.46 (n=51)	0.016 ± 0.0009 (n=51)	0.013 ± 0.001 (n=51)
VQ1355	<i>kin-20(ok505), qvIs8</i>	81.66 ± 16.37 (n=3)	34.33 ± 10.27 (n=3)	31.66 ± 12.25 (n=3)	26.61 ± 0.69 (n=39)	0.026 ± 0.0019 (n=39)	0.0085 ± 0.0013 (n=39)
VQ1310	<i>qvIs8 (psur5::luc::gfp)</i>	98 ± 2 (n=4)	50.25 ± 9.00 (n=4)	24 ± 5.26 (n=4)	24.99 ± 0.60 (n=32)	0.020 ± 0.0006 (n=32)	0.0089 ± 0.00073 (n=32)
DG1	<i>kin-20(ox423), qvIs8</i>	94.66 ± 3.53 (n=3)	30.33 ± 7.51 (n=3)	52.33 ± 15.77 (n=3)	27.81 ± 0.92 (n=18)	0.043 ± 0.0038 (n=18)	0.0130 ± 0.0018 UNDL (n=18)

Tabla 4.2

OO/CC (20°C)	Cepa	Genotipo	Tau (h)	n (Total)	% Rítmicos
VQ1355	<i>kin-20(ok505), qvIs8</i>	29.36 ± 1.05	26	81.25 ± 10.83 (n=4)	
VQ1310	<i>qvIs8 (psur5::luc::gfp)</i>	25.34 ± 0.60	16	72.5 ± 11.46 (n=5)	
DG1	<i>kin-20(ox423), qvIs8</i>	30.22 ± 1.48	11	29.33 ± 23.14 (n=3)	

Tabla 4.3

Todos estos resultados indican que la proteína KIN-20 es necesaria para determinar el período de los ritmos circadianos en *C. elegans*, pero no estaría involucrada en el entrenamiento circadiano.

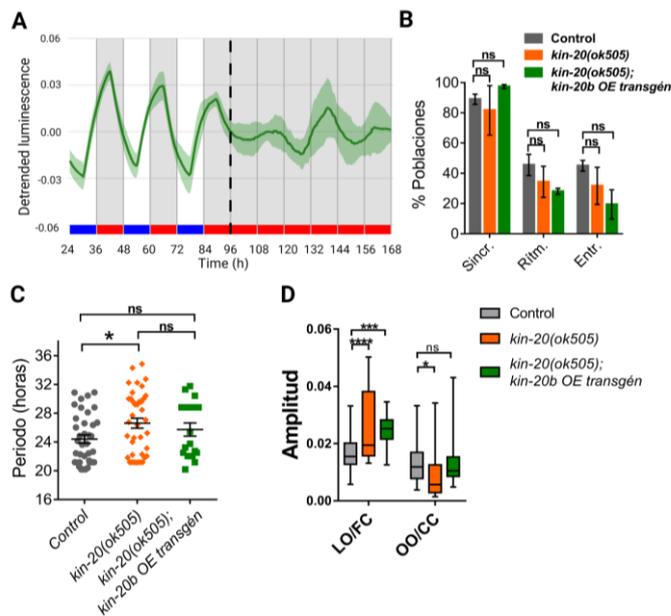
## Registros de luminiscencia de nematodos rescatados para la proteína KIN-20

Para constatar que la disminución en la expresión de *kin-20* (cepa *kin-20(ok505)*) afectó los ritmos circadianos de luminiscencia, los defectos en este mutante fueron rescatados mediante la sobre-expresión del transgén *kin-20b*. La mutación en el alelo *ok505* se rescató con la sobre-expresión de *kin-20b* mediante un arreglo extracromosomal que expresa el constructo *pkin-20b::kin-20b::RFP* (ver materiales y métodos), cepa VQ1358 [*kin-20(ok505)* X; *qvl8* (*psur5::luc::gfp*; *punc-122::RFP*); *qvEx389* (*pkin-20::kin-20b::RFP*, pBB107)].

Se llevaron a cabo registros de luminiscencia de la línea VQ1358 (también llamada *kin-20b* OE (*over expression*) transgén) bajo un ciclo dual de luz/oscuridad y temperatura (LO/FC 12:12h 15.5°C-17°C). Los resultados mostraron un ritmo de luminiscencia, donde se observó un aumento de la señal de luminiscencia en la fase nocturna del ciclo dual, el ritmo continuó bajo condiciones constantes (Figura 4. 13 A). No se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de nematodos sincronizados entre las cepas *kin-20b* OE transgén y el control ( $97.33 \pm 1.33$  %,  $n = 3$  versus  $89 \pm 3.41$ %,  $n = 4$ , del control). Tampoco se encontraron diferencias significativas entre las poblaciones de nematodos rítmicos ( $28 \pm 2$ %,  $n = 3$ , *kin-20b* OE transgén versus  $45 \pm 7.03$ ,  $n = 4$ , control); de igual forma, no se encontraron diferencias significativas entre las poblaciones de nematodos entrenados ( $19.33 \pm 9.66$ %,  $n = 3$ , *kin-20b* OE transgén versus  $45 \pm 3.58$   $n = 4$ , del control) (Figura 4. 13 B).

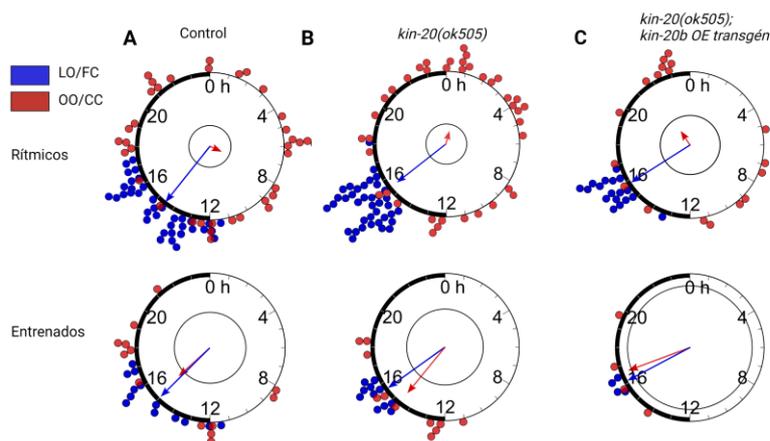
Por otro lado, al analizar el periodo de luminiscencia se encontró que la cepa *kin-20b* OE transgén ( $25.73 \pm 0.91$  h,  $n = 18$ ) no mostró diferencias significativas con la cepa control ( $24.4 \pm 0.57$  h,  $n = 37$ ), ni con la cepa *kin-20(ok505)* ( $26.61 \pm 0.69$  h,  $n = 39$ ). Sin embargo, la cepa *kin-20(ok505)* tiene un aumento del periodo endógeno significativo versus la cepa control (Figura 4.13 C). Estos resultados sugieren que la cepa *kin-20b* OE transgén no es un rescate total, sino que se trata de un rescate parcial.

La amplitud promedio de los ritmos de luminiscencia bajo condiciones cíclicas (LO/FC) fue mayor para la cepa *kin-20b* OE transgén ( $0.025 \pm 0.001$  UNDL,  $n=18$ ) y para la cepa *kin-20(ok505)* ( $0.026 \pm 0.002$  UNDL,  $n=39$ ) versus el control ( $0.016 \pm 0.0009$  UNDL,  $n=51$ ) (Figura 4. 13 D). Bajo condiciones constantes (OO/CC), la cepa *kin-20(ok505)* mostró una disminución marcada en la amplitud promedio del ritmo de luminiscencia (*kin-20(ok505)*:  $0.008 \pm 0.001$ ,  $n=39$ , versus el control:  $0.013 \pm 0.001$  UNDL,  $n=51$ ). Sin embargo, la amplitud promedio de luminiscencia correspondiente a la cepa *kin-20b* OE transgén no mostró diferencias significativas con la cepa control ( $0,013 \pm 0,002$ ;  $n=18$  vs  $0.013 \pm 0.001$  UNDL,  $n=51$ , del control) (Figura 4.13 D).



**Figura 4. 13. Ritmos de luminiscencia de *sur-5* en la cepa *kin-20b* transgén.** **A.** Gráfico representativo de los ritmos de luminiscencia de *sur-5* medidos por la luminiscencia sin la tendencia (*detrend*) en LO/FC y OO/CC para *kin-20(ok505)* rescatada [*kin-20(ok505); kin-20b* transgén OE (*over-expression*)]. **B.** Porcentaje de nematodos sincronizados, rítmicos y entrenados, para la cepa control, *kin-20(ok505)* y *kin-20(ok505)* rescatada. No se observaron diferencias significativas en la población de nematodos sincronizados, rítmicos y entrenados, ANOVA de dos vías, *Tukey's multiple comparisons test*. **C.** Promedio del periodo endógeno para la población de nematodos rítmicos para la cepa control, *kin-20(ok505)* y *kin-20(ok505)* rescatada. ANOVA de una vía, *Tukey's multiple comparisons test*, \* $p=0,0135$ . **D.** Amplitud promedio para la población de nematodos rítmicos en LO/FC y OO/CC, para las cepas control, *kin-20(ok505)* y *kin-20(ok505)* rescatada, ANOVA de dos vías, *Sidak's multiple comparisons test*, \*\*\*\* $p<0,0001$ ; \*\*\* $p=0.0006$ ; \* $p=0.016$ .

Como se mencionó antes, bajo condiciones cíclicas (LO/FC) se encontró un cambio de fase significativo entre la cepa *kin-20(ok505)* y el control ( $ZT15.49 \pm 0.12$  h,  $n = 39$  versus  $ZT14.45 \pm 0.31$  h,  $n = 51$  del control) para la población de nematodos rítmicos. De igual manera, la cepa *kin-20b* OE transgén mostró un cambio de fase significativo versus la cepa control ( $ZT 15,83 \pm 0,18$ ;  $n=18$  versus  $ZT14.45 \pm 0.31$  h,  $n = 51$  del control), pero de menor significancia que la cepa *kin-20(ok505)*. Bajo condiciones constantes (OO/CC), no se encontraron diferencias significativas para la población de nematodos rítmicos (Figura 4.14 A-B). Al evaluar la población de nematodos entrenados, la cepa *kin-20(ok505)* ( $15.65 \pm 0.18$  h,  $n=11$ ) presentó un cambio de fase significativo versus la cepa control ( $14.54 \pm 0.48$  h,  $n = 24$ ); contrariamente, no se encontraron diferencias significativas entre la cepa *kin-20b* OE transgén ( $16.11 \pm 0.15$  h,  $n = 4$ ) versus la cepa control ( $14.54 \pm 0.48$  h,  $n = 24$ ). En condiciones constantes (OO/CC), no se encontraron diferencias significativas entre las cepas estudiadas (Figura 4.14 A-B).



**Tabla 1**

Ciclo	Cepa	R	h	SEM	n	valor p	
LO/FC	Control	0.83	14.45	0.31	51	****	
	<i>kin-20(ok505)</i>	0.97	15.49	0.12	39		**
	<i>kin-20(ok505); kin-20b</i> transgén OE	0.97	15.83	0.18	18		0.002
OO/CC	Control	0.047	15.23	0.73	51	NS	
	<i>kin-20(ok505)</i>	0.21	22.83	0.76	39		0.13
	<i>kin-20(ok505); kin-20b</i> transgén OE	0.098	2.03	1.2	18		0.74

**Tabla 2**

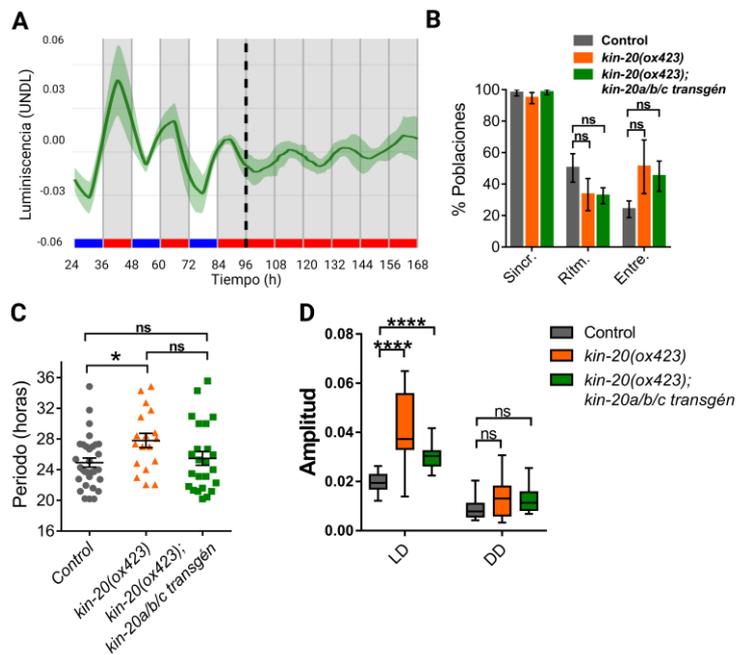
Ciclo	Cepa	R	h	SEM	n	valor p	
LO/FC	Control	0.81	14.54	0.48	24	*	
	<i>kin-20(ok505)</i>	0.98	15.65	0.18	11		0.012
	<i>kin-20(ok505); kin-20b</i> transgén OE	0.99	16.11	0.15	4		0.08
OO/CC	Control	0.48	15.04	0.78	24	NS	
	<i>kin-20(ok505)</i>	0.79	14.55	0.73	11		0.15
	<i>kin-20(ok505); kin-20b</i> transgén OE	0.86	16.65	0.97	4		0.34

**Figura 4. 14. Acrofase de la población de nematodos rescatados *kin-20b* OE transgén.** Gráficos de *Rayleigh* para las acrofases de la población de nematodos rítmicos y entrenados bajo condiciones cíclicas (LO/FC, puntos azules) y bajo condiciones constantes (OO/CC, puntos rojos), control (A), *kin-20(ok505)* (B), *kin-20(ok505); kin-20b* transgén OE (C). *Watson-Wheeler test*, \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ . Se detallan los valores obtenidos para las acrofases para los nematodos rítmicos (Tabla 1) y para los nematodos entrenados (Tabla 2).

Debido a que la línea *kin-20b* OE transgén dio un fenotipo circadiano intermedio, se generó el rescate de la mutación en el alelo *ox423* del gen *kin-20*. Dicha cepa rescate se realizó por integración en el genoma del constructo *kin-20a/b/c*, generando la cepa DG2 [*oxSi1087* [*pkin-20::RFP::kin-20::kin-20UTR*, *Cb unc-119(+)* \**ttTi5605*] II; *kin-20(ox423)* X; *qvl8* [*psur-5::luc::gfp* + *punc-122::RFP*]] (ver sección Materiales y Métodos).

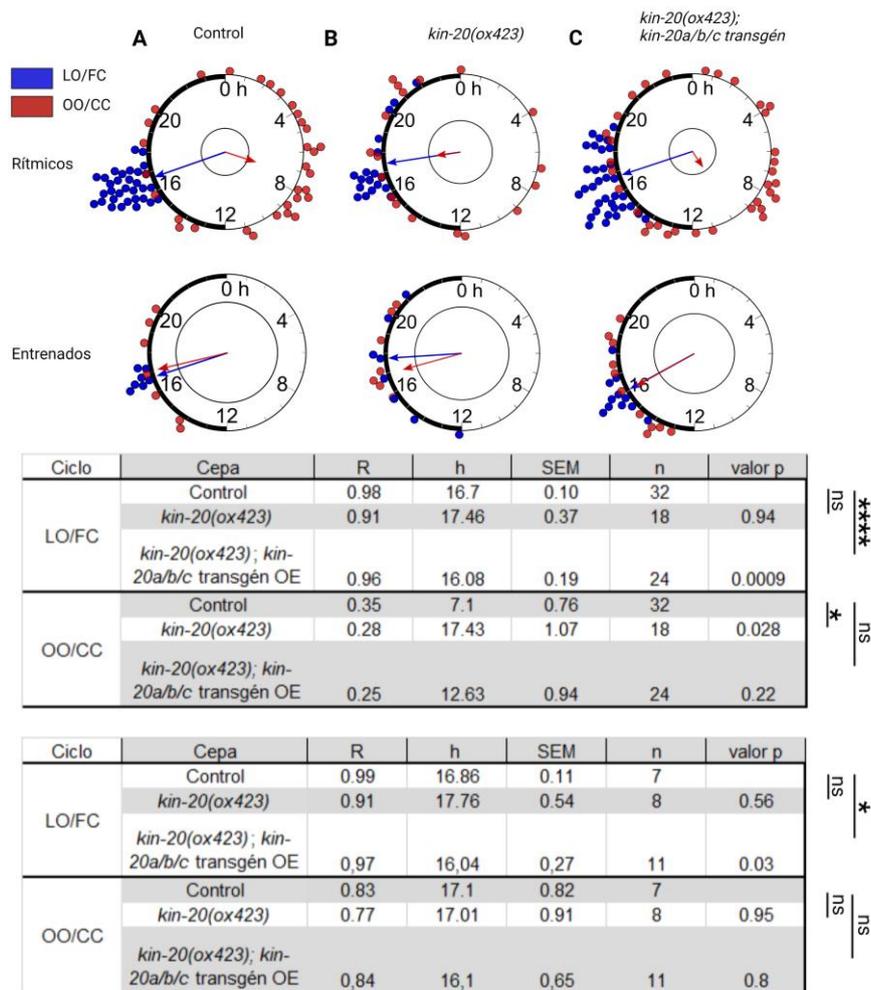
La cepa DG2 (también denominada *kin-20(ox423); kin-20a/b/c* transgén), presentó una oscilación del ritmo de luminiscencia de *sur-5* robusta tanto bajo condiciones cíclicas (LO/FC) como condiciones constantes (OO/CC), presentando un aumento de la señal de luminiscencia durante la fase nocturna (Figura 4.15 A). No se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de nematodos sincronizados entre las cepas *kin-20(ox423)* ( $94.66 \pm 3.52$  %,  $n = 3$ ) y *kin-20(ox423); kin-20a/b/c* transgén ( $98.40 \pm 1.60$  %,  $n = 5$ ) versus la cepa control ( $98 \pm 2$  %,  $n = 4$ ) (Figura 4.15 B). Tampoco se encontraron diferencias significativas

en la población de nematodos rítmica entre las cepas *kin-20(ox423)* ( $33.33 \pm 10.71$  %, n = 3) y *kin-20(ox423); kin-20a/b/c* transgén ( $32.60 \pm 5.05$  %, n = 5) versus la cepa control ( $50.25 \pm 9$  %, n = 4) (Figura 4.15 B). De igual forma, no se encontraron diferencias significativas en la cantidad de nematodos entrenados entre las cepas *kin-20(ox423)* ( $51 \pm 17.06$  %, n = 3) y *kin-20(ox423); kin-20a/b/c* transgén ( $45 \pm 9.63$  %, n = 5) versus la cepa control ( $24 \pm 5.60$  %, n = 4) (Figura 4.15 C). Al analizar el período de la oscilación, no se encontraron diferencias significativas entre la cepa *kin-20(ox423); kin-20a/b/c* transgén ( $25.46 \pm 0.89$  h, n = 24) versus el control ( $24.93 \pm 0.59$  h, n = 32). En cambio, se encontraron diferencias significativas entre la cepa *kin-20(ox423)* ( $27.81 \pm 0.92$  h, n = 18) versus el control (Figura 4.15 C). Al comparar las cepas *kin-20(ox423)* versus *kin-20(ox423); kin-20a/b/c* transgén no se encontraron diferencias significativas (Figura 4.15 C). Estos resultados indican que la línea *kin-20a/b/c* transgén, tiene la capacidad de rescatar la mutación en el alelo *ox423*, siendo este rescate un rescate parcial. La amplitud de la señal de luminiscencia disminuye bajo condiciones constantes (OO/CC) para todas las cepas estudiadas. Bajo condiciones cíclicas (LO/FC), la amplitud de la señal para la cepa *kin-20(ox423)* ( $0.042 \pm 0.003$  UNDL, n = 27) y *kin-20(ox423); kin-20a/b/c* transgén ( $0.030 \pm 0.001$  UNDL, n=24) aumenta significativamente versus la cepa control ( $0.020 \pm 0.0006$  UNDL, n = 36) (Figura 4.15 D). Contrariamente, bajo condiciones constantes (OO/CC), no se encontraron diferencias significativas entre las cepas *kin-20(ox423)* ( $0.013 \pm 0.001$  UNDL, n=27) y *kin-20(ox423); kin-20a/b/c* transgén ( $0.013 \pm 0.001$  UNDL, n=24) versus la cepa control ( $0.009 \pm 0.0007$  UNDL, n=36) (Figura 4.15 D).



**Figura 4. 15. Ritmos de luminiscencia del gen *sur-5* en la cepa *kin-20(ox423); kin-20a/b/c* transgén. **A.** Gráfico representativo de los ritmos transcripcionales de *sur-5* medidos por la luminiscencia sin la tendencia (*detrend*) en LO/FC y OO/CC para *kin-20(ox423)* rescatada [*kin-20(ox423); kin-20a/b/c* transgén]. **B.** Porcentaje de nematodos sincronizados, rítmicos y entrenados, para la cepa control, *kin-20(ox423)* y *kin-20(ox423)* rescatada. No se observaron diferencias significativas en la población de nematodos sincronizados, rítmicos y entrenados, ANOVA de dos vías, *Tukey's multiple comparisons test*. **C.** Promedio del periodo endógeno para la población de nematodos rítmicos para la cepa control, *kin-20(ox423)* y *kin-20(ox423)* rescatada. ANOVA de una vía, *Tukey's multiple comparisons test*, \* $p=0,0365$ . **D.** Amplitud promedio para la población de nematodos rítmicos en LO/FC y OO/CC, para las cepas control, *kin-20(ox423)* y *kin-20(ox423)* rescatada, ANOVA de dos vías, *Sidak's multiple comparisons test*, \*\*\*\* $p<0,0001$ .**

Al analizar la acrofase promedio de la población de nematodos rítmica, *kin-20(ox423)* no se encontraron diferencias significativas con la cepa control. Contrariamente a lo esperado, bajo condiciones LO/FC la cepa rescatada presentó un cambio de fase significativo versus la cepa control. Bajo condiciones constantes no es posible comparar las acrofases ya que los *Rayleigh* no son significativos ( $R<0.5$ ) para las cepas estudiadas (Figura 4.16 A-C). Para las poblaciones entrenadas, la cepa rescatada mostró un cambio de fase significativo versus la cepa control bajo condiciones cíclicas. Contrariamente, no se encontraron diferencias significativas entre las acrofases de *kin-20(ox423)* vs la cepa control. Bajo condiciones constantes no se encontraron diferencias significativas entre las cepas (Figura 4.16 A-C). Observando la población de nematodos entrenados, los resultados indicarían que la cepa *kin-20(ox423)* tiene un cambio de fase con respecto a la cepa control bajo condiciones cíclicas, al rescatar la mutación la acrofase recupera los valores normales. Los nematodos rescatados exhiben un ritmo de luminiscencia con un período similar al de la cepa control, sin embargo, la población de sincronizados, rítmicos y entrenados fue similar en el mutante y en la cepa con el rescate.



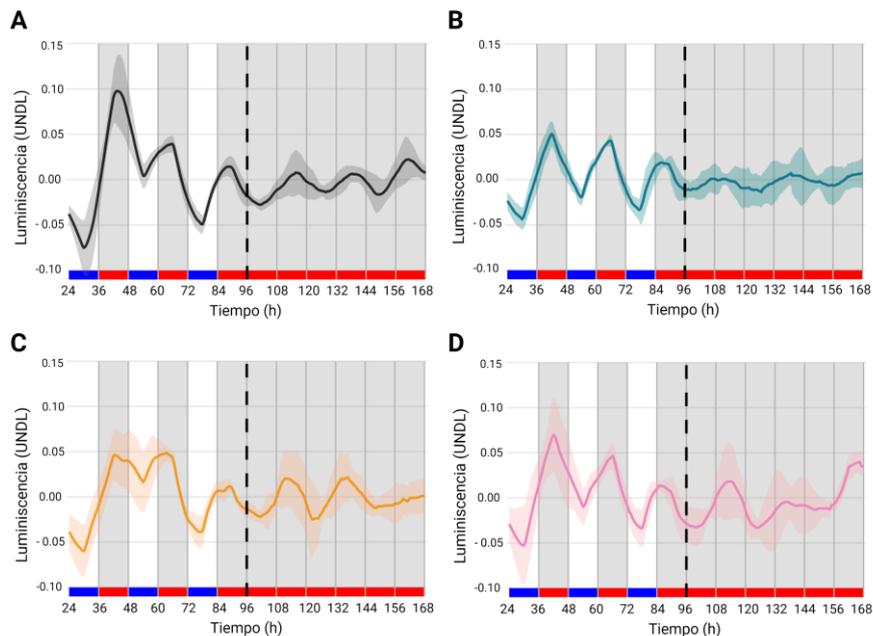
**Figura 4. 16. Acrofase de la población de nematodos rescatados *kin-20a/b/c* transgén.** Gráficos de Rayleigh para las acrofases de la población de nematodos rítmicas y entrenados bajo condiciones cíclicas (LO/FC, puntos azules) y bajo condiciones constantes (OO/CC, puntos rojos), control (A), *kin-20(ox423)* (B), *kin-20(ox423); kin-20a/b/c transgén OE* (over expression) (C). Watson-Wheeler test, \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

### Sobre-expresión de la proteína KIN-20

Dado que nuestros resultados mostraron que una disminución en los niveles de expresión de la proteína KIN-20 afectan los ritmos circadianos del nematodo adulto, decidimos estudiar cuál es el efecto de aumentar los niveles basales de KIN-20. Para ello, se sobreexpresó KIN-20b, c y d en la cepa control, generando las cepas DG4 [*qvEx389 (pkin-20::kin-20b::RFP, pBB107); qvls8 (psur-5::luc::gfp; punc-122::RFP)*], DG7 [*qvEx359 (pkin-20::kin-20c::RFP, pCFJ90); qvls8 (psur-5::luc::gfp; punc-122::RFP)*] y DG5 [*qvEx350 (pkin-20::kin-20d::RFP, pCFJ90); qvls8 (psur-5::luc::gfp; punc-122::RFP)*].

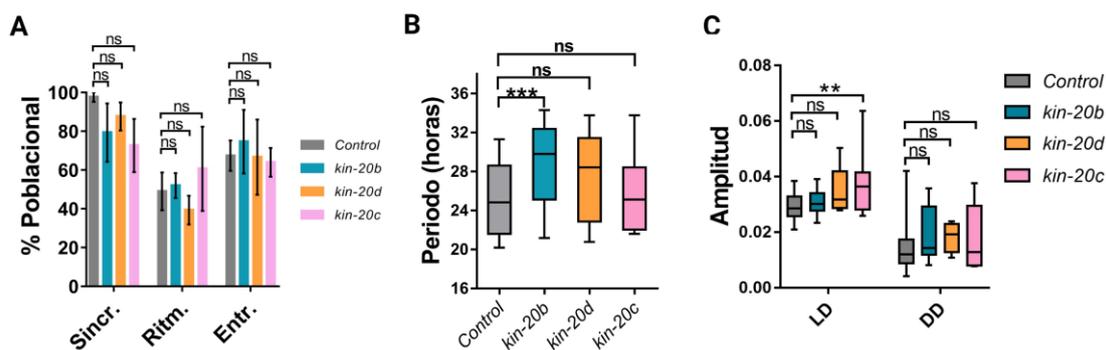
Se estudiaron los ritmos de luminiscencia en condiciones de LO/FC y OO/CC, de las cepas DG4 (*kin-20b* OE transgén), DG7 (*kin-20c* OE transgén) y DG5 (*kin-20d* OE transgén). Al analizar los ritmos de luminiscencia de *sur-5*, se encontró que todas las cepas estudiadas mostraron un ritmo de luminiscencia

robusto tanto bajo condiciones cíclicas como constantes (Figura 4.17 A-D). Se observó un aumento en la señal de luminiscencia durante la fase nocturna del ciclo, y durante la noche subjetiva.



**Figura 4. 17. Ritmo de luminiscencia de *sur-5* en las cepas que sobre-expresan *kin-20*.** Gráfico representativo de los ritmos de luminiscencia de *sur-5* medidos por la luminiscencia sin la tendencia (*detrend*) en LO/FC y OO/CC para la cepa control (A), y las cepas que sobre-expresan las isoformas de *kin-20*: *kin-20b* (B), *kin-20c* (C) y *kin-20d* (D).

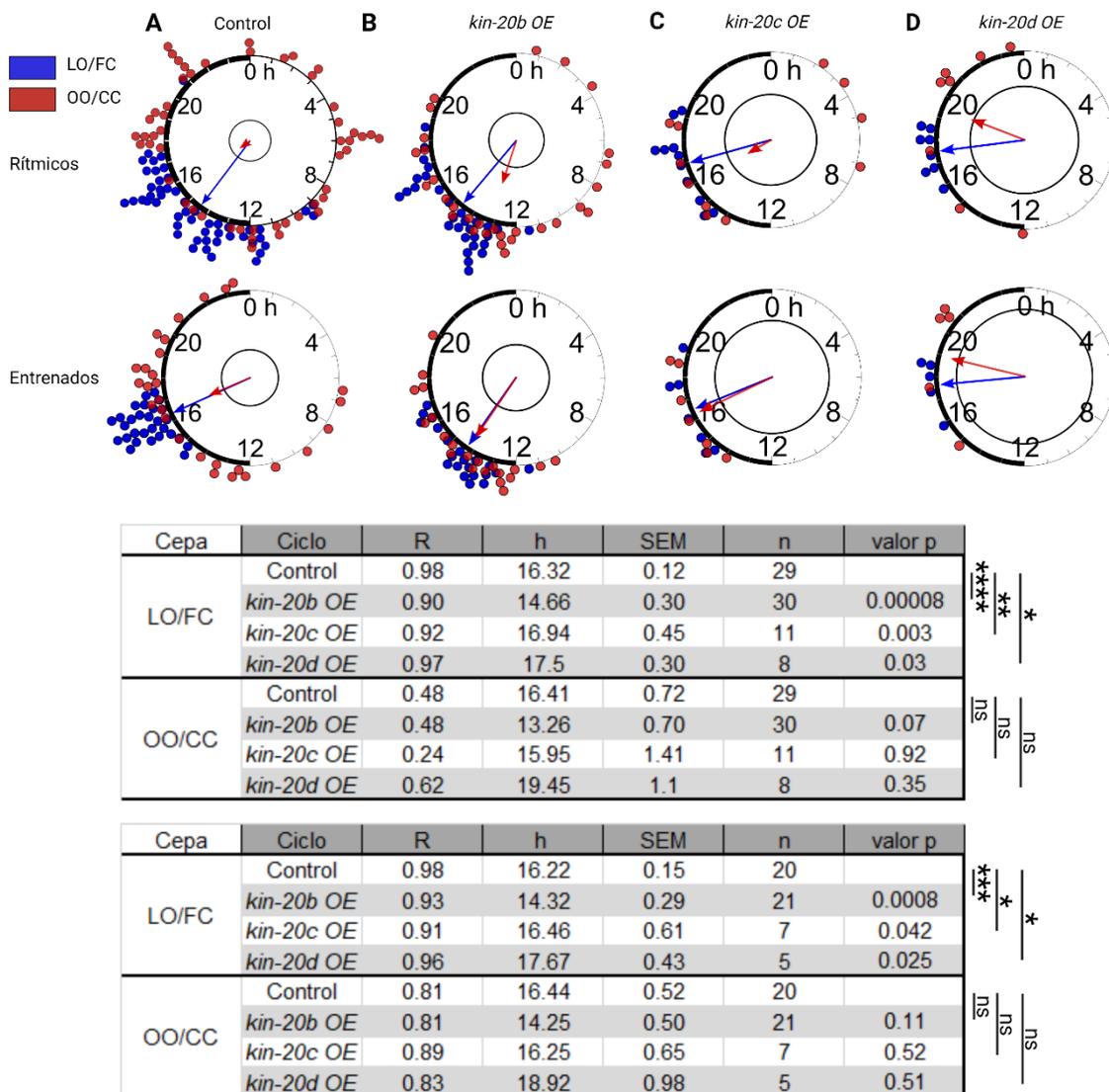
Al analizar la población de nematodos sincronizada, rítmica y entrenada, no se encontraron diferencias significativas con la cepa control (Figura 4. 18 A). Para el caso de la cepa que sobre-expresa *kin-20b*, el periodo endógeno fue significativamente mayor con respecto a la cepa control ( $29.05 \pm 0.70$  h,  $n = 30$  versus  $25.09 \pm 0.68$  h,  $n = 29$ ). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en el periodo endógeno de las cepas que sobre-expresan *kin-20c* y *kin-20d* (Figura 4.18 B). Esto sugiere que la sobre-expresión de *kin-20b* afecta el periodo de la oscilación de la luminiscencia en nematodos adultos. Un aumento en los niveles basales de *kin-20b* produciría una degradación más rápida de la proteína LIN-42 debido a la fosforilación de la misma por KIN-20b, generando un cambio en el periodo endógeno. La cepa que sobre-expresa *kin-20d* mostró una amplitud de la señal significativamente mayor a la cepa control bajo condiciones cíclicas (LO/FC), esta diferencias puede deberse a una expresión diferencial del constructo *psur5::luc::gfp* en dicha cepa. Por el contrario, las cepas que sobre-expresan *kin-20b* y *kin20c* no presentaron diferencias en la amplitud de la señal en comparación con la cepa control bajo las condiciones estudiadas (Figura 4.18 C). De acuerdo con estos resultados, un aumento en la expresión de los niveles basales de la proteína KIN-20b genera una alteración de los ritmos circadianos del nematodo.



**Figura 4. 18. Sobre-expresión de *kin-20 b, c y d*.** **A.** Porcentaje de nematodos sincronizados, rítmicos y entrenados, para la cepa control, *kin-20b* OE, *kin-20c* OE, *kin-20d* OE. No se encontraron diferencias significativas en la población de nematodos sincronizados (*kin-20b* OE:  $79.33 \pm 15.07\%$ ,  $n=3$ ; *kin-20c* OE:  $72.66 \pm 13.67\%$ ,  $n=3$ ; *kin-20d* OE:  $87.66 \pm 7.21\%$ ; versus control:  $97.60 \pm 2.40\%$ ,  $n=5$ ), rítmicos (*kin-20b* OE:  $52 \pm 6.43\%$ ,  $n=3$ ; *kin-20c* OE:  $60.66 \pm 21.72\%$ ,  $n=3$ ; *kin-20d* OE:  $39.33 \pm 7.44\%$ ,  $n=3$ ; versus control:  $49 \pm 9.37\%$ ,  $n=5$ ) y entrenados (*kin-20b* OE:  $74.66 \pm 16.38\%$ ,  $n=3$ ; *kin-20c* OE:  $64 \pm 7.37\%$ ,  $n=3$ ; *kin-20d* OE:  $66.66 \pm 19.34\%$ ,  $n=3$ ; versus control:  $67.40 \pm 7.85\%$ ,  $n=5$ ), ANOVA de dos vías, *Dunnett's multiple comparisons test*, ns. **B.** Promedio del periodo endógeno para la población de nematodos rítmicos para la cepa control ( $25.09 \pm 0.68h$ ,  $n=29$ ), *kin-20b* OE ( $29.05 \pm 0.70h$ ,  $n=30$ ), *kin-20c* OE ( $26 \pm 1.27h$ ,  $n=11$ ), *kin-20d* OE ( $27.67 \pm 1.62h$ ,  $n=8$ ). ANOVA de una vía, *Dunnett's multiple comparisons test*, ns. **C.** Amplitud promedio para la población de nematodos rítmicos en LO/FC y OO/CC, para las cepas control (LO/FC:  $0.029 \pm 0.0008$  UNDL,  $n=29$ ; OO/CC:  $0.015 \pm 0.0016$  UNDL,  $n=29$ ), *kin-20b* OE (LO/FC:  $0.026 \pm 0.001$  UNDL,  $n=30$ ; OO/CC:  $0.020 \pm 0.002$  UNDL,  $n=30$ ), *kin-20c* OE (LO/FC:  $0.038 \pm 0.004$  UNDL,  $n=8$ ; OO/CC:  $0.018 \pm 0.002$  UNDL,  $n=8$ ), *kin-20d* OE (LO/FC:  $0.038 \pm 0.004$  UNDL,  $n=11$ ; OO/CC:  $0.018 \pm 0.003$  UNDL,  $n=11$ ), ANOVA de dos vías, *Sidak's multiple comparisons test*,  $**p<0,0048$ .

Al analizar las acrofases de las cepas que sobre-expresan KIN-20 bajo condiciones cíclicas, se observó un cambio de fase significativo para las tres isoformas estudiadas (*kin-20b*, *kin-20c* y *kin-20d*) versus la cepa control, tanto para la población de nematodos rítmica, como para la población de nematodos entrenada. Contrariamente, no se encontró un cambio de fase bajo condiciones constantes para las dos poblaciones analizadas (rítmicas y entrenadas) (Figura 4. 19 A-D).

De acuerdo con los resultados, un aumento en los niveles basales de expresión de KIN-20 no afectan la capacidad de los nematodos de ser entrenados; pero un aumento específico de KIN-20b produce una alteración de los ritmos circadianos del nematodo adulto, a través de un aumento en el periodo endógeno. Adicionalmente, la sobre-expresión de las tres isoformas de KIN-20 produce un cambio de fase bajo condiciones cíclicas. Por lo tanto, un aumento en los niveles de expresión de KIN-20, particularmente de la isoforma b, afecta los ritmos circadianos de nematodos adultos.



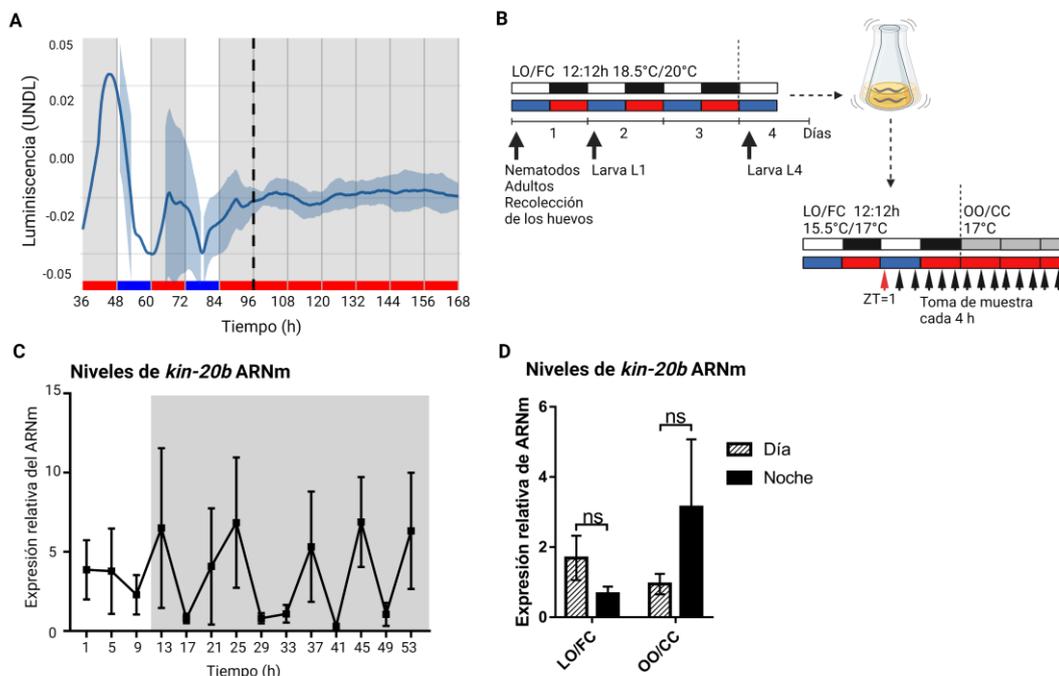
**Figura 4. 19. Acrofase de las cepas *kin-20b OE*, *kin-20c OE* y *kin-20d OE*.** Gráficos de Rayleigh para las acrofases de la población de nematodos rítmicos y entrenados bajo condiciones cíclicas (LO/FC, puntos azules) y bajo condiciones constantes (OO/CC, puntos rojos), control (A), *kin-20b OE* (B), *kin-20c OE* (C), *kin-20d OE* (D). *Watson-Wheeler test*, \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ . Las tablas muestran los datos de las acrofases para las cepas analizadas bajo condiciones cíclicas y bajo condiciones constantes, tomando la población de nematodos rítmicos (tabla superior) y tomando la población de nematodos entrenados (tabla inferior).

### Oscilación transcripcional de *kin-20b*

Con el fin de estudiar el patrón de expresión de *kin-20b in vivo*, se desarrolló una línea de nematodos que contienen el arreglo extracromosomal *pkin-20b::luc::gfp::pest* (ver Materiales y Métodos), VQ1320 [*qvEx360 (pkin-20b::luc::gfp::pest, pCFJ90)*]. La línea VQ1320 mostró expresión de GFP durante el estadio embrionario y larval, con una expresión clara en la faringe y en las *seam cell*.

Los registros de luminiscencia se llevaron a cabo bajo un ciclo dual de luz/oscuridad y temperatura 12h:12h (LO/FC) y bajo condiciones constantes (OO/CC), en una población de nematodos adultos. El promotor de *kin-20b* no mostró actividad rítmica bajo ninguna de las condiciones estudiadas (4. 20 A).

En base a estos resultados, nos propusimos investigar el patrón de oscilación del ARNm de *kin-20* en nematodos adultos por PCR en tiempo real, bajo condiciones cíclicas y constantes, con una toma de muestras cada 4 horas, comenzando a ZT1 (10 am) el primer día bajo el ciclo LO/FC (Figura 4.20 B). Los resultados obtenidos muestran que el ARNm de *kin-20b* no presenta una expresión cíclica bajo ninguna de las condiciones ensayadas (Figura 4. 18C). Adicionalmente, se comparó el nivel de expresión del ARNm de *kin-20b* entre el día y la noche de la condición cíclica, y entre el día y la noche subjetiva; y no se encontraron diferencias significativas (Figura 4. 20 D). Estos resultados sugieren que el ARNm de *kin-20b* no tiene una oscilación rítmica en el nematodo adulto.



**Figura 4. 20. Ritmos de expresión del ARNm de *kin-20b*.** **A.** Registro de la luminiscencia del constructo *pkln-20b::luc::gfp::pest* durante 3 días en LO/FC y luego, por 4 días más bajo OO/CC. **B.** Esquema de la toma de muestra del ARNm, los nematodos se crecieron bajo el ciclo dual de luz y temperatura. Los huevos fueron recolectados de nematodos adultos. Luego, las larvas L1 fueron crecidas en placas de Petri NGM con bacteria. En el estadio L4 los nematodos fueron pasados a 4 Erlenmeyer (n=4) con medio de luminiscencia sin luciferina, se dejaron en agitación durante un día y al día siguiente se comenzó la toma de muestra en ZT=1 (flecha roja). Se tomó muestra cada 4 h durante un día bajo condiciones LO/FC y un día más bajo condiciones constantes OO/CC. Se repitieron los dos primeros puntos del día subjetivo. **C.** Niveles promedio de expresión del ARNm *kin-20b* (n=4) cada 4 h bajo LO/FC y OO/CC, horario ZT. ANOVA de una vía, *Turkey's multiple comparisons test*, ns. **D.** Promedio de la expresión del ARNm para el día y la noche bajo condiciones LO/FC y OO/CC. ANOVA de 2 vías, *Sidak's multiple comparisons test*, ns.

## Discusión

Como se mencionó antes, CK1 $\epsilon/\delta$  cumplen un rol esencial en la regulación de los ritmos circadianos en diferentes organismos [116], modulando el periodo de los genes reloj mediante la fosforilación de PERIOD y posterior degradación [52, 53, 313, 314]. En *C. elegans*, KIN-20 tiene amplia homología con CK1 $\epsilon/\delta$  de mamíferos y con DBT de moscas [185, 213]. En los nematodos, se ha descrito que este gen posee roles cruciales a nivel del desarrollo y la maduración neuronal [305, 311], pero su función en el reloj circadiano de *C. elegans* no ha sido estudiada en profundidad.

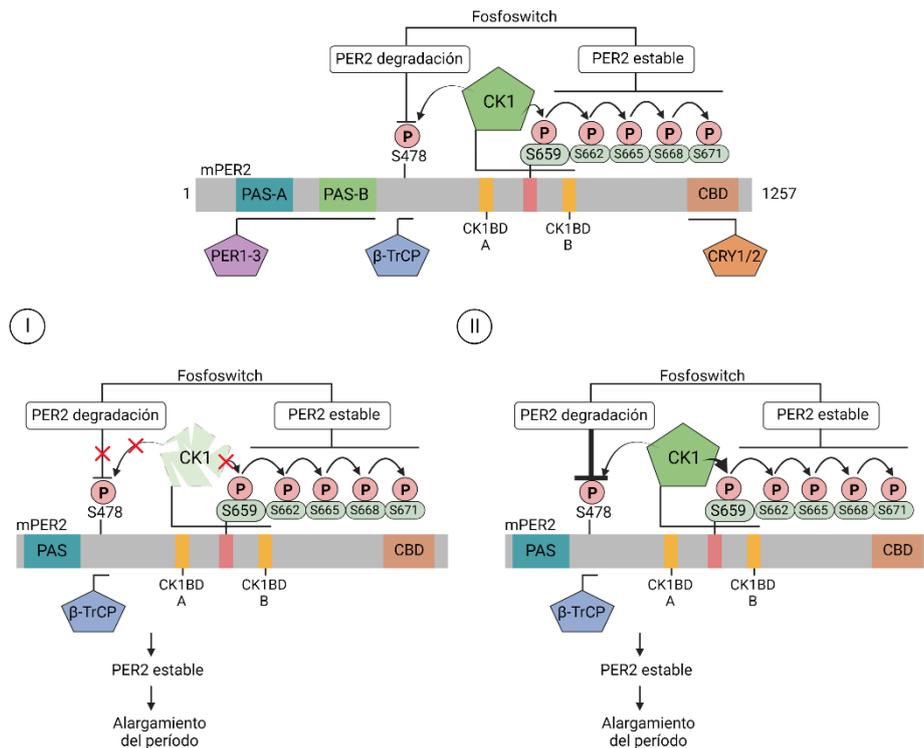
Para tratar de entender la participación de KIN-20 en la regulación de los ritmos circadianos de *C. elegans*, en el presente capítulo nos centramos en medir los ritmos de luminiscencia del gen reportero *sur-5* en líneas mutantes deficientes en la expresión de KIN-20. Para ello, se utilizó el sistema reportero basado en luminiscencia dado que nos permite obtener una lectura continua durante un periodo de al menos 7 días [183]. Además, a diferencia de los registros de locomoción (también utilizados como salida del reloj en estos nematodos [181], el sistema de luminiscencia tiene una ventaja a la hora de medir mutantes que tienen afectada la movilidad, como ocurre en el caso de los mutantes de KIN-20 donde su movimiento es reducido debido a su fenotipo *dumpy* [306, 311].

Los resultados obtenidos bajo las condiciones ensayadas mostraron que el mutante *kin-20(ok505)* fue capaz de entrenar al ciclo dual de luz y temperatura, ya que el porcentaje de nematodos sincronizados, rítmicos y entrenados no tuvo diferencias significativas con la cepa control. Además, el mutante *kin-20(ok505)* mostró un alargamiento significativo del periodo de luminiscencia en condiciones de oscuridad y temperatura constante (OO-17.5°C). Al igual que el control, *kin-20(ok505)* tuvo un pico de actividad de luminiscencia durante la fase nocturna del ciclo. Por otro lado, el mutante *kin-20(ox423)* tampoco mostró alteraciones en la capacidad de sincronización y entrenamiento por un estímulo dual de luz y temperatura. Al igual que lo encontrado para el mutante *kin-20(ok505)*, *kin-20(ox423)* tuvo un alargamiento significativo del periodo en comparación con la cepa control. El pico de luminiscencia se encontró durante la fase nocturna del ciclo, al igual que la cepa control. Estos resultados también fueron consistentes con los obtenidos durante los ensayos de luminiscencia en placas de Petri bajo condiciones constantes. Tanto *kin-20(ok505)* como *kin-20(ox423)* mostraron un alargamiento significativo del periodo de luminiscencia en comparación con la cepa control. Todos estos resultados sugieren que KIN-20 no solo cumple un rol importante en el desarrollo de los nematodos y la maduración neuronal, sino que también participa en el mantenimiento de los ritmos circadianos en *C. elegans* adulto.

Por otra parte, dado que los mutantes *kin-20(ok505)* y *kin-20(ox423)* mostraron variaciones a nivel del periodo con respecto a la cepa control, realizamos experimentos de rescates mediante la sobreexpresión de *kin-20b* en el mutante nulo *kin-20(ok505)*, y mediante la expresión de una sola copia de las isoformas *kin-20a/b/c* en *kin-20(ox423)*. En ambos casos, los registros de luminiscencia mostraron que la función de KIN-20 se pudo rescatar parcialmente dado que la diferencia en el periodo que se observó entre las cepas mutantes y las rescatadas no fue significativa. Esto puede deberse a que el constructo *pkin-*

*20b::kin-20b::RFP* utilizado para el rescate se mantiene como un arreglo extra-cromosomal y por lo tanto la expresión del mismo es diferente en cada célula del nematodo. Todos estos resultados indican que la proteína KIN-20 es necesaria para determinar el período de los ritmos circadianos en *C. elegans*, pero no estaría directamente involucrada en el entrenamiento circadiano. Una disminución en los niveles de KIN-20 no afectó la capacidad de los nematodos de ser entrenados por un estímulo de luz/oscuridad y temperatura. En concordancia con estos resultados, trabajos realizados en mamíferos y *Drosophila* muestran que una mutación en la CK1 genera cambios en el periodo endógeno. En hámster, una mutación en la CK1 $\epsilon$  (mutante *tau*) produce un periodo circadiano de 22 h en la cepa heterocigota y un período más corto de 20 h en el mutante homocigota, mientras que la cepa *wild-type* tiene un período de 24 h [114, 292]. Asimismo, mutaciones en DBT (*doubletime*) de *Drosophila* generan un periodo circadiano largo y comportamiento arrítmico [298].

Por otro lado, dado que nuestros resultados mostraron que una disminución en los niveles de expresión de la proteína KIN-20 alarga el periodo de luminiscencia en nematodos adultos, decidimos estudiar cuál es el efecto de aumentar los niveles basales de KIN-20 sobre los ritmos circadianos de *C. elegans*. Se encontró que la sobre-expresión de KIN-20b en nematodos *wild-type* también genera un alargamiento del periodo endógeno. Sin embargo, la sobre-expresión de KIN-20c y KIN-20d no modificó el periodo del ritmo de luminiscencia de *sur-5* en comparación con el control. Estos resultados indican que *kin-20b* tiene mayor relevancia en la modulación de los ritmos circadianos del nematodo. En este sentido, ha sido descrito que CK1 $\epsilon/\delta$  y DBT tienen mayor homología con *kin-20b* [185]. Resulta interesante notar que una disminución en los niveles de KIN-20 produce un alargamiento del período endógeno en el nematodo adulto, por lo tanto, se esperaría encontrar que un aumento en los niveles basales de KIN-20 produzca un acortamiento del período endógeno. Dado que experimentalmente se observó lo contrario, surgieron entonces dos hipótesis contrapuestas de la posible función de KIN-20 en nematodos adultos. Por un lado, KIN-20 podría estar regulando los ritmos de luminiscencia al fosforilar a LIN-42 y llevarla a degradación vía proteosoma; al disminuir los niveles de KIN-20, no se produciría la adecuada fosforilación de LIN-42 generando un aumento de su estabilidad y produciendo un alargamiento del periodo endógeno (Figura 4.22 1). Por otro lado, KIN-20 podría estar regulando los ritmos de luminiscencia al fosforilar a LIN-42 y estabilizarla; así, al aumentar los niveles basales de KIN-20 podría estar exacerbado el fenómeno de *fosfoswitch* inhibiendo el sitio de fosforilación en LIN-42 requerido para la unión de  $\beta$ -TrCP (por sus siglas del inglés, “*beta-transducin repeat containing*”, necesaria para la formación del complejo ubiquitina-proteína ligasa), produciendo la estabilización de LIN-42 y en consecuencia un aumento del período endógeno (Figura 4.22 2). Esto podría significar que la proteína KIN-20 regula a LIN-42 mediante fosforilación, ya sea para estabilizarla o marcarla para degradación vía proteosoma. De acuerdo con lo encontrado en la literatura, CK1 cumple un rol antagónico sobre PER2; dependiendo del sitio fosforilado, la proteína PER2 puede ser estabilizada o desestabilizada por CK1 [315, 316] (Figura 4.22).



**Figura 4. 22. Modelo del fosfoswitch en PER2 dependiente de CK1 $\delta$ .** Modelo de *fosfoswitch* en PER2 caracterizado previamente, JM Philpott et al., 2022; Rajesh Narasimamurthy et al., 2021. CK1 interacciona con PER2 en los sitios CK1BD. LIN-42 es fosforilada en los sitios FASP (S659) y fosfodegron (S478). La fosforilación en los sitios fosfodegron, permite la unión de  $\beta$ -TrCP a PER2, generando su degradación vía proteosoma. La fosforilación en el sitio FASP produce la fosforilación sucesiva de las cuatro serinas consecutivas, esto produce la estabilidad de PER2, ya que la fosforilación en FASP produce un *fosfoswitch* que inhibe la fosforilación de la región fosfodegron. Modelo basado en PER2 de ratas modificado de JM Philpott et al., 2021. 1. La ausencia de KIN-20 (CK1), generaría la estabilidad de LIN-42 (PER2), ya que no puede ser fosforilada y degradada, en consecuencia, se produce un aumento del período endógeno. 2. El aumento de los niveles de KIN-20 (CK1), produciría un aumento de la fosforilación de LIN-42 (PER2), generando un aumento en el *fosfoswitch* y, por lo tanto, la estabilidad de LIN-42 (PER2) y un alargamiento del período endógeno.

Finalmente, investigamos la posible oscilación circadiana del ARNm de *kin-20b*, y encontramos que los niveles del transcripto no ciclan a lo largo del día, apoyando la idea de que *kin-20b* es un gen constitutivo. Previamente se ha demostrado que algunos genes de *C. elegans* homólogos al reloj central de otros organismos –como CLOCK, PERIOD y DOUBLETIME– no presentan patrones de expresión circadiana a nivel del ARNm [174, 317], al menos bajo ciclos clásicos de luz/oscuridad o temperatura y en extracciones de ARN total de animales enteros. Se ha demostrado en diferentes organismos que la expresión de la caseína quinasa no tiene una oscilación diaria [53, 280]. Sin embargo, se ha observado que la actividad de la caseína quinasa varía entre el día y la noche. Por ejemplo, CDK5 (quinasa dependiente de ciclina 5) tiene un aumento de la actividad durante la noche y una disminución durante el día en el NSQ (núcleo supraquiasmático) de ratones [318]. Dicha actividad coincide con una acumulación en los niveles de ATP durante la noche en el NSQ, requerido para la fosforilación [319]. Estudios realizados en nuestro laboratorio, demostraron que en *C. elegans* los niveles de ATP endógeno tienen un ritmo diario, con un pico durante la

fase diurna [183]. La diferencia diaria encontrada entre los niveles de ATP endógeno podría estar relacionada con una actividad diferencial de la quinasa KIN-20 a lo largo del día. Para responder a esa hipótesis, se necesitan realizar a futuro ensayos de actividad de KIN-20. En mamíferos, CK1 fosforila y activa a CDK5 *in vitro* [320], y CKD5 fosforila e inhibe a CK1 $\delta$  [321], estableciendo un *loop* de retroalimentación entre las dos quinasas. En *C. elegans* existen otras quinasas que podrían estar regulando la actividad de KIN-20, o bien regulando la actividad de proteínas reloj del nematodo. Por ejemplo, la caseína quinasa KIN-19 tiene homología con la caseína quinasa 1 $\epsilon/\delta$  [186]; por lo tanto, resulta indispensable estudiar la función de otras quinasas que podrían tener un rol importante en la regulación de los ritmos circadianos del nematodo. Sin embargo, sigue siendo posible que los genes que forman parte del sistema circadiano de *C. elegans* ciclen en un pequeño subconjunto de células o tejidos en los gusanos.

En conclusión, el cambio observado en el periodo endógeno de luminiscencia en los mutantes *kin-20(ok505)* y *kin-20(ox423)* apoya la idea de un mecanismo evolutivamente conservado de regulación postraduccional en la maquinaria molecular del reloj del nematodo (Figura 4. 21). La conservación de los sitios regulatorios en KIN-20 (así como los sitios regulatorios presentes en LIN-42) sugiere la posibilidad de una fosforilación de LIN-42 mediada por KIN-20, similar a lo que ocurre en otras especies. Por lo tanto, en el siguiente capítulo nos centraremos en analizar la posible interacción entre LIN-42 y KIN-20.

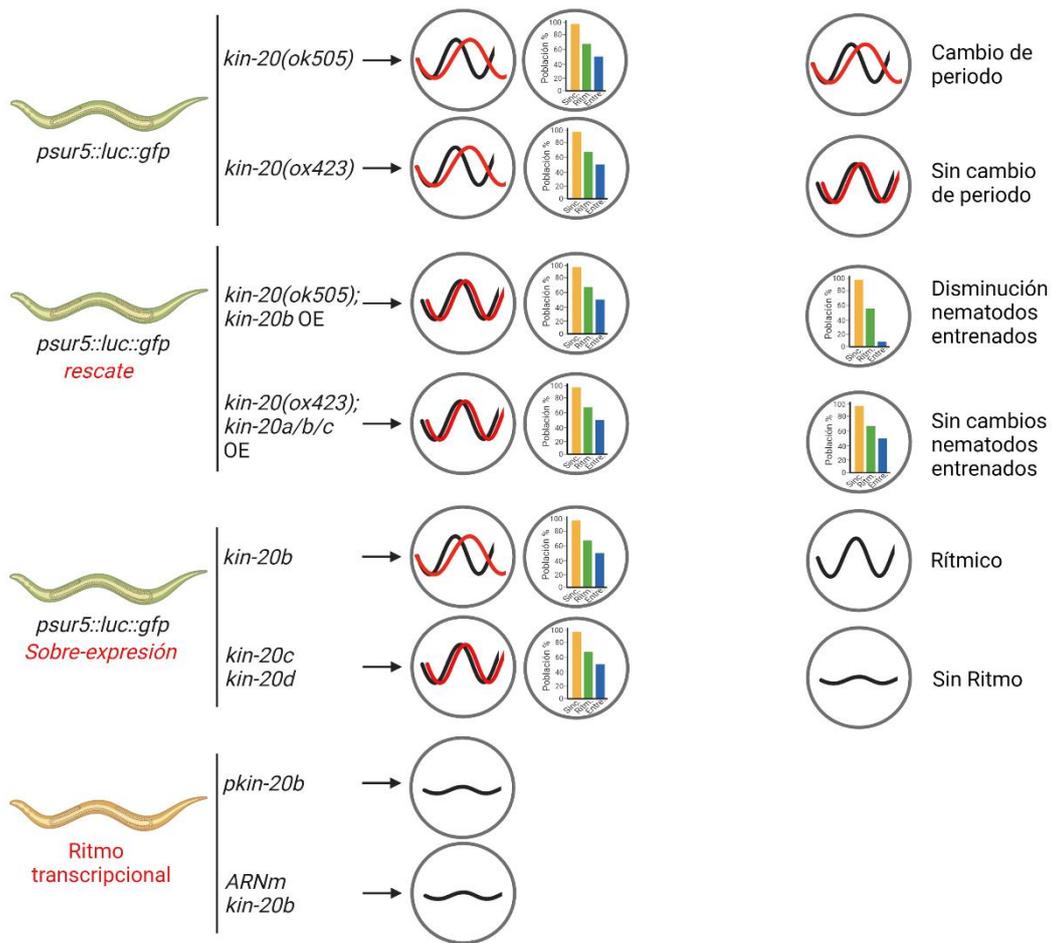


Figura 4. 21. Resumen de los resultados del Capítulo 2.

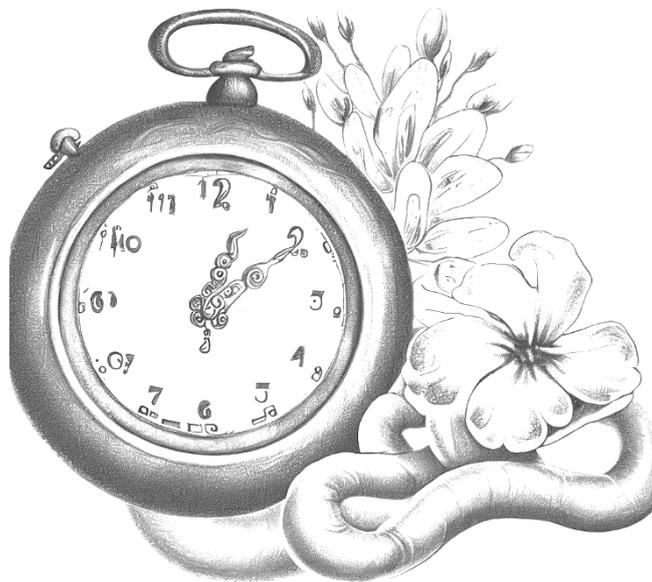
# .Capítulo 3.

---

**Modulación de los ritmos circadianos del**

***C. elegans* a través de las proteínas**

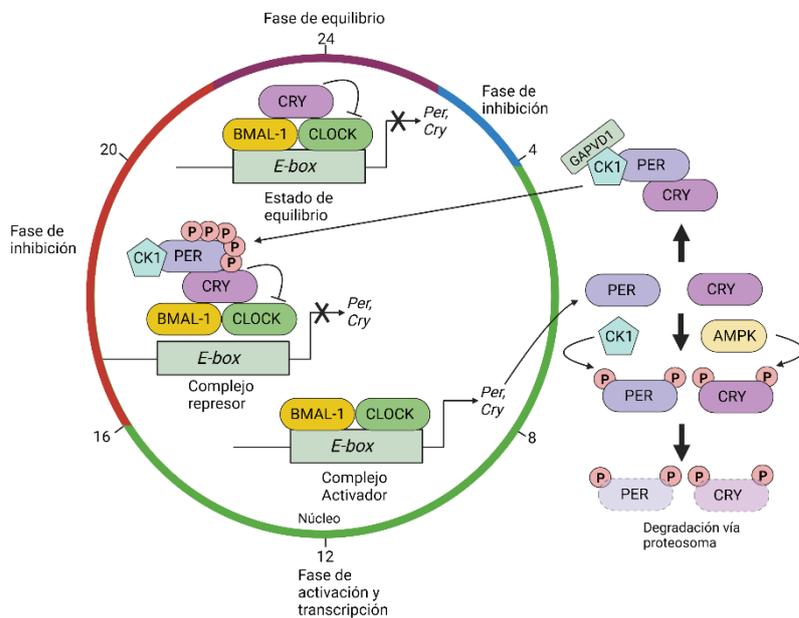
**LIN-42 y KIN-20**



## Introducción

### Regulación postraduccional del reloj circadiano

Como se mencionó en la introducción general, en mamíferos las proteínas CLOCK y BMAL-1 forman un heterodímero que se une a los sitios E-boxes de los promotores de genes reloj –como *per* y *cry*– generando su activación en el núcleo de las neuronas reloj [270, 322]. Durante la fase nocturna, PER y CRY se acumulan en el citoplasma de la célula y se dimerizan, seguidamente PER es fosforilada por CK1 y es estabilizada, permitiendo la unión de GAPVD1, con la subsiguiente translocación nuclear e inactivación de la transcripción mediada por CLOCK-BMAL1. A medida que avanza la noche, el dímero PER-CRY es fosforilado gradualmente por caseína quinasa 1 $\epsilon/\delta$  (Ckl $\epsilon/\delta$ ) y la proteína quinasa activada por AMP 5' (AMPK) para ser degradado vía proteosoma [270, 322]. La degradación de las proteínas represoras PER y CRY permite que se reanude la transcripción de CLOCK-BMAL1, iniciando así un nuevo ciclo transcripcional (Figura 5.1). Así, las modificaciones postraduccionales sobre PER y CRY cumplen un rol importante en el correcto funcionamiento del reloj biológico de mamíferos. Por ejemplo, en cianobacterias se ha demostrado la importancia de las modificaciones postraduccionales en proteínas que forman parte del reloj biológico de estos organismos; a través de la reconstitución *in vitro* del reloj, se encontró que el mismo puede ser mantenido por ciclos de fosforilación y desfosforilación de la proteína KaiC [323, 324].

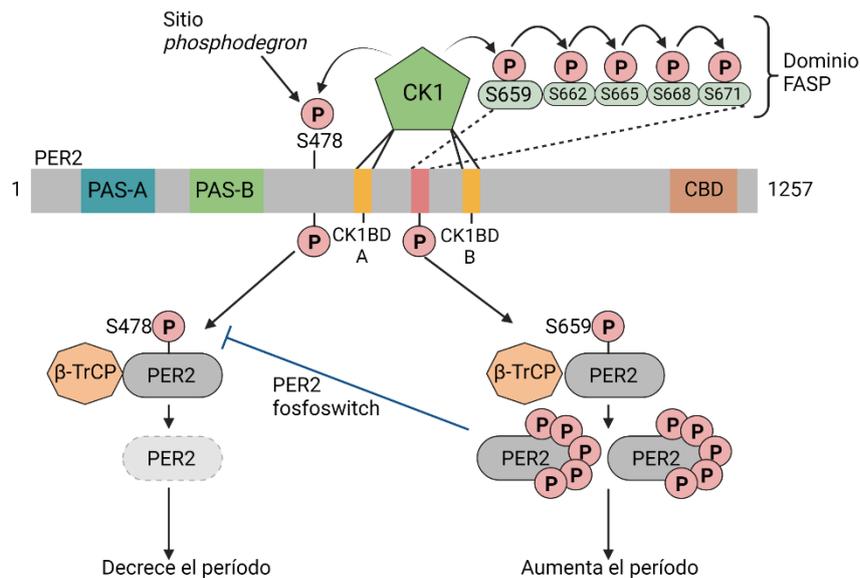


**Figura 5. 1. Regulación postraduccional del reloj circadiano.** Los activadores transcripcionales BMAL1 y CRY se unen a los E-box de los genes *per* y *cry*, activando su expresión. En el citoplasma, PER y CRY forman un complejo con CK1 y GAPVD1 y translocan al núcleo. El complejo PER-CRY se une al heterodímero BMAL1-CLOCK y lo inhibe. En el citoplasma, la fosforilación y posterior degradación de PER y CRY, regulan la duración del ciclo circadiano.

Desde *Neurospora* hasta mamíferos, CK1 es la quinasa mayormente responsable de fosforilar a FRQ (FREQUENCY) y PER, respectivamente [292, 325, 326]. Existen múltiples sitios de fosforilación dependientes de CK1 en PER, la fosforilación en dichos sitios genera efectos opuestos en la estabilidad de PER. Tanto en humanos como en ratas, existen dos sitios de fosforilación dependientes de CK1 en PER2:

el sitio FASP (del inglés, *familial advanced sleep phase*), y el sitio de unión  $\beta$ -TrCP dependiente de fosforilación (también llamado *phosphodegron site*) [116, 327]. El balance en la fosforilación entre estos dos sitios es clave para la regulación de PER2 y el mantenimiento del periodo circadiano. El dominio FASP es una región dentro de PER compuesta por un conjunto de 5 serinas (SxxSxxSxxSxxS), comenzando en la Ser662 en humanos y en la S659 en ratas, y dicho dominio es conocido como un sitio de fosforilación de CK1 en humanos [293]. La fosforilación del sitio FASP mediada por CK1 genera la estabilización de PER [117, 328, 329]. Por otro lado, la degradación de PER estimulada por la fosforilación de CK1 es regulada al menos por dos sitios *phosphodegrons*. En PER1 el sitio de fosforilación se encuentra entre los aminoácidos 121 y 126 [330], mientras que en PER2 el sitio de fosforilación se encuentra en S478 (en ratas) [116]. La fosforilación en los sitios *phosphodegron* permiten la unión de  $\beta$ -TrCP, que luego dirige la degradación de PER2 mediada por ubiquitina [116] (Figura 5.2). En ratas, CK1 se une a PER2 a través de los residuos de aminoácidos 582-606 y 731-756, llamados CK1BD-A y CK1BD-B, respectivamente (Figura 5.2) [116, 205].

Como se ha mencionada en el capítulo anterior, los sitios de unión y fosforilación de PER son conservados entre especies. En *Drosophila*, existen varios sitios de fosforilación dependientes de DBT (la quinasa homóloga de CK1 $\epsilon$ ) que regulan la estabilidad de PER. Por ejemplo, PER fosforilada en el sitio S47 es reconocida por SLIMB (una proteína similar a  $\beta$ -TrCP) y seguidamente degradada mediante ubiquitinación [275]. Por otro lado, una fosforilación de PER en el sitio S589 produce la estabilidad de la proteína [273, 275]. Estos estudios en *Drosophila* y en mamíferos apoyan la idea de que al menos existen dos regiones de fosforilación de PER dependientes de CK1 que tienen efectos opuestos en la estabilidad de PER, y este mecanismo está evolutivamente conservado. Así, cuando PER esta hiperfosforilada la velocidad del reloj es más lenta generando un aumento del periodo; cuando PER esta desestabilizada, la velocidad del reloj es más rápido y el periodo más corto (Figura 5.2). Adicionalmente, la fosforilación de los dos sitios de PER dependientes de CK1 pueden ser regulados por un mecanismo de *fosfoswitch* [329]. A su vez, la fosforilación en el dominio FASP previene una fosforilación en el sitio *phosphodegron* (Figura 5.2). En resumen, la interacción PER y CK1 es de suma importancia para generar la adecuada fosforilación de PER y regular así su estabilidad.

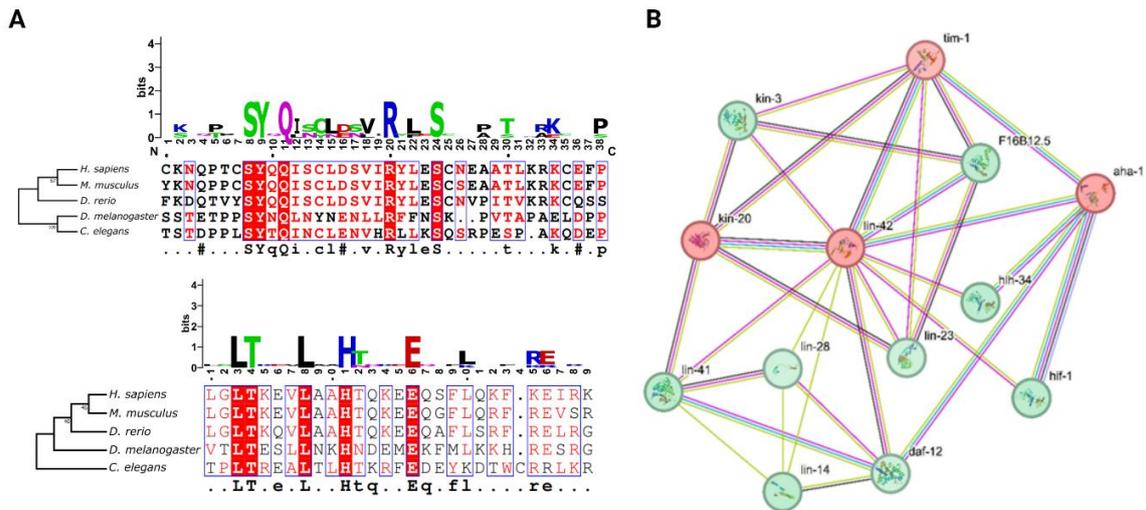


**Figura 5. 2. Mecanismo de fosforilación de PER2 dependiente de CK1.** CK1 fosforila tres diferentes regiones en PER2. La fosforilación en S478 en el sitio *phosphodegron* genera la degradación de PER dependiente de  $\beta$ -TrCP. La fosforilación en el dominio FASP estabiliza a PER2, previniendo la fosforilación del sitio *phosphodegron* a través del mecanismo de fosfoswitch. CBD es el dominio de unión de CRY.

## Regulación postraduccional del reloj circadiano

Como se mencionó en capítulos anteriores, LIN-42 (homóloga a PER de mamíferos) y KIN-20 (homóloga a la CK1 $\epsilon/\delta$  de mamíferos y DBT de moscas) son necesarias para el correcto desarrollo del nematodo, sugiriendo que ambas proteínas podrían estar participando en las mismas vías de señalización. Tanto LIN-42 como KIN-20 intervienen en la regulación de miARN, como *let-7* y *lin-4* [220, 306], y además se ha demostrado que los niveles de LIN-42A decrecen en ausencia de KIN-20 [306]. Sin embargo, la interacción entre LIN-42 y KIN-20 ha sido escasamente estudiada.

A pesar de que la secuencia aminoacídica de LIN-42b representa aproximadamente la mitad respecto de PER2 de *Mus musculus* (597 vs. 1257 aminoácidos), los sitios PAS y el dominio de unión de CK1 están conservados. Un alineamiento de secuencias entre LIN-42b de *C. elegans* y PER de diferentes organismos reveló una similitud muy fuerte entre los sitios de unión a CK1 (Figura 5.3 A). Además, mediante el programa STRING (versión 11.5) se pudo predecir una fuerte interacción entre las proteínas KIN-20 y LIN-42 (Figura 5. 3 B). En base a esto, postulamos la hipótesis de que en *C. elegans* las proteínas LIN-42 y KIN-20 pueden interactuar y así regular los ritmos circadianos en nematodos adultos.

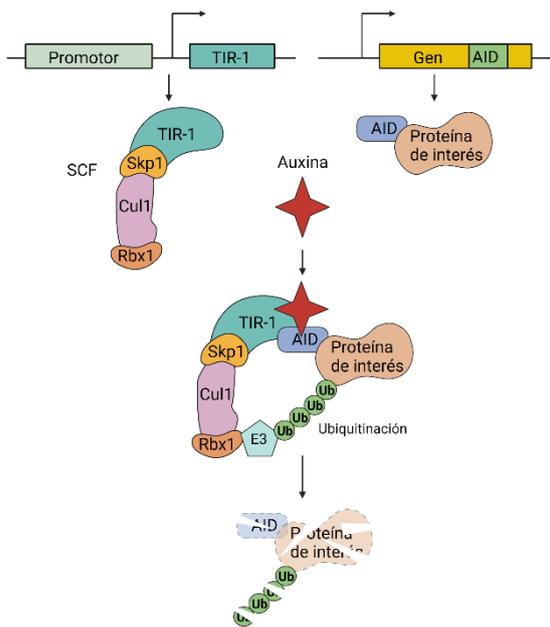


**Figura 5. 3. Interacción entre LIN-42 y KIN-20. A.** Alineamiento de la región de interacción CK1BD (SYQ/LT) de LIN-42 y PER de *H. sapiens*, *M. musculus*, *D. rerio*, *D. melanogaster*. **B.** Proteínas que interactúan con LIN-42, interacción conocida por base de datos (línea celeste) o determinado experimentalmente (línea violeta), por datos en bibliografía (línea verde), co-expresión (línea negra). Las proteínas coloreadas en rojo son homologas a proteínas reloj de mamíferos y *Drosophila*. Datos obtenidos de STRING (versión 11.5).

### Sistema de degradación de proteínas inducible por auxinas

El sistema de degradación inducible por auxinas (AID, del inglés, *Auxin-inducible degron*) permite la degradación rápida, condicional y tejido-específico de una proteína de interés; este sistema se ha aplicado en diferentes organismos [331-333]. Actualmente, el sistema AID ha sido exitosamente implementado en *C. elegans*. Estudios realizados en el nematodo han demostrado que el sistema produce la degradación de una proteína de interés en un tejido específico (ya sea neuronas, *seam cells*, tejido muscular, intestino, células somáticas) de manera muy eficiente [334]. Así, el sistema AID es una herramienta muy utilizada para controlar tempo-espacialmente la disponibilidad de las proteínas de interés en un tejido específico.

El sistema AID está compuesto por dos componentes: la proteína F-box de plantas TIR-1 (del inglés, *Transport Inhibitor Response 1*) que se expresa bajo un promotor tejido específico, y una secuencia degron de degradación inducible por auxina (AID) fusionada a la proteína de interés [331, 335]. TIR-1 interactúa con las proteínas endógenas Skp1 y Cul1 para formar el complejo SCF E3 ubiquitina ligasa (Figura 5. 4). Al adicionar Auxina, una hormona de plantas, se promueve la unión de TIR-1 con la secuencia degron, luego el complejo formado es ubiquitinilado y llevado a degradación vía protosoma (Figura 5. 4).



**Figura 5. 4. Mecanismo del sistema AID.** La proteína TIR-1 es expresada bajo un promotor de interés con un patrón de expresión tejido específico. TIR-1 interactúa con las proteínas endógenas Skp-1 y Cul1 para formar un complejo SCF E3 ubiquitina ligasa. La secuencia AID es fusionada a la proteína de interés. En presencia de Auxina, TIR-1 reconoce y se une a la secuencia AID llevándola a ubiquitinación y subsecuentemente degradación vía proteosoma.

En *C. elegans*, el sistema AID es una herramienta poderosa que se puede aplicar en el estudio de los ritmos circadianos del nematodo, ya que permite disminuir la cantidad de una proteína de interés de manera tejido-específica; y más interesante aun, al ser un sistema inducible permite estudiar la depleción de la proteína en un estadio del desarrollo determinado, como por ejemplo el estadio adulto. Como demostramos en los capítulos 1 y 2, tanto LIN-42 como KIN-20 están involucradas en la regulación de los ritmos circadianos en nematodos adultos; de todas maneras, no podemos descartar la posibilidad de efectos indirectos sobre los ritmos en el desarrollo de los mutantes empleados (como se mencionó antes, LIN-42 y KIN-20 intervienen en la regulación del desarrollo de *C. elegans*). Para abordar este tema, y además obtener más información sobre el o los tejidos en los que ambos genes actúan para modular la duración del período, utilizamos el sistema de degradación AID durante el estadio adulto de *C. elegans*.

En el presente capítulo estudiaremos la regulación de LIN-42 mediada por KIN-20, y el efecto sobre los ritmos de luminiscencia de *sur-5* cuando ambas proteínas se encuentran ausentes en el estadio adulto del *C. elegans*.

## Objetivos del presente capítulo

- Estudiar la expresión de LIN-42b y KIN-20b en el nematodo adulto.
- Observar la expresión de LIN-42b en las neuronas del nematodo.
- Analizar la co-expresión de LIN-42b y KIN-20b en el nematodo adulto.
- Estudiar la oscilación de los niveles de expresión de LIN-42b.
- Estudiar los niveles de expresión de LIN-42b en ausencia de KIN-20 (*kin-20(ok505)*).
- Estudiar la regulación de los ritmos circadianos dependiente de LIN-42 y KIN-20 en las células neuronales y en las *seam cells*.

## Materiales y Métodos

### Cepas de nematodos

Los nematodos transgénicos utilizados en este trabajo fueron generados por la técnica de microinyección estándar [240, 241], mediante una colaboración con el laboratorio de la Dra. Claire Bénéard, del *Département des sciences biologiques, Université du Québec à Montréal*, Canada. Las cepas citadas a continuación fueron realizadas por el método de CRISPR por la empresa Sunybiotech: PHX650 [*syb650 (kin-20b::mKate2::myc) X x3OC*], PHX713 [*syb713 (lin-42b::gfp::HISx6::3XFLAG) II x3OC*], VQ1850 [*kin-20(syb4198[kin-20b/c::mKate2::degron::HA]) X*]. El mutante *kin-20(ok505)* fue obtenido del *Caenorhabditis Genetics Center* (CGC, Universidad de Minnesota, Estados Unidos, <https://cgc.umn.edu>). Las siguientes cepas fueron cedidas por el laboratorio de Jordan Ward: JDW136 [*lin-42(wrd35[lin-42b::GFP::AID::3xFLAG]*], DV3805 [*eSi7[rgef1p::TIR1::F2A::mTagBFP2::NLS::AID::tbb-2 3'UTR] I:-5.32*], JDW233 [*wrdSi46[SCMp::TIR1::F2A::BFP::AID::NLS::tbb-2 3'UTR] I:-5.32*].

El cruce entre las cepas PHX650 [*syb650 (kin-20b::mKate2::myc) X x3OC*] y PHX713 [*syb713 (lin-42b::gfp::HISx6::3XFLAG) II x3OC*], para generar la cepa VQ1329 [*syb650 (kin-20b::mKate2::myc) X; syb713 (lin-42b::gfp::HISx6::3XFLAG) II*], se siguió por PCR a punto final, *lin-42* (PHX713) se siguió por la proteína GFP, generando un amplicon de 480 pb, y *kin-20b* (PHX650) se siguió por la proteína mKate2, generando un amplicon de 609 pb, utilizando los siguientes pares de primers:

FW\_GFP: TGACGGGAAGACTACAAGACAC

RV\_GFP: CCAGCAGCTGTTACAAACTC

FW\_mKate2: CCATACGAGGGAACCCAAAC

RV\_mKate2: CTTGGCTGGCTTCTTGAAC

Las siguientes cepas fueron generadas en colaboración con el Laboratorio de la Dra. Claire Bénéard:

**a.** VQ1618 [*syb713 (lin-42b::gfp::HISx6::3XFLAG) II; qvEx503(pCB101 [prgef1::DsRed2])*]. **b.** VQ1723 [*kin-20(ok505) X; lin-42(syb713) (syb713 (lin-42b::gfp::HISx6::3XFLAG) II)*]. **c.** VQ1903 [*qvls8 (psur-5::luc::gfp; punc-122::RFP); reSi7 [rgef1p::TIR1::F2A::mTagBFP2::NLS::AID::tbb-2 3'UTR] I*]. **d.** VQ1901 [*lin-42 [ wrd35[lin-42::GFP::degron::3xFLAG]II; reSi7 [rgef-1p::TIR1::F2A::mTagBFP2::NLS::AID::tbb-2 3'UTR] I; qvls8*]. **e.** VQ1872 [*kin-20(syb4198[kin-20b/c::mkate-2::degron::HA]) X; wrdSi46[SCMp\*::TIR1::F2A::BFP::AID\*::NLS::tbb-2 3'UTR] I; qvls8*]. **f.** VQ1919 [*kin-20(syb4198[kin-20b/c::mkate-2::degron::HA]) X; lin-42(wrd35[lin-42::GFP::degron::3xFLAG]) II; reSi7 [rgef-1p::TIR1::F2A::mTagBFP2::NLS::AID::tbb-2 3'UTR] I; qvls8*]. **g.** VQ1873 [*wrdSi46[SCMp::TIR1::F2A::BFP::AID::NLS::tbb-2 3'UTR] I; qvls8*]. **h.** VQ1871 [*lin-42(wrd35[lin-42::GFP::degron::3xFLAG]) II; wrdSi46[SCMp::TIR1::F2A::BFP::AID::NLS::tbb-2 3'UTR] I; qvls8*]. **i.** VQ1872 [*kin-20(syb4198[kin-20b/c::mkate-2^degron::HA]) X*];

*wrdSi46[SCMp::TIR1::F2A::BFP::AID::NLS::tbb-2 3'UTR] I; qvls8]. j. VQ1870 [kin-20(syb4198[kin-20b/c::mkate-2::degron::HA]) X; lin-42(wrd35[lin-42::GFP::degron:3xFLAG]) II; wrdSi46[SCMp::TIR1::F2A::BFP::AID::NLS::tbb-2 3'UTR] I; qvls8].*

Las cepas VQ1919 [*kin-20(syb4198[kin-20b/c::mkate-2::AID::HA]) X; lin-42(wrd35[lin-42::GFP::AID::3xFLAG]) II; reSi7 [rgef-1p::TIR1::F2A::mTagBFP2::NLS::AID::tbb-2 3'UTR] I; qvls8]* y VQ1870 [*kin-20(syb4198[kin-20b/c::mkate-2::degron::HA]) X; lin-42(wrd35[lin-42::GFP::degron:3xFLAG]) II; wrdSi46[SCMp::TIR1::F2A::BFP::AID::NLS::tbb-2 3'UTR] I; qvls8]*, fueron cruzadas con la cepa VQ1329 [*syb650 (kin-20b::mKate2::myc) X; syb713 (lin-42b::gfp::HISx6::3XFLAG) II*], para extraer el constructo *qvls8*, generando la cepa DG12 [*kin-20(syb4198[kin-20b/c::mKate2::AID::HA]) X; lin-42(wrd35[lin-42::GFP::AID::3xFLAG]) II; reSi7 [rgef-1p::TIR1::F2A::mTagBFP2::NLS::AID::tbb-2 3'UTR] I]* y DG13 [*kin-20(syb4198[kin-20b/c::mKate2::AID::HA]) X; lin-42(wrd35[lin-42::GFP::AID::3xFLAG]) II; reSi7 [rgef-1p::TIR1::F2A::mTagBFP2::NLS::AID::tbb-2 3'UTR] I*]. Los cruces de las cepas se siguieron por lupa de fluorescencia, se seleccionaron los nematodos que no expresan GFP en el cuerpo (*psur5::GFP*), y posteriormente se genotipo utilizando PCR en punto final con los *primers* de *gfp* y *mKate2*, anteriormente mencionados, y con los *primers* de *bfp*, dando un amplicon de 893 bp, utilizando los siguientes pares de *primers*:

Fw\_BFP: TCAAGCTCGCCGGAGACG

Rv\_BFP: GTTGAGCTTGTGTCGAGC

### Reacción de PCR a punto final

Los ensayos de PCR se realizaron utilizando Platinum Taq DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos), en un ciclador térmico para tubos (Eppendorf, Alemania) y en un volumen final de 10 µl. El programa de PCR utilizado fue de 5 minutos a 95°C y 35 ciclos de: 30 segundos a 95°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 de ácidos nucleicos y revelado

Tanto las reacciones de PCR fueron corroboradas mediante electroforesis preparativa en geles de agarosa 0.8 % (Genbiotech, Argentina), en presencia de *buffer* TAE 1X (Stock TAE 50X: Tris-Acetato 2 M, EDTA 0,05 M; Sigma-Aldrich, Estados Unidos) y utilizando el 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) y se analizó en un transiluminador UV (DyNA Light, Labnet International, Estados Unidos). Las imágenes de cada electroforesis se digitalizaron mediante el programa *Kodak Digital Images* (Kodak, Estados Unidos).

## **Ensayo de luminiscencia en placa *multiwell* bajo condiciones cíclicas**

Los registros de luminiscencia bajo ciclos duales de luz/oscuridad y temperatura (15,5°C/17°C, 12h:12h) fueron realizados en placas *multiwells*. Los ensayos de luminiscencia bajo condiciones constantes (oscuridad/ 20°C) fueron realizados en placas de Petri de 90 mm. En todos los casos se utilizó el medio de luminiscencia descrito en la sección de materiales y métodos generales. Los ensayos fueron realizados en todos los casos con poblaciones de nematodos. Se utilizaron 50 nematodos por *well*.

### **-Análisis de Datos**

Los datos fueron analizados como se describe en la sección de materiales y métodos generales. Para el análisis del período en los ensayos de auxinas se realizó un análisis de la varianza y un *test* de normalidad *D'Agostino* y *Pearson test*, posteriormente se utilizó un ANOVA de una vía o de dos vías, dependiendo los datos. En todos los casos un valor de  $P < 0,05$  fue considerado como el mínimo para ser estadísticamente diferente. Para todos los análisis estadísticos se utilizó el programa *GraphPad Prism 7*.

## **Ensayos de Microscopia**

Para todos los casos de observación y toma de fotos de nematodos por microscopia, se utilizaron nematodos en etapa L4-jovenes adultos. Los animales se montaron en un *pad* de agarosa al 5 % y se paralizaron con azida al 2 %. Todas las imágenes se tomaron con un microscopio confocal espectral de escaneo láser Leica TCS SP8, con una escala de 40X-60X. Se utilizó láser BFP, GFP, mKate2 y campo claro (DIC), dependiendo el experimento.

Para el análisis de la co-expresión se cuantifico la correlación de la intensidad de la fluorescencia utilizando el programa JACoP de ImageJ. Se realizó un análisis de correlación entre las señales utilizando el índice de correlación de *Pearson*, si la correlación es superior a 0, se toma como que las señales de fluorescencia están expresadas en la misma región, es decir, hay co-expresión. Para el análisis se realizó un ROI en las células que presentaban fluorescencia y se les realizó el *test* de *Pearson* (PC), luego se comparó el PC promedio para las regiones donde existía co-localización versus el PC promedio de las regiones donde no existía co-localización (PC cercano a cero) [336].

## **Medición de fluorescencia de LIN-42::GFP**

Para el ensayo de expresión de LIN-42 en diferentes momentos del día, poblacionales de nematodos fueron sincronizados en el estadio L1, y pasados a placas de Petri NGM con bacteria *E. coli* HB101. La mitad de las placas fueron mantenidas en una incubadora con un ciclo dual de luz/temperatura 12:12 h (~150  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  :18.5°C/0  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ :20°C), la otra mitad fue pasada a una incubadora con el mismo ciclo pero invertido (0  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ :20°C/~150  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  :18.5°C). A los 2 días, cuando los nematodos llegaron a

estadio L4, se tomaron imágenes cada 4 hs, empezando en ZT=0 (9 am). Los animales fueron tratados como se menciona en “Ensayos de Microscopia”.

Los datos fueron analizados utilizando el programa ImageJ; se realizó una cuantificación de la fluorescencia total tomando la región de la faringe y tomando sola las células fluorescentes en la zona de la faringe. Los datos obtenidos fueron analizados utilizando el programa *GraphPad Prism 7*. Para todos los datos se realizó un análisis de la varianza y un *test* de normalidad D’Agostino y *Pearson test*, posteriormente se utilizó un ANOVA de una vía o *t-test* no pareado, un valor de  $P < 0,05$  fue considerado como el mínimo para ser estadísticamente diferente.

Para el análisis de la fluorescencia medido por *nanodrop*, poblaciones de nematodos fueron sincronizadas mediante la técnica de Cloro e NaOH [337]. Los embriones obtenidos se dejaron crecer en *buffer* M9, suplementado con Antibiotico-Antimicótico y Tobramicina, ON (*over night*) en agitación. Al día siguiente los nematodos en estadio L1, fueron pasadas a placas de Petri NGM con comida (*E. coli* HB101) (~4000 nematodos por placa); a los dos días, cuando los nematodos llegaron al estadio L4, se tomaron muestras cada 4 hs empezando en ZT=0 (9 am). Los nematodos fueron levantados de la placa y lavados dos veces con *buffer* M9, para extraer los restos de bacteria, y pasados a un eppendorf de 1,5 ml. Se les adiciono 200 ul de *buffer* M9 con inhibidor de proteasas (1/100 v/v) y se congelaron en  $-80^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente fueron sonicados para romper los nematodos y obtener el homogenato de proteínas utilizando un sonicador (Sonicador *vibra cell*). Se tomó 1 ul de cada muestra para medir la fluorescencia en el *nanodrop* (Nanodrop de fluorescencia 3300, Thermo Fisher). Para el análisis de los datos, se realizó un análisis de la varianza y un *test* de normalidad D’Agostino y *Pearson test*, posteriormente se utilizó un ANOVA de una vía o *t-test* no pareado, un valor de  $P < 0,05$  fue considerado como el mínimo para ser estadísticamente diferente.

### **Medición de LIN-42::GFP en el mutante KIN-20**

Los nematodos fueron mantenidos en incubadora bajo un ciclo dual de luz/temperatura 12:12 h (~150  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  :18.5°C/0  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ :20°C). Poblaciones de nematodos fueron sincronizados por el método de Cloro e NaOH, las larvas L1 fueron pasadas a placas de Petri NGM con comida (*E. coli* HB101). A los dos días, cuando los nematodos llegaron al estadio L4, los mismos fueron tratados como se menciona en la sección de “Ensayo de Microscopia”, imágenes fueron tomadas durante el día, ZT1-ZT8 (10 am-17pm). Los datos fueron analizados utilizando el programa ImageJ, se realizó una cuantificación de la fluorescencia total tomando la región de la faringe y tomando sola las células fluorescentes en la zona de la faringe. Para todos los datos se realizó un análisis de la varianza y un *test* de normalidad D’Agostino y *Pearson test*, posteriormente se utilizó un ANOVA de una vía o *t-test* no pareado, un valor de  $P < 0,05$  fue considerado como el mínimo para ser estadísticamente diferente.

## Ensayos de degradación con el sistema AID/degron

Para los ensayos con el sistema AID, los nematodos se mantuvieron bajo las mismas condiciones que se explican en "Ensayos de luminiscencia". Se agregó auxina 4 mM K-NAA (Phyto-Technology Laboratories, N610) [338] para inducir la degradación en el medio de luminiscencia y con nematodos de estadio L4. Para el control del experimento se utilizó L15 (vehículo) con una concentración equivalente.

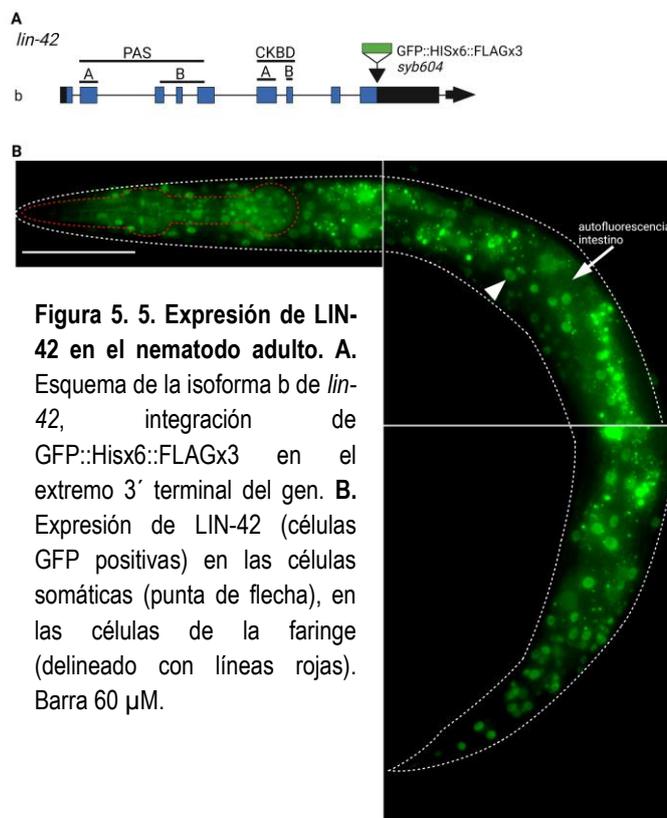
Para corroborar el correcto funcionamiento del sistema AID, los nematodos se mantuvieron en el medio de luminiscencia durante 7 días con auxina 4mM K-NAA, y el control con L15 (vehículo). Se usaron nematodos en estadio L4 para observar las células BFP positiva en neuronas y, para *seam cells* se usaron nematodos en estadio L2/L3. Los animales se montaron en un *pad* de agarosa al 5 % y se paralizaron con azida al 2 %. Todas las imágenes se tomaron con un microscopio confocal espectral de escaneo láser Leica TCS SP8, con una escala de 40X. Se utilizó láser BFP y se realizaron dos experimentos independientes con al menos 10 nematodos.

Para los ensayos de co-expresión de LIN-42::GFP y KIN-20::mKate2, en neuronas o *seam cell* marcadas con BFP, se utilizó nematodos estadios L4. Los animales se montaron en un *pad* de agarosa al 5 % y se paralizaron con azida al 2 %. Todas las imágenes se tomaron con un microscopio confocal espectral de escaneo láser Leica TCS SP8, con una escala de 40X. Se utilizó láser BFP, GFP y mKate2.

## Resultados

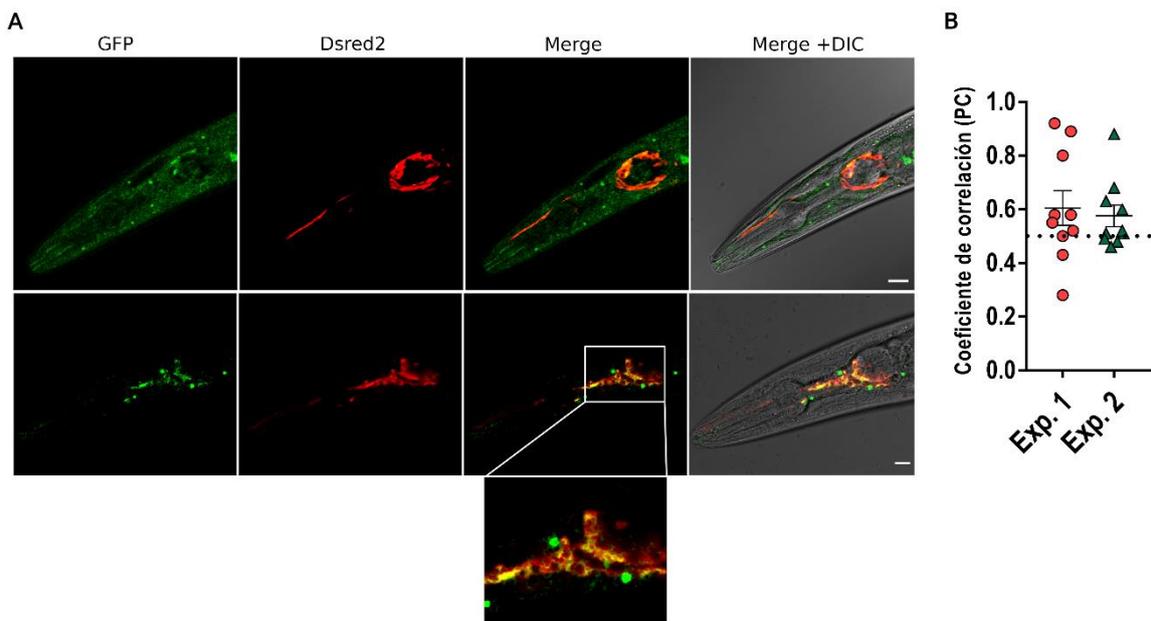
### Localización de LIN-42 y KIN-20 en nematodos adultos

Para estudiar la localización subcelular de LIN-42b y KIN-20b, se generaron dos líneas de nematodos que expresan las proteínas de fusión LIN-42b::GFP y KIN-20b::mKate-2. Las líneas generadas fueron **PHX650** [*syb650 (kin-20b::mKate2::myc) X x3OC*] y **PHX713** [*syb713 (lin-42b::gfp::HISx6::3XFLAG) II x3OC*]. Utilizando microscopía confocal se pudo observar una clara expresión de LIN-42b en la línea PHX713 en la zona de la faringe, células somáticas y en la región neuronal de la faringe (o anillo nervioso); también se observó autofluorescencia en el intestino del nematodo (Figura 5. 5 B).



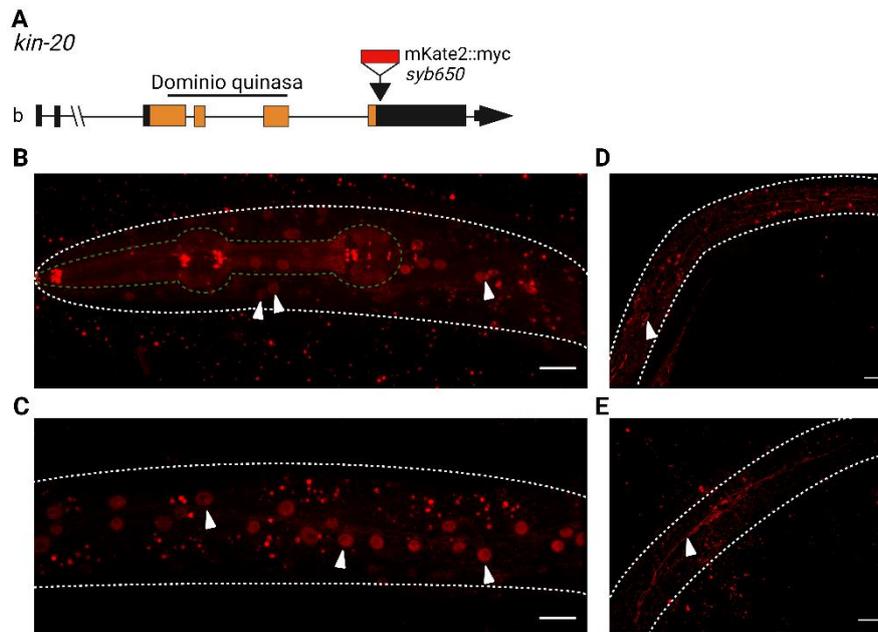
Para poder identificar si las células GFP positivas correspondían a células neuronales, se cruzó la cepa PHX713 con una cepa que expresa la proteína fluorescente DsRed2 bajo un promotor neuronal (*prgef1*), generando la cepa **VQ1618** [*syb713 (lin-42b::gfp::HISx6::3XFLAG) II; qvEx503 (pCB101 [prgef1::DsRed2])*]. Al estudiar la expresión de LIN-42 en VQ1618 se observó una alta correlación entre las células GFP positivas (LIN-42) y las células neuronales DsRed2 positivas. Los resultados corresponden a dos experimentos independientes (Experimento 1:  $0.60 \pm 0.06$  PC,  $n=10$ ; Experimento 2:  $0.58 \pm 0.04$  PC,  $n=10$ ), ambos experimentos demostraron tener un PC superior a 0, un coeficiente de Pearson cercano a 1 indica una alta correlación y un coeficiente de Pearson cercano a 0 indica una baja correlación o nula. Por lo tanto, se analizó la correlación entre GFP y dsRed2 en regiones donde no existe

co-localización, para luego comparar con las regiones donde se observó una correlación entre GFP y dsRed2. Se encontró que ambos experimentos presentaban un valor promedio de PC significativamente superior a cero (regiones donde no existe una correlación entre GFP y dsRed2) (\*\*\*\* $p < 0.0001$ , ANOVA de una vía *Dunnett's multiple comparisons test*) (Figura 5. 6 A-B).



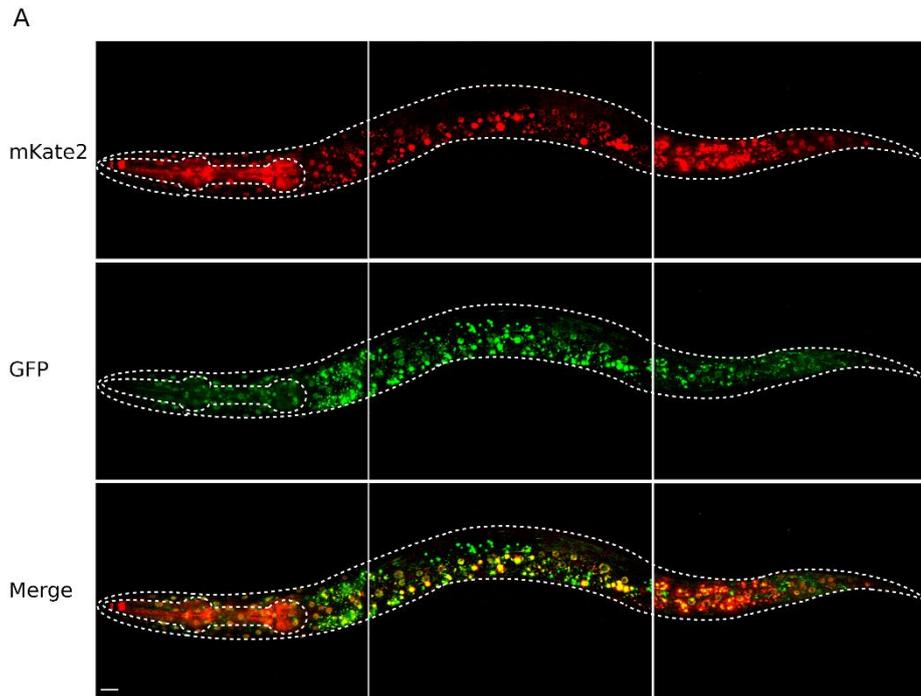
**Figura 5. 6. Expresión de LIN-42 en las neuronas del nematodo adulto.** **A.** Expresión de LIN-42b en las células neuronales (células GFP positivas), marcador neuronal (células DsRed2 positivas). El cuadrado representa la región con zoom para mostrar la co-expresión de GFP y DsRed2. Barra 60  $\mu$ M. **B.** Correlación de los niveles de fluorescencia de LIN-42 (GFP) y pan neuronal (DsRed2), dos experimentos independientes. Coeficiente de correlación, *Pearson's coefficient* (PC). Los valores de promedios PC fueron significativamente superiores a 0, ANOVA de una vía *Dunnett's multiple comparisons test*, \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

Por otro lado, usando microscopia confocal también se observó expresión de KIN-20b en la línea PHX650 en la zona de la faringe (Figura 5. 7 B), células somáticas (Figura 5. 7 C), *seam cells* y en las estructuras llamadas *alae* (Figura 5. 7 D-E).



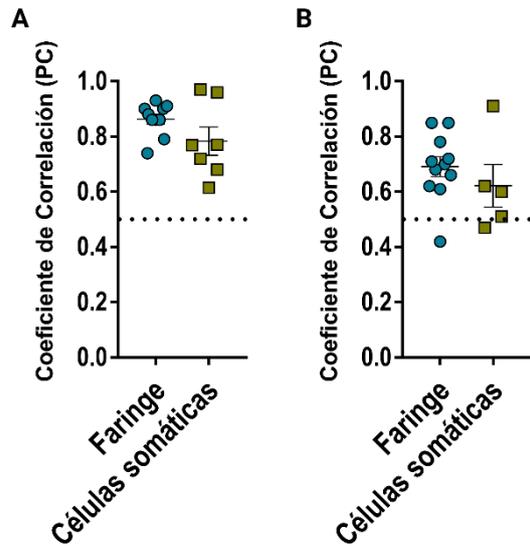
**Figura 5. 7. Expresión de KIN-20 en el nematodo adulto.** **A.** Esquema de la isoforma b de *kin-20*, integración de mKate2::myc en el extremo 3' terminal del gen *kin-20b*. **B.** Expresión de KIN-20, células mKate2 positivas, en las células somáticas (punta de flecha blanca) **(C)**, expresión en la faringe (delineada con líneas verdes). **D-E.** Estructura de *alae* formada por las *seam cells* en estadio adulto, marcadas con la punta de flecha blanca. Barra 60  $\mu$ M.

Para evaluar la co-expresión de las proteínas LIN-42 y KIN-20, se cruzaron las cepas PHX650 y PXH713 dando lugar a una nueva línea **VQ1329** [*syb650 (kin-20b::mKate2::myc) X; syb713 (lin-42b::gfp::HISx6::3XFLAG) II*]. Cuando se analizó la expresión de LIN-42b y KIN-20b en nematodos adultos encontramos que ambas proteínas se expresan en la región de la faringe y en las células somáticas (Figura 5. 8) y, por lo tanto, podrían llegar a interactuar entre ellas.



**Figura 5. 8. Co-expresión de KIN-20 y LIN-42 en el nematodo adulto. A.** Expresión de KIN-20 (células mKate2 positivas) y LIN-42 (células GFP positivas) en las células somáticas y faringe (delineada con líneas blancas). Barra 60  $\mu$ M.

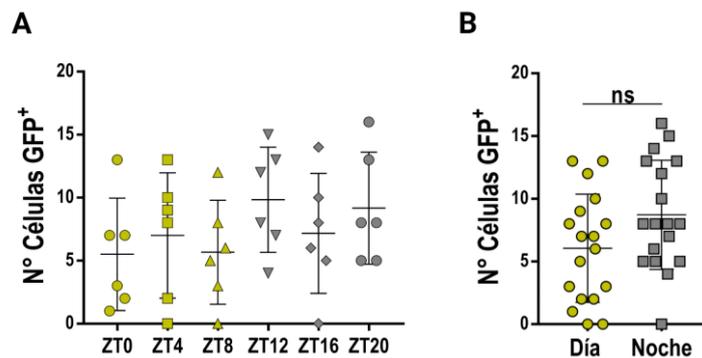
Los niveles de expresión de LIN-42b y KIN-20b fueron cuantificados midiendo la intensidad de la fluorescencia en la faringe; y por otro lado, tomando solo la intensidad de la fluorescencia en las células somáticas de la faringe, a través de la utilización del coeficiente PC (del inglés, *Pearson's coefficient*). Se realizaron dos experimentos por separados y se encontró que la correlación (valor promedio de PC) entre LIN-42 y KIN-20 en células somáticas (Experimento 1:  $0.78 \pm 0.05$  PC,  $n=7$ ; Experimento 2:  $0.62 \pm 0.077$  PC,  $n=5$ ), fue significativamente superior a 0 en ambos experimentos ( $****p<0.0001$ , ANOVA de 1 vía, *Dunnett's multiple comparisons test*), se tomó como parámetro de comparación regiones en las cuales no existía correlación entre LIN-42 y KIN-20, valores de PC cercanos a cero. En la región de la faringe ambos experimentos obtuvieron un PC promedio significativamente superior a 0 (Experimento 1:  $0.86 \pm 0.018$  PC,  $n=10$ ; Experimento 2:  $0.69 \pm 0.036$  PC,  $n=11$ ,  $****p<0.0001$ , ANOVA de 1 vía, *Dunnett's multiple comparisons test*). Por lo tanto, se determinó que LIN-42b y KIN-20b co-expresan en las regiones analizadas (Figura 5. 9).



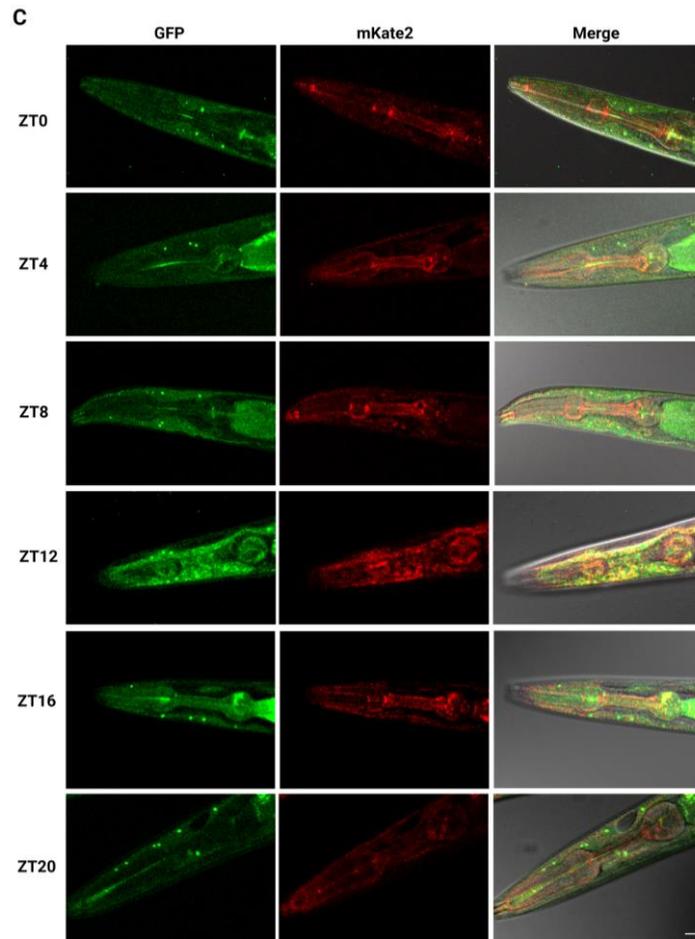
**Figura 5. 9. Co-expresión de KIN-20b y LIN-42b en el nematodo adulto.** Correlación de los niveles de fluorescencia de LIN-42 (GFP) y KIN-20 (mKate2), en la región de la faringe y en las *seam cells*, dos experimentos independientes (A y B). PC: *Pearson's coefficient*.

### Patrones de expresión de LIN-42 *in vivo*

Con el fin de estudiar si existe una oscilación en los niveles de expresión de la proteína LIN-42 en el estadio adulto del nematodo, se contaron células GFP positivas en diferentes horarios del día en la línea VQ1329 mencionada anteriormente. Como se muestra en la figura 5. 10 A, los niveles de expresión de LIN-42 no variaron a lo largo del día. Tampoco se encontraron diferencias significativas al promediar los valores de las células GFP positivas durante el día versus la noche (Figura 5. 10 B). Cabe destacar que en las imágenes solo se muestra un plano de las mismas que fueron utilizadas para contar la cantidad de células positivas para GFP, también se realizó un *z-stack* y se contabilizó el total de células GFP positivas en todos los planos.

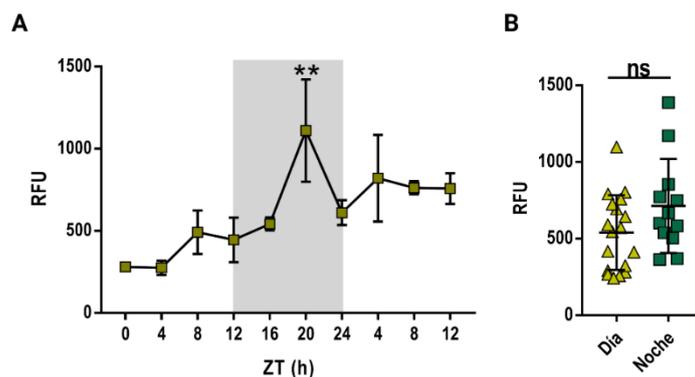


**Figura 5. 10. Oscilación de los niveles de LIN-42 en la faringe del nematodo adulto.** **A.** Oscilación de LIN-42, células GFP positivas, por microscopía. ANOVA de 1 vía, ns (no significativo). **B.** Promedio de Células GFP positivas (LIN-42) en el día y durante la noche. *t-test* no pareado, ns.



**Continuación Figura 5. 10. Oscilación de los niveles de LIN-42 en la faringe del nematodo adulto. C.** Expresión de LIN-42 (GFP), KIN-20 (mKate2) y el *merge* con el DIC para los distintos horarios estudiados. Barra de 60  $\mu$ M.

Por otro lado, se analizó la cantidad total de GFP por *nanodrop fluorescente* en poblaciones de nematodos (ver Materiales y Métodos). Los resultados mostraron un aumento significativo en los niveles de GFP (RFU, por sus siglas en inglés, *Relative Fluorescent Units*) a ZT = 20 (Figura 5.11 A). Al comparar los niveles de GFP promediados durante el día versus la noche no se encontraron diferencias significativas (Figura 5.11 B). Los conjuntos de datos fueron ajustados a una ecuación cosinor, utilizando el paquete *MetaCycler* de *R studio*, pero no se encontró un ritmo en la expresión de GFP.



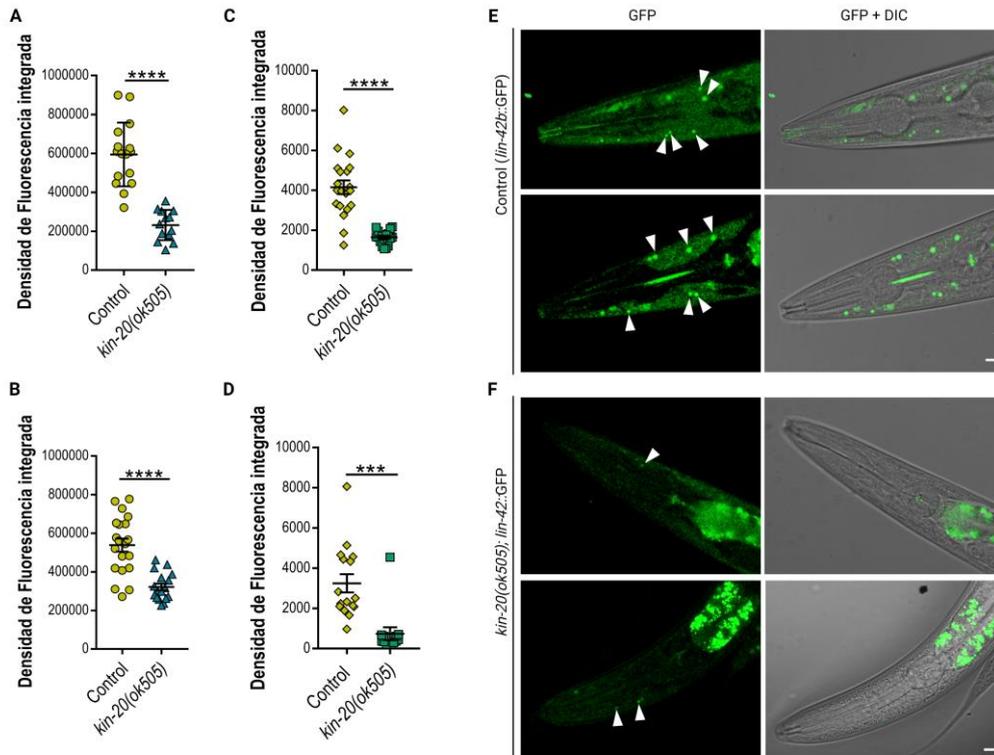
**Figura 5. 11. Oscilación diaria en los niveles de expresión de LIN-42 en nematodos adultos.** A. Oscilación de LIN-42, a través de la expresión de GFP (RFU) en un homogenato de nematodos medidos con nanodrop. ANOVA de 1 vía, *Turkey's multiple comparisons test*,  $**p=0.0018$ . B. Promedio de los valores de GFP (RFU) para el día y la noche, *t-test*, no pareado, ns.

En base a todos los resultados obtenidos podemos concluir que no se encontraron variaciones diarias en la expresión de la proteína LIN-42 medida a través de la proteína reportera GFP; sin embargo, se puede observar una tendencia al aumento de los niveles de LIN-42 durante la fase nocturna. Estos datos son preliminares y se necesitaría el uso de técnicas que revelen la identidad de la proteína en estudio – como *Western Blot*– para estudiar en mayor detalle la oscilación circadiana de LIN-42.

#### KIN-20 modula la expresión de LIN-42 en nematodos adultos

Como se mencionó anteriormente, CK1 regula los niveles de PER en diferentes modelos experimentales como mamíferos y *Drosophila*. Para estudiar si la proteína KIN-20 modula la expresión de LIN-42 en nematodos adultos, se generó una nueva línea por cruzamiento entre *kin-20(ok505)* y la cepa PHX713 mencionada antes (y usada en este experimento como control). La línea generada se denominó **VQ1723** [*kin-20(ok505)* X; *lin-42(syb713)* (*syb713* (*lin-42b::gfp::HISx6::3XFLAG*) II)]. Se cuantificaron los niveles de fluorescencia, teniendo en cuenta toda la faringe, o tomando solo las células GFP positivas en esa región. Los niveles de GFP teniendo en cuenta toda la faringe fueron significativamente mayores en la cepa control ( $594113 \pm 40936$  RFU,  $n = 16$ ) versus *kin-20(ok505);lin-42b::gfp* ( $231664 \pm 21680$  RFU,  $n = 13$ ) (Figura 5. 12 A). Al repetir el experimento obtuvimos el mismo resultado: la cepa control ( $538444 \pm 33839$  RFU,  $n = 20$ ) presentó un aumento significativo en los niveles de GFP versus *kin-20(ok505);lin-42b::gfp* ( $321532 \pm 17446$  RFU,  $n = 17$ ) (Figura 5. 12 B). Cuando se cuantificaron los niveles de GFP en las células positivas de la faringe, también se observó un aumento marcado en los niveles de GFP en la cepa control ( $3249 \pm 452.5$  RFU,  $n = 16$ ) versus *kin-20(ok505);lin-42b::gfp* ( $423.2 \pm 54.03$  RFU,  $n = 12$ ) (Figura 5. 12 C). Al repetir el experimento se obtuvieron datos similares, la cepa control ( $4156 \pm 341.1$  RFU,  $n = 20$ ) aumentó significativamente los niveles de GFP versus *kin-20(ok505);lin-42b::gfp* ( $1649 \pm 80.32$  RFU,  $n = 18$ ) (Figura 5. 12 D). En base a estos resultados podemos decir que los niveles de expresión de

LIN-42 se ven afectados por KIN-20, dado que una disminución en la expresión de KIN-20 produjo una clara disminución de en los niveles de LIN-42, cuantificados mediante la expresión de GFP.



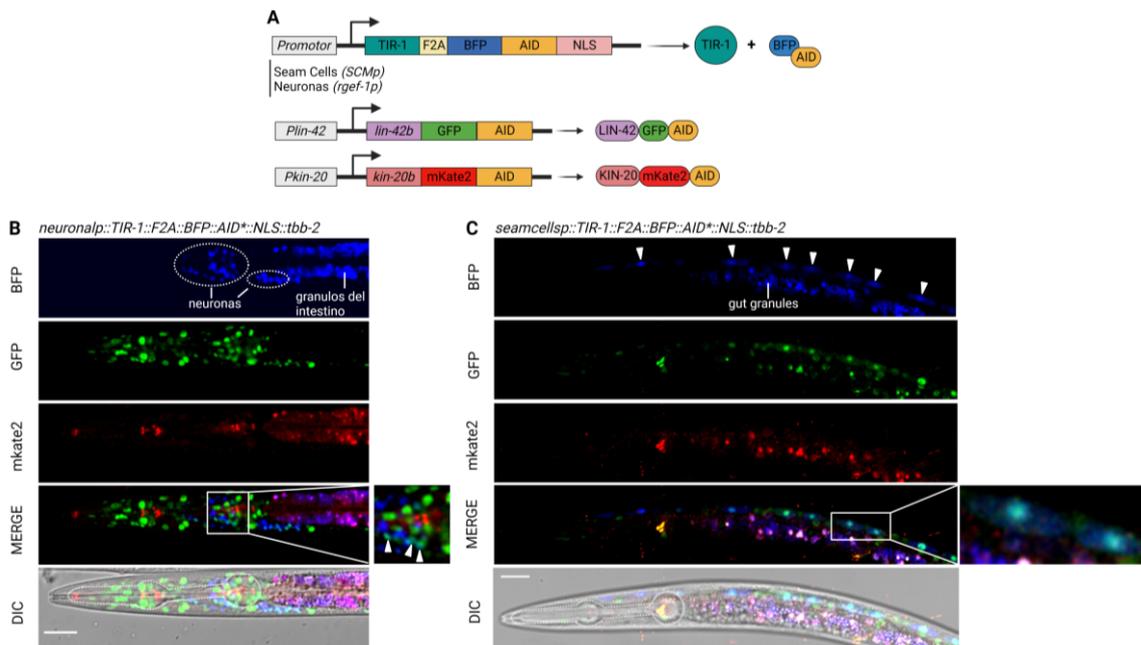
**Figura 5. 12. Expresión de LIN-42 en *kin-20(ok505)*.** **A y C.** Niveles de fluorescencia (GFP) en nematodos jóvenes adultos tomando la región de la faringe, se realizaron dos experimentos independientes (A y C), disminución significativa de los niveles de GFP en la cepa *kin-20(ok505)* vs el control, *Mann Whitney test*, \*\*\*\* $p < 0.0001$ . **B y D.** Niveles de fluorescencia (GFP) en nematodos jóvenes adultos tomando las células GFP positivas de la faringe, se realizaron dos experimentos independientes (B y D), disminución significativa de los niveles de GFP en la cepa *kin-20(ok505)* vs el control. *Mann Whitney test*, \*\*\*\* $p < 0.0001$ , \*\*\* $p < 0.001$ . **E y F.** Imágenes representativas de la expresión de LIN-42 (GFP) en la cepa control (E) y en la cepa *kin-20(ok505)* (F). Imágenes tomadas con microscopio con focal. Barra 60  $\mu$ M.

### Expresión de LIN-42 y KIN-20 tejido-especifica

Para evaluar dónde es necesaria la actividad de los genes candidatos *lin-42* y *kin-20* –cuyos mutantes, como fue mencionado en los capítulos anteriores, mostraron un fenotipo circadiano robusto– se utilizó el sistema de degradación AID antes mencionado. Para llevar a cabo la degradación tejido-especifica de los genes *lin-42* y *kin-20* se utilizaron las cepas que se detallan en la sección de materiales y métodos.

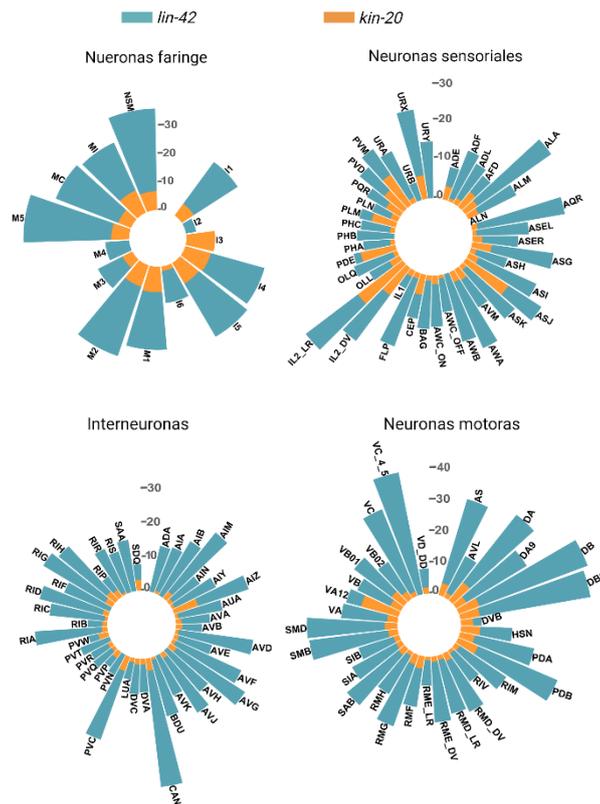
En primer lugar, se analizó el patrón de expresión endógeno de LIN-42b y KIN-20b en neuronas y en las *seam cells* mediante microscopía fluorescente confocal. Para ello, las cepas **VQ1919** [*kin-20b/c::mKate2::AID; lin-42b::GFP::AID; rgef-1p::TIR1::BFP2; qvls8*] y **VQ1870** [*kin-20b/c::mKate2::AID; lin-42b::GFP::AID; SCMp::TIR1::BFP::AID; qvls8*] fueron cruzadas con la cepa **VQ1329** [*kin-*

*20b::mKate2::myc; lin-42b::gfp*] con el objetivo de eliminar el constructo *qvl58* y que de esta forma *p5::GFP* no interfiera con la expresión de LIN-42b::GFP. Las cepas generadas se denominaron **DG12** [*kin-20b/c::mKate2::AID; lin-42b::GFP::AID; rgef-1p::TIR1::BFP2*] y **DG13** [*kin-20b/c::mKate2::AID; lin-42b::GFP::AID; SCMp::TIR1::BFP::AID*]. Los resultados mostraron una fuerte co-localización de LIN-42b y KIN-20b en las neuronas de la faringe y en las *seam cells* de nematodos L4 y jóvenes adultos (Figura 5. 13 B-C).



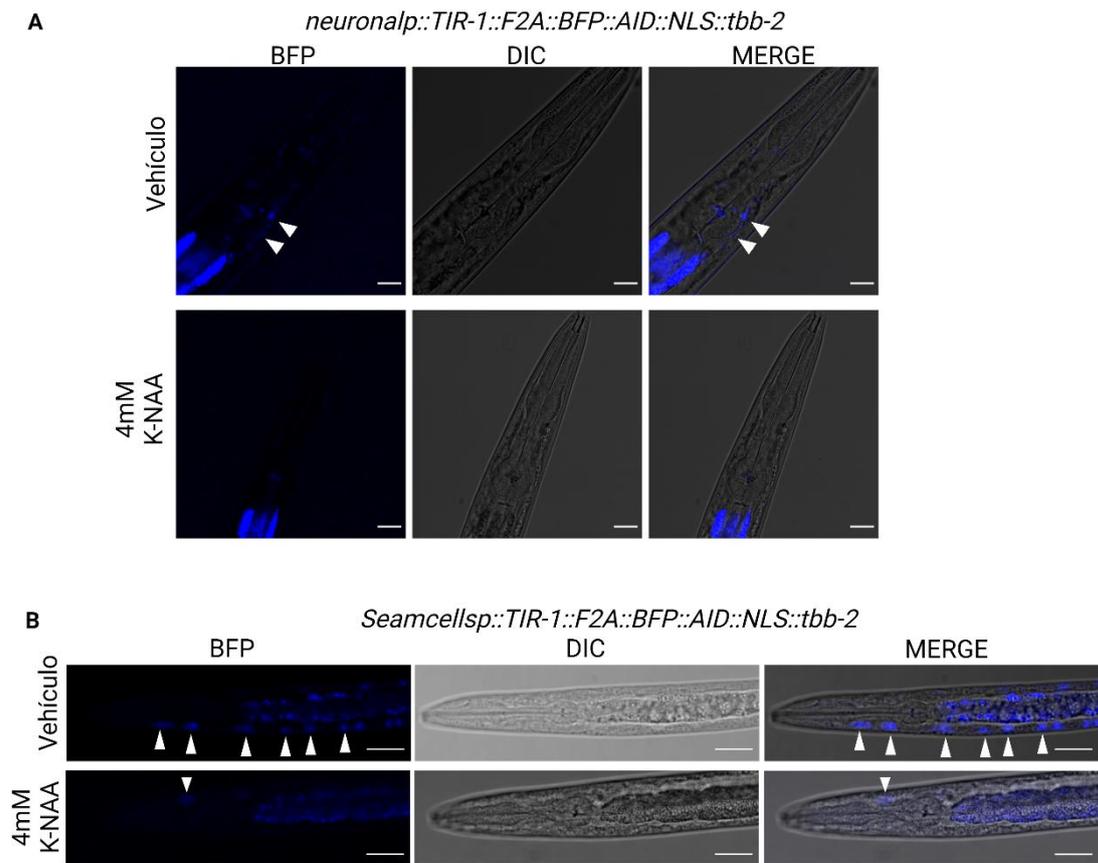
**Figura 5. 13. Expresión de LIN-42 y KIN-20 en neuronas y en las *seam cells*.** **A.** Esquema representativo del sistema AID para *lin-42b* y *kin-20b*, TIR-1 es expresado bajo el promotor neuronal (*prgef-1*) y bajo el promotor de *seam cells* (pSCM). El constructo TIR-1::F2A::BFP::AID::NLS codifica dos proteínas separadas: TIR-1, que interacciona con la proteína SCF endógena, produciendo el complejo ligasa E3 ubiquitina, el cual se une exclusivamente a la secuencia AID en presencia de la droga Auxina; y la secuencia AID unida a BFP con una secuencia de localización nuclear (NLS), que funciona como un control interno de la actividad de TIR-1. La secuencia *lin-42b::AID* fue etiquetada con GFP, y la secuencia *kin-20b::AID* fue etiquetada con mKate2. **B.** GFP y mKate2 fueron detectados en las neuronas BFP positivas (marcado con un círculo blanco). Células representativas con co-expresión de GFP, mKate2 y BFP fueron indicadas con puntas de flechas en el estadio L4. **C.** GFP y mKate2 fueron detectados en las *seam cells* BFP positivas (puntas de flechas) en estadio L4. Células representativas con co-expresión de GFP, mKate2 y BFP fueron indicadas con puntas de flechas en el estadio L4. La marca encontrada en la región del intestino se trata de auto-fluorescencia. Escala de la barra 20  $\mu$ m.

Para confirmar por otro método los resultados obtenidos, se realizó un análisis bioinformático utilizando el CeNGEN [339, 340] para obtener las listas de neuronas donde se expresan los genes *lin-42* y *kin-20*. Hemos encontrado que ambos genes se expresan en las neuronas de la faringe, neuronas motoras, neuronas sensoriales y en las interneuronas (Figura 5. 14).



**Figura 5. 14. Niveles de expresión de *lin-42* y *kin-20* en las neuronas de nematodos adultos.** Niveles de expresión del ARNm de *lin-42* (barras azul-verdoso) y *kin-20* (barras naranjas) en las neuronas de la faringe, neuronas sensoriales, en las neuronas motoras y en las interneuronas. Los datos fueron obtenidos de la base de datos de CeNGEN (<https://www.cengen.org/>). La escala representa el porcentaje de los niveles de expresión del ARNm de los genes de interés, cada una de las barras representa una neurona.

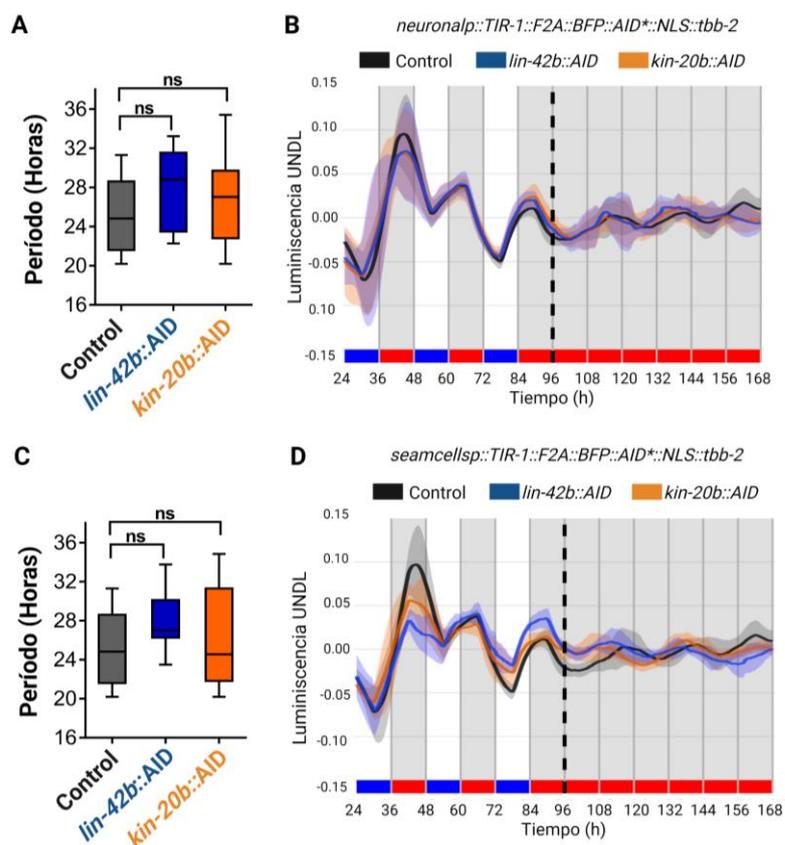
Por otro lado, para comprobar la funcionalidad del sistema AID en los tejidos de interés, medimos los niveles de expresión TIR-1::BFP en nuestras condiciones de registro de luminiscencia mediante microscopía de fluorescencia, en presencia y ausencia de la droga Auxina. Como las *seam cells* en los nematodos adultos son difíciles de observar, utilizamos gusanos en estadio L2/L3 para detectar dicho tipo de células. Para las células neuronales, se usaron gusanos en estadio L4. Como era de esperar, observamos una pérdida significativa de fluorescencia de BFP en las células neuronales y en las *seam cells* después de 7 días de exposición a auxina 4 mM (K-NAA) [341], lo que confirma la degradación específica del BFP::AID (Figura 5. 15 A-B). Estos resultados indican que TIR-1 puede degradar eficazmente las proteínas marcadas con AID en las células neuronales y en las *seam cells* en nuestras condiciones de registro luminiscente.



**Figura 5. 15. Expresión de BFP::AID en neuronas y seam cells expuestas a Auxina.** Imágenes representativas de nematodos que expresan TIR-1 en neuronas (*prgef-1::TIR-1::F2A::BFP::AID::NLS::tbb-2*) (A) y en seam cells (*pSCM::TIR-1::F2A::BFP::AID::NLS::tbb-2*) (B), tratados con el vehículo o con la droga 4 mM K-NAA (Auxina sintética) por 7 días. Imágenes BFP y DIC fueron superpuestas para mostrar la expresión de BFP en neuronas (A) y en seam cells (B), en nematodos en estadio L4 y L2/L3, respectivamente (puntas de flecha). Escala de barra 20  $\mu$ m.

Posteriormente, se analizaron los ritmos de luminiscencia del gen reportero *sur-5::luc::gfp* en animales que contenían el constructo *lin-42b::GFP::AID* y *kin-20b::mKate2::AID* (con expresión de TIR-1 en neuronas o seam cells) y se compararon con la cepa control (línea VQ1310 [*qvl8 (psur5::luc::gfp)*]). Los ensayos de luminiscencia de nematodos transgénicos crecidos durante 3 días bajo condiciones cíclicas (LO/FC: 15,5-17°C; 12:12 h) y luego crecidos por 4 días más bajo condiciones constantes (OO/CC, 17°C) mostraron que los nematodos transgénicos *lin-42b::GFP::AID* y *kin-20b::mkate2::AID* tuvieron un comportamiento similar a la cepa control (Figura 5.16 A-B). Además, se obtuvieron resultados similares al analizar las cepas *lin-42b::GFP::AID* y *kin-20b::mkate2::AID* que expresan TIR-1 en las células neuronales (Figura 5.16 C-D). Así, estos resultados indican que la modificación en los alelos de *lin-42b* y *kin-20b* por la fusión de la proteína fluorescente y la secuencia AID no alteran la expresión de las proteínas LIN-42 y KIN-20 y, en consecuencia, no generan una alteración de los ritmos de luminiscencia del nematodo.

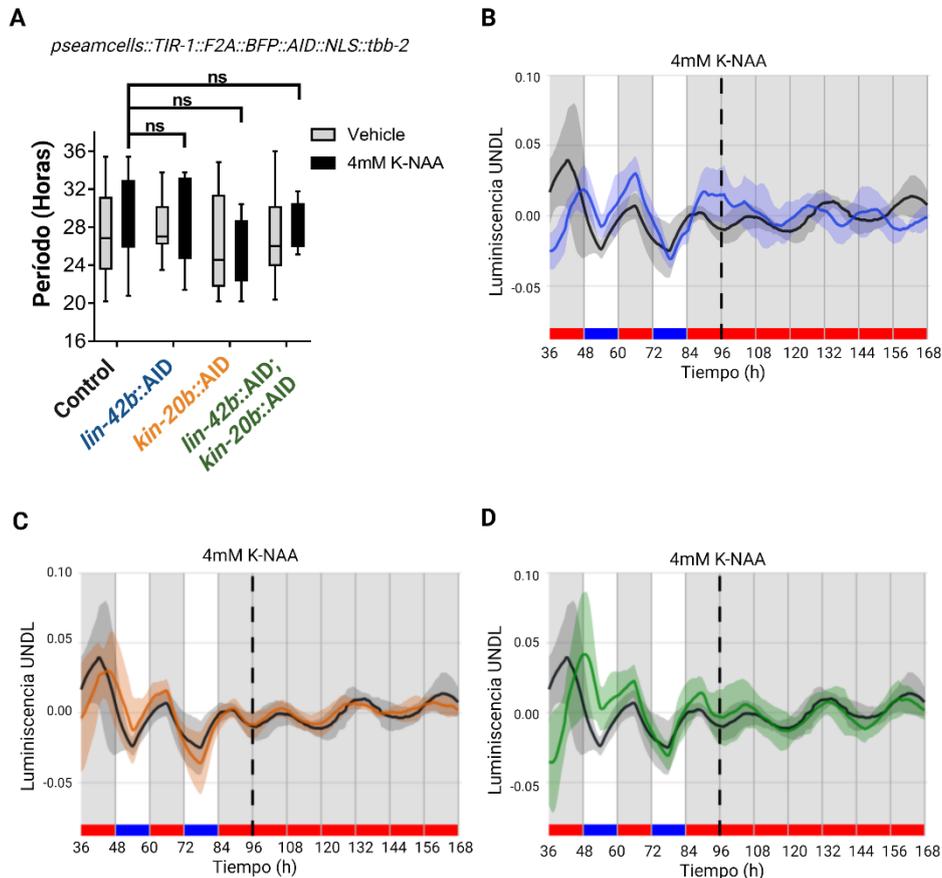
Asimismo, podemos decir que la expresión de TIR-1 en las células neuronales, tanto como en las *seam cells*, no genera una alteración en el comportamiento circadiano del nematodo.



**Figura 5. 16. Registros de luminiscencia de nematodos transgénicos *lin-42b::GFP::AID* y *kin-20b::mkate2::AID*.** **A.** Período endógeno promedio de la cepa control ( $25.09 \pm 0.68$  h,  $n = 29$ ), cepa *lin-42b::AID* ( $27.62 \pm 1.14$  h,  $n = 13$ ) y cepa *kin-20b::AID* ( $26.93 \pm 1.30$  h,  $n = 12$ ), que además expresen la proteína TIR-1 en las células neuronales (*rgef-1p::TIR-1::F2A::BFP::AID::NLS::tbb-2*). ANOVA de 1 vía, *Dunnett's multiple comparisons test*, ns. **B.** Gráficos representativos de los ritmos de luminiscencia de poblaciones de nematodos adultos, bajo un ciclo dual (LO/FC, 12h :12h) y bajo condiciones constantes (OO/CC). **C.** Promedio del período endógeno de la cepa control ( $25.09 \pm 0.68$  h,  $n = 29$ ), *lin-42b::AID* ( $27.87 \pm 0.74$  h,  $n = 14$ ) y *kin-20b::AID* ( $26.16 \pm 1.12$  h,  $n = 17$ ), que además expresen la proteína TIR-1 en *seam cells* (*SM Cp::TIR-1::F2A::BFP::AID::NLS::tbb-2*). ANOVA de 1 vía, *Dunnett's multiple comparisons test*, ns. **D.** Gráficos representativos de los ritmos de luminiscencia de poblaciones de nematodos adultos, bajo un ciclo dual (LO/FC, 12h :12h) y bajo condiciones constantes (OO/CC).

Para estudiar el efecto de la degradación específica de KIN-20b y LIN-42b en las *seam cells* y en neuronas de nematodos adultos sobre los ritmos de luminiscencia del gen reportero *sur-5::luc::gfp*, se registró la luminiscencia en poblaciones durante 3 días en condiciones cíclicas (LO/FC: 15,5-17°C, 12:12 h) y luego por 4 días más en condiciones constantes (OO/CC, 17°C). En cada ensayo, se agregó 4 mM K-NAA en el medio de luminiscencia el primer día de registro, y se observó que la concentración suministrada no generó toxicidad en los nematodos ya que al final del experimento los mismos continuaron moviéndose igual que al comienzo del ensayo. Al comparar los periodos endógenos de nematodos transgénicos expuestos al fármaco o al vehículo (grupo control), no se encontraron diferencias significativas entre

nematodos con disminución en la expresión de KIN-20b y LIN-42b en las *seam cells* y el control; esto sugiere que los ritmos de luminiscencia de *sur-5* no están regulados por las proteínas KIN-20 y LIN-42 en este tipo de células (Figura 5.17 A-D).

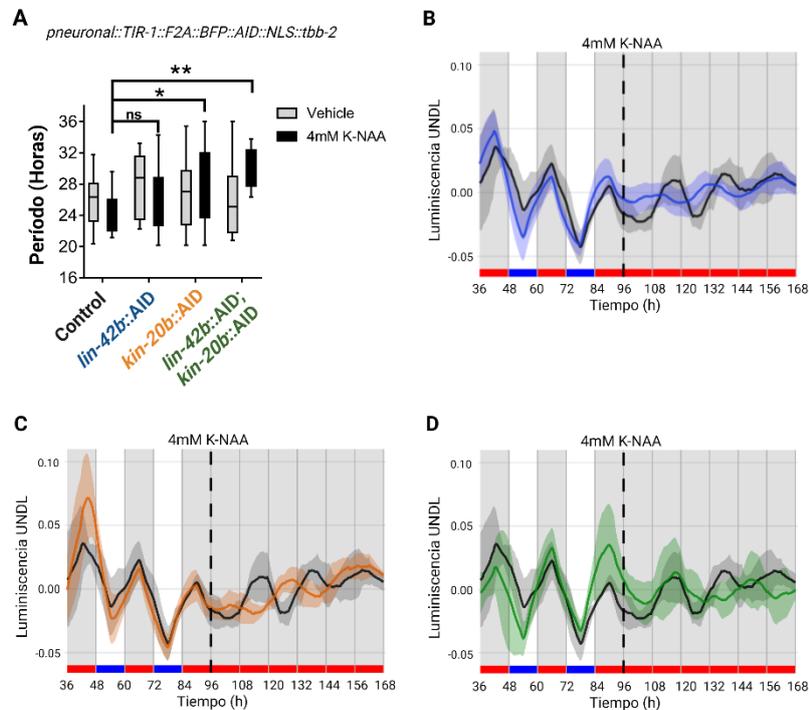


**Figura 5. 17. La ausencia de LIN-42b y KIN-20b en las *seam cells* no modifican los ritmos de luminiscencia.**

**A.** Promedio de los períodos endógenos en el silenciamiento de LIN-42b y KIN-20 en las *seam cells*, expuestas a la droga o al vehículo. Nematodos expuestos al vehículo: Control ( $26.96 \pm 1.05$  h,  $n=18$ ), *lin-42b::AID* ( $27.87 \pm 0.74$  h,  $n=14$ ), *kin-20b::AID* ( $26.16 \pm 1.12$  h,  $n=17$ ) y *lin-42b::AID; kin-20b::AID* ( $26.88 \pm 1.11$ ,  $n=16$ ). Nematodos expuestos a la droga (4 mM Auxina): Control ( $28.87 \pm 1.02$  h,  $n=18$ ), *lin-42b::AID* ( $28.86 \pm 1.60$  h,  $n=8$ ), *kin-20b::AID* ( $25.44 \pm 1.04$  h,  $n=10$ ) y *lin-42b::AID; kin-20b::AID* ( $27.93 \pm 0.71$ ,  $n=11$ ). ANOVA de dos vías, Sidak's multiple comparisons test, ns. **B-D.** Gráficos representativos de los ritmos de luminiscencia de las poblaciones de nematodo adultos expuestos a la droga 4mM (K-NAA), bajo condiciones cíclicas y bajo condiciones constantes: *lin-42b::AID* (B), *kin-20b::AID* (C) y *lin-42b::AID; kin-20b::AID* (D).

Contrariamente, se encontró un alargamiento significativo del período endógeno en nematodos con disminución en la expresión de KIN-20b en neuronas ( $28,32 \pm 1,12$  h,  $n=21$  versus  $24 \pm 0,86$  h,  $n=11$ , del control). Asimismo, una disminución de ambas proteínas (KIN-20b y LIN-42b) generó un cambio significativo en el periodo endógeno ( $30,01 \pm 0,70$  h,  $n=12$  versus  $24 \pm 0,86$  h,  $n=11$ , del control) (Figura 5.14 A, C-D). Cabe destacar que el fenotipo circadiano encontrado en las poblaciones con expresión de

KIN-20 disminuida específicamente en neuronas fue similar al de nematodos mutantes de *kin-20(ok505)* y *kin20(ox423)*, presentados en el capítulo 2. Inesperadamente, una disminución de LIN-42b en células neuronales no generó un cambio significativo en el período endógeno en comparación con el control ( $26,32 \pm 0,89$  h,  $n=19$  versus  $24 \pm 0,86$  h,  $n=11$ , del control) (Figura 5.18 A-B).



**Figura 5. 18. La ausencia de LIN-42b en neuronas no cambia el periodo y KIN-20b en neuronas modifica los ritmos de luminiscencia. A.** Promedio de los períodos endógenos en el silenciamiento de LIN-42b y KIN-20 en las neuronas, expuestas a la droga o al vehículo. Nematodos expuestos al vehículo: Control ( $25.97 \pm 0.85$  h,  $n=17$ ), *lin-42b::AID* ( $27.62 \pm 1.14$  h,  $n=13$ ), *kin-20b::AID* ( $26.93 \pm 1.30$  h,  $n=12$ ) y *lin-42b::AID; kin-20b::AID* ( $26.07 \pm 0.92$ ,  $n=25$ ). Nematodos expuestos a la droga (4 mM Auxina): Control ( $23.99 \pm 0.86$  h,  $n=11$ ), *lin-42b::AID* ( $26.31 \pm 0.89$  h,  $n=19$ ), *kin-20b::AID* ( $28.32 \pm 1.12$  h,  $n=21$ ) y *lin-42b::AID; kin-20b::AID* ( $30.00 \pm 0.70$  h,  $n=12$ ). ANOVA de dos vías, *Dunnett's multiple comparisons test*,  $*p=0.0160$ ,  $**p=0.0020$ . **B-D.** Gráficos representativos de los ritmos de luminiscencia de las poblaciones de nematodo adultos expuestos a la droga 4mM (K-NAA), bajo condiciones cíclicas y bajo condiciones constantes: *lin-42b::AID* (B), *kin-20b::AID* (C) y *lin-42b::AID; kin-20b::AID* (D).

En resumen, la degradación de KIN-20b específicamente en neuronas produjo un alargamiento del período endógeno (al igual que la degradación de ambas proteínas, KIN-20 y LIN-42, en neuronas). Sin embargo, la degradación de LIN-42 específicamente en neuronas no generó un fenotipo circadiano. Estos resultados sugieren que KIN-20b tendría mayor relevancia a la hora de regular los ritmos de luminiscencia de nematodos adultos. KIN-20b podría estar actuando no solo sobre LIN-42b, sino que también podría estar regulando la estabilidad de otras proteínas involucradas en el mecanismo del reloj central de *C. elegans* a través de su fosforilación. Estos resultados sugieren que KIN-20b y, en menor medida, LIN-42b, regulan el

período de los ritmos de luminiscencia de *sur-5* en las neuronas del nematodo adulto. Esto sugiere la idea de un reloj central ubicado en las neuronas de *C. elegans*, como ocurre en otros organismos, y posiblemente con actores moleculares de naturaleza similar.

## Discusión

Las modificaciones postraduccionales de las proteínas reloj regulan la duración del periodo del ciclo circadiano en diferentes organismos, desde *Neurospora* hasta Mamíferos [117, 288, 342, 343]. La principal modificación postraducciona que regula la oscilación de los ritmos circadianos es la fosforilación de PER mediada por CK1 $\epsilon/\delta$ . La interacción entre ambas proteínas (esto es, la regulación de PER mediada por CK1 $\epsilon/\delta$ ) ha sido ampliamente estudiada en diferentes organismos; sin embargo, en *C. elegans* se sabe muy poco sobre la participación de LIN-42 y KIN-20 (homólogos a PER y CK1 $\epsilon/\delta$ , respectivamente) en el sistema circadiano de los nematodos. Estudios bioinformáticos revelaron que tanto los dominios de interacción entre CK1 y PER2 (llamados CK1BD A-B) como los sitios de fosforilación son conservados en la proteína LIN-42 del nematodo [185, 213]. Por otro lado, CK1 tiene alto grado de homología con KIN-20, específicamente en el dominio caseína quinasa necesario para la fosforilación [185]. Como ocurre en otros organismos, KIN-20 podría interactuar con LIN-42 para su regulación mediada por fosforilación. Estudios previos han mostrado evidencias de la posible co-expresión de LIN-42 y KIN-20 en el nematodo, al expresar GFP bajo los promotores de *lin-42* y *kin-20* respectivamente. Estos trabajos mostraron que GFP se expresa en la faringe, en las *seam cells*, en neuronas y en células somáticas de nematodos adultos [216, 305, 344], sugiriendo que LIN-42 y KIN-20 podrían expresarse en esos tejidos. Sin embargo, estos estudios solo demuestran la expresión transcripcional de ambas proteínas.

Para seguir avanzando en el estudio de la participación de LIN-42 y KIN-20 en el sistema circadiano de *C. elegans*, en el presente capítulo estudiamos la expresión endógena de las proteínas LIN-42b y KIN-20b en nematodos en estadio L4-joven adulto, y encontramos una co-expresión de ambas proteínas en las células de la faringe y en las células somáticas. Posteriormente, corroboramos que las células marcadas con LIN-42b::GFP en la región de la faringe eran células neuronales, gracias a la co-expresión de un marcador pan neuronal.

Por otro lado, los ensayos de expresión proteica de LIN-42b mostraron que los niveles de la proteína no varían a lo largo del día (más allá de que observamos una clara tendencia a una mayor expresión durante la noche). Estos resultados son contrarios a los publicados en otros modelos. Por ejemplo, en mamíferos y *Drosophila* se ha encontrado una oscilación clara de la proteína PER con un pico de expresión durante la noche [57, 84, 298]. Una de las dificultades que presentan los estudios de expresión de LIN-42 (ya sea a nivel del ARNm o de la proteína) en el estadio L4-joven adulto, es la disminución drástica de los niveles de *lin-42* en dichos estadios. El transcripto de *lin-42* es altamente detectado durante el desarrollo de los nematodos, pero en los estadios L4 y adulto los niveles disminuyen drásticamente [187]; por lo tanto, es difícil detectar una variación diaria de LIN-42 cuando los niveles de la proteína son muy bajos. Para evitar ese problema, llevamos a cabo un ensayo de *Western blot* (dado que es una técnica que permite revelar la identidad de la proteína mediante el uso de anticuerpos específicos) pero no logramos poner a punto la

técnica ya que no encontramos marca en homogenatos de 4000 nematodos. En un futuro, será necesario seguir trabajando sobre la puesta a punto del *Western blot*, más allá de buscar otras estrategias para medir la variación diaria de la proteína LIN-42 en estadio adulto.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los cuales mostramos una co-localización de KIN-20b y LIN-42b en la región de la faringe y en las células somáticas, se buscó analizar la posible regulación de LIN-42 mediada por KIN-20. Los niveles de GFP se vieron disminuidos en el mutante *kin-20(ok505);lin-42b::gfp*. Estos resultados demuestran que la ausencia de KIN-20 produce una disminución en la expresión de LIN-42, indicando que en animales *wild-type*, es decir cuando KIN-20 se expresa en los nematodos, LIN-42 se encontraría estabilizada. Esta observación correlaciona con resultados previos, donde la expresión de LIN-42a se encuentra disminuida en el mutante *kin-20(ok505)* [306].

Es de particular interés identificar los tejidos y neuronas donde actúan los genes reloj de *C. elegans*, y así comprender mejor dónde estaría ubicado anatómicamente el reloj biológico de estos nematodos. Para ello, el sistema AID nos permitió delimitar a *grosso modo* el sitio de acción de LIN-42 y KIN-20 para la generación de los fenotipos rítmicos. Utilizando el sistema reportero luminiscente desarrollado en nuestro laboratorio, sorprendentemente observamos un cambio en el periodo de luminiscencia cuando degradamos específicamente en neuronas ambas proteínas (LIN-42 y KIN-20), pero no en las *seam cells*. También observamos el mismo fenotipo circadiano cuando degradamos únicamente KIN-20 en neuronas, pero ese aumento de periodo fue menos marcado; esto sugiere que tanto LIN-42 como KIN-20 deben expresarse en neuronas para la correcta funcionalidad del reloj de *C. elegans*. No observamos resultados similares cuando degradamos solo LIN-42 en neuronas. El alargamiento del periodo de luminiscencia observado al degradar específicamente en neuronas tanto LIN-42 como KIN-20 puede deberse a que KIN-20 no solo regule la expresión de LIN-42, sino que también podría estar regulando otras proteínas que tengan participación en el reloj central del nematodo. Si bien en el primer capítulo mostramos que LIN-42 interviene en los ritmos circadianos del nematodo adulto, esos experimentos fueron realizados con líneas mutantes de *lin-42* que tienen defectos en el desarrollo; por lo tanto, el sistema AID también nos permitió estudiar los ritmos de luminiscencia en nematodos con baja concentración de LIN-42 en la etapa adulta. Si bien no se encontraron diferencias significativas en el periodo endógeno entre la cepa con depleción de LIN-42 (mediada por auxina) versus la cepa utilizada como control, se observó una tendencia a aumentar el periodo endógeno de luminiscencia. Muchas veces la dispersión de los datos no nos permite encontrar una diferencia significativa; este es un problema muy común en el estudio de los ritmos poblacionales.

Cabe aclarar que en algunos casos los niveles de expresión de TIR-1 influyen sobre la disminución de la proteína de interés. Un estudio previo demostró que la sobre-expresión de TIR-1 en neuronas de *C. elegans* genera una mayor degradación de la proteína de interés, en comparación con la expresión de TIR-1 en una copia simple [345], lo que lleva a pensar que una baja expresión de TIR-1 genera un menor silenciamiento de la proteína de interés. En nuestros ensayos utilizamos una simple copia de TIR-1, y en

consecuencia, podría pasar que el silenciamiento de LIN-42 y KIN-20 no sea total en las *seam cells*. Además, la inducción de la degradación de la proteína de interés varía dependiendo del tipo de auxina empleada. Las auxinas más usadas son IAA (auxina natural) y K-NAA (auxina análoga soluble en agua, y utilizada en este trabajo). Se demostró en *C. elegans* que la disminución en la expresión de NHR-25::AID (una proteína que interviene en el desarrollo del nematodo) mostró fenotipos diferentes dependiendo de la auxina utilizada [345]. Otro estudio que utilizó la proteína de fusión DAF-15::AID mostró que nematodos crecidos en presencia de IAA presentaron un arresto larval en estadios más tempranos que aquellos tratados con K-NAA [346]. Por lo tanto, resulta necesario corroborar nuestros ensayos de luminiscencia utilizando la auxina I-AA para degradar las proteínas en estudio específicamente en las *seam cells*.

Como fue demostrado en el capítulo 2, la ausencia de KIN-20 produce un alargamiento del período. En roedores se ha demostrado que el alargamiento del período está relacionado con un aumento en los niveles de PER2, generado por la incapacidad de CK1 de fosforilar a PER2 en la S478 y llevarlo a degradación [116]. Estos resultados indicarían que KIN-20 estaría fosforilando a LIN-42 para llevarla a degradación, en consecuencia, en ausencia de KIN-20, LIN-42 se encontraría estabilizado. Sin embargo, en el nematodo observamos que, en ausencia de KIN-20, los niveles de LIN-42 están disminuidos durante el día, lo que sugiere que, en condiciones normales, KIN-20 podría estar fosforilando a LIN-42 para estabilizarla, como sucede con CK1 y PER2, donde la fosforilación en la S659 de PER2 mediada por CK1 produce la estabilización de la proteína [117, 328, 329]. Una posible interpretación es que los niveles de LIN-42 estén disminuidos en ausencia de KIN-20 durante el día, pero durante la fase nocturna exista un aumento mayor al basal y de esa forma se genere un alargamiento del período. Para poder corroborar esa hipótesis es necesario estudiar cómo son los niveles de LIN-42 durante la fase nocturna en ausencia de KIN-20. Además, resulta necesario estudiar el rol de KIN-19, una proteína caseína quinasa con homología a la CK1 [185], la cual también podría estar modulando los niveles de LIN-42.

Los resultados obtenidos en este capítulo sugieren que LIN-42 y KIN-20 participan en la regulación de los ritmos circadianos de nematodos adultos, posiblemente en neuronas. Además, KIN-20 regularía la expresión de LIN-42, demostrando que el reloj molecular es un mecanismo evolutivamente conservado. Como ya fuera mencionado, la presencia de un reloj circadiano le permitiría al nematodo adaptarse a los cambios del medio ambiente y predecir adecuadamente los cambios diarios que suceden en la naturaleza. Nuestros resultados aportan un importante eslabón referido al mecanismo molecular que sustenta dicho reloj circadiano en *C. elegans*.

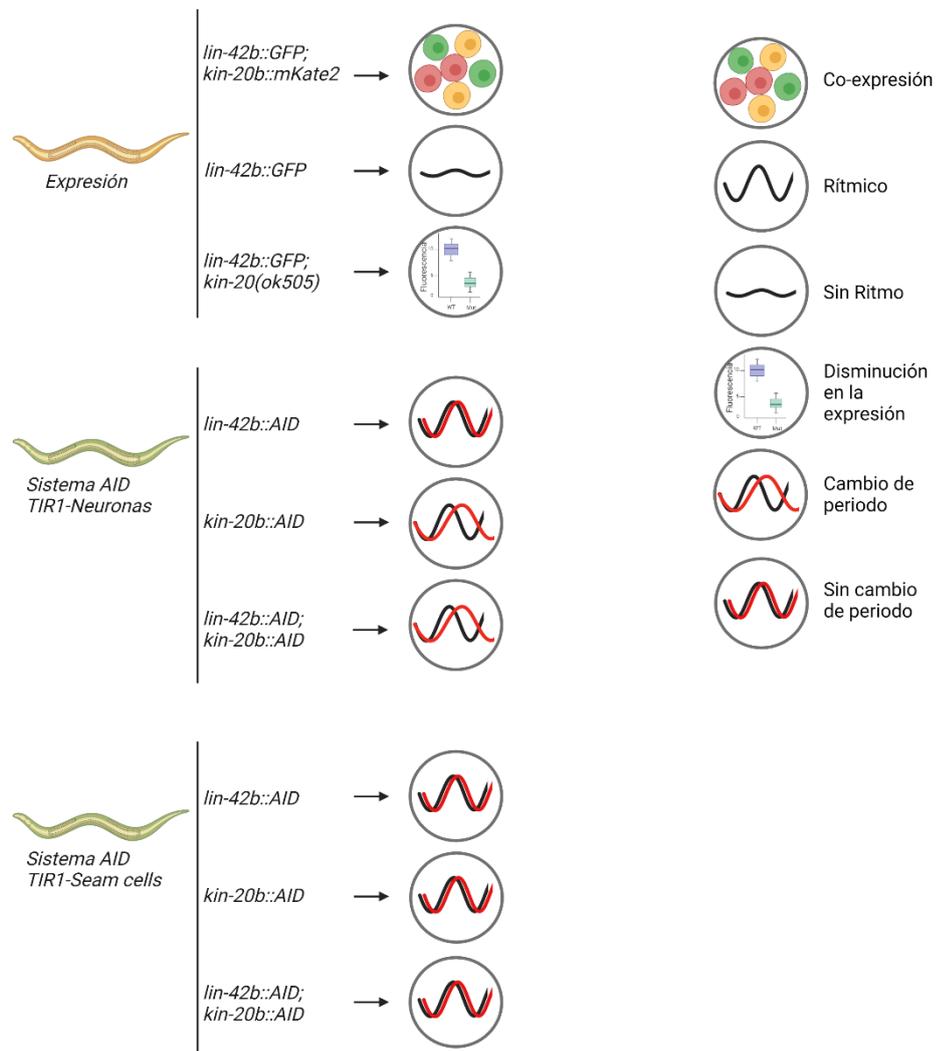


Figura 5. 19. Resumen de los resultados del Capítulo 3.

# .Anexo.

---

**Rol de AHA-1 en los ritmos circadianos de**

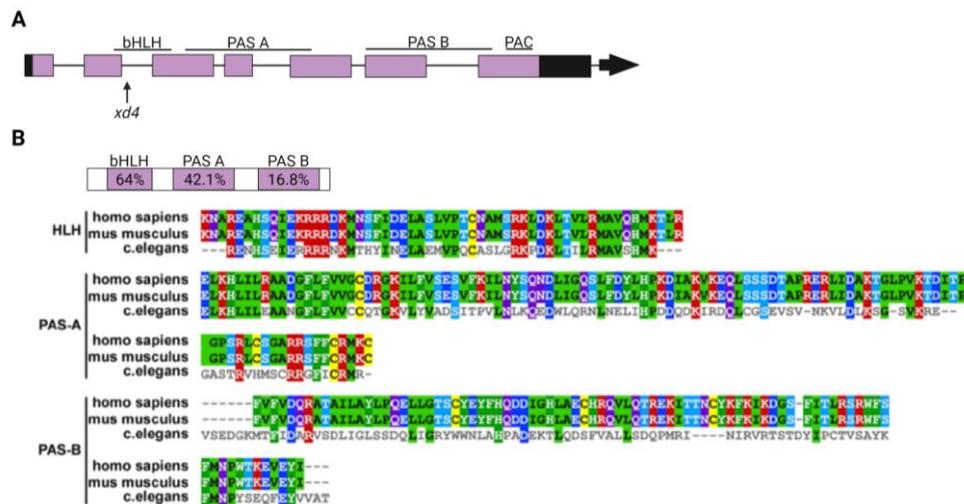
***C. elegans***



## Introducción

Como se mencionó en los capítulos anteriores, en *C. elegans* se han identificado mediante estudios bioinformáticos homólogos a genes reloj central de otros organismos como *Drosophila* y mamíferos [185, 186]. La proteína AHA-1 tiene cierto grado de homología con la proteína CYCLE de *Drosophila* y BMAL-1 de mamíferos [185]. En mamíferos, BMAL-1 y CLOCK forman un heterodímero que se une a los sitios E-box de promotores de genes reloj, como PER y CRY, a través del dominio de unión al ADN llamado bHLH (por sus siglas del inglés, *basic Helix-Loop-Helix*). El heterodímero BMAL-1/CLOCK al unirse a los sitios E-box activan la expresión de *per* y *cry* [270]. Por otro lado, la expresión de BMAL-1 y CRY es controlada por un *loop* transcripcional secundario conformado por las proteínas RORs y REV-ERBs, donde las proteínas RORs (*Retinoid-related Orphan Receptors*) activan la expresión de BMAL-1 y CRY, mientras que las proteínas REV-ERBs inhiben la expresión de BMAL-1 [347-349].

AHA-1 posee 453 aminoácidos y es ortóloga a ARNT (por sus siglas del inglés, *Aryl Hydrocarbon Nuclear Translocator*) de mamíferos. AHA-1 posee dos dominios PAS y un dominio bHLH (motivo de unión a ADN en el extremo N-terminal), entre otros [350-352](Figura 6.1). AHA-1 forma un heterodímero con AHR-1, proteína ortóloga a AHR (por sus siglas del inglés: *Aryl Hydrocarbon Receptor*) de mamíferos [191]. En mamíferos, el heterodímero AHR:ARNT se une a secuencias específicas del DNA y de esta forma regula la transcripción de genes *target*. La función fisiológica de AHR-1 y AHA-1 en el nematodo es desconocida, pero se sabe que cumplen funciones bioquímicas semejantes a lo que ocurre en mamíferos. Se ha demostrado que AHR-1 dimeriza con AHA-1 en el núcleo de las células en *C. elegans*, y por otro lado, se encontró por estudios *in vitro* que el heterodímero AHR-1:AHA-1 se une al elemento XRE (por sus siglas del inglés, *Xenobiotic Response Element*), el cual tiene una función de cofactor transcripcional [190, 351]. Además, está reportado que AHA-1 forma un heterodímero con HIF-1 (por sus siglas del inglés, *Hypoxia Inducible Factor*), homóloga a HIF $\alpha$  de mamíferos (que contiene un motivo bHLH y regiones regulatorias de unión con ADN) [191]. Bajo condiciones de hipoxia, HIF $\alpha$  es translocado al núcleo donde dimeriza con ARNT y genera la activación de genes *target* cuya función es incrementar los niveles de oxígeno o implementar una adaptación metabólica para la hipoxia [353]. En el nematodo, HIF-1 forma un heterodímero con AHA-1 el cual es necesario para la adaptación a condiciones de hipoxia [191, 354].



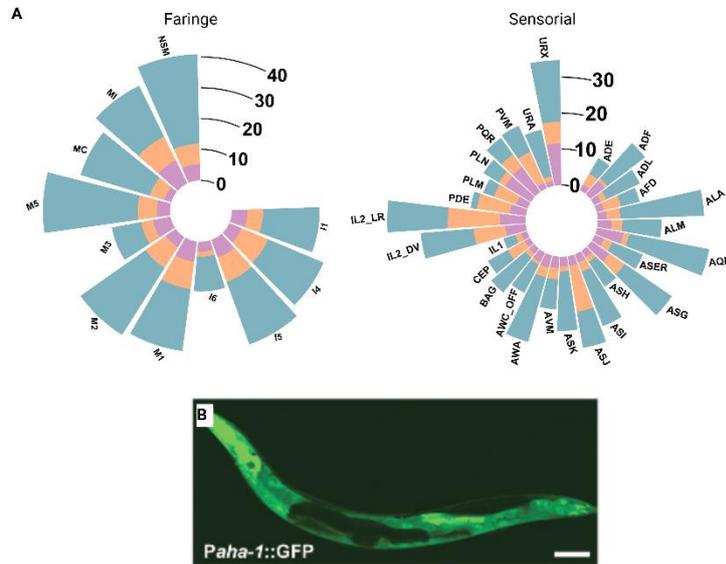
**Figura 6. 1. Secuencia de *aha-1*.** **A.** Arquitectura de *aha-1* en *C. elegans*. Se muestra el dominio PAS (A-B), bHLH, y PAC (por sus siglas del inglés, *PAS-associated C-terminal motif*, necesario para la formación de la estructura de PAS). El mutante *xd4* tiene una modificación de G por A, en el sitio de *splicing*. **B.** Alineamiento entre las secuencias *aha-1* y *bmal-1* de *homo sapiens* y *mus musculus*, datos modificados de Jacobi D, et al., 2015.

En mamíferos, AHR y ARNT cumplen roles importantes durante la regulación de procesos relacionados con el desarrollo; ratones *knockout* para ARNT mueren en estadios tempranos, indicando que ambas proteínas intervienen en el desarrollo de los animales [355]. En *C. elegans*, una mutación nula para el gen *aha-1* genera letalidad en el nematodo [356]. Además, se ha observado que nematodos mutantes para el gen *ahr-1* tienen efectos neurológicos [356, 357].

También, en *C. elegans* AHR-1 interviene en la regulación de genes involucrados en la búsqueda de alimentos y en la evitación de la hiperoxia. Estudios realizados en el nematodo mostraron que *C. elegans* tiene una preferencia por ambientes con baja concentración de oxígeno [358], lo que lleva a pensar que en su nicho ecológico los nematodos podrían preferir ambientes bajos en oxígeno como un indicativo de la presencia de bacterias u hongos los cuales están consumiendo oxígeno activamente [356]. Por otra parte, el dímero AHA-1:AHR-1 interviene en la regulación de neuronas motoras, con consecuente implicancia en el control del comportamiento de forrajeo [268].

El rol de AHA-1 en el sistema circadiano de *C. elegans* fue escasamente estudiado, y los niveles transcripcionales de *aha-1* parecen no ser rítmicos en el nematodo adulto, al menos bajo ciclos clásicos de luz-oscuridad o temperatura y en extracciones de ARN total [174, 317]. Como ya se mencionó, una mutación nula en *aha-1* es letal para el nematodo, por lo tanto, en nuestro laboratorio se estudió previamente una cepa rescatada para *aha-1* (*2g8*) que posee la expresión de *aha-1* en áreas no neuronales de la faringe [359]. No se encontraron diferencias significativas en el período de los ritmos de actividad locomotora entre dicha cepa y la *wild-type* (24.2 h), ni en la capacidad de ser entrenados por estímulos de luz o temperatura [171]. Además, se ha determinado que la expresión del ARNm de *aha-1* se encuentra en neuronas de la

faringe y sensoriales, donde también se expresa *lin-42* y *kin-20* (Figura 6.2 A). A través de la utilización del reportero *paha-1::gfp* se ha comprobado que *aha-1* se expresa en la faringe, en el intestino, en la hipodermis y en el sistema neuronal (Figura 6.2 B) [360].



**Figura 6. 2. Expresión de *aha-1* en el nematodo.** A. Niveles de expresión del ARNm de *lin-42* (barras azul-verdoso), *kin-20* (barras naranjas) y *aha-1* (barras violetas) en las neuronas de la faringe y neuronas sensoriales. Los datos fueron obtenidos de la base de datos de CeNGEN (<https://www.cengen.org/>). La escala representa el porcentaje de los niveles de expresión del ARNm de los genes de interés, cada una de las barras representa una neurona. B. Expresión de *paha-1::GFP* en el nematodo adulto, barra de escala 100 µm. Imagen tomada de Zhang et al., 2013.

Teniendo en cuenta el hecho de que *aha-1*, *lin-42* y *kin-20* se expresen en las neuronas de *C. elegans*, y en base a los resultados obtenidos en esta tesis, hipotetizamos que el reloj central del nematodo podría estar ubicado en algún grupo de neuronas que contemplen un ciclo molecular análogo al conocido en otros modelos. Además, *aha-1* podría estar regulando la expresión de *lin-42* y, en consecuencia, los ritmos circadianos del nematodo adulto, al igual que sucede con sus homólogos *bmal-1* y *per*, en mamíferos.

En este capítulo nos centramos en estudiar la función de *aha-1* en el reloj circadiano del nematodo adulto a través del sistema reportero basado en luminiscencia.

## Objetivos del presente capítulo

- Estudiar la ritmicidad circadiana bajo ciclos de luz/oscuridad y temperatura en líneas mutantes para el gen *aha-1*. En particular, nos centraremos en ritmos de expresión génica.
- Estudiar los ritmos transcripcionales el gen *aha-1* bajo ciclos de luz/oscuridad y temperatura.

## Materiales y Métodos

### Cepas de nematodos

Los nematodos transgénicos utilizados en este trabajo fueron generados por cruzamiento mediante una colaboración con el laboratorio de la Dra. Claire Bénard, del *Département des sciences biologiques, Université du Québec à Montréal*, Canada. La cepa XD321 [*aha-1(xd4)*] fue cedida por el laboratorio Mei Ding [360].

La cepa XD321 [*aha-1(xd4)*] posee una mutación puntual en *aha-1*. El cambio de un aminoácido G por A, en el segundo sitio de *splicing*, genera una disminución en los niveles transcripcionales de *aha-1* [360]. Los nematodos mutantes tienen una morfología y una locomoción similar a la cepa *wild-type*. La cepa fue cruzada con la cepa VQ1310 (*qvl8 [psur5::luc::gfp; punc-122::RFP]*), generando la cepa VQ1722 [*aha-1(xd4)* I; *qvl8*]. Los métodos de cruzamiento se encuentran detallados en la sección “Materiales y Métodos: cruce de cepas mutantes”. La cepa *paha-1::luc::gfp* fue generada previamente en el laboratorio.

### Ensayo de luminiscencia

Los registros de luminiscencia se llevaron a cabo bajo un ciclo dual de luz/oscuridad y temperatura (15,5°C/17°C, 12:12 h) y fueron realizados en placas *multiwells*. En todos los casos se utilizó el medio de luminiscencia descrito en la sección de materiales y métodos generales.

- **Ensayo de luminiscencia en placa multiwell bajo condiciones cíclicas**

Los ensayos bajo condiciones cíclicas de luz/oscuridad y temperatura (15,5°C/17°C, 12:12 h) fueron realizados en todos los casos con poblaciones de nematodos (aproximadamente 50 nematodos por *well*).

- **Análisis de Datos**

Los datos fueron analizados como se describe en la sección de materiales y métodos generales. Para todos los casos se realizó un análisis de la varianza y un *test* de normalidad *D’Agostino* y *Pearson test*, si pasaban el *test* de normalidad se realizó un *test* de *Student* (*Student’s t-test*) para la comparación de los cambios de periodos, si los datos no pasaran el *test* de normalidad se realizó un *test* no paramétrico, *Mann Whitney test*. Se realizó un *test Watson-Wheeler* en R Studio para el análisis del cambio de fase, y las acrofases fueron analizadas por un *test* de *Rayleigh* utilizando el programa *El Temps* (versión 1.313). Para el análisis de los porcentajes de nematodos sincronizados, rítmicos y entrenados se utilizó un ANOVA de dos vías. En todos los casos un valor de  $P < 0,05$  fue considerado como el mínimo para ser estadísticamente diferente. Para todos los análisis estadísticos se utilizó el programa *GraphPad Prism 7*.

## Ensayos de PCR en tiempo real

Poblaciones de nematodos adultos, cepa N2 (Bristol), fueron sincronizadas por la técnica de Cloro e NaOH [135]. Los huevos fueron recolectados y mantenidos en agitación en *buffer* M9 durante toda la noche. Al día siguiente, las larvas L1 fueron pasadas a placas NGM con bacterias (*E. Coli* HB101); se utilizaron 64 placas con 4.000 L1 por placa. Los nematodos fueron crecidos bajo un ciclo dual de luz/oscuridad y temperatura 12: 12 h (~150  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ :18.5 °C/0  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ :20 °C) por 48 hs. Luego, las larvas L4 fueron recolectadas a ZT4 (1 pm), lavadas con *buffer* M9 para remover los restos de bacteria, y pasadas a 4 Erlenmeyer de 500 ml con 130 ml de medio de luminiscencia sin luciferina (aproximadamente 64.000 nematodos por Erlenmeyer). Los nematodos fueron entrenados bajo un ciclo dual de luz/oscuridad y temperatura 12: 12 h (~150  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ :15.5 °C/0  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ :17 °C) en agitación 110 rpm durante 2 días, y luego fueron dejados 2 días más en condiciones constantes (oscuridad, 17 °C). Cuatro muestras biológicas independientes (n=4) de ~4000 nematodos cada una fueron recolectadas cada 4 hs, comenzando a ZT1 (10 am) en el segundo día bajo condiciones cíclicas y bajo condiciones constantes. Los nematodos fueron pasados a falcón de 15 ml, se esperó hasta que decanten y se les saco el medio de luminiscencia. Luego, se agregó 200  $\mu\text{l}$  de Trizol (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos) y fueron pasados a tubos eppendorf de 1,5 ml y congelados a -80°C.

El ARN total fue extraído de las muestras mediante el método de Trizol de acuerdo con las instrucciones del proveedor. 2  $\mu\text{g}$  de ARN total fueron tratados con *DNAse I amplification grade* (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos) y utilizados para realizar la síntesis de ADNc utilizando MLLV transcriptasa reversa (PB-L, Argentina) 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 3.0* (PB-L, Argentina) utilizando un termociclador *QuantStudio 3* (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos). 9  $\mu\text{l}$  de *mix* fue agregado en cada uno de los 96 pocillos de la placa de PCR, y 1  $\mu\text{l}$  de ADNc fue añadido como molde de PCR. El programa de PCR fue 10 minutos a 95 °C, 45 ciclos de 15 segundos a 95 °C y 60 segundos a 60 °C, 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 del gen de referencia Y45F10D.4. Los *primers* utilizados para amplificación de *aha-1* y Y45F10D.4 fueron:

Fw\_aha-1: 5'-GTTCGTGTTTCGGAAGATGG-3'

Rv\_aha-1: 5'-TTCTCATCTGCTGGATGTGC-3'

Fw\_Y45f10D.4: 5'-GTCGCTTCAAATCAGTTCAGC-3'

Rv\_Y45f10D.4: 5'-GTTCTTGTC AAGT GATCCGACA-3'

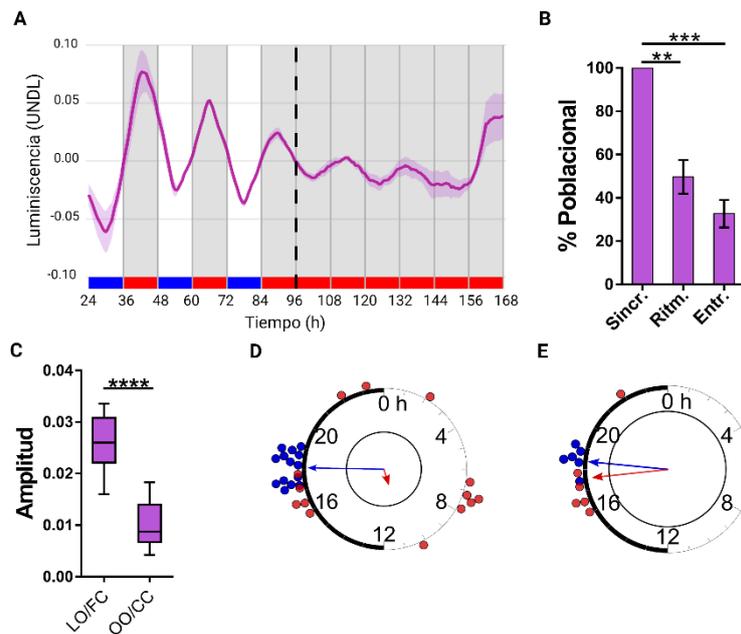
Las secuencias completas de los genes blanco fueron extraídas del *WormBase*, y los *primers* fueron diseñados con el programa *CloneManager* y fueron revisados para la especificidad utilizando NCBI BLAST (Blastn). Para la puesta a punto de cada *set* de *primers* se construyó una curva estándar de 3 puntos (serie de diluciones seriadas 1/10) para cada gen y se determinó la concentración adecuada de *primers* (0,2; 0,4; 0,6  $\mu$ M) a la cual la eficiencia fue mayor. Todos los oligos fueron sintetizados en Macrogen (Corea).

## Resultados

### Ritmos transcripcionales del gen *aha-1*

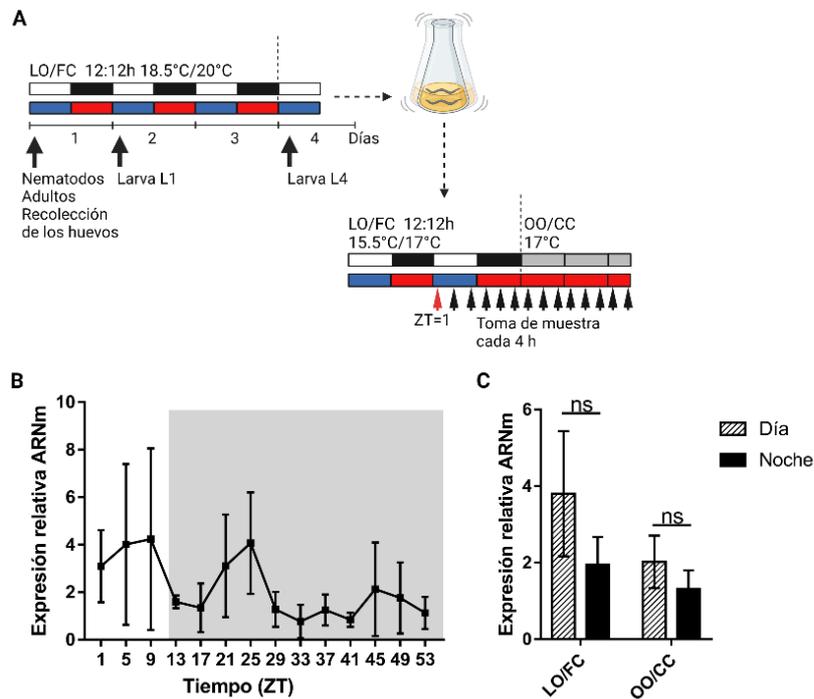
Para comprobar si *aha-1* presenta ritmos transcripcionales, se generó una línea transgénica con el reportero *paha-1::luc::gfp*, para registrar luminiscencia *in vivo*. Poblaciones de nematodos adultos mostraron un ritmo robusto de luminiscencia tanto bajo condiciones cíclicas como condiciones constantes, pudiendo evidenciarse un pico de luminiscencia durante la fase nocturna del ciclo que se mantuvo en condiciones constantes (Figura 6.5 A). La cepa exhibió un periodo endógeno promedio de  $24.15 \pm 0.75$  h,  $n = 13$ .

El análisis de los resultados mostró que el porcentaje de nematodos que logró sincronizarse al ciclo ambiental fue del 100% ( $n = 3$ ), mientras que el porcentaje de nematodos rítmicos fue de  $49.66 \pm 7.79\%$ ,  $n = 3$ . El porcentaje de poblaciones entrenadas fue de  $32.66 \pm 6.36\%$ ,  $n = 3$ , indicando que existe una disminución en el porcentaje de poblaciones que pueden entrenar al ciclo dual de luz y temperatura (Figura 6.5 B). Por otro lado, la amplitud del ritmo de luminiscencia fue significativa menor bajo condiciones constantes (LO/FC:  $0.026 \pm 0.001$  UNDL,  $n = 13$  versus OO/CC:  $0.01 \pm 0.001$  UNDL,  $n = 13$ ) (Figura 6.5 C). Finalmente, se determinaron las acrofases mediante el *test* de *Rayleigh*. Teniendo en cuenta las poblaciones rítmicas, la acrofase promedio del ritmo de luminiscencia fue a ZT  $18.08 \pm 0.16$  h ( $R = 0.98$ ,  $n = 14$ ) y a CT  $5.12 \pm 1.37$  h CT ( $R = 0.10$ ,  $n = 14$ ) (Figura 6.5 D). Asimismo, al estudiar la población de nematodos entrenados, las acrofases se vieron agrupadas bajo la fase nocturna tanto bajo condiciones cíclicas ( $18.42 \pm 0.19$ h ZT,  $n = 6$ ,  $R = 0.99$ ), como bajo condiciones constantes ( $17.48 \pm 0.79$  h CT,  $n = 6$ ,  $R = 0.86$ ) (Figura 6.5 E).



**Figura 6. 5. Ritmos de expresión transcripcional de *aha-1*.** **A.** Luminescencia promedio de las poblaciones mutantes *paha-1::luc::gfp* bajo condiciones de LO/FC y OO/CC. **B.** Porcentaje de nematodos sincronizados, rítmicos y entrenados; se encontró una disminución marcada en el porcentaje de nematodos rítmicos y entrenados, en la cepa *aha-1(xd4)*. ANOVA de 1 vía, *Turkey's multiple comparisons test*, \*\* $p=0.0021$ , \*\*\* $p=0.0004$ . **C.** Promedio de la amplitud del ritmo de luminescencia para la población de nematodos rítmicos, *aha-1(xd4)*:  $0.026 \pm 0.0014$  UNDL,  $n=14$  (LO/FC) versus  $0.0098 \pm 0.0011$  UNDL,  $n=14$  (OO/CC). Se encontró una disminución en la amplitud significativamente al pasar de LO/FC a OO/CC. *t-test* no pareado, \*\*\*\* $p<0.0001$ . **D-E.** Gráficos de *Rayleigh* de las acrofasas para la población de nematodos rítmicos (D) y entrenados (E) en condiciones LO/FC (puntos azules) y OO/CC (puntos rojos) para *aha-1(xd4)*.

Seguidamente a los ensayos de luminescencia, se procedió a estudiar el patrón de expresión del ARNm de *aha-1* en nematodos adultos mediante qPCR (Figura 6.6 A), como se detalla en la sección materiales y métodos. Los resultados mostraron que los niveles del ARNm de *aha-1* no tiene una oscilación circadiana (Figura 6.6 B). Los niveles de expresión del transcripto fueron analizados por un ANOVA de una vía, seguido de un *test* de *Turkey multiple comparisons*. No se encontraron diferencias significativas entre ninguno de los puntos de la curva, aunque se puede apreciar una aparente oscilación con un aumento en la expresión del transcripto durante la fase diurna. Sin embargo, al analizar los datos por método de *cosinor* con el paquete de *MetaCycle* de *RStudio*, la oscilación no se ajusta a una onda coseno (Figura 6.6 B). Además, se compararon los promedios de los valores de expresión del ARNm diarios y nocturnos; si bien se observó un aumento en los niveles del ARNm durante la fase diurna, la diferencia no fue significativa (Figura 6.6 C). En resumen, podemos decir que el ARNm de *aha-1* no presenta una oscilación circadiana bajo las condiciones estudiadas.



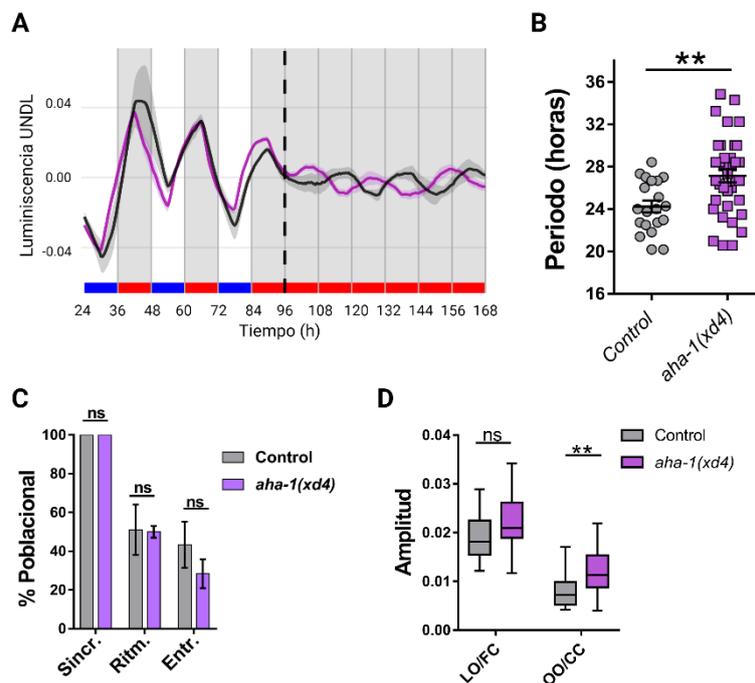
**Figura 6. 6. Ritmos de expresión del ARNm de *aha-1*.** A. Esquema de las condiciones de luz y temperatura utilizadas y del experimento, y de la toma de muestra del ARNm. B. Niveles promedio de expresión del ARNm *aha-1* (n=4) cada 4 h bajo LO/FC y OO/CC, horario ZT. ANOVA de una vía, *Turkey's multiple comparisons test*, ns. C. Promedio de la expresión del ARNm para el día y la noche bajo condiciones LO/FC y OO/CC. ANOVA de 2 vías, *Sidak's multiple comparisons test*, ns.

### Caracterización del rol de AHA-1 en los ritmos circadianos de nematodos adultos

Para entender el rol de AHA-1 en los ritmos circadianos de *C. elegans*, se estudió el ritmo de luminiscencia de *sur-5* en una cepa mutante para *aha-1*. En particular, se utilizó la cepa *aha-1(xd4)*, la cual posee una sustitución de un nucleótido G por A en el segundo sitio de *splicing*, generando una disminución en los niveles de expresión de *aha-1* [360].

Los registros de luminiscencia muestran que los nematodos *aha-1(xd4)* tienen un ritmo de luminiscencia robusto bajo condiciones cíclicas y constantes (Figura 6.3 A), y se observó un aumento de la actividad de luminiscencia durante la fase nocturna del ciclo, al igual que la cepa control. Bajo condiciones constantes se encontró un pico durante el día subjetivo, completamente en antifase con la cepa control (Figura 6.3 A). *aha-1(xd4)* exhibió un alargamiento significativo en el período endógeno ( $27.14 \pm 0.61$  h, n = 36 versus el control  $24.24 \pm 0.55$  h, n = 20) (Figura 6.3 B). Al analizar el porcentaje de nematodos sincronizados al ciclo dual de luz y temperatura no se encontraron diferencias significativas respecto a la cepa control ( $100 \pm 0$  %, n = 3 versus el control  $100 \pm 0$  %, n = 3). Tampoco se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de nematodos rítmicos ( $50.00 \pm 3.05$  %, n = 3 versus el control  $51.00 \pm 13.00$  %, n = 3) y entrenados ( $28.33 \pm 7.42$  %, n = 3 versus el control  $43.33 \pm 11.86$  %, n = 3) (Figura 6.3 C).

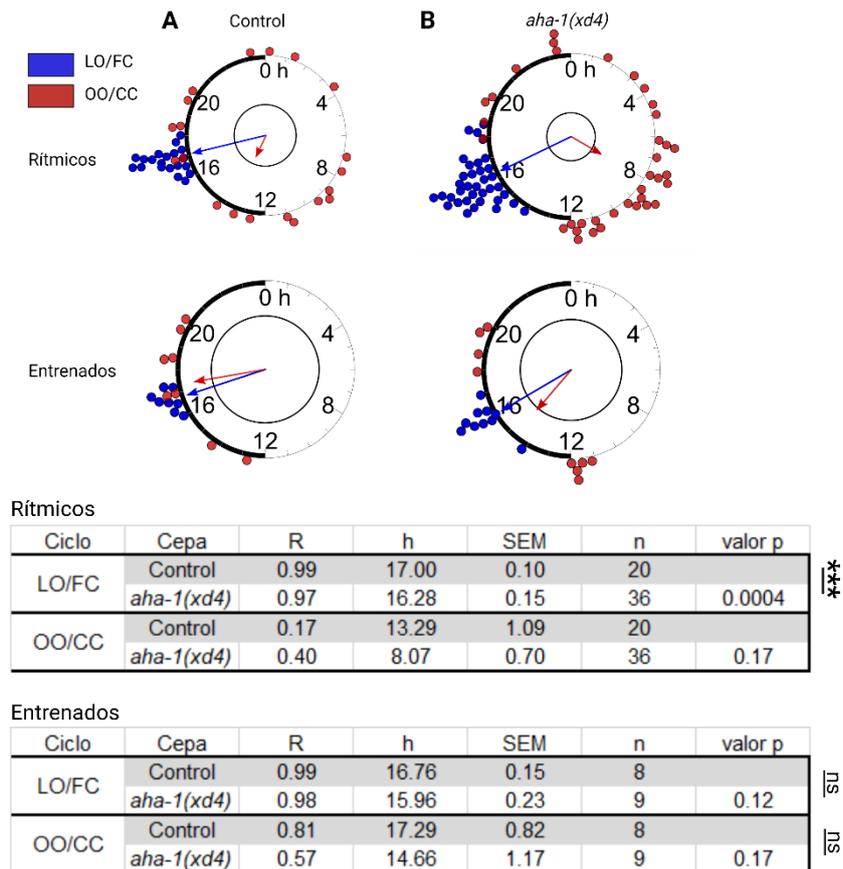
A partir del análisis de los datos se determinó la amplitud de los ritmos de luminiscencia, y se encontró que la misma disminuye al pasar de condiciones cíclicas a condiciones constantes; ambas cepas estudiadas no presentaron diferencias significativas en la amplitud bajo condiciones cíclicas (LO/FC) (*aha-1(xd4)*:  $0.022 \pm 0.0009$  UNDL,  $n = 36$ , versus el control:  $0.019 \pm 0.001$  UNDL,  $n = 20$ ). Sin embargo, bajo condiciones constantes (OO/CC) la cepa mutante tiene una amplitud significativamente mayor a la cepa control (*aha-1(xd4)*:  $0.012 \pm 0.0008$  UNDL,  $n = 36$ , versus el control:  $0.008 \pm 0.001$  UNDL,  $n = 20$ ) (Figura 6.3 D).



**Figura 6.3. Sincronización de poblaciones mutantes *aha-1(xd4)* bajo el ciclo LO/FC.** **A.** Datos suavizados (*smooth* de 12h) y sin tendencia (*detrend* de 24h) para el control (línea negra) y *aha-1(xd4)* (línea violeta), bajo un ciclo dual de luz/oscuridad y temperatura (LO/FC 15.5 °C/17 °C) por 3 días y bajo condiciones constantes por 4 días más (OO/CC 17 °C). **B.** Período promedio de las oscilaciones correspondientes a las poblaciones de nematodos rítmicos de *aha-1(xd4)*  $27.14 \pm 0.61$  h ( $n = 36$ ) versus el control  $24.24 \pm 0.55$  ( $n = 20$ ), *t*-test no pareado,  $**p=0.0028$ . **C.** Porcentaje de nematodos sincronizados, rítmicos y entrenados; no se encontraron diferencias entre *aha-1(xd4)* y la cepa control. ANOVA de 2 vías, *Sidak's multiple comparisons test*. **D.** Promedio de la amplitud del ritmo de luminiscencia para la población de nematodos rítmicos, *aha-1(xd4)*:  $0.022 \pm 0.0009$  UNDL,  $n = 36$  (LO/FC);  $0.012 \pm 0.0008$  UNDL,  $n = 36$  (OO/CC) versus el control:  $0.019 \pm 0.001$  UNDL,  $n = 20$  (LO/FC);  $0.008 \pm 0.001$  UNDL,  $n = 20$  (OO/CC). Se encontró una amplitud significativamente superior en la cepa mutante bajo condiciones constantes. ANOVA de 2 vías, *Sidak's multiple comparisons test*,  $**p= 0.0070$ .

Adicionalmente, con estos datos se realizó un *test* circular de *Rayleigh* y se analizaron las poblaciones de nematodos rítmicos y entrenados. La población de nematodos rítmicos, bajo condiciones cíclicas, demostró que *aha-1(xd4)* tiene un leve retraso de fase ( $16.28 \pm 0.15$  h ZT,  $n = 36$ ) en comparación al control ( $17.00 \pm 0.10$  h ZT,  $n = 20$ ), bajo condiciones constantes, aunque no se observaron diferencias

significativas (ambas cepas, mutante y control, presentan una amplia dispersión en dicha condición). Sin embargo, se distingue un agrupamiento de las acrofases para la cepa mutante en la fase diurna ( $8.07 \pm 0.70$  h CT,  $n = 36$ ). Al tomar la población de nematodos entrenados no se encontraron diferencias significativas entre la cepa mutante y el control, tanto para condiciones cíclicas como para condiciones constantes las acrofases se encontraron agrupadas en la fase nocturna para ambas cepas (Figura 6.4 A-B).



**Figura 6. 4. Acrofases de *aha-1(xd4)*.** **A.** Gráficos de *Rayleigh* de las acrofases de los registros de luminiscencia de la población de nematodos rítmicas y entrenados bajo condiciones cíclicas (LO/FC, puntos azules) y bajo condiciones constantes (OO/CC, puntos rojos) para la cepa control. **B.** Gráficos de *Rayleigh* de las acrofases de los registros de luminiscencia para la población de nematodos rítmicos y entrenados en condiciones LO/FC (puntos azules) y OO/CC (puntos rojos) para *aha-1(xd4)*. *Watson-Wheeler test*, \*\*\* $p > 0.0005$ . Se detallan los valores obtenidos para las acrofases para los nematodos rítmicos (Tabla superior) y para los nematodos entrenados (Tabla inferior).

Todos estos resultados indicarían que una mutación en *aha-1* modifica el período endógeno del nematodo, pero no la capacidad de ser sincronizado o entrenado a un ciclo dual de luz y temperatura.

## Discusión

Nuestros resultados muestran que una mutación en el gen *aha-1* es capaz de alterar los ritmos de luminiscencia de *sur-5*, generando específicamente un alargamiento significativo del período endógeno en comparación con el control. Sin embargo, la disminución de *aha-1* en el mutante *aha-1(xd4)* no alteró la capacidad de los nematodos de ser sincronizados y entrenados bajo las condiciones de luz y temperatura ensayadas. Si bien, tanto la cepa mutante como la cepa control presentan un aumento de los niveles luminiscencia durante la fase nocturna, bajo condiciones cíclicas, se encontró que la cepa mutante presenta un corrimiento de fase significativo de ~1 h. Bajo condiciones de *free running* (FR), la cepa mutante mostró un agrupamiento de las acrofases durante la fase diurna (pero con una gran dispersión, por lo que el *test* de *Rayleigh* no fue significativo) y, por lo tanto, no es comparable con el promedio de las acrofases de la cepa control bajo las mismas condiciones. Al igual que en todos los experimentos de luminiscencia, también observamos que la amplitud del ritmo de luminiscencia disminuye drásticamente al pasar de condiciones cíclicas a condiciones constantes; como se ha mencionado en capítulos anteriores, esto puede deberse a un envejecimiento de los nematodos a medida que pasa el tiempo. Al centrarnos en el estudio de la población de nematodos que tuvieron la capacidad de ser entrenados al ciclo dual de luz y temperatura, no se encontró una diferencia en la distribución de la acrofase entre la cepa mutante y la cepa control, ni bajo condiciones cíclicas, ni bajo condiciones constantes. Estos datos sugieren que la proteína AHA-1 afecta los ritmos de luminiscencia a través de una modificación en el período endógeno, pero no afectaría la capacidad del nematodo de ser entrenado por estímulos externos, como la luz y la temperatura.

En mamíferos, mutantes *knockout* para BMAL-1 (*bmal-1<sup>-/-</sup>*) exhiben la pérdida de los ritmos circadianos, tanto comportamentales como moleculares. Además, se observó que dichos mutantes presentan una disminución en la actividad locomotora y un aumento de la masa corporal, así como una vida más corta [361-363]. En *Drosophila*, moscas mutantes para *cycle* (*bmal-1*) muestran disrupción en el periodo de sueño, y además presentan un acortamiento del tiempo de vida en machos [364]. La regulación de *bmal-1* en el promedio de vida parece ser una función conservada entre los diferentes organismos, ya que en *C. elegans*, se ha demostrado que el mutante de *aha-1* presenta una disminución en el promedio de vida [357]. Por otro lado, se ha reportado que una disminución de *aha-1* por ARNi genera una desorganización mitocondrial, y la sobre-expresión de *aha-1* prologa el tiempo de vida de los nematodos [352]. Además, estudios realizados en nuestro laboratorio demostraron que al rescatar la mutación de *aha-1*, los ritmos de actividad locomotora del nematodo adulto son semejantes a la cepa *wild-type* [171]. Hasta el momento, no se han encontrado otros estudios que relación al gen *aha-1* con la regulación de los ritmos circadianos del nematodo.

Nuestros datos indican que el promotor *aha-1* tiene una oscilación marcada bajo condiciones cíclicas (LO/FC) con un periodo cercano a las 24h, y presenta un pico de luminiscencia durante la fase nocturna.

La oscilación se mantiene bajo condiciones constantes, con un periodo cercano a las 24 h, manteniendo el pico de actividad durante la noche subjetiva. Resulta interesante notar que los ritmos de luminiscencia para el promotor *lin-42* se encuentran en contra fase con los ritmos del promotor de *aha-1* bajo condiciones cíclicas, estos resultados coinciden con lo encontrado en otros organismos, como en ratones, donde se observó que los ritmos transcripcionales de *per* y *bmal-1* se expresan en contra fase [365].

Sin embargo, en el presente trabajo no hemos encontrado un ritmo marcado de *aha-1* al estudiar los niveles del ARNm; si bien se observa una oscilación, existe una dispersión amplia de los datos que dificulta poder encontrar una variación significativa. Además, se compararon los niveles de expresión promedio del día y la noche bajo condiciones cíclicas y bajo condiciones constantes, pero tampoco se encontró una variación significativa. Al igual que *lin-42*, los niveles de expresión de *aha-1* disminuyen en el nematodo adulto, este podría ser un motivo por lo cual no se logra apreciar una diferencia en los niveles de expresión del ARNm a lo largo del día. En estudios previos, se demostró que los niveles transcripcionales del ARNm de *aha-1* no son rítmicos en el nematodo adulto, al menos bajo ciclos clásicos de luz-oscuridad o temperatura [174, 317]. El hecho de que no exista una variación diaria en los niveles de ARNm de *aha-1*, también puede deberse a que se midieron los niveles de ARNm total, podría estar sucediendo que *aha-1* tenga una oscilación, pero solo en un grupo de células específicas y al estudiar el ARNm total del nematodo, estos ritmos se encuentran enmascarados. Una forma de subsanar esta metodología, sería realizar un RT-qPCR en *single-cell*.

Los datos encontrados en mamíferos demuestran que *bmal-1* no solo cumple funciones en la regulación de los ritmos circadianos, sino también en el mantenimiento metabólico de los organismos y en su promedio de vida [352]. En *C. elegans*, *aha-1* cumple funciones metabólicas y también participa en procesos relacionados con el envejecimiento de los nematodos [352]. En el presente capítulo demostramos que *aha-1* también interviene en el mantenimiento de los ritmos circadianos del nematodo adulto, muy posiblemente actuando como un activador transcripcional de *lin-42*, al igual que pasa con sus homólogos *bmal-1* y *per* en mamífero y *Drosophila* [364, 365]. Para poder comprender más acerca de la función de *aha-1* en los ritmos circadianos del nematodo, resulta interesante medir los niveles transcripcionales de *lin-42* en el mutante *aha-1*, así como corroborar la función de *aha-1* en los ritmos del nematodo mediante el rescate de la mutación. Adicionalmente, estudios de ARNseq bajo condiciones cíclicas y constantes permitirán obtener mayor información de los genes que tienen la capacidad de oscilar bajo ciertos estímulos y posiblemente encontrar otros componentes que estén implicados en el funcionamiento del reloj central del nematodo.

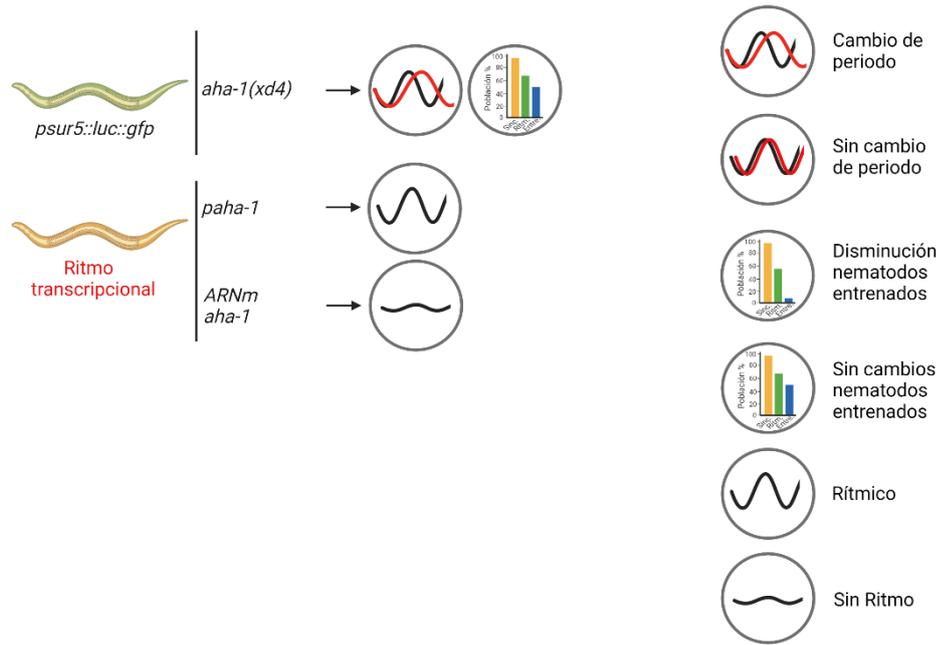


Figura 6. 7. Resumen de los resultados del Anexo.

# **.Conclusión General.**

---

A lo largo de la evolución, la alternancia entre el día y la noche –causada por la rotación de la Tierra– ha favorecido a aquellos organismos que fueron capaces de adaptarse a tales cambios periódicos presentes en el entorno. Todos los animales estudiados hasta el momento poseen una red jerárquica de relojes centrales y periféricos que les permite ajustar su fisiología y comportamiento mediante la sincronización al día solar y, a través de ello, seleccionar el momento óptimo para llevar a cabo una determinada función biológica. Durante muchos años se ha investigado en diferentes organismos qué genes componen la maquinaria molecular del reloj central, cómo la expresión de estos regula los ritmos internos, y qué factores ambientales tienen la capacidad de sincronizar el reloj circadiano. Múltiples procesos fisiológicos y bioquímicos presentes en los animales se encuentran regulados por el reloj central y los relojes periféricos, como por ejemplo los niveles hormonales, el sueño, la actividad metabólica, la resistencia al estrés, el aprendizaje y la memoria, entre otros. Hoy en día se sabe que muchas enfermedades humanas están relacionadas con el mal funcionamiento del reloj interno, y ejemplo de ellas son el trastorno bipolar, autismo, diabetes del tipo 2, hipertensión, obesidad, entre otras [366]. Por lo tanto, resulta imprescindible entender en detalle el mecanismo molecular del reloj central para comprender mejor cómo es la conexión entre la modulación circadiana y los cambios fisiológicos de los organismos. Los ritmos circadianos tienen un período de aproximadamente 24 horas y, tanto en vertebrados como en invertebrados, un grupo de neuronas controla los comportamientos circadianos y pueden transmitir información sobre la hora del día a relojes periféricos ubicados en diferentes órganos y tejidos [367-370]. El reloj central es sincronizado por el estímulo externo más fuerte, la luz, luego la información temporal es transmitida a los relojes periféricos a través de señales endocrinas y sistémicas [371, 372].

En el estudio de la cronobiología varios modelos experimentales han arrojado evidencias de la existencia de un reloj molecular que controla el comportamiento, la fisiología y el metabolismo, como por ejemplo *Mus musculus*, hámster, *Drosophila melanogaster* o *Danio rerio* [343, 365, 373, 374]. Actualmente, el nematodo *C. elegans* es utilizado como modelo de estudio en cronobiología, y se sabe que estos animales presentan ritmos circadianos en su actividad locomotora y en la resistencia al estrés oxidativo, entre otros [268, 375]. En el presente trabajo de tesis caracterizamos a nivel molecular el reloj biológico de *C. elegans*, e identificamos posibles genes que podrían estar involucrados en la regulación de los ritmos circadianos del nematodo.

Nuestros esfuerzos por entender cómo funciona el reloj biológico de los nematodos nos llevaron a estudiar en primer lugar la ritmicidad circadiana en líneas mutantes para genes que fueron identificados como homólogos al reloj central de moscas y mamíferos (tales como *lin-42*, *aha-1* y *kin-20*). En particular, nos centramos en ritmos de expresión génica a través de la utilización de un sistema reportero basado en luminiscencia, desarrollado previamente en nuestro laboratorio. En todos los ensayos realizados los nematodos fueron sincronizados con dos estímulos ambientales: luz y temperatura, dado que nuestro laboratorio mostró que en *C. elegans* ambos son estímulos muy importantes para llevar a cabo la

sincronización del reloj central, tanto para ritmos de actividad locomotora [171, 181, 376] como de expresión génica [183]. En el nicho ecológico del nematodo, en particular el compost y el humus, la temperatura se incrementa durante el día, llegando a su punto máximo al final del atardecer [377]. Así, las horas con mayor temperatura son concentradas al final del día, donde si bien la radiación solar es mínima, el suelo absorbió mayormente el calor. En este contexto, nuestro laboratorio diseñó un ciclo dual de luz y temperatura que emula el ambiente que rodea al nematodo, donde la temperatura alta coincide con la fase de oscuridad, y la temperatura baja con el día [183]. Por lo tanto, en nuestros ensayos utilizamos el siguiente esquema de sincronización LO/FC 12: 12h (~150  $\mu\text{mol}/\text{m}^2.\text{s}$  :18.5 °C/0  $\mu\text{mol}/\text{m}^2.\text{s}$ :20 °C).

En el presente trabajo se estudió los genes *lin-42*, *kin-20* y *aha-1*, los cuales tienen una extensa homología con genes reloj que intervienen en el funcionamiento del reloj central de Mamíferos y *Drosophila* [185]. El estudio de las proteínas LIN-42, KIN-20 y AHA-1, homólogos a PER, CK1 $\epsilon/\delta$  y BMAL-1, respectivamente, nos permite entender las bases moleculares del reloj del nematodo, así como también encontrar las regiones en las cuales podría encontrarse el reloj central del nematodo.

El **capítulo 1** del presente trabajo tuvo como objetivo general investigar los ritmos circadianos del nematodo adulto en líneas mutantes para el gen *lin-42* a través de la utilización del sistema reportero mencionado anteriormente, y así verificar el rol de la proteína LIN-42 –homóloga a PER de mamíferos y *Drosophila*– en los ritmos circadianos del nematodo. Está ampliamente estudiado que LIN-42 es importante para el correcto desarrollo del nematodo [187, 213, 221], y se ha demostrado que la proteína tiene ritmos durante el desarrollo (cada ~ 8-10 h), con un pico de expresión durante los cambios de muda [187], pero su función en los ritmos circadianos del nematodo adulto ha sido escasamente investigada. Como se mencionó, LIN-42 conserva gran homología con PER de mamíferos y *Drosophila*, la cual es una proteína importante para la regulación y el mantenimiento de los ritmos en dichos organismos. En base a esta premisa, medimos ritmos de luminiscencia del gen *sur-5* (utilizado en esta tesis como salida del reloj, de manera similar a trabajos previos realizados en el laboratorio [183]) en nematodos mutantes de *lin-42*. Los resultados presentados muestran que la ausencia de *lin-42* produjo una alteración en los ritmos de luminiscencia de *sur-5*, alargando el periodo endógeno, y disminuyendo la capacidad de los nematodos de ser entrenados bajo un ciclo dual de luz y temperatura. Estos datos concuerdan con resultados previos de nuestro laboratorio, en el cual nematodos mutantes de *lin-42* muestran un período de actividad locomotora ligeramente más largo [171]. Tanto en la cepa *wild-type* como en la mutante, observamos un máximo en la señal de luminiscencia durante la fase nocturna del ciclo. Está reportado que los nematodos utilizan la fototaxis negativa como un mecanismo protector para escapar de dosis altas de luz solar [378] y así evitar daños asociados con mutaciones en el ADN. La bajada en la señal de luminiscencia observada durante la fase de luz podría deberse a que los nematodos se encuentren en un estado de reposo metabólico y durante la noche incrementen su metabolismo, generando un aumento en la expresión del gen *sur-5* [238]. Por otro lado, cuando analizamos los ritmos de luminiscencia de un constructo luminiscente guiado por el promotor

de *lin-42* (la línea *plin-42::luc::gfp::pest*) observamos un ritmo robusto bajo condiciones cíclicas (LO/FC) y bajo condiciones constantes (OO/CC). Sin embargo, los niveles promedio del ARNm para *lin-42b* no mostraron una oscilación circadiana bajo las condiciones ensayadas. Cabe la posibilidad de que los genes homólogos al reloj, como es el caso de *lin-42*, ciclen en un grupo pequeño de células o tejidos del nematodo, y por lo tanto al trabajar con extracciones de ARNm total de animales enteros se pierda la capacidad de detectar cambios en la expresión. En resumen, mostramos que LIN-42 juega un rol importante en la generación de ritmos circadianos en nematodos adultos. Posiblemente, un reloj no funcional a causa de mutaciones en *lin-42* que den lugar a una proteína no funcional disminuya la capacidad del nematodo de adaptarse a los cambios ambientales. Además, también mostramos que tanto el dominio PAS como el dominio CKBD –y el sitio intermedio entre ambos– presentes en *lin-42* son necesarios para la correcta funcionalidad circadiana de la proteína. La región entre ambos dominios podría ser de gran importancia para la regulación de la proteína LIN-42 y su intervención en los ritmos circadianos del nematodo, muy posiblemente, esa sea una región propensa a ser fosforiladas y de esta forma regular la estabilidad de la proteína.

Por otro lado, se sabe que CK1 $\epsilon/\delta$  cumple un rol importante en mantener la ritmicidad y el período en mamíferos y otros organismos [296, 379]. Por lo tanto, en el **capítulo 2** se exploró el rol de KIN-20 (proteína del nematodo que posee la mayor homología con CK1 $\epsilon/\delta$ ) en el sistema circadiano de *C. elegans*, mediante el uso del reportero luminiscente. Pudimos observar que mutantes de *kin-20* exhibieron un alargamiento del período de luminiscencia significativo en comparación con la cepa control, sin verse afectada la capacidad del nematodo de ser sincronizado o entrenado al ciclo dual de luz y temperatura. El alargamiento del período observado podría deberse a la ausencia de fosforilación de LIN-42 mediada por KIN-20, y en consecuencia no se produciría la degradación de LIN-42 vía proteosoma. Resulta interesante notar que al aumentar los niveles basales de la isoforma KIN-20b también se observó un alargamiento del periodo endógeno. Es esperable que el aumento de estos produzca una mayor fosforilación de LIN-42 mediada por KIN-20 y, en consecuencia, una degradación de LIN-42 exacerbada, provocando un acortamiento del periodo endógeno. Trabajos recientes han postulado que, en mamíferos, CK1 $\epsilon/\delta$  cumple funciones opuestas. Por un lado, fosforila a PER para llevarla a degradación, por otro lado, lo fosforila para estabilizarlo [316]. Por lo tanto, en el nematodo podría estar ocurriendo una situación similar: al aumentar los niveles basales de KIN-20, la proteína LIN-42 se encontraría mayormente fosforilada, generando su estabilización y produciendo de esta forma un aumento del periodo endógeno. Además, se encontró que los niveles transcripcionales de *kin-20* se mantienen constantes a lo largo del día, coincidiendo con datos encontrados en otros organismos [53, 280]. Dada la gran homología de KIN-20 con CK1 $\epsilon/\delta$  de mamíferos, y en base a nuestros resultados, hipotetizamos que KIN-20 cumple funciones importantes en la regulación del reloj molecular del nematodo, a través de la regulación de LIN-42. Sin embargo, debemos tomar en cuenta otras quinasas que podrían estar interactuando, ya sea con LIN-42 o bien con KIN-20.

En el **capítulo 3** de este trabajo de tesis se realizó una descripción de la posible interacción entre LIN-42 y KIN-20. Para ello se buscó establecer la ubicación celular de dichas proteínas en el nematodo adulto. Nuestra hipótesis es que el reloj central del nematodo está ubicado en las células neuronales, al igual que sucede en otros organismos y, por lo tanto, se esperaría que ambas proteínas se expresen en los mismos tejidos para cumplir su rol circadiano. Los estudios de expresión de LIN-42 y KIN-20 mostraron una co-expresión en células neuronales, en la faringe y en las *seam cells*. Por otro lado, siguiendo con la idea de que LIN-42 es fosforilada por KIN-20 para su regulación, se buscó establecer una relación entre ambas proteínas. Se encontró que la expresión de LIN-42 se encuentra disminuida en mutantes de *kin-20*, lo cual sugiere la idea de que KIN-20 estabiliza a LIN-42 posiblemente mediante fosforilación. Aquí podrían estar ocurriendo dos fenómenos: que KIN-20 regule la estabilidad y translocación nuclear de LIN-42 vía fosforilación o bien que al fosforilar a LIN-42 KIN-20 no deje accesibles posibles sitios de fosforilación para la subsecuente degradación por proteosoma. Por lo tanto, en un futuro nos proponemos evaluar además si ambas proteínas interaccionan y si KIN-20 modula la actividad de LIN-42 por fosforilación, dado que esto demostraría una verdadera conservación evolutiva en el mecanismo central del reloj. Por otro lado, evaluamos el efecto de la degradación tejido-específica de los genes candidatos (*lin-42* y *kin-20*) sobre la sincronización y ritmicidad circadiana. Para ello, el sistema AID que empleamos fue de gran utilidad dado que no solo nos permitió disminuir los niveles de expresión de las proteínas en estudio en un tejido específico, sino que también nos permitió hacerlo en un momento del desarrollo determinado (en este caso, el estadio adulto); esto es de gran importancia para nuestro trabajo, ya que las proteínas estudiadas poseen roles cruciales a nivel del desarrollo en los nematodos. Tanto en vertebrados como en invertebrados, la regulación de los ritmos circadianos está dada por un grupo de neuronas que pueden transmitir información sobre la hora del día a relojes periféricos ubicados en diferentes órganos y tejidos [270, 380]. Por lo tanto, decidimos analizar el efecto de una disminución en los niveles de LIN-42 y KIN-20 en el nematodo adulto, específicamente en las células neuronales. Encontramos un fenotipo circadiano no solo cuando degradamos KIN-20, sino también cuando degradamos ambas proteínas (LIN-42 y KIN-20), observando un alargamiento del periodo de luminiscencia significativo. La disminución de ambas proteínas mostró un fenotipo circadiano más marcado, lo cual puede deberse a que KIN-20 regule no solo a LIN-42, sino también a otros genes reloj. Por otro lado, una disminución en los niveles de LIN-42, KIN-20 o ambas proteínas en las *seam cells*, no modificó los ritmos de luminiscencia, ni el periodo endógeno. Estos resultados demuestran que ambas proteínas regulan los ritmos de luminiscencia del nematodo adulto, posiblemente cumpliendo su rol circadiano en las neuronas. Esto nos permite pensar que los nematodos tendrían un reloj central neuronal donde actuarían los genes en cuestión para controlar los comportamientos circadianos.

Como mencionamos a lo largo de esta tesis, el nematodo posee casi todos los genes homólogos que componen el reloj molecular central de otros organismos modelos, y uno de ellos es *aha-1* (homólogo a *cycle* de *Drosophila* y *bmal-1* de mamíferos). BMAL-1 interviene en la regulación del reloj a través de la

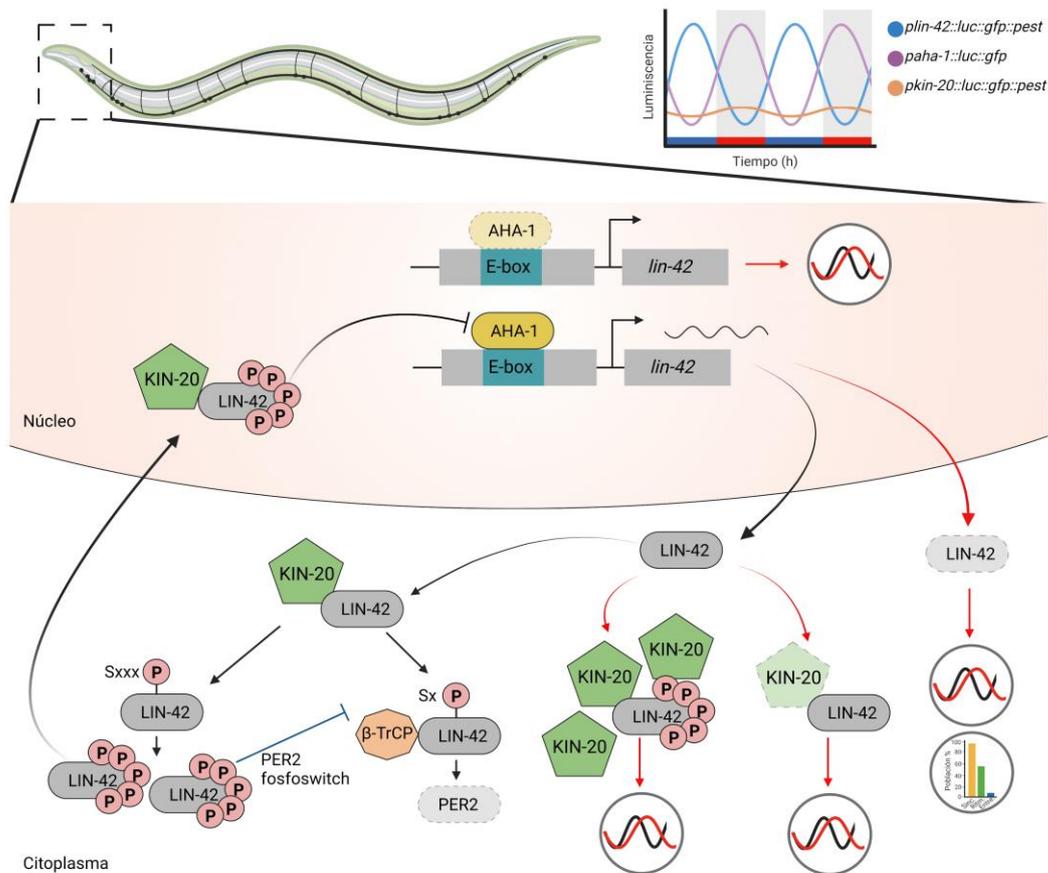
activación de la transcripción de PER, y un mecanismo semejante ocurre en *Drosophila*. Para entender con mayor detalle cómo es la regulación del reloj molecular del nematodo, se estudió la función de la proteína AHA-1 en los ritmos circadianos de *C. elegans*. En el **Anexo** del presente trabajo mostramos que mutantes de *aha-1* tienen un alargamiento del período de luminiscencia, sin afectar la capacidad de los nematodos de ser sincronizados o entrenados a un ciclo dual de luz y temperatura. Además, nematodos transgénicos *paha-1::luc::gfp* mostraron un ritmo robusto de luminiscencia tanto bajo condiciones cíclicas como condiciones constantes, con un pico de luminiscencia durante la fase nocturna del ciclo que se mantuvo en condiciones constantes. Al comparar estos resultados con los ritmos de luminiscencia de nematodos transgénicos *plin-42::luc::gfp::pest* pudimos observar que el pico de luminiscencia se encuentra en antifase; esto guarda cierta similitud con lo que ocurre con la oscilación de PER y BMAL-1 en mamíferos [270]. Sin embargo, cuando estudiamos el patrón de expresión del ARNm de *aha-1* en nematodos adultos, encontramos que los niveles del mensajero no tienen una oscilación circadiana. Si AHA-1 efectivamente posee un rol similar al que cumple su proteína homóloga en mamíferos y en *Drosophila*, posiblemente funcione activando la transcripción de LIN-42, siendo de esta forma un componente esencial para mantener el correcto funcionamiento del reloj del nematodo. Además, tanto en mamíferos como en *Drosophila*, se ha demostrado que BMAL-1 es importante no solo para mantener la oscilación del reloj central, sino también para regular la longevidad del organismo. En *C. elegans* también se ha encontrado el mismo rol para AHA-1 [351], indicando que posiblemente la función de dicha proteína se haya conservado a lo largo de la evolución.

En resumen, este trabajo de tesis presenta una caracterización de algunos de los componentes del reloj molecular del nematodo a través del estudio de los ritmos circadianos de luminiscencia del gen reportero *sur-5*, en el nematodo adulto. En particular, se han estudiado las proteínas reloj evolutivamente conservadas: LIN-42, KIN-20 y AHA-1. Una característica común observada en todos los ensayos realizados en *C. elegans* es la baja población de nematodos que mantienen un ritmo circadiano en ausencia de los estímulos externos (en este caso, el ciclo dual de luz y temperatura). En general, ~50% de la población es claramente entrenada por la luz y la temperatura, mientras que el resto muestra un fenómeno de enmascaramiento. Una de las posibles razones por la cual se observa este fenómeno, está probablemente relacionada con las condiciones de sincronización y los *zeitgebers* utilizados en los experimentos, los cuales podrían no ser óptimos para el entrenamiento del reloj del nematodo. Esto es especialmente crítico en ensayos poblacionales, donde es indispensable que animales individuales se encuentren sincronizados unos con otros, generando de esta forma una salida única y menos variable. En trabajos futuros sería interesante simular ciclos de luz y temperatura a los cuales *C. elegans* está expuesto en su nicho natural.

Como ocurre en todos los organismos estudiados hasta el momento, la presencia de un reloj central en el nematodo le conferiría una ventaja adaptativa, permitiéndole adaptarse a los cambios cíclicos del

ambiente, como por ejemplo cambios en la intensidad de la luz, fluctuaciones en la temperatura, disponibilidad de alimento, presencia de predadores, etc. Si bien el reloj molecular del nematodo presenta similitudes con el reloj circadiano de mamíferos y *Drosophila*, es intuitivo pensar que en el nematodo se trate de un reloj primitivo y más débil, el cual sea más sensible a cambios en el medioambiente. Se sabe que *C. elegans* es muy sensible a pequeños cambios de temperatura [381]; por lo tanto, pequeñas variaciones térmicas, que para organismos más desarrollados serían imperceptibles, para el nematodo resultan ser cambios significativos; de esta forma el reloj molecular constantemente trata de adaptarse a dichas modificaciones, generando una variación muy amplia entre poblaciones de nematodos. A pesar de ello, numerosas ventajas están a favor de la utilización de *C. elegans* como organismo modelo en cronobiología, siendo algunas de ellas la relativa facilidad para manipularlo genéticamente mediante mutagénesis clásica, ARN de interferencia (ARNi) y CRISPR, y además la posibilidad de estudiar la función de neuronas específicas y circuitos neuronales mediante la muerte programada por apoptosis inducida por la expresión específica de caspasas humanas [382] o controlar la actividad neuronal mediante canales de cloruro sensibles a histamina (HisCl1) provenientes de *Drosophila* [383]. En consecuencia, el nematodo nos permite estudiar con mayor facilidad las interacciones y las modificaciones transcripcionales y transducciones de las proteínas reloj, las cuales son muy complejas de estudiar en modelos más desarrollados.

En base a nuestros resultados, en la figura 7.1 mostramos un esquema del posible mecanismo molecular (o parte de él) del reloj central que gobierna los ritmos circadianos en *C. elegans*.



**Figura 7. 1. Posible mecanismo molecular del reloj central del nematodo, basado en el reloj de mamíferos.**

La proteína AHA-1 se uniría a los sitios E-box del promotor de *lin-42* produciendo la activación de gen. Al mutar AHA-1, la expresión de LIN-42 se ve disminuida, y por lo tanto se genera un entretencimiento del reloj molecular (traducido como un alargamiento del periodo). De igual forma, al mutar LIN-42 se genera un alargamiento del periodo y una alteración en la capacidad de los nematodos de ser entrenados al ciclo dual. Por otro lado, KIN-20 podría estar fosforilando a LIN-42 al menos de dos maneras diferentes: por un lado, marcaría a LIN-42 para su degradación, por el otro produciría la estabilización de LIN-42 por un aumento en la fosforilación de las serinas presentes en la proteína. LIN-42 estabilizada es translocada al núcleo, probablemente unida a KIN-20, para inhibir su propia transcripción. Al mutar KIN-20, LIN-42 no puede ser fosforilada en ninguno de los sitios, generando un aumento del periodo endógeno. Por otro lado, al aumentar los niveles basales de KIN-20 se produciría un aumento de la fosforilación de PER, y en consecuencia la proteína estaría estabilizada, ingresando al núcleo e inhibiendo su propia expresión, dando lugar a un alargamiento del periodo. Las flechas negras indican lo que sucedería en condiciones basales, las flechas rojas indican lo que sucedería al mutar las proteínas reloj. Las líneas punteadas indican las proteínas mutadas y ausentes, las líneas completas indican las proteínas expresadas.

Estos estudios nos ayudan a entender las bases moleculares del reloj circadiano de *C. elegans* y a identificar los circuitos neuronales involucrados en la sincronización del nematodo. Caracterizar el reloj molecular de *C. elegans* mejora no solo nuestra comprensión de la biología básica de los ritmos circadianos, sino que permitirá además establecerlo como organismo modelo para el estudio de enfermedades asociadas con alteraciones en el sistema circadiano.

Cepas	Genotipo	Descripción
N2	<i>Wild-type</i>	control
VQ1310	qvl8 [psur-5::luc::gfp + punc-122::rfp] #50C	Reportero rítmico luminiscente en <i>background</i> N2
RG1590	<i>lin-42 (ox461)</i> II	Delección en el dominio PAS y SYQ/LT
RB1843	<i>lin-42 (ok2385)</i> II	Delección en el dominio SYQ/LT
MT2257	<i>lin-42 (n1089)</i> II	Delección en el dominio PAS
VQ1354	<i>lin-42 (ox461)</i> II, #50C; qvl8	<i>ox461</i> mutante con el reportero rítmico luminiscente
VQ1326	<i>lin-42 (n1089)</i> II, #40C; qvl8	<i>n1089</i> mutante con el reportero rítmico luminiscente
VQ1353	<i>lin-42 (ok2385)</i> II, #20C; qvl8	<i>ok2385</i> mutante con el reportero rítmico luminiscente
VQ1384	qvEx400 ( <i>plin-42b/c::lin-42b::gfp::unc-54</i> , pBB107)	Sobreexpresión de <i>lin-42b</i> en <i>background</i> N2
VQ1366	qvEx385 ( <i>plin-42 b/c::lin-42c::gfp::unc54</i> , pBB107)	Sobreexpresión de <i>lin-42c</i> en <i>background</i> N2
VQ1368	qvEx387 ( <i>plin-42 a::lin-42a::gfp::unc54</i> , pBB107)	Sobreexpresión de <i>lin-42a</i> en <i>background</i> N2
DG3	qvEx400 ( <i>plin-42b/c::isoforma b::gfp::unc-54</i> , pBB107); qvl8	Sobreexpresión de <i>lin-42b</i> y con el reportero rítmico luminiscente
DG6	qvEx387 ( <i>plin-42 a::lin-42a::gfp::unc54</i> , pBB107); qvl8	Sobreexpresión de <i>lin-42a</i> y con el reportero rítmico luminiscente
DG8	qvEx385 ( <i>plin-42 b/c::lin-42c::gfp::unc54</i> , pBB107); qvl8	Sobreexpresión de <i>lin-42c</i> y con el reportero rítmico luminiscente
VQ1484	<i>lin-42(ox461)</i> II #50C; qvl8; qvEx400 ( <i>plin-42b/c::isoforma b::gfp::unc-54</i> ; pBB107)	<i>ox461</i> rescatado con <i>lin-42b</i> y con el reportero rítmico luminiscente
VQ1324	qvEx361 ( <i>plin-42::luc::gfp::pest</i> , pCFJ90)	Reportero luminiscente bajo el control del promotor de <i>kin-20</i> para analizar su expresión <i>in vivo</i>
VC398	<i>kin-20 (ok505)</i> X	Delección en el dominio quinasa
VQ1355	<i>kin-20 (ok505)</i> X, #50C; qvl8	<i>ok505</i> mutante con el reportero rítmico luminiscente
VQ1539	<i>kin-20(ok505)</i> X #30C; qvl8; qvEx390 ( <i>pkin-20::isoform b::rfp</i> ; pBB107)	<i>ok505</i> rescatado con <i>kin-20b</i> y con el reportero rítmico luminiscente
EG5202	oxls12 [ <i>punc-47::GFP</i> , <i>lin-15(+)</i> ] <i>kin-20(ox423)</i> X	Mutación sin sentido (Q344stop) en el dominio quinasa
DG1	oxls12 [ <i>punc-47::GFP</i> , <i>lin-15(+)</i> ] <i>kin-20(ox423)</i> X; qvl8	<i>ok423</i> mutante con el reportero rítmico luminiscente
EG9581	oxSi1087 [ <i>pkin-20::RFP::kin-20::kin-20UTR</i> , Cb <i>unc-119(+)</i> *ttTi5605] II ; oxls12 [ <i>punc-47::GFP</i> , <i>lin-15(+)</i> ] <i>kin-20(ox423)</i> X	<i>ox423</i> rescatado con <i>kin-20a/c/d</i>
DG2	oxSi1087 [ <i>pkin-20::rfp::kin-20::kin-20UTR</i> , Cb <i>unc-119(+)</i> *ttTi5605] II ; oxls12 [ <i>punc-47::GFP</i> , <i>lin-15(+)</i> ] <i>kin-20(ox423)</i> X; qvl8	<i>ox423</i> rescatado con <i>kin-20a/c/d</i> y con el reportero rítmico luminiscente
VQ1371	qvEx389 ( <i>pkin20::isoforma b::RFP</i> , pBB107)	Sobreexpresión de <i>kin-20b</i> en <i>background</i> N2
DG4	qvEx389 ( <i>pkin20::isoforma b::RFP</i> , pBB107); qvl8	Sobreexpresión de <i>kin-20b</i> y con el reportero rítmico luminiscente
VQ1299	qvEx350 ( <i>pkin20::isoforma d::RFP</i> , pCFJ90)	Sobreexpresión de <i>kin-20d</i> en <i>background</i> N2
DG5	qvEx350 ( <i>pkin20::isoforma d::RFP</i> , pCFJ90); qvl8	Sobreexpresión de <i>kin-20d</i> y con el reportero rítmico luminiscente
VQ1319	qvEx359 ( <i>pkin20::isoforma C::RFP</i> , pCFJ90)	Sobreexpresión de <i>kin-20c</i> en <i>background</i> N2
DG7	qvEx359 ( <i>pkin20::isoforma C::RFP</i> , pCFJ90); qvl8	Sobreexpresión de <i>kin-20c</i> y con el reportero rítmico luminiscente

VQ1320	qvEx360 ( <i>pkln20::luc::gfp::pest, pCFJ90</i> )	Reportero luminiscente bajo el control del promotor de <i>kin-20</i> para analizar su expresión <i>in vivo</i>
PHX651	syb651 [ <i>kin20b::mkate2::myc</i> ] X	Nativo <i>kin-20b</i> con mKate2 tag y <i>myc</i> tags
PHX604	syb604 [ <i>lin-42 b::gfp::HISx6::3XFLAG</i> ] II	Nativo <i>lin-42b</i> con GFP tag y histidina y FLAG tags
VQ1330	syb651 [ <i>kin20b::mkate2::myc</i> ] X; syb604 [ <i>lin-42b::gfp::HISx6::3XFLAG</i> ] II	Nativo <i>kin-20b</i> y mKate2 tag; nativo <i>lin-42b</i> con GFP tag
JDW136	<i>lin-42(wrd35 [lin-42::GFP^degron:3xFLAG])II</i>	Nativo <i>lin-42</i> con AID y 3XFLAG
VQ1850	<i>kin-20(syb4198[kin-20b/c::mkate-2^degron:HA])X</i>	Nativo <i>kin-20</i> con AID y HA
JDW233	<i>wrdSi46[SCMp*::TIR1::F2A::BFP::AID*::NLS::tbb-2 3'UTR] I:-5.32</i>	Expresión TIR-1 en <i>seam cell</i> y secuencia AID::BFP en <i>seam cell</i> . También expression en las células hipodermales.
VQ1873	<i>wrdSi46 [SCMp*::TIR1::F2A::BFP::AID*::NLS::tbb-2 3'UTR] I; qvls8</i>	Expresión TIR-1 en <i>seam cells</i> y el reportero luminiscente (control)
VQ1871	<i>lin-42(wrd35[lin-42::GFP^degron:3xFLAG])II; wrdSi46[SCMp*::TIR1::F2A::BFP::AID*::NLS::tbb-2 3'UTR] I:-5.32; qvls8</i>	Degradación de LIN-42 en <i>seam cells</i> y el reportero luminiscente
VQ1872	<i>kin-20(syb4198[kin-20b/c::mkate-2^degron:HA])X; wrdSi46[SCMp*::TIR1::F2A::BFP::AID*::NLS::tbb-2 3'UTR] I:-5.32; qvls8</i>	Degradación de KIN-20 en <i>seam cells</i> y el reportero luminiscente
VQ1870	<i>kin-20(syb4198[kin-20b/c::mkate-2^degron:HA])X; lin-42(wrd35[lin-42::GFP^degron:3xFLAG])II; wrdSi46[SCMp*::TIR1::F2A::BFP::AID*::NLS::tbb-2 3'UTR] I:-5.32; qvls8</i>	Degradación de LIN-42 y KIN-20 en <i>seam cells</i> y el reportero luminiscente
DV3805	<i>eSi7[rgef1p::TIR1::F2A::mTagBFP2::NLS::AID::tbb-2 3'UTR] (I:-5.32)</i>	Expresión TIR-1 en neuronas y secuencia AID::BFP en neuronas
VQ1903	<i>reSi7 [rgef1p::TIR1::F2A::mTagBFP2::NLS::AID::tbb-2 3'UTR] I; qvls8 [psur-5::luc::gfp + punc-122::RFP]</i>	Expresión TIR-1 en neuronas y el reportero luminiscente (control)
VQ1901	<i>lin-42(wrd35[lin-42::GFP^degron:3xFLAG])II; reSi7 [rgef-1p::TIR1::F2A::mTagBFP2::NLS::AID::tbb-2 3'UTR] (I:-5.32); qvls8</i>	Degradación de LIN-42 en neuronas y el reportero luminiscente
VQ1872	<i>kin-20(syb4198[kin-20b/c::mkate-2^degron:HA])X; wrdSi46[SCMp*::TIR1::F2A::BFP::AID*::NLS::tbb-2 3'UTR] I:-5.32; qvls8</i>	Degradación de KIN-20 en neuronas y el reportero luminiscente
VQ1919	<i>kin-20(syb4198[kin-20b/c::mkate-2^degron:HA])X; lin-42(wrd35[lin-42::GFP^degron:3xFLAG])II; reSi7 [rgef-1p::TIR1::F2A::mTagBFP2::NLS::AID::tbb-2 3'UTR] (I:-5.32); qvls8</i>	Degradación de LIN-42 y KIN-20 en neuronas y el reportero luminiscente
VQ1723	<i>kin-20(ok505) X; lin-42(syb604) [lin-42 b::gfp::hisx6::3XFLAG] II</i>	Nativo <i>lin-42b</i> con GFP en background <i>ok505</i>
XD321	<i>aha-1(xd4)</i>	Mutación sin sentido en <i>aha-1</i>
VQ1722	<i>aha-1(xd4) I; qvls8</i>	<i>xd4</i> mutante con el reportero rítmico luminiscente
VQ1071	<i>paha-1::luc::gfp</i>	Reportero luminiscente bajo el control del promotor de <i>aha-1</i> para analizar su expresión <i>in vivo</i>

Nombre	Secuencia
Fw_ox461_ext	CGGTTACGCATTGAAAGACA
Rv_ox461_ext	CAATTCATCCCGGTTTCTGT
Rv_ox461_int	AACGTGGCCTATCCAATCTC
Fw_ok2385_ext	CGGTTACGCATTGAAAGACA
Rv_ok2385_ext	AGTCCCTTTTGCCTGGATCT
Rv_ok2385_int	AACGTGGCCTATCCAATCTC
Fw_n1089_ext	AGACTGCTGCAGGGCAGTGT
Rv_n1089_ext	GCACCTTACATTACCCCACG
Rv_n1089_int	GTTGCGAGCAGCCACTCTCTC
Fw_LIN42_PEST_HindIII	CCCAAGCTTAGAGATAGAGAGCGTCCGAGGGTG
Rv_LIN42_PEST_BamHI	CGCGGATCCTTGGCTGATGGTGCCACGTTT
Fw_lin42b/c_RT	CCGAAAAATGGAGCTAGTCCG
Rv_lin42b/c_RT	CGAAAGTCTTCGCCATAACC
Fw_Y45f10D.4_RT	GTCGCTTCAAATCAGTTCAGC
Rv_Y45f10D.4_RT	GTTCTTGTCAAGTATCCGACA
Fw_KIN20ext	CCGGTTATTCTGTTCAAAGCA
Rv_KIN20ext	CAGGCACAGCTAGCATCTTC
Rv_KIN20int	TGTTCCGCACGTTATTCCATC
Fw_kin20d_XbaI	GCTCTAGACTGGAGGGTGTCTGTCCCGATTG
Rv_kin20d_KpnI-SacI	GGGGTACCCGAGCTCGGTAATAATGGCAAGTCAAATTTG
Fw_kin20d_XbaI	GCTCTAGAGCTAAAACGTGGCAAAAATCAGAGAG
Rv_kin20d_SphI	ACATGCATGCGATGAGATCAGTGCGACTAGACG
Fw_kin20c_XbaI	GCTCTAGACTGGAGGGTGTCTGTCCCGATTG
Rv_kin20c_SacI	CGAGCTCTATGTCGACGTTGATTTGG
Fw_1_kin20b	CCACCGCACCGCTGGTTTCTTCAAGAAAGCGGAGATGG
Fw_2_kin20b	TGACAACAACCCACCTCTCGGATCCATCAACCGTCAGCCACCGCACC GCTGGTTTCTTC
Fw_3_kin20b	GCTCTAGAACCATCCATCTGACAACAACCCACCTCTCG
Rv_1_kin20b_SacI	CGAGCTCGATAATGTCGACGTTGATTTG
Fw_kin20b_Clon	ATTTTTGCCACGTTTTAGCTCTAGAACCATCCATCTGAC
Rv_kin20b_Clon	TGGCGACCGGTACCCGAGCTCGATAATGTCGACGTTGATTTG
Fw_kin20_PEST	GCTAACAACTTGAAATGAAATAGATGAGATCAGTGCGACTAG
Rv_kin20_PEST	TGTTTTTGGCGTCTTCCATGGCTAAAACGTGGCAAAAATC
FW_GFP	TGACGGGAACTACAAGACAC
RV_GFP	CCAGCAGCTGTTACAAACTC
FW_mKate2	CCATACGAGGGAACCCAAAC
RV_mKate2	CTTGGCTGGCTTCTTGGAAAC
FW_BFP	TCAAGCTCGCCGAGACG
RV_BFP	GTTGAGCTTGTGTCCGAGC
Fw_aha-1	GTTTCGTGTTTCGGAAGATGG
Rv_aha-1	TTCTCATCTGCTGGATGTGC

## Bibliografía

---

1. de Mairan, J.-J., *Observation botanique*. Histoire de l'Académie Royale des Sciences Paris, 1729.
2. Golombek, D.A., *Cronobiología humana: ritmos y relojes biológicos en la salud y en la enfermedad*. 2007: Universidad Nacional de Quilmes.
3. Madrid, J.A. and A.R. de Lama, *Cronobiología básica y clínica*. 2006: Editec@ red.
4. RANVAUD, R., et al., *The initial orientation of homing pigeons at the magnetic equator: compass mechanisms and the effect of applied magnets*. Journal of experimental biology, 1991. **161**(1): p. 299-314.
5. Pittendrigh, C.S., W.T. Kyner, and T. Takamura, *The amplitude of circadian oscillations: temperature dependence, latitudinal clines, and the photoperiodic time measurement*. Journal of biological rhythms, 1991. **6**(4): p. 299-313.
6. Pittendrigh, C.S. *Circadian rhythms and the circadian organization of living systems*. in *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*. 1960. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
7. Aschoff, J. *Exogenous and endogenous components in circadian rhythms*. in *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*. 1960. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
8. Aschoff, J., *Human circadian rhythms in activity, body temperature and other functions*. Life sciences and space research, 1967. **5**: p. 159-173.
9. Hrushesky, W.J., et al., *Circadian stage dependence of cis-diamminedichloroplatinum lethal toxicity in rats*. Cancer Research, 1982. **42**(3): p. 945-949.
10. Singh, R.B., et al., *Circadian heart rate and blood pressure variability considered for research and patient care*. International Journal of Cardiology, 2003. **87**(1): p. 9-28.
11. Richter, C.P., *Heavy water as a tool for study of the forces that control length of period of the 24-hour clock of the hamster*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1977. **74**(3): p. 1295-1299.
12. Stephan, F.K. and I. Zucker, *Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1972. **69**(6): p. 1583-1586.
13. Moore, R.Y. and N.J. Lenn, *A retinohypothalamic projection in the rat*. Journal of Comparative Neurology, 1972. **146**(1): p. 1-14.
14. Moore, R. *Organization and function of a central nervous system circadian oscillator: the suprachiasmatic hypothalamic nucleus*. in *Federation proceedings*. 1983.
15. Stetson, M.H. and M. Watson-Whitmyre, *Nucleus suprachiasmaticus: the biological clock in the hamster?* Science, 1976. **191**(4223): p. 197-199.
16. Takahashi, J.S. and M. Zatz, *Regulation of circadian rhythmicity*. Science, 1982. **217**(4565): p. 1104-1111.
17. Claridge-Chang, A., et al., *Circadian regulation of gene expression systems in the Drosophila head*. Neuron, 2001. **32**(4): p. 657-671.
18. Edmonds, S.C. and N.T. Adler, *Food and light as entrainers of circadian running activity in the rat*. Physiology & Behavior, 1977. **18**(5): p. 915-919.
19. Czeisler, C.A., M.C. Moore-Ede, and R.M. Coleman, *Rotating shift work schedules that disrupt sleep are improved by applying circadian principles*. Science, 1982. **217**(4558): p. 460-463.
20. Palmer, J.D. and B.G. Williams, *Comparative studies of tidal rhythms. II. The dual clock control of the locomotor rhythms of two decapod crustaceans*. Marine & Freshwater Behaviour & Phy, 1986. **12**(4): p. 269-278.
21. Aschoff, J. and R. Wever. *Human circadian rhythms: a multioscillatory system*. in *Federation proceedings*. 1976.
22. Kavanau, J.L., *Influences of light on activity of small mammals*. Ecology, 1969. **50**(4): p. 548-557.

23. Moore, R.Y. and J.P. Card, *Visual Pathways and the Entrainment of Circadian Rhythms a*. Annals of the New York Academy of Sciences, 1985. **453**(1): p. 123-133.
24. Morin, L. and C. Allen, *The circadian visual system, 2005*. Brain research reviews, 2006. **51**(1): p. 1-60.
25. Mrosovsky, N., *Masking: history, definitions, and measurement*. Chronobiology international, 1999. **16**(4): p. 415-429.
26. Anderson, R.W., D.L. Laval-Martin, and L.N. Edmunds Jr, *Cell cycle oscillators: temperature compensation of the circadian rhythm of cell division in Euglena*. Experimental cell research, 1985. **157**(1): p. 144-158.
27. Bruce, V.G. and C.S. Pittendrigh, *Temperature independence in a unicellular "clock"*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1956. **42**(9): p. 676-682.
28. Hastings, J.W. and B.M. Sweeney, *On the mechanism of temperature independence in a biological clock*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1957. **43**(9): p. 804-811.
29. Golden, S.S. and L.A. Sherman, *Optimal conditions for genetic transformation of the cyanobacterium Anacystis nidulans R2*. Journal of bacteriology, 1984. **158**(1): p. 36-42.
30. Elhai, J. and C.P. Wolk, [83] *Conjugal transfer of DNA to cyanobacteria*, in *Methods in enzymology*. 1988, Elsevier. p. 747-754.
31. Golden, S.S. and S.R. Canales, *Cyanobacterial circadian clocks—timing is everything*. Nature Reviews Microbiology, 2003. **1**(3): p. 191-199.
32. Huang, T.-C., et al., *Circadian rhythm of the prokaryote Synechococcus sp. RF-1*. Plant Physiology, 1990. **92**(2): p. 531-533.
33. Grobbelaar, N., et al., *Dinitrogen-fixing endogenous rhythm in Synechococcus RF-1*. FEMS Microbiology Letters, 1986. **37**(2): p. 173-177.
34. Cohen, S.E. and S.S. Golden, *Circadian rhythms in cyanobacteria*. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2015. **79**(4): p. 373-385.
35. Hynes, M.J., *The Neurospora crassa genome opens up the world of filamentous fungi*. Genome Biol, 2003. **4**(6): p. 217.
36. Pittendrigh, C., et al., *Growth patterns in Neurospora: a biological clock in Neurospora*. Nature, 1959. **184**: p. 169-170.
37. Loros, J.J. and J.C. Dunlap, *Genetic and molecular analysis of circadian rhythms in Neurospora*. Annual review of physiology, 2001. **63**(1): p. 757-794.
38. Baker, C.L., J.J. Loros, and J.C. Dunlap, *The circadian clock of Neurospora crassa*. FEMS microbiology reviews, 2012. **36**(1): p. 95-110.
39. Barak, S., et al., *All in good time: the Arabidopsis circadian clock*. Trends in plant science, 2000. **5**(12): p. 517-522.
40. Millar, A.J., et al., *A novel circadian phenotype based on firefly luciferase expression in transgenic plants*. The Plant Cell, 1992. **4**(9): p. 1075-1087.
41. Somers, D.E., P.F. Devlin, and S.A. Kay, *Phytochromes and cryptochromes in the entrainment of the Arabidopsis circadian clock*. Science, 1998. **282**(5393): p. 1488-1490.
42. Dowson-Day, M.J. and A.J. Millar, *Circadian dysfunction causes aberrant hypocotyl elongation patterns in Arabidopsis*. The Plant Journal, 1999. **17**(1): p. 63-71.
43. Millar, A.J., et al., *Circadian clock mutants in Arabidopsis identified by luciferase imaging*. Science, 1995. **267**(5201): p. 1161-1163.
44. Ashmore, L.J. and A. Sehgal, *A fly's eye view of circadian entrainment*. Journal of Biological Rhythms, 2003. **18**(3): p. 206-216.
45. Konopka, R.J. and S. Benzer, *Clock mutants of Drosophila melanogaster*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1971. **68**(9): p. 2112-2116.
46. Bargiello, T.A., F.R. Jackson, and M.W. Young, *Restoration of circadian behavioural rhythms by gene transfer in Drosophila*. Nature, 1984. **312**(5996): p. 752-754.

47. Rosbash, M. and J.C. Hall, *The molecular biology of circadian rhythms*. Neuron, 1989. **3**(4): p. 387-398.
48. Sehgal, A., et al., *Loss of circadian behavioral rhythms and per RNA oscillations in the Drosophila mutant timeless*. Science, 1994. **263**(5153): p. 1603-1606.
49. Allada, R., et al., *A mutant Drosophila homolog of mammalian Clock disrupts circadian rhythms and transcription of period and timeless*. Cell, 1998. **93**(5): p. 791-804.
50. Rutila, J.E., et al., *CYCLE is a second bHLH-PAS clock protein essential for circadian rhythmicity and transcription of Drosophila period and timeless*. Cell, 1998. **93**(5): p. 805-814.
51. Stanewsky, R., et al., *The cryb mutation identifies cryptochrome as a circadian photoreceptor in Drosophila*. Cell, 1998. **95**(5): p. 681-692.
52. Price, J.L., et al., *double-time is a novel Drosophila clock gene that regulates PERIOD protein accumulation*. Cell, 1998. **94**(1): p. 83-95.
53. Kloss, B., et al., *The Drosophila clock gene double-time encodes a protein closely related to human casein kinase Iepsilon*. Cell, 1998. **94**(1): p. 97-107.
54. Rosato, E., E. Tauber, and C.P. Kyriacou, *Molecular genetics of the fruit-fly circadian clock*. European journal of human genetics, 2006. **14**(6): p. 729-738.
55. Vanin, S., et al., *Unexpected features of Drosophila circadian behavioural rhythms under natural conditions*. Nature, 2012. **484**(7394): p. 371-375.
56. Green, E.W., et al., *Drosophila circadian rhythms in seminatural environments: Summer afternoon component is not an artifact and requires TrpA1 channels*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2015. **112**(28): p. 8702-8707.
57. Ralph, M.R. and M. Menaker, *A mutation of the circadian system in golden hamsters*. Science, 1988. **241**(4870): p. 1225-1227.
58. Lowrey, P.L., et al., *Positional syntenic cloning and functional characterization of the mammalian circadian mutation tau*. Science, 2000. **288**(5465): p. 483-92.
59. King, D.P., et al., *Positional cloning of the mouse circadian clock gene*. Cell, 1997. **89**(4): p. 641-653.
60. Ko, C.H. and J.S. Takahashi, *Molecular components of the mammalian circadian clock*. Human molecular genetics, 2006. **15**(suppl\_2): p. R271-R277.
61. Aguilar-Roblero, R., et al., *Ryanodine receptor Ca<sup>2+</sup>-release channels are an output pathway for the circadian clock in the rat suprachiasmatic nuclei*. European Journal of Neuroscience, 2007. **26**(3): p. 575-582.
62. Granados-Fuentes, D., et al., *The suprachiasmatic nucleus entrains, but does not sustain, circadian rhythmicity in the olfactory bulb*. Journal of Neuroscience, 2004. **24**(3): p. 615-619.
63. Moore, R.Y. and V.B. Eichler, *Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat*. Brain research, 1972.
64. Mosko, S. and R.Y. Moore, *Neonatal suprachiasmatic nucleus ablation: absence of functional and morphological plasticity*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1978. **75**(12): p. 6243-6246.
65. van den Pol, A.N., *The suprachiasmatic nucleus: morphological and cytochemical substrates for cellular interaction*. Suprachiasmatic nucleus: the mind's clock, 1991: p. 17-50.
66. Card, J.P. and R.Y. Moore, *The organization of visual circuits influencing the circadian activity of the suprachiasmatic nucleus*. Suprachiasmatic nucleus: the mind's clock, 1991: p. 51-76.
67. Drucker-Colín, R., et al., *Fetal suprachiasmatic nucleus transplants: diurnal rhythm recovery of lesioned rats*. Brain research, 1984. **311**(2): p. 353-357.

68. Aguilar-Roblero, R., et al., *Morphological and functional development of the suprachiasmatic nucleus in transplanted fetal hypothalamus*. Brain research, 1992. **580**(1-2): p. 288-296.
69. Welsh, D.K., et al., *Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms*. Neuron, 1995. **14**(4): p. 697-706.
70. Matsuo, T., et al., *Control mechanism of the circadian clock for timing of cell division in vivo*. Science, 2003. **302**(5643): p. 255-259.
71. Albrecht, U. and G. Eichele, *The mammalian circadian clock*. Current opinion in genetics & development, 2003. **13**(3): p. 271-277.
72. Gooley, J.J., et al., *Melanopsin in cells of origin of the retinohypothalamic tract*. Nature neuroscience, 2001. **4**(12): p. 1165-1165.
73. Mistlberger, R.E., *Circadian regulation of sleep in mammals: role of the suprachiasmatic nucleus*. Brain research reviews, 2005. **49**(3): p. 429-454.
74. Moore, R.Y. *Organization of the mammalian circadian system*. in *Ciba Foundation Symposium 183-Circadian Clocks and their Adjustment: Circadian Clocks and their Adjustment: Ciba Foundation Symposium 183*. 2007. Wiley Online Library.
75. Binkley, S.A., *Circadian rhythms of pineal function in rats*. Endocrine reviews, 1983. **4**(3): p. 255-270.
76. Moore, R.Y. and D.C. Klein, *Visual pathways and the central neural control of a circadian rhythm in pineal serotonin N-acetyltransferase activity*. Brain research, 1974. **71**(1): p. 17-33.
77. Stephens, J. and S. Binkley, *Daily change in pineal N-acetyltransferase activity in a diurnal mammal, the ground squirrel*. Experientia, 1978. **34**(11): p. 1523-1524.
78. Reiter, R.J., et al., *Nature and the time course of seizures associated with surgical removal of the pineal gland from parathyroidectomized rats*. Experimental neurology, 1973. **38**(3): p. 386-397.
79. Balsalobre, A., F. Damiola, and U. Schibler, *A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells*. Cell, 1998. **93**(6): p. 929-937.
80. Yamazaki, S., et al., *Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats*. Science, 2000. **288**(5466): p. 682-685.
81. Menaker, M., L. Moreira, and G. Tosini, *Evolution of circadian organization in vertebrates*. Brazilian journal of medical and biological research, 1997. **30**: p. 305-313.
82. Nonaka, H., et al., *Angiotensin II induces circadian gene expression of clock genes in cultured vascular smooth muscle cells*. Circulation, 2001. **104**(15): p. 1746-1748.
83. Maywood, E., et al. *Genetic and molecular analysis of the central and peripheral circadian clockwork of mice*. in *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*. 2007. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
84. Lowrey, P.L. and J.S. Takahashi, *Mammalian circadian biology: elucidating genome-wide levels of temporal organization*. Annu. Rev. Genomics Hum. Genet., 2004. **5**: p. 407-441.
85. Reppert, S.M. and D.R. Weaver, *Molecular analysis of mammalian circadian rhythms*. Annual review of physiology, 2001. **63**(1): p. 647-676.
86. Nishiitsutsuji-Uwo, J. and C.S. Pittendrigh, *Central nervous system control of circadian rhythmicity in the cockroach: II. The pathway of light signals that entrain the rhythm*. Zeitschrift für vergleichende Physiologie, 1968. **58**: p. 1-13.
87. Page, T.L., *Transplantation of the cockroach circadian pacemaker*. Science, 1982. **216**(4541): p. 73-75.
88. Tomioka, K., *Residual circadian rhythmicity after bilateral lamina-medulla removal or optic stalk transection in the cricket, Gryllus bimaculatus*. Journal of insect physiology, 1985. **31**(8): p. 653-657.

89. Helfrich-Förster, C., *The circadian clock in the brain: a structural and functional comparison between mammals and insects*. Journal of Comparative Physiology A, 2004. **190**: p. 601-613.
90. Helfrich-Förster, C., *Robust circadian rhythmicity of Drosophila melanogaster requires the presence of lateral neurons: a brain-behavioral study of disconnected mutants*. Journal of Comparative Physiology A, 1998. **182**: p. 435-453.
91. Kaneko, M., et al., *Disruption of synaptic transmission or clock-gene-product oscillations in circadian pacemaker cells of Drosophila cause abnormal behavioral rhythms*. Journal of neurobiology, 2000. **43**(3): p. 207-233.
92. Helfrich-Förster, C., *The neuroarchitecture of the circadian clock in the brain of Drosophila melanogaster*. Microscopy research and technique, 2003. **62**(2): p. 94-102.
93. Helfrich-Förster, C., *Neurobiology of the fruit fly's circadian clock*. Genes, Brain and Behavior, 2005. **4**(2): p. 65-76.
94. Rieger, D., et al., *Functional analysis of circadian pacemaker neurons in Drosophila melanogaster*. Journal of Neuroscience, 2006. **26**(9): p. 2531-2543.
95. Yoshii, T., et al., *Synergic entrainment of Drosophila's circadian clock by light and temperature*. Journal of biological rhythms, 2009. **24**(6): p. 452-464.
96. Damulewicz, M., E. Rosato, and E. Pyza, *Circadian regulation of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase alpha subunit in the visual system is mediated by the pacemaker and by retina photoreceptors in Drosophila melanogaster*. PLoS One, 2013. **8**(9): p. e73690.
97. Damulewicz, M. and E. Pyza, *The clock input to the first optic neuropil of Drosophila melanogaster expressing neuronal circadian plasticity*. PLoS One, 2011. **6**(6): p. e21258.
98. Beckwith, E.J. and M.F. Ceriani, *Communication between circadian clusters: The key to a plastic network*. FEBS letters, 2015. **589**(22): p. 3336-3342.
99. Grima, B., et al., *Morning and evening peaks of activity rely on different clock neurons of the Drosophila brain*. Nature, 2004. **431**(7010): p. 869-873.
100. Stoleru, D., et al., *The Drosophila circadian network is a seasonal timer*. Cell, 2007. **129**(1): p. 207-219.
101. Yu, W. and P.E. Hardin, *Circadian oscillators of Drosophila and mammals*. Journal of cell science, 2006. **119**(23): p. 4793-4795.
102. Doherty, C.J. and S.A. Kay, *Circadian control of global gene expression patterns*. Annual review of genetics, 2010. **44**: p. 419-444.
103. Özkaya, Ö. and E. Rosato, *The circadian clock of the fly: a neurogenetics journey through time*. Advances in genetics, 2012. **77**: p. 79-123.
104. Tataroglu, O. and P. Emery, *The molecular ticks of the Drosophila circadian clock*. Current opinion in insect science, 2015. **7**: p. 51-57.
105. Sangoram, A.M., et al., *Mammalian circadian autoregulatory loop: a timeless ortholog and mPer1 interact and negatively regulate CLOCK-BMAL1-induced transcription*. Neuron, 1998. **21**(5): p. 1101-1113.
106. Yoo, S.-H., et al., *A noncanonical E-box enhancer drives mouse Period2 circadian oscillations in vivo*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2005. **102**(7): p. 2608-2613.
107. Onishi, Y., et al., *Rhythmic SAF-A binding underlies circadian transcription of the Bmal1 gene*. Molecular and cellular biology, 2008. **28**(10): p. 3477-3488.
108. Gekakis, N., et al., *Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism*. Science, 1998. **280**(5369): p. 1564-1569.
109. Kume, K., et al., *mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop*. Cell, 1999. **98**(2): p. 193-205.

110. Hogenesch, J.B., et al., *The basic-helix-loop-helix-PAS orphan MOP3 forms transcriptionally active complexes with circadian and hypoxia factors*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1998. **95**(10): p. 5474-5479.
111. Griffin Jr, E.A., D. Staknis, and C.J. Weitz, *Light-independent role of CRY1 and CRY2 in the mammalian circadian clock*. Science, 1999. **286**(5440): p. 768-771.
112. Field, M.D., et al., *Analysis of clock proteins in mouse SCN demonstrates phylogenetic divergence of the circadian clockwork and resetting mechanisms*. Neuron, 2000. **25**(2): p. 437-447.
113. Sato, T.K., et al., *Feedback repression is required for mammalian circadian clock function*. Nature genetics, 2006. **38**(3): p. 312-319.
114. Ralph, M.R. and M. Menaker, *A mutation of the circadian system in golden hamsters*. Science, 1988. **241**(4870): p. 1225-7.
115. Camacho, F., et al., *Human casein kinase Idelta phosphorylation of human circadian clock proteins period 1 and 2*. FEBS Lett, 2001. **489**(2-3): p. 159-65.
116. Eide, E.J., et al., *Control of mammalian circadian rhythm by CKIepsilon-regulated proteasome-mediated PER2 degradation*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(7): p. 2795-807.
117. Vanselow, K. and A. Kramer. *Role of phosphorylation in the mammalian circadian clock*. in *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*. 2007. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
118. Reischl, S., et al., *β-TrCP1-mediated degradation of PERIOD2 is essential for circadian dynamics*. Journal of biological rhythms, 2007. **22**(5): p. 375-386.
119. Siepka, S.M., et al. *Genetics and neurobiology of circadian clocks in mammals*. in *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*. 2007. NIH Public Access.
120. Godinho, S.I., et al., *The after-hours mutant reveals a role for Fbxl3 in determining mammalian circadian period*. Science, 2007. **316**(5826): p. 897-900.
121. Harada, Y., et al., *Ser-557-phosphorylated mCRY2 is degraded upon synergistic phosphorylation by glycogen synthase kinase-3β*. Journal of Biological Chemistry, 2005. **280**(36): p. 31714-31721.
122. Kurabayashi, N., et al., *DYRK1A and glycogen synthase kinase 3β, a dual-kinase mechanism directing proteasomal degradation of CRY2 for circadian timekeeping*. Molecular and cellular biology, 2010. **30**(7): p. 1757-1768.
123. Lamia, K.A., et al., *AMPK regulates the circadian clock by cryptochrome phosphorylation and degradation*. Science, 2009. **326**(5951): p. 437-440.
124. Albrecht, U., et al., *A differential response of two putative mammalian circadian regulators, mper1 and mper2, to light*. Cell, 1997. **91**(7): p. 1055-1064.
125. Shearman, L.P., et al., *Two period homologs: circadian expression and photic regulation in the suprachiasmatic nuclei*. Neuron, 1997. **19**(6): p. 1261-1269.
126. Shigeyoshi, Y., et al., *Light-induced resetting of a mammalian circadian clock is associated with rapid induction of the mPer1 transcript*. Cell, 1997. **91**(7): p. 1043-1053.
127. Yan, L. and R. Silver, *Resetting the brain clock: time course and localization of mPER1 and mPER2 protein expression in suprachiasmatic nuclei during phase shifts*. European Journal of Neuroscience, 2004. **19**(4): p. 1105-1109.
128. Buhr, E.D. and J.S. Takahashi, *Molecular components of the Mammalian circadian clock*. Circadian clocks, 2013: p. 3-27.
129. Kiontke, K.C., et al., *A phylogeny and molecular barcodes for Caenorhabditis, with numerous new species from rotting fruits*. BMC evolutionary biology, 2011. **11**(1): p. 1-18.
130. Andersen, E.C., et al., *Chromosome-scale selective sweeps shape Caenorhabditis elegans genomic diversity*. Nature genetics, 2012. **44**(3): p. 285-290.
131. Brenner, S., *The genetics of Caenorhabditis elegans*. Genetics, 1974. **77**(1): p. 71-94.

132. Byerly, L., R. Cassada, and R. Russell, *The life cycle of the nematode Caenorhabditis elegans: I. Wild-type growth and reproduction*. *Developmental biology*, 1976. **51**(1): p. 23-33.
133. Sulston, J. *Neuronal cell lineages in the nematode Caenorhabditis elegans*. in *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*. 1983. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
134. Wood, W.B., *Determination of pattern and fate in early embryos of Caenorhabditis elegans*. *The Molecular Biology of Cell Determination and Cell Differentiation*, 1988: p. 57-78.
135. Lewis, J.A. and J.T. Fleming, *Basic culture methods*. *Methods in cell biology*, 1995. **48**: p. 3-29.
136. Dickinson, D.J. and B. Goldstein, *CRISPR-based methods for Caenorhabditis elegans genome engineering*. *Genetics*, 2016. **202**(3): p. 885-901.
137. Anderson, P., *Mutagenesis*. *Methods in cell biology*, 1995. **48**: p. 31-58.
138. Jorgensen, E.M. and S.E. Mango, *The art and design of genetic screens: Caenorhabditis elegans*. *Nature Reviews Genetics*, 2002. **3**(5): p. 356-369.
139. Rankin, C.H., *From gene to identified neuron to behaviour in Caenorhabditis elegans*. *Nature Reviews Genetics*, 2002. **3**(8): p. 622-630.
140. De Bono, M., *Molecular approaches to aggregation behavior and social attachment*. *Journal of Neurobiology*, 2003. **54**(1): p. 78-92.
141. Wu, Y., et al., *Sleep counteracts aging phenotypes to survive starvation-induced developmental arrest in C. elegans*. *Current biology*, 2018. **28**(22): p. 3610-3624. e8.
142. Cassada, R.C. and R.L. Russell, *The dauerlarva, a post-embryonic developmental variant of the nematode Caenorhabditis elegans*. *Developmental biology*, 1975. **46**(2): p. 326-342.
143. Albert, P.S. and D.L. Riddle, *Mutants of Caenorhabditis elegans that form dauer-like larvae*. *Developmental biology*, 1988. **126**(2): p. 270-293.
144. Hodgkin, J. and T. Doniach, *Natural variation and copulatory plug formation in Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 1997. **146**(1): p. 149-164.
145. Barrière, A. and M.-A. Félix, *Natural variation and population genetics of Caenorhabditis elegans*. *WormBook*, 2005. **2005**: p. 1-19.
146. Barriere, A. and M.-A. Félix, *Temporal dynamics and linkage disequilibrium in natural Caenorhabditis elegans populations*. *Genetics*, 2007. **176**(2): p. 999-1011.
147. Félix, M.-A. and F. Duveau, *Population dynamics and habitat sharing of natural populations of Caenorhabditis elegans and C. briggsae*. *BMC biology*, 2012. **10**: p. 1-19.
148. Petersen, C., et al., *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 ecology*, 2014. **14**(1): p. 1-10.
149. Fay, J.C. and J.A. Benavides, *Hypervariable noncoding sequences in Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 2005. **170**(4): p. 1575-1587.
150. Diezmann, S. and F.S. Dietrich, *Oxidative stress survival in a clinical Saccharomyces cerevisiae isolate is influenced by a major quantitative trait nucleotide*. *Genetics*, 2011. **188**(3): p. 709-722.
151. Schacherer, J., et al., *Comprehensive polymorphism survey elucidates population structure of Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, 2009. **458**(7236): p. 342-345.
152. Charron, G., J.B. Leducq, and C.R. Landry, *Chromosomal variation segregates within incipient species and correlates with reproductive isolation*. *Molecular ecology*, 2014. **23**(17): p. 4362-4372.
153. Félix, M.-A. and C. Braendle, *The natural history of Caenorhabditis elegans*. *Current biology*, 2010. **20**(22): p. R965-R969.

154. Lee, Q. and P. Widden, *Folsomia candida*, a "fungivorous" collembolan, feeds preferentially on nematodes rather than soil fungi. *Soil Biology and Biochemistry* (United Kingdom), 1996.
155. Kiontke, K. and W. Sudhaus, *Ecology of Caenorhabditis species*. *WormBook*, 2006. **9**: p. 1-14.
156. Maguire, S.M., et al., *The C. elegans touch response facilitates escape from predacious fungi*. *Current Biology*, 2011. **21**(15): p. 1326-1330.
157. Troemel, E.R., et al., *Microsporidia are natural intracellular parasites of the nematode Caenorhabditis elegans*. *PLoS biology*, 2008. **6**(12): p. e309.
158. Frézal, L. and M.-A. Félix, *C. elegans outside the Petri dish*. *elife*, 2015. **4**: p. e05849.
159. Burlinson, P., et al., *Pseudomonas fluorescens NZ17 repels grazing by C. elegans, a natural predator*. *The ISME journal*, 2013. **7**(6): p. 1126-1138.
160. White, J.G., et al., *The structure of the nervous system of the nematode Caenorhabditis elegans*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 1986. **314**(1165): p. 1-340.
161. Durbin, R.M., *Studies on the development and organisation of the nervous system of Caenorhabditis elegans*. 1987, University of Cambridge Cambridge, England.
162. Ward, S., et al., *Electron microscopical reconstruction of the anterior sensory anatomy of the nematode Caenorhabditis elegans*. *Journal of Comparative Neurology*, 1975. **160**(3): p. 313-337.
163. Sulston, J.E. and H.R. Horvitz, *Post-embryonic cell lineages of the nematode, Caenorhabditis elegans*. *Developmental biology*, 1977. **56**(1): p. 110-156.
164. Bargmann, C.I., *Chemosensation in C. elegans*. *WormBook: The online review of C. elegans biology* [Internet], 2006.
165. Bergamasco, C. and P. Bazzicalupo, *Signaling in the chemosensory systems*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2006. **63**(13): p. 1510.
166. Gray, J.M., J.J. Hill, and C.I. Bargmann, *A circuit for navigation in Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2005. **102**(9): p. 3184-3191.
167. Horvitz, H.R. and J.E. Sulston, *Isolation and genetic characterization of cell-lineage mutants of the nematode Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 1980. **96**(2): p. 435-454.
168. Emmons, S.W. and J. Lipton, *Genetic basis of male sexual behavior*. *Journal of Neurobiology*, 2003. **54**(1): p. 93-110.
169. Emmons, S.W., *Male development*. *WormBook: The Online Review of C. elegans Biology* [Internet], 2005.
170. Saigusa, T., et al., *Circadian behavioural rhythm in Caenorhabditis elegans*. *Current Biology*, 2002. **12**(2): p. R46-R47.
171. Simonetta, S.H., et al., *Timing of locomotor activity circadian rhythms in Caenorhabditis elegans*. *PLoS One*, 2009. **4**(10): p. e7571.
172. Kippert, F., D.S. Saunders, and M.L. Blaxter, *Caenorhabditis elegans has a circadian clock*. *Current Biology*, 2002. **12**(2): p. R47-R49.
173. Olmedo, M., et al., *Circadian regulation of olfaction and an evolutionarily conserved, nontranscriptional marker in Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. **109**(50): p. 20479-84.
174. van der Linden, A.M., et al., *Genome-wide analysis of light- and temperature-entrained circadian transcripts in Caenorhabditis elegans*. *PLoS Biol*, 2010. **8**(10): p. e1000503.
175. Migliori, M.L., et al., *Circadian rhythms in metabolic variables in Caenorhabditis elegans*. *Physiol Behav*, 2011. **103**(3-4): p. 315-20.
176. Iwasaki, K., D.W. Liu, and J.H. Thomas, *Genes that control a temperature-compensated ultradian clock in Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(22): p. 10317-21.

177. Take-uchi, M., et al., *FLR-4, a novel serine/threonine protein kinase, regulates defecation rhythm in Caenorhabditis elegans*. Mol Biol Cell, 2005. **16**(3): p. 1355-65.
178. Migliori, M.L., et al., *Daily variation in melatonin synthesis and arylalkylamine N-acetyltransferase activity in the nematode Caenorhabditis elegans*. J Pineal Res, 2012. **53**(1): p. 38-46.
179. Simonetta, S.H., et al., *Circadian stress tolerance in adult Caenorhabditis elegans*. J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol, 2008. **194**(9): p. 821-8.
180. Romanowski, A., et al., *Circadian variation in Pseudomonas fluorescens (CHA0)-mediated paralysis of Caenorhabditis elegans*. Microb Pathog, 2011. **50**(1): p. 23-30.
181. Simonetta, S.H. and D.A. Golombek, *An automated tracking system for Caenorhabditis elegans locomotor behavior and circadian studies application*. J Neurosci Methods, 2007. **161**(2): p. 273-80.
182. Winbush, A., et al., *Long-term imaging of circadian locomotor rhythms of a freely crawling C. elegans population*. Journal of neuroscience methods, 2015. **249**: p. 66-74.
183. Goya, M.E., et al., *Circadian rhythms identified in Caenorhabditis elegans by in vivo long-term monitoring of a bioluminescent reporter*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016. **113**(48): p. E7837-E7845.
184. Olmedo, M., et al., *A High-Throughput Method for the Analysis of Larval Developmental Phenotypes in Caenorhabditis elegans*. Genetics, 2015. **201**(2): p. 443-8.
185. Romanowski, A., et al., *Potential conservation of circadian clock proteins in the phylum Nematoda as revealed by bioinformatic searches*. PLoS One, 2014. **9**(11): p. e112871.
186. Hasegawa, K., T. Saigusa, and Y. Tamai, *Caenorhabditis elegans opens up new insights into circadian clock mechanisms*. Chronobiology international, 2005. **22**(1): p. 1-19.
187. Jeon, M., et al., *Similarity of the C. elegans developmental timing protein LIN-42 to circadian rhythm proteins*. Science, 1999. **286**(5442): p. 1141-6.
188. Ambros, V., *Control of developmental timing in Caenorhabditis elegans*. Current opinion in genetics & development, 2000. **10**(4): p. 428-433.
189. Chan, R.C., et al., *Chromosome cohesion is regulated by a clock gene paralogue TIM-1*. Nature, 2003. **423**(6943): p. 1002-1009.
190. Semenza, G.L., *Perspectives on oxygen sensing*. Cell, 1999. **98**(3): p. 281-284.
191. Jiang, H., R. Guo, and J.A. Powell-Coffman, *The Caenorhabditis elegans hif-1 gene encodes a bHLH-PAS protein that is required for adaptation to hypoxia*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2001. **98**(14): p. 7916-7921.
192. Peters, J.M., et al., *Casein kinase I transduces Wnt signals*. Nature, 1999. **401**(6751): p. 345-350.
193. Korswagen, H.C., *Canonical and non-canonical Wnt signaling pathways in Caenorhabditis elegans: variations on a common signaling theme*. Bioessays, 2002. **24**(9): p. 801-10.
194. Thompson, C.L. and A. Sancar, *Photolyase/cryptochrome blue-light photoreceptors use photon energy to repair DNA and reset the circadian clock*. Oncogene, 2002. **21**(58): p. 9043-9056.
195. Vitaterna, M.H., et al., *Differential regulation of mammalian period genes and circadian rhythmicity by cryptochromes 1 and 2*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1999. **96**(21): p. 12114-12119.
196. Horst, G.T.v.d., et al., *Mammalian Cry1 and Cry2 are essential for maintenance of circadian rhythms*. Nature, 1999. **398**(6728): p. 627-630.
197. Ceriani, M.F., et al., *Light-dependent sequestration of TIMELESS by CRYPTOCHROME*. Science, 1999. **285**(5427): p. 553-556.

198. Trojanowski, N.F., et al., *Distinct mechanisms underlie quiescence during two Caenorhabditis elegans sleep-like states*. Journal of Neuroscience, 2015. **35**(43): p. 14571-14584.
199. Trojanowski, N.F. and D.M. Raizen, *Call it worm sleep*. Trends in neurosciences, 2016. **39**(2): p. 54-62.
200. Gonzales, D.L., et al., *A microfluidic-induced C. elegans sleep state*. Nature communications, 2019. **10**(1): p. 5035.
201. Dowse, H.B., *Maximum entropy spectral analysis for circadian rhythms: theory, history and practice*. Journal of circadian rhythms, 2013. **11**(1): p. 1-9.
202. Press, W.H., et al., *Numerical recipes in C. 2*. Cambridge University, 1992.
203. Zielinski, T., et al., *Strengths and limitations of period estimation methods for circadian data*. PloS one, 2014. **9**(5): p. e96462.
204. Chang, D.C. and S.M. Reppert, *A novel C-terminal domain of drosophila PERIOD inhibits dCLOCK:CYCLE-mediated transcription*. Curr Biol, 2003. **13**(9): p. 758-62.
205. Lee, C., D.R. Weaver, and S.M. Reppert, *Direct association between mouse PERIOD and CKIepsilon is critical for a functioning circadian clock*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(2): p. 584-94.
206. Sun, W.C., et al., *Two distinct modes of PERIOD recruitment onto dCLOCK reveal a novel role for TIMELESS in circadian transcription*. J Neurosci, 2010. **30**(43): p. 14458-69.
207. Huang, Z.J., I. Edery, and M. Rosbash, *PAS is a dimerization domain common to Drosophila period and several transcription factors*. Nature, 1993. **364**(6434): p. 259-62.
208. Zheng, B., et al., *The mPer2 gene encodes a functional component of the mammalian circadian clock*. Nature, 1999. **400**(6740): p. 169-73.
209. Tei, H., et al., *Circadian oscillation of a mammalian homologue of the Drosophila period gene*. Nature, 1997. **389**(6650): p. 512-6.
210. Nambu, J.R., et al., *The Drosophila single-minded gene encodes a helix-loop-helix protein that acts as a master regulator of CNS midline development*. Cell, 1991. **67**(6): p. 1157-67.
211. Crews, S.T., J.B. Thomas, and C.S. Goodman, *The Drosophila single-minded gene encodes a nuclear protein with sequence similarity to the per gene product*. Cell, 1988. **52**(1): p. 143-51.
212. Saez, L. and M.W. Young, *Regulation of nuclear entry of the Drosophila clock proteins period and timeless*. Neuron, 1996. **17**(5): p. 911-20.
213. Tennessen, J.M., et al., *Novel heterochronic functions of the Caenorhabditis elegans period-related protein LIN-42*. Dev Biol, 2006. **289**(1): p. 30-43.
214. Abrahante, J.E., E.A. Miller, and A.E. Rougvie, *Identification of heterochronic mutants in Caenorhabditis elegans. Temporal misexpression of a collagen::green fluorescent protein fusion gene*. Genetics, 1998. **149**(3): p. 1335-51.
215. Van Wynsberghe, P.M. and A.E. Pasquinelli, *Period homolog LIN-42 regulates miRNA transcription to impact developmental timing*. Worm, 2014. **3**(4): p. e974453.
216. Monsalve, G.C., C. Van Buskirk, and A.R. Frand, *LIN-42/PERIOD controls cyclical and developmental progression of C. elegans molts*. Curr Biol, 2011. **21**(24): p. 2033-45.
217. Raizen, D.M., et al., *Lethargus is a Caenorhabditis elegans sleep-like state*. Nature, 2008. **451**(7178): p. 569-72.
218. McCulloch, K.A. and A.E. Rougvie, *Caenorhabditis elegans period homolog lin-42 regulates the timing of heterochronic miRNA expression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(43): p. 15450-5.
219. Van Wynsberghe, P.M., et al., *The Period protein homolog LIN-42 negatively regulates microRNA biogenesis in C. elegans*. Dev Biol, 2014. **390**(2): p. 126-35.

220. Perales, R., et al., *LIN-42, the Caenorhabditis elegans PERIOD homolog, negatively regulates microRNA transcription*. PLoS Genet, 2014. **10**(7): p. e1004486.
221. Tennessen, J.M., K.J. Opperman, and A.E. Rougvie, *The C. elegans developmental timing protein LIN-42 regulates diapause in response to environmental cues*. Development, 2010. **137**(20): p. 3501-11.
222. Greer, L.F., 3rd and A.A. Szalay, *Imaging of light emission from the expression of luciferases in living cells and organisms: a review*. Luminescence, 2002. **17**(1): p. 43-74.
223. Wilson, T. and J.W. Hastings, *Bioluminescence*. Annu Rev Cell Dev Biol, 1998. **14**: p. 197-230.
224. Leclerc, G.M., et al., *Development of a destabilized firefly luciferase enzyme for measurement of gene expression*. Biotechniques, 2000. **29**(3): p. 590-1, 594-6, 598 passim.
225. Welsh, D.K., T. Imaizumi, and S.A. Kay, *Real-time reporting of circadian-regulated gene expression by luciferase imaging in plants and mammalian cells*. Methods Enzymol, 2005. **393**: p. 269-88.
226. Rechsteiner, M. and S.W. Rogers, *PEST sequences and regulation by proteolysis*. Trends Biochem Sci, 1996. **21**(7): p. 267-71.
227. Kondo, T., et al., *Circadian rhythms in prokaryotes: luciferase as a reporter of circadian gene expression in cyanobacteria*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(12): p. 5672-6.
228. Millar, A.J., et al., *A novel circadian phenotype based on firefly luciferase expression in transgenic plants*. Plant Cell, 1992. **4**(9): p. 1075-87.
229. Brandes, C., et al., *Novel features of drosophila period Transcription revealed by real-time luciferase reporting*. Neuron, 1996. **16**(4): p. 687-92.
230. Morgan, L.W., A.V. Greene, and D. Bell-Pedersen, *Circadian and light-induced expression of luciferase in Neurospora crassa*. Fungal Genet Biol, 2003. **38**(3): p. 327-32.
231. Kaneko, M. and G.M. Cahill, *Light-dependent development of circadian gene expression in transgenic zebrafish*. PLoS Biol, 2005. **3**(2): p. e34.
232. Kaneko, M., N. Hernandez-Borsetti, and G.M. Cahill, *Diversity of zebrafish peripheral oscillators revealed by luciferase reporting*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(39): p. 14614-9.
233. Yamazaki, S. and J.S. Takahashi, *Real-time luminescence reporting of circadian gene expression in mammals*. Methods Enzymol, 2005. **393**: p. 288-301.
234. Asai, M., et al., *Visualization of mPer1 transcription in vitro: NMDA induces a rapid phase shift of mPer1 gene in cultured SCN*. Curr Biol, 2001. **11**(19): p. 1524-7.
235. Yoo, S.H., et al., *PERIOD2::LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(15): p. 5339-46.
236. Lagido, C., et al., *Development and application of bioluminescent Caenorhabditis elegans as multicellular eukaryotic biosensors*. FEBS Lett, 2001. **493**(1): p. 36-9.
237. Lagido, C., et al., *Bridging the phenotypic gap: real-time assessment of mitochondrial function and metabolism of the nematode Caenorhabditis elegans*. BMC Physiol, 2008. **8**: p. 7.
238. Gu, T., S. Orita, and M. Han, *Caenorhabditis elegans SUR-5, a novel but conserved protein, negatively regulates LET-60 Ras activity during vulval induction*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(8): p. 4556-64.
239. Stinchcomb, D.T., et al., *Extrachromosomal DNA transformation of Caenorhabditis elegans*. Mol Cell Biol, 1985. **5**(12): p. 3484-96.
240. Mello, C.C., et al., *Efficient gene transfer in C.elegans: extrachromosomal maintenance and integration of transforming sequences*. EMBO J, 1991. **10**(12): p. 3959-70.
241. Mello, C. and A. Fire, *DNA transformation*. Methods Cell Biol, 1995. **48**: p. 451-82.

242. Fire, A., *Integrative transformation of Caenorhabditis elegans*. EMBO J, 1986. **5**(10): p. 2673-80.
243. Kramer, J.M., et al., *The Caenorhabditis elegans rol-6 gene, which interacts with the sqt-1 collagen gene to determine organismal morphology, encodes a collagen*. Mol Cell Biol, 1990. **10**(5): p. 2081-9.
244. Fire, A., S.W. Harrison, and D. Dixon, *A modular set of lacZ fusion vectors for studying gene expression in Caenorhabditis elegans*. Gene, 1990. **93**(2): p. 189-98.
245. Granato, M., H. Schnabel, and R. Schnabel, *pha-1, a selectable marker for gene transfer in C. elegans*. Nucleic Acids Res, 1994. **22**(9): p. 1762-3.
246. Maduro, M. and D. Pilgrim, *Identification and cloning of unc-119, a gene expressed in the Caenorhabditis elegans nervous system*. Genetics, 1995. **141**(3): p. 977-88.
247. Praitis, V., et al., *Creation of low-copy integrated transgenic lines in Caenorhabditis elegans*. Genetics, 2001. **157**(3): p. 1217-26.
248. Kelly, W.G., et al., *Distinct requirements for somatic and germline expression of a generally expressed Caenorhabditis elegans gene*. Genetics, 1997. **146**(1): p. 227-38.
249. Dernburg, A.F., et al., *Transgene-mediated cosuppression in the C. elegans germ line*. Genes Dev, 2000. **14**(13): p. 1578-83.
250. Yoshina, S., et al., *Locus-specific integration of extrachromosomal transgenes in C. elegans with the CRISPR/Cas9 system*. Biochem Biophys Rep, 2016. **5**: p. 70-76.
251. Noma, K. and Y. Jin, *Rapid Integration of Multi-copy Transgenes Using Optogenetic Mutagenesis in Caenorhabditis elegans*. G3 (Bethesda), 2018. **8**(6): p. 2091-2097.
252. Spieth, J., et al., *Overview of gene structure in C. elegans*. WormBook, 2014: p. 1-18.
253. Corsi, A.K., B. Wightman, and M. Chalfie, *A Transparent window into biology: A primer on Caenorhabditis elegans*. WormBook, 2015: p. 1-31.
254. McGhee, J.D. and M.W. Krause, *Transcription Factors and Transcriptional Regulation, in C. elegans II*, D.L. Riddle, et al., Editors. 1997: Cold Spring Harbor (NY).
255. Daugherty, A.C., et al., *Chromatin accessibility dynamics reveal novel functional enhancers in C. elegans*. Genome Res, 2017. **27**(12): p. 2096-2107.
256. Okkema, P.G., et al., *Sequence requirements for myosin gene expression and regulation in Caenorhabditis elegans*. Genetics, 1993. **135**(2): p. 385-404.
257. Blumenthal, T., *Trans-splicing and operons in C. elegans*. WormBook, 2012: p. 1-11.
258. Blumenthal, T. and K. Steward, *RNA Processing and Gene Structure, in C. elegans II*, D.L. Riddle, et al., Editors. 1997: Cold Spring Harbor (NY).
259. Lee, L.W., H.W. Lo, and S.J. Lo, *Vectors for co-expression of two genes in Caenorhabditis elegans*. Gene, 2010. **455**(1-2): p. 16-21.
260. Le Hir, H., A. Nott, and M.J. Moore, *How introns influence and enhance eukaryotic gene expression*. Trends Biochem Sci, 2003. **28**(4): p. 215-20.
261. Nott, A., S.H. Meislin, and M.J. Moore, *A quantitative analysis of intron effects on mammalian gene expression*. RNA, 2003. **9**(5): p. 607-17.
262. McNally, K., et al., *Katanin controls mitotic and meiotic spindle length*. J Cell Biol, 2006. **175**(6): p. 881-91.
263. Harmer, S.L., S. Panda, and S.A. Kay, *Molecular bases of circadian rhythms*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2001. **17**: p. 215-53.
264. Edelman, T.L., et al., *Analysis of a lin-42/period Null Allele Implicates All Three Isoforms in Regulation of Caenorhabditis elegans Molting and Developmental Timing*. G3 (Bethesda), 2016. **6**(12): p. 4077-4086.
265. Sambrook, J., D.W. Russell, and J. Sambrook, *The condensed protocols from Molecular cloning : a laboratory manual*. 2006, Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press. v, 800 p.

266. Praitis, V. and M.F. Maduro, *Transgenesis in C. elegans*. Methods in cell biology, 2011. **106**: p. 159-185.
267. Herrero, A., et al., *Pigment-dispersing factor signaling in the circadian system of Caenorhabditis elegans*. Genes Brain Behav, 2015. **14**(6): p. 493-501.
268. Temmerman, L., et al., *C. elegans homologs of insect clock proteins: a tale of many stories*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2011. **1220**(1): p. 137-148.
269. Dubowy, C. and A. Sehgal, *Circadian Rhythms and Sleep in Drosophila melanogaster*. Genetics, 2017. **205**(4): p. 1373-1397.
270. Partch, C.L., C.B. Green, and J.S. Takahashi, *Molecular architecture of the mammalian circadian clock*. Trends Cell Biol, 2014. **24**(2): p. 90-9.
271. Takahashi, J.S., *Transcriptional architecture of the mammalian circadian clock*. Nat Rev Genet, 2017. **18**(3): p. 164-179.
272. Zheng, B., et al., *Nonredundant roles of the mPer1 and mPer2 genes in the mammalian circadian clock*. Cell, 2001. **105**(5): p. 683-94.
273. Top, D., et al., *CK1/Doubletime activity delays transcription activation in the circadian clock*. Elife, 2018. **7**: p. e32679.
274. Lam, V.H., et al., *CK1 $\alpha$  collaborates with DOUBLETIME to regulate PERIOD function in the Drosophila circadian clock*. Journal of Neuroscience, 2018. **38**(50): p. 10631-10643.
275. Chiu, J.C., et al., *The phospho-occupancy of an atypical SLIMB-binding site on PERIOD that is phosphorylated by DOUBLETIME controls the pace of the clock*. Genes Dev, 2008. **22**(13): p. 1758-72.
276. Baylies, M.K., et al., *Changes in abundance or structure of the per gene product can alter periodicity of the Drosophila clock*. Nature, 1987. **326**(6111): p. 390-2.
277. Bae, K., et al., *Differential functions of mPer1, mPer2, and mPer3 in the SCN circadian clock*. Neuron, 2001. **30**(2): p. 525-36.
278. Masuda, S., et al., *Mutation of a PER2 phosphodegron perturbs the circadian phosphoswitch*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2020. **117**(20): p. 10888-10896.
279. Xu, Y., et al., *Modeling of a human circadian mutation yields insights into clock regulation by PER2*. Cell, 2007. **128**(1): p. 59-70.
280. An, Y., et al., *Decoupling PER phosphorylation, stability and rhythmic expression from circadian clock function by abolishing PER-CK1 interaction*. Nat Commun, 2022. **13**(1): p. 3991.
281. Darlington, T.K., et al., *Closing the circadian loop: CLOCK-induced transcription of its own inhibitors per and tim*. Science, 1998. **280**(5369): p. 1599-603.
282. Hao, H., D.L. Allen, and P.E. Hardin, *A circadian enhancer mediates PER-dependent mRNA cycling in Drosophila melanogaster*. Mol Cell Biol, 1997. **17**(7): p. 3687-93.
283. Rutila, J.E., O. Maltseva, and M. Rosbash, *The tim<sup>SL</sup> mutant affects a restricted portion of the Drosophila melanogaster circadian cycle*. J Biol Rhythms, 1998. **13**(5): p. 380-92.
284. Harbour, V.L., et al., *Phase differences in expression of circadian clock genes in the central nucleus of the amygdala, dentate gyrus, and suprachiasmatic nucleus in the rat*. PLoS One, 2014. **9**(7): p. e103309.
285. Dunlap, J.C., *Molecular bases for circadian clocks*. Cell, 1999. **96**(2): p. 271-290.
286. Uchida, Y., J. Hirayama, and H. Nishina, *A common origin: signaling similarities in the regulation of the circadian clock and DNA damage responses*. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2010. **33**(4): p. 535-544.
287. Hirayama, J. and P. Sassone-Corsi, *Structural and functional features of transcription factors controlling the circadian clock*. Current opinion in genetics & development, 2005. **15**(5): p. 548-556.

288. Gallego, M. and D.M. Virshup, *Post-translational modifications regulate the ticking of the circadian clock*. Nature reviews Molecular cell biology, 2007. **8**(2): p. 139-148.
289. Yoshitane, H., et al., *JNK regulates the photic response of the mammalian circadian clock*. EMBO reports, 2012. **13**(5): p. 455-461.
290. Ma, Y.-T., et al., *O-GlcNAcylation of BMAL1 regulates circadian rhythms in NIH3T3 fibroblasts*. Biochemical and biophysical research communications, 2013. **431**(3): p. 382-387.
291. Kaasik, K., et al., *Glucose sensor O-GlcNAcylation coordinates with phosphorylation to regulate circadian clock*. Cell metabolism, 2013. **17**(2): p. 291-302.
292. Lowrey, P.L., et al., *Positional syntenic cloning and functional characterization of the mammalian circadian mutation tau*. Science, 2000. **288**(5465): p. 483-491.
293. Toh, K.L., et al., *An h Per2 phosphorylation site mutation in familial advanced sleep phase syndrome*. Science, 2001. **291**(5506): p. 1040-1043.
294. Xu, Y., et al., *Functional consequences of a CK1 $\delta$  mutation causing familial advanced sleep phase syndrome*. Nature, 2005. **434**(7033): p. 640-644.
295. Ebisawa, T., et al., *Association of structural polymorphisms in the human period3 gene with delayed sleep phase syndrome*. EMBO reports, 2001. **2**(4): p. 342-346.
296. Akashi, M., et al., *Control of intracellular dynamics of mammalian period proteins by casein kinase I epsilon (CKIepsilon) and CKIdelta in cultured cells*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(6): p. 1693-703.
297. Takano, A., Y. Isojima, and K. Nagai, *Identification of mPer1 phosphorylation sites responsible for the nuclear entry*. Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(31): p. 32578-32585.
298. Muskus, M.J., et al., *Drosophila DBT lacking protein kinase activity produces long-period and arrhythmic circadian behavioral and molecular rhythms*. Mol Cell Biol, 2007. **27**(23): p. 8049-64.
299. Graves, P.R. and P.J. Roach, *Role of COOH-terminal Phosphorylation in the Regulation of Casein Kinase I $\delta$  (\*)*. Journal of Biological Chemistry, 1995. **270**(37): p. 21689-21694.
300. Cegielska, A., et al., *Autoinhibition of casein kinase I  $\epsilon$  (CKI $\epsilon$ ) is relieved by protein phosphatases and limited proteolysis*. Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**(3): p. 1357-1364.
301. Rivers, A., et al., *Regulation of casein kinase I epsilon and casein kinase I delta by an in vivo futile phosphorylation cycle*. J Biol Chem, 1998. **273**(26): p. 15980-4.
302. Cegielska, A., et al., *Autoinhibition of casein kinase I epsilon (CKI epsilon) is relieved by protein phosphatases and limited proteolysis*. J Biol Chem, 1998. **273**(3): p. 1357-64.
303. Guo, G., et al., *Autokinase activity of casein kinase 1  $\delta/\epsilon$  governs the period of mammalian circadian rhythms*. Journal of biological rhythms, 2019. **34**(5): p. 482-496.
304. Walton, K.M., et al., *Selective inhibition of casein kinase 1 epsilon minimally alters circadian clock period*. J Pharmacol Exp Ther, 2009. **330**(2): p. 430-9.
305. Banerjee, D., et al., *Developmental timing in C. elegans is regulated by kin-20 and tim-1, homologs of core circadian clock genes*. Dev Cell, 2005. **8**(2): p. 287-95.
306. Rhodehouse, K., et al., *The Doubletime Homolog KIN-20 Mainly Regulates let-7 Independently of Its Effects on the Period Homolog LIN-42 in Caenorhabditis elegans*. G3 (Bethesda), 2018. **8**(8): p. 2617-2629.
307. Cadigan, K.M. and R. Nusse, *Wnt signaling: a common theme in animal development*. Genes Dev, 1997. **11**(24): p. 3286-305.
308. Moon, R.T., J.D. Brown, and M. Torres, *WNTs modulate cell fate and behavior during vertebrate development*. Trends Genet, 1997. **13**(4): p. 157-62.
309. Bhanot, P., et al., *A new member of the frizzled family from Drosophila functions as a Wingless receptor*. Nature, 1996. **382**(6588): p. 225-30.

310. Morse, D. and P. Sassone-Corsi, *Time after time: inputs to and outputs from the mammalian circadian oscillators*. Trends Neurosci, 2002. **25**(12): p. 632-7.
311. LaBella, M.L., et al., *Casein Kinase 1delta Stabilizes Mature Axons by Inhibiting Transcription Termination of Ankyrin*. Dev Cell, 2020. **52**(1): p. 88-103 e18.
312. Green, M.R. and J. Sambrook, *Molecular cloning*. A Laboratory Manual 4th, 2012.
313. Meng, Q.J., et al., *Setting clock speed in mammals: the CK1 epsilon tau mutation in mice accelerates circadian pacemakers by selectively destabilizing PERIOD proteins*. Neuron, 2008. **58**(1): p. 78-88.
314. Etchegaray, J.P., et al., *Casein kinase 1 delta (CK1delta) regulates period length of the mouse suprachiasmatic circadian clock in vitro*. PLoS One, 2010. **5**(4): p. e10303.
315. Narasimamurthy, R. and D.M. Virshup, *The phosphorylation switch that regulates ticking of the circadian clock*. Mol Cell, 2021. **81**(6): p. 1133-1146.
316. Philpott, J.M., et al., *Biochemical mechanisms of period control within the mammalian circadian clock*. Semin Cell Dev Biol, 2022. **126**: p. 71-78.
317. Olmedo, M., et al., *Circadian regulation of olfaction and an evolutionarily conserved, nontranscriptional marker in Caenorhabditis elegans*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2012. **109**(50): p. 20479-20484.
318. Brenna, A., et al., *Cyclin-dependent kinase 5 (CDK5) regulates the circadian clock*. Elife, 2019. **8**: p. e50925.
319. Yamazaki, S., et al., *Circadian fluctuations of cAMP content in the suprachiasmatic nucleus and the anterior hypothalamus of the rat*. Brain Res, 1994. **651**(1-2): p. 329-31.
320. Sharma, P., et al., *Regulation of cyclin-dependent kinase 5 catalytic activity by phosphorylation*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1999. **96**(20): p. 11156-11160.
321. Ianes, C., et al., *CK1δ activity is modulated by CDK2/E-and CDK5/p35-mediated phosphorylation*. Amino Acids, 2016. **48**: p. 579-592.
322. Philpott, J.M., et al., *Casein kinase 1 dynamics underlie substrate selectivity and the PER2 circadian phosphoswitch*. Elife, 2020. **9**: p. e52343.
323. Nakajima, M., et al., *Reconstitution of circadian oscillation of cyanobacterial KaiC phosphorylation in vitro*. science, 2005. **308**(5720): p. 414-415.
324. Tomita, J., et al., *No transcription-translation feedback in circadian rhythm of KaiC phosphorylation*. Science, 2005. **307**(5707): p. 251-254.
325. He, Q., et al., *CKI and CKII mediate the FREQUENCY-dependent phosphorylation of the WHITE COLLAR complex to close the Neurospora circadian negative feedback loop*. Genes & Development, 2006. **20**(18): p. 2552-2565.
326. Fan, J.-Y., et al., *Drosophila and vertebrate casein kinase 1δ exhibits evolutionary conservation of circadian function*. Genetics, 2009. **181**(1): p. 139-152.
327. Narasimamurthy, R., et al., *CK1δ/ε protein kinase primes the PER2 circadian phosphoswitch*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2018. **115**(23): p. 5986-5991.
328. Shanware, N.P., et al., *Casein kinase 1-dependent phosphorylation of familial advanced sleep phase syndrome-associated residues controls PERIOD 2 stability*. Journal of Biological Chemistry, 2011. **286**(14): p. 12766-12774.
329. Zhou, M., et al., *A Period2 phosphoswitch regulates and temperature compensates circadian period*. Molecular cell, 2015. **60**(1): p. 77-88.
330. Shirogane, T., et al., *SCFβ-TRCP controls clock-dependent transcription via casein kinase 1-dependent degradation of the mammalian period-1 (Per1) protein*. Journal of Biological Chemistry, 2005. **280**(29): p. 26863-26872.
331. Nishimura, K., et al., *An auxin-based degron system for the rapid depletion of proteins in nonplant cells*. Nature methods, 2009. **6**(12): p. 917-922.

332. Holland, A.J., et al., *Inducible, reversible system for the rapid and complete degradation of proteins in mammalian cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2012. **109**(49): p. E3350-E3357.
333. Camlin, N.J. and J.P. Evans, *Auxin-inducible protein degradation as a novel approach for protein depletion and reverse genetic discoveries in mammalian oocytes*. Biology of reproduction, 2019. **101**(4): p. 704-718.
334. Ashley, G.E., et al., *An expanded auxin-inducible degron toolkit for Caenorhabditis elegans*. Genetics, 2021. **217**(3): p. iyab006.
335. Natsume, T. and M.T. Kanemaki, *Conditional degrons for controlling protein expression at the protein level*. Annual Review of Genetics, 2017. **51**: p. 83-102.
336. Dunn, K.W., M.M. Kamocka, and J.H. McDonald, *A practical guide to evaluating colocalization in biological microscopy*. Am J Physiol Cell Physiol, 2011. **300**(4): p. C723-42.
337. Lewis, J.A. and J.T. Fleming, *Chapter 1 Basic Culture Methods*, in *Methods in Cell Biology*, H.F. Epstein and D.C. Shakes, Editors. 1995, Academic Press. p. 3-29.
338. Martinez, M.A.Q., et al., *Rapid Degradation of Caenorhabditis elegans Proteins at Single-Cell Resolution with a Synthetic Auxin*. G3 (Bethesda), 2020. **10**(1): p. 267-280.
339. Hammarlund, M., et al., *The CeNGEN Project: The Complete Gene Expression Map of an Entire Nervous System*. Neuron, 2018. **99**(3): p. 430-433.
340. Taylor, S.R., et al., *Molecular topography of an entire nervous system*. Cell, 2021. **184**(16): p. 4329-4347 e23.
341. Martinez, M.A.Q. and D.Q. Matus, *Auxin-mediated Protein Degradation in Caenorhabditis elegans*. Bio Protoc, 2020. **10**(8).
342. Crosby, P. and C.L. Partch, *New insights into non-transcriptional regulation of mammalian core clock proteins*. Journal of Cell Science, 2020. **133**(18): p. jcs241174.
343. Hardin, P.E., *Molecular genetic analysis of circadian timekeeping in Drosophila*. Advances in genetics, 2011. **74**: p. 141-173.
344. Hunt-Newbury, R., et al., *High-throughput in vivo analysis of gene expression in Caenorhabditis elegans*. PLoS Biol, 2007. **5**(9): p. e237.
345. Ashley, G.E., et al., *An expanded auxin-inducible degron toolkit for Caenorhabditis elegans*. Genetics, 2021. **217**(3).
346. Duong, T., et al., *The Rheb-TORC1 signaling axis functions as a developmental checkpoint*. Development, 2020. **147**(5): p. dev181727.
347. Bugge, A., et al., *Rev-erba and Rev-erbb coordinately protect the circadian clock and normal metabolic function*. Genes & development, 2012. **26**(7): p. 657-667.
348. Cho, H., et al., *Regulation of circadian behaviour and metabolism by REV-ERB- $\alpha$  and REV-ERB- $\beta$* . Nature, 2012. **485**(7396): p. 123-127.
349. Sato, T.K., et al., *A functional genomics strategy reveals Rora as a component of the mammalian circadian clock*. Neuron, 2004. **43**(4): p. 527-37.
350. Burbach, K.M., A. Poland, and C.A. Bradfield, *Cloning of the Ah-receptor cDNA reveals a distinctive ligand-activated transcription factor*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1992. **89**(17): p. 8185-8189.
351. Powell-Coffman, J.A., C.A. Bradfield, and W.B. Wood, *Caenorhabditis elegans orthologs of the aryl hydrocarbon receptor and its heterodimerization partner the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1998. **95**(6): p. 2844-2849.
352. Jacobi, D., et al., *Hepatic Bmal1 Regulates Rhythmic Mitochondrial Dynamics and Promotes Metabolic Fitness*. Cell Metab, 2015. **22**(4): p. 709-20.
353. Salceda, S. and J. Caro, *Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions: its stabilization by*

- hypoxia depends on redox-induced changes*. Journal of Biological Chemistry, 1997. **272**(36): p. 22642-22647.
354. Shen, C. and J.A. POWELL-COFFMAN, *Genetic analysis of hypoxia signaling and response in C. elegans*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2003. **995**(1): p. 191-199.
355. Kozak, K.R., B. Abbott, and O. Hankinson, *ARNT-deficient mice and placental differentiation*. Developmental biology, 1997. **191**(2): p. 297-305.
356. Qin, H., Z. Zhai, and J.A. Powell-Coffman, *The Caenorhabditis elegans AHR-1 transcription complex controls expression of soluble guanylate cyclase genes in the URX neurons and regulates aggregation behavior*. Dev Biol, 2006. **298**(2): p. 606-15.
357. Huang, C., C. Xiong, and K. Kornfeld, *Measurements of age-related changes of physiological processes that predict lifespan of Caenorhabditis elegans*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2004. **101**(21): p. 8084-8089.
358. Cheung, B.H., et al., *Experience-dependent modulation of C. elegans behavior by ambient oxygen*. Current Biology, 2005. **15**(10): p. 905-917.
359. Huang, X., J.A. Powell-Coffman, and Y. Jin, *The AHR-1 aryl hydrocarbon receptor and its co-factor the AHA-1 aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator specify GABAergic neuron cell fate in C. elegans*. Development, 2004. **131**(4): p. 819-28.
360. Zhang, J., et al., *Neuronal target identification requires AHA-1-mediated fine-tuning of Wnt signaling in C. elegans*. PLoS Genet, 2013. **9**(6): p. e1003618.
361. Kondratov, R.V., et al., *Early aging and age-related pathologies in mice deficient in BMAL1, the core component of the circadian clock*. Genes Dev, 2006. **20**(14): p. 1868-73.
362. McDearmon, E.L., et al., *Dissecting the functions of the mammalian clock protein BMAL1 by tissue-specific rescue in mice*. Science, 2006. **314**(5803): p. 1304-8.
363. Sun, Y., et al., *The mortality of MOP3 deficient mice with a systemic functional failure*. J Biomed Sci, 2006. **13**(6): p. 845-51.
364. Hendricks, J.C., et al., *Gender dimorphism in the role of cycle (BMAL1) in rest, rest regulation, and longevity in Drosophila melanogaster*. J Biol Rhythms, 2003. **18**(1): p. 12-25.
365. Takahashi, J.S., *Molecular components of the circadian clock in mammals*. Diabetes Obes Metab, 2015. **17 Suppl 1**(0 1): p. 6-11.
366. Takahashi, J.S., et al., *The genetics of mammalian circadian order and disorder: implications for physiology and disease*. Nat Rev Genet, 2008. **9**(10): p. 764-75.
367. Ahmad, M., W. Li, and D. Top, *Integration of Circadian Clock Information in the Drosophila Circadian Neuronal Network*. J Biol Rhythms, 2021. **36**(3): p. 203-220.
368. Hastings, M.H., E.S. Maywood, and M. Brancaccio, *Generation of circadian rhythms in the suprachiasmatic nucleus*. Nat Rev Neurosci, 2018. **19**(8): p. 453-469.
369. Helfrich-Förster, C., M. Stengl, and U. Homberg, *Organization of the circadian system in insects*. Chronobiol Int, 1998. **15**(6): p. 567-94.
370. Patke, A., M.W. Young, and S. Axelrod, *Molecular mechanisms and physiological importance of circadian rhythms*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2020. **21**(2): p. 67-84.
371. Buhr, E.D., S.H. Yoo, and J.S. Takahashi, *Temperature as a universal resetting cue for mammalian circadian oscillators*. Science, 2010. **330**(6002): p. 379-85.
372. Dibner, C., U. Schibler, and U. Albrecht, *The mammalian circadian timing system: organization and coordination of central and peripheral clocks*. Annu Rev Physiol, 2010. **72**: p. 517-49.
373. Dunlap, J.C. and J.J. Loros, *The Neurospora circadian system*. Journal of biological rhythms, 2004. **19**(5): p. 414-424.
374. Krylov, V.V., et al., *Circadian rhythms in zebrafish (Danio rerio) behaviour and the sources of their variability*. Biol Rev Camb Philos Soc, 2021. **96**(3): p. 785-797.

375. Migliori, M.L., et al., *Caenorhabditis elegans as a Promising Model Organism in Chronobiology*. J Biol Rhythms, 2023. **38**(2): p. 131-147.
376. Caldart, C.S., A. Carpaneto, and D.A. Golombek, *Synchronization of circadian locomotor activity behavior in Caenorhabditis elegans: Interactions between light and temperature*. J Photochem Photobiol B, 2020. **211**: p. 112000.
377. Monteith, J. and M. Unsworth, *Principles of environmental physics: plants, animals, and the atmosphere*. 2013: Academic Press.
378. Edwards, S.L., et al., *A novel molecular solution for ultraviolet light detection in Caenorhabditis elegans*. PLoS biology, 2008. **6**(8): p. e198.
379. Preuss, F., et al., *Drosophila doubletime mutations which either shorten or lengthen the period of circadian rhythms decrease the protein kinase activity of casein kinase I*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(2): p. 886-98.
380. Hardin, P.E., *The circadian timekeeping system of Drosophila*. Current biology, 2005. **15**(17): p. R714-R722.
381. Goodman, M.B. and P. Sengupta, *How Caenorhabditis elegans senses mechanical stress, temperature, and other physical stimuli*. Genetics, 2019. **212**(1): p. 25-51.
382. Chelur, D.S. and M. Chalfie, *Targeted cell killing by reconstituted caspases*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2007. **104**(7): p. 2283-2288.
383. Pokala, N., et al., *Inducible and titratable silencing of Caenorhabditis elegans neurons in vivo with histamine-gated chloride channels*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2014. **111**(7): p. 2770-2775.