

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA
AGRONÓMICA Y DEL MEDIO NATURAL

Grado en Biotecnología
(2012-2016)



**ESTUDIO DEL PAPEL DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN LAG-1
EN EL PROCESO DE DIFERENCIACIÓN TERMINAL DE LAS
NEURONAS SEROTONÉRGICAS ADF EN *C. ELEGANS***

TRABAJO FINAL DE GRADO

Realizado por: **Laura Blasco Chamarro**

Dirigido por:

Dra. Miren Maicas Irigaray

Dra. Nuria Flames Bonilla

Tutor UPV:

Jose S. Vicente Antón

Valencia, 19 de Septiembre 2016

Título: Estudio del papel del factor de transcripción LAG-1 en el proceso de diferenciación terminal de las neuronas serotoninérgicas ADF en *C. elegans*.

Autora: Laura Blasco Chamarro

Directora: Dra. Nuria Flames Bonilla

Co-Directora: Miren Maicas Irigaray

Tutor UPV: Jose S. Vicente Antón

Valencia, 19 de Septiembre.

Resumen

Las neuronas que sintetizan el neurotransmisor serotonina se denominan neuronas serotoninérgicas. La serotonina tiene funciones esenciales en el organismo como la regulación del sueño, el apetito o el estado de ánimo. Debido a su función clave, alteraciones en el sistema serotoninérgico se relacionan con enfermedades psíquicas tan importantes como la depresión, el trastorno bipolar, la esquizofrenia o el autismo. Para comprender las bases genéticas de estas enfermedades, el estudio de cómo se genera una neurona serotoninérgica madura funcional es esencial. A nivel molecular, las neuronas serotoninérgicas maduras de cualquier organismo se caracterizan por la expresión coordinada de una batería de genes filogenéticamente conservados, conocidos como genes de la vía de la serotonina. Estos genes codifican para enzimas y transportadores implicados en la síntesis, liberación y recaptación del neurotransmisor serotonina. Los genes de la vía de la serotonina confieren a las neuronas serotoninérgicas su identidad, por lo que conocer cómo se activa su expresión durante el desarrollo nos ayudará a comprender los mecanismos implicados en el proceso de diferenciación de las mismas. Dado que estos genes se encuentran conservados filogenéticamente, este trabajo propone el uso del modelo *C. elegans* para su estudio. El sistema serotoninérgico de este nematodo está formado por 3 subtipos neuronales (NSM, ADF y HSN), diferentes anatómicamente y funcionalmente. En el presente trabajo, nos hemos centrado en el estudio de la diferenciación terminal de la neurona neurosecretora ADF. Previamente al inicio del trabajo, mediante estudios *in vivo* en *C. elegans* realizados en el laboratorio, se determinaron las regiones reguladoras mínimas involucradas en la activación transcripcional de los genes de la vía de la serotonina (*tph-1*, *cat-1*, *cat-4*, *bas-1* y *mod-5*) en las neuronas ADF, y tras realizar análisis bioinformáticos, experimentos preliminares de mutagénesis dirigida y ARN de interferencia, los datos sugirieron que proteínas de la familia CSL (CBF1 en humanos, Su(H) en *Drosophila melanogaster* y LAG-1 en *C. elegans*) y el factor HLH-14 podrían estar implicados en la activación de los genes de la vía de la serotonina en las neuronas ADF. El objetivo principal de este trabajo ha sido el analizar el papel de LAG-1 y de su posible cofactor HLH-14 en la regulación directa de los genes de la vía de la serotonina en las neuronas ADF en *C. elegans*. Con este fin, en primer lugar, se confirmó la expresión del factor de transcripción LAG-1 en la neurona ADF mediante el empleo de una cepa reportera para el gen. En segundo lugar, para demostrar la regulación directa de los genes de la vía de la serotonina a través de LAG-1 y/o miembros de la familia HLH, se generaron cepas reporteras de las secuencias reguladoras de los genes de la vía de la serotonina portando mutaciones puntuales en los sitios de unión CSL (LAG-1) y E-box (sitios de unión para los factores HLH). Finalmente, se analizó la expresión de los genes de la vía de la serotonina en cepas mutantes para el gen *lag-1*. Los resultados obtenidos en los distintos experimentos sugieren que LAG-1 y su posible cofactor HLH-14 son necesarios en la activación de los genes de la vía de la serotonina en ADF y en consecuencia, en el proceso de diferenciación de las neuronas ADF en *C. elegans*.

Palabras clave: *C. elegans*, diferenciación, neuronas serotoninérgicas, ADF, LAG-1, HLH

Abstract

Neurons that synthesize the serotonin neurotransmitter are known as serotonergic neurons. Serotonin has essential functions such as regulation of sleep, appetite or mood. Due to its key functions, deregulation of serotonin signaling might underlie psychiatric disorders such as depression, bipolar disorder, schizophrenia or autism. Serotonergic neurons from any organism are characterized by the coordinated expression of a battery of phylogenetically conserved genes, known as serotonergic pathway genes. These genes code for enzymes and transporters that are involved in the synthesis, release, recycling and degradation of the serotonin neurotransmitter. The serotonin pathway genes define the serotonergic neuron's identity. Thus, knowing how the expression of these genes is activated during development will help understand the mechanisms involved in the differentiation of these neurons. Thanks to the phylogenetic conservation of these genes, we propose to use the simple organism *C. elegans* for the study. The serotonergic system of this nematode is composed of three neuron subtypes (NSM, HSN, ADF), which are anatomically and functionally different. In this project, we have studied the differentiation process of the neurosecretory neurons ADF. Before the beginning of this project, *in vivo* studies in *C. elegans* allowed to identify the minimal regulatory regions that activated the expression of the serotonin pathway genes (*tph-1*, *bas-1*, *cat-1*, *cat-4* and *mod-5*) in the ADF neurons and after performing bioinformatics analysis, directed mutagenesis and interference RNA experiments, the results suggested that proteins from the CSL family ((CBF1 in humans, Su(H) in *Drosophila melanogaster* and LAG-1 in *C. elegans*) and the HLH-14 factor could be involved in the activation of the serotonin pathway genes in the ADF neurons. The main objective of this project was to analyze the role of LAG-1 and its possible co-factor HLH-14 in the direct regulation of the serotonin pathway genes in the ADF neurons in *C. elegans*. With this aim, firstly, LAG-1 expression in the ADF neurons was analyzed using a reporter of the gene. Secondly, to demonstrate the direct regulation of the serotonin pathway genes by LAG-1 and/or factors from the HLH family, we generated reporters including point mutations in CSL sites and E-boxes (binding sites for HLH factors) in the minimal regulatory regions of the serotonin pathway genes for the ADF neuron. Finally, the expression of the serotonin pathway genes was analyzed in mutants for the *lag-1* gene. The results obtained in the different experiments suggest that LAG-1 and its cofactor HLH-14 are required for the activation of the serotonin pathway genes in ADF and in consequence, in the terminal differentiation of this neuron in *C. elegans*.

Key words: *C. elegans*, differentiation, serotonergic neurons, ADF, LAG-1, HLH

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 <i>Caenorhabditis elegans</i> como organismo modelo	1
1.2 El sistema nervioso de <i>C. elegans</i>	3
1.2.1 Generalidades del sistema nervioso de <i>C. elegans</i>	3
1.2.2 Diferenciación neuronal	4
1.2.3 El sistema serotoninérgico de <i>C. elegans</i>	4
1.2.1 Las neuronas ADF	6
1.3 El factor de transcripción LAG-1	7
1.3.1 Mecanismos de acción de LAG-1	7
a. LAG-1 como efector en la ruta Notch	7
b. Función de LAG-1 independiente a la ruta Notch.....	8
1.4 Evidencias previas del papel de LAG-1 y los factores HLH en la diferenciación de las neuronas ADF	8
1. OBJETIVOS	9
3. MATERIALES Y MÉTODOS	10
3.1 Cepas de <i>C. elegans</i> empleadas	10
3.2 Cultivo y mantenimiento de cepas	12
3.2.1 Cultivo de cepas.....	12
3.2.2 Mantenimiento de cepas.....	12
3.2.3 Descontaminación de cepas	12
3.2.4 Congelación de cepas	13
3.2.5 Descongelación de cepas.....	13
3.3 Generación de reporteros de <i>C. elegans</i>	13
3.3.1 Generalidades	13
3.3.2 Generación de cepas transgénicas para el estudio de la regulación en <i>cis</i> de los genes de la vía de la serotonina	14
3.3.2.1 Mutagénesis dirigida	15
a. PCR	15
b. Digestión del plásmido parental	16
c. Transformación en bacterias	16
3.3.2.2 Selección de bacterias transformadas	16
3.3.2.3 Extracción de DNA plasmídico	16
3.3.2.4 Secuenciación	16
3.3.2.5 Microinyección	17
3.4 Generación de cepas mediante cruces genéticos	17
3.4.1 Factores a considerar cuando se realiza un cruce	18
3.4.2 Cruce para evaluar la expresión de LAG-1 en ADF	18
a. Descripción de cepas	18
b. Diseño y procedimiento.....	19
3.4.3 Cruces de cepas reporteras con mutantes de LAG-1	19
a. Descripción de cepas	19
b. Diseño y procedimiento.....	20
3.5 Genotipado	23
3.5.1 Extracción de DNA genómico	23

3.5.2 PCR	23
3.5.3 Electroforesis en gel de agarosa	23
3.5.4 Purificación y cuantificación de productos de PCR	24
3.5.5 Secuenciación y análisis de secuencias.....	24
3.6 Recuentos de reporteros mediante técnicas de microscopía	25
3.6.1 Recuentos de reporteros con sitios de unión CSL y E-box mutados.....	25
3.6.2 Recuentos de mutantes para <i>lag-1</i>	25
3.7 Tratamiento estadístico de los datos: Test exacto de Fisher	26
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	28
4.1 Evaluación de la expresión de LAG-1 en las neuronas ADF	28
4.2 Estudio <i>in vivo</i> del papel de los sitios de unión de LAG-1 (CSL) y el posible cofactor HLH-14 (E-box) en las regiones reguladoras de los genes de la vía de la serotonina en <i>C. elegans</i>	29
4.3 Estudio <i>in vivo</i> de la expresión de los genes de la vía de la serotonina en mutantes para el gen <i>lag-1</i>	32
5. CONCLUSIÓN	35
6. BIBLIOGRAFÍA	36
7. ANEXOS	1

ÍNDICE de Tablas y figuras

Figuras

- Figura 1- Ciclo de vida de *C. elegans*.
- Figura 2- Diferencias anatómicas entre sexos.
- Figura 3- Organización del sistema nervioso de *C. elegans*.
- Figura 4- Genes de la vía de la serotonina.
- Figura 5- Neuronas serotoninérgicas de la cabeza.
- Figura 6- Neuronas ADF.
- Figura 7- La ruta Notch en *C. elegans*.
- Figura 8- Plásmido pPD95_75.
- Figura 9- Fenotipo *roller*.
- Figura 10- Hermafrodita en estadio L4.
- Figura 11- Diseño del cruce del reportero de *lag-1* (NFB922) con el reportero de *tph-1* (NFB297).
- Figura 12- Fenotipo *dumpy*.
- Figura 13- Diseño del cruce del reportero extracromosómico de *bas-1* (OH4196) con el mutante EL301.
- Figura 14- Diseño del cruce de reporteros integrados con el mutante EL301.
- Figura 15- Diseño del cruce de reporteros integrados con el mutante JK1227.
- Figura 16- Cromatogramas de líneas salvaje y mutantes en homocigosis y en heterocigosis.
- Figura 17- Fenotipo de mutantes para *lag-1*.
- Figura 18- Evaluación al microscopio de la expresión de LAG-1 en las ADF.
- Figura 19- Resultados de los recuentos en reporteros de *tph-1* mutados en su región promotora mínima.
- Figura 20- Resultados de los recuentos en reporteros de *bas-1* mutados en su región promotora mínima.
- Figura 21- Resultados de los recuentos en reporteros de *cat-1* mutados en sus región promotora mínima.

Figura 22- Resultados de los recuentos en reporteros de *cat-4* mutados en sus región promotora mínima.

Figura 23- Resultados de los recuentos en reporteros de *mod-5* mutados en su región promotora mínima.

Figura 24- Expresión del reportero de *tph-1* salvaje y mutante (*lag-1(om13)*).

Figura 25- Expresión del reportero de *bas-1* salvaje y mutante (*lag-1(om13)*).

Figura 26- Expresión de los reportero de *cat-4* salvajes y mutantes para *lag-1* (*lag-1om(13)* y *lag-1(q385)*).

Figura 27- Expresión de los reporteros de *cat-1* salvajes y mutantes para *lag-1* (*lag-1om(13)*).

Tablas

Tabla 1- Cepas de *C. elegans* empleadas.

Tabla 2- Cebadores empleados en la mutagénesis dirigida.

Tabla 3- Parámetros de PCR empleados en la mutagénesis dirigida.

Tabla 4- Programa de PCR utilizado para la amplificación del gen *lag-1*.

Tabla 5- Modelo de tabla de contingencia 2 x 2.

ABREVIATURAS

CSL: CBF1, Su(H) y LAG-1

CBF1 (RBPJ): Proteína recombinante de unión supresora de la calvicie

Su(H): Supressor of hairless

DIC: Microscopía diferencial de contraste de interferencia

ARNi: Acido ribonucleico de interferencia

ADN: Acido desoxiribonucleico

HLH: Helix-loop-helix

PCR: Polimerase Chain Reaction

GLP-1: Glucagon-Like Peptide

E-box: Enhancer Box

NICD: Notch intracelular domain

GFP: Green fluorescent protein

DsRed: *Disocoma sp.* Red fluorescent protein

CGC: Cenorhabditis Genetic Center

F1: Primera generación filial

F2: Segunda generación filial

NGM: Nematode Growth Medium

L: Línea

Mut: Mutación

Pb: Pares de bases

UV: Ultravioleta

Prom: Promotor

FT: Factor de transcripción

1. INTRODUCCIÓN

1.1 *Caenorhabditis elegans* como organismo modelo

El biólogo sudafricano Sydney Brenner, en 1970, estableció el uso del nematodo *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) como organismo modelo en experimentación (Brenner, 1974). Desde entonces, gracias a sus características únicas y las ventajas que su uso confiere a nivel experimental, se ha convertido en un modelo ampliamente utilizado a nivel mundial en investigación, en ámbitos diversos entre los que destaca la biología y neurobiología del desarrollo. *C. elegans* es un organismo de vida libre (no parasítico) que pertenece a la familia Rhabditidae; es un nematodo transparente, de cuerpo cilíndrico y de tamaño muy pequeño (0.25 milímetros al nacer y 1 milímetro de largo en estadio adulto).

En la naturaleza, debido a que no requiere condiciones especiales para crecer, se encuentra ampliamente distribuido a nivel mundial, mayoritariamente en el suelo y en materia vegetal de regiones húmedas y templadas. En el laboratorio, *C. elegans* puede ser cultivado de manera muy eficiente en lo que se refiere al espacio que ocupa y sustratos que necesita. Es cultivado en placas Petri de agar pequeñas, sembradas con la bacteria *Escherichia Coli* (cepa OP50-1) que les sirve como alimento. Las placas, en las que crecerán un promedio de 10.000 gusanos, son mantenidas en incubadores a distintas temperaturas, normalmente a 15, 20 ó 25°C. La temperatura de cultivo dependerá de las características de las cepas concretas, siendo 20°C la temperatura óptima en la mayoría de los casos. En función de la temperatura de cultivo, la velocidad del ciclo de vida de los nematodos es distinta. A mayor temperatura, el crecimiento es más rápido (un aumento de 10°C dobla su tasa de crecimiento). Disminuir la temperatura reducirá la velocidad del ciclo de vida de los nematodos, de forma que mantenerlos a 15°C, permitirá mantenerlos vivos durante periodos de tiempo más largos (de hasta 6 meses). A la hora de mantener cepas periodos más largos, éstas pueden ser congeladas. La congelación permite mantener cepas inalteradas durante años y revivirlas cuando sean de nuevo requeridas para su uso.

El ciclo de vida de *C. elegans*, a 25°C y en condiciones óptimas de comida, es de aproximadamente 3 días (WORMBOOK, 2016). Una vez eclosiona el huevo, el ciclo de vida consta de cuatro estadios larvarios (L1-L2-L3-L4) tras los cuales el nematodo se convierte en adulto. Una vez alcanzado el estadio adulto, su vida suele alargarse de dos a tres semanas (*Figura 1*). El estadio L1 es un punto crítico en el desarrollo de los nematodos, puesto que en condiciones desfavorables puede producirse un arresto de su desarrollo o la activación de una ruta de desarrollo alternativa que les lleve a estado dauer. El gusano adquiere en este estado unas características morfológicas y de comportamiento distintas de aquellas en larvas en condiciones ambientales favorables que les permite resistir al estrés y sobrevivir durante meses en condiciones adversas (Cassada y Russell, 1975).

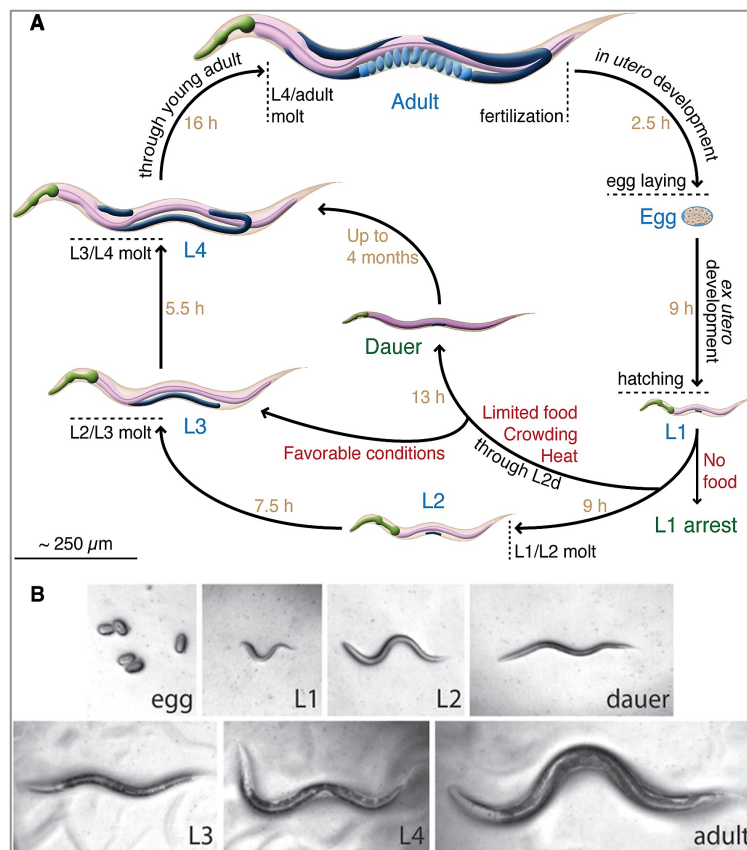


Figura 1- Ciclo de vida de *C. elegans*. A. Representación esquemática del ciclo de vida de *C. elegans*. B. imágenes representativas en contraste de fases interferencial (DIC) de todos los estadios de desarrollo desde el huevo a estadio adulto. (WORMATLAS, 2016)

C. elegans tiene cinco pares de autosomas y dos cromosomas sexuales. Posee la peculiaridad de que existe en dos formas sexuales: hermafroditas (XX) y machos (X0) (Figura 2). Las hermafroditas producen en sus gónadas tanto esperma como ovocitos y son capaces de autofecundarse. Por autofecundación, una única hermafrodita podrá dar una población de hasta 300 descendientes genéticamente idénticos al nematodo parental (población isogénica) que serán, prácticamente en su totalidad, hermafroditas. Únicamente podrá obtenerse un descendiente macho por autofecundación cuando ocurra un fallo en el proceso de disyunción meiótica del cromosoma X, lo cual ocurre de manera natural en una proporción baja (del 0.1-0.2%). Esta baja frecuencia de machos permite la introducción de diversidad genética en la población mediante cruces entre machos y hermafroditas. Es un proceso rápido, que durará de 3 a 4 días y que permitirá obtener una descendencia con genotipos específicos y con una proporción de machos del 50% (WORMBOOK, 2016).

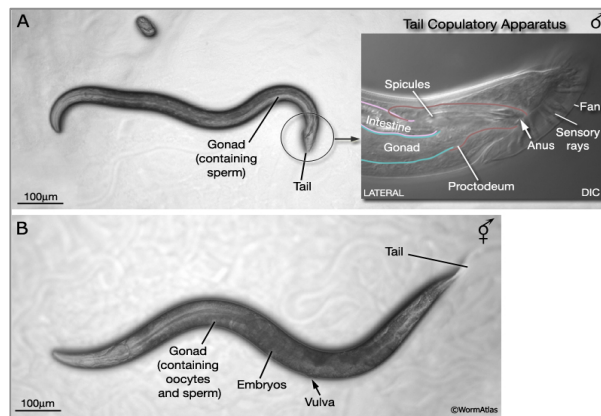


Figura 2- Diferencias anatómicas entre sexos. A. Imagen DIC del cuerpo completo un macho joven y de su cola en mayor detalle. B. Imagen de una hermafrodita adulta. (WORMATLAS, 2016).

A pesar de su sencillez, *C. elegans* posee multitud de tejidos. El más complejo es el nervioso, que se explicará en detalle en el siguiente apartado. Anatómicamente, este nematodo se encuentra constituido por una serie de tubos concéntricos. La capa más externa es la epidermis, que delimita la cavidad pseudocelómica, llena de fluido. Después se encuentran las bandas musculares y las cuerdas dorsales y ventrales, necesarias para el movimiento del gusano y para la innervación del músculo, respectivamente. Acogidos en el interior de la cavidad se encuentran los distintos sistemas que posee: el digestivo, el excretor y el reproductor (WORMATLAS, 2016).

Debido a la gran cantidad de estudios realizados empleando este nematodo como modelo, se tiene una gran cantidad de información del mismo, lo que simplifica notablemente su uso. Por ejemplo, se conoce el linaje completo de las 959 células somáticas que poseen las hermafroditas y las 1031 de los machos (Sulston et al., 1983). Además, *C. elegans* se encuentra muy bien caracterizado genéticamente. Curiosamente, fue el primer organismo multicelular cuyo genoma fue secuenciado de manera completa (*C. elegans* Sequencing Consortium, 1998). Éste posee aproximadamente 19.000 genes y presenta una gran similitud con el genoma humano (un 60-80% del total de los genes humanos tienen ortólogos en el genoma de *C. elegans*, que incluyen genes relacionados con la enfermedad del Alzheimer o la enfermedad de Parkinson entre otras (Markaki and Tavernarakis, 2010)), lo que lo convierte en un modelo muy válido para el estudio de procesos fisiológicos y patológicos humanos.

1.2 El sistema nervioso de *C. elegans*.

1.2.1 Generalidades del sistema nervioso de *C. elegans*.

C. elegans, aun siendo un organismo aparentemente sencillo, posee un sistema nervioso bastante complejo, que se encuentra anatómica y funcionalmente bien caracterizado. El sistema nervioso de *C. elegans* está compuesto por 118 neuronas morfológicamente distintas. Las hermafroditas tienen 302 neuronas y 56 células gliales y los machos presentan un total de 383 neuronas (Sulston and Horvitz 1977; White et al. 1986). El sistema nervioso se encuentra distribuido a lo largo del cuerpo del gusano, con los cuerpos celulares agrupados mayoritariamente en la cabeza, en la cuerda ventral y en la cola (Figura 3).

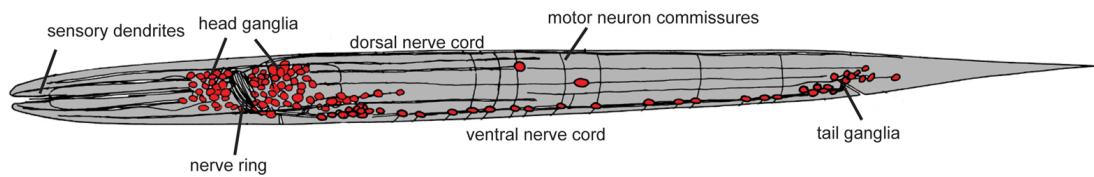


Figura 3- Organización del sistema nervioso de *C. elegans*. En rojo, se muestran los somas de las neuronas. El nematodo representado se encuentra en el primer estadio larvario y posee 222 neuronas. Durante el desarrollo larvario, algunas neuronas se adicionarán, alcanzando en el estadio adulto las 302 y 383 neuronas de hembras y machos respectivamente (White *et al.*, 1986).

Aunque las neuronas de este nematodo parezcan simples a nivel anatómico, la mayoría de las neuronas de *C. elegans* son multi-funcionales, y presentan sistemas de procesamiento de información muy sofisticados; En la transmisión de los impulsos nerviosos, sus neuronas son capaces de generar más de 7000 sinapsis químicas y co-expresar un gran número de moléculas neurotransmisoras, que coinciden en su mayoría con los neurotransmisores humanos más importantes (White *et al.*, 1986).

1.2.2 Diferenciación neuronal.

Se define como diferenciación neuronal al proceso por el cual un neuroblasto o neurona inmadura es capaz de convertirse en una neurona madura con identidad y funcionalidad propia. Las características morfológicas y funcionales de las neuronas individuales maduras son reflejo de la expresión de una batería de genes, que es única de cada tipo neuronal. Estos genes codifican para proteínas (canales iónicos, receptores, enzimas de biosíntesis de neurotransmisores, etc) que se expresan a lo largo de toda la vida de la neurona y que condicionan sus características terminales e identidad (Hobert *et al.*, 2010). Por tanto, para comprender cómo se generan los distintos tipos neuronales, será necesario estudiar los mecanismos por los cuales se produce la activación de la expresión de las baterías de genes específicas de cada tipo. Los factores de transcripción que, a través de su unión directa a módulos específicos de regulación en *cis*, son capaces de activar la expresión de estas baterías génicas se han denominado como selectores terminales. Estos selectores terminales pueden actuar a nivel individual co-regulando toda la batería de genes o, más posiblemente, en combinación con otros selectores terminales, constituyendo lo que se conoce como código de selectores terminales (Flames and Hobert, 2011).

1.2.3 El sistema serotoninérgico.

La serotonina es uno de los principales neurotransmisores del cerebro humano, que tiene además gran relevancia clínica. Controla comportamientos como el estado de ánimo, el apetito o el sueño. Debido a su función clave, alteraciones en la función normal del sistema serotoninérgico pueden causar enfermedades psíquicas tan importantes como la depresión, el trastorno bipolar, la esquizofrenia o el autismo (Brummelte *et al.*, 2016). Para comprender las bases genéticas que rigen estas enfermedades, será esencial estudiar los mecanismos de diferenciación por los cuales se genera una neurona serotoninérgica madura funcional.

A nivel molecular, las neuronas serotoninérgicas se caracterizan por la expresión de una batería de genes conocidos como genes de la vía de la serotonina, que codifican para enzimas y transportadores necesarios para la síntesis, liberación y recaptación del neurotransmisor (*Figura 4*). La expresión de esta batería de genes, como he comentado, determina las características terminales de las neuronas serotoninérgicas, con lo que para comprender cómo se genera una neurona serotoninérgica funcional

habrá que responder a la pregunta de cómo se produce la activación de los genes de la vía de la serotonina.

Las neuronas serotoninérgicas, por su importancia, se encuentran ampliamente conservadas en la evolución y lo mismo ocurre con los genes de la vía de la serotonina; existe un gen ortólogo en *C. elegans* para cada uno de los genes de la vía humanos (*Figura 4*). Esta conservación filogenética permite hacer uso del organismo sencillo *C. elegans* para el estudio de la diferenciación, lo cual simplifica en gran medida todos los procesos experimentales.

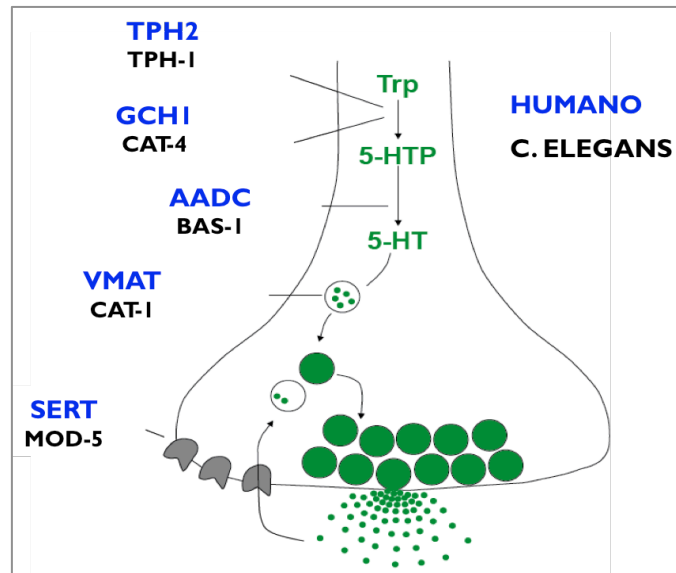


Figura 4- Genes de la vía de la serotonina. Representación esquemática de la sinapsis de una neurona serotonérgica madura. Se representa la síntesis, formación de vesículas, liberación y recaptación del neurotransmisor serotonina (verde). Los genes de la ruta de la serotonina en *C. elegans* se muestran en negro y sus ortólogos humanos en azul. Trp: Triptófano. 5- HTP: 5- Hidroxitriptófano. 5-HT: 5- Hidroxitriptamina (serotonina). TPH: Triptófano Hidroxilasa. GCH: GTP Ciclohidrolasa. AADC: Aminoácido Aromático Descarboxilasa. VMAT: Transportador Vesicular de Monoaminas. SERT: Transportador de serotonina dependiente de Na^[+] Cl^[-].

El sistema serotoninérgico de *C. elegans* está formado por 3 pares de neuronas bilaterales: NSM, ADF y HSN (*Figura 5*). Las neuronas NSM son neuronas motoras neurosecretoras, localizada en la faringe del gusano. Estas neuronas señalizan la presencia de comida en la faringe, provocando un aumento de la actividad de la faringe o la disminución de la locomoción (Avery and Thomas, 1997). Las HSN son neuronas motoras específicas de hermafroditas, localizadas cerca de la vulva. Se encargan de la innervación de los músculos de la vulva y la estimulación la puesta de huevos (WORMATLAS, 2016). Por último, las neuronas ADF son neuronas quimiosensoriales que se localizan en el ganglio lateral de la cabeza del gusano. Las neuronas ADF serán descritas en el subapartado 1.2.3.1.



Figura 5- Neuronas serotoninérgicas de *C. elegans*. **A.** Fotografía de la cabeza de un gusano adulto reportero de *cat-1* con expresión únicamente en las neuronas NSM. **B.** Fotografía de la cabeza de un gusano adulto reportero de *bas-1* con expresión únicamente en las neuronas ADF. **C.** Fotografía de la vulva de una hermafrodita adulta con un reportero de *tph-1* con expresión en las neuronas HSN.

Estos subtipos neuronales, aún siendo funcionalmente y anatómicamente diferentes, comparten la expresión de los genes de la vía de la serotonina. Sin embargo, en estudios realizados en este laboratorio en las neuronas NSM (Zhang F *et al.*, 2014) y HSN (Lloret-Fernandez *et al.* Manuscrito en preparación), se ha visto que los mecanismos que activan la expresión de los genes de la vía de la serotonina son distintos en ambos subtipos neuronales (la expresión de estos genes se encuentra regulada por combinaciones de selectores terminales distintos). A diferencia de las neuronas HSN y NSM, de las que se conocen los factores involucrados en el proceso de diferenciación terminal, se tiene poca información acerca de los mecanismos de activación génica que controlan la diferenciación de las neuronas ADF.

1.2.3.1 Las neuronas ADF

Las ADF son neuronas bilaterales, constituidas por un par de neuronas simétricas. Durante el desarrollo, se generan en la nariz del embrión y posteriormente, su cuerpo celular migra hasta su posición en el ganglio lateral de la cabeza del gusano (*Figura 6*). Son neuronas quimiosensoriales (en hermafroditas, son las únicas neuronas serotoninérgicas sensoriales) cuya función principal es la quimiotaxis. Presentan cilios sensoriales, que penetran la cutícula (capa más externa de la epidermis del gusano) para la detección de estímulos en el ambiente. *C. elegans* necesita la respuesta quimiotáctica para, por ejemplo, encontrar comida o para desarrollarse o cruzarse correctamente (WORMATLAS, 2016). Otra de las funciones de relevancia de las ADF es el control de la entrada a estado dauer, que como se ha comentado en la introducción, es un estado de desarrollo al que entran las larvas L1 cuando se encuentran en condiciones adversas y que les permite sobrevivir.

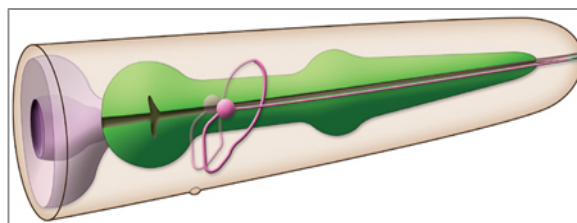


Figura 6- Neuronas ADF. Representación esquemática de las neuronas ADF en la cabeza del gusano (WORMATLAS, 2016).

1.3 El factor de transcripción LAG-1

El factor LAG-1 es el único miembro de la familia de proteínas CSL en *C. elegans*. La familia CSL es una familia muy conservada en metazoos, constituida por los siguientes factores de unión ortólogos: CBF1 en humanos, Su(H) en *Drosophila melanogaster* y LAG-1 en *C. elegans*. LAG-1 es un factor de transcripción que tiene un papel clave en la especificación celular durante el desarrollo. Por ello, mutaciones de este gen derivan en defectos del desarrollo normal, por ejemplo, arresto en el estado larvario más temprano (L1), defectos en las células excretoras, defectos en la diferenciación del músculo intestinal o fallos en la proliferación de la línea germinal (Lambie y Kimble, 1991). El estudio de los sitios de unión consenso de la familia CSL (YGTGGGAA, CAYRMK, TCTGG) presentes en las regiones reguladoras en *cis* en genes diana sugieren que las funciones de los factores de esta familia requieren de combinaciones específicas de elementos de control del DNA, lo que lleva a pensar que actúan en colaboración con cofactores en la regulación génica. Se han identificado, por ejemplo, motivos de unión E-box (CANNTG) separados 15-22 nucleótidos de los sitios de unión CSL en las regiones promotoras de genes diana en *Drosophila melanogaster* (Bailey and Posakony, 1995), lo que ha llevado a pensar que factores de la familia bHLH (factores con estructuras hélice-bucle-hélice que se unen a los sitios E-box) pueden tener un papel como cofactores de las proteínas CSL en la activación génica.

1.3.1 Mecanismos de acción de LAG-1

a. LAG-1 como efector de la ruta Notch

La ruta Notch es una ruta conservada evolutivamente que controla programas de proliferación, apoptosis o diferenciación celular. Tiene un papel clave en el desarrollo, por ejemplo, del sistema nervioso o del sistema hematopoiético (Kopan. R *et al*, 2009). En *C. elegans*, ésta ruta se encuentra mediada por los receptores LIN-12 y GLP-1 y el efector principal responsable de la activación de genes diana es el factor LAG-1 (Lambie and Kimble, 1991). En ausencia de señalización Notch, LAG-1 actúa reprimiendo la transcripción de los genes (*Figura 7*) (Pursglove and Mackay, 2005). Cuando la ruta se activa, tiene lugar la escisión proteolítica de parte del dominio intracelular (NICD) de los receptores, que viaja al núcleo e interacciona con LAG-1 formando un complejo que se une al DNA (a través de sitios de unión CSL) y activa la expresión de genes diana (*Figura 7*) (Greenwald and Howard, 2005).

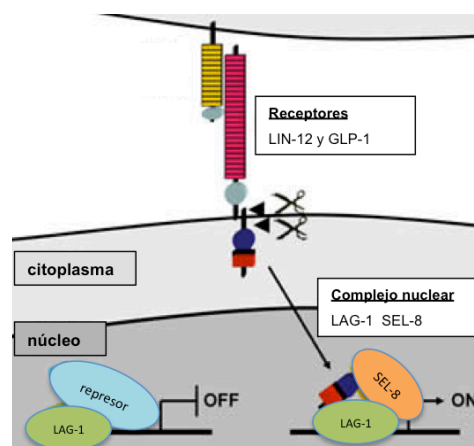


Figura 7- La ruta Notch en C. elegans. Representación esquemática de la ruta Notch. Se indican los receptores principales y los factores que forman el complejo de transcripción activo en *C. elegans*.

b. Función de LAG-1 Independiente de la ruta Notch

Publicaciones recientes sugieren que el mecanismo de acción por el que actúa el factor LAG-1 no es únicamente dependiente de la ruta Notch. Se ha visto que LAG-1 es capaz de regular la activación génica independientemente de la señalización por Notch, mediante la formación complejos transcripcionales distintos a los que actúan en la ruta de señalización (Johnson and Macdonald, 2011). Estos estudios sugieren, además, que la regulación de LAG-1 no es de manera absoluta independiente o dependiente a Notch. Es decir, que la activación de la expresión de un determinado gen por parte de LAG-1 puede ser dependiente de la ruta Notch en algunas células e independiente en otras. (Johnson and MacDonald, 2011).

1.4 Evidencias previas del papel de LAG-1 y los factores HLH en la diferenciación de las neuronas ADF

El presente trabajo se enmarca dentro de un proyecto más amplio cuyo objetivo consiste en determinar los factores de transcripción implicados en la regulación terminal de la diferenciación de las neuronas serotoninérgicas ADF, llevado a cabo por la doctora Miren Maicas. Previamente a este trabajo, Miren determinó las regiones mínimas reguladoras para los genes de la vía de la serotonina (*tph-1*, *cat-1*, *cat-4*, *bas-1*, *mod-5*) en la neurona ADF. A través de estudios bioinformáticos y mutagénesis dirigida en el promotor mínimo más pequeño determinado para el gen *tph-1* (*tph1prom17::gfp*, 100 pb), se encontraron sitios de unión funcionales para la familia CSL. Ampliando el estudio al resto de genes de la vía de la serotonina, se observaron sitios funcionales en todos ellos. Además, en el laboratorio se realizaron ensayos de silenciamiento por ARN de interferencia y se observó que al silenciar LAG-1, quedaba reducida significativamente la expresión de dos de los genes reporteros de la vía de la serotonina en las ADF: *tph-1::gfp* y *cat-1::gfp*. Los resultados obtenidos sugerían que LAG-1 tiene un papel en la diferenciación de las neuronas ADF en *C. elegans*.

Por otro lado, dentro del mismo proyecto, en el laboratorio se está haciendo un cribado de ARN de interferencia frente a todos los factores de transcripción de *C. elegans* para obtener candidatos a estar implicados en la regulación directa de los genes de la vía de la serotonina en la diferenciación de las neuronas serotoninérgicas. Gracias a este cribado se observó que al disminuir la expresión del factor de transcripción HLH-14, miembro de la familia de FT bHLH, se obtuvo una disminución en la expresión del reportero *tph-1::gfp*. Este dato sugiere que HLH-14 pudiera estar actuando como cofactor de LAG-1 en el proceso de diferenciación de la neurona ADF. El análisis bioinformático de los promotores mínimos de los genes de la vía de la serotonina revelaron que existían varios sitios E-box (sitios de unión para factores bHLH) separados pocos nucleótidos de los sitios de unión CSL, lo cual apoyaba la hipótesis de que factores de la familia de HLH podían estar actuando como cofactores en la regulación de sendos genes.

Tras las evidencias observadas, el presente trabajo se propuso con el objetivo de determinar el papel de LAG-1 en la diferenciación terminal de las neuronas serotoninérgicas ADF en *C. elegans* y obtener nuevas evidencias acerca de su posible colaboración con algún miembro de la familia bHLH en este proceso.

2. OBJETIVOS

El objetivo global de este trabajo es el estudio del papel del factor de transcripción LAG-1 y de su posible co-factor HLH-14 en el proceso de diferenciación terminal de las neuronas ADF en *C. elegans*. Para su consecución se definieron los siguientes 3 objetivos más concretos:

a. Evaluar la expresión de LAG-1 en las neuronas ADF.

El factor de transcripción LAG-1 se expresa en muchas células de *C. elegans* y no se ha descrito específicamente su expresión en ADF por lo que en el primer objetivo se propuso comprobar la expresión de LAG-1 en las neuronas ADF. Para ello, se generó una cepa que contenía reporteros con distinto marcaje fluorescente para los genes *lag-1* y *tph-1*. Este último, se expresa específicamente en neuronas serotoninérgicas, por lo que permite diferenciar las neuronas ADF y mediante co-localización determinar la expresión de LAG-1 en dichas neuronas.

b. Estudiar mediante análisis *in vivo* el papel de los sitios de unión de LAG-1 (CSL) y el posible cofactor HLH-14 (E-box) en las regiones reguladoras de los genes de la vía de la serotonina en *C. elegans*.

Para determinar si la regulación de la expresión de los genes de la vía de la serotonina por los factores de transcripción LAG-1 y HLH-14 era directa, se mutaron mediante mutagénesis dirigida los sitios de unión CSL y E-box en las regiones reguladoras mínimas de dichos genes y se generaron cepas transgénicas para su consiguiente análisis al microscopio de fluorescencia.

c. Estudiar mediante análisis *in vivo* cepas mutantes para el gen *lag-1* en reporteros de los genes de la vía de la serotonina en *C. elegans*.

Para estudiar el papel de LAG-1 en la regulación de los genes de la vía de la serotonina se emplearon cepas mutantes para *lag-1* que se cruzaron con reporteros para los genes de la vía de la serotonina. Las distintas cepas generadas fueron después analizadas al microscopio de fluorescencia, comparando el porcentaje de expresión de ADF con los reporteros salvajes.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Cepas de *C. elegans* empleadas

Todas las cepas empleadas en el trabajo quedan recogidas en la *Tabla 1*. Durante el trabajo se utilizaron cepas de *C. elegans* transgénicas con reporteros para los genes de la vía de la serotonina y cepas mutantes para el gen *lag-1*. La columna “Generación” indica la parte o partes del procedimiento de la generación de cepas en las que he participado. Las cepas mutantes (EL301 y JK122) se obtuvieron a partir de la CGC (Caenorhabditis Genetic Center), un repositorio público de cepas de *C. elegans* de la Universidad de Minnesota que pone a disposición de los investigadores las cepas que soliciten. La secuencia genética completa salvaje y mutante del locus de *lag-1* de ambas cepas EL301 y JK1227 y las secuencias promotoras mínimas de los distintos genes de la vía de la serotonina empleadas en la generación de reporteros quedan recogidas en el Anexo II.

Tabla 1- Cepas de C. elegans empleadas.

Nombre	Genotipo	Mutación	Generación
NFB 291 L1	<i>vlcEx149(cat-1prom14::gfp (50ng/ul),rol-6)</i>	Salvaje	Microinyectada durante el trabajo
NFB 292 L2	<i>vlcEx150(cat-1prom14::gfp (50ng/ul),rol-6)</i>		
NFB 503 L3	<i>vlcEx279(cat-1prom14::gfp (50ng/ul),rol-6)</i>		
NFB 740 L1	<i>vlcEx398(cat-1prom80::gfp (50ng/ul),rol-6)</i>	CSL	Generada previamente en el laboratorio
NFB 741 L2	<i>vlcEx399(cat-1prom80::gfp (50ng/ul),rol-6)</i>		
NFB 1206 L3	<i>vlcEx701(cat-1prom80::gfp (50ng/ul), rol-6)</i>	CSL	Mutagenizada y Microinyectada durante el trabajo
NFB 244 L1	<i>vlcEx119(cat-1prom37::gfp (50ng/ul),rol-6)</i>	Salvaje	Microinyectada durante el trabajo
NFB 245 L2	<i>vlcEx120(cat-1prom37::gfp (50ng/ul),rol-6)</i>		
NFB 246 L3	<i>vlcEx121(cat-1prom37::gfp (50ng/ul),rol-6)</i>		
NFB 737 L1	<i>vlcEx395(cat-1prom81::gfp (50ng/ul),rol-6)</i>	E-box	Generada previamente en el laboratorio
NFB 739 L2zz	<i>vlcEx397(cat-1prom81::gfp (50ng/ul),rol-6)</i>		
NFB 1322 L1	<i>vlcEx784(cat-1prom90::gfp (50ng/ul),rol-6)</i>	2 E-boxes	Mutagenizada y Microinyectada durante el trabajo
NFB 1323 L2	<i>vlcEx785(cat-1prom90::gfp (50ng/ul),rol-6)</i>		
L3	<i>cat-1prom90::gfp (50ng/ul),rol-6</i>		
OH8246	<i>otIs221[cat-1::gfp]III</i>	Salvaje	Generada previamente en el laboratorio
NFB 1330	<i>otIs221[cat-1::gfp]III; lag-1(om13) IV</i>	LAG-1	Generada por cruce genético durante el trabajo
NFB 1193	<i>otIs221[cat-1::gfp]III; lag-1(q385)/dpy-13(e184) unc-24(e138) IV</i>	LAG-1	Generada por cruce genético durante el trabajo
NFB 305 L1	<i>vlcEx159(cat-4prom6::gfp (50ng/ul),rol-6)</i>	Salvaje	Microinyectada durante el trabajo
OH 7500 L2	<i>otEx3297cat-4prom6::gfp; rol-6</i>		
NFB 1101 L1	<i>vlcEx607(cat-4prom71::gfp (50ng/ul),rol-6)</i>	CSL	Microinyectada durante el trabajo
NFB 1102 L2	<i>vlcEx608(cat-4prom71::gfp (50ng/ul),rol-6)</i>		
L3			
NFB 1320 L1	<i>vlcEx782(cat-4prom73::gfp (50ng/ul),rol-6)</i>	E-box	Mutagenizada y Microinyectada durante el trabajo
L3	<i>cat-4prom73::gfp (50ng/ul),rol-6)</i>		

NFB1321 L2	<i>vlcEx783(cat-4prom73::gfp (50ng/ul),rol-6)</i>		
OH 8250	<i>otIs255[cat-4::gfp]II</i>	Salvaje	Generada previamente en el laboratorio
NFB 1332	<i>otIs255[cat-4::gfp]II; lag-1(om13) IV</i>	LAG-1	Generada por cruce genético durante el trabajo
NFB 1205	<i>otIs255[cat-4::gfp]II; lag-1(q385)/dpy-13(e184) unc-24(e138) IV</i>	LAG-1	Generada por cruce genético durante el trabajo
NFB 638 L1	<i>vlcEx346(mod-5prom8::gfp (50ng/ul),rol-6)</i>	Salvaje	Generada previamente en el laboratorio
NFB 639 L2	<i>vlcEx347(mod-5prom8::gfp (50ng/ul),rol-6)</i>		
L3	<i>mod-5prom8::gfp (50ng/ul),rol-6</i>		
NFB 709 L1	<i>vlcEx380(mod-5prom10::gfp (50ng/ul),rol-6)</i>	CSL	Microinyectada durante el trabajo
NFB 710 L2	<i>vlcEx381(mod-5prom10::gfp (50ng/ul),rol-6)</i>		
NFB 1207	<i>vlcEx702(mod-5prom10::gfp (50ng/ul), rol-6)</i>		
NFB 1094 L1	<i>vlcEx603(mod-5prom11::gfp (50ng/ul),rol-6)</i>	E-box	Microinyectada durante el trabajo
NFB 1095 L2	<i>vlcEx604(mod-5prom11::gfp (50ng/ul),rol-6)</i>		
L3	<i>mod-5prom11::gfp (50ng/ul),rol-6</i>		
NFB 1096 L1	<i>vlcEx605(mod-5prom12::gfp (50ng/ul),rol-6)</i>	E-box	Microinyectada durante el trabajo
NFB 1097 L2	<i>vlcEx606(mod-5prom12::gfp (50ng/ul),rol-6)</i>		
L3	<i>mod-5prom12::gfp (50ng/ul),rol-6</i>		
NFB 1203 L1	<i>vlcEx699(mod-5prom14::gfp (50ng/ul), rol-6)</i>	2 E-boxes	Mutagenizada y Microinyectada durante el trabajo
NFB 1204 L2	<i>vlcEx700(mod-5prom14::gfp (50ng/ul), rol-6)</i>		
L3	<i>mod-5prom14::gfp (50ng/ul), rol-6</i>		
NFB 1208 L1	<i>vlcEx703(mod-5prom15::gfp (50ng/ul), rol-6)</i>	CSL + E-box	Mutagenizada y Microinyectada durante el trabajo
NFB 1209 L2	<i>vlcEx704(mod-5prom15::gfp (50ng/ul), rol-6)</i>		
L3	<i>mod-5prom15::gfp (50ng/ul), rol-6</i>		
NFB 1360 L1	<i>vlcEx807(Bas-1prom90::gfp(50ng/ul,rol-6))</i>	CSL	Mutagenizada y Microinyectada durante el trabajo
NFB 1361 L2	<i>vlcEx808(Bas-1prom90::gfp(50ng/ul,rol-6))</i>		
L3	<i>Bas-1prom90::gfp(50ng/ul,rol-6)</i>		
OH4196	<i>otex2435[bas-1prom1::gfp(50ng/ul),rol-6]</i>	Salvaje	Generada previamente en el laboratorio
NFB 1332	<i>lag-1(om13) IV; otex2435[bas-1prom1::gfp(50ng/ul),rol-6]</i>	LAG-1	Generada por cruce genético durante el trabajo
otIs517	<i>otIs517[tph-1::SL2::YFP::H2B], ttx-3::mcherry,rol-6]</i>	Salvaje	Generada previamente en el laboratorio
NFB 297	<i>him-5V; lin-15B(n765)X; vsIs97[tph-1p::Dsred2 + lin-15 (+)]</i>	Salvaje	Generada previamente en el laboratorio
NFB 1340	<i>otIs517[tph-1::SL2::YFP::H2B], ttx-3::mcherry,rol-6]; lag-1(om13) IV</i>	LAG-1	Generada por cruce genético durante el trabajo
NFB 1111	<i>lin-15B(n765)X; vsIs97[tph-1p::Dsred2 + lin-15 (+)]; vlcEx496(lag-1fos::gfp(40ng/ul); ttx-3::mcherry(50ng/ul);rol-6(50ng/ul)]</i>	Salvaje (reportero de <i>lag-1</i> y <i>tph-1</i>)	Generada durante el trabajo por cruce genético
JK1227	<i>lag-1(q385)/dpy-13(e184) unc-24(e138) IV</i>	Mutante de <i>lag-1</i>	Obtenido de la CGC
EL301	<i>Lag-1(om13) IV</i>	Mutante de	Obtenido de la CGC
NFB 922	<i>vlcEx496(lag-1fos::gfp(40ng/ul); ttx-3::mcherry(50ng/ul);rol-6(50ng/ul)]</i>	Salvaje (reportero <i>lag-1</i>)	Generada previamente en el laboratorio

Las cepas correspondientes a distintos genes de la vía de la serotonina se muestran con colores distintos. Los mutantes y reporteros de *lag-1* se muestran en gris.

3.2 Cultivo y mantenimiento de las cepas

3.2.1 Cultivo de cepas

Para el cultivo de *C. elegans* se empleó el método descrito por Sydney Brenner (Brenner, 1974). Los nematodos se cultivaron en placas Petri con medio NGM (Nematode Growth Medium) y sembradas con *Escherichia coli* (*E.coli*) (cepa OP50-1), que constituye la fuente de comida de los nematodos. La cepa OP50-1 es auxótrofa para el uracilo, es decir, incapaz de sintetizarlo. Se emplea para el cultivo de *C. elegans* debido a que, al tener el crecimiento limitado por su auxotrofia, permite una mejor visualización de los gusanos en las placas. La composición del medio NGM y los protocolos de preparación (Protocolo 1) y siembra (Protocolo 2) de las placas, quedan recogidos en el Anexo I.

3.2.2 Mantenimiento de las cepas

Para la visualización y mantenimiento rutinario de *C. elegans* se utilizó una lupa binocular (modelo MZ6L2, Leica). Las cepas se mantuvieron en incubadores a distintas temperaturas (15, 20 ó 25°C). La temperatura de incubación de cada cepa se eligió en función de sus necesidades concretas y del uso que se le iba a dar. Por ejemplo, para la mayor parte de los recuentos, los gusanos se mantuvieron a 25°C. Las cepas empleadas en los cruces genéticos, en cambio, se mantuvieron a 20°C ya que al reducir en algunos grados la temperatura, el desarrollarlo de los gusanos es más lento y aumenta la probabilidad de éxito del cruce. La cepa mutante para *lag-1* EL301 (*lag-1(om13)IV*) fue mantenida a 15 °C ya que una cepa que presenta un alelo hipomorfo sensible a la temperatura. El otro mutante empleado, JK1227 (*lag-1(q385)/dpy-13(e184) unc-24(e138) IV*), que presenta un alelo nulo en el que la temperatura no genera un efecto, se mantuvo a 25 °C.

Conforme se agotaba la comida en las placas, los gusanos se pasaban a placas Petri nuevas sembradas con *E. coli*. Este procedimiento se realizó de dos formas distintas, en función del tipo de cepa. Una gran parte de las cepas empleadas son reporteros que presentan el DNA exógeno incorporado extracromosómicamente. En estos casos, se utiliza el gen *rol-6* mutado como marcador de incorporación (apartado 3.3). Cuando los gusanos lo incorporan, presentan un fenotipo *roller*; un defecto en el movimiento que hace que giren sobre si mismos en lugar de avanzar progresivamente. Para mantener estas cepas, se seleccionaron de forma individual los gusanos con este fenotipo y se pasaron a placas Petri con comida, haciendo uso de un *pick* (instrumento que se utiliza para manipular los gusanos). Por otro lado, las cepas que no presentaban este marcador y que estaban constituidas por poblaciones homogéneas, se mantuvieron mediante la realización de *chunks*, es decir, la transferencia de un trozo de agar de una placa repleta de gusanos a una placa nueva con comida.

3.2.3 Descontaminación de placas de *C. elegans*

De forma ocasional, las placas de *C. elegans* se contaminaron con otras bacterias o levaduras. En estos casos, se limpiaron para evitar alteraciones en los experimentos. Además, también se descontaminaron, estuviesen o no contaminadas, todas las cepas que fuesen a ser congeladas para que los stocks congelados se mantuviesen limpios. El método de lavado que se empleó fue el siguiente: Se colocó una gota de la solución *drop bleach* (lejía, KOH y agua) en una placa nueva (sin tocar la comida). En esta gota se dispusieron gusanos hermafroditas con un gran número de huevos provenientes de la placa contaminada. Esta solución eliminaría todos los contaminantes y mataría a las hermafroditas, pero permitiría a los embriones sobrevivir debido a que poseen una capa externa (cutícula) que les protege de la solución. El Protocolo 3 del Anexo I recoge el procedimiento para la descontaminación en mayor detalle.

3.2.4 Congelación de cepas

Una de las grandes ventajas que presenta el organismo *C. elegans* es que puede ser congelado y mantenido de forma indefinida en nitrógeno líquido (-196 °C) (Brenner, 1974). Todas las cepas nuevas generadas durante el trabajo, junto con las descongeladas para su uso fueron congeladas para su mantenimiento y posteriores usos. Previamente a la congelación, las cepas se limpiaron mediante *drop bleach*, como he comentado previamente. Una vez descontaminadas, se pasó un número similar de gusanos a 4 o 5 placas nuevas para obtener un número elevado de gusanos a congelar. Una vez las placas presentaban un número elevado de gusanos L1-L2 y se encontraban sin comida se procedió a su congelación, ya que la tasa de supervivencia tras la congelación es mayor en estas condiciones. Por cepa, se congelaron dos criotubos y un eppendorf (que sirve como prueba para confirmar que la congelación ha funcionado correctamente). En el Protocolo 4 del Anexo I se explica en más detalle el procedimiento de la congelación y la composición de los reactivos empleados.

3.2.5 Descongelación de cepas

Para poder utilizar las cepas que con anterioridad se habían generado en el laboratorio, se procedió a su descongelación. Se descongelaron prioritariamente los eppendorfs y, en su defecto, los criotubos. El protocolo de descongelación se detalla en el Protocolo 5 del Anexo I.

3.3 Generación de reporteros de *C. elegans*

3.3.1 Generalidades

Los reporteros de *C. elegans* son cepas transgénicas que permiten el análisis de expresión génica *in vivo*. Presentan en forma de *array* extracromosómico o integrado en su genoma vectores con regiones promotoras de genes de interés fusionadas al gen *gfp*, que codifica la proteína fluorescente verde. La activación de la expresión del gen cuyo promotor se encuentra clonado derivará en la expresión de la proteína fluorescente, que tras ser excitada a través de un microscopio de fluorescencia a la longitud de onda a la que absorbe (picos de excitación a 475 nm y a 395 nm), emitirá en la zona verde del espectro (509 nm). En el laboratorio también se emplean otras proteínas fluorescentes como la proteína fluorescente roja Dsred.

Para la generación de reporteros transgénicos de *C. elegans*, en primer lugar se ha de clonar las regiones promotoras de interés en un vector. En el laboratorio se utiliza el plásmido pPD95_75 (Figura 8). En algunos casos también se utilizan fósmidos, que incluyen el locus completo del gen que se quiera estudiar fusionado en la región C terminal de la molécula *gfp* u otra. En nuestro caso, las construcciones reporteras se introdujeron en el gusano mediante la microinyección (apartado 3.3.2.5) incorporándose a las células de manera extracromosómica. Al no encontrarse integrada en el genoma, la construcción reportera no se transmite a la totalidad de la descendencia. Por ello, se requiere de un marcador que indique si el gusano posee o no el *array* extracromosómico. En el laboratorio se emplean, por un lado, marcadores de fluorescencia. Un ejemplo de marcador de fluorescencia empleado en el laboratorio son los reporteros del gen *ttx-3* que se expresa en las neuronas AIY (fácilmente distinguibles en el ganglio ventral de la cabeza de los gusanos). Por otro lado, también se emplea el gen *rol-6* mutado (*rol-6(su1006)*). El gen *rol-6* es uno de los más de 40 loci que afectan la morfología de *C. elegans*. Mutaciones en este gen producen fallos en el proceso de formación normal de colágeno y alteran el movimiento de los nematodos, generando un fenotipo *roller*. Como he comentado previamente, los gusanos con este fenotipo se moverán girando sobre sí mismos en lugar de avanzar progresivamente (Figura 9).

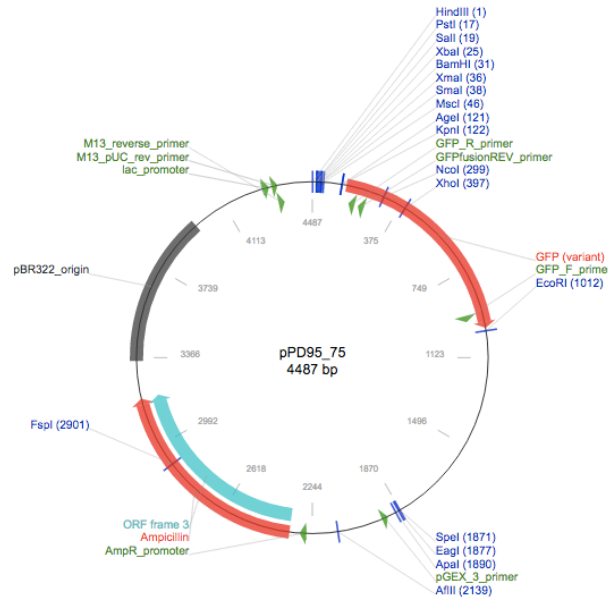


Figura 8- Plásmido pPD95_75. Representación esquemática del plásmido pPD95_75 empleado como vector. Presenta multitud de sitios de restricción seguidos del gen que codifica para la proteína GFP. También tiene incorporado un gen de resistencia a ampicilina. (WORMBASE,2016)

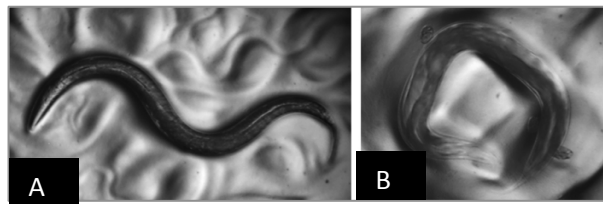


Figura 9- Fenotipo roller. A. Imagen DIC de un nematodo salvaje B. Imagen DIC de un namatodo con fenotipo roller. (WORMBOOK, 2016)

3.3.2 Generación de cepas transgénicas para el estudio de la regulación en *cis* de los genes de la vía de la serotonina

Como se ha comentado previamente, el análisis bioinformático de los sitios de unión de las regiones promotoras mínimas de los genes de la vía de la serotonina en ADF reveló la existencia de sitios de unión CSL (YGTGGGAA, CAYRMK, TCTGG) y sitios E-box (CANNTG) en las regiones promotoras de todos los genes de la vía de la serotonina. Con el objetivo de estudiar el papel de LAG-1 (CSL) y su posible cofactor HLH-14 (E-box) en la regulación directa de sendos genes, se generaron reporteros con los sitios de unión de interés mutados. El estudio de los sitios de unión de las regiones reguladoras mínimas lo inició Miren Maicas y durante mi trabajo, ha sido completado.

Los promotores mínimos de los genes de la vía de la serotonina habían sido previamente clonados en el plásmido pPD95_75 por Miren Maicas. Durante el trabajo, partiendo de las construcciones reporteras ya generadas como molde, se mutaron puntualmente los sitios de unión CSL y E-box presentes en las regiones reguladoras mínimas. Los sitios de unión se mutaron en algunos casos individualmente y en otros en combinación junto con otros sitios. Tras la mutagénesis, se confirmó la presencia de las mutaciones mediante secuenciación y se procedió a la microinyección de las construcciones con la finalidad de obtener líneas transgénicas reporteras con las que evaluar el efecto de las mutaciones en la expresión de los genes de la vía de la serotonina. A continuación, se va a proceder a la descripción de cada uno de los pasos en más detalle.

3.3.2.1 Mutagénesis dirigida

La mutagénesis dirigida es una técnica de biología molecular que se utiliza para generar mutaciones en sitios puntuales del DNA. El kit utilizado para mutar los sitios de unión de interés de las regiones promotoras fue QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit de Stratagene. La mutagénesis dirigida mediante el kit de Stratagene consta de tres pasos: Introducción de la mutación por PCR (a), digestión del plásmido parental (b) y transformación en bacterias competentes (c).

a. PCR

Para la realización de la PCR se diseñaron cebadores de entre 41-69 nucleótidos complementarios a las secuencias promotoras salvo en las posiciones a mutar (indicadas en mayúscula) (*Tabla 2*). Los cebadores empleados presentaban una temperatura de anillamiento de 77 °C en promedio. En la mayoría de constructos se indican dos cebadores directos y dos reversos ya que la mutagénesis se realizó en dos pasos distintos. Para la amplificación se empleó la ADN polimerasa *Pfu Turbo* y el programa de PCR recogido en la *Tabla 3*. Para más detalles, ver el Protocolo 6 del Anexo I.

Tabla 2- Cebadores empleados en la mutagénesis dirigida.

Cepas generadas	Directo	Reverso
<i>cat1prom90::gfp</i>	1.ctgagagaaaaatgaaaggaaaatCCCgagaa atgtgataacaaaactgagagtc 2.gaataagcagcaaggggTTcgAtttagattccc acggtct	1.gactctcagtttgttatcacatttctcGGGattttctt tcatttttctctcag 2.agaccgtgggaatctaaaTcgAACcccttgctcgctt attc
<i>cat1prom89::gfp</i>	1.gaataagcagcaaggggTTcgAtttagattccc acggtct 2.gcaaggggcacgtttagattcccTTTgtctgaaaa aattgattg	1.agaccgtgggaatctaaaTcgAACcccttgctcgctt attc 2.gcaaggggcacgtttagattcccTTTgtctgaaaa ttgattg
<i>cat4prom73::gfp</i>	1.ctttactgaatcatTCATCATTtTtTTCCGT TGTTACCCatccgccc 2.CCACCAAATTTTCaatgtttccctgCcgAA agaaaatgaaaatcaacg	1.gggcggaaatGGGTAACAACGGAAAaaAaAA TGATGAatgattcagtaaag 2.cgttgatatttcatatttctTTcgGcagggaaaaca ttGAAAAATTTGGTGG
<i>mod5prom14::gfp</i>	1.cccaaatcaatgaatattcccagcaAAtttccT TTTTTCACTTCAA 2.CCCCAAATAGATTCCCCATTGaaTAGA TGATTGTTCCATCTG	1.TTGAAGTGAAAAAAAggaaaaTTtgcgtggga atattcattgattggg 2.CAGATGGAACAATCATCTAttCAATGGGG GAATCTATTGGGG
<i>mod5prom15::gfp</i>	1.cccaaaaacctaaccnaaatcaatgaatattcTTa cgcaAAtttccTTTTTCACTTCAATATAACC 2.cctaaccnaaatcaatgaatattcTTacgcatgttt tccTTTTTCACTTC	1.GGTATATTGAAGTGAAAAAAAggaaaaTTt gcgtAgaatattcattgattgggttagttttgggg 2.GAAGTGAAAAAAAggaaaaacatcgctAgaat attcattgattgggttagg
<i>bas1prom90::gfp</i>	1.gtatcgaaatgtgctcggGGGccatagcgaat tatatttctatttctattt	1.aaataagaaaataagaatataatttgcctatggCC Cccgagcacatttccgatac

Tabla 3- Parámetros de PCR empleados en la mutagénesis dirigida.

Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	95 °C	30 segundos
12-18	95°C	30 segundos
	55°C	1 minuto
	68°C	1 minuto/Kb

b. Digestión del plásmido parental

Tras la amplificación, se digirió el plásmido parental (molde) para mantener únicamente el plásmido mutado. Para la degradación del plásmido parental se utilizó la endonucleasa *Dpn I* (secuencia diana: 5'- Gm⁶ATC-3'). La *Dpn I* es un enzima de restricción específica de ADN metilado y hemimetilado. El plásmido molde se encuentra metilado, ya que fue aislado de una cepa de *E. coli dam +*, es decir, con la enzima capaz de añadir grupos metilo al DNA (desoxiadenosina metilasa). El plásmido procedente de la amplificación, en cambio, no se encuentra metilado. Por tanto, la enzima *Dpn I* degradará específicamente el plásmido molde sin afectar a las copias del plásmido mutado (amplificado).

Para realizar la digestión del plásmido molde, se añadió 1µl de enzima *Dpn I* a cada reacción de PCR y se incubó dos horas en un baño a 37 °C.

c. Transformación en bacterias competentes XL-Blue

La transformación consiste en la introducción y expresión de ADN exógeno en bacterias. Las bacterias para la transformación fueron proporcionadas por el propio kit comercial (bacterias supercompetentes XL-Blue). La transformación se realizó con el objetivo de replicar el plásmido y de ligarlo, ya que tras la amplificación los plásmidos quedan abiertos.

Para transformar las bacterias se mezcló por cada mutagénesis 25 µl de bacterias XL-Blue con 1 µl de β-mercaptoetanol (aumenta la eficiencia de la transformación) y se dejó 10 minutos en hielo. Después, se añadió 1 µl del plásmido a transformar a cada tubo. La transformación tuvo lugar por choque térmico: se mantuvo 30 minutos en hielo, 30 segundos a 42 °C y por último dos minutos en hielo. Una vez finalizado el proceso, las bacterias transformadas se mantuvieron en medio LB a 37°C en agitación durante 1h.

3.3.2.2 Selección de bacterias transformadas

Una vez realizada la mutagénesis y transformación en las bacterias, se seleccionaron aquellas bacterias que hubiesen adquirido el plásmido. Para ello, se sembraron en placas con antibiótico (ampicilina) durante 16h. Únicamente bacterias transformadas eran capaces de crecer en presencia del antibiótico ya que el plásmido incorporado presentaba un gen de resistencia a ampicilina. Se picaron dos colonias aisladas y se crecieron en medio LB en agitación.

3.3.2.3 Extracción de DNA plasmídico

Para la extracción del DNA plasmídico de las bacterias, se empleó un kit Miniprep (Qiagen). En primer lugar, se lisaron las bacterias transformadas. Después, se procedió a lavar el lisado para eliminar los restos bacterianos y por último, se eluyó el DNA en varios pasos. El proceso de extracción de DNA queda recogido en mayor detalle en el Protocolo 7 del Anexo I.

3.3.2.4 Secuenciación

Para confirmar que la mutagénesis dirigida había incorporado las mutaciones deseadas en los sitios de unión, se hizo uso del servicio de secuenciación del Instituto de Biomedicina de Valencia. Las muestras para secuenciar se prepararon según lo estipulado por el servicio de secuenciación del centro: Por cada muestra a secuenciar, se dispuso individualmente en tubos eppendorf 6 µL de DNA (50 ng/ µL aproximadamente) y se preparó en otro tubo independiente 5 µL del cebador, a una concentración final de 3,2 µM. Los cebador empleados para la secuenciación es el otB125: TTGTGTGGAATTGTGAGCGG, que presenta una temperatura de anillamiento (Ta) de 50°C y un

porcentaje de Gs y Cs del 50%. Como resultado, se obtuvieron las secuencias junto con el cromatograma correspondiente. El análisis de secuencias se realizó con el software apE.

3.3.2.5 Microinyección

Los plásmidos mutados y amplificados en bacterias fueron posteriormente microinyectados con el objetivo de generar nuevas cepas transgénicas. La microinyección es un método sencillo para insertar DNA exógeno a los nematodos. Se realiza en la parte distal de las gónadas multinucleadas de hermafroditas de tipo salvaje. La eficiencia del proceso es máxima cuando la microinyección se realiza a los pocos días de que las hermafroditas alcancen el estadio adulto, cuando presentan una fila de oocitos en la parte distal proximal. Algunos de los núcleos en división son capaces de asimilar y replicar el DNA exógeno, generando un *array* extracromosómico que se mantiene durante la vida del gusano. Como resultado del proceso, se generan estirpes transgénicas con información genética distinta a la natural que permiten, por ejemplo, el estudio de la expresión génica *in vivo*. El proceso de microinyección de las cepas generadas durante el trabajo fue realizado por el técnico del laboratorio Benito Alarcón.

Los plásmidos a microinyectar se prepararon a una concentración de 50ng/ μ l y se mezclaron con el plásmido pFD4 a 100ng/ μ l, que contiene el gen *rol-6* mutado. Como he comentado previamente, el gen *rol-6* codifica para el colágeno y mutaciones en el mismo conllevan a defectos en el movimiento del gusano (fenotipo *roller*). Debido a que ambos plásmidos forman parte de un *array* extracromosómico, se transmiten juntos a la descendencia. En consecuencia, el fenotipo *roller* puede ser utilizado como marcador para distinguir los gusanos que hayan incorporado el *array* extracromosómico de los que no. Sin embargo, la incorporación del *array* por parte de un gusano no implica que vaya a ser capaz de transmitirlo a su descendencia ya que la herencia de *C. elegans* es considerablemente inestable. Para identificar aquellos gusanos con transmisión estable del *array*, se pasaron a placas independientes (se realizaron *singles*) todos los gusanos *rollers* obtenidos en la F1 de los gusanos microinyectados. Posteriormente, se evaluó la F2 de los gusanos, para distinguir los nematodos con capacidad de transmitir el *array* extracromosómico a su descendencia. Por cada cepa microinyectada, las tres placas con una F2 con mayor número de gusanos con el *array* incorporado (*rollers*) fueron seleccionadas como líneas y nombradas como L1, L2 y L3 (líneas 1, 2 y 3). Para mantenerlas y poder acceder a ellas en un futuro, las dos mejores líneas (L1 y L2) obtenidas tras la microinyección fueron congeladas según el Protocolo 4 (Anexo I).

3.4 Generación de cepas mediante cruces genéticos

Como se ha comentado en la introducción, las hermafroditas de *C. elegans* pueden reproducirse además de por autofecundación por cruce genético con machos. En presencia de machos, se produce una competencia entre la autofecundación de hermafroditas y la fecundación cruzada de ambos. Al tener las hermafroditas una mayor afinidad por el esperma exógeno, cuando se realiza un cruce la descendencia provendrá mayoritariamente de la reproducción sexual. Las hermafroditas actuarán como hembras durante el cruce, con lo que nos referiremos a ellas como tal. Sin embargo, es importante destacar que las hermafroditas no son hembras, sino que adquieren este papel durante el cruce con los machos.

Durante el trabajo, se emplearon cruces genéticos para generar cepas con características genotípicas concretas. Por un lado, una cepa reportera para LAG-1 y a su vez para *tph-1* en la que evaluar la expresión de este factor en las neuronas ADF (subobjetivo 1) y por otro, cepas mutantes para el gen *lag-1* que fuesen además reporteros para distintos genes de la vía de la serotonina para evaluar el efecto de la mutación en la expresión de los genes. (subobjetivo 3).

3.4.1 Factores a considerar cuando se realiza un cruce

Para que un cruce funcione, han de tenerse en cuenta varios factores. En primer lugar, la proporción de hermafroditas y machos. La probabilidad de que un cruce funcione aumenta con un exceso de machos frente a hermafroditas. Durante el trabajo se utilizaron 12 machos y 4 hermafroditas (una proporción 3:1) por cruce.

En segundo lugar, el estadio de desarrollo. Las hermafroditas L4 (el último estadio larvario) tienen una fertilidad óptima. Además, como en este estadio todavía no tienen capacidad de autofecundarse, es más probable que al alcanzar la madurez y en presencia de machos, los descendientes provengan del cruce entre ambos. Para seleccionar las hermafroditas L4 para los cruces, nos fijamos en la vulva en desarrollo, que puede distinguirse como una media luna más transparente en la parte ventral del cuerpo (Figura 10). Los machos se seleccionaron jóvenes ya que éstos poseen una mayor capacidad de fecundación.

El último parámetro a tener en cuenta en los cruces es el área de comida. Los gusanos se mueven continuamente por la región de la placa donde se encuentra el césped de *E. coli*. Cuanto más grande sea la región por la que se mueven, menos probabilidad habrá de que se encuentren. En consecuencia, para facilitar el cruce se emplean placas Petri con menos volumen de comida (unos 0,5 cm de diámetro), que llamamos placas de “luna de miel”.

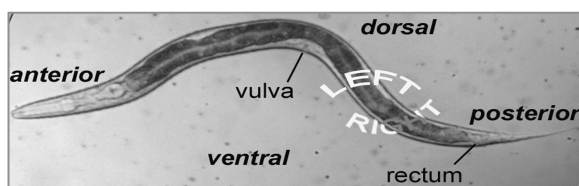


Figura 10- Hermafrodita en estadio L4. Imagen DIC de un nematodo L4. La vulva en desarrollo puede visualizarse en la parte ventral del cuerpo, en forma de media luna.

3.4.2 Cruce para evaluar la expresión de LAG-1 en ADF.

a. Descripción de cepas

Con el objetivo de determinar la expresión del factor de transcripción LAG-1 en las neuronas ADF, se diseñó y realizó el cruce de las cepas NFB297 (*him-5V; lin-15B(n765)X; vsIs97[tph-1p::Dsred2 + lin-15 (+)]*) y NFB922 (*vlcEx496(lag-1fos::gfp(40ng/ml); ttx-3::mccherry(50ng/ml); rol-6(50ng/ml))*).

La cepa NFB922 es un reportero que presenta el fósforo WRM0625A_CO1 (de alrededor de 40 Kb) que contiene todo el locus de *lag-1* incluidos varios genes aguas arriba y aguas abajo. Este fósforo fue modificado genéticamente para crear una construcción en la que la proteína LAG-1 aparece fusionada a GFP (*lag-1::gfp*) lo que nos permite monitorizar fácilmente la localización de LAG-1 mediante microscopía. Es importante destacar que, al incluir todo el locus, reproduce la expresión de forma semejante a la endógena del gen. Además, este reportero contiene dos marcadores, un reportero del gen *ttx-3*, que se expresa en las neuronas AIY, en rojo y el gen *rol-6*. La cepa NFB297, por otro lado, presenta integrado en su genoma un reportero del gen *tph-1*, cuya expresión es específica de neuronas serotoninérgicas (NSM, ADF, HSN). La cepa obtenida (NFB 1111), con genotipo *lin-15B(n765)X; vsIs97[tph-1p::Dsred2 + lin-15 (+)]; vlcEx496(lag-1fos::gfp(40ng/ml); ttx-3::mccherry(50ng/ml); rol-6(50ng/ml))*, reportera para el factor LAG-1 y el gen *tph-1*, fue analizada al microscopio de fluorescencia para evaluar la co-localización de los fluoróforos (apartado 4.1).

b. Diseño y procedimiento

La *Figura 11* muestra el diseño del cruce realizado. Normalmente hay que realizar un cruce previo con cepas salvajes para obtener machos, ya que como he comentado en la introducción, por autofecundación su frecuencia es muy baja. Sin embargo, la cepa NFB297 (*him-5V; lin-15B(n765)X; vsls97[tph-1p::Dsred2 + lin-15 (+)]*) se encuentra mutada en el gen *him-5*, lo cual aumenta la frecuencia de la no-disyunción meiótica del cromosoma X, aumentando la proporción de machos XO en la autofecundación (WORMBASE, 2016).

Se seleccionaron hembras con el fósido de *lag-1* y se cruzaron con machos con el reportero *tph-1::Dsred*. La descendencia proveniente del cruce da lugar a hermafroditas que presentan 6 neuronas rojas en la cabeza (los pares NSM y ADF y las neuronas AIY del marcador), además algunas de ellas mantendrán el constructo de *lag-1fos::gfp* que puede seguirse fácilmente a la lupa por los defectos de movimiento que produce su co-marcador *roller*. Se realizaron aislamientos de gusanos individuales (*singles*) de gusanos F1 (heterocigotos en su totalidad) y *roller* a la lupa de fluorescencia (1FAxioZoom V16, Zeiss) siguiendo los marcadores y se obtuvo la F2. De la F2, el 25% de los gusanos *roller* presentan el genotipo de interés (*lag-1fos::gfp; tph-1::Dsred/tph-1::Dsred*). Para seleccionarlo, se hicieron *singles* de la F2 siguiendo los marcadores y de entre esas placas se seleccionaron aquellas en las que todos los gusanos contuviesen el marcador de interés, es decir, que éste estuviese en homocigosis.

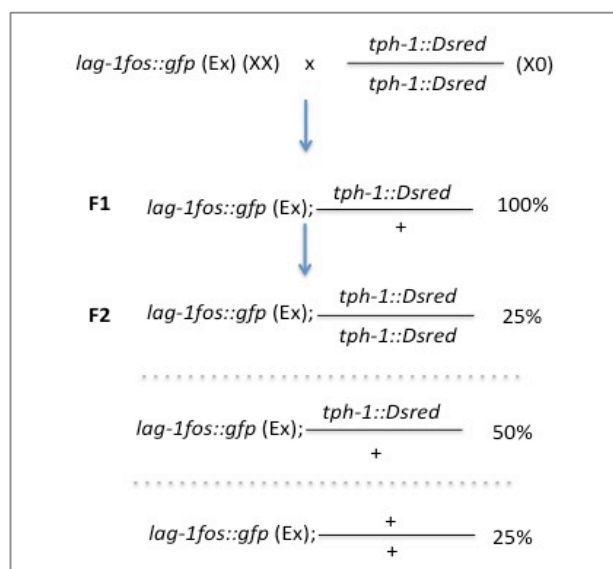


Figura 11- Diseño del cruce del reportero de *lag-1* (NFB 922) con el reportero de *tph-1* (NFB 297).

3.4.3 Cruces de cepas reporteras con mutantes de LAG-1.

a. Descripción de cepas

Para evaluar el efecto de mutaciones en el gen LAG-1 en la expresión de los genes de la vía de la serotonina, se cruzaron los mutantes de *lag-1* JK1227 (*lag-1(q385)/dpy-13(e184) unc-24(e138) IV*) y EL301 (*lag-1(om13)IV*) con los reporteros de *tph-1::gfp* (otIs517), *bas-1::gfp* (OH4196), *cat-1::gfp* (OH8246) y *cat-4::gfp* (OH8250) (*Tabla 1*). Las cepas obtenidas (*Tabla 1*) fueron posteriormente analizadas al microscopio de fluorescencia.

El mutante EL301 presenta una mutación hipomorfa en el gen *lag-1* (Anexo II), que hace a los gusanos sensibles a la temperatura. JK1277 presenta un alelo nulo, letal en estadios larvarios tempranos. En este caso, para mantener la mutación es necesario emplear un balanceador genético. Si la mutación letal estuviese en heterocigosis y sin balancear (*lag-1(q385)/+*), los descendientes de

genotipo salvaje (+/+) y los heterocigotos ((*lag-1(q385)*/+) no podrían distinguirse fenotípicamente ya que ambos tendrían un fenotipo salvaje. Al no poderse distinguir, habría que picar muchos gusanos salvajes para asegurar la propagación de heterocigotos y habría que comprobar directamente la existencia de homocigotos mutantes ((*lag-1(q385)*/*lag-1(q385)*) observando larvas muertas que nos asegurasen que se ha mantenido la mutación. Incorporar (en trans a la mutación letal) un gen que en homocigosis presente un fenotipo distinto al salvaje permitiría distinguir los gusanos salvaje de los heterocigotos para *lag-1* con facilidad, permitiendo de esta forma mantener la mutación. Este constructo genético, que permiten mantener mutaciones letales de manera estable en heterocigotos, es lo que se conoce como balanceador genético (WORMBOOK, 2016). En este caso, el balanceador está constituido por una mutación recesiva (*dpy-13(e184) unc-24(e138)*) que genera un fenotipo *dumpy*. Los gusanos *dumpy* se distinguen fácilmente de los gusanos salvaje por ser gusanos más más cortos y anchos de lo normal (Figura 12).



Figura 12 – Fenotipo dumpy.
Foto a la lupa de un gusano con fenotipo dumpy.

b. Diseño y procedimiento

Debido a que poseen características genotípicas distintas, los cruces fueron distintos para cada uno de los mutantes. Como ya he comentado, el procedimiento del cruce también fue distinto en función de los reporteros (con construcción extracromosómica (*tph-1::gfp* y *bas-1::gfp*) o integrados (*cat-1::gfp* y *cat-4::gfp*)). La Figura 13 representa el diseño del cruce del mutante EL301 con el reportero de *bas-1*.

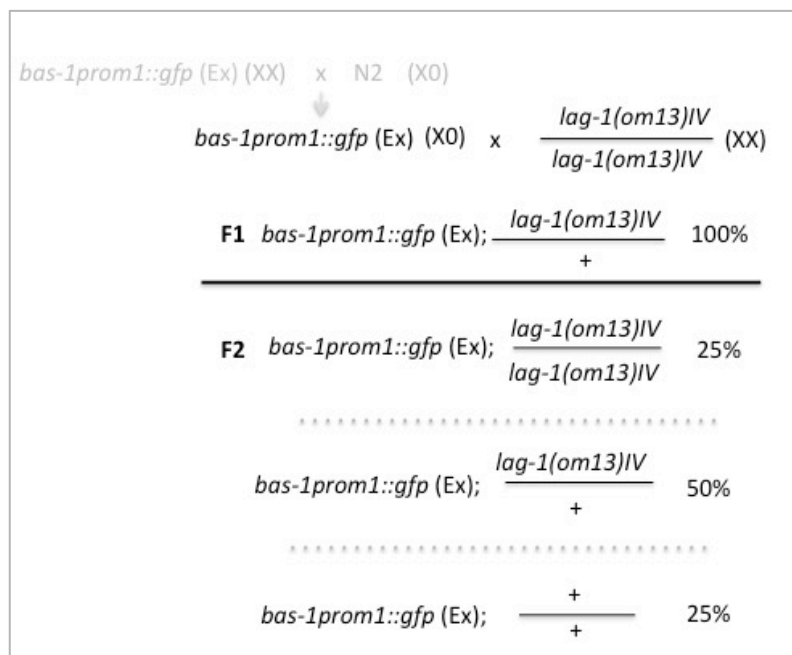


Figura 13-Diseño del cruce del reportero extracromosómico de *bas-1* (OH4196) con el mutante EL301.

Para obtener machos reporteros, en primer lugar se cruzaron hermafroditas con el reportero con machos salvajes (cepa N2). Tras el cruce con el mutante, la F1 obtenida era en su totalidad heterocigota para el reportero. Se realizaron *singles* de gusanos *rollers*, que es el co-marcador del reportero extracromosómico *bas-1prom1::gfp*, y se obtuvo la F2. Por probabilidad, uno de cada cuatro tendría que tener el genotipo de interés (*bas-1prom1::gfp; lag-1(om13)IV/lag-1(om13)IV*). De nuevo, se pasaron gusanos *rollers* a placas independientes y se dejaron crecer. Se seleccionaron las placas con gusanos que parecían tener un aspecto menos sano (unas 10 placas) y se genotiparon. Tras conocer su genotipo, se seleccionó una de las placas que presentase la mutación en homocigosis.

En cuanto a las cepas con la construcción reportera integrada, se muestra como ejemplo el cruce con el reportero *cat-1* (Figura 14). En vez de ir seleccionando gusanos *rollers*, en este caso tendríamos que seguir el reportero a la lupa de fluorescencia, pero el procedimiento fue el mismo. Una vez genotipadas las cepas e identificados los mutantes, en este caso se procedió al homocigoseado del reportero en el caso que no hubiese coincidido que el mutante presentase el reportero en homocigosis (*cat-1::gfp/cat-1::gfp; lag-1(om13)IV/lag-1(om13)IV*), cuya probabilidad es de 1/16.

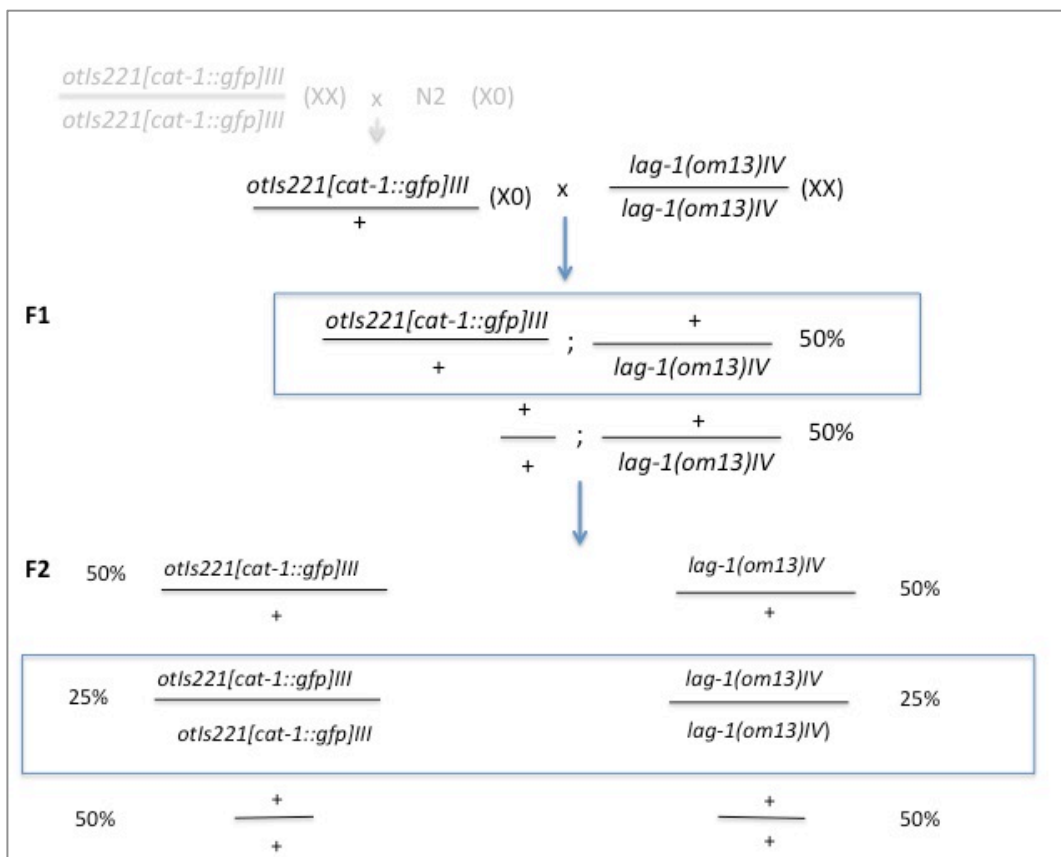


Figura 14- Diseño del cruce de reporteros integrados con el mutante EL301 La figura ejemplifica el diseño del cruce empleado en cepas con reportero integrado con el reportero del gen *cat-1* (*otIs221[cat-1::gfp]III*).

En el caso del mutante JK1227, el diseño del cruce queda recogido en la *Figura 15*. Este mutante únicamente se cruzó con cepas con las construcciones reporteras integradas. A diferencia del primer mutante, en este caso, para facilitar la obtención de la cepa deseada se incluye un segundo cruce con la cepa mutante por tratarse de una mutación balanceada. Para simplificar, la figura muestra únicamente los genotipos y probabilidades de los mutantes.

La primera generación filial presenta un 50% de heterocigotos para la mutación de *lag-1* y el 50% de heterocigotos para la mutación de los genes *dpy* y *unc*. Los heterocigotos para ambas mutaciones segregan fenotipo salvaje. Tras el segundo cruce con el mutante, 1/8 de los descendientes son homocigotos para la mutación de *lag-1*, con lo que mueren en estadios larvarios tempranos. Otro octavo son gusanos con la mutación *dpy-unc* en homocigosis y segregarán *dumpy*. Los 3/4 restantes, con las otras tres variantes genotípicas posibles (cuadro azul de la figura), son gusanos de fenotipo salvaje. De estos, 1/3 presentan el genotipo de interés (*lag-1(q385)/ dpy-13(e184) unc-24(e138) IV*). Se realizaron *singles* de gusanos salvajes y se obtuvo F2. Los tres genotipos posibles segregan combinaciones de fenotipos distintos

- *lag-1(q385)/ dpy-13(e184) unc-24(e138) IV*: Segregan salvaje, *dumpy* y larvas muertas.
- *lag-1/+*: Salvaje y larvas muertas.
- *dpyunc/+*: Salvaje y *dumpy*.

Seleccionamos, por tanto, las placas de gusanos F2 con el genotipo de interés (*lag-1(q385)/ dpy-13(e184) unc-24(e138) IV*) observando que había en la misma placa gusanos salvajes, *dumpy* y larvas muertas.

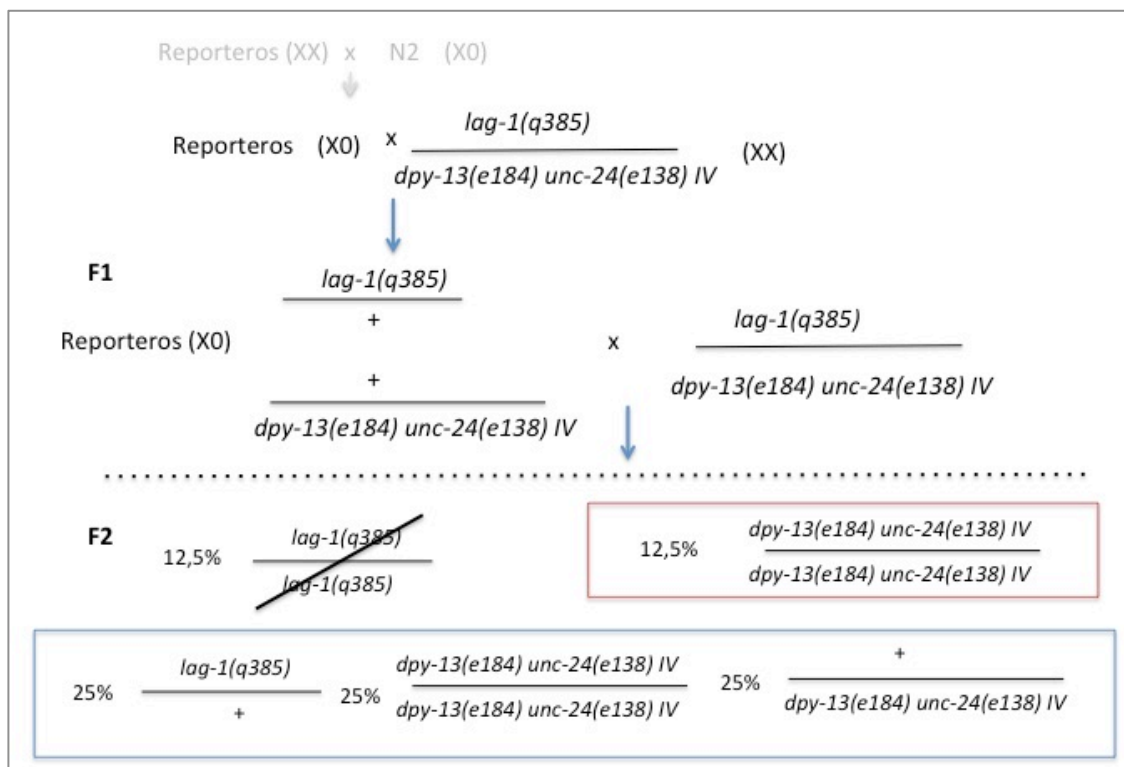


Figura 15- Diseño del cruce de reporteros integrados con el mutante JK1227. La figura ejemplifica el diseño del cruce empleado en cepas con reportero integrado con el reportero del gen *cat-1 (otIS221[cat-1::gfp]III)*.

3.5 Genotipado de Cepas

El genotipado de cepas hace referencia a la identificación del genotipo de las mismas. Durante el trabajo, se genotiparon las cepas provenientes del cruce genético con el mutante EL301 para identificar aquellas cepas que fueran homocigotas para la mutación de *lag-1*. Para ello, se extrajo el DNA genómico de los gusanos, se amplificó la región del gen *lag-1* que incluía la mutación y se purificaron y mandaron a secuenciar los productos de PCR para obtener el genotipo.

3.5.1 Extracción de DNA genómico

Para la extracción del DNA genómico de las placas a genotipar, se hizo uso del protocolo de lisis establecido por Williams (Williams et al, 1992). Utilizando un tampón de lavado (M9), los gusanos se recogieron de placas con comida y se dispusieron en tubos eppendorf en hielo. Se esperó a que los gusanos se depositasen en el fondo, se eliminó el tampón y se adiciona un tampón de lisis con proteinasa K. La lisis tiene lugar por choque de temperatura; los gusanos se incuban a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ y posteriormente, se someten a un ciclo de temperaturas altas ($65\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 4 horas seguidos de 30 segundos a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$). El protocolo de extracción de DNA junto con los componentes de los reactivos empleados se encuentran descritos en el Protocolo 8 del Anexo I.

3.5.2 PCR

La reacción de PCR permitió amplificar una región de 300 pares de bases del gen *lag-1* que incluía mutación. Los cebadores empleados fueron el oMM804: tctctcaacttcacaaatgtgc (22 nt, $T_a = 58\text{ }^{\circ}\text{C}$, % GC= 40,91 %) como cebador directo y oMM765: gaacaatgaagactcttctcacttc (25 nt, $T_a = 70\text{ }^{\circ}\text{C}$, % GC = 40 %) como reverso. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un volumen total de 25 μL . Por reacción, se añadió 0,5 μL de desoxiribonucleótidos trifosfato (100 μM , Fermentas), 17,5 μL de Buffer A Kapa Taq (10X con MgCl_2 , KapaBiosystems), 1 μL la enzima ADN polimerasa KAPA Taq (5U/ μL , KapaBiosystems) (una enzima genéticamente modificada obtenida de la bacteria termófila *Thermus aquaticus*) y 3 μL de ADN procedente del lisado de las cepas a genotipar. Se adicionó agua hasta alcanzar los 25 μL de la reacción. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador (mastercycler® Pro S, Eppendorf) siguiendo el programa de PCR que se detalla en la *Tabla 4*. Para asegurar que no se producía ninguna contaminación, se emplearon controles negativos a los que se adicionaron todos los componentes de la PCR excepto el DNA.

Tabla 4- Programa de PCR utilizado para la amplificación del gen lag-1.

Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	95°C	2 minutos
35	$95\text{ }^{\circ}\text{C}$	30 segundos
	$58\text{ }^{\circ}\text{C}$	30 segundos
	$72\text{ }^{\circ}\text{C}$	1 minuto
1	$72\text{ }^{\circ}\text{C}$	2 minutos
Inf.	$4\text{ }^{\circ}\text{C}$	-

3.5.3 Electroforesis en gel de agarosa

Para confirmar que la amplificación había tenido lugar de forma específica se realizó una electroforesis en gel de agarosa, que separa el DNA por peso molecular.

Se cargaron aproximadamente 4 µl de cada reacción de PCR y el control negativo en un gel de agarosa al 1%, adicionando GelRed al 1X (10000u en agua, Biotium) a las muestras para revelar su posición en el gel. Para la migración de las muestras en el gel, se aplicó un voltaje constante de 120 voltios, empleando TAE al 1X para favorecer el paso de corriente por el gel. Al tratarse de un fragmento corto (300 pb), se dejó correr 20-30 minutos. Para poder estimar el tamaño de las bandas de DNA obtenidas, se utilizó el marcador de pesos molecular GeneRuler1Kb (Thermo Scientific). Las bandas de DNA se visualizaron utilizando un transiluminador de luz UV (Ultima16si Plus, Isogen).

3.5.4 Purificación y cuantificación de productos de PCR

El producto de PCR obtenido se encuentra mezclado con los componentes utilizados durante la reacción (Taq, cebadores, etc). Previamente a la secuenciación de los productos, es indispensable su purificación. Para el proceso de purificación por columna en primer lugar se añadió disolución PB con etanol para que el DNA amplificado quedase atrapado en la matriz de la columna de purificación. Después, se lavó el DNA con PE + etanol. Por último, se realizaron dos tandas de secado y finalmente se eluyó el DNA con agua. Para más detalles acerca de la purificación en columna, se recomienda ver el Protocolo 9 del Anexo I.

La cuantificación de ADN se realizó mediante espectrofotometría UV-visible (NanoDrop2000, Thermo Scientific). El NanoDrop estima la concentración de ADN a partir de 1 µL de muestra. También permite evaluar la calidad de la muestra a partir de imágenes del espectro de absorción y el cálculo de ratios de absorbancia 260/280, cuyos valores normales oscilan entre 1.8 - 2.0.

3.5.5 Secuenciación y análisis de secuencias

Para el genotipado de las cepas provenientes del cruce con el mutante EL301, se procesaron parte de las placas F2 para identificar cepas con la mutación de *lag-1* en homocigosis. Para el genotipado se empleó el cebador oMM804: tctctcaacttcacaaatgtgc (22 nt, Ta= 58 °C, % GC= 40,91 %). El servicio de secuenciación fue el mismo que el empleado para la confirmación de la inserción de mutaciones en las regiones promotoras mínimas y por ello, la preparación de las muestras se realizó como se ha descrito anteriormente (apartado 3.3.2.4). El análisis de los cromatogramas (mediante el programa apE) permitió distinguir no solo si las cepas presentaban la mutación en *lag-1* (Anexo II) sino además si la mutación se encontraba en homocigosis o en heterocigosis (Figura 16).

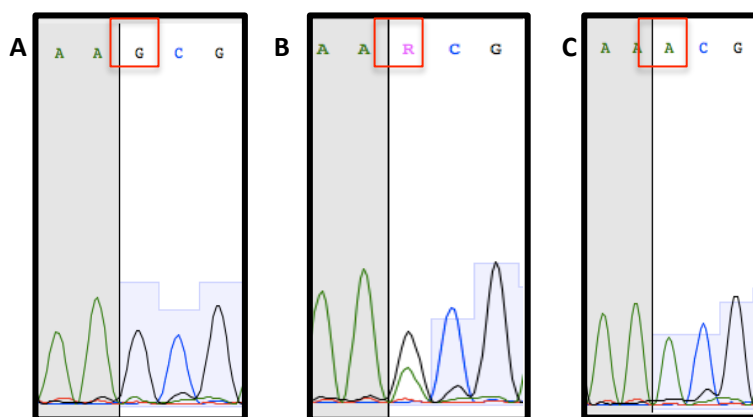


Figura 16- Cromatogramas de líneas salvaje y mutantes en homocigosis y en heterocigosis. Imagen de cromatogramas visualizado con el software apE. La mutación de *lag-1* del mutante EL301 es un cambio en una única base (G por A) en la posición 156 del gen. El cromatograma muestra la región flanqueante a la mutación en gris y la mutación está señalizada con una caja roja. **A.** Secuencia salvaje (guanina (G)) **B.** Secuencia de un mutante con la mutación en heterocigosis. (R = purina (G, A)) **C.** Secuencia de un mutante con la mutación en homocigosis, (adenina (A)).

3.6 Recuentos de reporteros mediante técnicas de microscopía

Los recuentos se realizaron valorando la presencia o ausencia de fluorescencia en las neuronas ADF en los distintos reporteros. Se empleó un microscopio de fluorescencia monitorizado (Zeiss Axioplan2), acoplado a una cámara (Mamatsu Oerca-ER C4742-95) que permitió obtener imágenes a tiempo real de los gusanos. Este tipo de microscopio presenta un sistema óptico Normarski, basado en el uso de contraste diferencial interferencial o DIC. La tecnología DIC es una tecnología de contraste de fases que produce imágenes con un efecto óptico característico de relieve 3D, ideal para la observación de organismos vivos transparentes sin teñir como es el caso de *C. elegans* (Strange K., 2016). Los nematodos se inmovilizaron sobre una gota de azida sódica (100 μ M, Sigma) dispuesta sobre agarosa (4 % en agua) solidificada en un portaobjetos. Durante su análisis, para cada gusano se anotó si se observaba fluorescencia en ninguna, una o en las dos neuronas ADF (derecha e izquierda).

3.6.1 Recuentos de reporteros con sitios de unión CSL y E-box mutados

En los recuentos de reporteros con promotores mutados en sus sitios de unión se contaron por cepa reportera 2 o más líneas transgénicas y por cada línea, se contaron 30 gusanos en estadio adulto joven (n=30). Es decir, se contaron al menos 60 gusanos (120 neuronas) por construcción. Para el tratamiento de los resultados, el número de neuronas ADF fluorescentes se normalizó en porcentaje. Para construcciones de promotores salvaje, se obtuvo un porcentaje promedio de expresión de ADF correspondiente a las 3 líneas analizadas. En cuanto a las construcciones con mutaciones, para cada línea se calcularon los porcentajes de expresión comparándolos con la expresión salvaje. Para simplificar los resultados, un porcentaje de expresión > 60% se indicó como "+", de entre 20-60% como "+/-" y de < 20% como "-". Únicamente cuando al menos dos de las tres líneas de una determinada construcción reportera con mutación/es tenía el mismo resultado (+, - o +/-), éste fue considerado. En los casos en los que no coincidían los resultados entre las líneas, se procedió a obtener más líneas y realizar los recuentos para obtener datos concluyentes.

3.6.2 Recuentos de mutantes para *lag-1*

Por cada cepa mutante de *lag-1* obtenida se contaron un total de 50 gusanos mutantes y 50 gusanos de los reporteros salvaje (100 neuronas ADF en cada caso).

En los dos mutantes (JK1227 y EL301) los recuentos se realizaron en estadios larvarios iniciales (L1-L2). En el caso del mutante JK1227 fue completamente necesario puesto que como he comentado, la mutación es un alelo nulo que tiene un efecto letal en estadios iniciales del desarrollo. En cuanto EL301 se hizo para evitar sesgar los resultados, ya que se pensó que si se contaban gusanos adultos se podría estar seleccionando inconscientemente gusanos que hubiesen activado ciertos mecanismos compensatorios que hiciesen que la deficiencia de *lag-1* perdiese efecto.

En las cepas originadas por cruce con el mutante EL301 no se hizo ninguna distinción entre gusanos a la hora de los recuentos ya que todos los gusanos eran mutantes (mutación en homocigosis). En cambio, las cepas provenientes del cruce con JK1227 (*lag-1(q385)/dpy-13(e184) unc-24(e138) IV*), al tener la mutación balanceada los descendientes presentan distintos genotipos y únicamente el 25% de los nematodos son mutantes homocigotos para *lag-1* (*lag-1(q385)/lag-1(q385)*). Los mutantes de *lag-1*, presentan un fenotipo conocido como Lag, que se caracteriza por la aparición de tres defectos anatómicos: defectos en la célula excretora o ducto excretor, defectos en el recto y por último, en la nariz, que se encuentra torcida hacia al lado o hacia atrás (Figura 17) (Lambie and Kimble, 1991). La nariz torcida de los mutantes era fácilmente visible al microscopio con lo que se utilizó este fenotipo para identificarlos y contar únicamente los mutantes (*lag-1(q385)/lag-1(q385)*).

En cuanto a la temperatura de los recuentos, en los reporteros con la mutación de JK1227 la temperatura no tenía ningún efecto negativo con lo que se contaron a 25 °C. El alelo *lag-1(om13)IV* como he comentado es un alelo hipomorfo sensible a la temperatura, por ello, es a una temperatura elevada (a 25 °C por ejemplo) cuando la proteína pierde su capacidad funcional mientras que a temperaturas más bajas, más permisivas, el efecto de la mutación es menor. Para ver si la temperatura tenía un efecto grande en estos mutantes, analizamos los mutantes a 15 °C y a 25 °C y observamos que no había una diferencia apreciable entre ambos. Así pues, para simplificar el proceso, decidimos contar a temperatura de 15 °C donde los nematodos crecían con más facilidad.

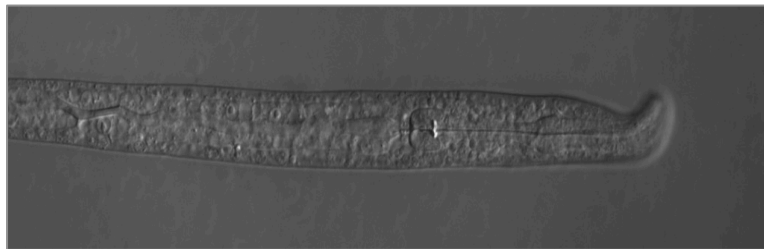


Figura 17- Fenotipo de mutantes para *lag-1*. Imagen DIC de un gusano en estadio L2 que presenta un defecto morfológico en la nariz ocasionado por la mutación en el gen *lag-1*.

3.7 Tratamiento estadístico de los datos: Test exacto de Fisher

Para evaluar si existía una diferencia significativa en la expresión en ADF de los genes de la vía de la serotonina entre cepas salvajes y mutantes para *lag-1*, se empleó el test exacto de Fisher.

El test exacto de Fisher es un test estadístico que se usa para determinar la significación de una asociación (contingencia) entre dos variables categóricas. En este caso, la variable genotipo (mutante o salvaje) con la variable expresión en ADF (con expresión (“on”) o sin expresión (“off”). Este test define dos hipótesis excluyentes: una hipótesis nula (H0) y una hipótesis alternativa (H1). La H0 afirma la independencia de las variables analizadas, es decir, que los valores de una de ellas no están influidos por la modalidad o nivel que adopte la otra. La hipótesis alternativa (H1) por el contrario, acepta la asociación de ambas variables. En este caso concreto la hipótesis nula defendería que el hecho de que una cepa sea mutante o salvaje no condiciona la expresión neuronal del gen concreto que se está estudiando (son independientes). Por el contrario, la H1 defendería que la expresión depende del genotipo de la cepa. Es decir, que existen diferencias lo suficientemente significativas como para afirmar que las variables están asociadas y que la variación observada entre mutante/salvaje a nivel de expresión se debe a que su característica genotípicas y no a otros factor distintos o al azar. Para la realización del test se hizo uso de una tabla de contingencia 2 x 2 (Tabla 5).

Tabla 5- Modelo de tabla de contingencia 2 x 2

	Expresión ON	Expresión OFF
Mutante	A	B
Salvaje	C	D

Como resultado del análisis de las tablas de contingencia, el test de Fisher calcula un valor P (o P-valor). El P-valor es una probabilidad, cuyo valor va de 0 a 1. Se define como la probabilidad de haber obtenido el resultado que hemos obtenido si suponemos que la hipótesis nula es cierta. En este caso concreto, el P-valor hace referencia a la probabilidad de haber obtenido unas diferencias de expresión entre mutante y salvaje como las obtenidas en el caso de que la hipótesis nula se cumpla y las variables no dependan la una de la otra. En otras palabras, es probabilidad que mide la evidencia en contra de la hipótesis nula. Cuanto menor sea el P-valor, más probable es que la hipótesis nula (la independencia de las variables) sea falsa. El valor de significación que determina la aceptación o rechazo de la H0 es 0,05. Un P-valor < 0,05 conllevará el rechazo de la H0 y aceptación de la H1 mientras que un P-valor > 0,05 supondrá la aceptación de la H0.

Para el análisis de las tablas de contingencia se utilizó por el servicio online QuickCalcs de GraphPad (<http://graphpad.com/quickcalcs/contingency1.cfm>). El programa obtiene el P-valor a partir de los datos crudos insertados en una tabla de contingencia 2 x 2.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Evaluación de la expresión de LAG-1 en las neuronas ADF

Para evaluar si LAG-1 se expresa en las neuronas ADF (subobjetivo a) se generó una cepa reportera para *lag-1* y para *tph-1* (NFB 1111: *lin-15B(n765)X;vsIs97[tph-1p::Dsred2 + lin-15 (+)]; vlcEx496(lag-1fos::gfp(40ng/ml); ttx-3::mcherry(50ng/ml);rol-6(50ng/ml))*) (apartado 3.4.2). Por morfología y posición únicamente, no se puede establecer inequívocamente si entre las células que expresan el factor LAG-1 se encuentran las ADF. Para poder determinar si las neuronas ADF expresan *lag-1* hicimos uso del reportero de *tph-1::Dsred2*, que al ser un gen específico de serotonérgicas, permiten distinguir las ADF (marcadas con fluorescencia roja) con facilidad. El análisis microscópico de la cepa doble fluorescente generada permitió confirmar, por co-localización de ambos fluoróforos, que el factor LAG-1 se expresa en las neuronas de interés (*Figura 18*).

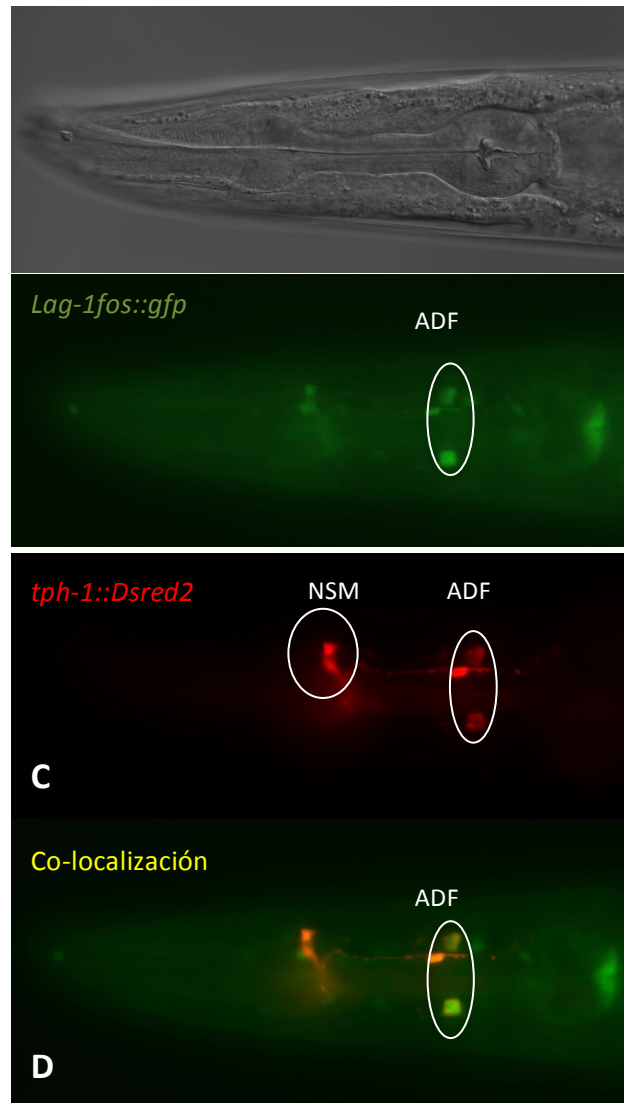


Figura 18- Evaluación al microscopio de la expresión de LAG-1 en las ADF. A. Imagen DIC de la cabeza de un gusano adulto B. Muestra la expresión del fósforo de *lag-1* en todo el soma de las neuronas ADF C. Muestra la expresión del reportero *tph-1::Dsred2* en el citosol de las neuronas ADF D. Co-localización de ambos fluoróforos.

4.2 Estudio *in vivo* del papel de los sitios de unión de LAG-1 (CSL) y el posible cofactor HLH-14 (E-box) en las regiones reguladoras de los genes de la vía de la serotonina en *C. elegans*

Para estudiar la funcionalidad de los sitios de unión de LAG-1 (CSL) y del posible cofactor HLH-14 (E-box) de las regiones reguladoras mínimas de los genes de la vía de la serotonina, se generaron reporteros de los promotores mínimos de los distintos genes de la vía de la serotonina con mutaciones en los sitio de unión de interés predichos previamente (apartado 3.3.2).

Una vez generadas las nuevas cepas transgénicas, se procedió a realizar recuentos al microscopio de fluorescencia (apartado 3.6.1).

A continuación se va a proceder a comentar gen por gen los resultados obtenidos. Para cada uno de los genes, los resultados se recogen en una figura que muestra el promotor o promotores mínimos del gen específico fusionados al gen *gfp* y con los sitios de unión CSL y E-box señalados con cajas de colores (azul oscuro y claro respectivamente). En primer lugar se muestra el promotor salvaje y a continuación, los distintos constructos mutados (las mutaciones se marcan con una "X"). En cada caso, se indican los resultados obtenidos en los recuentos ("+", "-" ó "+/-") y el número de líneas que presentan el fenotipo respecto al total de líneas analizadas. Los recuentos realizados previamente al inicio de este trabajo se han señalado con un color rojo para distinguirlos de los realizados durante el trabajo (en negro).

La región promotora mínima del gen *tph-1* en ADF (*tph-1prom17::gfp*) presenta un único sitio de unión CSL. Al mutarlo (*tph-1prom42::gfp*) se observó que el porcentaje de neuronas ADF con expresión de *tph-1* se reducía en más de un 80% respecto al promotor salvaje (Figura 19). Estos datos sugieren que el factor LAG-1 regula, a través de su unión directa a este sitio de unión, la expresión del gen *tph-1* en ADF.



Figura 19- Resultados de los recuentos en reporteros de *tph-1* mutados en su región promotora mínima.

En cuanto a *bas-1* (Figura 20), el análisis bioinformático de su región promotora mínima permitió identificar dos sitios de unión CSL y un sitio E-box. Al mutar el sitio de unión CSL localizado al principio de la región promotora (*bas-1prom90::gfp*), la expresión del gen se redujo, aunque levemente (20%). La mutación que afectaba a los sitios solapantes CSL y E-box (*bas-1prom74::gfp*) redujo la expresión en mayor medida, en un 71 %. Los resultados sugieren que LAG-1 y algún miembro de la familia bHLH (las evidencias previas sugieren que HLH-14) activan, a través de su unión directa a sitios CSL y E-box, la expresión del gen *bas-1* en las ADF.

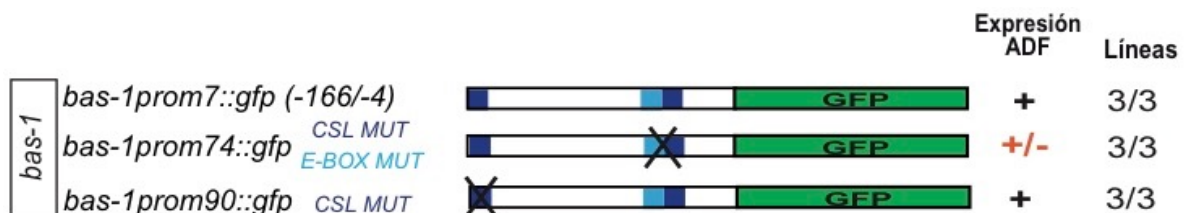


Figura 20- Resultados de los recuentos en reporteros de *bas-1* mutados en sus regiones promotoras mínimas.

Para *cat-1*, se identificaron dos secuencias reguladoras mínimas (Figura 21). En la primera (*cat-1prom14::gfp*) se encontraron un sitio CSL y un sitio E-box. Al mutar el sitio CSL, se observó que la expresión se reducía un 46 %. Al mutar el E-box (*cat-1prom72::gfp*) el porcentaje de expresión en ADF se reducía más del 80%.

En cuanto a la otra región promotora (*cat-1prom37::gfp*), se encontró un sitio CSL y dos E-boxes. La mutación del sitio CSL redujo la expresión de *cat-1* un 80%. El reportero con un sitio E-box mutado (*cat-1prom81::gfp*), en cambio, se expresaba en la totalidad de neuronas ADF. Se pensó que esto podía ser debido a que el otro sitio E-box se mantenía funcional y por ello, tenía capacidad de activar la expresión y compensar la pérdida del primer sitio E-box. Para testar esta hipótesis, se mutaron en el mismo constructo ambos sitios E-box juntos (*cat-1prom90::gfp*). Los recuentos revelaron un efecto en la expresión (una reducción del 12 %). Esta reducción no demasiado grande puede deberse a que el sitio CSL (*cat-1prom77::gfp*) (que los resultados sugerían que era necesario en la activación génica) en esta construcción se encuentra funcional.

Los datos obtenidos de ambas regiones promotoras sugieren que el factor LAG-1 y algún cofactor de la familia HLH (posiblemente HLH-14), regulan directamente la expresión del gen *cat-1* en las ADF.

				Expresión ADF	Líneas
cat-1	<i>cat-1prom14::gfp</i> (-1088/-566)		GFP	+	4/6
	<i>cat-1prom80::gfp</i> CSL MUT		GFP	+/-	3/5
	<i>cat-1prom72::gfp</i> E-BOX MUT		GFP	-	3/3
cat-1	<i>cat-1prom37::gfp</i> (-180/+5)		GFP	+	3/3
	<i>cat-1prom77::gfp</i> CSL MUT		GFP	+/-	3/3
	<i>cat-1prom81::gfp</i> E-BOX MUT		GFP	+	2/2
	<i>cat-1prom90::gfp</i> E-BOX MUT		GFP	+	3/3

Figura 21- Resultados de los recuentos en reporteros de *cat-1* mutados en sus regiones promotoras mínimas.

En la región reguladora de *cat-4* se encontraron dos sitios CSL y un E-box (Figura 22). Al mutar el sitio de unión de LAG-1 más cercano al inicio de la región promotora (*cat-4prom73::gfp*), la expresión se redujo considerablemente (un 60%). El otro sitio CSL (*cat-4prom69::gfp*) también tenía un efecto en la expresión de *cat-4::gfp*, reduciéndola en más de un 80%. En cuanto al sitio de unión E-box (*cat-4prom71::gfp*), su mutación redujo la expresión del gen en un 14 %, que no es considerado significativo.

El efecto observado en la expresión del gen *cat-4* tras mutar puntualmente los sitios de unión CSL y E-box sugieren que LAG-1 activa directamente, a través de los sitios de unión CSL, la expresión del gen *cat-4* en las ADF.

				Expresión ADF	Líneas
cat-4	<i>cat-4prom6::gfp</i> (-629/-3)		GFP	+	3/3
	<i>cat-4prom69::gfp</i> CSL MUT		GFP	-	3/3
	<i>cat-4prom71::gfp</i> E-BOX MUT		GFP	+	3/3
	<i>cat-4prom73::gfp</i> CSL MUT		GFP	+/-	3/3

Figura 22- Resultados de los recuentos en reporteros de *cat-4* mutados en las regiones promotoras mínimas.

Por último, en el promotor mínimo del gen *mod-5* se encontró un sitio CSL y dos E-box (Figura 23). La mutación de los sitios de unión E-box (*mod-5prom12::gfp* y *mod-5prom14::gfp*) redujeron la expresión en un 20 y 24% respectivamente. La pérdida de función del sitio de unión CSL (*mod-5prom10::gfp*) redujo la expresión de *mod-5* un 30 %. La mutación del E-box más cercano (*mod-5prom11::gfp*), supuso también una reducción en la expresión, pero esta vez del 40%. El hecho de que sitios de unión CSL y E-box cercanos (*mod-5prom10::gfp* y *mod-5prom11::gfp*) se observase una reducción parcial en la expresión del gen, nos llevó a pensar que ambos sitios podían ser redundantes. Es decir, que al mutar únicamente uno de los sitios de unión y mantener el otro funcional, el sitio funcional fuese capaz de activar la expresión de *mod-5* evitando que la expresión se perdiese totalmente. Para testarlo, se mutaron ambos sitios de unión en una misma construcción (*mod-5prom15::gfp*). Al mutar ambos sitios, la expresión se redujo en un porcentaje mayor que al mutar independientemente (un 60% en este caso), lo cual apoya que ambos sitios están involucrados en la activación génica. Los datos sugieren de nuevo que LAG-1 y factores HLH (HLH-14) regulan directamente la expresión de *mod-5* en las ADF.

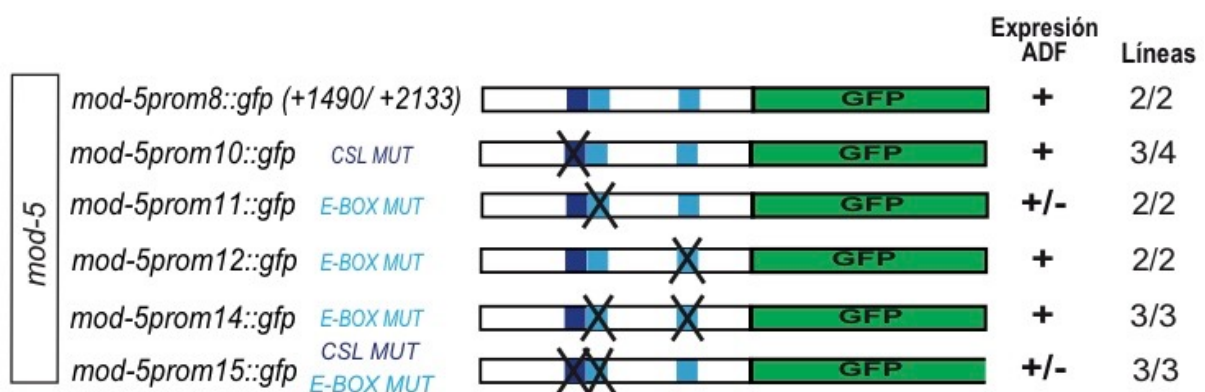


Figura 23- Resultados de los recuentos en reporteros de *mod-5* mutados en su región promotora mínima.

Los resultados de los recuentos al microscopio de fluorescencia de reporteros con promotores mutados sugieren que los sitios de unión CSL y E-box presentes en las regiones reguladoras mínimas de ADF para los distintos genes de la vía de la serotonina (*tph-1*, *bas-1*, *cat-1*, *cat-4* y *mod-5*) están involucrados en la activación génica de los mismos ya que mutaciones en los sitios de unión generan un fenotipo distinto al salvaje, en el que el porcentaje de neuronas ADF que expresan el gen se reduce. Esto lleva a pensar que LAG-1 y el posible co-factor HLH-14 están regulando directamente la expresión de los genes a través de su unión a los sitios CSL y E-box presentes en las regiones promotoras mínimas y por tanto, que éstos tienen un papel en la diferenciación terminal de las neuronas serotoninérgicas.

4.3 Estudio *in vivo* de cepas mutantes para el gen *lag-1* en reporteros de los genes de la vía de la serotonina en *C. elegans*.

Con el objetivo de estudiar el efecto de mutaciones de LAG-1 en la expresión de los genes de la vía de la serotonina, se generaron cepas mutantes para el factor LAG-1 que además eran reporteras para algunos de los genes (*tph-1*, *bas-1*, *cat-1* y *cat-4*). En el apartado 3.4.3 se han descrito las cepas mutantes empleadas y el diseño de los cruces realizados. Una vez obtenidas las cepas, se procedió a realizar los recuentos al microscopio de fluorescencia (apartado 3.6.2). A continuación, voy a proceder a comentar los resultados obtenidos en los recuentos, organizándolos por gen de la vía de la serotonina.

El reportero del gen *tph-1* empleado (*otIs517[tph-1::SL2::YFP::H2B],ttx-3::mcherry,rol-6*) se cruzó con los dos mutantes pero únicamente funcionó el cruce con el mutante EL301 (*lag-1(om13) IV*). Tras el recuento de la cepa mutante generada (NFB 1340: *otIs517[tph-1::SL2::YFP::H2B],ttx-3::mcherry,rol-6*; *lag-1(om13) IV*) y de la cepa reportera salvaje al microscopio de fluorescencia, se observó que el porcentaje de neuronas ADF con expresión de *tph-1::gfp* era significativamente menor en la cepa mutante que en la cepa salvaje (Figura 24). El P-valor obtenido en el Test exacto de Fisher que determina la asociación o independencia entre dos variables (en este caso genotipo y expresión génica) fue menor a 0.0001. Además, en las neuronas ADF que no perdían la expresión del gen, la fluorescencia observada era notablemente más tenue que la observada en la cepa salvaje. La reducción en la expresión de *tph-1::gfp* observada en mutantes para el gen *lag-1* sugiere que el factor LAG-1 es necesario para la expresión del gen *tph-1* en las neuronas ADF del gusano.

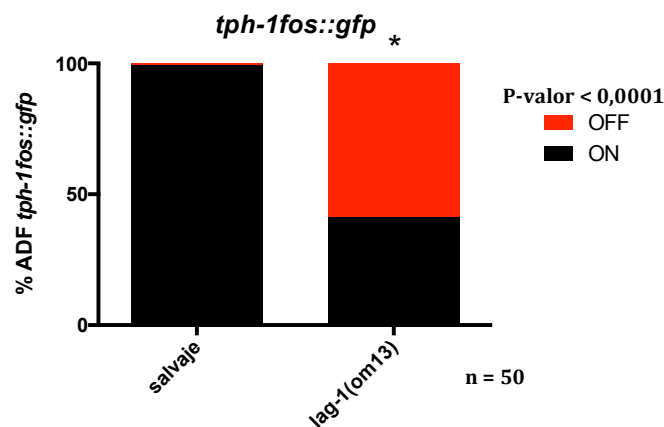


Figura 24- Expresión del reportero de *tph-1* salvaje y mutante (*lag-1(om13)*). El eje Y representa el porcentaje de neuronas ADF. En rojo, se muestra el porcentaje de neuronas ADF ON (con expresión, *gfp* +) y en negro OFF (sin expresión, *gfp* -) (n= 50).

El reportero del gen *bas-1* (*otex2435[bas-1prom1::gfp(50ng/μl),rol-6]*) se cruzó también con ambos mutantes pero solo funcionó el cruce con el mutante EL301 (*lag-1(om13) IV*). Los recuentos revelaron una reducción significativa (P-valor = 0,0002) en el porcentaje de neuronas ADF con expresión del gen *bas-1* (*bas-1::gfp*) (Figura 25). En las neuronas que no perdían la expresión, se observaba, de nuevo, una expresión más tenue en el caso de gusanos mutantes respecto a salvajes. Los resultados sugieren que el factor LAG-1 es necesario para la activación del gen *bas-1* en las neuronas ADF.

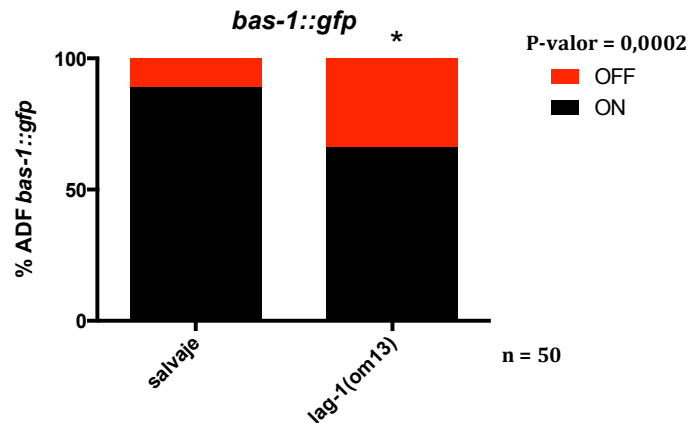


Figura 25- Expresión del reportero de *bas-1* salvaje y mutante (*lag-1(om13)*). El eje Y representa el porcentaje de neuronas ADF. En rojo, se muestra el porcentaje de neuronas ADF ON (con expresión, *gfp* +) y en negro OFF (sin expresión, *gfp* -) (n=50)

En cuanto al gen *cat-4*, se obtuvieron cepas mutantes para *lag-1* y reporteras de *cat-4* por cruce con ambos mutantes EL301 y JK1227 (NFB 1332: *otls255[cat-4::gfp]II*; *lag-1(om13)* IV y NFB 1205: *otls255[cat-4::gfp]II*; *lag-1(q385)/dpy-13(e184) unc-24(e138)* IV). En ambas cepas mutantes para *lag-1* se observó una reducción significativa de la expresión de *cat-4* con respecto a la cepa salvaje (*otls255[cat-4::gfp]II*) (Figura 26). El P-valor obtenido en el test exacto de Fisher fue de nuevo menor a 0.0001 en ambos casos, revelando una probabilidad muy baja que las diferencias de expresión observadas sean fruto del azar y no debido al efecto de la mutación. En este caso, las diferencias en intensidad de fluorescencia entre mutante y salvaje de las neuronas que expresaban el gen, no eran tan evidentes como en el caso de *tph-1* o *bas-1*. Sin embargo, sí que se observó una diferencia de expresión entre el reportero *cat-4::gfp* con la mutación de *lag-1* del mutante JK1227 (*lag-1(q385)*) y del mutante EL301 (*lag-1(om13)* IV). El reportero con la mutación *lag-1(q385)* tenía una expresión de *cat-4* en las ADF más tenue que en el caso del reportero con la mutación *lag-1(om13)* IV, lo cual era esperable ya que esta mutación genera defectos más graves en el gusano, llevándolos al arresto de su desarrollo en estadios tempranos. Los resultados obtenidos en este caso de nuevo sugieren que LAG-1 es requerido para la activación del gen *cat-4* en las neuronas ADF.

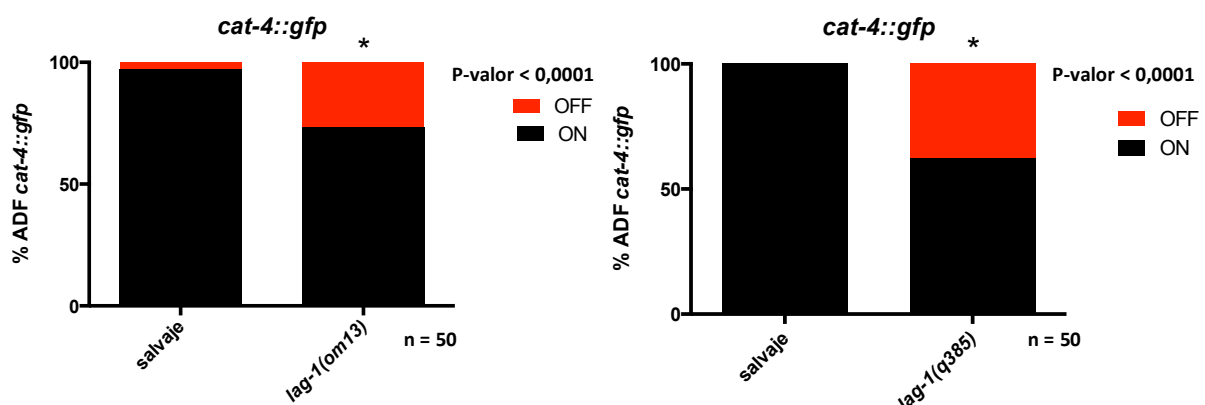


Figura 26- Expresión de los reportero de *cat-4* salvajes y mutantes para *lag-1* (*lag-1om13*) y *lag-1(q385)*. El eje Y representa el porcentaje de neuronas ADF. En rojo, se muestra el porcentaje de neuronas ADF ON (con expresión, *gfp* +) y en negro OFF (sin expresión, *gfp* -). (n=50)

En cuanto al reportero del gen *cat-1* (*otIs221[cat-1::gfp]III*), éste se cruzó con ambos mutantes EL301 y JK1227 generando las cepas NFB 1330: *otIs221[cat-1::gfp]III; lag-1(om13) IV* y NFB 1193: *otIs221[cat-1::gfp]III; lag-1(q385)/dpy-13(e184) unc-24(e138) IV*. Por falta de tiempo, únicamente se realizaron los recuentos de la cepa NFB1330. Se observó que el mutante *lag-1(om13) IV* presentaba una expresión significativamente menor que el reportero salvaje (P-valor = 0,0287) (Figura 27). Las diferencias en expresión entre mutante y salvaje son algo más sutiles que en los mutantes reporteros para *tph-1*, *bas-1* y *cat-4*, pero aun así, significativas, sugiriendo que el factor LAG-1 es necesario para la activación de la expresión del gen *cat-1* en ADF.

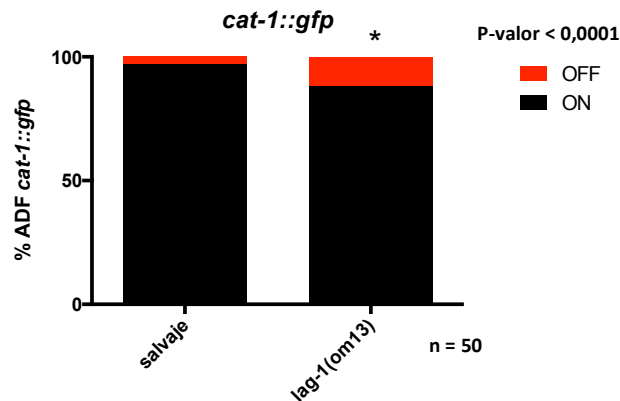


Figura 27- Expresión de los reportero de *cat-1* salvajes y mutantes para *lag-1* (*lag-1om13*). El eje Y representa el porcentaje de neuronas ADF. En rojo, se muestra el porcentaje de neuronas ADF ON (con expresión, *gfp* +) y en negro OFF (sin expresión, *gfp* -). (n=50)

Los resultados obtenidos sugieren que el factor LAG-1 es necesario para la expresión de los genes específicos de la vía de la serotonina *tph-1*, *bas-1*, *cat-1* y *cat-4*. Sin embargo, debido a que en todos los mutantes analizados se observó una reducción del porcentaje de neuronas ADF *gfp*+, no se puede saber si las neuronas están o no presentes. Es decir, si las mutaciones en el factor causan defectos en el desarrollo que impiden la correcta generación de las neuronas ADF o, si en cambio, la neurona está presente pero no es capaz de adquirir el fenotipo serotoninérgico ya que la expresión de genes que la caracteriza está afectada. Para saber si las neuronas ADF están presentes, habría que estudiar la expresión de otros genes como el gen *rab-3*, que es un gen que se expresa en todas las células (panneuronal) y que suelen estar regulados de forma diferente, menos específica.

5. CONCLUSIÓN

El presente trabajo ha permitido obtener nuevas evidencias acerca del papel del factor de transcripción LAG-1 y de su posible co-factor HLH-14 en el proceso de diferenciación terminal de las neuronas ADF en el organismo *C. elegans*. Los distintos objetivos del estudio permitieron llegar a las siguientes conclusiones:

a. En primer lugar, se determinó **que el factor LAG-1 se expresa en las neuronas ADF** del nematodo, lo cual es el punto de partida para pensar que pudiese tener una función autónoma celular en las mismas.

b. En segundo lugar, los resultados obtenidos sugieren que **LAG-1 y los factores HLH** (de los cuales HLH-14 es el mejor candidato según las evidencias previas) **activan la expresión de los genes de la vía de la serotonina** (*tph-1, bas-1, cat-1, cat-4* y *mod-5*) **a través de su unión directa** a los sitios CSL y E-box de las regiones promotoras mínimas.

c. Por último, los efectos en la expresión de los genes de la vía de la serotonina en mutantes para el gen *lag-1* sugieren que este factor **es necesario en la activación de los genes *tph-1, bas-1 cat-1, cat-4***.

Durante el trabajo se observó que perder la funcionalidad del factor LAG-1 (mutando los sitios de unión CSL o mutando el propio factor) reducía la expresión de los genes de la vía de la serotonina respecto a las cepas salvajes en las que el factor ejercía su función normal. Esto sugiere que LAG-1 tiene un papel esencial en la activación de los genes de la vía de la serotonina en las neuronas ADF y, por tanto, apoya la hipótesis inicial de que el factor está involucrado en la diferenciación terminal de las neuronas serotoninérgicas ADF en *C. elegans*.

En la introducción del trabajo, se comentó que existían evidencias que señalaban al factor HLH-14 como posible co-factor de LAG-1 en la expresión de los genes de la vía de la serotonina. La mutación de los sitios E-box reveló que estos sitios de unión eran esenciales en la activación de los genes de la vía de la serotonina, confirmando que factores de la familia HLH tienen un papel en la regulación directa de los mismos. Sin embargo, a diferencia de LAG-1 que es el único miembro de la familia CSL en *C. elegans*, se necesitarían más estudios para concluir si es el factor HLH-14 u otro factor de la familia HLH el responsable de la activación de la expresión génica en ADF.

6. BIBLIOGRAFÍA

AVERY, L.; THOMAS, JH. (1997). Feeding and Defecation. *Elegans II*. 2nda edición. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press. Capítulo 24

BAILEY, AM.; POSAKONY, JW. (1995). Suppressor of hairless directly activates transcription of enhancer of Split complex genes in response to Notch receptor activity. *Genes Dev.* 9(21), 2609-22.

BRENNER, S. (1974). The Genetics of *Caenorhabditis Elegans*. *Genetics* 77, 71-79.

BRUMMELTE, S.; MC GLANAGHY, E. et al. (2016) Developmental changes in serotonin signaling: Implications for early brain function, behavior and adaptation. *Neuroscience*, 33, 02-037.

CASSADA, R.C. ; RUSELL, R.L. (1975). The dauerlarva, a post-embryonic developmental variant of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* 46, 326–342.

CHRISTENSEN, S. et al (1996). *lag-1*, a gene required for *lin-12* and *glp-1* signaling in *Caenorhabditis elegans*, is homologous to human CBF1 and *Drosophila* Su(H). *Development*, 122, 1373-83.

FLAMES, N.; HOBERT, O. (2011). Transcriptional control of the terminal fate of monoaminergic neurons. *Annu. Rev. Neurosci.* 34, 153-184.

GREENWALD, I.; HOWARD, H. (2005). *Lin-12/Notch* signaling in *C. elegans*. *Wormbook*.

HOBERT, O. (2008). *Regulatory logic of neuronal diversity: Terminal selector genes and selector motifs*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(51), pp.20067-20071.

HOBERT, O.; CARRERA, I.; STEFANAKIS, N. (2010). *The molecular and gene regulatory signature of a neuron*. *Trends Neurosci.* 33, 435-445.

JARRIAULT, S et al (1995). *Signaling downstream of activated mammalian Notch*. *Nature*, 377, 355-8.

JOHNSON, J.E.; MACDONALD, R.J. (2011). *Notch-independent functions of CSL*. *Top Dev Biol.* 97:55-74.

LAMBIE, E.J.; KIMBLE, J. (1991) *Two homologous regulatory genes, lin-12 and glp-1, have overlapping functions*. *Development.* 112(1):231-40.

MARKAKI, M.; TAVERNARAKIS, N. (2010). *Modeling human diseases in Caenorhabditis elegans*. *Biotechnol. J.* 5, 1261- 1276.

OIKONOMOU, G.; SHAHAM, S. (2011). *The glia of Caenorhabditis elegans*. *Glia.* 59(9):1253-63.

PURSGLOVE, S.E. ; MACKAY, J. P- (2005). *CSL: a notch above the rest*. *Int J Biochem Cell Biol.* 12, 2472-77.

KOPAN, R. et al (2009). *The canonical Notch signalling pathway: unfolding the activation mechanism*. *Cell.* 137(2):216-233.

RIDDLE, D.L. ; BLUMENTHAL, T. et al. (1997) *Origins of the model*.

SHABER, C et al. (1996) . *Notch signaling inhibits muscle cell differentiation through a CBF1-independent pathway*. Development, 122, 3765-73.

STRANGE, K. (2006). *C. elegans methods and applications*. Editorial Human Press. Totowa, New Jersey.

SULSTON, J.E.; HORVITZ, H.R. (1977). *Post-embryonic cell lineages of the nematode, Caenorhabditis elegans*. Dev Biol.,;56(1):110-56

SULSTON, J., DEW, M, BRENNER, S. (1975). *Dopaminergic neurons in the nematode Caenorhabditis elegans* J. Comp. Neurol. 160, 215-226.

WHITE, J.G et al (1986). *The structure of the nervous system of the nematode Caenorhabditis elegans*. Philosophical Transactions of the Royal Society of London B. Biological Sciences 314, 1-340.

WILLIAMNS, B.D., SCHRANK, B. et al. (1992). *A genetic mapping system in Caenorhabditis elegans based on polymorphic sequence-tagged sites*. Genetics 131, 609-624.

Wormbook.org. (2016). *Neurogenesis in the nematode Caenorhabditis elegans*. Disponible en: http://www.wormbook.org/chapters/www_specnervsys.2/neurogenesis.html

WormBook. (2016). Wormbook.org. Visto el 3 de Agosto 2016 <http://www.wormbook.org/>

WormAtlas (2016). WORMATLAS. Org. Visto el 5 de Agosto 2016 <http://www.wormatlas.org/>

ZHANG, F. et al. (2014). The LIM and POU homeobox genes ttx-3 and unc-86 act as terminal selectors in distinct cholinergic and serotonergic neuron types. Development..141(2):422-35.

7. ANEXOS

ANEXO I. Protocolos

Protocolo 1: Preparación de las placas de NGM.

Tabla 1- Componentes de las placas de cultivo de *C. elegans*

COMPONENTE	CONCENTRACIÓN
NaCl	0,05 M
Agar	16 g·L ⁻¹
Peptona	2,5 g·L ⁻¹
MgSO ₄	1M
Colesterol	1 ml·L ⁻¹ en etanol
CaCl ₂	1 M
KPO ₄	1M, pH 6
Nistatina	2,5 mL·L ⁻¹
Estreptomina	0,15 g·L ⁻¹

Método:

1. Mezclar 3 g de NaCl , 17 g de agar , y 2,5 g de peptona en un matraz Erlenmeyer de 2 litros .
2. Añadir 975 ml de H₂O. Cubir la boca del matraz con papel de aluminio y autoclavar 50 min.
3. Añadir 1 ml 1 M CaCl , 1 ml de 5 mg / ml de colesterol en etanol , 1 ml 1 M sulfato de magnesio y 25 ml de tampón 1 M KPO . Agitar para mezclar bien.
4. Utilizando procedimientos estériles, dispensar la solución NGM en placas Petri utilizando una bomba peristáltica. Llenar 2/3 de las placas de Agar.
5. Dejar a temperatura ambiente durante 2-3 días antes de su uso para permitir la detección de contaminantes, y para permitir que el exceso de humedad se evapore. Las placas almacenadas en un recipiente hermético a temperatura ambiente se podrán ser utilizadas durante varias semanas.

Protocolo 2: Siembra de placas NGM

Método:

1. Utilizando una técnica estéril, aplicar aproximadamente 0,05 ml de cultivo líquido de *E.coli* OP50 a placas NGM pequeñas o medianas o 0,1 ml a placas NGM grandes, utilizando una pipeta. Si se desea, la gota se puede extender utilizando la punta de la pipeta o una varilla de vidrio. La extensión creará una capa más grande, que puede ayudar en la visualización de los gusanos. Tenga cuidado de no propagar la capa bacteriana hasta el final a los bordes de la placa; mantenerla en el centro. Los gusanos tienden a pasar la mayor parte del tiempo en las bacterias. Si la capa se extiende a los bordes de la placa de los gusanos pueden trepar por los lados de la placa, secarse y morir.

2. Dejar crecer durante la noche a temperatura ambiente o a 37 ° C durante 8 horas
3. Enfriar a temperatura ambiente las placas antes de la adición de gusanos. Placas sembradas almacenados en un recipiente hermético podrán ser utilizadas hasta después de 2-3 semanas de haberlas sembrado

Protocolo 3: Método de pequeña escala para la eliminación de contaminantes bacterianos o de levaduras utilizando hembras hermafroditas.

Tabla 2- Componentes de la solución de lado *drop bleach*

COMPONENTE	CONCENTRACIÓN
NaOH	1 N
Hipoclorito de sodio	5 %

Método:

1. Haga una mezcla 1: 1 de NaOH 1N: lejía (Tabla 1).
2. Ponga una gota de esta solución en el borde de una placa limpia NGM sembrado con un césped de *E. coli* OP50.
3. Ponga varias hermafroditas con el mayor número posible de huevos en la gota. La solución va a matar a los contaminantes y hermafroditas, pero la cutícula de los embriones los protegerá de la solución. Antes del eclosionado de los embriones, la solución ya habrá sido disipada en la placa.
4. Al día siguiente, las larvas habrán nacido y se encontrarán entre la comida. Transferirlos a una placa limpia NGM sembrado con *E. coli* OP50.

Protocolo 4: Congelación de cepas de *C. elegans*.

Tabla 3- Componentes de la Solución de congelación

COMPONENTE	CONCENTRACIÓN
NaCl	5 M
Agar	0,4 g/100mL ⁻¹
MgSO ₄	1M
Glicerol	
KPO ₄	1M, pH 6

Tabla 4- Componentes del tampón M9

COMPONENTE	CONCENTRACIÓN
Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O	80 mM
KH ₂ PO ₄	22 mM
NaCl	8,5 mM
NH ₄ Cl	0,2 M

Generación de la solución de congelación:

- Solución de congelación (autoclavado)
 - 40 ml 5M NaCl
 - 100 ml 1M KPO₄, pH 6.0
 - 600 ml glicerol
 - Llevar a 2 L con H₂O
- MgSO₄ 1M. Añadir 0,06mL/200mL de la solución de congelación una vez autoclavada.

Solución de congelación + 0,4g de Agar/ 100 mL (y hervir)

Método:

1. Poner la Solución de congelación (*Tabla 3*) + agar en un baño de agua de 50 ° C durante 15'
2. Crecer gusanos hasta que se queden sin comida en 4 o 5 placas Petri. Un día después de que las placas se queden sin comida, con gusanos predominantemente en estadios L1 y L2 (toleran mejor la congelación), están listas para ser congeladas. Parece ser que la comida en el intestino de los gusanos de alguna manera evita que sobrevivan al proceso de congelación.
3. Verter M9 (*Tabla 4*) en una primera placa, agitar brevemente para despegar los gusanos del agar y verter el contenido en la siguiente placa, y repetir el proceso en cada una de las placas sucesivas. Verter el M9 de la última placa en un tubo de centrifuga estéril de 15 ml desechable. Hacer una segunda ronda con el mismo procedimiento.
4. Enfriar el contenido del tubo en hielo durante 10 '. Esto permite que los gusanos precipiten al fondo del tubo.
5. Centrifugar 2 'a 2500 r.p.m para que todos los gusanos queden en el pellet. Retirar a vacío todo menos 2,5 ml del sobrenadante.
6. Añadir 2,5 ml de freezing solution + Agar a lo anterior, mezclar bien, y alícuota de 2 ml cada uno en 2 viales de congelación estériles y 1 ml en un eppendorf para ser utilizado como una prueba (Nunca criotubos). Todos ellos deberán estar bien identificados con número de cepa y genotipo.
7. Congelar lentamente a -80 ° C. Esto se logra mediante la colocación de los viales en un bastidor de espuma de poliestireno que se tapa con otro bastidor invertida en la parte superior de la primera y es fijado con bandas de goma, y colocando en un congelador -80 ° C.

Protocolo 5: Descongelación de cepas de *C. elegans* congeladas.

Método:

1. Retirar un vial del congelador (preferentemente se utilizan los eppendorfs que se congelan como prueba y, en su defecto, se utilizan los criotubos) y deje que se descongele a temperatura ambiente hasta que todo el hielo se ha convertido en líquido.
2. Se vierte el contenido sobre una o dos placas de NGM con *E. coli* OP50. Debería ver gusanos moviendo después de sólo unos pocos minutos.
3. Después de 2-3 días, transferir de 10-15 animales a placas nuevas para proporcionarles nueva comida y mantenerlos.

Protocolo 6: PCR QuikChange[®] Site-Directed Mutagenesis Kit de Stratagene.

Reactivos:

- Buffer de PCR a 10X
- dNTP
- QSolution
- ddH₂O
- DNA (molde)
- Cebadores directo y reverso
- DNA polimerasa *PfuTurbo*

Método:

1. Preparar las muestras como se indica a continuación:

Mix:

5 µl de reaction buffer 10X

1 µl de mix de dNTP

3 µl de QSolution

ddH₂O a un volumen final de 50 µl

Añadir:

1 µl de DNA (molde) a 20ng/ µl

2 µl de mix de primers forward y reverse

0,5 µl *PfuTurbo*

Realizar la PCR con los siguientes parámetros:

Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	95 °C	30 segundos
12-18	95°C	30 segundos
	55°C	1 minuto
	68°C	1 minuto/kb plásmido

Protocolo 7: Extracción de DNA plasmídico.

Tabla 5- Componentes de la solución P1 para Miniprep

COMPONENTE	CONCENTRACIÓN
Tris-HCl	50 mM
EDTA	10 mM, pH 8
RNAasa A	0,05 g·L ⁻¹

Tabla 6- Componentes de la solución P2 para Miniprep

COMPONENTE	CONCENTRACIÓN
NaOH	0,2 M
SDS	1 %

Tabla 7- Componentes de la solución N3 para Miniprep

COMPONENTE	CONCENTRACIÓN
Guanidina hidroclorido	5 M
Acetato de Potasio	0,5 M; pH 4.2

Tabla 8- Componentes de la solución PE+ Etanol para Miniprep

COMPONENTE	CONCENTRACIÓN
NaCl	20 mM
Tris-HCl	2 mM, pH 7.5
Etanol	80 %

Tabla 9- Componentes de la solución PB + etanol para Miniprep

COMPONENTE	CONCENTRACIÓN
Guanidina hidrocloreto	5 M
Tris-HCl	20 mM, pH 6.6
Etanol	38 %

Método:

1. Verter las bacterias transformadas en eppendorfs de 2 mL y centrifugar a máxima velocidad (13000 rpm).
2. Desechar el sobrenadante y resuspender el pellet con 250 µl de la solución P1 (Tabla 5).
3. Añadir 250 µl de Solución P2 (Tabla 6) y mezclar invirtiendo. Dejar actuar durante 5 minutos como máximo.
4. Añadir 350 µl de la solución N3 (Tabla 7) y mezclar invirtiendo.
5. Centrifugar 10 minutos a 13000 rpm. Pasar el sobrenadante de los eppendorfs y ponerlo en la columna de Miniprep.
6. Centrifugar 60 segundos a 13000rpm y eliminar el sobrenadante.
7. Lavar añadiendo 500 µl de PB (Tabla 9). Centrifugar 60s a 13000rpm y descartar el sobrenadante.
8. Añadir 750 µl de tampón PE (Tabla 8). Centrifugar 60s a 13000rpm y descartar el sobrenadante.
9. Poner la columna en un eppendorf nuevo de 1,5 mL. Añadir 50 µl de tampón EB al centro de la columna para eluir el ADN. Esperar 1 minuto.
11. Centrifugar 60 segundos a 13000rpm.

Protocolo 8: Preparación del lisado para la extracción de DNA genómico

Tabla 10- Componentes de la solución de lisis de nematodos

COMPONENTE	CONCENTRACIÓN
KCl	50 mM
Tris-HCl	10 mM, pH 8.3
MgCl ₂	2,5 mM
Triton X-100	0,45 % (v/v)
Tween 20	0,45 % (v/v), Sigma

Método:

1. Crecer la placa para obtener muchos gusanos sin que se quede sin comida
2. Añadir 600 µl de tampón M9 1X (Tabla 4) para lavar la placa y recuperar los gusanos
3. Recoger 200 µl y pasarlo a un tubo de PCR
4. Poner en hielo 5 minutos, para que queden depositados en el fondo
5. Eliminar el tampón M9

6. Añadir 100 µl de la solución tampón de lisis (*Tabla 10*) + Proteinasa K a una dilución 1:100
7. Incubar a -80 °C durante 20 minutos
8. Incubar a 65°C durante 4h + incubar a 95°C durante 30 segundos

Protocolo 9: Purificación de productos de PCR.

Método:

1. Añadir a los productos de PCR 250 µL de disolución PB con etanol (*Tabla 9*)
2. Pasar la solución a una columna Miniprep
3. Centrifugar 1' a máxima velocidad (13000 r.p.m)
4. Desechar el líquido y añadir 700 µL de PE (*Tabla 8*)
5. Centrifugar 1' a máxima velocidad (13000 r.p.m)
6. Desechar líquido y centrifugar 1' a máxima velocidad (13000 r.p.m) para secar la columna
7. Pasar la columna a un eppendorf limpio y añadir gota a gota 30 µL de H₂O para eluir el DNA
8. Centrifugar 1' a máxima velocidad y recoger el líquido eluido
9. Recoger el eluido del paso 8 y volver a pasarlo por la columna (opcional)
10. Centrifugar 1' a máxima velocidad

Anexo II. Secuencias.

Mutantes para *lag-1*:

EL301 (*lag-1(om19)IV*):

>om13salvaje:

aaattgaaatgtgaagcattccagacgtttgaacattgttctaaaacaaaaatcatgcaaaaatccgaaaaatccggaaaaataattaatca
attgtccgagagaagtacacggccgagaatcacatgaaactcattgacgacgaaatgaaatcagataagcggcaagaaatgaaatgtgga
atgttctgatgtgagcaatgagaaaatgaaagacaaatgaattaactgattataaactaataaactgaatttcaggtcgataagcagcaag
taattctgatgcatcgtgtagtagaagaaccagtctcaacttcacaaatgcatcctcaaatgattgacaatgagctcgtctatctttgtctcagt
catgacaagattatcaacatcaagccacagctatcaatgagcatcgtcatcagatcaacgatggagctgctggacaatcatctcactgataa
ggctgaatcagattctcgaGcagatgggacaggttgcgaaccgatttctcatgtccagttgctggttcacttgaagtgtgagacatggtga
agcgtcgcgtgctgagttgcatggaagagatttaagccaaatctgaaagttggttggagcaacccgggtgaaacgacgttcagaagtgaag
agagttctcattgttcgataaccctgtgagtcaggttcgaaatgagcaaaactcactggatgtttacgaataggacaaccggcgatgttgaggtaa
tatattggatttgaacacaatgagaatagagttctgaattcagaattatcacaaaagaaaaacgaaaaaatcgagctatgtttaaattgtgatt
ttcagtttggctgatttctggttggattcgtccagaatgagaactgctaggccaatcttatttggaggggaattcaaacatccagtcacaatg
aa aaatttcatttataattatgttgaattaacgatcgatcc

>om13 om13

aaattgaaatgtgaagcattccagacgtttgaacattgttctaaaacaaaaatcatgcaaaaatccgaaaaatccggaaaaataattaatca
attgtccgagagaagtacacggccgagaatcacatgaaactcattgacgacgaaatgaaatcagataagcggcaagaaatgaaatgtgga
atgttctgatgtgagcaatgagaaaatgaaagacaaatgaattaactgattataaactaataaactgaatttcaggtcgataagcagcaag
taattctgatgcatcgtgtagtagaagaaccagtctcaacttcacaaatgcatcctcaaatgattgacaatgagctcgtctatctttgtctcagt
catgacaagattatcaacatcaagccacagctatcaatgagcatcgtcatcagatcaacgatggagctgctggacaatcatctcactgatag
gctgaatcagattctcgaAacgatgggacaggttgcgaaccgatttctcatgtccagttgctggttcacttgaagtgtgagacatggtgaa
gctcgcgtgctgagttgcatggaagagatttaagccaaatctgaaagttggttggagcaacccgggtgaaacgacgttcagaagtgaaga
gagttctcattgttcgataaccctgtgagtcaggttcgaaatgagcaaaactcactggatgtttacgaataggacaaccggcgatgttgaggtaat
atattggatttgaacacaatgagaatagagttctgaattcagaattatcacaaaagaaaaacgaaaaaatcgagctatgtttaaattgtgatt
ttcagtttggctgatttctggttggattcgtccagaatgagaactgctaggccaatcttatttggaggggaattcaaacatccagtcacaatg
aaaatttcatttataattatgttgaattaacgatcgatcc

JK1227 (*lag-1(q385)/dpy-13(e184) unc-24(e138) IV*):

>q385 salvaje

aaatgaaatgattataaactaataaactgaatttcaggtcgataagcagcaagtaattcttgatgcatcgtgtagtagaagaaccagtctc
tcaacttcacaaatgtgattcctcaaatgattgacaatgagctcgtctatctttgtctcagtcagatgacaagattatcaacatcaagccacagctatc
aatgagcatcgtcatcagatcaacgatggagctgctggacaatcatctcactgataaggctgaatcagattcttcgaagcagatgggacaggt
tgcaaccgatttctcatgtccagttgctggttcacttgaagtgtgagacatggtgaagcgtcgcgtgctgagttgcatggaagagatttaag
ccaaatctgaaagttggttggagcaacccgggtgaaacgacgttcagaagtgaagagagttctcattgttcgataaccctgtgagtcaggtt
cgaatgagcaaaactcactGgatgtttacgaataggacaaccggcgatgttgaggtaatatattggatttgaacacaatgagaatagagttct
gaattcagaattatcacaaaagaaaaacgaaaaaatcgagctatgtttaaattgtgattttcagtttggctgatttctggttggattcgtcca
gaatgagaactgctaggccaatcttatttggaggggaattcaaacatccagtcacaatgaaaaatttcatttataattatgttgaattaacgatc
gatccgtgaatgttgcactgaaaaagaggcgaagcattttccgcaaccctgcccacaaattttctcttttctgcccgaagagagaaaa
accgtgacatagggttgcgaattacgccccctctctctttgcgacctgattgggttaattcaatagtaaagtcgaatgttcttcttattc
gattttcttgttttgaactatctgaattcaga

>q385 q385

aaatgaaatgattataaactaataaactgaatttcaggtcgataagcagcaagtaattcttgatgcatcgtgtagtagaagaaccagtctc
tcaacttcacaaatgtgattcctcaaatgattgacaatgagctcgtctatctttgtctcagtcagatgacaagattatcaacatcaagccacagctatc
aatgagcatcgtcatcagatcaacgatggagctgctggacaatcatctcactgataaggctgaatcagattcttcgaagcagatgggacaggt
tgcaaccgatttctcatgtccagttgctggttcacttgaagtgtgagacatggtgaagcgtcgcgtgctgagttgcatggaagagatttaag

ccaaatctgaaagtt tggtttgagcaaccccggttgaaacgacgttcagaagtgagagagtcttcattgttcgataccacctgtgagtcaggt
tcgaaatgagcaaacactactAgatgtttacgaataggacaaccggcgatgttgaggaatattggatttggaaacacaatgagaatagattct
gaattcagaattatcacaagaagaaacgaaaaaatcgagctattttaaagtgtattttcagtttggctgatttctgttggattcgctcca
gaatgagaactgctaggccaatcttatttggaggggaattcaaacatccagtcacaatgaaaaattcattattaattatgttgaattaacgatc
gatccgtgaatttgcactgaaaaagaggcgaagcattttccgcaaccctgcggcacaatttttctcttttctgtccgaaaaaggagaaaa
accgtgacatagggtgcgaaattacgccccgctctctcttgcgaccctgattgggttaattcaatagtaaagtcgaattttcattcttattc
gatttttcttgttttgaactatctgaattcaga

Promotores mínimos salvajes:

>mod-5prom8

aataaattaattgaattttcaaaacaagttctcaaaaactaggaaaaaaaggcgaaatccttttcttgaattttttttgaaaattcaattgg
gaaaatatttgagccgctcagtgactaaaaatccattcaaaaatagttgaaaatatttaaaaaattcaaaattctcaaaaacaaaattca
attttatttctttccgctttttcagcccccttccacaccagaaatccccaaaaacctaaccacaatgaatattcccacgcatgtttccTT
TTTTCACTTCAATATACTACTCATTCTGATAACTAGAAGAAAAATTAATAATCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAG
GAAATCCAATCTGTGCTTGCCTGTGAGCCCCCTTCCCTCCCTGCCCCAAAAAAAAAAATGACGGATTTCACTC
ATTTCTACCCATTAATCATTTTCTCTCTTTCTCTCTCTTTCTTTTTATACTTTTCTTGAGCCATTTTCATAGA
TTGAGGTCCCCCAAATAGATTCCCCATTGTGTAGATGATTGTTCCATCTGAATCTATACTTTTCGCTGATGAG
CTTCCAATTCTGACTGTATTGCAGGTGAGaaaatatcaagataa

>cat-4prom6

gtgagtgaaggtctatatcattcctcgctgatttacgatccttctctgtatctcctcagaccagtcacttttcttttctgttgcgctatccacct
aatcaatcggtttcatttctttttacatgttcttttgttgataaataaattattctctccacattttcctgaatacctagaagtgtgcatgaa
ggaatggcggaaaacgattgatgtatgggacgacgtctccgttcttttcgatttttctattttctatttttctatttttccataagtg
ggaaaagatgatgaagtctatccattcgactagattgatttcttctgtcccttattttgctatttttccagaatacctttcataatacatgacgt
gtgtaccttttttctgaatttcttcttctgttggacattgcacatattcggtttcatccggcaattattgaaatgtctatccttcttttgcgccc
tacgttctcagcttcttaagatttaccacggctcatttcaatatcacctatttctactactcaatcaatgtttcAGGCTTACCCA
CTCTATCAACATCATAATATC

>bas-1prom7

gtatcggaaatgtgctcgggtcccatagcgaattatatttctattttcttattttcccctcatttcttattttctacctcctcctgatctctgtcaatc
gtgggaaatcttttgcctcagctttacaattttgtcgaacttccagTAGTAGTTCGG

>cat-1prom37

GACATacctccttctccaagtttattgaatgttgattctgaaactgagagaaaaatgaaaggaaaattgtgagaaatgtgataacaaaactg
agagtctatgagctatagcgaagaataagcgagcaaggggacgttttagattcccacggtctgaaaaattgattgatattttatgc

>tph-1prom17

ggctcatttattctcccacggaaacctgacagcaaaaataatagagtgGCCTTATTCGACTCATTTTCGTTTTTTTTTCTCCGG
ATATTAGATTGT