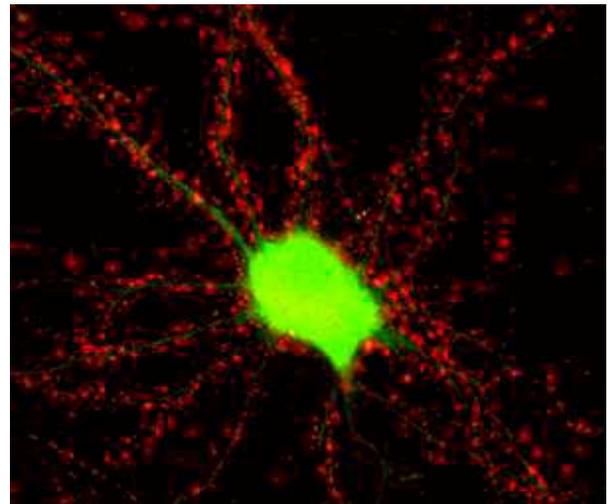
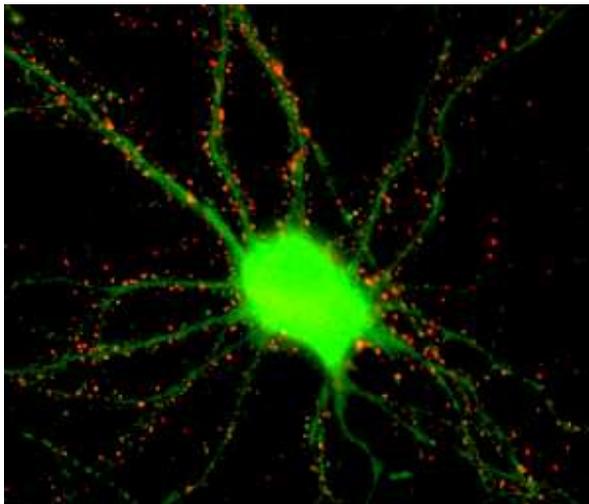


Fernando CALAHORRO NÚÑEZ

**Genética del Autismo. *Caenorhabditis elegans*  
como modelo experimental en el  
estudio de la función sináptica neuronal.**

TESIS DOCTORAL



Departamento Genética

Facultad de Ciencias

UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

2011

TITULO: *Genética del autismo. Caenorhabditis elegans como modelo experimental en el estudio de la función sináptica neuronal*

AUTOR: *Fernando Calahorro Núñez*

---

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2011  
Campus de Rabanales  
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A  
14071 Córdoba

[www.uco.es/publicaciones](http://www.uco.es/publicaciones)  
[publicaciones@uco.es](mailto:publicaciones@uco.es)

---

ISBN-13: 978-84-694-5926-3



UNIVERSIDAD DE CORDOBA

**Facultad de Ciencias**

**Departamento de Genética**

**Genética del Autismo: *Caenorhabditis elegans* como modelo  
experimental en el estudio de la función sináptica neuronal**

Trabajo realizado en el Departamento de Genética de la Universidad de  
Córdoba para optar al grado de Doctor en Biología por el licenciado

**Fernando Calahorro Núñez**

Dirigido por  
**Dr. Manuel Ruiz Rubio**  
Córdoba 2011

**Manuel Ruiz Rubio**, Catedrático de Universidad, Departamento de Genética de la Universidad de Córdoba.

**Informa:**

Que el trabajo titulado “**Genética del Autismo: *Caenorhabditis elegans* como modelo experimental en el estudio de la función sináptica neuronal**” realizado por Don Fernando Calahorro Núñez bajo su dirección, puede ser presentado para su exposición y defensa como Tesis Doctoral en el Departamento de Genética de la Universidad de Córdoba.

Y para que así conste, expedimos el siguiente informe

Córdoba, 28 de Abril de 2011



**Fdo: Manuel Ruiz Rubio**  
**Departamento de Genética**  
**Universidad de Córdoba**



**TÍTULO DE LA TESIS: Genética del Autismo: *Caenorhabditis elegans* como modelo experimental en el estudio de la función sináptica neuronal.**

**DOCTORANDO/A: Fernando Calahorro Núñez**

**INFORME RAZONADO DEL LOS DIRECTOR DE LA TESIS**

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

Esta tesis doctoral constituye el primer trabajo experimental sobre genética del autismo en la Universidad de Córdoba. Se ha realizado siguiendo dos estrategias diferentes. En la primera se analizaron polimorfismos de genes implicados en el metabolismo de neurotransmisores y la asociación de éstos con el autismo, utilizando una muestra homogénea de pacientes diagnosticados con este trastorno en la Unidad de Salud Mental Infanto Juvenil del Hospital Universitario Reina Sofía (Calahorro et al., 2009, Res. Autism Spect. Disord. 3, 438-443). La segunda estrategia, se ha llevado a cabo con el nematodo *Caenorhabditis elegans*, una especie que presenta muchas ventajas experimentales para estudios sobre comportamiento debido a la simplicidad de su sistema nervioso. Este organismo es a nuestro entender, la primera vez que se utiliza como modelo experimental en la Universidad de Córdoba, y esta tesis ha sido pionera a nivel internacional en estudiar genes relacionados con el autismo en el nematodo (Calahorro et al, 2009, J.Vis. Exp., 34, doi: 10.3791/1616). La hipótesis de partida consistió en que *C. elegans* permitiría establecer un escenario donde se podrían analizar mecanismos neurobiológicos básicos implicados en este trastorno. Los resultados permiten concluir que es una alternativa prometedora, ya que uno de los componentes sinápticos humanos analizados relacionados con el autismo es funcional en el nematodo.

Los datos obtenidos en la primera estrategia experimental se han publicado en la revista Research in Autism Spectrum Disorder (Journal Citation Report, Social Science Edition, Citation Impact Factor en 2009: 2,267). Hasta la fecha solo se han publicado algunos datos preliminares de los experimentos con *C. elegans* en las revistas Journal of Visualized Experiments ((2009) 34, <http://www.jove.com/details.php?id=1616>, PMID: 20010541,) y Worm Breeding Gazette (2009, 18, 1, 25; y 2010, 18, 2, 9); la mayor parte de los resultados presentados en esta tesis están en preparación para su publicación.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 18 de Abril de 2011

Firma del director

Fdo.: Manuel Ruiz Rubio

“In studying the genetics of behaviour, it is difficult, if not impossible, to go directly from the gene to behaviour, because there is no simple mapping that connects the two. In my paper, I put it in this way: *Behaviour is the result of a complex ill-understood set of computations performed by nervous systems and it seems essential to decompose the question into two: one concerned with the question of the genetic specification of nervous systems and the other with the way nervous systems work to produce behaviour* (Brenner, 1974). Thus, just as the structure and function of protein molecules is the necessary connection between the genes and metabolism, the link between genes and behaviour resides in understanding the structure of nervous systems and how they are constructed. These are questions of anatomy and embryological development. This set the requirements for the experimental organism as one which was not only suitable for genetical study in the laboratory but also allowed the structure of the nervous system to be accurately defined. Since a nervous system is essentially a cellular network, we had to be able to observe junctions between cells and their processes and this could only be achieved with the electron microscope which has the necessary resolution. Since the electron microscope provides only a small window because of its high magnification, we needed a small animal which would also need to have a nervous system with a small number of cells. After some searching, my choice finally settled on the small nematode, *Caenorhabditis elegans*.”

Sydney Brenner  
NATURE'S GIFT TO SCIENCE  
Nobel Lecture, December 8, 2002

## **Agradecimientos**

En primer lugar quiero dar las gracias de todo corazón a Manolo, algo más que un director de tesis, un gran amigo. Gracias por darme la oportunidad de trabajar juntos, y confiar en mí tanto en ciencia como personalmente. Gracias por haberme hecho crecer como científico y madurar como persona en ciertos aspectos de la vida, por haberme enseñado a divertirme con la ciencia, a hacerme que me sudaran las manos y me emocionara con los experimentos. Y sobre todo gracias por confiar en mí, y haber estado juntos en la aventura del gusano. Siempre estaré agradecido con el trato más allá del laboratorio que me has brindado durante este tiempo. Gracias por haber hecho un sueño realidad.

Gracias a Encarna, por todo su apoyo y su cariño mostrado hacia mi en todo momento. Gracias por preocuparte siempre por mí.

Gracias a todos y cada una de las personas que han estado a mi lado este tiempo, y me han ayudado en este trabajo. Muy especialmente a Antonio Miranda Vizuite, Julián Cerón y Juan Cabello por sus consejos y asistencia técnica.

Y por supuesto gracias a las dos mujeres más importantes de mi vida: mi tía Celi y mi madre. Gracias tita, por enseñarme a leer con ese precioso libro que aún conservo, por haberme forjado una integridad personal a lo largo de los años, por haberme hecho crecer como persona mirando hacia mi interior, por la filosofía que me has inculcado. Gracias por haberme transmitido tu sensibilidad por las cosas simples de la vida. Gracias por tu amor.

Gracias mama y papa, por todo y por tanto; no tengo palabras de agradecimiento hacia vosotros.

## Glosario

- aBoc:** Contracción anterior del cuerpo.
- ADI-R:** Autism Diagnostic Interview Revised.
- cDNA:** DNA copia.
- DiI:** 1,1',di-octadecyl-3,3,3'3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate.
- DMP:** Programa motor de la defecación.
- dNTPs:** Deoxinucleótidos trifosfato.
- DQ:** Developmental Quotient.
- DSM-IV:** Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorder Classification.
- dsRNA:** RNA de doble cadena.
- Exp:** Expulsión.
- GABA:** Ácido gamma-aminobutírico.
- GFP:** Green Fluorescen Protein.
- GWAS:** Genome-Wide Association Studies.
- IPTG:** Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside.
- IQ:** Intelligence Quotient.
- KDa:** Kilodaltons.
- LA:** Luria-bertani agar.
- LB:** Luria-Bertani.
- NMDA:** N-methyl D-aspartate.
- NGM:** Nematodo Grow Medium.
- Pb:** Par(es) bases.
- pBoc:** Posterior body muscle contraction.
- PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa.
- PTZ:** Pentilentetrazole.
- p/v:** Relación peso/volumen.
- RMSD:** Root Mean Square Desviation.
- RNAi:** Interferencia por RNA.
- SDS:** Sodium dodecil sulfato.
- TDT:** Transmission DisequilibriumTest.
- v/v:** Relación volumen/volumen.
- VNTR:** Variable Number Tandem Repeat.

## Índice general.

<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>INTRODUCCIÓN GENERAL</b> .....	4
<b>I. El autismo</b> .....	5
1. Descripción del espectro del trastorno autista. ....	5
2. Autismo y su relación con la función sináptica. ....	6
2.1. Conexión sináptica y autismo: neuroliguinas y neurexinas .....	7
2.1.1. Neurexinas .....	7
2.1.2. Neuroliguina .....	9
2.1.3. Homología en <i>C. elegans</i> de los genes <i>NRXN</i> y <i>NLGN</i> .....	10
<b>II. <i>Caenorhabditis elegans</i> como organismo modelo</b> .....	11
1. Ventajas y características .....	11
2. Sistema nervioso .....	15
2.1. Neurotransmisión .....	16
<b>OBJETIVOS</b> .....	18
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	20
<b>I. Materiales</b> .....	21
1. Material Biológico .....	21
1.1. Bacterias .....	21
1.2. Muestras de sujeto diagnosticados con autismo .....	21
1.3. Nematodos: <i>Caenorhabditis elegans</i> .....	22
2. Medios de cultivo .....	22
2.1. Medios de cultivo de <i>Escherichia coli</i> .....	23
2.2. Medios de cultivo de nematodos ( <i>C. elegans</i> ) .....	23
2.3. Antibióticos .....	23
3. Vectores de clonación .....	24
4. Oligonucleótidos sintéticos .....	24

4.1. Detección de polimorfismos en humanos .....	25
4.2. Detección de alelos mutantes en <i>C. elegans</i> .....	25
4.3. Clonación del gen <i>mCherry</i> .....	25
4.4. Clonación de promotores de los genes <i>nrx-1</i> y <i>nlg-1</i> de <i>C. elegans</i> , y cDNAs de los genes neuroliquina de <i>C. elegans</i> y humano .....	26
4.5. Oligonucleótidos universales .....	27
4.6. Mutagénesis dirigida de los genes <i>nlg-1</i> de <i>C. elegans</i> , <i>Nlgn1</i> de rata y <i>NLGN1</i> humano .....	28
5. Programas para el análisis de secuencias .....	28
<b>II. Métodos</b> .....	29
1. Crecimiento y mantenimiento de organismos .....	29
1.1. Bacterias .....	29
1.2. Nematodos: <i>C. elegans</i> .....	29
2. Manipulación de ácidos nucleicos .....	30
2.1. Aislamiento de ácidos nucleicos .....	30
2.2. Tratamiento enzimático de ácidos nucleicos .....	32
2.3. Electroforesis de ácidos nucleicos .....	32
2.4. Cuantificación de ácidos nucleicos .....	33
3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	33
3.1. PCR estándar. ....	34
3.2. PCR para amplificar ADN genómico de <i>C. elegans</i> . ....	34
3.3. PCR para el genotipado de polimorfismos .....	35
3.4. PCR con polimerasa del kit Expand Long Template PCR System (Roche) .....	36
3.5. Mutagénesis mediante superposición .....	37
4. Manipulación de proteínas .....	38
4.1 Determinación de la concentración de proteínas .....	38
4.2 Electroforesis desnaturante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) .....	39
4.3. Detección y análisis de proteínas. Western blot .....	40
5. Observación microscópica de <i>C. elegans</i> .....	40
6. Transformación genética .....	41
7. Construcciones génicas .....	43

7.1. Clonación del gen <i>mCherry</i> .....	43
7.2. Clonación de los promotores de los genes <i>nrx-1</i> y <i>nlg-1</i> de <i>C. elegans</i> .....	44
7.3. Clonación del gen <i>nlg-1</i> de <i>C. elegans</i> .....	44
7.4. Clonación del gen <i>Nlgn1</i> de rata .....	45
7.5. Clonación del gen <i>NLGN1</i> humano .....	45
7.6. Clonación de los genes <i>nlg-1</i> , <i>Nlgn1</i> y <i>NLGN1</i> mutados .....	46
8. Experimentos de comportamiento en <i>C. elegans</i> .....	46
- Ciclo de defecación .....	46
- Respuesta a drogas .....	47
Sensibilidad a aldicarb	
Sensibilidad a levamisol	
Sensibilidad a pentilentetrazol	
- Medida de la locomoción .....	48
- Capacidad exploratoria (“ <i>roaming</i> ”) .....	48
- Cuantificación de la sensibilidad mecanosensorial .....	49
- Sensibilidad al estrés osmótico .....	50
9. ARN de interferencia (ARNi) .....	51
10. Métodos bioinformáticos .....	52
- Modelado estructural de proteína .....	52

## **RESULTADOS Y CONCLUSIONES** .....53

### **I. Estudio de polimorfismos genéticos implicados en el metabolismo de neurotransmisores de un grupo homogéneo de pacientes diagnosticados con autismo** .....54

1. Frecuencias genotípicas y alélicas de polimorfismos en los genes <i>SLC6A4</i> , <i>DAT1</i> , <i>DRD4</i> y <i>MAO-A</i> en pacientes con autismo, sus padres y la población control .....	55
2. Análisis de asociación de polimorfismos de los genes <i>SLC6A4</i> , <i>DAT1</i> , <i>DRD4</i> y <i>MAO-A</i> con el autismo .....	56
3. Análisis de transmisión preferencial de polimorfismos de los genes <i>SLC6A4</i> , <i>DAT1</i> , <i>DRD4</i> y <i>MAO-A</i> . .....	58
4. Consideraciones sobre estrategias experimentales para el estudio genético del autismo .....	59

### **II. Caracterización de deleciones en mutantes de *C. elegans* deficientes en neurexina y neuroligina** .....60

1. Análisis bioinformático de mutaciones en los genes <i>nrx-1</i> y <i>nlg-1</i> .....	60
---	----

1.1. Descripción de las mutaciones <i>nrx-1 (ok1649)</i> y <i>nrx-1 (tm1961)</i> .....	60
1.2. Descripción de las mutaciones <i>nlg-1 (ok259)</i> y <i>nlg-1 (tm474)</i> .....	62
1.3. Elección de las estirpes de <i>C. elegans</i> de los genes <i>nrx-1</i> y <i>nlg-1</i> para realizar los ensayos de comportamiento y rescate. ....	63
2. Silenciamiento de los genes <i>nrx-1</i> y <i>nlg-1</i> mediante ARN de interferencia (ARNi) .....	64
<b>III. Caracterización fenotípica de mutantes de <i>C. elegans</i> deficientes en neurexina y neuroliquina</b> .....	65
1. La neurexina y la neuroliquina afectan de forma sinérgica al ritmo de defecación .....	65
1.2. Sensibilidad a aldicarb, levamisol y pentilentetrazol .....	68
2. Los mutantes en los genes que codifican neurexina o neuroliquina son deficientes en las rutas dopaminérgica y serotoninérgica en respuesta a la presencia de alimento .....	70
3. Definición de una nueva característica fenotípica: capacidad de exploración o “ <i>exploring</i> ” .....	73
- Análisis cualitativo de la capacidad de exploración (“ <i>exploring</i> ”) .....	74
- Análisis cuantitativo de la capacidad de exploración (“ <i>exploring</i> ”) .....	75
4. Las estirpes deficientes en neurexina y neuroliquina presentan el fenómeno de habituación a estímulos mecanosensoriales anticipadamente. ....	76
5. Las estirpes deficientes en neuroliquina son defectivas en la detección de estrés osmótico, capacidad que recuperan en ausencia de neurexina. ....	79
<b>IV. Estudio de la expresión de los genes neurexina y neuroliquina en <i>C. elegans</i></b> .....	83
1. Expresión de los genes <i>nrx-1</i> y <i>nlg-1</i> de <i>C. elegans</i> en las neuronas de los ganglios de la cabeza .....	83
2. Expresión de los genes <i>nrx-1</i> y <i>nlg-1</i> de <i>C. elegans</i> en las neuronas del cordón nervioso .....	89
3. Coexpresión de los genes <i>nrx-1</i> y <i>nlg-1</i> de <i>C. elegans</i> .....	91
<b>V. Rescate funcional de un mutante de <i>C. elegans</i> deficiente en neuroliquina por <i>NLGN1</i> murina y humana</b> .....	94
1. Estudio comparativo de las neuroliquinas humanas y rata con la que codifica el gen <i>nlg-1</i> de <i>C. elegans</i> .....	94
1.1. Interacción entre neurexinas y neuroliquinas .....	95
1.2. Interacción entre neuroliquinas .....	97
1.3. Homología entre la neuroliquina de <i>C. elegans</i> y la de mamíferos .....	98
2. Construcciones traduccionales de rescate con los genes <i>NLGN1</i> humano y <i>Nlgn1</i> de rata, y obtención de organismos transgénicos .....	104
3. Expresión de las proteínas neuroliquina 1 humana y de rata en mutantes <i>nlg-1</i> en <i>C. elegans</i> .....	107
3.1. Expresión de la proteína neuroliquina 1 humana en <i>C. elegans</i> .....	107
3.2. Expresión de la proteína neuroliquina 1 de rata en <i>C. elegans</i> .....	108

4. Rescate de fenotipos en mutantes de <i>C. elegans</i> deficientes en <i>nlg-1</i> .....	109
5. Efecto de mutaciones en los genes <i>NLGN1</i> y <i>nlg-1</i> en su funcionalidad .....	112
<b>CONCLUSIONES</b> .....	120
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	122

## Índice de Figuras.

### Introducción

<b>Figura 1.</b> Estructuras de alpha y beta-neurexinas. ....	8
<b>Figura 2.</b> Estructura de las neuroliquinas. ....	9
<b>Figura 3.</b> Comparación de la estructura de dominios funcionales de las proteínas alfa-neurexina1 y neuroliquina-1 de humana y de <i>C. elegans</i> . ....	11
<b>Figura 4.</b> Imagen de microscopía de barrido de dos individuos adultos, hermafrodita y macho de <i>C. elegans</i> . ....	12
<b>Figura 5.</b> Ciclo de vida de <i>Caenorhabditis elegans</i> . ....	13

### Material y métodos

<b>Figura 1.</b> Esquema de la técnica de mutagénesis mediante superposición. ....	38
<b>Figura 2.</b> Esquema que representa el ensayo de sensibilidad mecanosensorial. ....	49
<b>Figura 3.</b> Dibujo esquemático de las placas de Petri utilizadas para el análisis de exploración. ....	50
<b>Figura 4.</b> Diseño esquemático de las placas de petri utilizadas en el experimento de respuesta al choque osmótico con fructosa. ....	50
<b>Figura 5.</b> Representación esquemática de la técnica ARNi <i>feeding</i> . ....	51

### Resultados

#### 2. Caracterización fenotípica de mutantes de *C. elegans* deficientes en neurexina y neuroliquina.

<b>Figura 1.</b> Localización de mutaciones en el gen <i>nrx-1</i> de <i>C. elegans</i> . ....	62
<b>Figura 2.</b> Modelo tridimensional teórico de la proteína NRX-1 de <i>C. elegans</i> . ....	62
<b>Figura 3.</b> Localización de mutaciones en el gen <i>nlg-1</i> <i>C. elegans</i> . ....	63
<b>Figura 4.</b> Modelo tridimensional teórico de la proteína NLG-1 de <i>C. elegans</i> . ....	64
<b>Figura 5.</b> Localización de los fragmentos utilizados en el silenciamiento de los genes <i>nrx-1</i> y <i>nlg-1</i> mediante RNAi. ....	65

#### 3. Caracterización fenotípica de mutantes de *C. elegans* deficientes en neurexina y neuroliquina.

<b>Figura 1.</b> Diagrama representativo del ciclo de defecación de <i>C. elegans</i> . ....	66
<b>Figura 2.</b> Representación esquemática de los músculos entéricos y las motoneuronas AVL y DVB. ....	67
<b>Figura 3.</b> Medida de la duración del ciclo de defecación de mutantes <i>nrx-1</i> , <i>nlg-1</i> y <i>nrx-1;nlg-1</i> . ....	67
<b>Figura 4.</b> Respuesta de los mutantes <i>nrx-1</i> , <i>nlg-1</i> y <i>nrx-1;nlg-1</i> a aldicarb y levamisol. ....	69
<b>Figura 5.</b> Respuesta de los mutantes <i>nrx-1</i> , <i>nlg-1</i> y <i>nrx-1;nlg-1</i> a pentilentetrazol (PTZ) ....	70
<b>Figura 6.</b> Esquema de la modulación de las ondas corporales en <i>C. elegans</i> . ....	71
<b>Figura 7.</b> Ruta dopaminérgica y serotoninérgica de mutantes <i>nrx-1</i> , <i>nlg-1</i> y <i>nrx-1;nlg-1</i> . ....	72

<b>Figura 8.</b> Ensayo cualitativo de la capacidad exploratoria (“ <i>exploring</i> ”).	74
<b>Figura 9.</b> Dibujo esquemático de las placas de Petri utilizadas para el análisis de exploración.	75
<b>Figura 10 y 11.</b> Cuantificación de la capacidad exploratoria (“ <i>exploring</i> ”).	76
<b>Figura 12.</b> Localización esquemática de las seis neuronas mecanosensoras en <i>C. elegans</i> .	77
<b>Figura 13.</b> Cuantificación de la respuesta al contacto mecánico en mutantes <i>nrx-1</i> , <i>nlg-1</i> y <i>nrx1;nlg-1</i> .	78
<b>Figura 14.</b> Análisis de la respuesta de habituación de los mutantes <i>nrx-1</i> , <i>nlg-1</i> y <i>nrx1;nlg-1</i> .	79
<b>Figura 15.</b> Respuesta al estrés osmótico de mutantes en los genes <i>nrx-1</i> , <i>nlg-1</i> y <i>nrx-1;nlg-1</i> .	80
<b>Figura 16.</b> Tinción con DiI de las neuronas sensoriales ASHR y ASHL.	81
<b>Figura 17.</b> Esquema representativo de las respuestas ante el estrés osmótico y modelo esquemático de la actividad moduladora de las proteínas neurexina y neuroliquina en la sinapsis.	82

#### 4. Estudio de la expresión de los genes neurexina y neuroliquina en *C. elegans*.

<b>Figura 1.</b> Esquema representativo del sistema nervioso de <i>C. elegans</i> .	83
<b>Figura 2.</b> Expresión del gen <i>nrx-1</i> en neuronas de los ganglios de la cabeza.	84
<b>Figura 3.</b> Localización de la expresión del gen <i>nrx-1</i> en embriones tempranos.	85
<b>Figura 4.</b> Expresión del gen <i>nrx-1</i> en las neuronas OLQ y ASH en los ganglios de la cabeza.	86
<b>Figura 5.</b> Expresión del gen <i>nlg-1</i> en neuronas de los ganglios de la cabeza a nivel de la faringe.	87
<b>Figura 6.</b> Imágenes de epifluorescencia correspondientes al análisis de expresión del gen <i>nlg-1</i> en estirpes controles.	88
<b>Figura 7.</b> Representación esquemática de las posiciones de las motoneuronas del cordón nervioso ventral.	89
<b>Figura 8.</b> Expresión del gen <i>nrx-1</i> en neuronas del cordón nervioso dorsal y ventral.	90
<b>Figura 9.</b> Expresión del gen <i>nlg-1</i> en neuronas del cordón nervioso dorsal y ventral.	91
<b>Figura 10.</b> Coexpresión de los genes <i>nrx-1</i> y <i>nlg-1</i> en motoneuronas del cordón nervioso ventral.	92
<b>Figura 11.</b> Coexpresión de los genes <i>nrx-1</i> y <i>nlg-1</i> en motoneuronas del cordón nervioso ventral.	93
<b>Figura 12.</b> Expresión diferencial de los genes <i>nrx-1</i> y <i>nlg-1</i> en neuronas del cordón nervioso ventral.	93

#### 5. Rescate funcional de un mutante de *C. elegans* deficiente en neuroliquina por isoformas de neuroliquinas humana y murina.

<b>Figura 1.</b> Interacciones establecidas en la interfase de unión entre <i>Nrx1</i> y <i>Nlgn1</i> de rata.	95
<b>Figura 2.</b> Conservación de la estructura de las neuroliquinas de mamíferos.	96
<b>Figura 3.</b> Conservación de residuos en la interfase de unión neurexina/neuroliquina.	97
<b>Figura 4.</b> Esquema representativo de la formación de un dímero de neuroliquina.	98
<b>Figura 5.</b> Alineamiento de las secuencias de las neuroliquinas de <i>C. elegans</i> , rata y humanas.	99
<b>Figura 6.</b> Alineamiento de las secuencias de aminoácidos correspondientes a la zona de unión neurexina/neuroliquina de las neuroliquinas de <i>C. elegans</i> , rata y humanas.	102
<b>Figura 7.</b> Conservación de los aminoácidos de dimerización en neuroliquinas humanas.	103

<b>Figura 8.</b> Construcciones traduccionales usadas en el rescate funcional de mutantes deficientes <i>nlg-1</i> . .....	105
<b>Figura 9.</b> Expresión del gen <i>NLGN1</i> humano en <i>C. elegans</i> . .....	106
<b>Figura 10.</b> Extractos proteicos del mutante <i>nlg-1 (ok259)</i> y de animales transgénicos expresando el gen <i>NLGN1</i> humano. ....	107
<b>Figura 11.</b> Análisis <i>western</i> de extractos de líneas transgénicas expresando la proteína <i>NLGN1</i> humana. .....	108
<b>Figura 12.</b> Expresión del gen <i>Nlgn1</i> de rata en mutantes <i>nlg-1 (ok259)</i> . .....	109
<b>Figura 13.</b> Cuantificación del rescate funcional de mutantes <i>nlg-1 (ok259)</i> con los genes <i>NLGN1</i> humano y <i>Nlgn1</i> de rata. ....	110
<b>Figura 14.</b> Alineamiento estructural de las proteínas <i>NLG-1</i> de <i>C. elegans</i> y <i>NLGN1</i> humana. ....	111
<b>Figura 15.</b> Comparación de los motivos de unión a PSD-95 y “ <i>Dendrite Targeting</i> ” de las neuroliquinas humanas y de rata con la <i>NLG-1</i> de <i>C. elegans</i> . ....	112
<b>Figura 16.</b> Localización de algunas mutaciones en la proteína <i>NLGN4</i> humana descritas en autismo. ....	113
<b>Figura 17.</b> Conservación de los residuos Arg451 ( <i>NLGN3</i> ) y Asp396 ( <i>NLGN4</i> ) en los genes <i>NLGN1</i> y <i>nlg-1</i> . ....	113
<b>Figura 18.</b> Modelo tridimensional teórico de la proteína <i>NLGN4</i> humana y de la proteína originada por la mutación Arg451Cys. ....	114
<b>Figura 19.</b> Modelo tridimensional teórico de la proteína <i>NLG-1</i> silvestre de <i>C. elegans</i> y de la proteína originada por la mutación Arg451Cys. ....	115
<b>Figura 20.</b> Detalle de la $\alpha$ -hélice 25 de la proteína <i>NLG-1</i> de <i>C. elegans</i> . ....	116
<b>Figura 21.</b> Modelo tridimensional teórico de la proteína <i>NLGN1</i> humana y de la proteínas originadas por la mutación Arg451Cys y Asp396X. ....	116
<b>Figura 22.</b> Modelo tridimensional teórico de la proteína <i>NLG-1</i> de <i>C. elegans</i> , mostrándo el residuo Arg437 sustituido. ....	117
<b>Figura 23.</b> Modelo tridimensional de la proteína <i>NLGN1</i> humana, mostrándo los residuos Arg453 que y Asp432 que fueron sustituidos. ....	118
<b>Figura 24.</b> Cuantificación del efecto de las mutaciones Arg453Cys ( <i>NLGN1</i> ), Asp396X ( <i>NLGN1</i> ) y Arg437Cys ( <i>nlg-1</i> ). ..	119

## Índice de Tablas

### Material y métodos

<b>Tabla 1.</b> Estirpes bacterianas utilizadas. ....	21
<b>Tabla 2.</b> Estirpes de nematodos utilizadas. ....	22
<b>Tabla 3.</b> Antibióticos utilizados en la elaboración de los medios bacterianos. ....	24
<b>Tabla 4.</b> Vectores de clonación usados en este trabajo. ....	24
<b>Tabla 5.</b> Oligonucleótidos usados en el genotipado de polimorfismos de los genes <i>SLC6A4</i> , <i>DAT1</i> , <i>DRD4</i> y <i>MAO-A</i> . ....	25
<b>Tabla 6.</b> Oligonucleótidos usados en el análisis y detección de alelos mutantes en <i>C. elegans</i> . ....	26
<b>Tabla 7.</b> Oligonucleótidos específicos para la clonación y secuenciación. ....	26
<b>Tabla 8.</b> Oligonucleótidos utilizados en la clonación del gen <i>mCherry</i> . ....	27
<b>Tabla 9.</b> Oligonucleótidos utilizados en la mutagénesis dirigida de los genes <i>nlg-1</i> , <i>Nlgn1</i> y <i>NLGN1</i> . ...	27
<b>Tabla 10.</b> Oligonucleótidos universales para secuenciación de ADN. ....	28
<b>Tabla 11.</b> Programas informáticos utilizados para el análisis de datos. ....	28
<b>Tabla 12.</b> Condiciones estándar de PCR. ....	34
<b>Tabla 13.</b> Condiciones de la PCR para amplificar ADN genómico de <i>C. elegans</i> . ....	35
<b>Tabla 14.</b> Condiciones de la PCR usadas para el análisis de los polimorfismos de los genes <i>SLC6A4</i> , <i>DRD4</i> y <i>MAO-A</i> . ....	35
<b>Tabla 15.</b> Condiciones de la PCR usadas para el análisis de los polimorfismos del genes <i>DAT1</i> . ....	36
<b>Tabla 16.</b> Condiciones de la PCR con el kit <i>Expad Long Template PCR System</i> . ....	37
<b>Tabla 17.</b> Mezcla de microinyección utilizadas en la obtención de transgénicos. ....	42

### Resultados

#### 1. Estudio de polimorfismos genéticos implicados en el metabolismo de neurotransmisores de un grupo homogéneo de pacientes diagnosticados con autismo.

<b>Tabla 1.</b> Secuencias nucleotídicas analizadas en cada polimorfismo. ....	56
<b>Tabla 2.</b> Frecuencias genotípicas y alélicas de los genes <i>SLC6A4</i> , <i>DAT1</i> , <i>DRD4</i> y <i>MAO-A</i> . ....	57
<b>Tabla 3.</b> Análisis de <i>Odd Ratio</i> para los genes <i>SLC6A4</i> , <i>DAT1</i> y <i>DRD4</i> . ....	58
<b>Tabla 4.</b> “ <i>Transmission disequilibrium test</i> ” (TDT) de los genes <i>SLC6A4</i> , <i>DAT1</i> , <i>DRD4</i> y <i>MAOA</i> . ....	60

#### 5. Rescate funcional de un mutante de *C. elegans* deficiente en neuroliquina por isoformas de neuroliquinas humana y murina.

<b>Tabla 1.</b> Porcentaje de identidad y similaridad entre las neuroliquinas humanas y de rata. ....	95
<b>Tabla 2.</b> Porcentaje de identidad y similaridad entre la proteína NLG-1 de <i>C. elegans</i> y las proteínas humanas y de rata. ....	105
<b>Tabla 3.</b> Porcentaje de identidad y similaridad entre la proteína NLGN1 de rata con las proteínas humanas y de <i>C. elegans</i> . ....	105

# Resumen

## **Genética del Autismo: *Caenorhabditis elegans* como modelo experimental en el estudio de la función sináptica neuronal.**

Los trastornos del espectro autista son de etiología desconocida. Los datos epidemiológicos en los que se compara la incidencia de estas enfermedades en gemelos monocigóticos y dicigóticos demuestran que tienen un origen predominantemente genético. Diversos resultados experimentales recientes indican que en un número significativo de casos, estos trastornos se originan por alteraciones en la sinapsis neuronal, que durante el desarrollo del sistema nervioso podrían constituir la raíz de las anomalías observadas en el comportamiento de estos sujetos.

En esta tesis se han realizado dos aproximaciones experimentales diferentes. En una primera se analizaron polimorfismos de genes implicados en el metabolismo de neurotransmisores y la asociación de éstos con el autismo, en una muestra homogénea de pacientes diagnosticados con el trastorno. Los neurotransmisores juegan un papel crucial en el desarrollo y funcionamiento del sistema nervioso. Por esta razón se ha considerado que la alteración del metabolismo de los mismos podría ser el origen de algunos casos de autismo. Esta sospecha se ha visto reforzada por el hecho de que un tercio de las personas diagnosticadas con este trastorno tienen niveles elevados de serotonina en sangre. En concreto se analizaron polimorfismos de los genes *SLC6A4* (transportador de la serotonina), *DRD4* (receptor de dopamina D4), *DAT1* (transportador de dopamina) y *MAO-A* (monoamina oxidasa, enzima que degrada serotonina y catecolaminas). Los resultados mostraron asociación significativa del autismo con el alelo *5HTTLPR-S* del promotor del gen *SLC6A4*, que causa una menor expresión del transportador de serotonina. Además este mismo alelo se transmitía de forma preferencial por parte de la línea materna, lo que indicaría que el genotipo materno asociado con una disminución de la recaptación de la serotonina, podría originar unas condiciones desfavorables para el desarrollo del sistema nervioso en el feto.

Las estrategias basadas en análisis genéticos como los estudios de ligamiento en familias, asociación de genes candidatos en poblaciones, GWAS (estudio de asociación del genoma completo), técnicas citogenéticas y secuenciación de nueva generación constituyen una herramienta de gran utilidad para localizar genes implicados en el autismo. No obstante estos trabajos son costosos, requieren una muestra amplia y no permiten profundizar a nivel experimental en las bases celulares y moleculares de este trastorno. Este inconveniente sería posible solventarlo recurriendo a sistemas y organismos de menor complejidad y fácil manejo en el laboratorio. Esta estrategia de simplificación ha sido utilizada en muchas ocasiones en biología para estudiar mecanismos básicos, cuyos conocimientos se extrapolaron posteriormente a organismos de mayor complejidad. El animal modelo utilizado en el autismo es el ratón. En esta tesis y como una segunda aproximación experimental, se decidió utilizar el nematodo

*Caenorhabditis elegans*, una especie que presenta muchas ventajas como organismo modelo por su fácil manipulación en el laboratorio y por su extraordinaria simplicidad para el estudio del sistema nervioso, ya que el hermafrodita adulto posee 302 neuronas y 56 células gliales de un total de 959 células somáticas. La hipótesis de partida es que la utilización de este organismo permitiría establecer un modelo donde se podrían analizar mecanismos neurobiológicos básicos implicados en el autismo.

Desde esta otra aproximación experimental se caracterizó el efecto de mutaciones en genes de *C. elegans* ortólogos de genes humanos implicados en autismo. En concreto se estudiaron los genes *nrx-1* y *nlg-1* que codifican las proteínas neurexina y neuroligina respectivamente, ambas implicadas en la adhesión sináptica neuronal. En primer lugar se analizaron los patrones de comportamiento de mutantes simples y dobles por delección en estos genes, observando alteraciones en el ciclo de defecación, en la respuesta mecanosensorial, en la capacidad de exploración, en la tasa de movimiento y en la capacidad de respuesta a un choque osmótico, así como en la sensibilidad a aldicarb (inhibidor de la acetilcolinesterasa), levamisol (agonista colinérgico) y pentilentetrazol (antagonista de GABA). En segundo lugar se estudiaron los patrones de expresión de ambos genes en estirpes transgénicas de *C. elegans* obtenidas por la fusión de los promotores de *nrx-1* y *nlg-1* con la proteínas GFP y/o mCherry; pudiéndose concluir que ambos genes se expresan casi exclusivamente en el sistema nervioso del nematodo e identificándose la expresión de los mismos en neuronas específicas del cordón nervioso ventral y en cuerpos neuronales localizados en los ganglios de la cabeza. Por último, y quizás el resultado más prometedor de este trabajo, ha sido el rescate funcional de mutantes de *C. elegans* deficientes en el gen *nlg-1*, con el cDNA del gen *NLGN1* humano y *Nlgn1* de rata. Los animales *knockout* en el gen *nlg-1* y transgénicos portando el cDNA tanto de humanos como murino, recuperaban de manera significativa el comportamiento del nematodo silvestre en la respuesta al estrés osmótico. De enorme interés también es el hecho que los cDNAs con la mutación Asp396X descrita en autismo eran incapaces de rescatar el fenotipo silvestre.

Por todo lo expuesto, los resultados obtenidos en este trabajo permiten concluir que la utilización de *C. elegans* como organismo modelo en el estudio del autismo es una alternativa prometedora. Este organismo permite crear un escenario experimental que facilita el estudio genético de algunos de los componentes sinápticos implicados en el trastorno. El objetivo a corto plazo es que los resultados obtenidos puedan extrapolarse a humanos y que ayuden a explicar algunos de los mecanismos neurobiológicos que intervienen en la etiología de los trastornos del espectro autista.

# **Introducción general**

## **Introducción general.**

### **I. El autismo.**

#### **1. Descripción de los trastornos del espectro autista.**

Hasta prácticamente el año 1980 el autismo se consideraba una enfermedad de origen ambiental, que se originaría por el comportamiento inapropiado de progenitores y/o cuidadores (hipótesis de “*refrigerator mothers*”) (Chamak and Cohen 2003). Los estudios realizados en familias y especialmente la comparación de los valores de concordancia entre gemelos monocigóticos (36-91%) y dicigóticos (10-20%) demostraron un elevado componente genético en este trastorno (Folstein and Rutter 1977; Cantwell 1996; Hechtman 1996; Folstein and Rosen-Sheidley 2001; Rutter 2005; Waldman and Gizer 2006; Nishiyama, Notohara et al. 2009). Hoy día se considera que el autismo es un conjunto de trastornos de etiologías diferentes que comparten rasgos fenotípicos similares. En la mayoría de las ocasiones la enfermedad podría deberse a mutaciones en uno o varios genes que intervienen en el desarrollo o la funcionalidad del sistema nervioso; en otros casos podría originarse por la acción de factores ambientales biológicos, químicos o físicos en el sistema nervioso del feto durante el embarazo; por último existe la posibilidad de que la enfermedad se origine por la interacción de alteraciones genéticas y factores ambientales. En cualquier caso, en su conjunto se considera que el autismo es uno de los trastornos del comportamiento de origen multifactorial con un componente genético más elevado.

El trastorno autista viene definido por la existencia de tres características fenotípicas: deficiencia en la interacción social, anormalidades en la comunicación verbal y no verbal, e intereses restrictivos y conductas repetitivas (Zwaigenbaum 2010). El trastorno es más frecuente en niños que en niñas (proporción 4,3:1) y su sintomatología aparece antes de los tres años de edad. Los datos obtenidos en estudios epidemiológicos son variables, probablemente debido a los instrumentos empleados para llevar a cabo el diagnóstico y por las diferencias en las muestras analizadas. La prevalencia del trastorno entre 1991 y 1996 (media de 16 estudios) era de 4,4/10.000 (Fombone 2002); en la última década los datos epidemiológicos indican una prevalencia de hasta 110/10.000 (Newschaffer, Croen et al. 2007). Este incremento podría deberse a la utilización de instrumentos de diagnóstico más fiables, aunque no se descarta la posibilidad de que existan factores ambientales que puedan estar incidiendo en el incremento de la incidencia en las poblaciones actuales.

El término “autismo” se emplea para definir a todos los trastornos incluidos bajo la denominación de Trastornos Generalizados del Desarrollo (TGD) (World-Health-Organization 1992; Frances and Ross 2003), que incluyen a los trastornos “Autista”, “Asperger”, “Desintegrativo Infantil (CDD)”, “Generalizado del Desarrollo no Especificado (PDD-NOS)” y

“Rett”. El término Trastornos del Espectro Autista (TEA), incluye generalmente a los mismos trastornos que los TGD, a excepción del síndrome de Rett, del que se conoce con exactitud el gen cuya disfunción es responsable de la enfermedad (Amir, Van den Veyver et al. 1999). La experiencia acumulada en el diagnóstico de los TEA ha demostrado que existe una gran variabilidad en los síntomas de los mismos, de tal manera que no se puede definir un cuadro clínico uniforme y este varía con la edad del paciente y se ve influido por el grado de capacidad intelectual del sujeto y por la accesibilidad a programas de estimulación precoz y otros apoyos especializados. Actualmente los TEA se consideran un conjunto de trastornos que tienden a clasificarse en “alto funcionamiento” o “bajo funcionamiento” en función de si el cociente intelectual (CI) del sujeto diagnosticado es superior o inferior a 70-80.

Teniendo en cuenta todo lo anterior se puede concluir que las características fenotípicas del autismo son difíciles de homogenizar por su variabilidad y complejidad. No obstante, aunque es cierto que los conocimientos neurobiológicos actuales no permiten explicar con exactitud las causas que originan estos trastornos, los resultados experimentales apuntan a la idea de que un elemento común en la mayoría de los casos son disfunciones en las interacciones y conexiones neuronales (Garber 2007).

## **2. Autismo y su relación con la función sináptica.**

En los últimos años se han publicado resultados experimentales que permiten explicar el origen de algunos casos de autismo, y éstos indican como una posible causa del trastorno la presencia en el genoma de mutaciones que codifican proteínas que intervienen en la sinapsis neuronal. Un buen número de estas observaciones se refieren a los procesos moleculares que se producen durante el establecimiento de la sinapsis entre el terminal presináptico y el postsináptico. En este escenario cobran protagonismo numerosas proteínas de adhesión celular, entre las cuales destacan la familia de las neuroliginas y de las neurexinas (Craig and Kang 2007; Sudhof 2008).

Existen estudios que relacionan los trastornos del espectro autista con mutaciones en las secuencias codificantes de diferentes genes de neuroliginas (Jamain, Quach et al. 2003; Laumonnier, Bonnet-Brilhault et al. 2004; Talebizadeh, Lam et al. 2006; Lawson-Yuen, Saldivar et al. 2008; Yan, Feng et al. 2008; Blundell, Tabuchi et al. 2009; Gutierrez, Hung et al. 2009; Zhang, Milunsky et al. 2009; Blundell, Blaiss et al. 2011; De Jaco, Lin et al. 2011), y neurexinas (Arking, Cutler et al. 2008; Kim, Kishikawa et al. 2008; Reissner, Klose et al. 2008; Yan, Noltner et al. 2008; Etherton, Blaiss et al. 2009; Rujescu, Ingason et al. 2009; Bot, Schweizer et al. 2011; Ching, Shen et al. 2011). También diversos casos de autismo se han asociado al complejo entramado molecular que permiten las conexiones neuronales. En concreto, mutaciones que afectan al gen *SHANK3*, que codifica una proteína esencial en el

andamiaje molecular de la densidad postsináptica (Bonaglia, Giorda et al. 2001; Durand, Betancur et al. 2007; Moessner, Marshall et al. 2007; Okamoto, Kubota et al. 2007) y recientemente alteraciones en el gen *SHANK2* (Berkel, Marshall et al. 2010). Otras proteínas de adhesión que participan en la sinapsis como las cadherinas, han sido relacionadas con un número significativo de casos de autismo (Wang, Zhang et al. 2009), y *CADM1*, una molécula de adhesión celular que interviene en la sinapsis (Fujita, Dai et al. 2011). Todos estos resultados revelan la importancia de los componentes moleculares que participan en un correcto establecimiento sináptico y su relación con los aspectos neurológicos que pueden tener lugar en el trastorno autista.

## **2.1. Conexión sináptica y autismo: neuroliginas y neurexinas.**

Las neurexinas y neuroliginas están implicadas en la activación de los terminales pre y postsinápticos durante la transmisión sináptica. La disfunción de ambas moléculas afecta a las propiedades de la sinapsis, así como al correcto funcionamiento de las redes neuronales, pero su ausencia no elimina completamente la transmisión sináptica (Missler, Zhang et al. 2003; Varoqueaux, Aramuni et al. 2006).

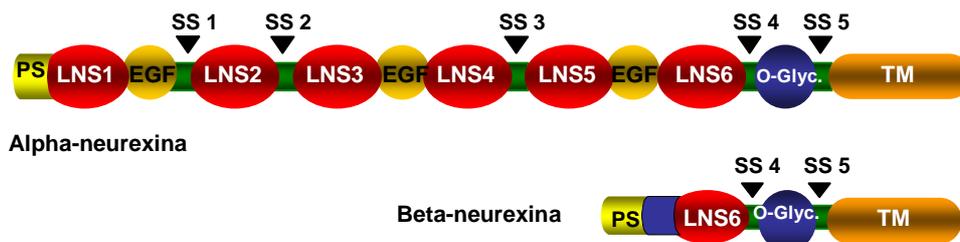
Las neurexinas y las neuroliginas son proteínas localizadas principalmente en las membranas pre y postsinápticas respectivamente, estableciéndose una interacción entre ambas en el espacio sináptico. No existe certeza de que las neurexinas estén confinadas exclusivamente en la membrana presináptica, ya que se ha observado que algunas deleciones en genes que codifican alpha-neurexinas tienen efectos en el terminal postsináptico (Kattenstroth, Tantalaki et al. 2004) y una proporción de neurexinas han sido localizadas en la membrana postsináptica (Fabrichny, Leone et al. 2007; Taniguchi, Gollan et al. 2007; Sudhof 2008). Además en un estudio reciente se ha descrito la presencia de neurexina en zonas postsinápticas de embriones de *Drosophila melanogaster* (Chen, Gracheva et al. 2010). De la misma manera, las neuroliginas han sido identificadas tanto pre como postsinápticamente en el sistema nervioso de *C. elegans* (Feinberg, Vanhoven et al. 2008).

Ambas proteínas han sido propuestas como candidatas en enfermedades neurocognitivas. De hecho, diversos estudios relacionan las cuatro neuroliginas existentes con el autismo y también como se ha mencionado anteriormente, se han descrito mutaciones que afectan a las neurexinas en pacientes diagnosticados con este trastorno (Sudhof 2008).

### **2.1.1. Neurexinas.**

La función de adhesión celular y de reconocimiento celular de las neurexinas fue deducida a partir de su estructura molecular, consistente en una región transmembrana simple y un dominio extracelular similar al de proteínas implicadas en la sinaptogénesis (Ushkaryov, Petrenko et al. 1992). Las neurexinas pueden ser clasificadas en dos tipos: alpha-neurexinas y beta-neurexinas.

Ambos tipos tienen diferentes secuencias amino-terminales (dominios extracelulares), pero idénticas regiones transmembrana carboxi-terminales y colas citoplasmáticas (Figura 1). Extracelularmente, las alpha-neurexinas tienen seis dominios LNS (“*laminin, NRXN, sex-hormone-binding globulin domains*”) con tres dominios EGF (“*epidermal growth factor*”) intercalados entre los primeros, y las beta-neurexinas tienen un solo dominio LNS. Las alpha-neurexinas son necesarias para la liberación de  $Ca^{2+}$  y para la actividad de los receptores de tipo NMDA (Missler, Zhang et al. 2003; Kattenstroth, Tantalaki et al. 2004).



**Figura 1. Estructuras de alpha y beta-neurexinas.** Las alpha-neurexinas están compuestas de una secuencia N-terminal extracelular conteniendo un péptido señal (PS), seis dominios “*Laminin-alpha, Neurexin and Sex hormone-binding globulin*” (LNS) separados por tres dominios “*epidermal growth factor*” (EGF), seguido por una región de O-glicosilación (O-Glyc), un dominio transmembrana (TM) y una corta región aminoacídica intracelular conteniendo un sitio de interacción PDZ (no mostrado). Las beta-neurexinas contienen un solo dominio LNS precedido de una secuencia específica de beta-neurexinas (bloque rayado) y un péptido señal diferente al de alpha-neurexinas. Las puntas de flecha (SS) indican la localización de los sitios de procesamiento alternativo presentes en alpha y beta-neurexinas.

El genoma de mamíferos contiene tres genes que codifican neurexinas (*NRXN1, NRXN2* y *NRXN3*) que se expresan mayoritariamente en neuronas, y cada uno de ellos codifica a su vez una alpha-proteína (alpha-neurexina) y una beta-proteína (beta-neurexina) desde promotores independientes (Tabuchi and Sudhof 2002). Además, mediante procesamiento alternativo de estas proteínas se pueden generar una gran cantidad de isoformas (Ullrich, Ushkaryov et al. 1995). Los sitios de procesamiento alternativo SS 1 a SS 4 (Figura 1) están conservados en las tres neurexinas, todos son de secuencias cortas (30 residuos o menos) y se localizan en los dominios LNS o cercanos a éstos. Por el contrario el sitio de procesamiento alternativo SS 5 (Figura 1) presentan gran variabilidad; así, en la proteína *NRXN1* consta de una inserción de solo tres residuos, en la *NRXN2* de 191 residuos y en la *NRXN3* pueden existir gran diversidad de longitudes del insertos, incluyendo secuencias de fin de mensaje y pudiéndose generar isoformas de neurexinas que son secretadas extracelularmente (Ushkaryov, Petrenko et al. 1992; Ullrich, Ushkaryov et al. 1995; Rozic-Kotliroff and Zisapel 2007). Los ratones “*knockouts*” en el gen que codifica alpha-neurexina-1 son deficientes en neurotransmisión de sinapsis excitatorias (Etherton, Blaiss et al. 2009). Los ratones “*knockouts*” en los tres genes que codifican alpha-neurexinas son deficientes en la liberación de neurotransmisores excitatorios e inhibitorios y mueren al poco tiempo de nacer (Missler, Zhang et al. 2003).

### 2.1.2. Neuroliquinas.

Las neuroliquinas son también proteínas de membrana (Figura 2). Su secuencia extracelular está compuesta por un único dominio globular “*acetylcholinesterase-like*”, conectado a una región transmembrana mediante una secuencia glicosilada. Las neuroliquinas forman dímeros por la interacción entre los sitios de oligomerización. Las neuroliquinas presentan un único sitio de procesamiento alternativo (SS A), aunque *NLGN1* presenta un sitio alternativo adicional en una segunda posición (SS B) (Ichtchenko, Nguyen et al. 1996; Boucard, Chubykin et al. 2005). Scheiffele et al., 2000, demostraron que las neuroliquinas pueden inducir la formación de estructuras presinápticas *de novo*, sugiriendo que estas moléculas son esenciales en la conectividad y plasticidad del sistema nervioso (Scheiffele, Fan et al. 2000).



**Figura 2. Estructura de las neuroliquinas.** Las neuroliquinas están compuestas de una secuencia N-terminal extracelular que contiene un péptido señal (PS), seguido de un dominio “*cholinesterase like*” que contiene dos sitios de procesamiento alternativo (SS-A y SS-B), una región de oligomerización (bloque rayado) y un sitio de O-glicosilación (O-Glyc.). A este dominio le sigue una región transmembrana (TM) y una corta secuencia aminoacídica intracelular que contiene un motivo de reconocimiento de PDZ (no mostrado).

En mamíferos existen cuatro genes que codifican neuroliquinas. Los genes *NLGN3* y *NLGN4* en humanos se localizan en el cromosoma X. En el cromosoma Y hay un gen complementario a *NLGN4* denominado *NLGN5*. Los genes que codifican neuroliquinas se expresan mayoritariamente en el sistema nervioso (Ichtchenko, Nguyen et al. 1996; Philibert, Winfield et al. 2000). Mediante estudios inmunohistoquímicos se ha podido demostrar que las proteínas *NLGN1* y *NLGN2* se circunscriben exclusivamente a las sinapsis excitatorias e inhibitorias respectivamente, *NLGN3* podría estar presente en ambas (Song, Ichtchenko et al. 1999; Graf, Zhang et al. 2004; Varoqueaux, Jamain et al. 2004; Budreck and Scheiffele 2007), y *NLGN4* preferentemente en sinapsis inhibitorias (Hoon, Soykan et al. 2011).

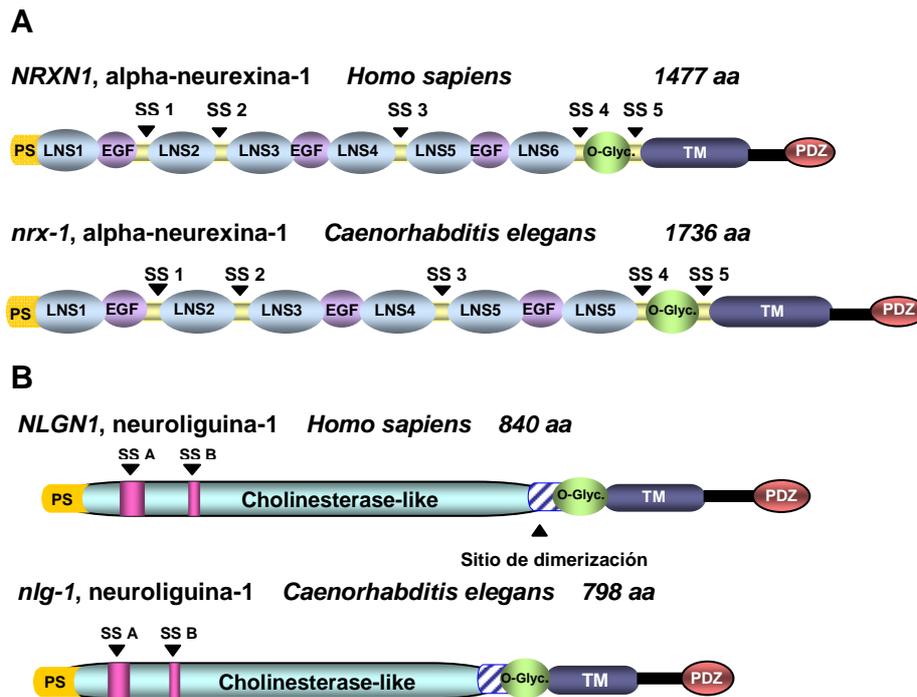
Las neuroliquinas pueden unirse tanto a  $\alpha$ - como a  $\beta$ -neurexina, mediante el sexto dominio LNS de las  $\alpha$ -neurexinas, que se corresponde con el único dominio LNS de las  $\beta$ -neurexinas (Comoletti, Flynn et al. 2006). La afinidad de unión varía entre las diferentes isoformas de neuroliquinas y neurexinas (Petrenko, Ullrich et al. 1996; Comoletti, Flynn et al. 2006; Chih, Gollan et al. 2006). Las isoformas generadas como consecuencia del procesamiento alternativo en el sitio SS B de la *NLGN1* es el responsable de que exista mayor o menor afinidad de unión a neurexinas. La presencia de ocho aminoácidos en SSB, permite la unión de *NLGN1* a aquellas  $\beta$ -neurexinas que hayan perdido una determinada secuencia del sitio de procesamiento SS 4; por el contrario cuando estos ocho aminoácidos están ausentes, se favorece

la unión de alpha y beta-neurexinas independientemente del procesamiento en el sitio SS 4 (Boucard, Chubykin et al. 2005). Las posibilidades de combinación en la unión entre ambas moléculas de adhesión celular podrían explicar en parte los fenómenos de plasticidad sináptica neuronal (Boucard, Chubykin et al. 2005).

Los ratones “*knockout*” en los genes *NLGN1*, *NLGN2* y *NLGN3* mueren al nacer, pero presentan un número de sinapsis con una estructura aparentemente normal (Varoqueaux, Aramuni et al. 2006). Sin embargo, los ratones que pierden uno de estos genes son viables y fértiles, aunque mediante análisis electrofisiológicos se demuestra que presentan una disfunción en la sinapsis neuronal. Los ratones “*knockouts*” en el gen *NLGN1* presentan defectos en la neurotransmisión en las sinapsis excitatorias vía receptores NMDA (Chubykin, Atasoy et al. 2007), y presentan patrones de comportamiento repetitivos con déficit en los procesos de aprendizaje y memoria (Powell 2009; Dahlhaus and El-Husseini 2010). Los ratones “*knockouts*” en el gen *NLGN2* tienen deficiencias en la transmisión de las sinapsis inhibitorias (Chubykin, Atasoy et al. 2007), pero no se observan en ellos alteraciones fenotípicas en el comportamiento (Blundell, Tabuchi et al. 2009). Los ratones “*knockouts*” en el gen *NLGN3* muestran un fenotipo que podría estar relacionado con el descrito en el trastorno autista, presentando una disminución en el interés por sucesos novedosos, en la interacción social, así como una pérdida en la vocalización y emisión de sonidos empleados en su comunicación (Radyushkin, Hammerschmidt et al. 2009). Por último, los ratones “*knockouts*” en el gen *NLGN4* presentan una disminución en la interacción con otros ratones y una reducción en la emisión de sonidos en su comunicación, con respecto a ratones silvestres (Jamain, Radyushkin et al. 2008).

### **2.1.3. Homología en *C. elegans* de los genes *NLGN* y *NRXN*.**

En *C. elegans* los genes *nrx-1* y *nlg-1* son homólogos a los genes humanos que codifican la alfa-neurexinas y neuroliquinas respectivamente y presentan una estructura similar de dominios funcionales. En la Figura 3 se comparan la estructura de los dominios funcionales de las proteínas alfa-neurexinal y neuroliquina-1 humanas con las del nematodo. El porcentaje de identidad entre los dominios de alfa-neurexinas en ambas especies varía entre el 22 y el 32% (Biswas, Russell et al. 2008). El porcentaje de identidad entre los dominios “*cholinesterase-like*” y transmembrana (TM) de las neuroliquinas en ambas especies son del 28% y 23% respectivamente (Arac, Boucard et al. 2007).



**Figura 3. Comparación de la estructura de dominios funcionales de las proteínas alfa-neurexina1 (A) y neuroligina-1 (B) de *H. sapiens* y *C. elegans*.** La neurexina contiene en el extremo N-terminal la parte extracelular compuesta de un péptido señal (SP), seis dominios de unión LNS (“*laminin/neurexin/sex-hormone*”) intercalados con tres dominios EGF (“*epidermal growth factor*”) y en el extremo C-terminal los dominios transmembrana (TM) y de unión PDZ. La neuroligina contiene en el extremo N- terminal la parte extracelular compuesta de un péptido señal (SP) y los dominios “*cholinesterase-like*”, de oligomerización (OD) y de glicosilación (OG), y en el extremo C-terminal los dominios transmembrana (TM) y de unión PDZ. Modificado de (Biswas, Russell et al. 2008).

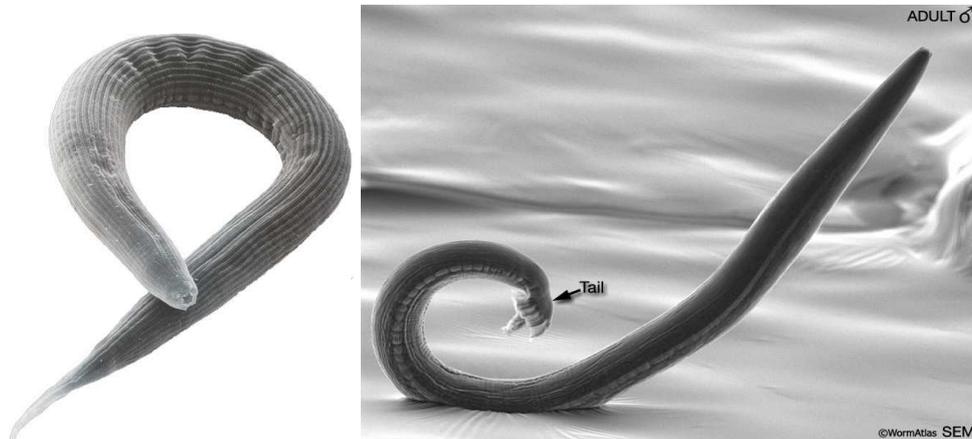
## II. *Caenorhabditis elegans* como organismo modelo.

### 1. Ventajas y características.

*Caenorhabditis elegans* es un pequeño nematodo no parásito que se alimenta de microorganismos y habita en la naturaleza en lugares templados y húmedos. En el laboratorio se alimenta de *Escherichia coli* y bajo unas condiciones óptimas su ciclo de vida dura aproximadamente 3 días. El tamaño de ambos sexos, hermafroditas y machos, es de aproximadamente 1mm de largo, pero su morfología es diferente en la edad adulta (Figura 4).

*C. elegans* es un organismo de relativa simplicidad desde el punto de vista anatómico. El hermafrodita adulto tiene 959 células somáticas y el macho 1031. Tanto el número de células como su posición son constantes en la especie. *C. elegans* tiene 5 pares de cromosomas autosómicos y 1 par de cromosomas sexuales. Los organismos hermafroditas poseen dos cromosomas XX, mientras que los machos poseen sólo uno (X0). Los hermafroditas producen ovocitos y espermatozoides, se reproducen por autofecundación y no pueden fertilizar a otros hermafroditas. Los machos, que aparecen de manera espontánea con una frecuencia inferior al 0,3%, pueden fertilizar hermafroditas. Un hermafrodita es capaz de poner entre 200 y 300

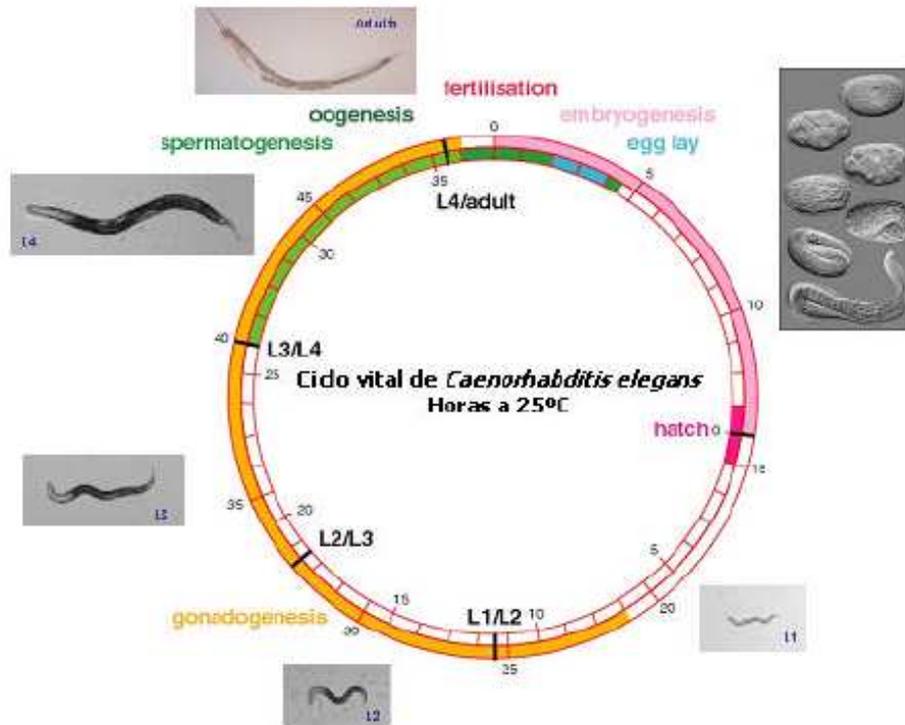
huevos a lo largo de su vida reproductiva. Esta característica facilita la producción de numerosos individuos para un estudio genético. Una vez el huevo eclosiona, el gusano se desarrolla pasando por cuatro estadios larvarios, cada uno de ellos interrumpido por un cambio de muda, hasta convertirse en joven adulto (Figura 5). El adulto maduro es fértil durante 4 días y posteriormente es capaz de vivir entre 10 y 15 días.



**Figura 4. Imagen de microscopía de barrido de dos individuos adultos de *C. elegans*.** El hermafrodita se muestra a la izquierda y el macho a la derecha. En el gusano hermafrodita se puede observar la cutícula en anillos y la boca con las terminaciones sensoriales que recogen información química, térmica y mecánica. En el macho adulto se puede observar la diferencia en la estructura de la cola respecto al hermafrodita. <http://wormatlas.org>.

El mantenimiento de *C. elegans* en el laboratorio es muy sencillo, ya que puede crecer en placas de agar o en medio líquido, en ambos casos con *Escherichia coli* como fuente de alimento. Los animales, con la ayuda de una lupa estereoscópica, pueden ser observados y manipulados de forma individual. El gusano es transparente a lo largo de todo su ciclo de vida y gracias a esta característica, utilizando un microscopio con luz preferiblemente con sistema Nomarski, se puede observar en preparaciones vivas el desarrollo y el linaje celular.

El tamaño del genoma es de  $8 \times 10^7$  pares de nucleótidos, alrededor de 8 veces más que la levadura *Saccharomyces* y 1/30 del humano. El genoma de *C. elegans* fue secuenciado completamente en 1998, convirtiéndose así en el primer organismo multicelular del que se disponía la secuencia completa de su genoma (Consortium 1998). Además, el hecho de que su genoma muestre bastante similitud con el genoma humano, ya que al menos el 83% del proteoma de *C. elegans* presenta homología con genes humanos (Lai, Chou et al. 2000), hace que *C. elegans* sea un organismo potencialmente muy valioso para el estudio de enfermedades humanas.



**Figura 5. Ciclo de vida de *Caenorhabditis elegans*.** El círculo exterior está fraccionado en horas a partir de la fertilización. El círculo interior está dividido en horas desde la eclosión del huevo. El ciclo de vida es más corto o más largo dependiendo de la temperatura de incubación. En este caso se muestra el ciclo a 25 °C. Los estadios larvarios están indicados e ilustrados a lo largo del ciclo (embriogénesis, L1, L2, L3, L4 y adulto). Los procesos biológicos también están determinados en el ciclo por colores (Tesis doctoral, Pilar González Cabo, 2006).

Existen trabajos con *C. elegans* previos a la década de los años sesenta del siglo XX. Pero es a partir de entonces cuando Sidney Brenner propuso utilizar este organismo como modelo para estudiar el comportamiento basado en la simplicidad del sistema nervioso y la posibilidad de ser manipulado casi con la facilidad de un microorganismo (Brenner 1974). En esa fecha se sabía que los grandes avances en los conocimientos sobre genética y biología molecular se habían conseguido gracias a la utilización de organismos simples como virus, bacterias y otros microorganismos, que ofrecían la oportunidad de trabajar con grandes cantidades de individuos y con tiempos de generación muy cortos.

Hasta entonces existían otros modelos animales bien consolidados, tales como *Drosophila melanogaster*, *Mus musculus*, etc. Sin embargo, *C. elegans* ofrecía la posibilidad de trabajar con un modelo que presentaba el equilibrio justo entre lo sencillo y lo complejo. Cuando *C. elegans* fue propuesto como organismo modelo debido a sus cualidades, no se conocían aún todas las ventajas de trabajar con este gusano. Se han descrito desde entonces peculiaridades muy útiles que hacen más sencillo todavía el trabajo con este organismo. En *C. elegans* un DNA exógeno inyectado en el sincitio de la gónada se liga y/o recombina para formar una construcción en tándem (“*extrachromosomal transgenic array*”), que algunos autores señalan en un número que

oscila entre 80 y 300 copias del DNA inyectado (Stinchcomb DT. 1985). Estas construcciones pueden ser heredadas por la progenie del nematodo transgénico, sin necesidad de ser integradas en el genoma. Esto permite realizar experimentos de sobreexpresión de proteínas y ácidos nucleicos, así como estudios de expresión con genes “reporteros” en tiempos cortos. En realidad la formación de “*extrachromosomal transgenic array*” puede constituir una desventaja cuando se quiere controlar el número de copias existentes en el transgénico y por la inestabilidad de los mismos. No obstante se pueden conseguir cambios estables en loci cromosómicos por recombinación homóloga por transformación biolística (Berezikov, Bargmann et al. 2004). Recientemente se ha ideado un método basado en el trasnposon Mos-1 que permite la inserción de una copia single del DNA deseado en loci específicos del genoma (Giordano-Santini, Milstein et al. 2011).

Por otro lado se describió en 1998 un proceso fisiológico, que más tarde se comprobaría que estaba conservado en muchos otros organismos, por el cual se puede degradar el mensajero de un gen concreto. Este proceso es la interferencia por RNA o RNAi (Guo 1995; Rocheleau 1997). Con esta técnica se puede hacer genética “reversa” con una gran facilidad y rapidez. El RNAi es un proceso natural, por el cual se degradan moléculas de RNA de manera muy específica (Hutvagner 2002). Esto es el fundamento de una nueva técnica de estudiar la función génica, denominada *knock-down* o reducción transitoria de la expresión de un gen. Introduciendo moléculas de doble cadena de RNA (dsRNA) de un gen concreto, en el ambiente celular de los nematodos (y de otros organismos), se puede obtener una fenocopia de un mutante para el gen en cuestión (Fire 1998).

Mientras las secuencias de genes y genomas disponibles en las distintas bases de datos aumentan exponencialmente, la comprensión de la función de los genes lo hace linealmente. Una técnica muy útil para obtener datos sobre la función de los genes es la genética “reversa”, mediante la obtención de mutaciones en los mismos. En los modelos animales tradicionales, como el ratón, el tiempo de generación de mutaciones es largo y costoso. Por el contrario, en *C.elegans* existen consorcios internacionales (*Caenorhabditis* Genetic Center y Nacional BioResource Project) que suministran mutantes por delección en los genes solicitados por la comunidad investigadora.

Otra ventaja que presenta este nematodo es que es susceptible de ser congelado y mantenido a –80 °C; alternativamente puede ser mantenido a medio plazo (entre seis meses y un año) en un estadio de resistencia denominado *dauer*, durante el cual el nematodo se encuentra en una fase de latencia en la fase larvaria L2. Este estadio es inducido ante la falta de alimento en el medio, disminución de la temperatura o una combinación de ambos factores ambientales. Si posteriormente se administra alimento las larvas *dauer* tienen la capacidad de completar su ciclo vital y desarrollarse hasta el estadio adulto.

Aunque se han enumerado numerosas ventajas de *C. elegans* como organismo modelo, es obvio que también posee desventajas, fundamentalmente debido a las diferencias existentes entre nematodos y mamíferos. Por tanto, lógicamente la extrapolación de los hallazgos en el nematodo no es siempre posible a humanos, aunque a nivel básico de funcionamiento, los mecanismos generales conservados son más factibles de estudiar y analizar en dicho organismo por su simplicidad y facilidad de manejo.

Quizás, una de las pruebas más relevantes de la importancia del uso de *C. elegans* como organismo modelo está ejemplarizado por la concesión de los premios Nobel de fisiología y medicina en los años 2002 y 2006, y de química en 2008, a personas que realizaron su investigación y aportaciones fundamentales a la ciencia utilizando este nematodo. En concreto, Sydney Brenner, Robert Horvitz y John Sulston por sus aportaciones en el proceso de apoptosis o muerte celular programada (Brenner 2003), Andrew Fire y Craig Mello por el descubrimiento del RNA de interferencia (Mello 2007) y Martin Chalfie por la aplicación de la proteína verde fluorescente (GFP) en el estudio de la expresión génica (Chalfie 2009).

## **2. Sistema nervioso.**

Las 302 neuronas y 56 células gliales del hermafrodita adulto de *C. elegans* constituyen el 37% del número total de sus células somáticas (Hobert 2005). Estas neuronas pueden ser eliminadas individualmente mediante ablación láser y se pueden obtener mutantes en diferentes genes implicados en los circuitos neurológicos, que mantienen la viabilidad la mayoría de las veces. Estas características ha convertido a *C. elegans* en un modelo muy valioso para estudios neurobiológicos.

El trabajo en la reconstrucción de la anatomía de *C. elegans* mediante secciones de microscopía electrónica proporcionó un avance significativo en el conocimiento de la anatomía de su sistema nervioso (White, E. et al. 1986). Esto ayudó a definir 118 clases de neuronas de acuerdo a criterios morfológicos y de conectividad y a comprobar la existencia de un total de 5000 sinapsis químicas, 600 uniones de tipo “gap” y 2000 uniones neuromusculares.

Las neuronas de *C. elegans* se pueden clasificar al menos según cuatro criterios diferentes: acorde con su función general (sensoriales, interneuronas y motoneuronas); de acuerdo con la naturaleza del neurotransmisor (GABAérgicas, glutamatérgicas, colinérgicas, etc.); en relación a su pertenencia a conjuntos neuronales con la misma función (“*sensilla*”, “*amphids*”, “*phasmids*” etc.), o atendiendo a sus características morfofuncionales (morfología axodendrítica, tipo de conectividad sináptica, etc).

Las neuronas sensoriales son responsables en gran parte del comportamiento del nematodo en respuesta a estímulos procedentes del medio que los rodea. Estas neuronas se prolongan (con sus dendritas) hacia el exterior del nematodo mediante aperturas en la cutícula, a través de las

cuales emiten terminaciones sensoriales especializadas (por ejemplo, el caso de las sensillia en las neuronas “*amphids*” ASHL/R). Entre las neuronas sensoriales destacan las quimiosensoriales y las mecanosensoriales. Las quimiosensoriales constituyen dos neuronas “*amphids*” localizadas en la parte anterior del nematodo, dos neuronas “*phasmids*” en la parte posterior (ambas bilaterales y simétricas) y seis neuronas denominadas “*inner labial*” (IL) localizadas en la cabeza del nematodo (Bargmann and Mori 1997). Las neuronas mecanosensoriales pueden ser clasificadas en varias subclases en función de los estímulos en que se especializan y en la respuesta que producen. Así, las neuronas ASH, FLP y OLQ son responsables de la respuesta al toque suave en la parte anterior del nematodo (“*light nose touch*”), contribuyendo cada una de ellas con una determinada fracción en la respuesta final al estímulo. Las neuronas ASH también tienen un papel único en la detección de una elevada osmolaridad y la presencia de repelentes volátiles en el medio (Kaplan and Horvitz 1993). Pero además *C. elegans* tiene la capacidad de distinguir entre las sensaciones de tacto suave y brusco en el cuerpo debido a que las neuronas que se estimulan en ambos casos son diferentes. Las células ALM, AVM y PLM (“*touch cell*”) son las encargadas de la detección del tacto suave (cuando son palpados con un pelo de pestaña) en el cuerpo del nematodo y responsables de la respuesta a la sensación de vibración suave en el medio (Chalfie and Sulston 1981). Mientras que en el tacto brusco, medido experimentalmente mediante palpación con un hilo fino de platino, se estimula la neurona PVD que hace sinapsis con las interneuronas AVA y PVC, y estas a su vez con motoneuronas que son las responsables últimas junto con las células musculares de la respuesta.

Mediante la interacción entre neuronas quimio y mecanosensoriales como ocurre en la interacción entre las neuronas glutamatérgicas IL1 y OLQ (haciendo sinapsis ambas con la neurona RMD), el nematodo puede llevar a cabo comportamientos como el de “*foraging*” (cortos movimientos de la cabeza durante la exploración de la comida) y del reflejo de la retirada ante un estímulo adverso en el medio (Hart, Sims et al. 1995).

En general, la respuesta a los estímulos procedentes del exterior se traduce en la mayoría de las ocasiones en el movimiento del nematodo a través de las motoneuronas mediante una vía directa o a través de las interneuronas. Tanto las motoneuronas como las interneuronas en *C. elegans* extienden sus axones principalmente a lo largo de las vías fasciculadas del cordón nervioso dorsal y ventral, aunque los cuerpos celulares se pueden localizar tanto en los ganglios nerviosos (repartidos en la anatomía del nematodo) como o a lo largo del cordón nervioso ventral, desde donde envían prolongaciones transversales (comisuras) hacia el cordón nervioso dorsal (White, E. et al. 1986).

## **2.1. Neurotransmisión.**

En *C. elegans* el comportamiento, esto es, las diferentes respuestas observadas a los estímulos, requieren la participación de múltiples neuronas y de la comunicación entre ellas. En esta comunicación neuronal juega un papel primordial los neurotransmisores. Los neurotransmisores se liberan en la terminación nerviosa presináptica y posteriormente modifican las propiedades de la célula postsináptica mediante su unión a receptores específicos en ella. A lo largo de los años se han estudiado e identificado diferentes categorías de neurotransmisores que ejercen su función en el sistema nervioso de vertebrados. Entre ellos destacan los colinérgicos (e.g.: acetilcolina), las aminas biógenas como las catecolaminas (e.g.: dopamina) e indolaminas (e.g.: serotonina), aminoácidos (e.g.: glutamato y GABA) y neuropéptidos (e.g.: FMRFamida). A pesar de que el sistema nervioso de *C. elegans* tiene sólo 302 neuronas y de que es relativamente sencillo, la diversidad de los neurotransmisores que utiliza es comparable a la del sistema nervioso de vertebrados. Así, los neurotransmisores clásicos más conocidos de mamíferos se encuentran también en *C. elegans* a excepción de las catecolaminas adrenalina y noradrenalina (Rand, Duerr et al. 2000), aunque las funciones de éstos neurotransmisores en invertebrados son equivalentes a las ejercidas por las aminas biógenas tiramina y la octopamina ambas funcionales en el nematodo (Roeder 2003). Otra característica diferencial respecto al funcionamiento de los neurotransmisores en el nematodo con respecto a mamíferos, es que GABA en *C. elegans* ejerce a veces como inhibitorio y otras veces como excitatorio sináptico, mientras que en mamíferos es siempre un neurotransmisor de carácter inhibitorio (Schuske, Beg et al. 2004).

# Objetivos

El objetivo general de esta tesis ha sido profundizar en los mecanismos neurobiológicos que pudieran estar implicados en los trastornos del espectro autista. Para ello se siguió una primera aproximación experimental analizando polimorfismos de genes implicados en el metabolismo de neurotransmisores y la asociación de éstos con el autismo en una muestra homogénea de pacientes diagnosticados con el trastorno. Una segunda estrategia experimental fue utilizar el nematodo *Caenorhabditis elegans* como modelo para establecer un escenario experimental donde se pudieran analizar mecanismos neurobiológicos básicos implicados en los trastornos del espectro autista.

Dentro de estas estrategias se marcaron los siguientes objetivos específicos:

- 1.- Análisis de asociación de polimorfismos en los genes *SLC6A4*, *DRD4*, *DAT-1* y *MAO-A* con una muestra de casos clínicos diagnosticados con autismo.
- 2.- Comparación de los dominios funcionales de las proteínas neurexina y neuroligina de *C. elegans* con los de las proteínas humanas. Análisis de las deleciones *nrx-1 (ok1649)*, *nrx-1 (tm1961)*, *nlg-1 (ok259)* y *nlg-1 (tm474)* en estirpes mutantes del nematodo y determinación de los dominios funcionales afectados en cada una de las proteínas mutantes.
- 3.- Caracterización fenotípica de mutantes simples de *C. elegans* en los genes *nrx-1* y *nlg-1* y dobles mutantes respecto a las siguientes características fenotípicas de comportamiento: ciclo de defecación, respuesta mecanosensorial, capacidad de exploración, tasa de movimiento, y capacidad de respuesta al choque osmótico.
- 4.- Estudio de los patrones de expresión de los genes *nrx-1* y *nlg-1* en *C. elegans* fusionando los promotores de ambos con las proteínas GFP y/o mCherry.
- 5.- Verificación de la posibilidad del rescate funcional de mutantes de *C. elegans* deficientes en el gen *nlg-1* con una neuroligina humana y si las mutaciones descritas en autismo afectan a su funcionalidad en el nematodo.
- 6.- Interpretación de los resultados obtenidos analizando las implicaciones biológicas y razonando la posibilidad de utilizar *C. elegans* como modelo experimental en el estudio de los mecanismos a nivel molecular que podrían estar implicados en casos de trastornos del espectro autista.

# **Material y Métodos**

# I. Materiales.

## 1. Material Biológico.

### 1.1. Estirpes bacterianas utilizadas.

Las estirpes bacterianas empleadas en este trabajo se detallan en la Tabla 1:

**Tabla 1.** Estirpes bacterianas utilizadas.

<b>Cepas</b>	<b>Genotipo</b>	<b>Especificaciones</b>
<b><i>E. coli</i> DH5<math>\alpha</math></b>	<i>supE44, <math>\Delta</math>lacU169 (<math>\phi</math>80lacZ<math>\Delta</math>M15), hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1</i>	La mutación $\phi$ 80lacZ $\Delta$ M15 permite la $\alpha$ complementación con el extremo amino-terminal de la $\beta$ -galactosidasa, codificado en los vectores pUC y en los derivados del mismo. Sensible al antibiótico ampicilina.  Cepa receptora utilizada en los experimentos de transformación genética de bacterias y para amplificar y aislar ADN plasmídico.
<b><i>E. coli</i> XL1-Blue</b>	<i>F<sup>+</sup>::Tn10 proA+B+ lacIq D(lacZ)M15/recA1 endA1 gyrA96 (Nalr) thi hsdR17 (rk-mk+) glnV44 relA1 lac</i>	Cepa receptora utilizada en los experimentos de transformación genética de bacterias y para amplificar y aislar ADN plasmídico.
<b><i>E. coli</i> OP50</b>	Auxotrofia para uracilo.	Cepa utilizada en el cultivo de <i>C. elegans</i> .
<b><i>E. coli</i> HT115 (DE3)</b>	<i>F<sup>-</sup>, mcrA, mcrB, IN (rrnD-rrnE) 1, lambda -, mrc14::<math>\Delta</math>Tn10 (DE3 lysogen: lavUV5 promoter -T7 polymerase (tet<sup>r</sup>) (IPTG-inducible T7 polymerase) (RNase III -)</i>	Cepa receptora utilizada en experimentos de ARNi.

### 1.2. Muestras de sujetos diagnosticados con autismo.

Los participantes de este estudio fueron un total de 24 niños (82.8 %) y 5 niñas (17.2 %), todos ellos entre 2 y 6 años de edad. El rario de niños y niñas fue de 4.8:1 y se agruparon en un total de 22 tríos completos (pacientes y sus padres) y siete pacientes adicionales.

Todos los niños analizados procedían de padres biológicos, y éstos fueron encuestados en relación al historial familiar de los hijos.

Todos los pacientes fueron diagnosticados en la Unidad de Salud Mental Infanto-Juvenil, del Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba. Los instrumentos de diagnóstico utilizado fueron DSM-IV (“*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorder Classification*”) y ADI-R (“*Autism Diagnostic Interview Revised*”).

Los niveles funcionales de cada paciente fueron calculados usando sistemas de evaluación estándar de acuerdo con la edad y la capacidad de cognición. Los instrumentos utilizados fueron “*Leiter Internacional Performance Scale*” y “*Battelle Developmental Inventory*”. La medida del

coeficiente IQ (“*intelligence quotient*”) obtenida fue de  $50.6 \pm 18.92$  (rango 28-82) y del coeficiente DQ (“*disability quotient*”) fue de  $36.88 \pm 19.44$  (rango 6-65).

Se realizaron exámenes clínicos de los pacientes para descartar si existía alguna otra disfunción física o neurológica. Los individuos diagnosticados con neurofibromatosis, encefalopatía, esclerosis tuberosa o síndrome de X frágil, fueron excluidos del estudio.

Todos los padres aceptaron un consentimiento informado de participación y el estudio fue aprobado por el Comité Ético del Hospital Universitario Reina Sofía y la Universidad de Córdoba.

Las frecuencias alélicas de control se obtuvieron de la población europea utilizando la base de datos ALFRED (“*Allele Frequency Database*”): <http://alfred.med.yale.edu/alfred/index.asp>.

### 1.3. Estirpes de *Caenorhabditis elegans*.

Las estirpes de *C. elegans* empleadas en este trabajo se detallan en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Estirpes de nematodos utilizada.

<i>Estirpe</i>	<i>Gen</i>	<i>Alelo</i>	<i>Origen</i>	<i>Mutación</i>	<i>Especificaciones</i>
Bristol N2	-	-	<sup>a</sup> CGC	“wildtype”	
VC228	<i>nlg-1</i>	ok259	<sup>a</sup> CGC	Inserción 334 pb/ deleción 2341 pb	
FX00474	<i>nlg-1</i>	tm474	<sup>b</sup> NBP-Japan	Deleción 583 pb	
BC13535	<i>nlg-1</i>	<i>sIs13247</i>	Simon Fraser University	-	Estirpe transgénica con la construcción <i>nlg-1::GFP</i> integrada mediante radiación con rayos X.
BC13247	<i>nlg-1</i>	<i>sEx13247</i>	Simon Fraser University	-	Estirpe transgénica con la construcción <i>nlg-1::GFP</i> no integrada
VC1416	<i>nrx-1</i>	ok1649	<sup>a</sup> CGC	Deleción 861 pb	
FX1961	<i>nrx-1</i>	tm1961	<sup>b</sup> NBP-Japan	Deleción 428 pb	
DA609	<i>npr-1</i>	ad609	<sup>a</sup> CGC	Sustitución T (83) a I / T(144) a A	
CRR21	<i>nlg-1</i> ; <i>nrx-1</i>	ok259; ok1649	Este trabajo	-	
CRR23	<i>nlg-1</i> ; <i>nrx-1</i>	ok259; tm1961	Este trabajo	-	

<sup>a</sup> *Caenorhabditis* Genetics Center.

<sup>b</sup> National Bioresource Project for the Experimental Animal “Nematode *C. elegans*”.

## 2. Medios de cultivo.

### 2.1. Medios de cultivo de *Escherichia coli*.

Los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave (1.2 atm. y 120 °C durante 20 minutos) o mediante filtración a través de un diámetro de poro de 0,22 µm.

#### - Medio Luria Bertani (LB).

*Líquido:* bacto triptona (10 gL<sup>-1</sup>); extracto de levadura (5 gL<sup>-1</sup>), NaCl (5 gL<sup>-1</sup>).

*Sólido:* bacto triptona (10 gL<sup>-1</sup>); extracto de levadura (5 gL<sup>-1</sup>), NaCl (5 gL<sup>-1</sup>), bactoagar (15 gL<sup>-1</sup>).

#### - Medio X-Gal (LB+ampicilina+IPTG+X-Gal).

Bacto triptona (10 gL<sup>-1</sup>); extracto de levadura (5 gL<sup>-1</sup>), NaCl (5 gL<sup>-1</sup>), bactoagar (15 gL<sup>-1</sup>), 134 µM isopropil-1-tio-beta-D-galactopiranosido (IPTG), 0.005% X-Gal (p/v en formamida) y 0.005% ampicilina (p/v).

#### - Medio PSI-b.

Bacto triptona (20 gL<sup>-1</sup>); extracto de levadura (5 gL<sup>-1</sup>); MgSO<sub>4</sub> (5 gL<sup>-1</sup>). Ajustar el pH a 7.6 con KOH. Medio utilizado en la obtención de células competentes.

### 2.2. Medios de cultivo de nematodos (*C. elegans*).

Los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave (1.2 atm. de presión y 120 °C durante 20 minutos).

#### - Medio NGM (*Nematodo Grow Medium*).

NaCl (3 gL<sup>-1</sup>), bactoagar (17 gL<sup>-1</sup>), peptona (2.5 gL<sup>-1</sup>), colesterol (5 mg mL<sup>-1</sup>, etanol 95%) (1mL L<sup>-1</sup>), CaCl<sub>2</sub> 1M (1ml L<sup>-1</sup>), MgSO<sub>4</sub> 1M (1 ml L<sup>-1</sup>), tampón KPO<sub>4</sub> 1M, pH 6.0 (25 ml L<sup>-1</sup>).

#### - Medio de selección de transgénicos de *C. elegans* resistentes a Neomicina.

Medio NGM con una concentración 0,4 mg/mL de Neomicina (G-418) Phytotech<sup>®</sup> (potencia: 715 µg/mg).

#### - Medio para ensayos de “exploring”.

Bactoagar (2%), Tween 20 (0,25%), HEPES (10 mM); pH 7.2.

### 2.3. Antibióticos.

Los antibióticos se esterilizaron mediante filtración y se añadieron en las concentraciones indicadas en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Antibióticos utilizados en la elaboración de los medios bacterianos

<b>Antibiótico</b>	<b>Concentración de almacenaje</b>		<b>Concentración en el medio</b>
<b>Ampicilina/Carbenicilina</b>	50 mg/mL	diluido en agua	50 µg/mL
<b>Kanamicina</b>	50 mg/mL	diluido en agua	50 µg/mL
<b>Estreptomicina</b>	50 mg/mL	diluido en agua	50 µg/mL
<b>Cloranfenicol</b>	34 mg/mL	diluido en etanol 100%	34 µg/mL
<b>Tetraciclina</b>	10 mg/mL	diluido en etanol 50% ó 100%	10 µg/mL

### 3. Vectores de clonación.

Para el desarrollo de este trabajo se emplearon los siguientes vectores de clonación, recogidos en la Tabla 4:

**Tabla 4.** Vectores de clonación usados en este trabajo.

<b>Vector</b>	<b>Características</b>	<b>Procedencia/Referencia</b>
<b>pL4440</b>	2790 pb. Este vector permite clonar un fragmento del gen de interés en un <i>polylinker</i> flanqueado por dos promotores T7 con una orientación invertida. Presenta resistencia a carbenicilina.	(Dr. A. Fire, colección 1999). Obtenido de la librería de ARNi gestionada por Dr. Peter Askjaer (CABD-CSIC. U. Pablo Olavide, Sevilla).
<b>pGem<sup>®</sup>-T</b>	3000 pb. Vector que deriva del plásmido pGem <sup>®</sup> -52f (+), linealizado con la enzima <i>EcoRv</i> y con una T añadida en cada uno de los extremos 3'. Facilita la clonación directa de fragmentos de PCR. Es portador de los promotores SP6 y T7 que flanquean el <i>polylinker</i> . Presenta resistencia al antibiótico ampicilina.	Promega MBL
<b>pPD95.75</b> <b>pPD95.77</b>	4487pb. Vectores portadores del gen GFP (" <b>Green Fluorescen Protein</b> "), presenta la región UTR del gen <i>unc-54</i> de <i>C.elegans</i> . Utilizados para el estudio de expresión génica, y para la realización de construcciones portadores con la secuencia ADNc de los genes de interés. Presenta resistencia al antibiótico ampicilina.	Laboratorio Dr. Julián Cerón (Instituto Investigación Biomédica, Bellvitge, Barcelona). Laboratorio Dr. Antonio Miranda Vizuete (CABD-CSIC. U. Pablo Olavide, Sevilla).
<b>pME18S-FL3 (yk406f12)</b>	Vector portador de la secuencia ADNc del gen <i>nlg-1</i> de <i>C.elegans</i> .	National Institute of Genetics, Japón.
<b>C40C9</b>	Vector portador del promotor del gen <i>nlg-1</i> de <i>C.elegans</i> .	Sanger Institute, UK.
<b>C29A12</b>	Vector portador del promotor del gen <i>nrx-1</i> de <i>C.elegans</i> .	Sanger Institute, UK.
<b>pBluescript II SK(+). KIAA1070 (hj05602)</b>	Vector portador de la secuencia ADNc del gen <i>NLGN1</i> humano.	Kazusa DNA Research Institute, Japón.

#### 4. Oligonucleótidos sintéticos.

Los oligonucleótidos utilizados como cebadores en las reacciones de amplificación, secuenciación y extensión se diseñaron con la ayuda del programa Oligo<sup>®</sup> para PC, analizando en cada caso su estabilidad interna, la formación de dímeros y horquillas no deseados, así como diversos parámetros físicos y químicos (T<sub>m</sub>, T<sub>d</sub>, %G+C, %A+T, etc). Los oligonucleótidos fueron sintetizados por la casa comercial Bonsai Technologies. Se indican a continuación los oligonucleótidos que se han empleado en este trabajo. Las letras cursiva y minúscula indicadas en las secuencias de los oligonucleótidos no son fieles a la secuencia original y fueron introducidas para generar un sitio de corte de endonucleasas de restricción.

##### 4.1. Detección de polimorfismos en humanos.

Los oligonucleótidos específicos usados para la detección de polimorfismo en los genes *SLC6A4*, *DAT1*, *DRD4* y *MAO-A* humanos se muestran en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Oligonucleótidos usados en el genotipado de polimorfismos de los genes *SLC6A4*, *DAT1*, *DRD4* y *MAO-A*. Se detalla la temperatura de hibridación y el polimorfismo a analizar.

<b>Marcador molecular</b>	<b>Secuencia (5'→3')</b>	<b>Temp. de hibridación (°C)</b>	<b>Polimorfismo</b>
<b>Región promotora SLC6A4</b>	F:GGCGTTGCCGCTCTGAATGC R:GAGGGACTGAGCTGGACAACCAC	62	Inserción/delección (44 bp) en promotor
<b>VNTR/intrón 2 SLC6A4</b>	F:TGGATTTCTTCTCTCAGTGATTGG R:TCATGTTCTAGCTTACGCCAGTG	57.3	9, 10 ó 12 repet. (17 bp) en intrón 2
<b>VNTR/exón3 DRD4</b>	F:TGCTCTACTGGGCCACGTTC R:TGCGGGTCTGCGGTGGAGTCT	59.7	2 a 8 repet. (48 bp) en exón 3
<b>VNTR/3'UTR DAT1</b>	F:TGTGGTGTAGGGAACGGCCTGAG R:CTTCCTGGAGGTCACGGCTCAAGG	64	7, 9, 10 ó 11 repet. (40 bp) en región 3'UTR
<b>Promotor VNTR MAO-A</b>	F:ACAGCCTCACCGTGGAGAAG R:GAACGGACGCTCCATTCGGA	61.6	3, 3.5, 4, 5 repet. (30 bp) en región promotora

F: oligonucleótido "forward".

R: oligonucleótido "reverse".

##### 4.2. Detección de alelos mutantes en *C. elegans*.

Los oligonucleótidos usados en la detección de alelos mutantes de los genes *nrx-1* y *nlg-1* en *C. elegans* se muestran en la Tabla 6 (ver página siguiente).

##### 4.3. Clonación del gen *mCherry*.

Los oligonucleótidos usados en la clonación del cDNA del gen *mCherry*, y su secuenciación se muestran en la Tabla 7 (ver página siguiente).

**Tabla 6.** Oligonucleótidos usados en el análisis y detección de alelos mutantes en *C. elegans*.

<b>Gen (alelo)</b>	<b>Oligonucleótido</b>	<b>Secuencia (5'→3')</b>
<b><i>nlg-1</i> (ok259)</b>	ok259 <i>nlg-1</i> interF	CGGTGAAAATGTCACACTCG
	ok259 <i>nlg-1</i> interR	AGGCAGAAACGCAGAGAGAG
	ok259 <i>nlg-1</i> exterF	GAAAGCGCAGGTTGAGGTAG
	ok259 <i>nlg-1</i> exterR	CGATTGTTGATGGACAGGTG
<b><i>nlg-1</i> (tm 474)</b>	tm474 <i>nlg-1</i> interF	ATCCTACTTGAGCATTCCGA
	tm474 <i>nlg-1</i> interR	GTGGTTAGCCCCGAAGGAGA
	tm474 <i>nlg-1</i> exterF	ATTCTTGTGCAATTGCGGGA
	tm474 <i>nlg-1</i> exterR	GGGCATGGTGAGAGGTGAAG
<b><i>nrx-1</i> (ok1649)</b>	ok1649 <i>nrx-1</i> interF	TTATGCGGGAGATGAAAAGC
	ok1649 <i>nrx-1</i> interR	GTTGAGCATTTGCAATCGAA
	ok1649 <i>nrx-1</i> exterF	CGGAAGCAAAGAAACCAAAG
	ok1649 <i>nrx-1</i> exterR	CTCTTGCCAGATGTTTCGAT
<b><i>nrx-1</i> (tm1961)</b>	tm1961 <i>nrx-1</i> interF	ATCTGGCCGATCAAAGTTAC
	tm1961 <i>nrx-1</i> interR	TCTAACCTCCCGTTGAGCAT
	tm1961 <i>nrx-1</i> exterF	GCAGTATGCACCTGAACTTG
	tm1961 <i>nrx-1</i> exterR	TGGCCAGATGTTTCGATAAGT

**Tabla 7.** Oligonucleótidos utilizados en la clonación del gen *mCherry*

<b>- Oligonucleótido</b>	<b>- Secuencia (5'→3')</b>
- <b><i>mCherryF</i></b>	- TGACCATGATTACGCCAAGC
- <b><i>mCherryBamHR</i></b>	- GCA <del>ggatcc</del> CGCCCTTCGAGCT

#### 4.4. Clonación de promotores de los genes *nrx-1* y *nlg-1* de *C. elegans*, y cDNAs de los genes neuroliquina de *C. elegans* y humano.

Los oligonucleótidos usados en la clonación de los promotores de los genes *nrx-1* y *nlg-1* de *C. elegans* en vectores de expresión, así como los usados en la clonación de los cDNAs de los genes neuroliquina de *C. elegans* y humano se muestran en la Tabla 8.

**Tabla 8 .** Oligonucleótidos específicos para la clonación y secuenciación

<b>Gen</b>	<b>Oligonucleótido</b>	<b>Secuencia (5'→3')</b>
<b>nrx-1 (promotor)</b>	pPD95.77nrx-1SeqF	TCCTTCGAAATTCTCAGGTTGCTCG
	pPD95.77nrx-1SeqR	GGGAAAAGGGTGAGTGTGAACACG
	nrx-1XbaIF	ACATTTTTAAACA <b>tctaga</b> TTTCTAGG
	nrx-1BamHIR	CGTTAAGTATGGTCC <b>ggatcc</b> ATCAAAC
	nrx-1seqF	AATGTGTATGCCTTTTGGTG
<b>nlg-1 (promotor)</b>	nlg-1XbaIF	T <b>tctaga</b> CATATTTTTGGGGAGGCTTTC
	nlg-1BamHIR	GAAGGAGAAGAAGATAAATG <b>ggatcc</b> ATGC
	nlg-1seqF	ATGCGAATTTGGAAGTGAAC
	pPD95.77nlg-1SeqF	TGCCACCAAAAAGAGGTTTCGAAAG
	pPD95.77nlg-1SeqR	CGAGTCTGTTTATCCCAGCTTGCA
<b>nlg-1</b>	cDNAnlg-1BamHIF	GCGAATTTG <b>ggatcc</b> AACAGGCATG
	cDNAnlg-1EcoRIR	GGGTGT <b>gaattc</b> AAAAACTTGAATTG
	cDNAnlg-1seqF	ATGAGGATCTGAAAGTAGGC
	cDNAnlg-1seqR	GAGAGTTGTGGCGATTC
	ME-774seqF	CTTCTGCTCTAAAAGCTGCG
	ME-1250seqR	TGTGGGAGGTTTTTCTCTA
<b>Nlgn1</b>	TailBgIII <b>Bam</b> HIINlgn1F	ATTA <b>agatct</b> ATTA <b>ggatcc</b> GCCTGTTTCCATCCAAATTCGCATG
<b>NLGN1</b>	cDNANLGN1BamHIF	ATGT <b>ggatcc</b> CATGGCACTGCCC
	cDNANLGN1EcoRIR	AAAAATAGTTT <b>gaattc</b> TCTTATCTGGC

#### 4.5. Oligonucleótidos universales.

Los oligonucleótidos universales usados en este trabajo se muestran en la Tabla 9.

**Tabla 9.** Oligonucleótidos universales para secuenciación de ADN.

<b>Nombre</b>	<b>Secuencia (5'→3')</b>
<b>Forward</b>	GTAAAACGACGGCCAGT
<b>Reverse</b>	AACAGCTATGACCATG
<b>T7-Promoter</b>	TAATACGACTCACTATAGGG
<b>T7-Terminator</b>	GCTAGTTATTGCTCAGCGG
<b>SP6</b>	GATTTAGGTGACACTATAG

#### 4.6. Mutagénesis dirigida de los genes *nlg-1* de *C. elegans*, *Nlgn1* de rata y *NLGN1* humano.

Los oligonucleótidos usados en la mutagénesis dirigida de los genes *nlg-1*, *Nlgn1* y *NLGN1*, y secuenciación se muestran en la Tabla 10.

**Tabla 10.** Oligonucleótidos utilizados en la mutagénesis dirigida de los genes *nlg-1*, *Nlgn1* y *NLGN1*.

<b>Gen (mutación)</b>	<b>Oligonucleótido</b>	<b>Secuencia (5'→3')</b>
<b><i>nlg-1</i> (Arg437Cys)</b>	<i>nlg-1</i> RCmutF	CCGAAATCAATTTGCAATGGAGTTCTG
	<i>nlg-1</i> RCmutR	CAGAACTCCATTGCAAATTGATTTCCGG
<b><i>Nlgn1</i> (Arg453Cys)</b>	<i>Nlgn1</i> RCmutF	CTGAAACTAGATGCAAGACATTG
	<i>Nlgn1</i> RCmutR	CAATGTCTTGCATCTAGTTTCAG
	<i>Nlgn1</i> interSeqF	CAGATACTGATGGAACAAGGAGAG
<b><i>NLGN1</i> (Arg453Cys)</b>	<i>NLGN1</i> RCmutF	TGAAACCAGATGTAAGACATTAC
	<i>NLGN1</i> RCmutR	GTAATGTCTTACATCTGGTTTCAG
	<i>NLGN1</i> interSeqF	TTCAACCAGCTCGATACCACATAG
<b><i>NLGN1</i> (Asp432X)</b>	<i>NLGN1</i> stopmutF	GCTAGTGATTTTTGATTTGCTGTTTC
	<i>NLGN1</i> stopmutR	GAAACAGCAAATCAAAAATCACTAGC

#### 5. Programas para el análisis de secuencias.

Para el procesamiento y manejo de secuencias nucleotídicas y proteicas obtenidos en el transcurso del trabajo se han utilizado distintos *softwares* bioinformáticos, recogidos en la Tabla 11.

**Tabla 11.** Programas informáticos utilizados para el análisis de datos.

<b>Programa</b>	<b>Aplicación</b>	
<b>OLIGO (Mol. Biology Insights Inc., EE.UU)</b>	Diseño de oligonucleótidos con las características deseadas.	
<b>EditSeq</b>	Edición de secuencias.	
<b>LaserGene (DNA-Star)</b>	<b>MapDraw</b>	Análisis de las ORFs y dianas de restricción.
	<b>MegAlign</b>	Alineamiento de secuencias.
<b>BLAST (NCBI) www.ncbi.nlm.nih.gov/ blast/Blast.cgi</b>	<b>SeqMan</b>	Ordenamiento de "contigs" y ensamblaje de secuencias de ADN.
	<b>tBlastn</b>	Búsqueda de secuencias nucleotídicas que codifican secuencias aminoacídicas similares a una proteína de interés.
	<b>Blastp</b>	Búsqueda de proteínas similares a una proteína de interés.
<b>GeneScan 3.7 (Applied Biosystems)</b>	Análisis de fragmentos para el estudio de polimorfismos genéticos.	

## Continuación

---

<b>KODAK 1D Image Analysis</b>	Edición y análisis de imágenes obtenidas de geles de ADN.
<b>MultiGange v3.0 Image Reader LAS-3000</b>	Revelado y análisis de imágenes obtenidas de membranas de <i>wester blot</i> .
<b>Image J</b>	Edición y análisis de imágenes obtenidas de geles de ADN, y edición de imágenes obtenidas con el microscopio Leica.
<b>Leica IM 500, Leica IM 50 4.0 y Leica QWin</b>	Edición y análisis de imágenes obtenidas con el microscopio Leica.
<b>FlexiProt</b>	Alineamiento estructural 3D de secuencias proteicas.
<b>Bioedit</b>	Edición de alineamiento de secuencias.
<b>SwissPDBviewer v3.7</b>	Modelado estructural proteínas NLG-1 y NLGN1.
<b>Promoterome Database (Harvard University)</b>	Análisis de promotores <i>C. elegans</i> .

---

## II. Métodos.

### 1. Crecimiento y mantenimiento de organismos.

#### 1.1. Bacterias.

*Escherichia coli* se cultivó en medio líquido LB a 37 °C con agitación (120-200 rpm) y en medio sólido en una estufa a la misma temperatura. La conservación de estirpes bacterianas durante largos períodos de tiempo se llevó a cabo a -80 °C en medio LB líquido con 30% glicerol (v/v). Para períodos cortos se mantuvieron en medio LB sólido a 4 °C con el antibiótico de selección para todas aquellas estirpes portadoras de plásmidos con gen de resistencia, y para estirpes que no requieren selección mediante antibiótico.

#### 1.2. Nematodos: *C. elegans*.

##### - Crecimiento y mantenimiento.

Todos los nematodos utilizados fueron crecidos y mantenidos a 20°C y a 16°C en condiciones estándar, y cultivados en placas de medio NGM (1,6% agar) sembradas previamente con un césped bacteriano con 50 µL de *E.coli* OP50 crecida en medio LB (Brenner 1974).

*C. elegans* se mantuvo en incubación en medio sólido a 20 °C y 16 °C en incubadores termostatzados. La elección de cada una de estas temperaturas fue realizada en función de las condiciones de experimentación.

La conservación de estirpes de *C. elegans* durante períodos largos de tiempo se llevó a cabo a -80 °C en medio de congelación (tampón S; 30% glicerol (v/v)). Para ello se lavaron con 0.6 mL de tampón S (129 mL 0.05 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 871 mL 0.05 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 5,85 g NaCl) las placas de medio sólido donde crecieron los nematodos, y se recogió todo el volumen en viales de 1,5 mL estériles. A continuación se añadió a cada vial un volumen igual de tampón S y glicerol 30%

(v/v). Posteriormente cada uno de los viales fueron incubados a -80 °C durante 12 horas en compartimentos de polipropileno, antes de su conservación definitiva a -80°C.

La conservación de estirpes durante periodos de hasta 6 meses, fue realizada mediante la incubación de los cultivos en medio sólido a 16 °C.

#### - Lavado.

En aquellos ensayos donde se requería que los nematodos estuviesen libres de restos de bacterias (*E. coli* OP50) y de otros componentes del medio de cultivo, se siguió el siguiente protocolo de lavado:

Se lavaron las placas de cultivo donde se encontraban los nematodos en un determinado estadio de su desarrollo, añadiendo un volumen de 3 mL de tampón de lavado CTX (5mM  $K_2HPO_4/KH_2PO_4$  pH6.6, 1mM  $CaCl_2$ , 1mM  $MgSO_4$ ). A continuación todo este volumen, donde se encontraban los nematodos en suspensión, se recogió con una micropipeta y se depositó en un vial de fondo cónico donde se añadió 10 mL de tampón CTX. Tras dejar decantar durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y se añadió otros 10 mL de tampón CTX y se dejó decantar de nuevo durante 5 minutos; una vez eliminado el sobrenadante se añadió por último 5 mL de tampón CTX y tras 5 minutos decantando se eliminó de nuevo el sobrenadante y se dejó un pequeño volumen residual donde se encontraban todos los nematodos libres de restos de medio y bacterias.

Finalmente, los nematodos que iban a ser utilizados se recogieron con una micropipeta, aproximadamente 5 µL, y se depositó en las placas donde se iban a realizar el ensayo.

## **2. Manipulación de ácidos nucleicos.**

### **2.1. Aislamiento de ácidos nucleicos.**

#### - Purificación de ADN plasmídico de *E. coli* a pequeña escala con CTAB (minipreps).

Se partió de un cultivo de 12-14h en 5 mL de medio de selección obtenido a partir del inóculo de una única colonia de la estirpe portadora del plásmido de interés. Tras centrifugar 3 mL de este cultivo durante 3 min. a 1300 rpm y retirar el sobrenadante, se resuspendieron las células en 200 µL de STET (8% sacarosa p/v; 0,1% Tritón X 100 v/v; 50 mM EDTA; 50 mM Tris-HCl, pH 8,0). A continuación se añadieron 4 µL de lisozima (50 mg/mL) para provocar la lisis celular y 2 µL de RNasa A (10 mg/mL) para eliminar el ARN contaminante y se incubó a temperatura ambiente durante 10 min. Seguidamente la muestra se calentó a 100 °C durante 45 segundos y, tras centrifugar durante 10 min. a 1300 rpm, se retiraron los restos celulares, de aspecto mucoso, con un palillo de dientes esterilizado. Se añadieron 10 µL de CTAB (5% bromuro de hexadeciltrimetilamonio p/v. Mantener a 37 °C para evitar su precipitación) al

sobrenadante para precipitar el ADN y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. Posteriormente se centrifugó durante durante 10 min. a 1300 rpm y se retiró el sobrenadante. A continuación se añadieron 300 µL de una solución 1,2 M NaCl y 750 µl de etanol puro frío. Se homogeneizó completamente y se centrifugó durante 10 min. a 1300 rpm. El precipitado se lavó con etanol al 70% (v/v), se secó para eliminar cualquier resto de etanol y se resuspendió en 20 µL de agua desionizada esterilizada.

- Extracción de ADN genómico de *C. elegans*.

El protocolo utilizado está basado en el descrito por Williams et al. y Barstead et al. (Barstead, Kleiman et al. 1991; Williams, Schrank et al. 1992) con algunas modificaciones.

Se colocó uno o varios nematodos en un vial de PCR, al que se le añadió previamente de 5-10 µL de tampón de lisis (1X tampón PCR (10X PCR Buffer :100 mM Tris, 500 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub> pH 8.3) ; 5% proteinasa K (20 mg/mL) en función del número de nematodos y/o del estado larvario de los mismos. A continuación, tras centrifugar durante 30 seg. a 13000 rpm se congelaron cada una de las muestras con buffer de lisis a -80 °C sumergidos en isopropanol durante 1 hora. Inmediatamente, una vez congeladas las muestras, se sometieron a 65 °C durante 90 min. seguidos de 15 min. a 95 °C, para favorecer la liberación del ADN genómico del nematodo; para este último tratamiento se utilizó un termociclador automático programado previamente con las dos etapas descritas. Finalizado el programa de extracción de ADN genómico, éste fue conservado a -80 °C hasta su utilización.

- Extracción de ADN humano.

Todas las muestras de sangre analizadas fueron recogidas en viales de extracción que contenían EDTA, y fueron conservados a -80 °C hasta su utilización.

Se partió de 600 µL de sangre a los que se añadieron 375 µL de tampón de lisis de células sanguíneas (0.32 M sacarosa, 10 mM Tris HCL, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.75 % Triton-X-100, pH 7.6) y 525 µL de agua desionizada y esterilizada. Esta solución se homogeneizó mediante varias inversiones y se incubó durante 3 min. a 0 °C. Tras centrifugar durante 30 seg. a 1300 rpm y eliminar el sobrenadante, con la ayuda de una micropipeta, se resuspendió el precipitado con 200 µL de tampón de lisis y 600 µL de agua desionizada y esterilizada durante 30 seg. con el vórtex a velocidad media.

Tras incubar durante 1 min. a temperatura ambiente se observó una suspensión viscosa, correspondiéndose a la rotura de las células sanguíneas. A continuación, se centrifugó durante 30 seg. a 1300 rpm y tras eliminar el sobrenadante con la ayuda de la micropipeta se dejó un volumen residual de 20 µL, al que se añadió 500 µL de buffer para la proteinasa K (20 mM Tris-HCl, 4 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 100 mM NaCl, pH 7.4) y 50 µL de 10% SDS y se resuspendió con la ayuda del vórtex a velocidad media-máxima durante 30 seg. A continuación se añadió a la

resuspensión 5  $\mu\text{L}$  de proteinasa K (20 mg/mL) y se incubó a 55 °C durante 30 min. Finalizada la incubación, la solución se dejó a temperatura ambiente durante 10 min. y posteriormente se añadió 200  $\mu\text{L}$  de NaCl 5,3 M y se agitó en vórtex durante 15 seg. Seguidamente después de centrifugar durante 1 min. a 1300 rpm se depositó el sobrenadante resultante en un vial nuevo al que se le añadió 600  $\mu\text{L}$  de isopropanol (mantenido a -20 °C) para conseguir la precipitación del ADN. Tras centrifugar durante min. a 1300 rpm y eliminar el sobrenadante, el ADN se lavó con una solución de etanol 70 % (v/v) y una vez completamente seco se resuspendió en 100  $\mu\text{L}$  de agua desionizada y estéril para conseguir la hidratación del ADN obtenido y se incubó durante 8 horas a 4 °C.

## **2.2. Tratamiento enzimático de ácidos nucleicos.**

### **- Tratamiento con endonucleasas de restricción.**

Las enzimas de restricción empleadas para los tratamientos fueron suministradas por las casas comerciales Roche y BioLab. Los tratamientos del ADN con una única enzima de restricción o con enzimas que actúan en el mismo tampón se realizaron en el tampón y a la temperatura de incubación recomendados por el fabricante. Para aquellas enzimas cuyos tampones no eran compatibles entre sí, el cambio de tampón se realizó para la segunda enzima modificando el utilizado para la primera enzima. El ADN estaba a una concentración de 100 ng/ $\mu\text{L}$  y se utilizaron 1-2 unidades de enzima por microgramo de ADN, sin que el volumen añadido superara nunca el 10% del volumen total. Las incubaciones se llevaron a cabo a la temperatura óptima de la enzima normalmente durante no más de 3 horas.

Las enzimas de restricción se inactivaron según las instrucciones del fabricante, generalmente por choque térmico (65 °C durante 15 minutos).

### **- Unión de fragmentos de ADN.**

La unión de fragmentos de ADN a vectores linearizados se llevó a cabo utilizando el *kit Rápido de Ligación de ADN (Roche)*, utilizando una relación molecular 3:1 de inserto y vector. El resto del proceso fue realizado siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para realizar la clonación de fragmentos de ADN amplificados por PCR se empleó el sistema pGEM<sup>®</sup>-T Vector System de Promega y/o de MBL, y los vectores de la serie pPD95 específicos para *C. elegans* (pPD95.75 y pPD95.77) siguiendo las instrucciones del fabricante y utilizando una relación 3:1 de inserto y vector. Antes de su unión, los productos de PCR se purificaron utilizando el kit GENCLEAN<sup>®</sup> Turbo Nucleic Acid Purification kit (Bio-101) y otros kits comerciales.

## **2.3. Electroforesis de ácidos nucleicos.**

### **- Geles de agarosa.**

La separación e identificación de moléculas de ADN se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa ("Agarose SPT", Duchefa) disuelta en tampón TAE (40 mM Tris-acetato; 1 mM EDTA pH 8.0). La concentración de agarosa varió en función del tamaño de los fragmentos a separar, oscilando entre 0.7 y 2% (p/v). Para poder visualizar los ácidos nucleicos por transiluminación con luz ultravioleta, se añadió bromuro de etidio (0.5 µg/mL). Cada muestra se mezcló con tampón de carga para geles de agarosa (0.25% azul de bromofenol p/v; 0.25% azul de xilencianol p/v; 40% sacarosa p/v en 5X TAE) en proporción 4:1 (v/v). La electroforesis se realizó en cubetas horizontales con tampón TAE, a un voltaje constante de 1-4 V/cm.

Los geles se fotografiaron con una cámara digital Kodak modelo DC290 con filtro Warten 22A. La iluminación inferior procedía de un transiluminador de luz ultravioleta modelo TCX (Vilber Lourmat).

Para localizar el tamaño de los fragmentos de ADN se cargó rutinariamente en cada gel ADN del fago lambda digerido con la enzima de restricción *HindIII* (fragmentos de 0.2 a 23.1 kb, Invitrogen), y marcadores de peso molecular de diferentes casas comerciales.

#### - Electroforesis capilar.

Los fragmentos genómicos amplificados para detectar el polimorfismo en la región VNTR/exón 3 del gen *DRD4* y en la región VNTR del promotor del gen *MAO-A*, se resolvieron mediante electroforesis capilar mediante el analizador ABI Genetic Analyzer (ABI PRISM-3130, Applied Biosystems) en el Servicio Central de apoyo a la Investigación (SCAI), de la Universidad de Córdoba.

#### - Recuperación de los fragmentos de ADN de geles de agarosa.

La purificación de fragmentos de ADN se realizó usando el kit GENCLEAN® Turbo Nucleic Acid Purification kit (Bio-101) y otros, siguiendo las instrucciones del fabricante. Las soluciones incluidas en el kit proporcionan la concentración salina y pH adecuados para la unión del ADN a una membrana de sílice y su posterior elución en condiciones básicas.

### **2.4. Cuantificación de ácidos nucleicos.**

La cuantificación de la concentración de ADN en las purificaciones y/o extracciones se determinó mediante medida de la densidad óptica a una longitud de onda de 260 nm, empleando para ello un espectrofotómetro (Nanodrop® ND-1000). En ocasiones puntuales, la cuantificación fue por comparación con cantidades conocidas de fragmentos de tamaños discretos de marcadores de tamaño molecular comerciales.

## **3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).**

### 3.1. PCR estándar.

Para la amplificación estándar de fragmentos de menos de 4,5 kb se emplearon ADN polimerasas termoestables (Taq de MBL o BioTaq de Biotools), en las condiciones de reacción indicadas en la Tabla 12. La reacción se realizó con  $0,75 \text{ pmoles}\mu\text{L}^{-1}$  de cada uno de los dos oligonucleótidos empleados, una concentración de 2 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 0,16 mM de cada uno de los dNTPs y  $0,05 \text{ U}\mu\text{L}^{-1}$  de polimerasa.

**Tabla 12.** Condiciones estándar de PCR. N es 25 si el molde utilizado es plasmídico y 35 si es ADN genómico o ADN copia, Tun es la temperatura de unión de los oligonucleótidos al molde, que depende de los oligonucleótidos y Tex el tiempo de extensión de la reacción, normalmente 1 minuto por cada kb de producto.

<i>Etapa</i>	<i>Temperatura</i>	<i>Tiempo</i>	<i>Número de ciclos</i>
Desnaturalización inicial	94 °C	5 minutos	1
Desnaturalización	94 °C	30 segundos	N
Unión del oligonucleótido	Tun.	30 segundos	
Extensión	72 °C	Tex.	
Extensión final	72 °C 4 °C	7 minutos indefinido	1

La cantidad de ADN molde empleada fue de  $2 \text{ ng}\mu\text{L}^{-1}$  cuando se usó ADN plasmídico.

Para realizar la PCR a partir de una colonia bacteriana (PCR de colonia) se tomó la colonia con un palillo de dientes estéril y se resuspendió en 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada (con el mismo palillo se inocularon 3-5 mL de medio selectivo para la posterior extracción del plásmido), se hirvió durante 10 minutos, se enfrió en hielo durante 5 minutos y se centrifugó a 12000 g durante 10 minutos. Como molde se utilizaron 5  $\mu\text{L}$  del sobrenadante para un volumen de reacción de 10  $\mu\text{L}$ .

#### - Precipitación con isopropanol de productos de PCR.

Se utilizó esta técnica cuando el producto de PCR fue único, con el fin de eliminar tampón, polimerasa y dNTPs sobrantes de la reacción de PCR.

Para ello se añadió 1 volumen de una disolución 4M de acetato amónico pH 5.2 y 3 volúmenes de isopropanol. Se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos y posteriormente se centrifugó a 12000 g durante 30 minutos. Seguidamente se retiró el sobrenadante, se lavó en dos ocasiones con 70 % etanol (v/v) y, por último, se resuspendió en el volumen deseado de agua desionizada.

### 3.2. PCR para amplificar ADN genómico de *C. elegans*.

La extracción del ADN genómico de *C. elegans* y las reacciones de PCR fueron realizadas siguiendo el siguiente protocolo:

**Tabla 13.** Condiciones de la PCR para amplificar ADN genómico de *C. elegans*. Tun es la temperatura de unión de los oligonucleótidos al molde, que depende de los oligonucleótidos, y tex el tiempo de extensión de la reacción, normalmente 1 minuto por kb de producto.

<i>Etapa</i>	<i>Temperatura</i>	<i>Tiempo</i>	<i>Número de ciclos</i>
Desnaturalización inicial	95 °C	15 minutos	1
Desnaturalización	95 °C	30 segundos	35
Unión del oligonucleótido	Tun.	1 minuto	
Extensión	72 °C	Tex.	
Extensión final	72 °C 4 °C	7 minutos indefinido	1

- Pretratamiento de PCR.

Se seleccionaron nematodos individualmente, y se introdujeron en un tubo de reacción de PCR que contenía 10 µL de tampón de lisis (95 µL tampón de PCR + 5 µL 20 mg/mL proteinasa K). El tampón de PCR tiene un pH de 8.3 y se compone de 10 mM Tris, 50 mM KCl y 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>. A continuación se dio un pulso de centrifugación de varios segundos en una microfuga a máxima velocidad para precipitar los nematodos. Se incubaron cada uno de los tubos a una temperatura de -80°C al menos por 1 hora. En esta etapa se puede conservar el ADN genómico liberado indefinidamente, si es necesario. Transcurrido ese tiempo, antes de la descongelación, se sometió a 65°C durante 90 minutos, seguido de una incubación durante 15 minutos a 95°C inactivar la proteinasa K.

- Mezcla de reacción de PCR.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 50 µL (tampón de PCR 1x, 0,8 mM dNTPs, 0,5 µM oligonucleótidos específicos, 0.05 U/µL Taq polimerasa y 10 µL de suspensión de lisis de nematodo).

Las condiciones de temperaturas y ciclos para la PCR vienen indicadas en la Tabla 13.

### 3.3. PCR para el genotipado de polimorfismos.

Las regiones genómicas de interés fueron amplificadas con oligonucleótidos diseñados específicamente (Tabla 14).

**Tabla 14.** Condiciones de la PCR usadas para el análisis de los polimorfismos de los genes *SLC6A4*, *DRD4* y *MAO-A*. Se indica las diferentes temperaturas de hibridación de los cebadores utilizadas para cada polimorfismo.

<i>Etapa</i>	<i>Temperatura (°C)</i>		<i>Tiempo</i>	<i>nº ciclos</i>
Desnaturalización inicial	94		5 min.	1
Desnaturalización	94		30 seg.	40
Unión del cebador	5-HTTLPR	62	30 seg.	
	( <i>SLC6A4</i> )			
	VNTR/intrón2	57.3		
	( <i>SLC6A4</i> )			

Continuación

Unión del cebador	VNTR/exón 3 ( <i>DRD4</i> )	59.7		
	Promotor <i>MAO-A</i>	61.6	30 seg.	
Extensión	72		1 min.	
Extensión final	72		7 min.	1
	4		Indefinido	-

La reacción de PCR utilizada para analizar los polimorfismos de la región promotora (5-HTTLPR) y del VNTR del intrón 2 del gen *SLC6A4*, del VNTR de la región 3'UTR del gen *DATI*, del VNTR del exón 3 del gen *DRD4* y del VNTR de la región promotora del gen *MAO-A*; se realizó utilizando una cantidad de ADN genómico molde de 80-100 ng, 15 pmoles $\mu\text{L}^{-1}$  de cada uno de los cebadores empleados, una concentración final de 8 mM de una mezcla de dNTPs (ATP, TTP, CTP y GTP), 25 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 5 U $\mu\text{L}^{-1}$  de polimerasa (MBL<sup>®</sup>), 1X tampón E de la polimerasa (MBL<sup>®</sup>), 3X tampón “GC Enhancer” (MBL<sup>®</sup>) y tampón “Y Enhancer” (MBL<sup>®</sup>). La concentración del tampón “Y Enhancer” varió dependiendo del fragmento genómico amplificado: para amplificación de la región del VNTR/intrón 2 del gen *SLC6A4* se utilizó una concentración 1X, para la región promotora del gen *SLC6A4*, el VNTR/exón 3 del gen *DRD4* y el VNTR de la región promotora del gen *MAO-A* se usó una concentración 2X, y 3X para el VNTR de la región 3'UTR del gen *DATI*.

La reacción de PCR en todos los casos se realizaron en un volumen final de 10  $\mu\text{L}$ .

Las condiciones de temperaturas y ciclos para la PCR vienen indicadas en la Tabla 14 y 15.

**Tabla 15.** Condiciones de la PCR usadas para el análisis de los polimorfismos del genes *DATI*.

<i>Etapa</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Tiempo</i>	<i>nº ciclos</i>
Desnaturalización inicial	94	10 min.	1
Desnaturalización	94	1 min.	40
Unión del cebador	64	1 min.	
Extension	72	1 min.	
Extension final	72	10 min.	1
	4	Indefinido	

### 3.4. PCR con polimerasa del kit Expand Long Template PCR System (Roche).

La amplificación se llevó a cabo con este kit en aquellos casos en los que resultó de especial importancia evitar la introducción de mutaciones durante la amplificación o para fragmentos mayores de 4,5 kb.

La amplificación se llevó a cabo con 0,3 pmoles $\mu\text{L}^{-1}$  de cada uno de los dos oligonucleótidos empleados, una concentración 0,4 mM de cada uno de los dNTPs y 0,15 U $\mu\text{L}^{-1}$  de polimerasa. Con el kit se suministra tres tampones que, entre otros componentes, contienen cantidades de

magnesio diferentes. El tampón empleado varió en los distintos experimentos. La cantidad de ADN genómico o plasmídico añadidas fueron similares a las de la PCR estándar.

Las condiciones de temperaturas y ciclos para la PCR vienen indicadas en la Tabla 16 .

**Tabla 16.** Condiciones de la PCR con el kit Expad Long Template PCR System (Roche). Tun es la temperatura de unión de los oligonucleótidos al molde, que depende de los oligonucleótidos, y Tex el tiempo de extensión de la reacción, normalmente 1 minuto por kb de producto. \* Se usó 68 °C como temperatura de extensión para fragmentos a amplificar mayores de 3 kb, o 72 °C para fragmentos de 3 kb o mayores.

<i>Etapa</i>	<i>Temperatura</i>	<i>Tiempo</i>	<i>Número de ciclos</i>
Desnaturalización inicial	92 °C	2 minutos	1
Desnaturalización	92 °C	10 segundos	30
Unión del oligonucleótido	Tun.	30 segundos	
Extensión	68 °C -72 °C *	Tex.	
Extensión final	68 °C -72 °C * 4 °C	7 minutos indefinido	1

### 3.5. Mutagénesis mediante superposición.

El protocolo está basado en el descrito por Ho et al. (Ho, Hunt et al. 1989), que consiste en la introducción de mutaciones dirigidas y localizadas empleando la técnica de PCR (Figura 1). Se diseñó una pareja de oligonucleótidos complementarios (llamados 1 y 2) que contenían la mutación que se deseaba introducir, centrada dentro del fragmento de interés. Por otro lado, se diseñaron oligonucleótidos que flanqueaban la región a amplificar (llamados a y b). La temperatura de unión al molde de los cebadores 1 y 2 fue mayor que la de los cebadores a y b. Se realizó una primera PCR empleando las parejas de cebadores a+2 y 1+b. El producto de PCR obtenido en cada reacción se purificó (usando para ello kits comerciales), evitando co-purificar restos del molde original que pudieran interferir en las reacciones posteriores.

A continuación, se realizó una segunda PCR utilizando como molde los fragmentos amplificados y purificados en las reacciones anteriores. Estos dos fragmentos (1<sup>er</sup> segmento PCR y 2<sup>o</sup> segmento PCR) eran portadores de la mutación a introducir en el segmento final, y aparearon entre sí por la región complementaria solapante correspondiente a parte de la cadena complementaria y a la zona mutada. En esta segunda PCR se utilizó la pareja de oligonucleótidos externos a y b, para completar las cadenas para obtener un único fragmento bicatenario portador de la mutación. Se realizó a la temperatura de unión de los oligonucleótidos externos, con un tiempo de extensión equivalente al fragmento completo de ADN (Figura 1).

Las condiciones de la PCR variaron según la polimerasa utilizada. El producto de la segunda PCR fue purificado mediante kits comerciales, y fue utilizado para su clonación en los vectores adecuados.

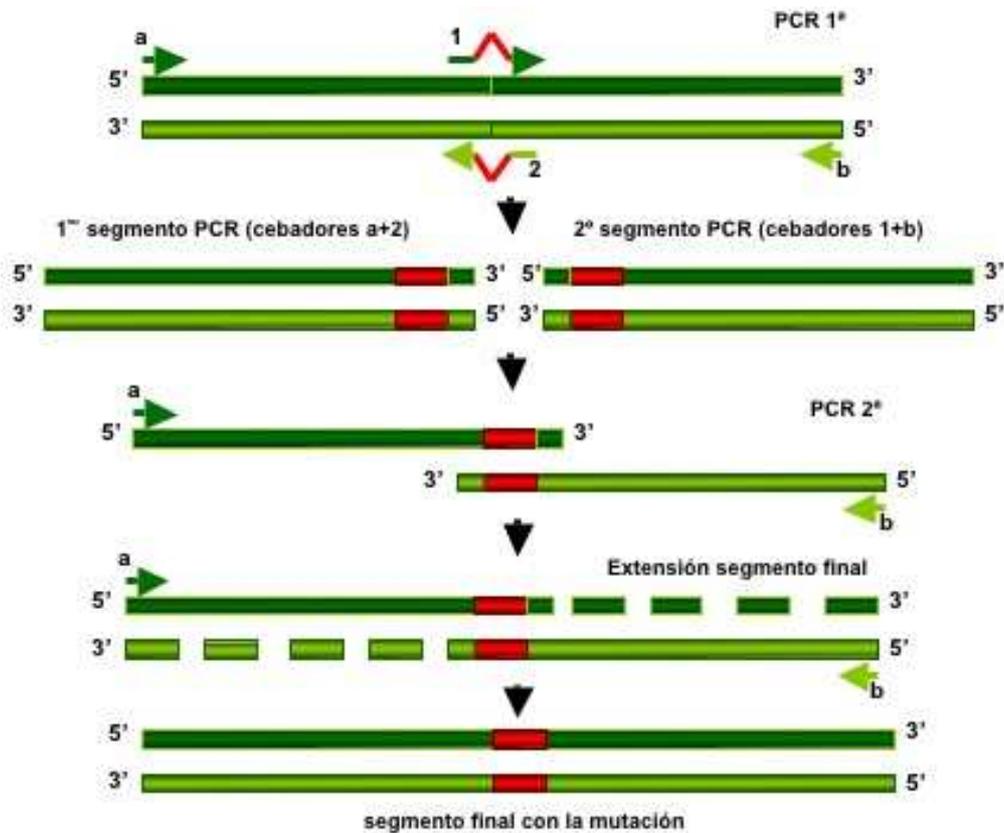


Figura 1. Esquema de la técnica de mutagénesis mediante superposición. Los segmentos en rojo indican la mutación elegida para introducir el segmento de ADN correspondiente. Las cadenas complementarias del segmento de ADN se representan en verde oscuro y claro. Las líneas rojas localizadas en los oligonucleótidos indican la secuencia mutada a introducir.

## 4. Manipulación de proteínas.

### 4.1 Determinación de la concentración de proteínas.

La concentración de proteína se determinó según el método de Bradford (Bradford 1976). Este método se basa en la reacción entre los grupos sulfonados ácidos presentes en el Azul de Coomassie (Brilliant blue G-250), por fuerza iónica, con grupos amino libres presentes en los aminoácidos básicos de las proteínas (arginina, lisina e histidina). Los cambios de absorbancia a 595 nm serán directamente proporcionales a la concentración de proteína presente, la cual será calculada posteriormente utilizando una recta patrón. Para la elaboración de la recta patrón se utilizó una disolución de BSA de concentración conocida ( $2,5 \text{ mgmL}^{-1}$ ) de la que se realizaron diluciones entre  $0,75$  y  $25 \text{ } \mu\text{gmL}^{-1}$ . La reacción colorimétrica se llevó a cabo añadiendo reactivo de Bradford comercial (BioRad) sobre las disoluciones de BSA y sobre las muestras problema. Tras 15 minutos de incubación en oscuridad se midió la absorbancia a 595 nm.

#### **4.2 Electroforesis desnaturante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).**

Las proteínas se visualizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE, Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrilamide Gel Electroforesis; (Laemmli 1970)).

##### - Preparación del gel.

Para el gel separador (5 mL), se mezclaron 1,25 mL de disolución LGB (“*Lower Gel Buffer*”) (1,5 M Tris-HCl, pH 8.8; 0,4% SDS), la cantidad de 40% Acrilamida:Bisacrilamida (37,5:1) (BioRad) para lograr la concentración deseada y agua desionizada. La polimerización se inició añadiendo 30 µL de 10% Persulfato de amonio (APS, de Biorad; v/v) y 10 µL de Temed (N,N,N',N'-Tetrametiletildiamina; Sigma). Tras verter la mezcla entre los dos cristales, se añadió suavemente agua hasta el borde. En el momento en el que el gel separador polimerizó, se retiró el agua invirtiendo el gel.

Para el gel concentrador (5 mL), se mezclaron 1,25 mL de disolución UGB (“*Upper Gel Buffer*”) (0,5 M Tris-HCl, pH 6.8; 0,4% SDS), 0,75 mL de 40% Acrilamida:Bisacrilamida (37,5:1) y 3 mL de agua desionizada. Para permitir la polimerización se añadieron 30 µL de 10% APS (v/v) y 10 µL de Temed. Esta mezcla se añadió lentamente entre los cristales que ya tenían el gel separador. Se colocó el peine para formar los pocillos, y se dejó polimerizar durante 1 hora.

##### - Preparación de muestras.

Para la recolección de los nematodos, se lavaron las placas de cultivo añadiendo un volumen de 3 mL de tampón de lavado CTX (5mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH6.6, 1mM CaCl<sub>2</sub>, 1mM MgSO<sub>4</sub>), se dejó que los nematodos decantaran y se eliminó el sobrenadante. A continuación se añadieron 5 mL de una solución de PBS (1X) y se centrifugó a 5000g durante 2 minutos y se eliminó el sobrenadante. El pellet conteniendo a los nematodos se mantuvo a -80°C durante 30 minutos, y tras su descongelación en hielo se añadió un volumen de 500 µL de tampón de lisis para extracción de proteínas (10 mM Tris, 150 mM NaCl, 1mM EDTA, 0,1% NP40, 2mM PMSF; pH 7.4). Seguidamente se sometió a 20 pulsos de 3 segundos (con una intensidad entre el 30-40%) de sonicación en hielo. El lisado de nematodos resultante se transfirió a un vial de 1,5 mL y se mantuvo en agitación orbital durante 30 minutos a una temperatura de 4 °C, se centrifugó a 20000g durante 30 minutos, a una temperatura de 4 °C, y el sobrenadante con las proteínas en suspensión se transfirió a un nuevo vial conservándose a -20 °C.

Un total de 20 µg de proteína total se mezclaron con tampón de carga para proteínas (50 mM Tris-HCl, pH 6,8; 8% glicerol (v/v); 1,6% SDS p/v; 4% β-mercaptoetanol (v/v); 0,1% azul de bromofenol (p/v), se desnaturizaron a 100 °C durante 10 minutos, se centrifugaron 10 minutos a 12000 g y se aplicaron en el gel SDS-PGE. Como marcadores de peso molecular se utilizó una mezcla comercial de proteínas (BioRad) compuesta por miosina (200 KDa), β-galactosidasa

(116.25 KDa), fosforilasa b (97.4 KDa), seroalbúmina bovina (66.2 KDa), ovoalbúmina (45 KDa), anhidrasa carbónica (31 KDa), inhibidor de tripsina (21.5 KDa), lisozima (14 KDa) y aprotinina (6.5 KDa).

- Electroforesis.

La electroforesis se realizó en tampón Tris-Glicina (25 mM Tris (Trizma base); 192 mM glicina; 0,1% SDS (p/v); pH 8,3) a un voltaje constante de 90 V, en el sistema vertical *Mini Protean<sup>®</sup> cell* (BioRad).

- Tinción del gel de proteínas y conservación.

Los geles se tiñeron con solución Coomassie (0,125% del colorante Azul de Coomassie (Brillante Blue R-250 (p/v) disuelta en una mezcla de 60% metanol (v/v) y 10% ácido acético (v/v) en agua destilada), durante al menos 1 hora, y el exceso de tinción se eliminó lavando con solución *High Destain* (50% de metanol (v/v) y 10% ácido acético (v/v) en agua) durante 30 minutos y con una solución *Low Destain* (5% de metanol (v/v) y 7% de ácido acético (v/v) en agua) durante al menos 1 hora.

La conservación de los geles se realizó entre dos hojas de celofán incoloro evitando las burbujas, y se dejaron secar a temperatura ambiente durante al menos dos días.

### **4.3. Detección y análisis de proteínas. Western blot.**

Para el análisis western blot se resuspendieron 20 µg de proteína total en tampón de carga (50 mM Tris-HCl, pH 6.8; 8% glicerol (v/v); 1,6% SDS w/v; 4% β-mercaptoetanol (v/v); 0,1% azul bromofenol), y se separó en geles SDS poliacrilamida (10%) a un voltaje constante de 90 V, usando como tampón de electroforesis Tris-HCl/glicina/SDS (50 mM, 400 mM y 0,02%, respectivamente). Los geles fueron transferidos a membranas de nitrocelulosa (BioRad) usando el sistema *Mini Trans-blot<sup>®</sup> Cell* (BioRad) con un tampón de transferencia conteniendo 40 mM Tris-HCl pH 7.5, 39 mM glicina, 0,0375% SDS y 20% metanol a un volumen constante (30 V a 4°C durante toda una noche).

Para la detección western blot, las membranas fueron bloqueadas usando 1% de *skimmed milk* durante 45 minutos a temperatura ambiente, y analizadas con el anticuerpo policlonal NLGN1(H-45) (*Santacruz*) siguiendo las instrucciones del fabricante. El revelado de las membranas se realizó mediante la adición de un anticuerpo secundario α-*Rabbit*-HRP, y el kit de revelado *ECL Plus immunoblotting reagent* (GE Healthcare).

## **5. Observación microscópica de *C. elegans*.**

Para la observación microscópica de los nematodos, estos fueron depositados sobre un cubreobjetos con una gota de 2% agarosa solidificada (“*pad agarose*”). Sobre el *pad agarose* se colocó una pequeña gota de una solución 10 mM de levamisol (un agonista de la acetilcolina) para anestesiarse a los nematodos. A continuación se colocaron los animales sobre la gota de levamisol y, cuidadosamente se depositó un cubreobjetos de menor tamaño que el primero sobre la gota.

Las preparaciones de nematodos fueron observadas con un microscopio Leica DM 5000B a unos aumentos de hasta 40X con objetivos en seco y, 65X-100X con objetivos de inmersión, usando aceite de inmersión (Sigma). Los nematodos se visualizaron con un sistema óptico nomarski (usando un polarizador DIC, *Differential Interfase Contrast*), y con filtros de fluorescencia para una longitud de onda de 395 nm (fluorescencia verde, e.g. GFP) o de 615 nm (fluorescencia roja, e.g. m Cherry).

Las imágenes fueron fotografiadas con una cámara Leica DC500, usando el programa de análisis fotográfico Leica IM50 4.0. Y montadas y tratadas con el programa Adobe Photoshop®.

## **6. Transformación genética.**

### - Transformación de *Escherichia coli*.

La obtención y transformación de las células competentes congeladas se realizó siguiendo el método descrito por Hanahan (Hanahan 1985), con algunas modificaciones.

### - Obtención de células competentes.

Una colonia fresca de *E. coli* DH5alpha o XL1-Blue se inoculó en 5 mL de PSI-b y se incubó durante toda la noche con agitación a 37 °C. Todo el cultivo estacionario se transfirió a 100 mL de PSI-b (ver apartado Medios de cultivo) en un matraz de 1 L (precalentado a 37 °C) y se continuó la incubación con agitación vigorosa hasta que la densidad óptica del cultivo a 550 nm (DO<sub>550</sub>) fue de 0.45-0.5. A continuación se enfrió el cultivo en hielo y se centrifugó a 5000g y a 4 °C durante 5 minutos. Seguidamente, las células se resuspendieron suavemente en 40 mL de disolución Tfb-1 fría (30 mM acetato potásico pH 6.9; 50 mM MnCl<sub>2</sub>; 100 mM KCl; 10 mM CaCl<sub>2</sub>; 15% glicerol (v/v). Filtrar para esterilizar.). Tras una incubación de 5 minutos en hielo se volvieron a centrifugar a 5000g y a 4 °C durante 5 minutos, se retiró el sobrenadante y se resuspendieron suavemente en 4 mL de disolución Tfb-2 fría (10 mM MOPS pH 7.0; 75 mM CaCl<sub>2</sub>; 10 mM KCl; 15% glicerol (v/v). Filtrar para esterilizar.). Por último, se enfrió en hielo durante 15 min., se distribuyó en viales previamente enfriados en alícuotas de 100 µL por tubo y se conservó a -80 °C hasta su uso.

- Transformación de células competentes.

A 50 µL de células competentes descongeladas en hielo se les añadió 5 µL de una disolución que contenía el ADN y se incubaron durante 30 minutos en hielo. Transcurrido ese tiempo las células se sometieron a un choque térmico de 2 minutos a 42 °C e inmediatamente se volvieron a incubar en hielo durante 5 minutos. Para permitir la expresión del gen que confería resistencia a un determinado antibiótico, las células transformadas se incubaron a temperatura ambiente y sin agitación durante 15 minutos con 100 µL de medio LB. Por último, se sembró toda la mezcla de transformación en placas de medio selectivo que se incubaron a 37 °C toda la noche.

- Transformación genética de *C. elegans*.

La microinyección se llevó a cabo empleando un microscopio invertido Nikon con sistema de contraste de fases, para poder localizar la posición exacta de las gónadas. Los nematodos se inmovilizaron en un cubreobjetos conteniendo una capa de agarosa 2% (“*pad agarose*”), donde se depositó una gota de aceite Holocarboil 700 (SIGMA) para evitar una deshidratación excesiva. La manipulación de los nematodos y su orientación correcta sobre el *pad agarose* se realizó en un estereomicroscopio auxiliar Leica EZ4. La composición de las mezclas de inyección para cada experimento, se describe en la Tabla 15. Cada una de las mezclas fueron inyectadas en la parte distal de las gónadas (donde se localiza el sincitio de núcleos) de individuos hermafroditas en el estadio un día después de adultos (presentando una sola fila de ovocitos maduros en la parte proximal de las gónadas). Para ello se utilizó un equipo micromanipulador InjectMan<sup>®</sup>NI2 (Eppendorf) y microinyector FemtoJet<sup>®</sup> (Eppendorf), utilizando microcapilares de inyección Femtotips<sup>®</sup> II Gold (Eppendorf). Para todos los experimentos de microinyección se usó una presión de compensación de 0 HPa., mientras que la presión de trabajo fue variable a lo largo de cada experimento. De esta manera el ADN microinyectado puede ser asimilado por los núcleos del sincitio. En el núcleo el ADN recombinará y/o se ligará inespecíficamente, formando un *array* de copias del mismo. Este núcleo, que porta el ADN transgénico, migra hacia la parte proximal de la gónada, donde es envuelto por una membrana y se convierte en un ovocito maduro preparado para ser fecundado a su paso por la espermateca.

**Tabla 17.** Mezcla de microinyección utilizadas en la obtención de transgénicos. Se indican los plásmidos usados en la obtención de cada transgénico y la concentración de los mismos utilizada en la microinyección.

<b>Transgénico</b>	<b>Mezcla microinyección utilizada</b>
GE24 <i>pha-1 (e2123)</i> III; [pC1 ( <i>pha-1+</i> ); <i>nrx-1::gfp</i> ]	pC1:: <i>pha-1</i> (50 ng/µl) pPD95.75:: <i>pnrx-1::gfp</i> (50 ng/µl)
GE24 <i>pha-1 (e2123)</i> III; [pC1 ( <i>pha-1+</i> ); <i>nlg-1::mCherry</i> ]	pC1:: <i>pha-1</i> (50 ng/µl) pPD95.75:: <i>pnlg-1::mCherry</i> (50 ng/µl)

## Continuación

---

GE24 <i>pha-1 (e2123)</i> III; [pC1 ( <i>pha-1+</i> ); <i>nrx-1::gpf; nlg-1::mCherry</i> ]	pC1:: <i>pha-1</i> (30 ng/μl) pPD95.75:: <i>pnrx-1::gfp</i> (20 ng/μl) pPD95.75:: <i>pnlg-1::mCherry</i> (20 ng/μl)
VC228 <i>nlg-1 (ok259)</i> X; [pPD95.77 ( <i>nlg-1</i> ); pDD04Neo <sup>R</sup> ( <i>pmyo-2::gfp</i> )]	pPD95.77:: <i>pnlg-1::nlg-1</i> (30 ng/μl) pDD04 Neo <sup>R</sup> ( <i>pmyo-2::gfp</i> ) (0,5 ng/μl)
VC228 <i>nlg-1 (ok259)</i> X; [pPD95.77 ( <i>nlg-1-RC</i> ); pDD04Neo <sup>R</sup> ( <i>pmyo-2::gfp</i> )]	pPD95.77:: <i>pnlg-1::nlg-1-RC</i> (30 ng/μl) pDD04 Neo <sup>R</sup> ( <i>pmyo-2::gfp</i> ) (0,5 ng/μl)
VC228 <i>nlg-1 (ok259)</i> X; [pPD95.77 ( <i>NLGN1</i> ); <i>nrx-1::gfp</i> ]	pPD95.77:: <i>pnlg-1::NLGN1</i> (50 ng/μl) pPD95.75:: <i>pnrx-1::gfp</i> (50 ng/μl)
VC228 <i>nlg-1 (ok259)</i> X; [pPD95.77 ( <i>NLGN1-RC</i> ); pDD04Neo <sup>R</sup> ( <i>pmyo-2::gfp</i> )]	pPD95.77:: <i>pnlg-1::NLGN1-RC</i> (30 ng/μl) pDD04 Neo <sup>R</sup> ( <i>pmyo-2::gfp</i> ) (0,5 ng/μl)
VC228 <i>nlg-1 (ok259)</i> X; [pPD95.77 ( <i>NLGN1-stop</i> ); pDD04Neo <sup>R</sup> ( <i>pmyo-2::gfp</i> )]	pPD95.77:: <i>pnlg-1::NLGN1-stop</i> (30 ng/μl) pDD04 Neo <sup>R</sup> ( <i>pmyo-2::gfp</i> ) (0,5 ng/μl)
VC228 <i>nlg-1 (ok259)</i> X; [pPD95.77 ( <i>Nlgn1</i> ); pBCN24Neo]	pPD95.77:: <i>pnlg-1::Nlgn1::EGFP</i> (0,5 ng/μl) pBCN24 Neo <sup>R</sup> (0,5 ng/μl)
VC228 <i>nlg-1 (ok259)</i> X; [pPD95.77 ( <i>Nlgn1-RC</i> ); pBCN24Neo]	pPD95.77:: <i>pnlg-1::Nlgn1-RC::EGFP</i> (0,5 ng/μl) pBCN24 Neo <sup>R</sup> (0,5 ng/μl)

---

## 7. Construcciones génicas.

### 7.1. Clonación del gen *mCherry*.

Se amplificó el cDNA del gen *mCherry* desde el vector pCRII (cedido por la Dra. Noemí Cabrera-Poch, Instituto de Investigaciones Biomédicas CSIC-Madrid ) utilizando la polimerasa *Expand Long Template*. Se utilizaron los oligonucleótidos *mCherryF* y *mCherryBamHIR*, los cuales se diseñaron creando las dianas de restricción *BamHI* y *EcoRI*. El producto de PCR se purificó y se clonó en el vector de almacenaje pGEM-T mediante ligación. Con la mezcla de ligación se transformaron células competentes *E. Coli* (XL1Blue) y las colonias positivas se analizaron mediante PCR de colonia y posterior secuenciación. La construcción obtenida se denominó pGEM-T(*mCherry*).

Esta construcción fue digerida con las enzimas de restricción *BamHI* y *EcoRI*, y el fragmento correspondiente al inserto se purificó y se ligó con el vector pPD95.75 previamente linearizado con dichas enzimas y eliminado el fragmento correspondiente al gen *gfp*. Así se consiguió la sustitución del gen *gfp* por el gen *mCherry*. La construcción obtenida se denominó pPD95.75::*mCherry*.

## **7.2. Clonación de los promotores de los genes *nrx-1* y *nlg-1* de *C. elegans*.**

Para fusionar los promotores de los genes *nrx-1* y *nlg-1* con la proteína GFP y mCherry, respectivamente; se amplificaron ambos promotores más los dos primeros aminoácidos de los genes correspondientes desde los cósmidos C29A12 y C40C9 respectivamente, cedidos del *Sanger Institute* (Reino Unido), utilizando la polimerasa *Expand Long Template*. Se utilizaron los oligonucleótidos específicos *pnrx-1XbaI* y *pnrx-1BamHI* (para el promotor del gen *nrx-1*) y, *pnlg-1XbaI* y *pnlg-1BamHI* (para el promotor del gen *nlg-1*), los cuales se diseñaron creando las dianas de restricción *XbaI* y *BamHI* en ellos. El producto de PCR se purificó y se clonó en el vector de almacenaje pGEM-T mediante ligación. Con la mezcla de ligación se transformaron células competentes *E. Coli* (XL1Blue) y las colonias positivas se analizaron mediante PCR de colonia y posterior secuenciación. Las construcciones obtenidas se denominaron pGEM-T(*pnrx-1*) y pGEM-T(*pnlg-1*).

### - Subclonación del promotor del gen *nrx-1*.

La construcción pGEM-T(*pnrx-1*) fue digerida con las enzimas de restricción *XbaI* y *BamHI*, y el fragmento correspondiente al inserto se purificó y se ligó con el vector pPD95.75 previamente linearizado con dichas enzimas. De esta manera se obtuvo la construcción pPD95.75::*pnrx-1::gfp*.

### - Subclonación del promotor del gen *nlg-1*.

La construcción pGEM-T (*pnlg-1*) fue digerida con las enzimas de restricción *XbaI* y *BamHI*, y el fragmento correspondiente al inserto se purificó y se ligó con el vector pPD95.75::*mCherry* previamente linearizado con dichas enzimas. De esta manera se obtuvo la construcción pPD95.75::*pnlg-1::mCherry*.

## **7.3. Clonación del gen *nlg-1* de *C. elegans*.**

Para la clonación del gen *nlg-1* se amplificó su cDNA desde el cósmido yk406f12, cedido del *National Institute of Genetics* (Japón), utilizando la polimerasa *Expand Long Template*. Se utilizaron los oligonucleótidos específicos *cdNAnlg-1BamHI* y *cdNAnlg-1EcoRI*, los cuales se diseñaron creando las dianas de restricción *BamHI* y *EcoRI* en ellos. El producto de PCR se purificó y se clonó en el vector de almacenaje pGEM-T mediante ligación. Con la mezcla de ligación se transformaron células competentes *E. Coli* (XL1Blue) y las colonias positivas se analizaron mediante PCR de colonia y posterior secuenciación. La construcción obtenida se denominó pGEM-T(*nlg-1*).

Esta construcción fue digerida con las enzimas de restricción *BamHI* y *EcoRI*, y el fragmento correspondiente al inserto se purificó y se ligó con el vector pPD95.77::*pnlg-1* previamente

linearizado con dichas enzimas, y eliminado el fragmento correspondiente al gen *gfp*. La construcción así obtenida se denominó pPD95.77::*pnlg-1::NLGNI*.

La construcción pPD95.77::*pnlg-1* fue obtenida de la misma manera descrita en el apartado 7.1, pero utilizando el vector pPD95.77 como vector de subclonación.

#### **7.4. Clonación del gen *Nlgn1* de rata.**

La clonación del cDNA del gen *Nlgn1* intercalado con la proteína EGFP, se realizó a partir de la digestión sobre el vector pCMV5, cedido por el Dr. Thomas Dresbach, con las enzimas de restricción *BglIII* y *BamHI*. El producto de dicha digestión correspondiente al inserto se purificó y se ligó en el vector pPD95.77::*pnlg-1* previamente linearizado con dichas enzimas. La construcción final obtenida se denominó pPD95.77::*pnlg-1::Nlgn1rat::EGFP*.

#### **7.5. Clonación del gen *NLGNI* humano.**

Para la clonación del gen *NLGNI* se amplificó su cDNA desde el cósmido KIAA1070 correspondiente al clon hj05602, obtenido de Kazusa DNA Research Institute, utilizando la polimerasa *Expand Long Template*. Se utilizaron los oligonucleótidos específicos cDNANLGNI*BamHIF* y cDNANLGNI*EcoRIR*, los cuales se diseñaron creando las dianas de restricción *BamHI* y *EcoRI* en ellos. El producto de PCR se purificó y se clonó en el vector de almacenaje pGEM-T mediante ligación. La construcción obtenida se denominó pGEM-T(*NLGNI*).

Esta construcción fue digerida con las enzimas de restricción *BamHI* y *EcoRI*, y el fragmento correspondiente al inserto se purificó y se ligó con el vector pPD95.77::*pnlg-1* previamente linearizado con dichas enzimas, y eliminado el fragmento correspondiente al gen *gfp*. La construcción así obtenida se denominó pPD95.77::*pnlg-1::NLGNI*.

#### **7.6. Clonación de los genes *nlg-1*, *Nlgn1* y *NLGNI* mutados.**

La introducción de las mutaciones deseadas en los genes *ng-1*, *Nlgn1* y *NLGNI* fue realizada mediante la técnica de mutagénesis por superposición, como se describen en el apartado 3.5.

##### - Clonación del gen *nlg-1* de *C. elegans* portador de la mutación *Arg437Cys*.

Se amplificó el cDNA del gen *nlg-1* desde el cósmido yk406f12, utilizando la polimerasa *Expand Long Template*. Se utilizaron los oligonucleótidos específicos *nlg-IRCmutF* y *nlg-IRCmutR*, los cuales eran portadores de la mutación *Arg437Cys* a introducir. Como oligonucleótidos externos se usaron cDNAnlg-1*BamHIF* y cDNAnlg-1*EcoRIR*.

La construcción final obtenida se denominó pPD95.77::*pnlg-1::nlg-1-RC*.

##### - Clonación del gen *Nlgn1* de rata portador de la mutación *Arg453Cys*.

El fragmento liberado desde el plásmido pCMV5V (ver apartado 7.4) se amplificó usando los oligonucleótidos *Nlgn1RCmutF* y *Nlgn1RCmutR*, y utilizando la la polimerasa *Expand Long Template*. Como oligonucleótidos externos se usaron *Forward* y *Reverse*.

La construcción final obtenida se denominó pPD95.77::*pnlg-1::Nlgn1-RC::EGFP*.

#### - Clonación del gen *NLGN1* humano portador de las mutaciones *Arg453Cys* y *Asp432X*.

Se amplificó el cDNA del gen *NLGN1* desde el cósmido KIAA1070, utilizando la polimerasa *Expand Long Template*. Se utilizaron los oligonucleótidos específicos *NLGN1RCmutF* y *NLGN1RCmutR* (para la mutación *Arg453Cys*), y *NLGN1stopmutF* y *NLGN1stopmutR* (para la mutación *Asp432X*), los cuales eran portadores de las mutaciones *Arg453Cys* y *Asp432X* a introducir. Como oligonucleótidos externos se usaron *cDNANLGN1BamHIF* y *cDNANLGN1EcoRIR*.

Las construcción finales obtenidas se denominaron pPD95.77::*pnlg-1::NLGN1-RC* y pPD95.77::*pnlg-1::NLGN1-stop*.

## **8. Experimentos de comportamiento en *C. elegans*.**

Todos los ensayos de comportamiento fueron llevados a cabo en las estirpes mutantes que se recogen en la Tabla 2, y se utilizó la estirpe silvestre Bristol N2 como control. En el caso de existir más de un alelo de un gen disponible en los Consorcios descritos, se estudió con más detalle el alelo de referencia y se confirmaron los resultados obtenidos con los otros alelos disponibles. En todos los experimentos se utilizaron nematodos hermafroditas L4, con una vulva blanca creciente con un pequeño punto negro en su interior.

Todos los experimentos fueron llevados a cabo de manera ciega, sin conocimiento previo de la estirpe evaluada en cada momento, y fueron repetidos un mínimo de tres veces.

#### - Ciclo de defecación.

Los ciclos de defecación de nematodos individuales fueron medidos como se describe en Thomas et al. (Thomas 1990), en un estereomicroscopio Zeiss. Se traspasaron nematodos hermafroditas L4 crecidos a 20 °C, a placas frescas de medio NGM con *E.coli* OP50. Los nematodos individuales fueron observados bajo un aumento de 50X. Bajo estas condiciones todas las etapas del programa motor de defecación son visibles; así las etapas de pBoc (“posterior body contraction”) y Exp (“expulsión”) son muy claras y pueden ser medidas en cada ciclo.

Se utilizaron placas de medio NGM (sembradas con *E.coli* dos días antes) incubadas a 20 °C y con *C. elegans* durante 1 hora, y posteriormente se midieron la duración de los ciclos de defecación en una habitación climatizada a 20 °C.

La longitud de cada ciclo fue definida como la duración de las etapas de pBoc de dos defecaciones consecutivas. Cada nematodo fue medido durante 10 ciclos consecutivos (11 pBocs consecutivos), y se calculó la media y la desviación estándar de cada nematodo.

- Respuesta a drogas:

***Sensibilidad a aldicarb.***

Se traspasaron un total de 25 nematodos hermafroditas jóvenes a placas de medio NGM con una concentración de 0.5 mM aldicarb (Sigma), y se evaluó el grado de parálisis como se describe en Mahoney et al. (Mahoney T.R. 2006). El día anterior a la realización del experimento se traspasaron 40-50 nematodos de estadio larvario L4, de cada uno de los genotipos a ensayar, a placas de medio NGM con un césped bacteriano. Al día siguiente, a las placas con la concentración adecuada de aldicarb (una por estirpe), se añadió una pequeña cantidad de *E.coli* OP50 en el centro de la placa formando una pequeña gota de 4-6 mm de diámetro. A continuación se colocaron en la gota 25 nematodos jóvenes y se dejaron a temperatura ambiente. Durante periodos consecutivos de 30 minutos se evaluó el grado de parálisis en el estereomicroscopio.

La parálisis fue definida por la ausencia de movimiento cuando los animales eran tocados tres veces con un hilo de platino en la parte anterior y posterior del cuerpo, y además no se producían los movimientos faríngeos normales (“*pharyngeal pumping*”).

***Sensibilidad a levamisol.***

Estos ensayos se realizaron en placas de medio NGM con una concentración de 0.2 mM de levamisol (Sigma) como se describe en Miller et al. (Miller K.G. 1996). La preparación de las placas con levamisol se llevó a cabo de la misma manera que se describe para los experimentos de aldicarb. Así, se traspasaron a placas con levamisol un total de 25 nematodos hermafroditas jóvenes de cada una de las estirpes a estudiar. El nivel de parálisis fue evaluado por observación de los nematodos en el estereomicroscopio cada 15 minutos. La parálisis fue definida como la pérdida de movimiento en respuesta al toque con un hilo de platino.

***Sensibilidad a pentilentetrazol.***

Estos ensayos se realizaron en placas de medio NGM con una concentración de 10 mM de PTZ (pentilentetrazol) (Sigma) como se describe en Locke et al. (Locke C. 2008). La preparación de las placas con PTZ se llevó a cabo de la misma manera que se describe para los anteriores experimentos de sensibilidad a drogas. El nivel de parálisis fue evaluado por observación de los nematodos en el estereomicroscopio cada 15 minutos. La parálisis fue definida como la pérdida de movimiento en respuesta al toque con un hilo de platino y el cese de movimientos en la faringe (“*pumping*”).

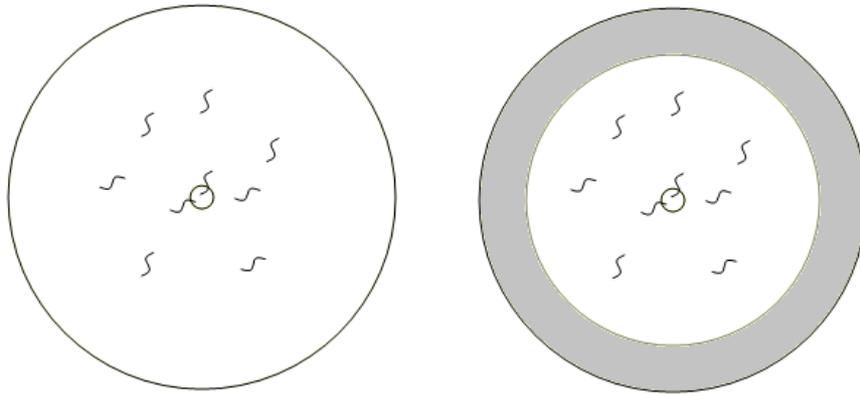
#### - Medida de la locomoción.

Para analizar la capacidad de locomoción las estirpes utilizadas en este trabajo, se cuantificaron el número de ondas corporales del nematodo en su desplazamiento (“*body bend*”). Los nematodos fueron cultivados semisincronizando las poblaciones, dejándolas crecer a 20 °C hasta obtener animales en el estadio larvario L4. A continuación se lavaron con tampón CTX, para la eliminación de bacterias, y tras dejar decantar los nematodos y eliminar el sobrenadante, se transpasaron unos 10 nematodos (en aproximadamente un volumen de 5 µL de tampón de lavado) a placas NGM sin bacteria o con césped bacteriano. Para ensayar las condiciones de falta de alimento, se mantuvieron los nematodos privados de bacteria durante 30 minutos en placas NGM. Un “*body bend*” fue definido como el cambio de dirección en un mismo plano, de un punto determinado del cuerpo el nematodo (en estos ensayos se tomó como punto referencial la vulva).

#### - Capacidad exploratoria (“*exploring*”).

Para analizar la capacidad de exploración de las estirpes mutantes en relación a la silvestre, y para utilizar nematodos en el mismo estadio larvario se sincronizaron los ciclos de vida cultivando nematodos en el mismo estadio larvario. Se dejaron crecer hasta que se encontraron en el estadio larvario L4. A continuación se lavaron con tampón CTX (5mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH6.6, 1mM CaCl<sub>2</sub>, 1mM MgSO<sub>4</sub>) siguiendo el siguiente protocolo: se añadió 3 mL de tampón CTX en las placas de cultivo. Se recogieron en un tubo de 15 mL y se añadió 10 mL de tampón CTX; se esperó 5 minutos para que los nematodos decantasen en el fondo, se retiró el sobrenadante y se añadió 10 mL de tampón CTX. Tras 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y se añadió 5 mL de tampón CTX. Transcurridos 5 minutos y se eliminó el sobrenadante.

Una vez lavados los nematodos, se colocaron unos 20 animales (en aproximadamente 5 µL) dentro de un círculo de unos 5 mm de diámetro en el centro de una placa de Petri. Cuando se colocó la gota de tampón que contenía los nematodos, cuidadosamente se secó la humedad excedente con papel de filtro estéril para permitir que los nematodos pudieran avanzar en el agar. Una vez seco, se contó cada 15 minutos el número de nematodos que había fuera del círculo (Figura 2).



**Figura 2. Dibujo esquemático de las placas de Petri utilizadas para el análisis de exploración.** A la izquierda placas sin césped bacteriano y a la derecha placas con césped bacteriano en su perímetro en gris.

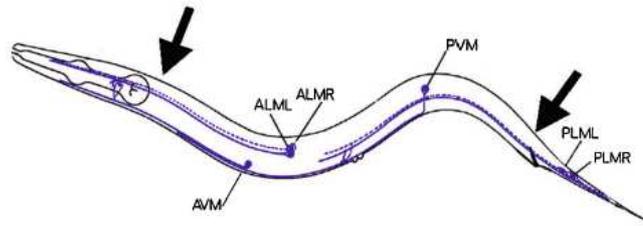
Los estudios de exploración se llevaron a cabo en placas de Petri de 60 mm sin césped bacteriano, o en cajas de Petri donde se había colocado un césped de la estirpe OP50 de *E. coli* de unos 10 mm a lo largo de todo el perímetro de la placa como se indica en la Figura 6. En este último caso, después de sembrar las bacterias en la placa de Petri, se dejaba para que se formara el césped 15-18 horas a 37°C, y se mantenían posteriormente a 4°C hasta su uso.

Se realizaron al menos 3 experimentos de cada estirpe con aproximadamente 20 nematodos cada uno, tanto para los experimentos sin césped bacteriano o con él. Como en los casos anteriores, se calculó la media del número de nematodos que salían del círculo respecto al tiempo y la desviación estándar para cada estirpe.

#### - Cuantificación de la sensibilidad mecanosensorial.

Para evaluar la respuesta mecanosensorial de las diferentes estirpes, se usaron nematodos hermafroditas de estadio larvario L4 incubados a 20 °C, los cuales fueron traspasados a placas frescas de medio NGM sembradas dos días antes de comenzar el experimento con un césped bacteriano con 50 ml de *E. coli* OP50. Para estudiar la respuesta cada animal fue palpado con un pelo de ceja acoplado a una pipeta Pasteur (Chalfie 1981). Los nematodos se tocaban con el pelo de ceja en el cuerpo justo detrás de la faringe, para evaluar la respuesta sensorial anterior, o justo antes de la cloaca, para evaluar la respuesta sensorial posterior (Figura 3).

La sensibilidad al toque fue definida como la respuesta del nematodo al toque del pelo redirigiendo su movimiento en sentido contrario a donde se palpó. Los animales insensibles a este estímulo fueron definidos cuando fallaban en la respuesta al toque con el pelo de ceja, aunque eran capaces de responder cuando eran tocados con un extremo de platino.

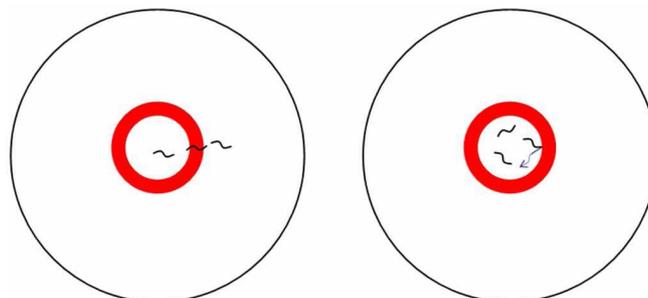


**Figura 3. Esquema que representa el ensayo de sensibilidad mecanosensorial.** Las flechas representan los lugares en el cuerpo donde se toca con el pelo de ceja para evaluar dicha respuesta. Se indica la localización de las seis neuronas mecanosensoras. Adaptado de Hart et al. (Hart 2006).

Para medir el grado de insensibilidad al toque de los nematodos ensayados, éstos fueron tocados un total de 10 veces (alternativamente en la parte anterior y posterior) como se describe en Horbet et al. (Hobert 1999), y se anotaron el número de respuestas positivas observadas. Un total de 30 animales fueron examinados, calculándose el porcentaje medio de respuestas resultantes en la parte anterior y posterior del cuerpo.

- Sensibilidad al estrés osmótico.

Para estudiar la sensibilidad al estrés osmótico de los mutantes utilizados en este trabajo se llevó a cabo el siguiente protocolo (Calahorro, Alejandre et al. 2009): el día del ensayo se preparó una solución de fructosa 4M con *Red Congo* (Sigma) al 1%. A continuación con 15  $\mu$ L de dicha solución se realizó un círculo de un centímetro de diámetro aproximadamente en el centro de placas frescas de medio NGM sin césped bacteriano. Se sincronizaron los ciclos de vida cultivando nematodos en el mismo estadio larvario. Se dejaron crecer hasta que se encontraron en el estadio larvario L4. A continuación se lavaron con tampón CTX y se colocaron unos 10 nematodos (aproximadamente en un volumen de 5  $\mu$ L de tampón de lavado) en el centro del círculo. Durante 10 minutos fueron observados para determinar la respuesta a la barrera osmótica. Los animales que retrocedían al entrar en contacto con la solución 4M de fructosa seis veces seguidas se consideraban que respondían positivamente. Los que atravesaban la barrera de fructosa en menos de seis intentos se consideraba que eran insensibles al estrés osmótico (Figura 4).

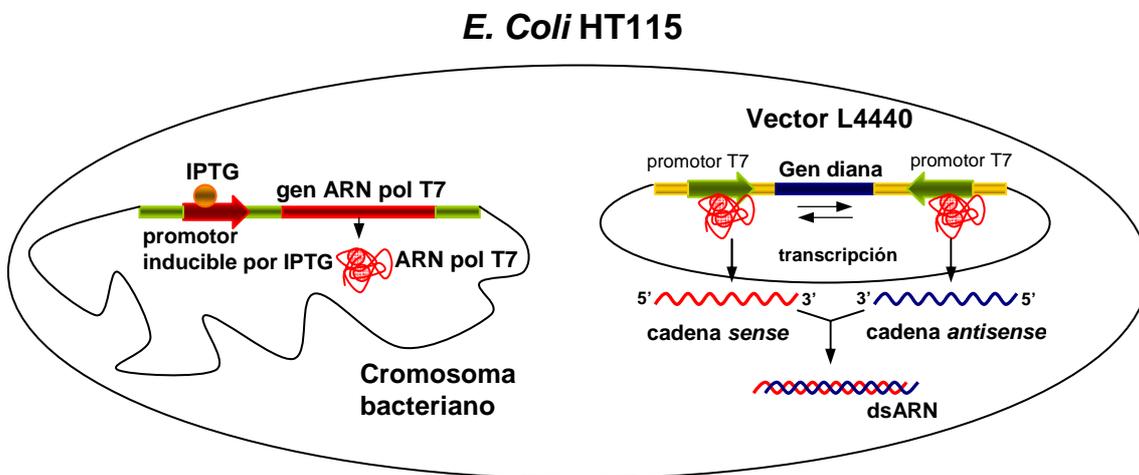


**Figura 4. Diseño esquemático de las placas de petri utilizadas en el experimento de respuesta al choque osmótico con fructosa.** A la izquierda podemos ver la reacción negativa de los nematodos al entrar en contacto con la barrera osmótica y a la derecha la reacción positiva (respuesta de la estirpe silvestre).

## 9. ARN de interferencia (ARNi).

El ARNi *feeding* consiste en alimentar a los gusanos silvestres con ARN de doble cadena (dsARN) del gen que se quiere mutar. Para ello se purificaron y clonaron los productos de PCR del gen diana en el vector L4440 (Dr. A. Fire, colección de 1999). Estas construcciones fueron transformadas en la cepa de *E. coli* HT115, la cual posee la maquinaria de expresión del promotor T7 y además es mutante para la RNasa III, lo cual aumenta la estabilidad de cualquier RNA que sea transcrito. Puesto que el vector L4440 posee dos promotores T7 flanqueando el sitio de clonación múltiple (MCS) en orientación invertida, un ADN insertado en el MCS se transcribirá en ambos sentidos y podrá hibridarse sobre si mismo formando así el dsARN (Figura 5).

Para los experimentos de ARNi se usó la estirpe Bristol N2 utilizando la estrategia de administración de ARNi por alimentación bacteriana (RNAi feeding). Las estirpes de bacterias portadoras de los clones de ARNi fueron obtenidas de la librería de ARNi gestionada por el Dr. Peter Askjaer (Universidad Pablo Olavide, Centro Andaluz de Biología del Desarrollo, CABD-CSIC). Se utilizaron las estirpes bacterias de *E. coli* HT-115 transformadas con el vector L4440 conteniendo las secuencias X-6M16 *nlg-1*(C40C9.5) y V-7016 *nrx-1*(C29A12.5). También se usaron otras estirpes bacterianas como control: *E. coli* HT115 transformada con el vector L440 conteniendo la secuencia *unc-22*, y la misma estirpe transformada con el vector L440 sin ninguna secuencia.



**Figura 5. Representación esquemática de la técnica ARNi feeding.** En primer lugar se transforma el vector L4440 portador del fragmento del gen que se quiere silenciar (gen diana) en la cepa de *E. coli* HT115. Cuando se induce la producción de la ARN polimerasa T7, por la presencia de IPTG, ésta es capaz de promover la expresión del fragmento de ADN clonado en el vector L4440 en ambos sentidos, produciendo copias *sense* y *antisense* del fragmento. Las hebras de ARN producidas son complementarias y pueden hibridar, produciéndose el dsARN. Cuando los nematodos se alimentan de esta cepa bacteriana, productora del dsARN, son capaces de dirigir hasta el ambiente celular este ARN y desencadenar el efecto ARNi, que degradará el mensajero del gen diana.

Las bacterias se inocularon durante 8 horas a 37 °C en medio LB con el antibiótico ampicilina (50 mg/ml). Para la realización de las placas donde se llevaron a cabo los experimentos de

'RNAi feeding', se sembraron 150  $\mu$ L de cultivos estacionarios de cada una de las estirpes bacterianas de ARNi sobre placas de medio NGM ("*Nematodo Grow Médium*") con 25  $\mu$ g/mL de antibiótico carbenicilina y 100 mM IPTG para inducir la transcripción. Una vez sembradas las placas fueron incubadas durante unas 12 horas a temperatura ambiente.

El día anterior al comienzo del experimento se traspasaron nematodos jóvenes de estadio larvario L4 a placas de ayuno conteniendo medio NGM sin bacterias, y se incubaron durante unas 12 horas a 20 °C. El segundo día se traspasaron 10 nematodos a cajas frescas e inducidas con IPTG. La progenie F2 semisincronizada (nematodos hermafroditas de estadio larvario L4), se analizó respecto al ciclo de defecación y se ensayó la respuesta mecanosensorial, a 20°C. Los animales crecidos en el medio de ARNi control (*unc-22*) mostraron un fenotipo de temblor, lo que sirvió para testar la funcionalidad del vector L4440. Todos los experimentos realizados fueron repetidos tres veces.

## **10. Métodos bioinformáticos.**

### **- Modelado estructural de proteínas.**

El modelado de estructura tridimensional de las proteínas NLG-1 de *C. elegans* y NLGN1 humana y de rata, se realizó con el programa SwissPDBviewer (Instituto Suizo de Bioinformática), a partir de la secuencia de la estructura de las proteínas NLGN1 humana y de rata cristalizadas. Para ello en primer lugar se realizó un alineamiento de secuencias aminoacídicas y posteriormente un alineamiento estructural de las proteínas. Se determinó el valor de superposición y coincidencia mediante el parámetro RMSD (*Root Mean Square Deviation*).

# **Resultados y Discusión**

## **I. Estudio de polimorfismos genéticos implicados en el metabolismo de neurotransmisores en un grupo homogéneo de pacientes diagnosticados con autismo.**

Publicado en *Research in Autism Spectrum Disorders*

Calahorro et al. (Calahorro 2009).

Los neurotransmisores juegan un papel crucial en el desarrollo y funcionamiento del sistema nervioso. Por esta razón, se ha considerado que la alteración del metabolismo de los mismos, podría ser el origen de algunos casos de autismo. En particular, se ha profundizado en la serotonina y las catecolaminas, puesto que éstos tienen una función crucial tanto en la sinaptogénesis como en el desarrollo del cerebro (Ruiz-Rubio and McInnes 2005; Geschwind and Levitt 2007; Gupta and State 2007).

La serotonina es uno de los neurotransmisores que más interés ha ocasionado en los trastornos generalizados del desarrollo, puesto que en un tercio de las personas diagnosticadas con un trastorno dentro del espectro autista se encuentran niveles elevados de serotonina en sangre (Anderson, Freedman et al. 1987). Además se ha comprobado que los inhibidores de la recaptación de este neurotransmisor pueden mejorar algunos síntomas clínicos del trastorno (McDougle, Naylor et al. 1996; Hollander, Phillips et al. 2005). El gen *SLC6A4*, que codifica un transportador de serotonina, ha sido estudiado expresamente como un gen candidato funcional. Tres estudios de barrido genómico han descrito la asociación del autismo con la región cromosómica 17q11-12, la región donde se localiza el gen *SLC6A4* (Bacchelli and Maestrini 2006). El transportador de la serotonina está localizado en la membrana presináptica e interviene en la recaptación del neurotransmisor tomándolo del espacio presináptico e introduciéndolo dentro de la célula. Cuando no funciona este transportador, la serotonina está más tiempo en el espacio sináptico ejerciendo su acción de forma más continuada. En el gen *SLC6A4*, se ha analizado el polimorfismo de su región promotora, que contiene una delección, alelo corto, y otro alelo normal o largo (Tabla 1). Cuando está presente el alelo corto en el promotor, la expresión del gen es inferior y los niveles del transportador disminuyen (Lesch, Bengel et al. 1996). La mayoría de estudios han encontrado una asociación positiva de alguno de éstos alelos y el trastorno autista (Calahorro 2009). Otro polimorfismo identificado en el gen *SLC6A4*, es un VNTR (“*Variable Number Tandem Repeat*”) en el intrón 2 (Tabla 1) (Klauck, Poustka et al. 1997).

La dopamina es una catecolamina que cumple funciones de neurotransmisor en el sistema nervioso central. Regula muchas funciones cerebrales, incluyendo el comportamiento y la cognición, la actividad motora, la motivación y la recompensa, el sueño, el estado de ánimo, la atención y el aprendizaje. Se han descritos polimorfismos genéticos que afectan al metabolismo

de este neurotransmisor. El gen *DAT1* codifica un transportador de dopamina, el cual regula la recaptación de dopamina desde el espacio sináptico hacia la neurona presináptica (Vandenberg, Persico et al. 1992). El polimorfismo DAT1-VNTR (Tabla 1) ha sido extensamente estudiado en un número elevado de niños con desordenes neurológicos y psiquiátricos incluyendo el trastorno de déficit de atención e hiperactividad (TDAH) (Lim, Kim et al. 2006). El gen que codifica el receptor de dopamina D4 (*DRD4*) es uno de los genes humanos conocidos más variable (Wang, Ding et al. 2004). El alelo 7R de este gen (Tabla 1) tiene una elevada frecuencia en pacientes con TDAH (Faraone, Perlis et al. 2005). Algunos estudios han sugerido que la susceptibilidad de los genes que se asocian a autismo y a TDAH podrían estar parcialmente solapados (Grady, Harxhi et al. 2005).

La enzima monoamina oxidasa (*MAO-A*) degrada serotonina y catecolaminas, teniendo una importante función en los sistema serotoninérgico y dopaminérgico. Mutaciones en el que codifica dicha enzima han sido implicadas con diversos desordenes neurobiológicos, así la deficiencia completa de *MAO-A* ha sido asociada con retraso mental y comportamientos impulsivos de agresividad (Popova 2006). Se han identificado diferentes polimorfismos en el gen *MAO-A*, pero una variante de gran relevancia funcional es un VNTR de 30 pb (Tabla 1) localizada aproximadamente a unas 1,2 kb antes de la región codificante (Sabol, Hu et al. 1998). En este estudio se analizó si existía asociación entre el fenotipo autista y determinados alelos de los genes *SLC6A4*, *DAT1*, *DRD4* y *MAO-A* (Tabla 1). Además se comprobó si existía transmisión preferencial de algunos de estos alelos por parte de alguno de los progenitores.

**Tabla 1.** Secuencias nucleotídicas analizadas en cada polimorfismo. Los números <sup>1</sup> y <sup>528</sup> indican el principio y el final, respectivamente, de la secuencia analizada.

<b>Gen (marcador molecular)</b>	<b>Secuencia nucleotídica</b>
<i>SLC6A4</i> (5-HTTLPR)	<sup>1</sup> GGCGTTGCCG ... ... TCAGTCCCTC <sup>528</sup>
<i>SLC6A4</i> (VNTR/intrón 2)	GGGGTGGGCTGTGACCT
<i>DAT1</i> (VNTR/3'UTR)	GGGCCCCACAGGAGCGTGTCTATCCCCGGACGCATGCA
<i>DRD4</i> (VNTR/exón 3)	CCCTGCGGCCCGACGTGTGCGCCCGCCGCGCCAGCCTCCCCAGGAC
<i>MAOA</i> (VNTR/promotor)	ACCGGCACCGGCACCGGCACCGGCACCGGC

### **1. Frecuencias genotípicas y alélicas de polimorfismos en los genes *SLC6A4*, *DAT1*, *DRD4* y *MAO-A* en pacientes con autismo, sus padres y la población control.**

Las frecuencias genotípicas y alélicas de cada uno de los polimorfismos analizados correspondientes a los genes *SLC6A4*, *DAT1*, *DRD4* y *MAO-A*, se recogen en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Frecuencias genotípicas y alélicas de los genes *SLC6A4*, *DAT1*, *DRD4* y *MAO-A* en pacientes con autismo, sus padres y la población control. Las frecuencias alélicas control de la población heterogénea europea se obtuvo de la base de datos ALFRED (“*Allele Frequency Database*”): <http://alfred.med.yale.edu/alfred/index.asp>.

Gen (marcador molecular)	Frecuencias genotípicas			Frecuencias alélicas	
<b>5-HTT</b> (5-HTTLPR)	S/S	S/L	L/L	S	L
<b>Pacientes</b>	0.364	0.50	0.136	0.614	0.386
<b>Padres</b>	0.3181	0.50	0.1819	0.57	0.43
<b>Controles</b>				0.41	0.59

Gen (marcador molecular)	Frecuencias genotípicas				Frecuencias alélicas		
<b>5-HTT</b> (VNTR/intrón 2)	12R-12R	10R-12R	10R-10R	Otros	12R	10R	Otros
<b>Pacientes</b>	0.546	0.364	0.045	0.045	0.727	0.25	0.023
<b>Padres</b>	0.50	0.3864	0.0909	0.0227	0.71	0.28	0.01
<b>Controles</b>					0.70	0.30	0.00

Gen (marcador molecular)	Frecuencias genotípicas			Frecuencias alélicas		
<b>DAT1</b> (VNTR/3'UTR)	10R-10R	10R-9R	Otros	9R	10R	11R
<b>Pacientes</b>	0.454	0.409	0.137	0.296	0.682	0.022
<b>Padres</b>	0.3864	0.4546	0.159	0.29	0.65	0.06
<b>Controles</b>				0.31	0.69	0.00

Gen (marcador molecular)	Frecuencias genotípicas					Frecuencias alélicas			
<b>DRD4</b> (VNTR/exón 3)	7R-7R	4R-4R	2R-4R	4R-7R	Otros	7R	2R	4R	Otros
<b>Pacientes</b>	0.091	0.272	0.182	0.318	0.137	0.273	0.114	0.568	0.045
<b>Padres</b>	0.0476	0.50	0.1429	0.1191	0.1904	0.13	0.11	0.68	0.08
<b>Controles</b>						0.18	0.07	0.65	0.10

Gen (marcador molecular)	Frecuencias genotípicas						Frecuencias alélicas		
<b>MAO-A</b> (VNTR/promotor)	4R-3R	4R-4R	4R-5R	3R-Y	4R-Y	5R-Y	3R	4R	5R
<b>Pacientes niños</b>	-	-	-	0.5	0.4	0.1	0.5	0.4	0.1
<b>Pacientes niñas</b>	0.75	0.25	0	-	-	-	0.37	0.63	0
<b>Padres</b>	-	-	-	0.182	0.818	0	0.182	0.818	0
<b>Madres</b>	0.55	0.40	0.05	-	-	-	0.273	0.704	0.023
<b>Controles</b>							Sin datos disponibles		

## 2. Análisis de asociación de polimorfismos de los genes *SLC6A4*, *DAT1*, *DRD4* y *MAO-A* con el autismo.

Los valores del estadístico “odd ratio” utilizado para medir el grado de asociación de cada polimorfismo analizado con el trastorno se muestra en la Tabla 3. Como se puede observar en esta Tabla, en el grupo de pacientes analizados se encontró una asociación positiva significativa

para el alelo corto (*S*) del locus HTTLPR del gen *SLC6A4* que codifica para el transportador de serotonina (OR = 2.03,  $\chi^2 = 6.69$ , P value = 0.01). También existía una asociación del alelo 7R del gen *DRD4*, aunque con un valor de significación menor que el anterior (OR = 1.78,  $\chi^2 = 2.70$ , P value = 0.1).

La asociación positiva entre la presencia del alelo *S* y el autismo está de acuerdo con el hecho de que un 30% de las personas diagnosticadas con un trastorno dentro del espectro autista se encuentran niveles elevados de serotonina en sangre (Anderson, Freedman et al. 1987). Cuando hay menos recaptación del neurotransmisor este llegaría en mayor cantidad al torrente sanguíneo.

**Tabla 3.** Análisis de Odd Ratio para los genes *SLC6A4*, *DAT1* y *DRD4*.

Gen (marcador molecular)	Alelo	Odd Ratio	95% IC	$\chi^2$ (g.l.)
<i>SLC6A4</i> (5-HTTLPR)	L	0.49	0.28-0.85	6.69** (1)
	S	2.03	1.17-3.51	6.69** (1)
<i>SLC6A4</i> (VNTR/intrón 2)	12R	0.91	1.03-3.27	0.09 (1)
	10R	0.94	0.28-0.90	0.03 (1)
<i>DAT1</i> (VNTR/3'UTR)	10R	1.15	0.52-1.89	0.18 (1)
	9R	0.8	0.48-1.77	0.44 (1)
<i>DRD4</i> (VNTR/exón 3)	7R	1.78	1.16-4.24	2.70 (1)
	4R	0.77	0.40-1.23	0.71 (1)
	2R	1.28	0.26-1.85	0.21 (1)

\*\* P ≤ 0.0

IC: Intervalo de confianza.

g.l.: grados de libertad.

El alelo *S* (“*short*”) del gen *SLC6A4* consiste en una delección de 44 pb en el promotor de dicho gen, mientras que el alelo *L* (“*long*”) no la tiene. A nivel funcional la presencia del alelo *S* se traduce en una disminución de la actividad transcripcional de *SLC6A4* respecto al alelo *L*, que ha sido asociado con altos niveles de ARN mensajero y una actividad alta de recaptación de serotonina (Lesch, Bengel et al. 1996). La asociación positiva entre la presencia del alelo *S* y el autismo está de acuerdo con el hecho de que un 30% de las personas diagnosticadas con un trastorno dentro del espectro autista se encuentran niveles elevados de serotonina en sangre (Anderson, Freedman et al. 1987). Cuando hay menos recaptación del neurotransmisor este llegaría en mayor cantidad al torrente sanguíneo. No obstante, se han llevado a cabo numerosos estudios de asociación de este polimorfismo con el autismo y en su conjunto han mostrado resultados contradictorios. Hay casos donde no se encuentra asociación significativa con ninguno de los alelos, aunque en la mayoría de ellos se pone de manifiesto una asociación significativa pero a veces con el alelo *S* y otras con el *L* (Devlin, Cook et al. 2005). No es

fácil encontrar una explicación satisfactoria a estas observaciones aparentemente inconsistentes, pero se podría pensar en dos escenarios diferentes que explicaran estas observaciones. En primer lugar, es posible que existan otros genes, cuya expresión influya en el equilibrio del nivel de serotonina. Así el hecho de que existiera más o menos expresión del transportador de serotonina se podría traducir en mayor o menor recaptación no solo por la presencia o ausencia de uno u otro alelo, sino por la influencia de otras proteínas que modularan la presencia de este neurotransmisor; o que determinados genotipos sean más sensibles a la actividad de la serotonina y en estos casos una menor cantidad en el espacio sináptico del neurotransmisor sea suficiente para disparar la respuesta que origina. En segundo lugar el hecho de que en la mayoría de los estudios exista asociación positiva de *SLC6A4* con autismo, independientemente de que sea el alelo *S* ó *L*, podría indicar que otro gen cercano podría estar implicado en numerosos casos del trastorno.

### 3. Análisis de transmisión preferencial de polimorfismos de los genes *SLC6A4*, *DAT1*, *DRD4* y *MAO-A*.

**Tabla 4.** “Transmission disequilibrium test” (TDT) de los genes *SLC6A4*, *DAT1*, *DRD4* y *MAOA*.

Gen (marcador molecular)	Alelo	Transmisión materna				Transmisión paterna			
		T <sup>a</sup>	NT <sup>b</sup>	$\chi^2$	P-value	T	NT	$\chi^2$	P-value
5-HTT (5-HTTLPR)	L	1	8	5.44*	0.05	8	5	0.69	ns
	S	8	1			5	8		
5-HTT (VNTR/intrón 2)	12R	4	6	0.4	ns	6	2	2	ns
	10R	6	4			1	7		
DAT1 (VNTR/3'UTR)	10R	6	7	0.076	ns	7	5	0.33	ns
	9R	7	6			4	8		
DRD4 (VNTR/exón 3)	4R	1	4	1.80	ns	3	6	1	ns
	2R	3	2	0.20		1	8	5.44	
	7R	-	-	-	-	4	5	0.20	
MAOA (VNTR/promotor)	3R	8	3	2.27	ns				
	4R	2	9	4.45					
	5R	1	10	7.36					

<sup>a</sup>T = transmitido. <sup>b</sup>NT = no transmitido. \* P ≤ 0.05.

Para determinar si existía transmisión preferencial de alguno de los alelos por parte de los progenitores, se calcularon los valores de transmisión de cada alelo mediante el test TDT (“Transmission Disequilibrium Test”) que se recogen en la Tabla 4. Como se puede observar, dicho análisis mostró una transmisión preferencial materna significativa del alelo S del locus 5-HTTLPR hacia la descendencia (TDT:  $\chi^2 = 5.44$ , P value = 0.05). No se detectó transmisión preferencial estadísticamente significativa de los polimorfismos *SLC6A4* (VNTR del intrón 2) y

los analizados de los genes *DAT1*, *DRD4* y *MAO-A*. La transmisión preferencial materna indica que el marcador en cuestión, en este caso el alelo *S* del gen *SLC6A4*, ejercería su efecto “in utero” durante el desarrollo del feto. Es decir el genotipo materno, asociado con una disminución de la recaptación de la serotonina, originaría unas condiciones desfavorables para el desarrollo del sistema nervioso. En este sentido se ha detectado que los niveles de serotonina en plasma era significativamente menor en madres de niños con autismo que sin este trastorno (Connors, Matteson et al. 2006).

#### **4. Consideraciones sobre estrategias experimentales para el estudio genético del autismo.**

Los estudios genéticos para determinar genes implicados en el autismo se han realizado principalmente utilizando cuatro tipos de estrategias experimentales: el análisis de ligamiento en familias, los estudios de asociación de genes candidatos en poblaciones, los estudios citogenéticos y el análisis GWAS (estudio de asociación del genoma completo) comparando variaciones genómicas en pacientes en relación a los controles.

Actualmente las estrategias de búsqueda de genes candidatos en autismo y los estudios de asociación que incluyen a un gran número de pacientes siguen aportando datos de interés de los componentes genéticos implicados en el trastorno (Wang, Zhang et al. 2009). No obstante estas aproximaciones presentan ciertas dificultades como son el número de pacientes analizados, la aplicación uniforme en el diagnóstico y la homogeneidad de la muestra. En los próximos años, la secuenciación de nueva generación va a constituir una herramienta poderosa para avanzar en este sentido, porque se compararán los genomas de individuos sanos con enfermos pudiéndose determinar con nitidez las diferencias a nivel genético.

No obstante estos estudios son costosos y la complejidad del sistema nervioso hace que a nivel experimental no sea fácil diseñar ensayos para explicar las bases celulares y moleculares de este trastorno. Por ello, la utilización de organismos modelo de gran simplicidad como *Caenorhabditis elegans*, son a priori herramientas prometedoras para crear un sistema donde se pueda profundizar en mecanismos neurobiológicos básicos que sean de aplicación para el conocimiento de la etiología de algunos casos de autismo.

## II. Caracterización fenotípica de mutantes de *C. elegans* deficientes en neurexina y neuroliguina.

### 1. Análisis bioinformático de mutaciones en los genes *nrx-1* y *nlg-1*.

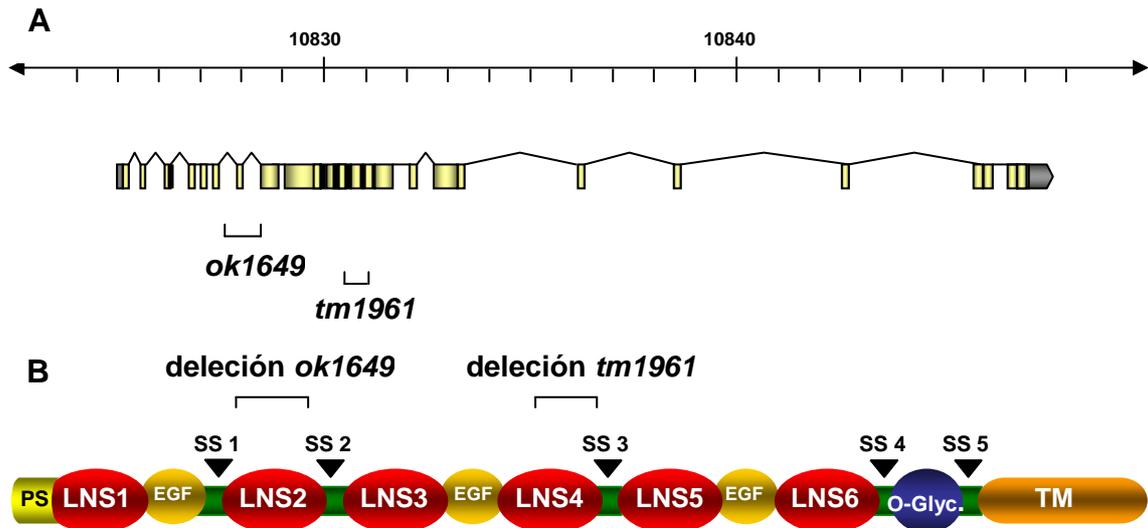
Los mutantes de *C. elegans* en los genes *nrx-1* y *nlg-1* fueron obtenidos a través de los consorcios internacionales “*C. elegans Gene Knockout Consortium*” en EEUU y Canadá (alelos *ok*) y “*National BioResource Project*” en Japón (alelos *tm*). Las mutaciones en los alelos de las estirpes VC1416 *nrx-1 (ok1649) V*, FX1961 *nrx-1 (tm1961) V*, VC228 *nlg-1 (ok259) X* y FX00474 *nlg-1 (tm474) X*, se analizaron con la ayuda de herramientas bioinformáticas (*Lasergene (DNA-Star)*, *BioEdit*, *PredictProtein*, *Swiss-Model Proteomic serve*). Este análisis nos permitió predecir a nivel de transcrito de ARN y a nivel protéico el alcance de cada una de las mutaciones en los genes *nrx-1* y *nlg-1*, e interpretar la posible deficiencia en la funcionalidad de las proteínas neurexina y neuroliguina resultantes de cada uno de los alelos.

#### 1.1. Descripción de las mutaciones *nrx-1 (ok1649)* y *nrx-1 (tm1961)*.

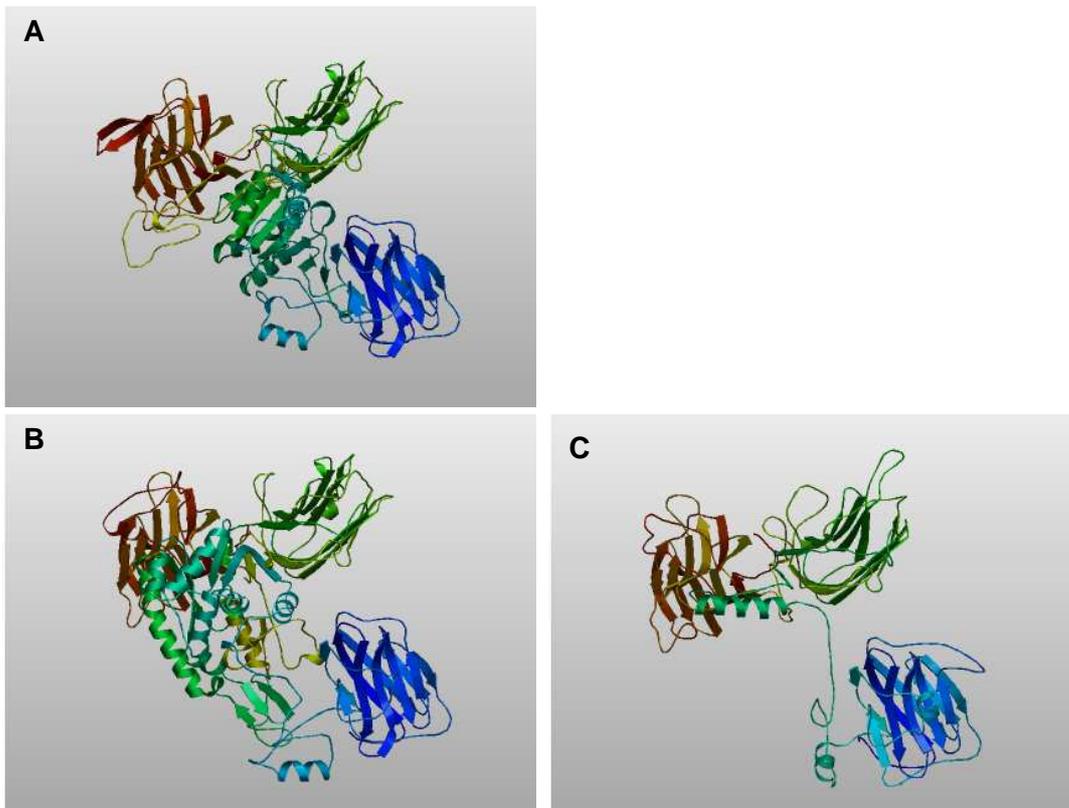
La mutación del alelo *ok1649* del gen *nrx-1* consiste en una deleción de una longitud de 861pb en el ADN genómico del cromosoma V. Esta deleción abarca parte del intrón 8, casi la totalidad del intrón 9 y completamente al exón 9 del correspondiente transcrito de la proteína NRX-1 (Figura 1A). A nivel de proteína esta mutación afecta a los residuos 316-368, localizados en el segundo dominio funcional “*laminin G*” de la proteína neurexina. El estudio “*in silico*” de la mutación descrita no mostró ninguna terminación temprana de la proteína, o sucesos de truncamiento en la misma.

La mutación portadora en el alelo *tm1961* se correspondió con una deleción de una longitud total de 428 pb en el ADN genómico; abarcando completamente a los intrones 13, 14, casi la totalidad del 15, parte del exón 13 y completamente en los exones 14 y 15 del transcrito de la proteína NRX-1 (Figura 1A). A nivel proteico esta deleción afecta a los residuos 757-863 correspondientes con parte del cuarto dominio “*laminin G*” (LNS4) y parte del sitio alternativo de *splicing* SS3. El estudio “*in silico*” de la deleción mostró la formación de un codón de fin de mensaje, a nivel del comienzo del exón 16 en el correspondiente transcrito de la proteína NRX-1; esto se traduce en una forma truncada de la proteína de tan solo 728 residuos frente a los 1560 en la proteína silvestre. Lo que hace que no estén presentes los dominios LNS1 a LNS4.

Para estudiar como se traduce estas mutaciones en el plegamiento y conformación final de la proteína mutada, se realizó un modelo teórico tridimensional de la proteína NRX-1 con los alelos *ok1649* (Figura 2B) y *tm1961* (Figura 2C) donde se observan cambios significativos en la conformación de ambas.



**Figura 1. Localización de mutaciones de los diferentes alelos descritos para el gen *nrx-1* de *C. elegans*.** Se muestra la localización de cada una de ellas a nivel de transcrito de ARN (A), y a nivel de proteína (B) en los dominios funcionales de la misma. PS: Péptido señal. LNS1-LNS6: dominios *laminin G*. EGF: "Epidermal growth factor" O-Glyc: Sitios de O-glicosilación. TM: Dominio transmembrana. SS1-SS5: Sitios de *splicing* alternativo.

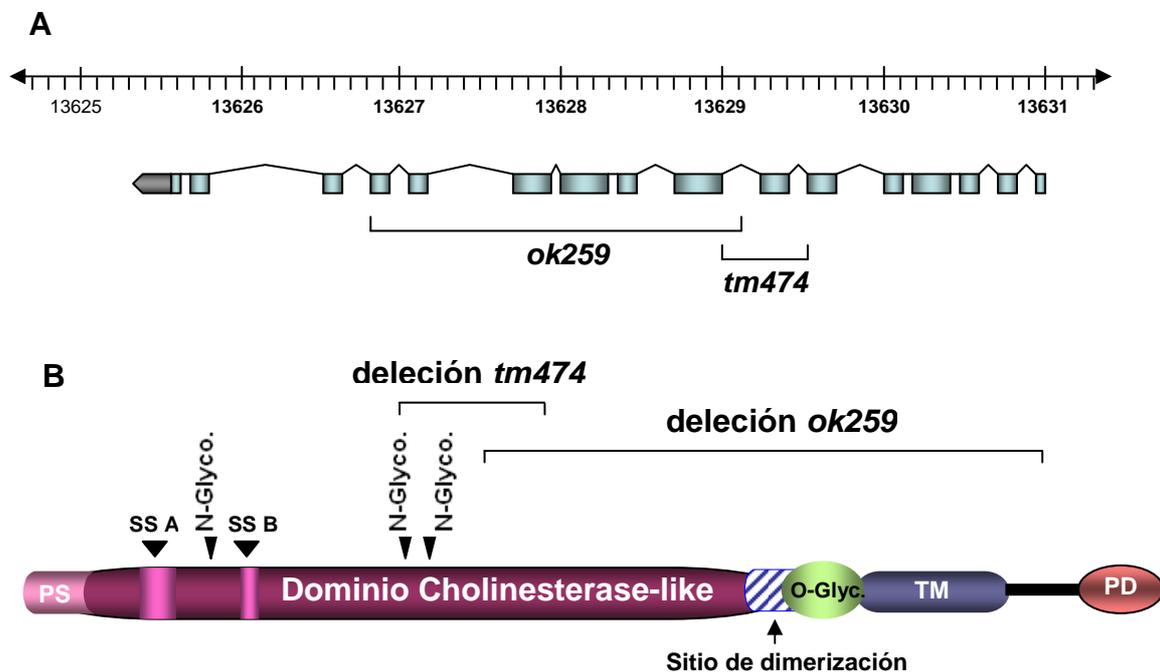


**Figura 2. Modelo tridimensional teórico de la proteína NRX-1 silvestre de *C. elegans* (A) y de la proteínas originada por la mutaciones en los alelos *ok1649* (B) y *tm1961* (C).** Los modelos fueron generados usando el motor bioinformático "Swiss-Model Proteomic serve" (Guex and Peitsch 1997; Schwede, Kopp et al. 2003; Arnold, Bordoli et al. 2006). Se puede observar como se produce un cambio conformacional de ambas proteínas mutadas y especialmente en la correspondiente al alelo *tm1961*, donde se produce una proteína truncada de 728 residuos frente a los 1560 de la silvestre.

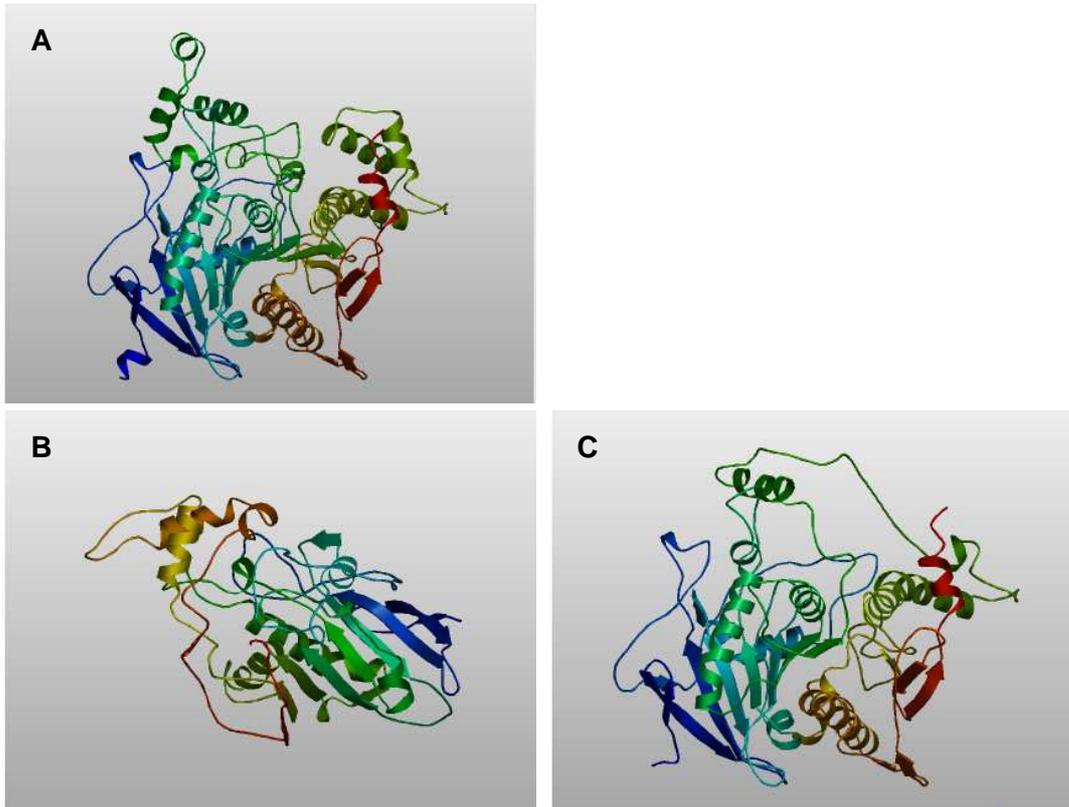
## 1.2. Descripción de las mutaciones *nlg-1 (ok259)* y *nlg-1 (tm474)*.

La mutación del alelo *ok259* del gen *nlg-1* consiste en una deleción de 2341 pb en el ADN genómico del cromosoma X. Esta deleción abarca desde el inicio del intrón 7 hasta el inicio del intrón 13, y completamente a los exones 8-13 del correspondiente transcrito de la proteína NLG-1 (Figura 1). A nivel de proteína esta mutación se localiza desde los residuos 340-745, afectando a la mitad del dominio “Cholinesterase-like”, al sitio de dimerización, a una región de O-Glicosilación, al dominio transmembrana y a una región del dominio citosólico de la proteína neuroliquina. El estudio “*in silico*” de la mutación descrita no mostró ninguna terminación temprana de la proteína, en cambio su estructura teórica mostró un drástico cambio comparado con la proteína silvestre (Figura 4B).

La mutación del alelo *tm474* del gen *nlg-1* consiste en una deleción de una longitud de 583 pb en el ADN genómico. Esta deleción abarca una pequeña parte del intrón 6 y completamente al intrón 7, y alcanza totalmente al exón 7 y casi la totalidad del exón 8 del correspondiente transcrito de la proteína (Figura 1). A nivel de proteína esta mutación afecta a los residuos 258-384, localizados aproximadamente en la zona central del dominio funcional “Cholinesterase-like” de la proteína neuroliquina, abarcando dos zonas de N-Glicosilación (Figura 3). El estudio “*in silico*” de la mutación descrita no mostró ningún cambio significativo en su estructura protéica respecto a la proteína silvestre (Figura 4C).



**Figura 3. Localización de mutaciones de los diferentes alelos descritos para el gen *nlg-1* *C. elegans*.** Se muestra la localización de cada una de ellas a nivel de transcrito de ARN (A), y a nivel de proteína (B) en los diferentes dominios funcionales de la misma. PS: Péptido señal. TM: dominio transmembrana. PD: dominio de unión a PDZ.



**Figura 4. Modelo tridimensional teórico de la proteína NLG-1 silvestre de *C. elegans* (A) y de la proteínas originada por la mutaciones en los alelos *ok259* (B) y *tm474* (C).** Ambos modelos fueron generados usando el motor bioinformático “*Swiss-Model Proteomic serve*” (Guex and Peitsch 1997; Schwede, Kopp et al. 2003; Arnold, Bordoli et al. 2006). Se puede observar como se produce un cambio conformacional en ambas proteínas mutadas pero especialmente en el alelo *ok259* afectando a la mitad del dominio “*Cholinesterase-like*”, al sitio de dimerización, a una región de O-Glicosilación, al dominio transmembrana y a una región del dominio citosólico.

### 1.3. Elección de las estirpes de *C. elegans* de los genes *nrx-1* y *nlg-1* para realizar los ensayos de comportamiento y rescate.

En base a los resultados obtenidos del análisis de las mutaciones descritas se eligió el alelo *ok1649* como alelo de referencia del gen *nrx-1*. La mutación de este alelo representa un cambio significativo en la estructura tridimensional de la proteína neurexina, aunque este parece más acusado en la que codifica el alelo *tm1961*. Los resultados previos obtenidos en los ensayos de comportamiento no mostraron diferencias significativas entre ambos alelos y también coincidían con los experimentos en que se utilizaba RNAi específico de *nrx-1* (*Knockdown*). Los ensayos más representativos fueron llevados a cabo con ambas estirpes VC1416 *nrx-1* (*ok1649*) V, FX1961 *nrx-1* (*tm1961*) V.

Como alelo de referencia del gen *nlg-1* se eligió el alelo *ok259*, de la estirpe VC228 ya que el análisis de esta mutación mostró un cambio significativo en la estructura de la proteína neuroligandina, afectando a una gran parte de los dominios funcionales de la misma. También se usó la estirpe FX00474 (*tm474*) para corroborar los resultados obtenidos con la estirpe de

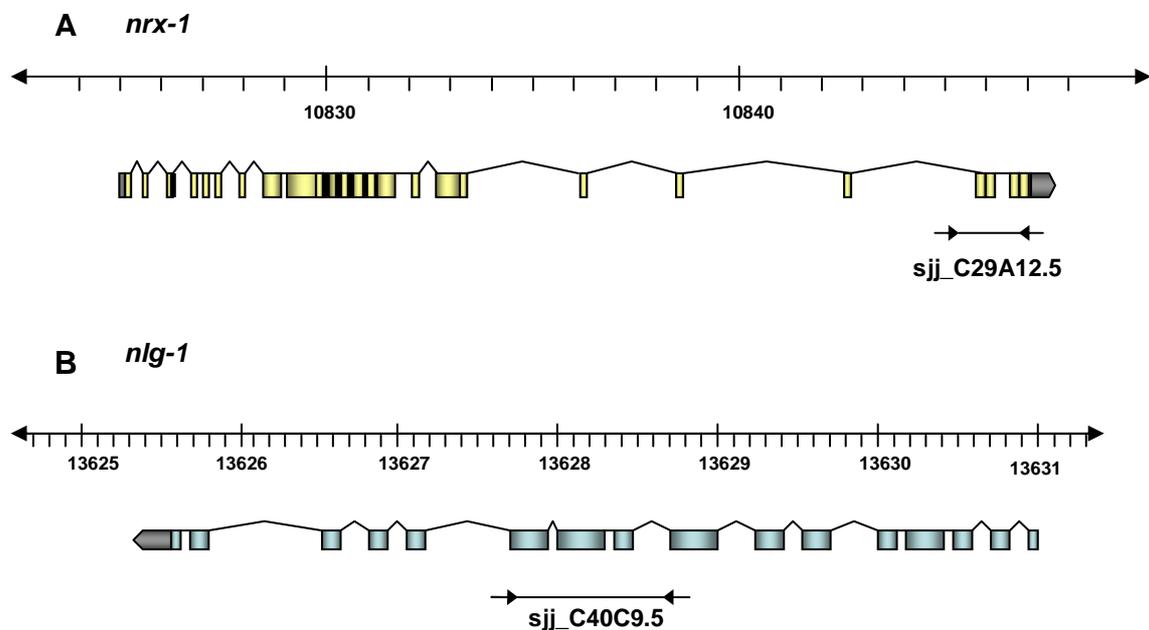
referencia. Como el caso anterior también se llevaron a cabo experimentos con RNAi específico de *nlg-1* (Knockdown), coincidiendo los resultados con el de ambas mutaciones.

Para la construcción del mutante doble CRR21 *nrx-1* (*ok1649*) V; *nlg-1* (*ok259*) X, se eligieron los alelos de referencia de cada gen.

## 2. Silenciamiento de los genes *nrx-1* y *nlg-1* mediante ARN de interferencia (ARNi).

Para corroborar los fenotipos obtenidos en el análisis de las mutaciones de los alelos *ok* y *tm*, se llevó a cabo el silenciamiento de los genes *nrx-1* y *nlg-1* de *C. elegans*, usando ARN de interferencia de secuencia antisentido correspondiente. Para el silenciamiento del gen *nrx-1* se usó el clon V-7016, correspondiente al fragmento de PCR *sjj\_C29A12.5* contenido en el vector pL4440. Para el gen *nlg-1* el clon X-6M16, correspondiente al fragmento de PCR *sjj\_C40C9.5* también contenido en el vector pL4440. Ambos clones fueron obtenidos de la librería de ARNi gestionada por el Dr. Peter Askjaer (Universidad Pablo Olavide, Centro Andaluz de Biología del Desarrollo, CABD-CSIC).

El fragmento *sjj\_C29A12.5* está localizado entre las posiciones 10845.5-10846.5 kb del cromosoma V de *C. elegans*, y el fragmento *sjj\_C40C9.5* en las posiciones 13627.75-13628.81 kb del cromosoma X de *C. elegans* (Figura 5).



**Figura 5. Localización de las secuencias RNAi complementarias a los RNAm de los genes *nrx-1* y *nlg-1*.** Localización de los fragmentos *sjj\_C29A12.5* (A) y *sjj\_C40C9.5* (B), en el cromosoma V y X respectivamente, utilizados en los experimentos de silenciamiento de los genes *nrx-1* y *nlg-1*. Se muestra la zona del transcrito de ARN afectada por ambos fragmentos.

### **III. Caracterización fenotípica de mutantes de *C. elegans* deficientes en neurexina y neuroligüina.**

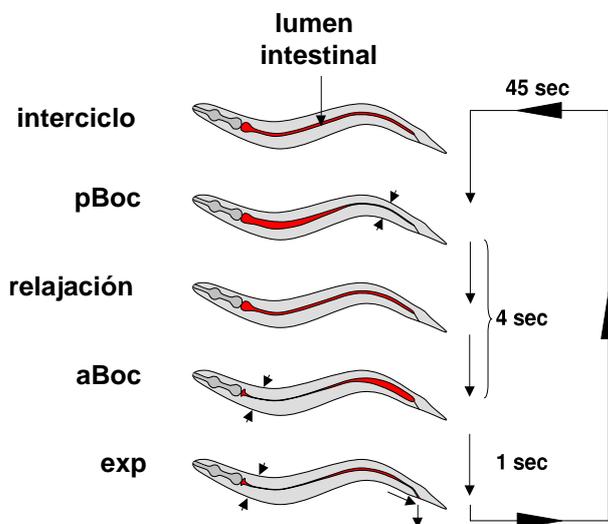
Las proteínas neurexina y neuroligüina se expresan en un elevado número de neuronas de *C. elegans*, y por lo tanto, están presentes en casi todas las sinapsis establecidas en el nematodo. Ambas moléculas participan en el establecimiento de la sinapsis, y contribuyen a una correcta transmisión sináptica entre neuronas. Algunos circuitos neuronales, unos más complejos que otros, son los responsables de muchos de los comportamientos observados en *C. elegans*. En estos circuitos son clave tanto el contacto, como la transmisión sináptica entre las neuronas implicadas. Por ello, cabría pensar que la pérdida de neurexina y/o neuroligüina en el nematodo alterase las pautas normales de ciertos comportamientos. En este sentido se analizaron los patrones de alguno de éstos, que están bien definidos y donde se conoce los circuitos neuronales que participan, como son: ritmo de defecación, ondas corporales, sensibilidad mecanosensorial, habituación y la respuesta al estrés osmótico. Por último se intentó definir una característica del comportamiento de *C. elegans*, que se definió como capacidad exploratoria.

#### **1. La neurexina y la neuroligüina afectan de forma sinérgica al ritmo de defecación.**

Los ritmos ultradianos, ritmos con un periodo de menos de 24 horas, son fundamentales en el mantenimiento de la homeostasis de los organismos y sin embargo en muchos casos se desconocen los mecanismos que los regulan a nivel molecular. En *C. elegans* la defecación es un proceso rítmico ultradiano (Liu and Thomas 1994; Baylis 2005), está muy bien definido y es de fácil seguimiento para estudiarlo como modelo de comportamiento rítmico (Thomas 1990; Branicky and Hekimi 2006). Las etapas de la excreción en el nematodo consisten en una serie de contracciones musculares que en conjunto se denominan programa motor de defecación (*Defecation Motor Program "DMP"*) (Figura 1). El DMP puede ser dividido en tres etapas claramente distinguibles: 1) contracción de los músculos posteriores del cuerpo (pBoc), los cuales comprimen el contenido intestinal hacia la parte anterior del intestino; 2) contracción de la parte anterior de los músculos del cuerpo (aBoc), los cuales dirigen el contenido intestinal hacia la parte posterior del intestino y 3) contracción de los músculos entéricos y una relajación del esfínter entérico, resultando en la expulsión del detritus (Exp). En el adulto joven de la estirpe silvestre Bristol N2 y en condiciones estándares de laboratorio (alimento césped bacteriano OP50 y 20°C), esta serie de contracciones musculares tienen lugar en un intervalo de tiempo de unos 45 segundos. El ritmo de defecación está regulado con mucha exactitud, de tal

forma que en condiciones controladas el error estándar (SEM) es menos de 1 segundo (Liu and Thomas 1994). La duración del ciclo de defecación cambia por factores ambientales tales como la temperatura, la disponibilidad de alimento y estímulos mecánicos (Branicky and Hekimi 2006).

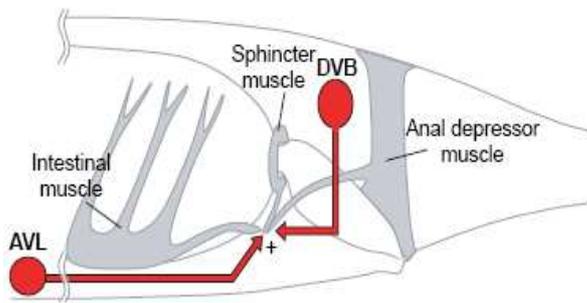
Se han identificado varios genes que están implicados en la regulación del ritmo de defecación, entre ellos hasta siete genes *dec* que alteran la periodicidad del ciclo (Iwasaki, Liu et al. 1995; Branicky and Hekimi 2006)). Además se ha descrito un “oscilador de defecación” subyacente al DMP que regula el inicio de dicho programa y que se encuentra influenciado por diversos genes implicados en la señalización de calcio (Branicky and Hekimi 2006). Se ha demostrado que la defecación está regulada por la liberación de calcio en las 20 células epiteliales del intestino (Dal Santo, Logan et al. 1999; Espelt, Estevez et al. 2005; Teramoto and Iwasaki 2006; Peters, Teramoto et al. 2007; Nehrke, Denton et al. 2008). De particular interés es el gen *itr-1* que ejerce su función en las células intestinales (Dal Santo, Logan et al. 1999; Espelt, Estevez et al. 2005) y codifica el receptor inositol 1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>R), que libera calcio desde el retículo endoplásmico en respuesta a la producción de IP<sub>3</sub>. Los mutantes de pérdida de función del gen *itr-1* tienen un ritmo lento o ausente de defecación en función de la severidad de la mutación (Dal Santo, Logan et al. 1999).



**Figura 1. Diagrama representativo del ciclo de defecación de *C. elegans*.**

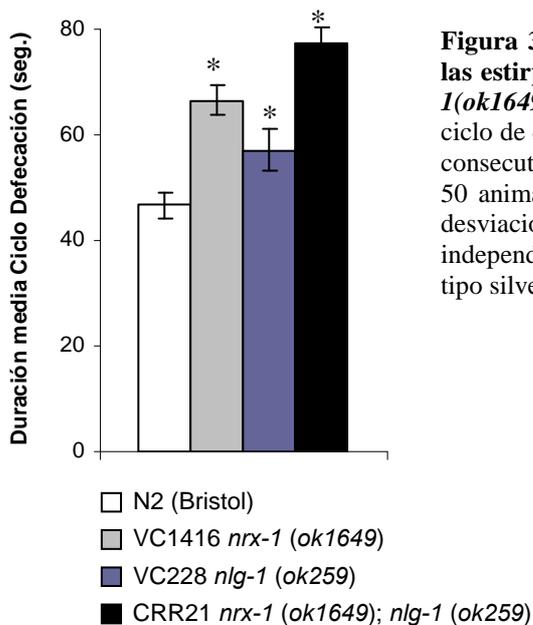
La defecación depende de una correcta ejecución del programa motor de defecación (DMP). Existen tres etapas distinguibles en el DMP: pBoc (contracción de los músculos posteriores del cuerpo), aBoc (contracción de los músculos anteriores del cuerpo) y exp (expulsión). Adaptado de Avery and Thomas, 1997 (Avery and Thomas 1997).

El control neuromuscular del programa de defecación de *C. elegans* se encuentra regulado exclusivamente por dos neuronas de naturaleza GABAérgica, AVL y DVB (Figura 2). Ambas controlan la contracción de los haces musculares implicados en las diferentes etapas del programa motor de defecación. Si AVL y DVB no funcionan correctamente el ciclo se retrasa (McIntire, Jorgensen et al. 1993)



**Figura 2. Representación esquemática de los músculos entéricos y las motoneuronas AVL y DVB.** Los músculos entéricos lo constituyen cuatro células: el depresor anal (“*anal depressor muscle*”), el esfínter (“*sphincter muscle*”) y dos células intestinales con simetría bilateral (“*intestinal muscle*”). Estas células musculares están conectadas entre sí mediante uniones “*gap*” y cada una de ellas envía una prolongación muscular hacia el ganglio preanal donde contactan con la motoneurona DVB. La interneurona AVL, localizada en el ganglio ventral de la parte más anterior del nematodo, envía un axón a lo largo del cordón nervioso ventral donde interacciona con DVB. Adaptado de (Schuske, Beg et al. 2004).

Para analizar los ciclos de defecación de los mutantes *nrx-1 (ok1649)*, *nlg-1 (ok259)* y *nrx1(ok1649);nlg-1(ok259)* se cuantificó el tiempo del ciclo de defecación en nematodos individuales como se ha descrito anteriormente (Thomas 1990). Siempre se utilizaron nematodos hermafroditas L4 crecidos a 20°C en placas frescas de medio NGM con *E.coli* OP50. Los nematodos individuales fueron observados bajo un aumento de 50X. Bajo estas condiciones todas las etapas del programa motor de defecación son visibles y son muy evidentes las etapas pBoc (“*posterior body contraction*”) y Exp (“*expulsión*”). La longitud de cada ciclo se definió como la duración entre dos etapas pBoc entre dos defecaciones consecutivas. Cada nematodo fue medido durante 10 ciclos (11 pBocs consecutivos).



**Figura 3. Medida de la duración del ciclo de defecación en las estirpes N2 (Bristol), *nrx-1 (ok1649)*, *nlg-1 (ok259)* y *nrx-1(ok1649);nlg-1(ok259)*.** Se representa la duración media del ciclo de defecación de cada estirpe medida entre dos etapas pBoc consecutivas. En cada experimento fueron analizados un total de 50 animales de cada estirpe. Las barras de error representan la desviación estándar de al menos tres experimentos independientes. El \* indica una diferencia significativa con el tipo silvestre con una  $P \leq 0.001$ .

La estirpe mutantes *nrx-1 (ok1649)* mostró un incremento en la duración del ciclo de defecación con respecto a la estirpe silvestre Bristol N2. Este incremento fue menos acusado en el caso de

los mutantes *nlg-1(ok259)*, aunque también fue significativo. Mucho más acentuado fue el incremento en el periodo de defecación de la estirpe doble mutante *nrx-1(ok1649);nlg-1(ok259)*, donde el ciclo duró  $77,33 \pm 2,40$  segundos que es un 65,8% más que en la estirpe silvestre ( $46,63 \pm 2,35$ ) (Figura 3). Este resultado podría ser debido a un efecto sinérgico de ambas mutaciones (*nrx-1(ok1649) + nlg-1(ok259)*).

Debido a que el control neurológico de este proceso está regulado por GABA, se podría pensar que la síntesis, liberación, recaptación y detección por los receptores de este neurotransmisor podría estar alterada en los terminales postsinápticos, de las neuronas AVL y DBV debido a una incorrecta funcionalidad de las proteínas neurexina y neuroliguina que intervendrían en los procesos de biosíntesis y sinapsis GABAérgica. Lo mismo podría decirse de la acetilcolina en la interacción de la motoneurona DVB con las células musculares. Recientemente Hunter y colaboradores (Hunter, Mullen et al. 2010) han demostrado que las neuroliguinas se expresan, además de en células del sistema nervioso del nematodo, en las células musculares.

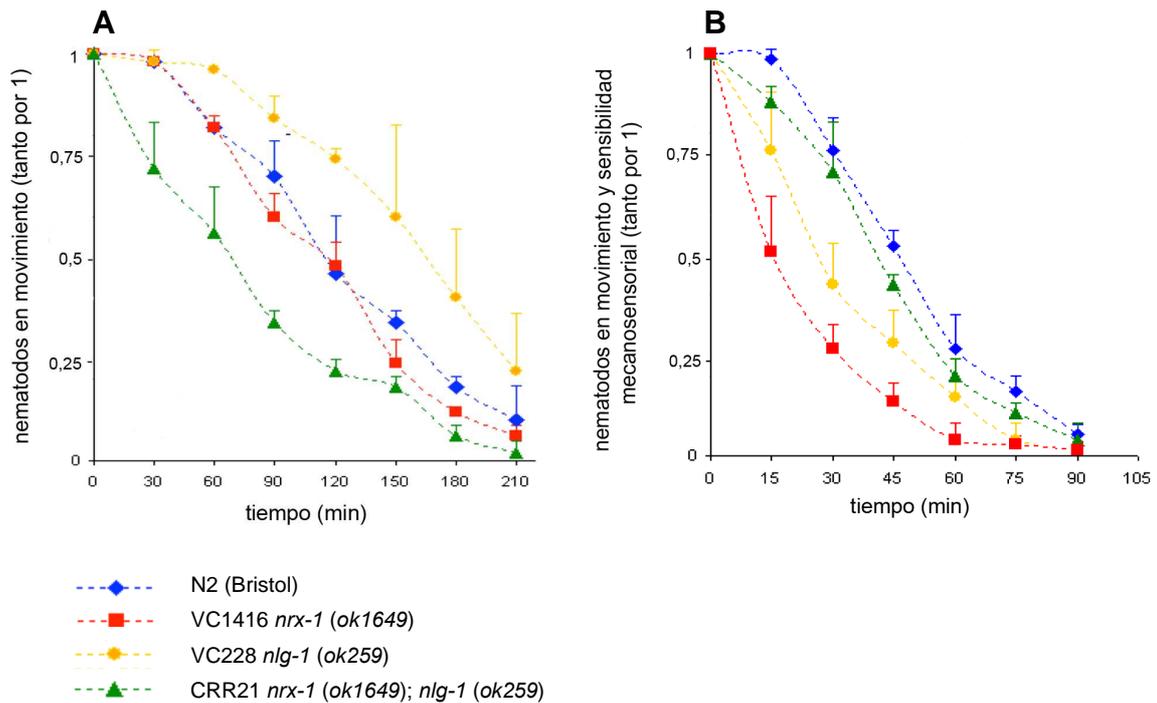
## **1.2. Sensibilidad a aldicarb, levamisol y pentilentetrazol.**

Para probar la hipótesis de que los neurotransmisores acetilcolina y/o GABA estaban implicados en los mecanismos neuronales que regulan la defecación en *nrx-1(ok1649)*, *nlg-1(ok259)* y *nrx1(ok1649);nlg-1(ok259)* de *C. elegans*, se estudiaron en cada uno de estos mutantes los efectos de un inhibidor de la acetilcolinesterasa (aldicarb), un agonista de acetilcolina (levamisol) y un compuesto antagonista del neurotransmisor GABA (pentilentetrazol ó PTZ).

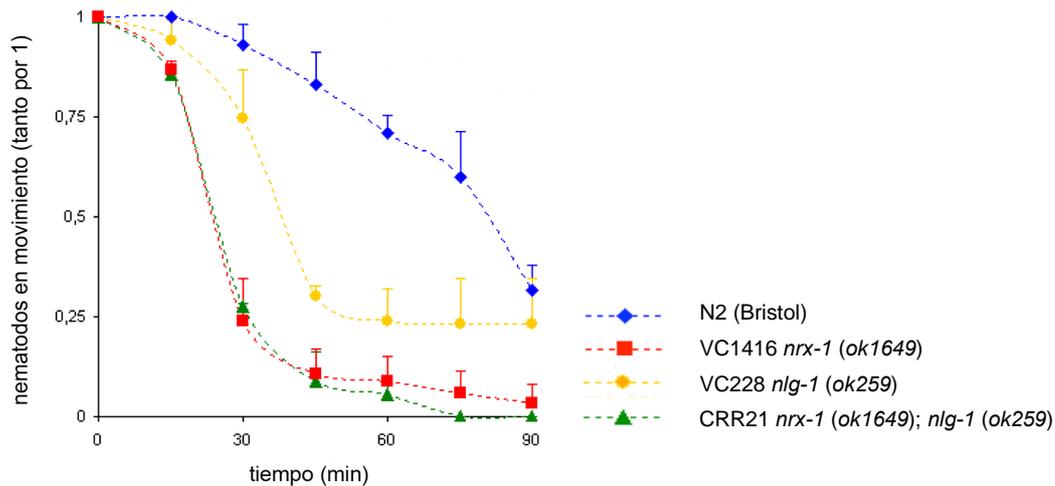
Como se puede observar en los resultados obtenidos (Figura 4A), los mutantes deficientes en neuroliguina fueron más resistentes al compuesto aldicarb que la estirpe silvestre. Por el contrario, los mutantes neurexina eran más sensibles. En el doble mutante *nrx1(ok1649);nlg-1(ok259)* se compensaba el efecto de ambas mutaciones simples mostrando una respuesta similar a la de la estirpe silvestre. La resistencia a este compuesto, como ocurre en los mutantes *nlg-1(ok259)*, se ha asociado con una disminución en la liberación de acetilcolina en los terminales presinápticos (Miller, Alfonso et al. 1996), sin embargo también es posible que sea debido a una alteración de los receptores postsinápticos. La mayor sensibilidad de los mutantes *nrx1(ok1649)* al aldicarb podría indicar que en estos mutantes habría una alteración en la liberación de acetilcolina, incrementándola, o bien de la recaptación, dificultándola. Puesto que las neurexinas están presentes fundamentalmente en la membrana presináptica y las neuroliguinas en la postsináptica y por otra parte el doble mutante *nrx1(ok1649);nlg-1(ok259)* tiene una respuesta similar a la de la estirpe silvestre, la explicación más lógica de los resultados observados sería que la neurexina interaccionaría en los mecanismos de recaptación de la acetilcolina incrementando la sensibilidad al aldicarb al existir más neurotransmisor en el espacio sináptico, la neuroliguina alteraría los receptores de acetilcolina en la membrana

postsináptica mostrando más resistencia al aldicarb y en el doble mutante se compensarían ambas respuestas.

Esta explicación podría ser confirmada estudiando la respuesta de estos mutantes a un agonista de la acetilcolina como el levamisol. Era de esperar que el mutante *nrx1(ok1649)* fuera más sensible al compuesto, el mutante *nlg-1(ok259)* más resistente y el doble mutante diera una respuesta similar al silvestre. Como se puede observar en la Figura 4B, los resultados no fueron los que se esperaban según la hipótesis anterior. Una posible explicación a este hecho es que existe una clase adicional de receptores colinérgicos presentes en las sinapsis neuromusculares de *C. elegans*, los cuales son activados tanto por acetilcolina como por nicotina, pero son insensibles al levamisol (Gally, Eimer et al. 2004). Estos receptores de composición y estructura molecular aún desconocida, enmascararían los resultados con el levamisol. En este sentido, este tipo de observaciones abren la posibilidad de investigar otros agonistas y antagonistas de la acetilcolina, así como la respuesta de mutantes de *C. elegans* en genes que codifican subunidades de receptores de acetilcolina.



**Figura 4. Respuesta de los mutantes *nrx-1(ok1649)*, *nlg-1(ok259)* y *nrx-1(ok1649); nlg-1(ok259)* a aldicarb, levamisol en comparación con la estirpe silvestre N2 (Bristol). Las concentraciones utilizadas fueron 0,5 mM de aldicarb (A), 0,2 mM de levamisol (B).**



**Figura 5. Respuesta de los mutantes *nrx-1* (*ok1649*), *nlg-1* (*ok259*) y *nrx1(ok1649);nlg-1(ok259)* a pentilentetrazol (PTZ) en comparación con la estirpe silvestre N2 (Bristol). La concentración utilizada fue de 10 mg/mL de pentilentetrazol.**

Como hemos visto anteriormente, el control neurológico de la defecación estaba regulado por dos neuronas GABAérgicas AVL y DBV. La disfunción de la neurexinas y/o neuroliquina podrían alterar la liberación, la recaptación o la detección del GABA por receptores específicos. Por lo tanto, sería de esperar que un antagonista de GABA produjera un efecto de parálisis más acusado en estos mutantes que en el tipo silvestre. La Figura 5 muestra que los mutantes *nrx-1* (*ok1649*), *nlg-1* (*ok259*) y *nrx-1(ok1649);nlg-1(ok259)* son más sensibles a pentilentetrazol, aunque el efecto en el mutante deficiente en neuroliquina es inferior al de la neurexina.

## **2. Los mutantes en los genes que codifican neurexina o neuroliquina son deficientes en las rutas dopaminérgica y serotoninérgica en respuesta a la presencia de alimento.**

Los estudios de los mapas de conectividad neuronal, las ablaciones de neuronas específicas y el análisis de los mutantes en la locomoción han demostrado que existen al menos tres procesos de control de locomoción parcialmente divisibles en *C. elegans*: la coordinación del movimiento ondulatorio del cuerpo (“*body bends*”), la selección del movimiento hacia adelante o atrás y la tasa o velocidad de locomoción (Driscoll and Kaplan 1997; Jorgensen, M. et al. 1997; Robotzke and Thomas 2000).

El movimiento ondulatorio coordinado de *C. elegans* se genera a partir de la actividad de motoneuronas colinérgicas y GABA-adrenérgicas que forman uniones con las células musculares de la pared del cuerpo del nematodo. Las ondulaciones del cuerpo se forman alternativamente por la excitación de motoneuronas colinérgicas de los músculos en un lado del animal y la inhibición recíproca de los músculos correspondientes en el lado opuesto del

nematodo a través de motoneuronas GABA-adrenérgicas (Figura 6) (McIntire, Jorgensen et al. 1993; McIntire, Jorgensen et al. 1993; Schuske, Beg et al. 2004).



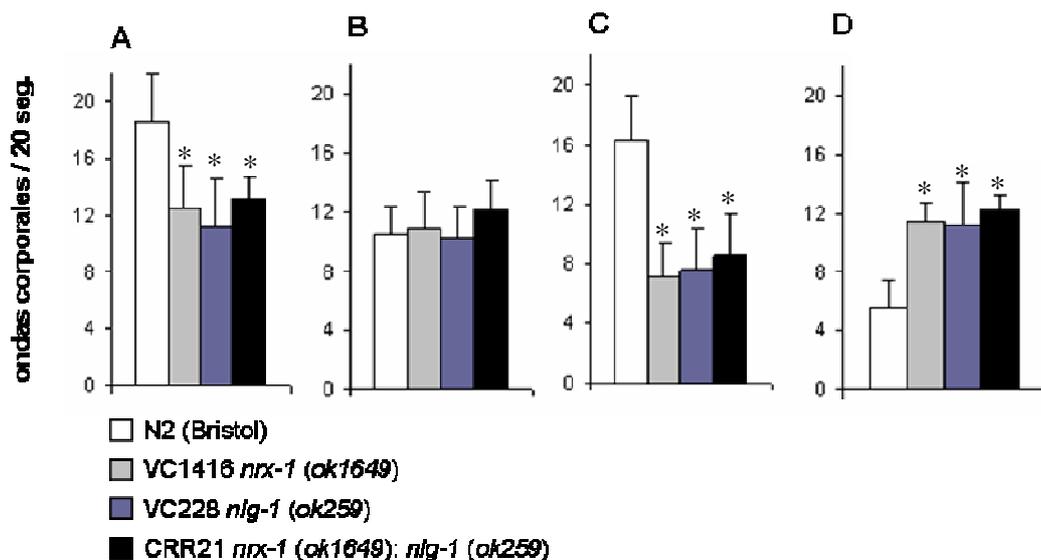
**Figura 6. Esquema de la modulación de las ondas corporales en *C. elegans* donde participan neuronas colinérgicas y GABAérgicas relajando y excitando las células musculares.** Como se muestra en la Figura las motoneuronas colinérgicas (en rojo) inducen la contracción de las células musculares y excitan a las motoneuronas GABAérgicas (en azul) que inhibir la contracción muscular en el lado opuesto (dorsal o ventral). Adaptado de Schuske et al. (Schuske, Beg et al. 2004).

Los mutantes de *C. elegans* en los genes *unc-25* (codifica la enzima ácido glutámico descarboxilasa que cataliza la síntesis de GABA a partir de ácido glutámico) o en los genes *unc-46* y *unc-47* (codifican el transportador vesicular de GABA), presentan un fenotipo denominado “*shrinker*” o de “acortamiento”. Este fenotipo se produce ante un estímulo mecánico sensorial en la parte anterior del cuerpo que origina una hipercontracción de las células musculares por señales colinérgicas, pero al no poder ser inhibidas por las señales respectivas gabaérgicas hace que el animal sea incapaz de retroceder y se produce un acortamiento del cuerpo (McIntire, Reimer et al. 1997).

*C. elegans* disminuye el número de ondulaciones corporales por unidad de tiempo cuando se encuentra sobre un césped bacteriano y la incrementa cuando se encuentra en un medio desprovisto de alimento. Se ha demostrado que la tasa de locomoción, medida por el número de ondulaciones corporales en veinte segundos, está regulada por una ruta dopaminérgica y otra serotoninérgica (Sawin, Ranganathan et al. 2000). En primer lugar, cuando el nematodo está en presencia de comida y se pasa de nuevo a presencia de comida el nematodo se mueve más despacio que si ésta no está presente. Esta respuesta depende de la dopamina y es posible que se deba a una respuesta de adaptación al medio para mantener al animal el mayor tiempo posible en presencia del alimento. Si el nematodo está en ayuno y se pone en presencia de comida su tasa de locomoción baja su tasa de locomoción aún más que en el caso anterior, un mecanismo que pretende asegurar que el animal no abandone la nueva fuente de alimento detectada. Este mecanismo que obedece a la experiencia de un estado anterior, en la que ha existido privación de alimento, depende de la serotonina. El análisis de la implicación de las rutas dopaminérgicas y serotoninérgicas en la tasa de locomoción se ha basado principalmente en dos tipos de aproximaciones experimentales. En primer lugar en el análisis de mutantes defectivos en la síntesis de dopamina (*cat-2*), y en la de dopamina y serotonina (*cat-4* y *bas-1*) y en segundo

lugar en la ablación de neuronas dopaminérgicas y serotoninérgicas (Sawin, Ranganathan et al. 2000). En *C. elegans* hay ocho neuronas dopaminérgicas: cuatro CEP, dos ADE y dos PDE; se ha demostrado que las ocho intervienen en la respuesta de adaptación al medio. Existen al menos doce neuronas serotoninérgicas: dos NSM, dos HSN, dos ADF, dos PHB, dos AIM, una I5 y una RIH; de todas ellas, solo las NSM son las imprescindibles para que se produzca la respuesta serotoninérgica.

Para analizar la funcionalidad de la ruta dopaminérgica en los mutantes *nrx-1 (ok1649)*, *nlg-1 (ok259)* y *nrx1(ok1649);nlg-1(ok259)* se utilizaron nematodos sometidos a dos condiciones previas: alimentados o en ayuno. Para estudiar la ruta dopaminérgica los nematodos de cajas con alimento fueron traspasados a placas sin alimento o con césped bacteriano (Figura 7A y B). Para estudiar la ruta serotoninérgica, los nematodos en cajas sin alimento (durante 30 minutos) fueron traspasados a placas sin alimento o con césped bacteriano (Figura 7C y D). En estas condiciones se contaron el número de ondulaciones corporales en un intervalo de tiempo de 20 segundos (ver detalles del diseño experimental en el apartado “Materiales y Métodos”).



**Figura 7.** Ruta dopaminérgica y serotoninérgica de mutantes *nrx-1*, *nlg-1* y *nrx-1;nlg-1* en comparación con la estirpe silvestre N2. Para estudiar la funcionalidad de la ruta dopaminérgica los nematodos de cajas con alimento (*E. Coli* OP50) fueron traspasados a placas sin alimento (A) o con césped bacteriano (B). Para estudiar la funcionalidad de la ruta serotoninérgica, los nematodos en cajas sin alimento (durante 30 minutos) fueron traspasados a placas sin alimento (C) o con césped bacteriano (D). El \* indica una diferencia significativa con la estirpe silvestre ( $P \leq 0.001$ ).

La Figura 7 muestra en primer lugar que el número de ondulaciones corporales es inferior en los mutantes *nrx-1 (ok1649)*, *nlg-1 (ok259)* y *nrx1(ok1649);nlg-1(ok259)* que en la estirpe silvestre N2 cuando los nematodos de placas con alimento o sin alimento fueron traspasados a placas sin alimento (Figura 7A y C). En segundo lugar se observa que los mutantes *nrx-1 (ok1649)*, *nlg-1 (ok259)* y *nrx1(ok1649);nlg-1(ok259)* son deficientes en las respuestas dependientes de la

dopamina (Figura 7A y B) y de la serotonina (Figura 7C y D). El número de ondulaciones corporales de las estirpes mutantes fueron similares tanto en presencia como en ausencia de alimento.

### **3. Definición de una nueva característica fenotípica: capacidad de exploración o “exploring”.**

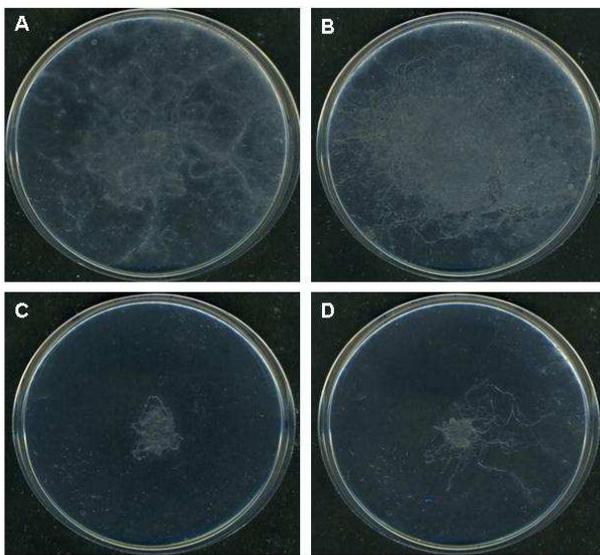
*C. elegans* alterna su comportamiento entre fases de actividad e inactividad cuando se encuentra sobre un césped bacteriano de la bacteria *Escherichia coli* OP50. En condiciones estándar se estima que el nematodo emplea hasta un 80% de su tiempo en una fase inactiva denominada “dwelling”, que en este contexto se podría traducir como “reposo”, y un 20% en una fase activa errante denominada “roaming” (Fujiwara, Sengupta et al. 2002). Durante la fase de “dwelling” los nematodos mantienen una velocidad baja, presentando de una manera frecuente y alterna movimientos hacia delante (“forward”) y hacia atrás (“backward”), sin que recorran mucha distancia. En cambio la fase de “roaming” consiste en desplazamientos claros con movimientos sinusoidales hacia delante (“crawling”), aunque a veces retroceden (“reversal”) y otras forman con el cuerpo estructuras que recuerdan a la primera letra del alfabeto griego (“omega”).

*C. elegans* administra su tiempo empleado en estos movimientos dependiendo de la cantidad y calidad nutricional del alimento presente en su medio ambiente. El tiempo empleado en la fase de “roaming” es menor cuando el crecimiento del nematodo es favorecido por la calidad del alimento disponible; mientras que ante una situación de escasez de alimento, los nematodos emplean la mayor parte del tiempo en una fase activa, en busca de una fuente de alimento con una calidad nutricional adecuada (Shtonda and Avery 2006). Esto puede ser una estrategia para seleccionar el mejor alimento en donde habita y cambiar de área cuando éste no tiene la calidad suficiente para sustentar el crecimiento de una población determinada (Ben Arous, Laffont et al. 2009). *C. elegans* también es capaz de distinguir diferentes características presentes en el alimento no sólo mediante circuitos químico y/o mecanosensoriales, también mediante rutas de señalización internas que reflejan su estado de saciedad (Colbert and Bargmann 1997; Sawin, Ranganathan et al. 2000; Kindt, Viswanath et al. 2007; Kang and Avery 2009).

Para que se produzca la fase de “dwelling” es necesaria la captación de ciertas señales internas inducidas por la presencia de alimento. En este circuito intervienen la serotonina, el péptido TGF-beta y la ruta de señalización de la insulina. Se ha descrito que los mutantes *tph-1* deficientes en la síntesis de serotonina presentan una disminución de la fase de “roaming” en presencia de alimento; emplean un 5% del tiempo en este estado en lugar del 20% de la estirpe silvestre. Lo mismo le ocurre a los mutantes *daf-2* (deficientes en un receptor de insulina) y los mutantes *daf-7* (deficientes en el gen que codifica el péptido TGF-beta), que emplean solo entre el 3-5% del tiempo en el estado de roaming (Ben Arous, Laffont et al. 2009).

- Análisis cualitativo de la capacidad de exploración (“exploring”).

En esta tesis definimos otra cualidad del comportamiento de *C. elegans* que hemos denominado “exploring” o capacidad exploratoria. Este comportamiento consistiría en el rastreo del medio en busca de nutrientes y puede valorarse teniendo en cuenta el área explorada por el nematodo y el tiempo en que lo hace en ausencia de alimento. La determinación del “exploring” se llevó a cabo en primer lugar de forma cualitativa mediante la valoración global de las trayectorias de 20 nematodos a tiempo final (cinco a siete días), colocados en el centro de una placa de 10 cm de diámetro y 0.25% de *Tween20*. En estas condiciones se facilitaba la visualización de las trayectorias trazadas (más detalles del diseño experimental, pueden consultarse en “Materiales y Métodos ”)



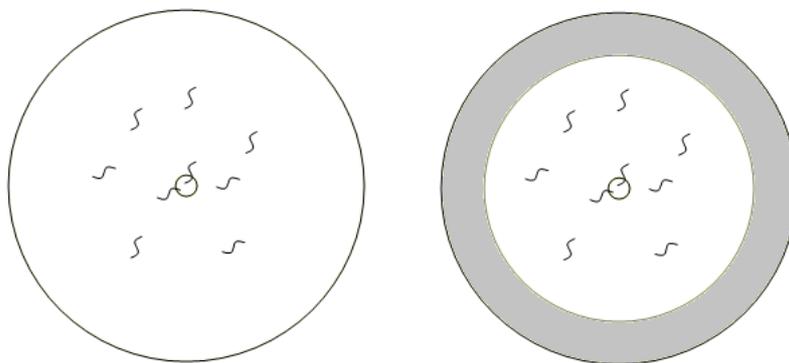
**Figura 8. Ensayo cualitativo de la capacidad exploratoria (“exploring”).** A. Bristol N2; B. VC228 *nlg-1 (ok259) X*; C. VC1416 *nrx-1 (ok1649) V*; D. CRR21 (*nrx-1 (ok1649) V*; *nlg-1 (ok259) X*). Cada una de las placas de los ensayos fueron escaneadas a una resolución de 600-ppp, mediante un escáner *Epson 4490 Photo*. Aquí se muestra un experimento representativo de un total de al menos tres réplicas.

En la Figura 8, se pueden visualizar los resultados obtenidos en mutantes defectivos *nlg-1* y *nrx-1*. Por una parte el mutante deficiente en neuroliquina, *nlg-1 (ok259)*, presenta mayor huella exploratoria que la estirpe silvestre Bristol N2. Por el contrario el mutante deficiente en neurexina, *nrx-1 (ok1649)* y el doble mutante *nrx1(ok1649);nlg-1(ok259)* la huella está muy reducida con respecto al silvestre. Tanto los mutantes *nrx-1* como los *nlg-1* son defectivo en la sinapsis y en este sentido serían deficientes en la transmisión de señales del medio para responder adecuadamente a dichos estímulos. Por ejemplo, en esta tesis se ha demostrado la discapacidad de los mutantes *nlg-1* de responder al estrés osmótico del medio (ver apartado 3.5). Se sabe que cuando el gusano está en el estado de “roaming” interviene la neurona AWC, una neurona sensorial encargada de captar la presencia de sustancias odorantes en el medio. AWC junto a las interneuronas AIB y AIY, están implicadas en los movimientos de navegación del nematodo (Gray, Hill et al. 2005) y que deben ser esenciales en el comportamiento exploratorio que hemos descrito. Es probable que en estos mutantes esté alterada la neurotransmisión en este circuito neuronal, ya que como puede observarse en los resultados de

esta tesis tanto la ruta dopaminérgica como la serotoninérgica no es funcional en estos mutantes (ver apartado 3.2).

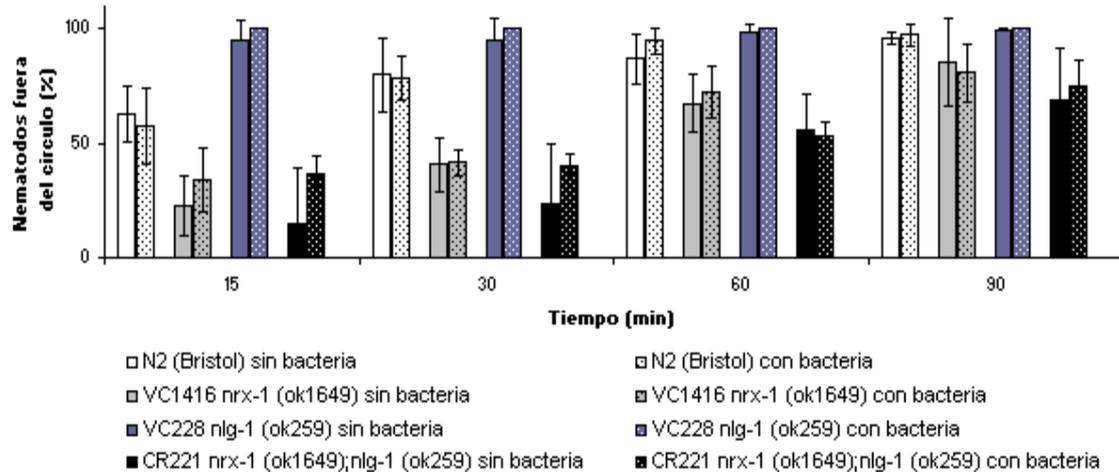
- Análisis cuantitativo de la capacidad de exploración (“exploring”).

Para realizar un análisis cuantitativo de la capacidad exploratoria de los mutantes *nlg-1(ok259)*, *nrx-1(ok1649)* y *nrx-1(ok1649);nlg-1(ok259)* se ideó un ensayo en el que los nematodos se exponían a dos condiciones ambientales diferentes. Una de estas condiciones era un medio estándar (agar NGM) en placas de Petri de 60 mm sin césped bacteriano, la otra era el mismo medio donde se había situado un césped de la estirpe OP50 de *E. coli* de unos 10 mm de ancho a lo largo de todo el perímetro de la placa como se indica en la Figura 9.

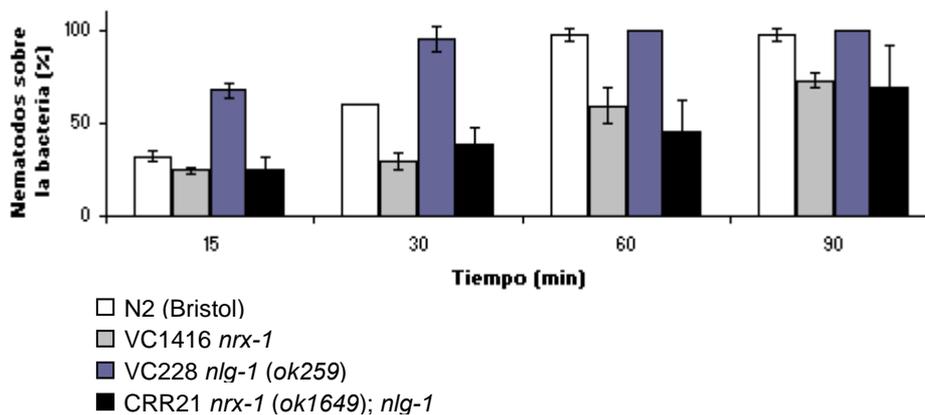


**Figura 9. Dibujo esquemático de las placas de Petri utilizadas para el análisis de exploración.** A la izquierda placas sin césped bacteriano y a la derecha placas con césped bacteriano (color gris) en su perímetro.

Unos 20 nematodos en estadio adulto joven, fueron colocados en el centro en un área de aproximadamente 1 centímetro de diámetro. En intervalos de tiempo de 15 minutos, se contaron aquellos nematodos que habían sido capaces de desplazarse fuera del área en las dos condiciones experimentales. Los resultados se muestran en la Figura 10. En ellos se corroboran los obtenidos en el ensayo anterior (Figura 8). Los mutantes *nlg-1 (ok259)*, presentaron desde los primeros intervalos de medición un elevado porcentaje de individuos fuera del área de 1 centímetro de radio y a los 15 minutos todos habían salido fuera de dicha área. Por el contrario los mutantes *nrx-1 (ok1649)*, incluso a los 30 minutos, permanecían en el interior del área en un alto porcentaje. A partir de este tiempo los animales acababan saliendo del área aunque nunca se desplazaron a mucha distancia del área inicial, sino que ocupaban zonas circundantes a ésta. Un comportamiento similar fue observado en la estirpe doble mutante CRR21: *nlg-1 (ok259); nrx-1 (ok1649)* (ver Figura 10). No se observaron diferencias significativas entre las dos condiciones, es decir sin alimento o con alimento en el perímetro de la caja de Petri. No obstante cuando se cuantificó el número de nematodos que llegaban al césped bacteriano en relación al tiempo se pudo constatar que los mutantes *nlg-1* llegaban antes que la estirpe silvestre y los mutantes *nrx-1* y dobles mutantes *nrx-1;nlg-1* lo hacía con retraso significativo respecto a esta (Figura 11).



**Figura 10. Cuantificación de la capacidad exploratoria (“exploring”).** La diferencia entre la estirpe silvestre Bristol N2 y cada uno de los mutantes fueron estadísticamente significativas según una prueba *t-Student*: VC1416 ( $P = 0.0003$ ), VC228 ( $P = 0.0130$ ), CRR21 ( $P = 0.0001$ ). Las diferencias entre los resultados obtenidos en las condiciones con y sin alimento no fueron estadísticamente significativas ( $P > 0.05$ ). Las barras de error representan la desviación estándar de al menos tres experimentos independientes.

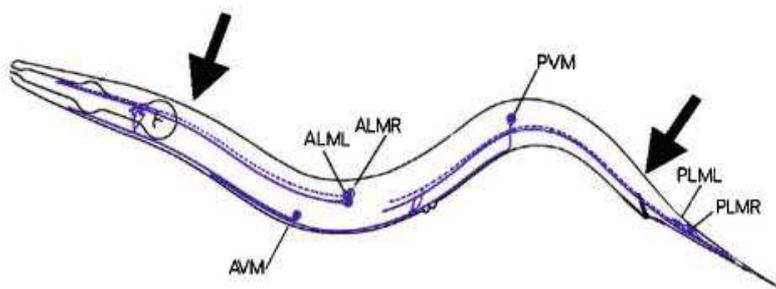


**Figura 11. Cuantificación de la capacidad exploratoria (“exploring”).** Porcentaje de nematodos de cada estirpe que alcanzan el césped bacteriano situado en el perímetro de placas NGM agar. Las barras de error representan la desviación estándar de al menos tres experimentos independientes. La diferencias entre la estirpe VC228 y cada una de la demás según una prueba *t-Student*: Bristol N2 ( $P = 0.0109$ ), VC1416 ( $P = 0.0062$ ), CRR21 ( $P = 0.1531$ ). Las barras de error representa la desviación estándar de al menos tres experimentos independientes.

#### 4. Las estirpes deficientes en neurexina y neuroliquina presentan el fenómeno de habituación a estímulos mecanosensoriales anticipadamente.

*C. elegans* es sensible al tacto y tiene la capacidad de cambiar de dirección del movimiento cuando recibe un estímulo táctil en la parte anterior o posterior del cuerpo. En este nematodo fue el primer organismo en el que se obtuvieron mutantes insensibles al contacto mecánico (Chalfie and Sulston 1981). La respuesta mecanosensorial es de gran complejidad e intervienen una serie de neuronas capaces de detectar los estímulos (AVM, ALML/R, PVM, PLML/R), que se transmiten por una serie de interneuronas (PVC, AVB, AVD y AVA) a

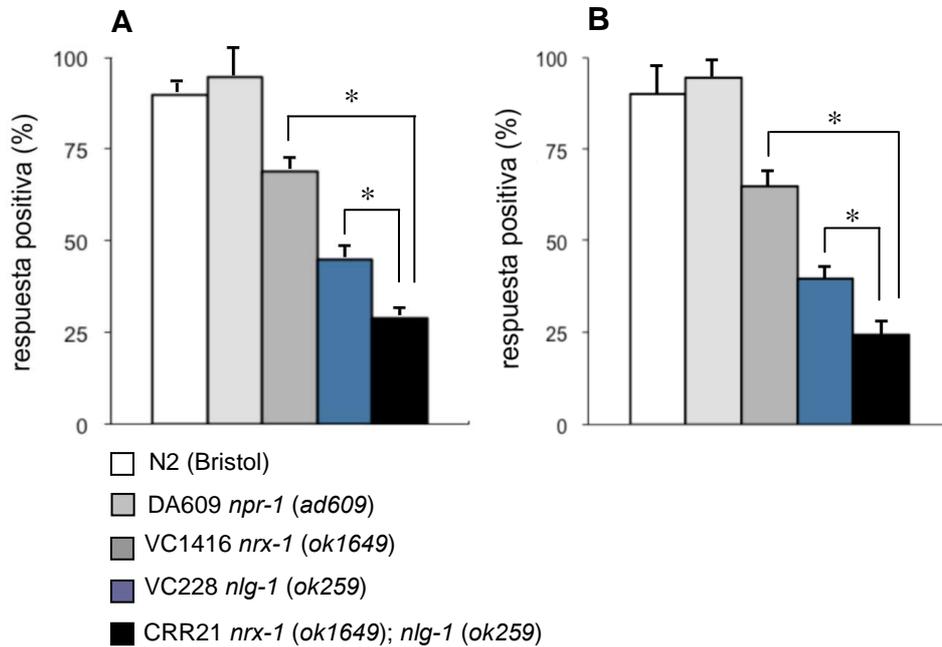
neuronas motoras (DD, VD, DB, VB, DA y VA) que finalmente activan a las células musculares que son las responsables últimas del movimiento (Hart 2006). Los estímulos mecanosensoriales anterior y posterior inducen el movimiento hacia atrás y hacia delante respectivamente. Las neuronas ALML/R y AVM son las responsables de la detección de los estímulos en la parte anterior del cuerpo, mientras que las PLML/R de la parte posterior (Figura 12). ALM y AVM presentan receptores dendríticos sensoriales a lo largo de la porción delantera del nematodo, de la misma forma las neuronas PLM tienen receptores dendríticos en la trasera. Se ha demostrado que cuando estas neuronas se eliminan por ablación láser los nematodos pierden la sensibilidad en la parte anterior o posterior del cuerpo.



**Figura 12.** Localización esquemática de las seis neuronas mecanosensoriales ALML, ALMR, AVM, PLML, PLMR y PVM. Estas neuronas detectan el estímulo y los impulsos nerviosos llegan a las células musculares que son las responsables del movimiento. Las flechas indican la posición donde se palpan a los nematodos con un pelo de ceja acoplado a una pipeta Pasteur para analizar su respuesta mecanosensorial. Esquema adaptado (Hart 2006).

La Figura 13 (ver página siguiente) muestra los resultados obtenidos al analizar la respuesta mecano-sensorial de la parte anterior y posterior del cuerpo de los mutantes *nrx-1 (ok1649)*, *nlg-1 (ok259)* y *nrx1(ok1649);nlg-1(ok259)*. Se puede observar que los mutantes neuroliquina y neurexina pierden capacidad de respuesta mecanosensorial, tanto en la parte anterior como posterior del cuerpo con respecto a la estirpe silvestre. Puesto que la conexión entre las neuronas que intervienen en esta respuesta es fundamental para que se produzca la respuesta del nematodo al tacto, el hecho de que la deficiencia en las proteínas neurexina y neuroliquina disminuya la capacidad de respuesta al tacto en *C. elegans* indica que ambas proteínas pueden actuar alterando el correcto mecanismo sináptico en estas redes neuronales, aunque desconocemos en cuantas conexiones influye. El mutante *nlg-1 (ok259)* responde con menor eficiencia que *nrx-1 (ok1649)*. Existe sinergia entre ambas mutaciones porque el doble mutante *nrx1(ok1649);nlg-1(ok259)* es el que presenta menor sensibilidad al tacto. Estos resultados también muestran que aunque existe una eficiencia en la respuesta mecanosensorial disminuida en dichos mutantes, ésta no es anulada. El hecho de que en los mutantes no se observe además ningún movimiento anómalo o fenotipo “*shrinker*” (acortamiento por contracción muscular), que se produce cuando se interrumpe la neurotransmisión de las motoneuronas GABAérgicas

inhibitorias DD y VD (McIntire, Jorgensen et al. 1993), indica que la conexión sináptica es funcional.

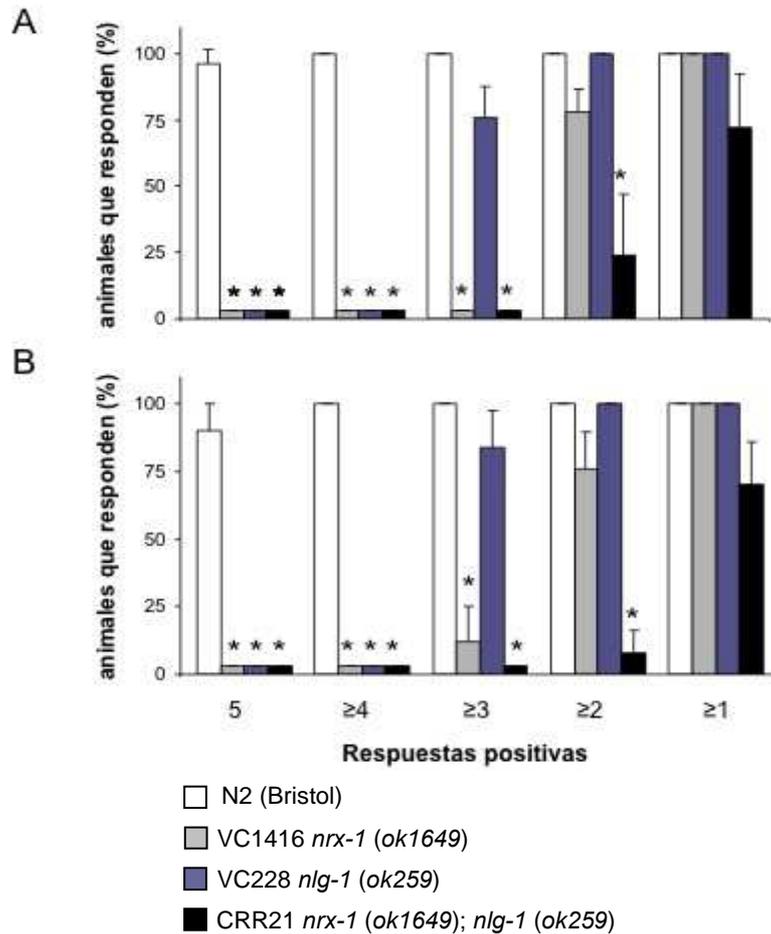


**Figura 13. Cuantificación de la respuesta al contacto mecánico de la parte anterior (A) y posterior (B) del cuerpo del nematodo en mutantes *nrx-1 (ok1649)*, *nlg-1 (ok259)* y *nrx1(ok1649);nlg-1(ok259)* en comparación con la estirpe silvestre y otra estirpe mutante con fenotipo social *npr-1(ad609)* utilizadas como control. 20 animales de cada estirpe fueron analizados con 10 estímulos mecánicos, alternativamente 5 en la parte anterior y otros 5 en la posterior. El \* indica diferencia significativa ( $P \leq 0.001$ ). Las diferencias entre la estirpe Bristol N2 y todas las demás, así como entre las estirpes VC228 y VC1416 fueron significativas ( $P \leq 0.001$ ). Las barras de error representa la desviación estándar de al menos tres experimentos independientes.**

Es interesante destacar aquí el término de habituación que se refiere al acostumbramiento a los estímulos. Los procesos de habituación se dan en todas las especies y consiste en un descenso de la respuesta ante un estímulo moderado y repetitivo. Es conocido hace tiempo que *C. elegans* presenta habituación, ya que un estímulo mecanosensorial como un toque ligero con un pelo de ceja en la parte anterior o posterior del cuerpo, hace al nematodo retroceder o iniciar la marcha hacia adelante respectivamente, y cuando se produce el estímulo repetidas veces deja de hacer efecto (Chalfie and Sulston 1981). Los resultados obtenidos con los mutantes *nrx-1 (ok1649)*, *nlg-1 (ok259)* y *nrx1(ok1649);nlg-1(ok259)* muestran el fenómeno de habituación antes que el tipo silvestre (Figura 14). El doble mutante es el que presenta el efecto de habituación más acusado, a continuación el mutante *nlg-1 (ok259)* y por último el *nrx1(ok1649)*.

Se ha observado que la dopamina afecta a la habituación. Las neuronas ALM y PML expresan el receptor dopaminérgico *dop-1* y se ha demostrado que los mutantes deficientes en este receptor muestran una habituación más rápida a un estímulo mecano-sensorial (Sanyal, Wintle et al. 2004). Recordemos que la ruta dopaminérgica no es funcional en los mutantes *nrx1(ok1649)* y *nlg-1 (ok259)* (ver apartado 3.2) y por tanto los resultados obtenidos en los que

se demuestra una habituación más rápida podría estar relacionada con este neurotransmisor, es posible que en relación a la liberación del mismo en la membrana presináptica (*nrx1(ok1649)*) como a los receptores de la membrana postsináptica (*nlg-1(ok259)*).



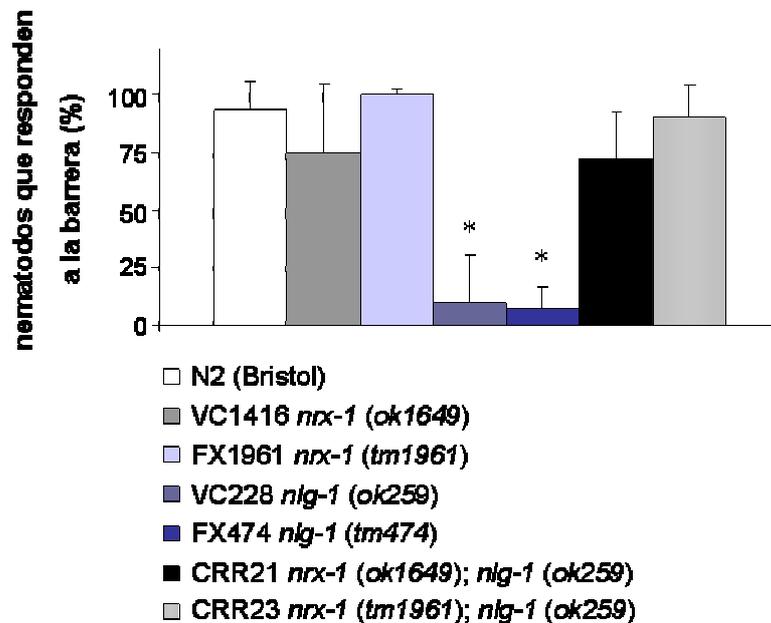
**Figura 14. Análisis de la respuesta de habituación de los mutantes *nrx-1(ok1649)*, *nlg-1(ok259)* y *nrx1(ok1649);nlg-1(ok259)*.** Se cuantificó la respuesta de habituación a un estímulo mecanosensorial, tanto en la parte anterior como posterior de los nematodos. El \* indica una diferencia significativa con la estirpe silvestre ( $P \leq 0.001$ ).

### 5. Las estirpes deficientes en neuroliquina son defectivas en la detección de estrés osmótico, capacidad que recuperan en ausencia de neurexina.

La percepción sensorial de *C. elegans* le permite reconocer el ambiente exterior y detectar estímulos químicos gracias a neuronas presentes en la parte anterior de su cuerpo. La cabeza del nematodo contiene un órgano sensorial denominado “*amphid*”, capaz de responder a diferentes estímulos externos entre los que se incluye los cambios de osmolaridad. Este órgano está compuesto por 12 neuronas bipolares con dendritas ciliares y un axón terminal presináptico (Ward, Thomson et al. 1975). Dos de estas neuronas denominadas ASHR and ASHL son indispensables para detectar repelentes solubles en agua con alta fuerza osmótica (Bargmann,

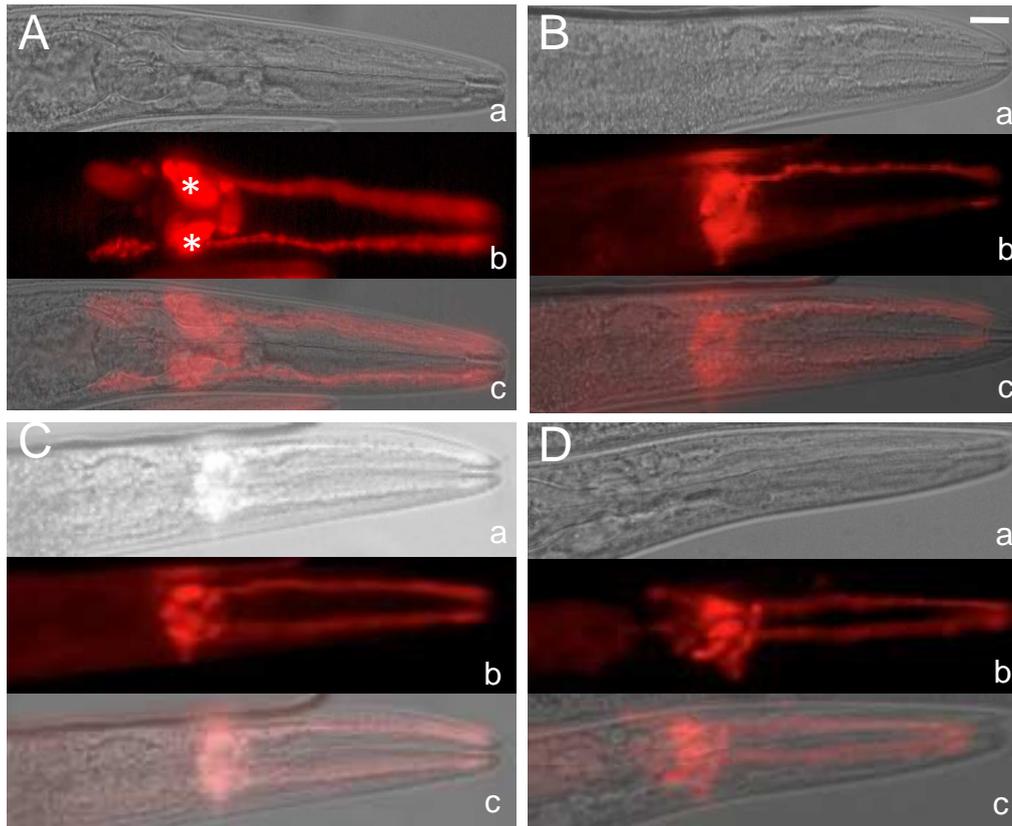
Thomas et al. 1990). Las dendritas de estas dos neuronas se alargan hasta el ápice de la boca y los axones se extienden hasta el anillo nervioso, donde conectan con otras neuronas determinando la respuesta, consistente normalmente en huir del repelente (White, E. et al. 1986).

Como podemos observar en la Figura 15, los mutantes deficientes en *nlg-1* (*ok259* y *tm474*) disminuyen significativamente la sensibilidad a la respuesta frente a una solución de fructosa 4M con respecto a la estirpe silvestre, ya que solo responden a la barrera osmótica aproximadamente un 10% de los casos. Los mutantes *nrx-1* (*ok1649* y *tm1961*) no se ven afectados e inesperadamente los dobles mutantes *nrx1(ok1649);nlg-1(ok259)* también tienen un comportamiento similar al de la estirpe silvestre, ya que responden a la barrera osmótica en un 80% de los casos



**Figura 15. Respuesta al estrés osmótico de mutantes en los genes *nrx-1*, *nlg-1* dobles mutantes *nrx-1*; *nlg-1*.** Se observa como tanto la estirpe silvestre como los mutantes deficientes en el gen *nrx-1* (*ok1649* y *tm1961*) V responden dirigiendo su movimiento hacia atrás cuando detectan la barrera osmótica impuesta (fructosa 4M). Los mutantes *nlg-1* (*ok259* y *tm474*) X presentan defectos en detectar la barrera. Las estirpes dobles mutantes CRR21 y CRR23 recuperan el fenotipo silvestre. El \* indica una diferencia significativa con la estirpe silvestre ( $P \leq 0.001$ ).

La estructura de las dendritas de las neuronas de las neuronas “*amphid*” pueden visualizarse “*in vivo*” con el microscopio óptico utilizando el marcador DiI: 1,1',di-octadecyl-3,3,3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate. Este compuesto tiñe con alta especificidad la membrana plasmática por ser altamente lipofílico. Como se observa en la Figura 16 no se apreció un cambio estructural de las dendritas de estas neurona al microscopio óptico en las diferentes estirpes mutantes *nrx-1* (*ok1649*) y *nlg-1* (*ok259*) y *nrx1(ok1649);nlg-1(ok259)* con respecto a la estirpe silvestre.

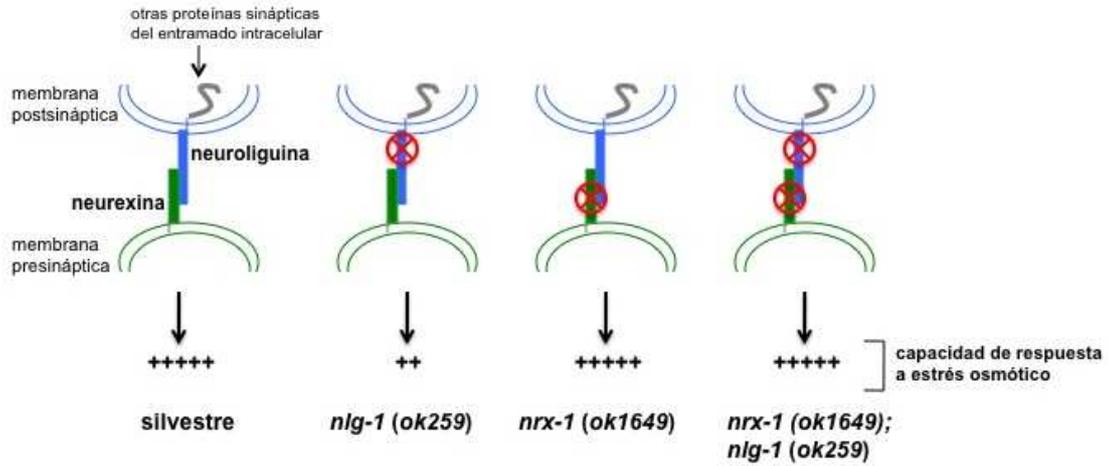


**Figura 16. Tinción con DiI de las neuronas sensoriales ASHR y ASHL.** Se muestran los cuerpos neuronales de las neuronas “*amphid*” sensoriales y sus dendritas en la estirpe silvestre Bristol N2 (A), VC1416 *nrx-1 (ok1649)* (B), VC228 *nlg-1 (ok259)* (C) y CRR21 *nrx-1 (ok1649); nlg-1 (ok259)* (D). **a**, imagen de óptica Nomarski; **b**, imagen de epifluorescencia; **c**, solapamiento de a y b. Las \* indican la localización aproximada de los cuerpos neuronales de ASHR y ASHL. Las imágenes fueron adquiridas con un aumento de 40x. La barra de escala equivale a 10  $\mu$ m.

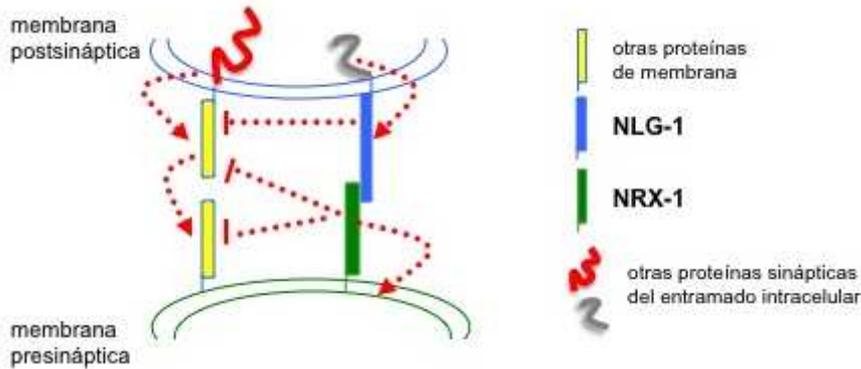
La explicación de que los mutantes deficientes en neuroliquina pierdan la capacidad de detectar una solución de alta osmolaridad y que recuperen dicha capacidad al estar presente otra mutación que la haga deficiente en neurexina (Figura 17A) no es obvia, pero una posibilidad es que la neuroliquina y neurexina actúen como activadores e inhibidores de la función sináptica a distintos niveles. Según el modelo propuesto en la Figura 17B, las neuroliquinas interaccionarían con las neurexinas de la membrana presináptica, permitiendo detectar la señal que activaría la respuesta al estrés osmótico. Su deficiencia originaría un fallo en dicho comportamiento. A su vez actuaría como inhibidoras de otras proteínas sinápticas. Por otro lado la proteína neurexina estaría inhibiendo a otras proteínas sinápticas, inactivando otras rutas que también actuarían en la función sináptica de membrana. Su ausencia, permitiría activar esas rutas, que junto con otras proteínas de adhesión permitiría una correcta detección de la señal ante la barrera osmótica. En el doble mutante *nrx-1; nlg-1*, la neuroliquina no podría llevar a cabo su actividad, y al estar ausente neurexina esta no podría ejercer su actividad inhibidora de la actividad sináptica, sobre otras proteínas, reestableciéndose la respuesta al estrés osmótico por otra vía. Estos resultados por tanto apuntan a la idea que tanto las neurexinas como

neuroliquinas actuarían como moduladores (activadores e inhibidores) de la actividad sináptica en un complejo mecanismo de interacción con otras proteínas.

**A**



**B**

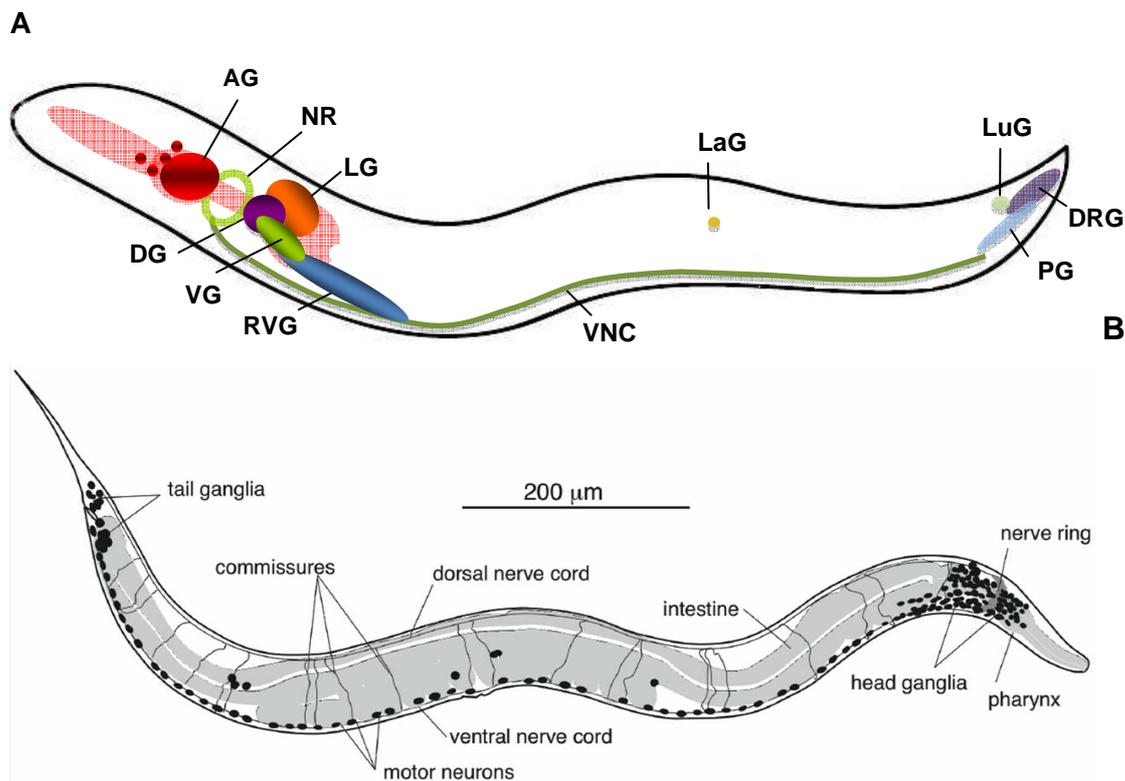


**Figura 17. Esquema representativo de las respuestas ante el estrés osmótico A**, esquema representativo de las respuestas ante el estrés osmótico observadas en los mutantes *nrx-1*, *nlg-1*, y dobles mutantes *nrx-1; nlg-1* con respecto a la estirpe silvestre. **B**, modelo esquemático de la actividad moduladora de las proteínas neurexina y neuroliquina en la sinapsis. La proteínas neurexina y neuroliquina tendría capacidad de activar la función sináptica al mismo tiempo que inhiben otras rutas activadoras de dicha función.

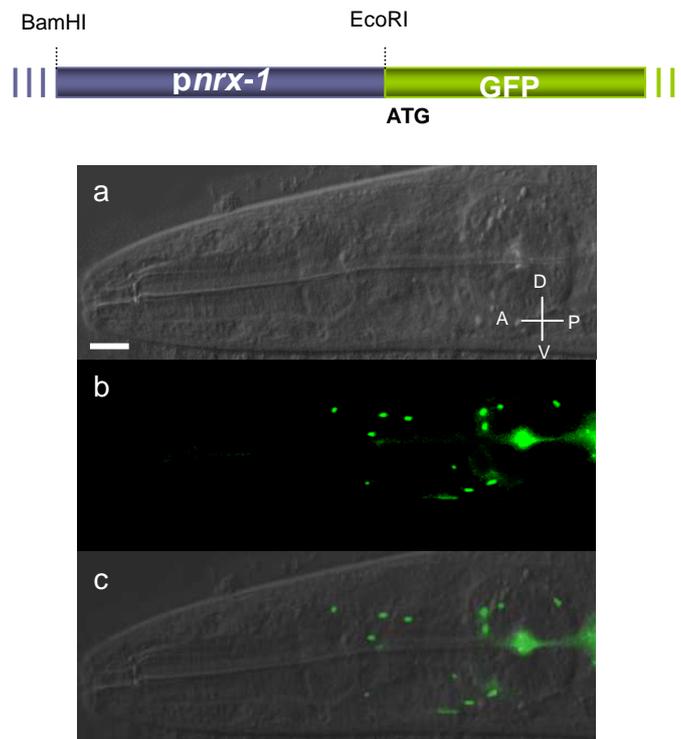
## IV. Estudio de la expresión de los genes neurexina y neuroligina en *C. elegans*.

### 1. Expresión de los genes *nrx-1* y *nlg-1* de *C. elegans* en las neuronas de los ganglios de la cabeza.

En el sistema nervioso de *C. elegans* existen al menos ocho agrupaciones de neuronas denominadas ganglios (Figura 1). Los ganglios con más cuerpos neuronales están situados en la cabeza, distinguiéndose entre ellos el ganglio anterior (AG), el dorsal (DG), el lateral (LG) y el ventral (VG). Entre el ganglio anterior, y el lateral y dorsal se localiza el anillo nervioso (NR), un conjunto de fibras nerviosas procedentes principalmente de las neuronas del cordón nervioso, y que rodean totalmente a la faringe, a nivel del *isthmus*. En la parte posterior de la faringe y debajo del bulbo terminal, y extendiéndose hacia el comienzo del intestino se sitúa el ganglio retroventricular (RVG) que se comunica con el cordón nervioso ventral. Otros tres ganglios se localizan en la cola del nematodo: preanal (PG), dorso-rectal (DRG) y lumbar (LuG). A lo largo de la línea lateral del nematodo se localizan algunas neuronas y un pequeño grupo de cuerpos neuronales que constituye el ganglio lateral (LaG).

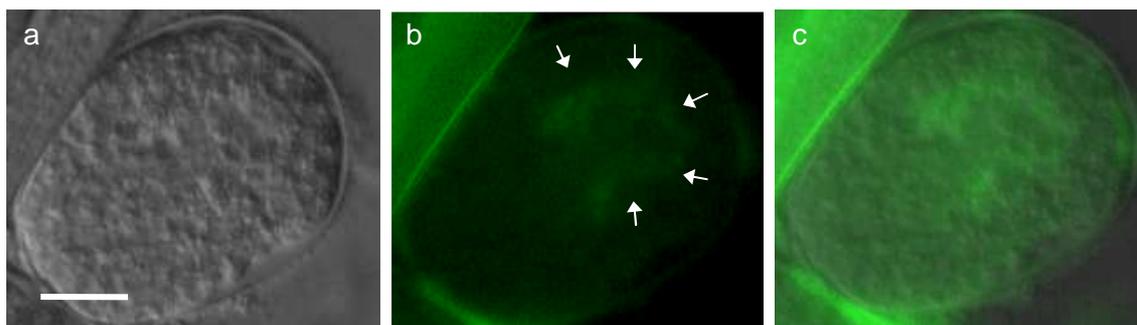


Para analizar los patrones de expresión de los genes neurexina y neuroligina, se realizaron construcciones transcripcionales donde se fusionaron los promotores de los genes *nrx-1* y *nlg-1* de *C. elegans* con la proteína verde fluorescente (GFP) o con la proteína Cherry (*mCherry*). En todos los casos, el estudio de la expresión génica se llevó a cabo en animales transgénicos en el estadio larvario L4.



**Figura 2. Expresión del gen *nrx-1* en neuronas de los ganglios de la cabeza a nivel de la faringe.** Para el análisis de la expresión se utilizó la estirpe transgénica GE24 *pha-1* (*e2123*) III; [pC1 (*pha-1*+); *nrx-1::gfp*], obtenida en esta tesis. En la parte superior del panel se representa un esquema de la construcción transcripcional utilizada en la obtención de la estirpe transgénica. Los patrones de expresión observados en las diferentes líneas transgénicas independientes fueron los mismos. **a**, imagen de óptica Nomarski; **b**, imagen de epifluorescencia; **c**, solapamiento de **a** y **b**. Las imágenes fueron adquiridas con un aumento de 40x. El eje de coordenadas indican las posiciones anterior (A), posterior (P), ventral (V) y dorsal (D) del nematodo. La barra de escala equivale a 10  $\mu$ m.

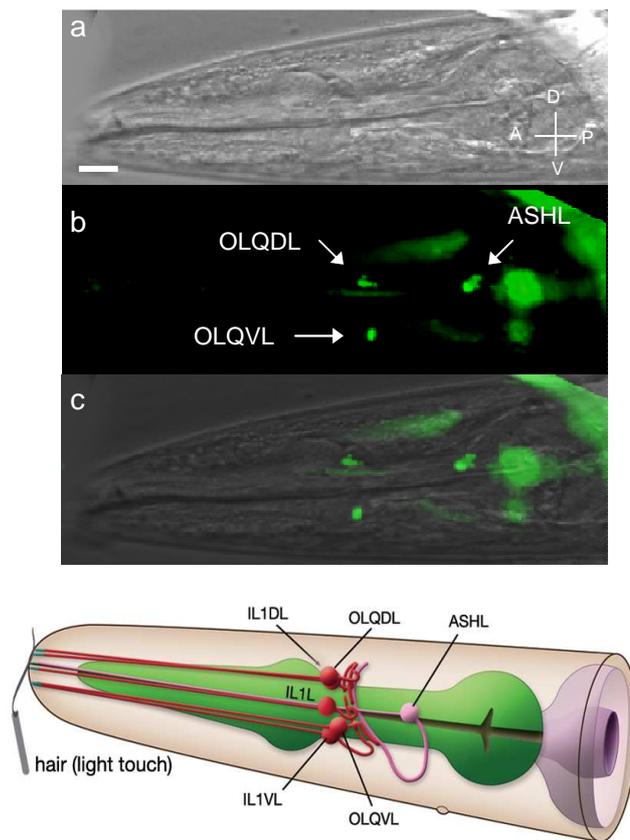
Se observó la expresión del gen *nrx-1* en neuronas de los ganglios de la cabeza de *C. elegans* en todos los estadios larvarios y en el estadio adulto en animales hermafroditas (Figura 2). En los embriones tempranos se observó una débil fluorescencia entre sus células (Figura 3). Se observaron alrededor de unas 15 neuronas distribuidas entre los cinco ganglios de la cabeza. Estas neuronas se podrían corresponder con neuronas sensoriales responsables de circuitos neuronales implicados en algunos comportamientos analizados en los mutantes *nrx-1* de *C. elegans*. Entre las neuronas localizadas en estos ganglios, se encuentran neuronas sensoriales que son responsables de la respuesta osmótica, de la respuesta al tacto suave o brusco, o la respuesta a cambios de textura.



**Figura 3 . Localización de la expresión del gen *nrx-1* en embriones tempranos de la estirpe transgénica GE24 *pha-1* (*e2123*) III; [pC1 (*pha-1*+); *nrx-1::gfp*].** La fluorescencia observada fue mantenida en las diferentes líneas transgénicas independientes. Las flechas indican la silueta de la fluorescencia de las células del embrión. **a**, imagen de óptica Nomarski; **b**, imagen de epifluorescencia; **c**, solapamiento de a y b. Las barras de escala equivalen a  $\mu\text{m}$ . Las imágenes fueron adquiridas con un aumento de 63x.

Las neuronas ASH, OLQ y FLP están implicadas en la respuesta del nematodo al toque en la cabeza o en la parte más anterior del nematodo (“*head-on nose touch*”). Concretamente las neuronas IL1 y OLQ (Figura 4, esquema inferior) intervienen en la respuesta al toque suave en el lado ventral y dorsal de la parte más anterior del cuerpo. Formando parte de los ganglios de la cabeza también se encuentran hasta 12 neuronas bipolares que se denominan neuronas “*amphid*”, presentando dendritas ciliadas y un axón terminal presináptico, y que son encargadas de responder a diferentes estímulos incluyendo el estrés osmótico (Ward, Thomson et al. 1975). Dos de estas neuronas, denominadas ASHR y ASHL son particularmente importantes en la función sensorial osmótica, detectando repelentes solubles en agua capaces de generar un alto estrés osmótico (Bargmann, Thomas et al. 1990). Las dendritas de estas dos neuronas se dirigen hasta la punta de la parte más anterior del nematodo y los axones se extienden hasta el anillo nervioso, donde realizan conexiones sinápticas con otras neuronas para generar una respuesta concreta (White, E. et al. 1986).

La identificación de algunas de estas neuronas concretas descritas no se realizó, puesto que no se usaron marcadores específicos de neuronas en las construcciones transcripcionales utilizadas. No obstante posicionalmente se pudieron identificar las neuronas ASH y OLQ. La expresión de la construcción transcripcional *pnrx-1::gfp* en ambas neuronas estaba mantenida en líneas transgénicas independientes (Figura 4).

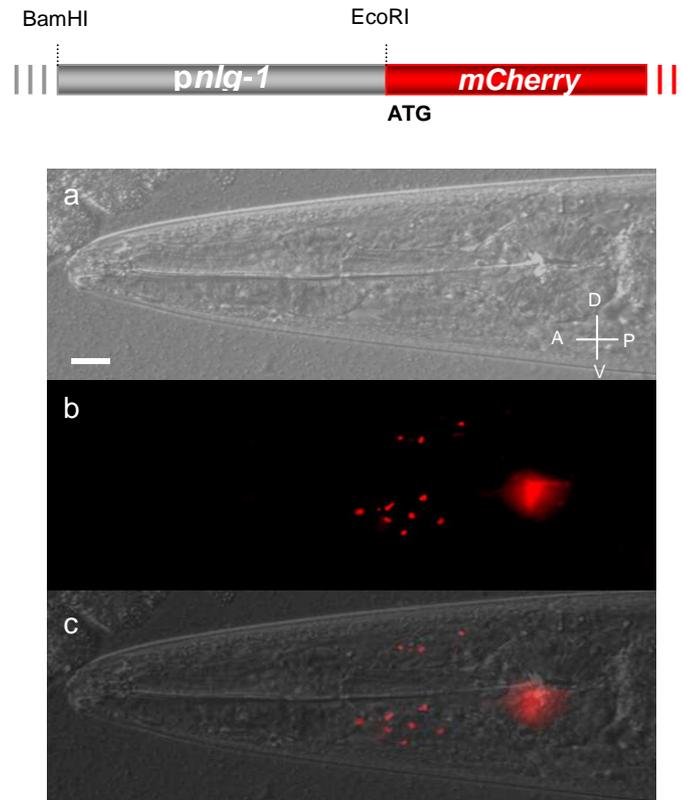


**Figura 4. Expresión del gen *nrx-1* en las neuronas OLQ y ASH en los ganglios de la cabeza en la estirpe transgénica GE24 *pha-1 (e2123) III*; [pC1 (*pha-1+*); *nrx-1::gfp*].** En la parte inferior se muestra un esquema representativo de la localización de las neuronas OLQ, ASH y IL1, implicadas en la respuesta mecanosensorial del nematodo (wormbook, referencia). La expresión en estas neuronas fue observada en las diferentes líneas transgénicas independientes. **a**, imagen de óptica Nomarski; **b**, imagen de epifluorescencia indicando con flechas la localización de las neuronas sensoriales OLQDL, OLQVL y ASHL; **c**, solapamiento de a y b. Las imágenes fueron adquiridas con un aumento de 40x. El eje de coordenadas indican las posiciones anterior (A), posterior (P), ventral (V) y dorsal (D) del nematodo. La barra de escala equivale a 10  $\mu\text{m}$ .

Según un reciente trabajo (Haklai-Topper, Soutschek et al. 2010) la expresión del gen *nrx-1* de *C. elegans* se localiza exclusivamente casi en la totalidad de todas las células del sistema nervioso del nematodo durante todos los estadios larvarios y el estadio adulto, y concretamente en las especializaciones presinápticas. Se observó la presencia de neurexina en neuronas de los ganglios de la cabeza y en los axones que conforman el anillo nervioso, en motoneuronas del cordón nervioso ventral, interneuronas en el cordón nervioso dorsal y sus comisuras, la neurona ALM, y en neuronas de los ganglios de la cola. No se observa expresión en células de la glia.

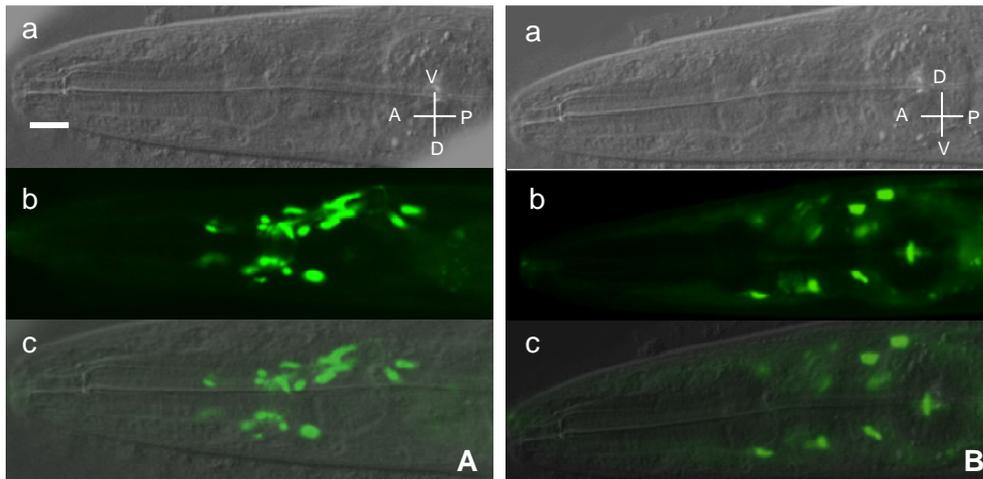
De los resultados obtenidos hasta la fecha no se puede excluir que las neurexinas se localicen también en los terminales postsinápticos de las neuronas de *C. elegans* como ocurre con la neuroligina. De hecho, en embriones de *Drosophila melanogaster* se ha identificado la neurexina pre y postsinápticamente (Chen, Gracheva et al. 2010).

En la estirpe transgénica expresando la construcción transcripcional *pnlg-1::mCherry*, se localizaron entre 10-15 neuronas de los ganglios de la cabeza, al igual que en el caso de la construcción *pnrx-1::gfp* (Figura 5).



**Figura 5. Expresión del gen *nlg-1* en neuronas de los ganglios de la cabeza a nivel de la faringe.** Para el análisis de la expresión se utilizó la estirpe transgénica GE24 *pha-1 (e2123)* III; [pC1 (*pha-1+*); *nlg-1::mCherry*], construida en esta tesis. En la parte superior del panel se representa un esquema de la construcción transcripcional utilizada en la obtención de la estirpe transgénica. Los patrones de expresión observados en las diferentes líneas transgénicas independientes fueron los mismos. **a**, imagen de óptica Nomarski; **b**, imagen de epifluorescencia; **c**, solapamiento de a y b. Las imágenes fueron adquiridas con un aumento de 40x. El eje de coordenadas indican las posiciones anterior (A), posterior (P), ventral (V) y dorsal (D) del nematodo. La barra de escala equivale a 10  $\mu$ m.

Los resultados de expresión obtenidos con la estirpe transgénica GE24 *pha-1 (e2123)* III; [pC1 (*pha-1+*); *nlg-1::mCherry*] construida en esta tesis, fueron corroborados con dos estirpes transgénicas expresando una construcción transcripcional *pnlg-1::gfp* tanto integrada como no integrada en el genoma del nematodo obtenidas del CGC (“*Caenorhabditis Genome Center*”). Ambas estirpes mostraron un patrón similar de expresión localizado en neuronas de los ganglios de la cabeza (Figura 6).



**Figura 6. Imágenes de epifluorescencia correspondientes al análisis de expresión del gen *nlg-1* en las estirpes BC13247 (*sEx13247*) (construcción transcripcional no integrada) (A), y BC13535 (*sIs13247*) (construcción transcripcional integrada) (B).** La construcción transcripcional usada para generar estas estirpe fue *nlg-1::gfp*. En ambas imágenes se muestran neuronas de los ganglios de la cabeza a nivel de la faringe. **a**, imagen de óptica Nomarski; **b**, imagen de epifluorescencia; **c**, solapamiento de a y b. Las imágenes fueron adquiridas con un aumento de 40x. El eje de coordenadas indican las posiciones anterior (A), posterior (P), ventral (V) y dorsal (D) del nematodo. La barra de escala equivale a 10  $\mu$ m.

Aparte de la localización de neuroligina en las motoneuronas DA y VA del cordón nervioso ventral de *C. elegans*, no existe hasta la fecha definido un patrón claro de expresión, asociado a una clase determinada de neuronas o a un circuito neuronal concreto.

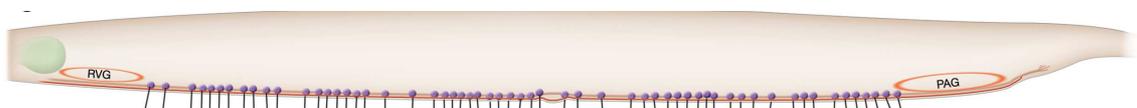
En un trabajo reciente (Hunter, Mullen et al. 2010) se observa que el gen *nlg-1* de *C. elegans* se localiza en la sinapsis neuronales, concretamente en los terminales postsinápticos de al menos 45 de las 302 neuronas de *C. elegans*; incluyendo aproximadamente unas 20 neuronas del cordón nervioso ventral y aproximadamente 20 neuronas en los ganglios de la cabeza. En el cordón nervioso ventral la expresión de neuroligina se identificó en las motoneuronas colinérgicas VA y DA, en dos AIY y dos URB interneuronas colinérgicas, en cuatro motoneuronas URA situadas en los ganglios de la cabeza, en dos PVD neuronas mecanosensoriales glutamatérgicas, y en dos HSN motoneuronas a lo largo del cuerpo. Además de en esta neuronas, se observó una débil expresión de neuroligina en células musculares de *C. elegans*, como ya se identificase previamente para la neuroligina 4 humana (Bolliger, Frei et al. 2001).

Otro estudio (Feinberg, Vanhoven et al. 2008) ha demostrado que la neuroligina se localiza tanto en regiones pre como postsinápticas de neuronas de *C. elegans*; mostrando que la expresión del gen *nlg-1* en la motoneurona DA9 se observa intensamente en su región postsináptica ventral y débilmente en su región presináptica dorsal. El significado de esta localización presináptica no está claro, aunque se ha observado que las neurexinas de roedores

se localizan tanto en zonas pre como postsinápticas (Taniguchi, Gollan et al. 2007); y esto también podría ocurrir con las neuroliquina

## 2. Expresión de los genes *nrx-1* y *nlg-1* de *C. elegans* en las neuronas del cordón nervioso.

A lo largo del cordón nervioso ventral de *C. elegans* se disponen las motoneuronas encargadas de inervar los músculos ventrales y dorsales, que gobiernan los movimientos corporales del nematodo. Los cuerpos neuronales de cada motoneurona se disponen ordenadamente desde el ganglio retrovesicular hasta el ganglio preanal (Figura 7). Entre las motoneuronas se pueden distinguir las VA, VB, VC y VD las cuales inervan a los músculos del lado ventral del nematodo; y las motoneuronas DA, DB y DD que inervan músculos del lado dorsal del nematodo enviando comisuras hacia este lado (se denominan comisuras a las finas prolongaciones de una neurona para contactar con otras en el lado opuesto de las primeras). Estas neuronas se clasifican en dos categorías: motoneuronas de tipo D (VD y DD) que son GABAérgicas (secretando el neurotransmisor ácido gamma-aminobutírico), inhibitorias y estrictamente postsinápticas con otras motoneuronas; y motoneuronas de tipo A y B (VA, VB, DA y DB) colinérgicas (secretan el neurotransmisor acetilcolina), y por lo tanto son excitatorias.



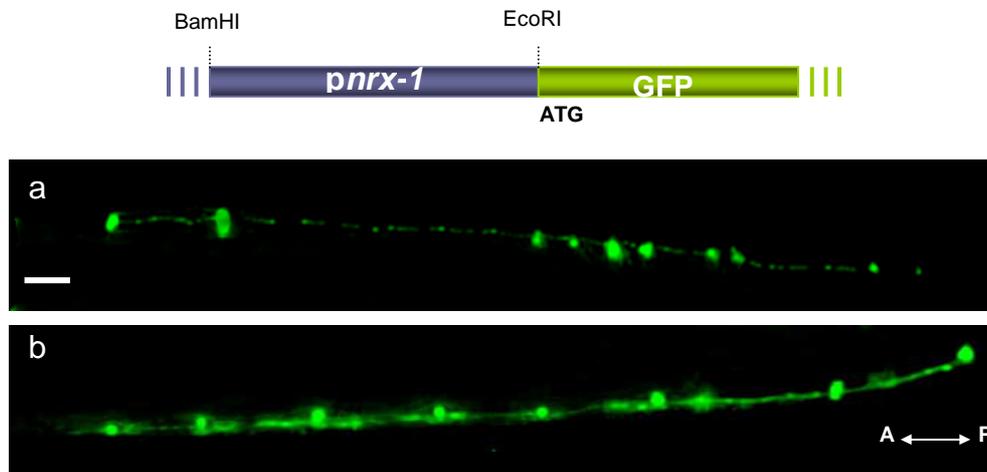
**Figura 7. Representación esquemática de las posiciones de las motoneuronas entre el ganglio retrovesicular (RVG) y el ganglio preanal (PAG) a lo largo del cordón nervioso ventral. Cada punto azul representa una motoneurona concreta. Adaptado de wormatlas (referencia).**

Las motoneuronas de tipo A son encargadas de los movimientos de locomoción hacia atrás (“*backward locomotion*”), mientras que las motoneuronas de tipo B son encargadas del control de los movimientos de locomoción hacia delante (“*forward locomotion*”). Las motoneuronas de tipo D reciben sinapsis de las motoneuronas A y B y actúan como inhibidor cruzado de los músculos corporales, interviniendo tanto en la locomoción hacia delante y hacia atrás.

En el lado dorsal del nematodo, las motoneuronas VDs son exclusivamente postsinápticas y reciben impulsos de las motoneuronas DA, DB y AS participando en las uniones neuromusculares; mientras que en el lado ventral las motoneuronas VDs son presinápticas con los músculos de la pared corporal. Las motoneuronas DDs son exclusivamente postsinápticas sobre el lado ventral del nematodo, donde reciben impulsos de las neuronas VA, VB y VC participando en las uniones neuromusculares; mientras que son predominantemente presinápticas con los músculos de la pared corporal en el lado dorsal. Las zonas sinápticas de las

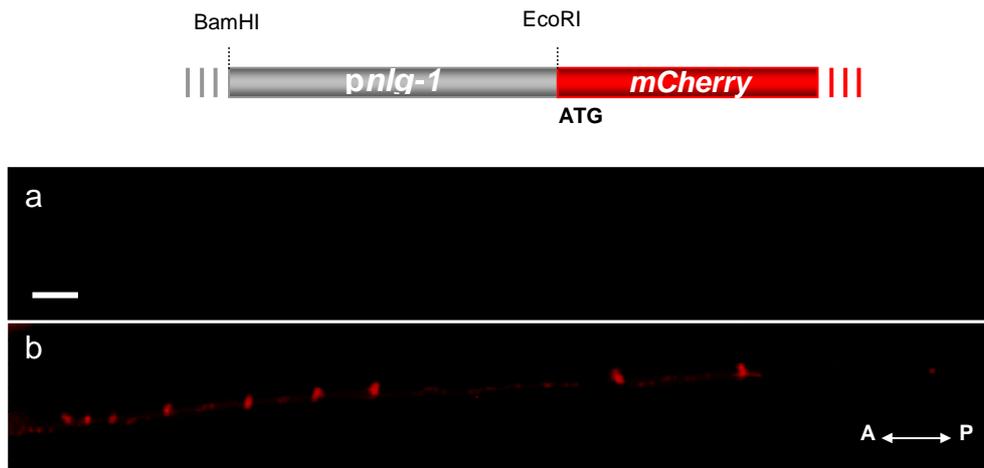
neuronas de cada una de las clases no están solapadas, creando un mapa claramente definido de la actividad neuromuscular de cada clase (White, E. et al. 1986). Las motoneuronas VCs son una excepción, ya que las zonas activas de las neuronas de las diferentes clases se solapan; sin embargo, las regiones de transición entre cada neurona de la misma clase generalmente no son las mismas (White, E. et al. 1986; Von Stetina, Treinin et al. 2006).

Para estudiar la expresión de los genes *nrx-1* y *nlg-1* de *C. elegans* en el cordón nervioso, se utilizaron las mismas construcciones transcripcionales usadas en el análisis de las neuronas de los ganglios de la cabeza. Se observó la expresión del gen *nrx-1* en aproximadamente 15-20 neuronas del cordón nervioso ventral y en el cordón nervioso dorsal (Figura 8). En el cordón nervioso ventral la neurexina se encontró casi en la totalidad de las motoneuronas, incluyendo a las VAs y VDs.



**Figura 8. Expresión del gen *nrx-1* en neuronas del cordón nervioso dorsal (a) y ventral (b).** Para el análisis de la expresión se utilizó la estirpe transgénica GE24 *pha-1* (*e2123*) III; [pC1 (*pha-1*+); *nrx-1*::*gfp*]. En la parte superior del panel se representa un esquema de la construcción transcripcional utilizada en la obtención de la estirpe transgénica. Los patrones de expresión observados en las diferentes líneas transgénicas independientes fueron los mismos. Se muestra una porción del cordón nervioso ventral y dorsal. Las imágenes fueron adquiridas con un aumento de 40x. El eje de coordenadas indica las posiciones anterior (A) y posterior (P) del nematodo. La barra de escala equivale a 15  $\mu$ m.

La expresión del gen *nlg-1* se localizó en aproximadamente 15-20 neuronas del cordón nervioso ventral. No se observó señal de fluorescencia en el cordón nervioso dorsal (Figura 9). Al igual que con la neurexina, la neuroliquina se encontraba casi en la totalidad de las motoneuronas del cordón nervioso ventral.



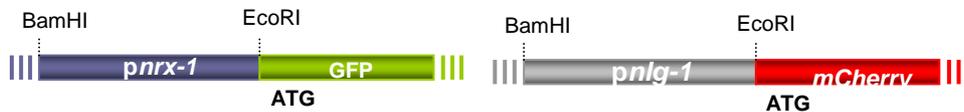
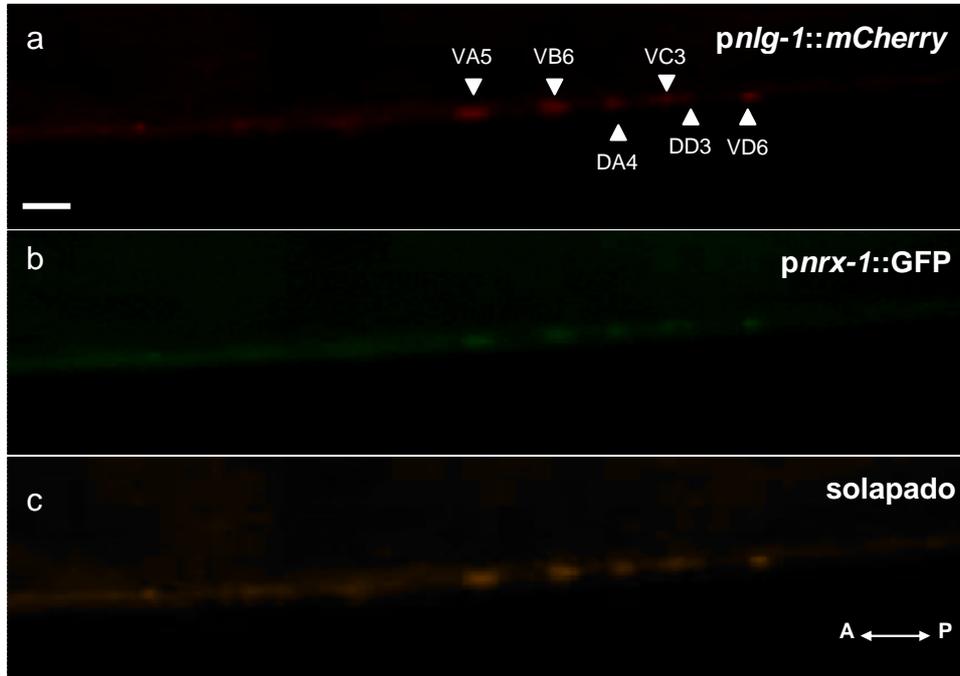
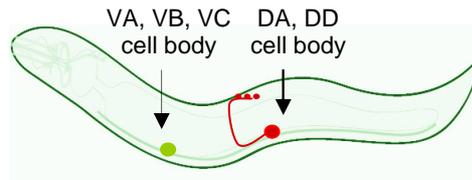
**Figura 9. Expresión del gen *nlg-1* en neuronas del cordón nervioso ventral (b).** No se observó expresión en el cordón nervioso dorsal (a). Para el análisis de la expresión se utilizó la estirpe transgénica GE24 *pha-1 (e2123)* III; [pC1 (*pha-1+*); *nlg-1::mCherry*]. En la parte superior del panel se representa un esquema de la construcción transcripcional utilizada en la obtención de la estirpe transgénica. Los patrones de expresión observados en las diferentes líneas transgénicas independientes fueron los mismos. Se muestra una porción del cordón nervioso ventral y dorsal. Las imágenes fueron adquiridas con un aumento de 40x. El eje de coordenadas indica las posiciones anterior (A) y posterior (P) del nematodo. La barra de escala equivale a 15  $\mu$ m.

### 3. Coexpresión de los genes *nrx-1* y *nlg-1* de *C. elegans*.

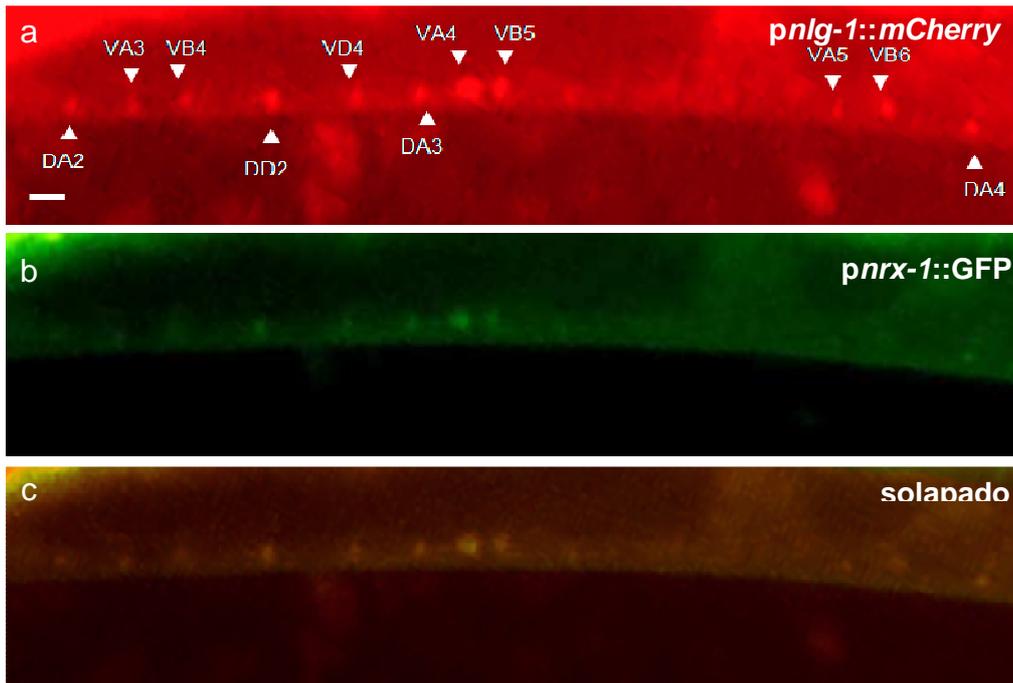
Para colocalizar la expresión de los genes *nrx-1* y *nlg-1* en el sistema nervioso de *C. elegans*, se generó la estirpe transgénica GE24 *pha-1 (e2123)* III; [pC1 (*pha-1+*); *nrx-1::gfp*; *nlg-1::mCherry*] mediante microinyección simultánea de las construcciones transcripcionales *nrx-1::gfp* y *nlg-1::mCherry*. Con la construcción de esta estirpe se pretendió estudiar la expresión diferencial de ambos genes en el nematodo.

Se identificó la expresión solapada de los genes *nrx-1* y *nlg-1* en las motoneuronas VA3, VA4, VA5, VB4, VB5, VB6, VC3, VD4, VD6, DA2, DA3, DA4, DD2 y DD3, del cordón nervioso ventral (Figura 10 y 11. Ambas imágenes corresponden a una línea transgénica representativa, mostrando diferentes porciones del cordón nervioso ventral). La identificación de estas neuronas se realizó mediante localización posicional de las mismas.

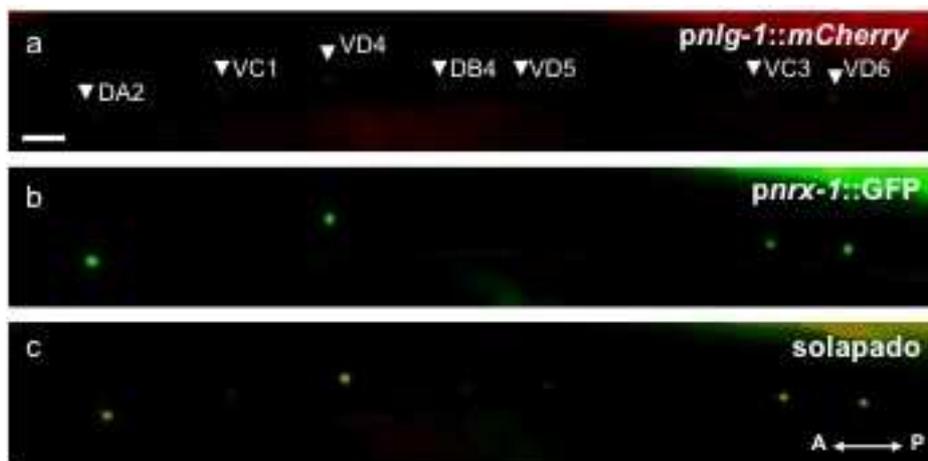
Mediante localización posicional se identificaron las motoneuronas DB4, VC1 y VD5, en el cordón nervioso ventral, las cuales expresaban diferencialmente neuroliquina (Figura 12). Las motoneuronas VDs (gabaérgicas) en el lado ventral son presinápticas, mientras que las motoneuronas DD son postsinápticas (Figura 10 y 11). Esto indica que la neuroliquina se localiza tanto pre como postsinápticamente, de acuerdo con lo ya descrito por Feinberg et al. (Feinberg, Vanhoven et al. 2008).



**Figura 10.** Coexpresión de los genes *nrx-1* y *nlg-1* en motoneuronas del cordón nervioso ventral. Se utilizaron las construcciones transcripcionales *pnrx-1::gfp* (b) y *pnlg-1::mCherry* (a) para ambos genes (esquema inferior). No se observó expresión en el cordón nervioso dorsal. Para el análisis de la expresión se utilizó la estirpe transgénica GE24 *pha-1* (*e2123*) III; [pC1 (*pha-1+*); *nrx-1::gfp*; *nlg-1::mCherry*]. Los patrones de expresión observados en las diferentes líneas transgénicas independientes fueron los mismos. Se muestra una porción del cordón nervioso ventral. Las puntas de flechas indican los cuerpos neuronales de las motoneuronas VA5, VB6, VC3, VD6, DA4, DD3. Esquema superior: localización de las motoneuronas VA, VB, VC que inervan los músculos ventrales, y las motoneuronas DA y DD, cuyos cuerpos neuronales se encuentran en el cordón nervioso e inervan los músculos del lado dorsal por envío de comisuras hacia ese lado. Las imágenes fueron adquiridas con un aumento de 40x. El eje de coordenadas indica las posiciones anterior (A) y posterior (P) del nematodo. La barra de escala equivale a 30  $\mu$ m.



**Figura 11.** Coexpresión de los genes *nrx-1* y *nlg-1* en motoneuronas del cordón nervioso ventral. No se observó expresión en el cordón nervioso dorsal. Para el análisis de la expresión se utilizó la estirpe transgénica GE24 *pha-1* (*e2123*) III; [pC1 (*pha-1+*); *nrx-1::gpf*; *nlg-1::mCherry*]. Se muestra una porción del cordón nervioso ventral. Las puntas de flechas indican los cuerpos neuronales de las motoneuronas VA3, VA4, VA5, VB4, VB5, VB6, VD4, DA2, DA3, DA4 y DD2. Las imágenes fueron adquiridas con un aumento de 40x. El eje de coordenadas indica las posiciones anterior (A) y posterior (P) del nematodo. La barra de escala equivale a 40  $\mu$ m.



**Figura 12.** Expresión diferencial de los genes *nrx-1* y *nlg-1* en neuronas del cordón nervioso ventral. Se utilizaron las construcciones transcripcionales *pnrx-1::gfp* (b) y *pnlg-1::mCherry* (a) para ambos genes. No se observó expresión en el cordón nervioso dorsal. Para el análisis de la expresión se utilizó la estirpe transgénica GE24 *pha-1* (*e2123*) III; [pC1 (*pha-1+*); *nrx-1::gpf*; *nlg-1::mCherry*]. Los patrones de expresión observados en las diferentes líneas transgénicas independientes fueron los mismos. Las puntas de flechas indican los cuerpos neuronales de las motoneuronas DA2, DB4, VC1, VC3, VD4, VD5 y VD6. Las imágenes fueron adquiridas con un aumento de 40x. El eje de coordenadas indica las posiciones anterior (A) y posterior (P) del nematodo. La barra de escala equivale a 15  $\mu$ m.

## V. Rescate funcional de un mutante de *C. elegans* deficiente en neuroliquina por isoformas de neuroliquinas humana y murina.

### 1. Estudio comparativo de las neuroliquinas humanas y rata con la que codifica el gen *nlg-1* de *C. elegans*.

Teniendo en cuenta la secuencia aminoacídica, las neuroliquinas se podrían considerar tanto miembros de la superfamilia de proteínas  $\alpha/\beta$ -hidrolasas, que incluyen a las colinesterasas, lipasas y carboxil esterases, como de las proteínas de adhesión celular como la neurotactina, glutactina y gliotactina (de la Escalera, Bockamp et al. 1990; Olson, Fessler et al. 1990; Auld, Fetter et al. 1995).

**Tabla 1.** Porcentaje de identidad/similaridad entre las proteínas NLGN1-4X humanas con las proteínas NLGN1-3 de rata. Se indican el porcentaje calculado usando la matriz *BLOSUM62* según el método de “*Pairwise alignment*” de cada uno de los dominios de la proteína: **A**, péptido señal; **B**, “*Acetylcholinesterase-like*”; **C**, transmembrana; **D**, intracelular.

<b>A</b>		<i>Homo Sapiens</i>			
		<b>NLGN1</b>	<b>NLGN2</b>	<b>NLGN3</b>	<b>NLGN4X</b>
<b>Rata</b>	<b>NLGN1</b>	84,11/91,45	8,33/15	12,87/21,23	11,65/28,32
	<b>NLGN2</b>	9,32/18,21	100/100	22,05/30,06	12,07/19,11
	<b>NLGN3</b>	10,02/25,13	22,03/30,43	86,11/89	16,01/22,34

<b>B</b>		<i>Homo Sapiens</i>			
		<b>NLGN1</b>	<b>NLGN2</b>	<b>NLGN3</b>	<b>NLGN4X</b>
<b>Rata</b>	<b>NLGN1</b>	96,23/96,23	65/77,1	70,12/80,65	72,35/81,03
	<b>NLGN2</b>	67,34/79,12	98/98	64/74,66	66,55/77,45
	<b>NLGN3</b>	69,43/78,33	64,21/74,13	99,11/99,11	73/83, 77

<b>C</b>		<i>Homo Sapiens</i>			
		<b>NLGN1</b>	<b>NLGN2</b>	<b>NLGN3</b>	<b>NLGN4X</b>
<b>Rata</b>	<b>NLGN1</b>	100/100	95,66/100	95,66/100	100/100
	<b>NLGN2</b>	95,66/100	100/100	90,08/100	95,66/100
	<b>NLGN3</b>	95,66/100	90,08/100	100/100	95,66/100

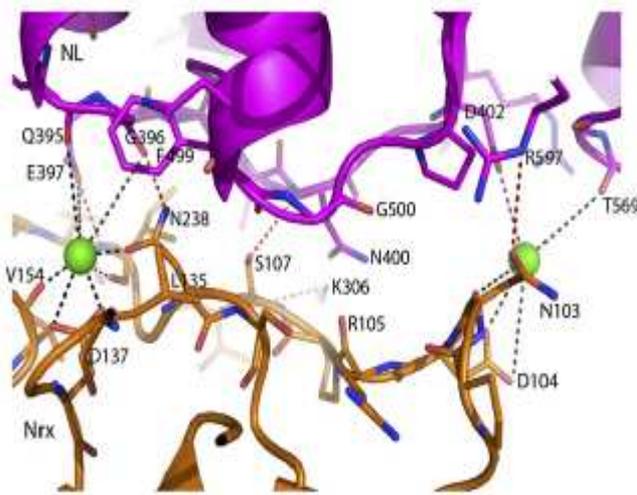
<b>D</b>		<i>Homo Sapiens</i>			
		<b>NLGN1</b>	<b>NLGN2</b>	<b>NLGN3</b>	<b>NLGN4X</b>
<b>Rata</b>	<b>NLGN1</b>	99,33/99,33	38,53/49,12	56,43/69,23	70,02/79,31
	<b>NLGN2</b>	38,53/49,12	99,33/99,33	35,13/48,08	35,21/47,66
	<b>NLGN3</b>	56,43/69,23	36/49,07	98,21/98,21	64,09/74,11

Los cinco genes de neuroliquina en mamíferos (*NLGN1-4* y *NLGN4Y*) codifican proteínas que presentan una alta identidad entre sí a nivel de la secuencia de aminoácidos, tanto en los dominios intracelular y transmembrana como en el extracelular (Arac, Boucard et al. 2007). Las diferentes neuroliquinas de mamíferos presentan más de un 70% de identidad en el extremo N-terminal que corresponde al dominio extracelular (“*acetylcholinesterase-like*”) (Fabrichny, Leone et al. 2007). El dominio “*acetylcholinesterase-like*” se une mediante una región O-

glicosilada a un dominio transmembrana, y éste al extremo C-terminal correspondiente a un dominio intracelular (Ichtchenko, Nguyen et al. 1996). Como se puede observar en la Tabla 1 las diferentes neuroliguinas están muy conservadas a nivel de aminoácidos entre humanos y rata. Los dominios más conservados son el transmembrana y el colinesterasa, y los que menos el intracelular y el péptido señal.

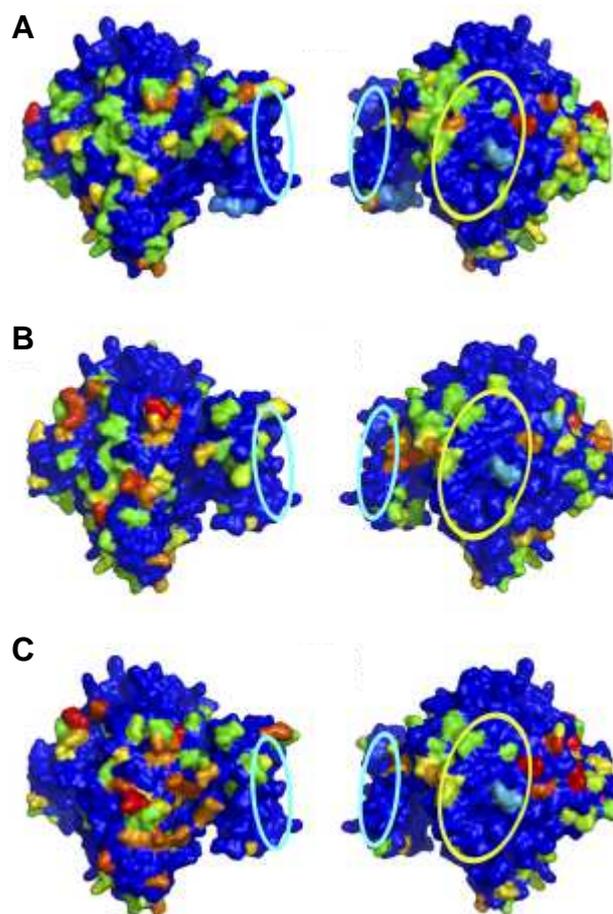
### 1.1. Interacción entre neurexinas y neuroliguinas.

Las neuroliguinas establecen conexiones con las neurexinas. En estas uniones se forma un complejo de alta afinidad favorecido principalmente por la combinación de tres interacciones diferentes: la interacciones electrostáticas de cationes  $Ca^{2+}$  con átomos de oxígeno, puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas (Figura 1).



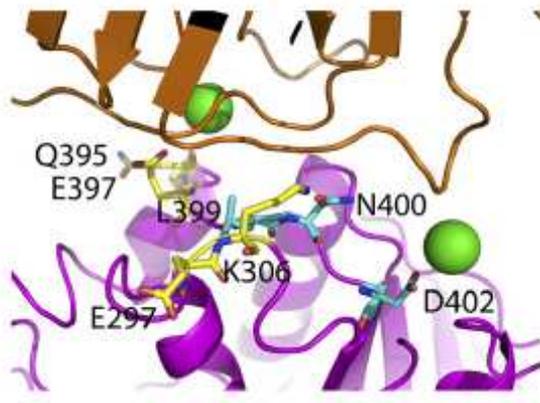
**Figura 1. Interacciones establecidas en la interfase de unión entre *Nrx1β* y *Nlgn1* de rata.** Los cationes  $Ca^{2+}$  se representan en color verde. Las interacciones electrostáticas que rodean a los cationes  $Ca^{2+}$  se representan con líneas punteadas negras. Los puentes de hidrógeno se corresponden con las líneas punteadas rojas. Los residuos aminoacídicos que se muestran intervienen en la interacción entre ambas proteínas. La molécula de neurexina se muestra en marrón y la de neuroliguina en violeta. En azul se muestran los átomos de oxígeno y en rojo los átomos de nitrógeno del aminoácido correspondiente. Adaptado de Araç et al., 2007 (Araç, Boucard et al. 2007).

Usando como modelo las proteínas NRXN1β y NLGN1 de rata cristalizadas se ha podido demostrar que en esta interacción, uno de los cationes  $Ca^{2+}$  se encuentra rodeado por cinco átomos de oxígeno (N238 OD1, D137 OD1, D137 OD2, V154 O y 1236 O) de la NRXN1β, y tres átomos de oxígeno (G396 O, Q395 O, y E397 OE2) de la NLGN1. El otro catión  $Ca^{2+}$  situado en el otro lado de la zona de interacción, se encuentra rodeado por tres átomos de oxígeno (N103 O, D104 OD1, y D104 OD2) de la NRXN1β y otros tres (D402 OD1, D402 OD2, y T569 O) de la NLGN1. Además existe una extensa red de puentes de hidrógeno establecidos entre los residuos NLGN1-R597 NE y NRXN1β-N103 OD1, NLGN1-N400 N y NRXN1β-S107 OG, NLGN1-K306 NZ y NRXN1β S107 O, NLGN1-E397 OE2 y NRXN1β-I236 N, y NLGN1-G396 O y NRXN1β-N238 ND2. Por último, algunos residuos de NLGN1 (H294, E297, K306, Q395, E397, L399, N400, y F499) y de NRXN1β (N103, S107, R109, L135, R232, I236, y N238), están implicados en interacciones electrostáticas e interacciones hidrofóbicas (Figura 1) (Araç, Boucard et al. 2007).



**Figura 2. Conservación de la estructura de las neuroliguinas de mamíferos.** En la imagen se muestran dímeros de neuroliguinas. Se superponen las estructuras tridimensionales dos a dos para comparar NLGN1 con NLGN2 (A), NLGN1 con NLGN3 (B), y NLGN1 con NLGN4 (C). Las regiones más conservadas se muestran en azul y las menos conservadas en rojo. Como se observa la zonas de interacción con neurexina (óvalos amarillos) y las zonas de dimerización donde interaccionan dos neuroliguinas (óvalos azules) se encuentran altamente conservadas entre las diferentes neuroliguinas. El óvalo amarillo correspondiente al otro monómero no se muestra porque este se encuentra por detrás del plano representado. Adaptado de Araç et al., 2007 (Arac, Boucard et al. 2007).

Las regiones correspondientes a la zona de dimerización y a la zona de unión a neurexina son las más conservadas entre las diferentes neuroliguinas (Figura 2). Específicamente, algunos residuos presentes en la zona de unión entre neurexinas y neuroliguinas se encuentran altamente conservados entre las neuroliguinas, pero no entre las diferentes acetilcolinesterasas de mamíferos (Q395, E397, D402, N400, H294, E297, L399) (Figura 3). Sin embargo otros residuos, dispuestos en el borde de la zona de interacción tienen una gran variabilidad (K306, F499, G500, N498, R597, R311) (Arac, Boucard et al. 2007). Esta variabilidad de residuos podría explicar las diferencias en la afinidad de unión a las neurexinas (Comoletti, Flynn et al. 2006), como por ejemplo las observadas entre la NLGN1 y NLGN2 con NRX1 $\beta$  de rata (Arac, Boucard et al. 2007).



**Figura 3. Conservación de residuos en la interfase de unión neurexina/neuroligina.** En la imagen se muestra los residuos conservados en las neuroliginas que participan en la interacción con la neurexina. La molécula de neurexina se muestra en marrón y la de neuroligina en violeta. Los cationes  $\text{Ca}^{2+}$  se representan en color verde. En azul se muestran los átomos de oxígeno y en rojo los átomos de nitrógeno del aminoácido correspondiente Adaptado de Araç et al. (Araç, Boucard et al. 2007).

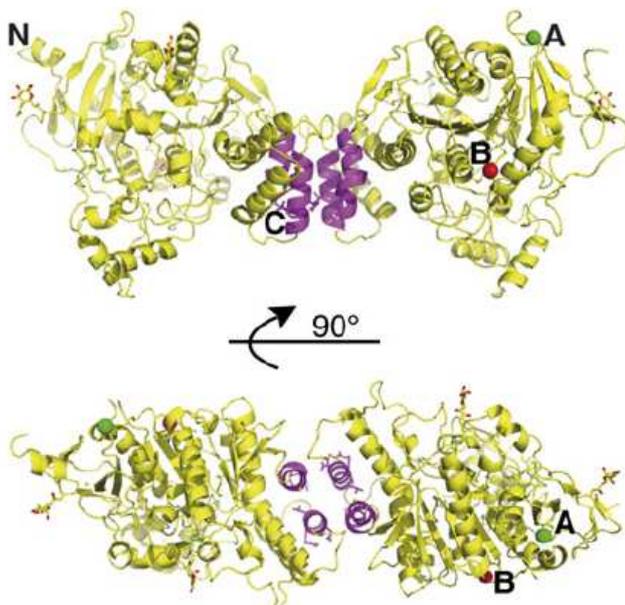
Araç et al., 2007 (Araç, Boucard et al. 2007), observaron que cuando originaban mutaciones en los residuos L399A, N400A y D402N de la NLGN1 de rata, se interrumpía el puente de hidrógeno entre el residuo N400 de la NLGN1 y el S107 de la NRXN1 $\beta$ , y una de las uniones que rodean al catión  $\text{Ca}^{2+}$  mediada por el residuo D402 de la neuroligina. Este cambio originaba una disminución de la afinidad por la neurexina de 500 veces respecto a la neuroligina silvestre. Otras mutaciones (L399A, N400A, D402N, Q395A y E397A) también interrumpían los enlaces que rodean al otro catión  $\text{Ca}^{2+}$ , y que están mediados principalmente por el residuo E397 de la neuroligina. El conjunto de estas cinco mutaciones hace que la neuroligina disminuya su afinidad de unión a la neurexina 2500 veces respecto a la proteína silvestre (Araç, Boucard et al. 2007).

Otros experimentos llevados a cabo por Ko et al., 2009 (Ko, Zhang et al. 2009) profundizaron en el mecanismo de interacción neurexina/neuroligina. Estos autores obtuvieron neuroliginas mutantes en diferentes aminoácidos y observaron su efecto en cultivos celulares con el objetivo de determinar el mecanismo por el cual se produce la interacción con las neurexinas. Concretamente, comprobaron que las NLGN1 mutadas en los residuos L399A, N400A, D402N, E297A, K306A, Q395A, E397A, F499A, perdían la capacidad de unirse tanto a  $\alpha$  como a  $\beta$ -neurexinas. Así mismo, estas mutaciones hacían que la sobreexpresión de estas neuroliginas disminuyera la capacidad de inducir la sinapsis en células en cultivo, respecto a la proteína silvestre. Además, aunque provocaban una disminución en el tamaño de la sinapsis (medido como el tamaño de los terminales presinápticos) con respecto a la proteína silvestre, no afectaban a la densidad (número de conexiones sinápticas) de las mismas (Ko, Zhang et al. 2009).

## 1.2. Interacción entre neuroliginas.

Otro apartado importante en el análisis de las neuroliginas es el hecho de la capacidad de estas proteínas de dimerizarse. Algunos estudios en cultivos neuronales (Comoletti, Flynn et al. 2006) y mediante análisis cristalográfico de neuroliginas mutantes en los aminoácidos que

intervienen en la dimerización de éstas (Dean, Scholl et al. 2003), se ha podido demostrar que la oligomerización de las neuroliginas es necesaria para que éstas tengan habilidad de iniciar el reclutamiento de proteínas sinápticas en el terminal presináptico. La zona de dimerización de las neuroliginas están muy conservadas (Figura 2) y es idéntica a la de las esterasas. Consiste en un conjunto de cuatro hélices (dos de ellas de cada monómero) localizadas en el extremo C-terminal de la proteína (Figura 4). En esta zona existe una densa red de puentes de hidrógeno e interacciones de enlaces salinos, como son contactos hidrofóbicos entre residuos dispuestos en las hélices de cada monómero (Koehnke, Jin et al. 2008). Los residuos de cada subunidad de neuroligina que contactan entre sí en la zona de dimerización (Val426, Phe433, Met434, Trp438, Leu604 y Leu608), están enteramente conservados entre las diferentes isoformas de neuroliginas de mamíferos, con la excepción del residuo Val426 que se sustituye en NLGN3 por el aminoácido Thr. Esto sugiere que todas las isoformas de neuroliginas forman dímeros mediante las mismas interacciones, y que la zona de dimerización podría actuar como soporte para la formación de heterodímeros de neuroliginas diferentes. Budreck et al. (Budreck and Scheiffele 2007) mediante inmunoprecipitación de extractos de cerebro observaron la formación de complejos en forma de dímeros entre NLGN2 y NLGN3.



**Figura 4. Esquema representativo de la formación de un dímero de neuroligina 1.** Cada monómero de neuroligina se muestra en amarillo. El dímero está formado por la interacción de las cuatro hélices (mostradas en morado) que constituyen la zona de dimerización. Se muestra dos planos diferentes de la estructura, uno de ellos rotado 90° sobre su eje. N, indica el extremo N-terminal de la proteína y C, el extremo C-terminal de la misma. En la Figura aparecen los sitios de splicing alternativo de la proteína, indicados con las letras A y B en verde y rojo respectivamente. Todas las neuroliginas presentan un único sitio de procesamiento alternativo (A), pero *NLGN1* presenta un sitio alternativo en una segunda posición (B). La afinidad de unión varía entre las diferentes combinaciones de neuroligina y neurexina, y es controlado por procesamiento alternativo de ambas. El procesamiento alternativo del sitio B de la *NLGN1* es el responsable de la unión a neurexinas, (ver apartado de Introducción de esta tesis). Adaptado de Fabrichny et al. (Fabrichny, Leone et al. 2007).

### 1.3. Homología entre la neuroligina de *C. elegans* y la de mamíferos.

Para estudiar la homología entre las secuencias proteicas de NLG-1 de *C. elegans* con las NLGN1 de rata y de humanos, se realizó un alineamiento de sus secuencias proteicas siguiendo



```

          370          380          390          400          410          420
acetilchol nlg 1 C. elegans MQVHSSSENIITKAVLKIIVPTFLSGFAPLIVDGDILIPNKPQVFSSTQYGSLEIREIDLLVGLIS
acetilchol Nlgn 1 Rat LQKKPYKELVDQDVQPAR--YHIAFGPVIDGDVIPDDPQILMEQGE--FLNYDIMLGVN
acetilchol NLGN 1 Homo sapiens LQKKPYKELVDQDIQPAR--YHIAFGPVIDGDVIPDDPQILMEQGE--FLNYDIMLGVN
acetilchol NLGN 2 Homo sapiens LRRKPSRELVDQDVQPAR--YHIAFGPVIDGDVIPDDPEILMEQGE--FLNYDIMLGVN
acetilchol NLGN 3 Homo sapiens LRKSAKELVQDIQPAR--YHIAFGPVIDGDVIPDDPEILMEQGE--FLNYDIMLGVN
acetilchol NLGN 4 Homo sapiens LRNKNYKELIQDITIPAT--YHIAFGPVIDGDVIPDDPQILMEQGE--FLNYDIMLGVN

```

```

          430          440          450          460          470          480
acetilchol nlg 1 C. elegans SNPSHHMLIS-NEDLKVCISKEKRMRIFRSLVRNLYDFHR--EELIASIINEYTDWENPRD
acetilchol Nlgn 1 Rat QGEGLKFEVENIVDSDDGVSASDFDFAVSNFVDNLYGYPEGKDVLRETIFKMYTDWAD--RH
acetilchol NLGN 1 Homo sapiens QGEGLKFEVENIVDSDDCTISASDFDFAVSNFVDNLYGYPEGKDVLRETIFKMYTDWAD--RH
acetilchol NLGN 2 Homo sapiens QGEGLKFEVDSAESDGVSAASDFDFVSNFVDNLYGYPEGKDVLRETIFKMYTDWAD--RD
acetilchol NLGN 3 Homo sapiens QGEGLKFEVDSVDPEDGVSGTDFDYVSNFVDNLYGYPEGKDLRETIFKMYTDWAD--RD
acetilchol NLGN 4 Homo sapiens QGEGLKFEVDSIVDNEEDGVTPNDFDFVSNFVDNLYGYPEGKDLRETIFKMYTDWAD--KE

```

```

acetilchol Nlgn 1 Rat NPETRRTLLALFTDHQWVAPAVATADLHSNFGS---PTYFYAFYHHCQTDQV---PA
acetilchol NLGN 1 Homo sapiens NPETRRTLLALFTDHQWVAPAVATADLHSNFGS---PTYFYAFYHHCQTDQV---PA
acetilchol NLGN 2 Homo sapiens NPETRRTLLALFTDHQWVAPAVATAKLHADYGS---PYFYFYHHCQAEGR---PE
acetilchol NLGN 3 Homo sapiens NPETRRTLLALFTDHQWVAPAVATADLHARYGS---PTYFYAFYHHCQSLMK---PA
acetilchol NLGN 4 Homo sapiens NPETRRTLLALFTDHQWVAPAVATADLHARYGS---PTYFYAFYHHCQSLMK---PS

```

```

          550          560          570          580          590          600
acetilchol nlg 1 C. elegans IRGSLSDGIVPYVIFGIPLAQGDSEERLYSGCNITDDKGLISKVMMIYVSNFVKSQDPSKPNP
acetilchol Nlgn 1 Rat WADAAHGDEVVYVIGIPMIG--PTELFPCNFSKNDVMLS AVVMTYWTNFAKTGDPNQVP
acetilchol NLGN 1 Homo sapiens WADAAHGDEVVYVIGIPMIG--PTELFPCNFSKNDVMLS AVVMTYWTNFAKTGDPNQVP
acetilchol NLGN 2 Homo sapiens WADAAHGDELIPYVFGVPMVG--ATDLFPCNFSKNDVMLS AVVMTYWTNFAKTGDPNQVP
acetilchol NLGN 3 Homo sapiens WSDAAHGDEVVYVFGVPMVG--PTDLFPCNFSKNDVMLS AVVMTYWTNFAKTGDPNQVP
acetilchol NLGN 4 Homo sapiens WADSAHGDEVVYVFGIPMIG--PTELFPCNFSKNDVMLS AVVMTYWTNFAKTGDPNQVP

```

```

          610          620          630          640          650          660
acetilchol nlg 1 C. elegans MSKNFPMG--DVFHSTAWPQFDQPNREAVLEIHDRPRVKNYRVAQVGFWNFFIPQLHKN
acetilchol Nlgn 1 Rat QDTKFIHTKPNRFEEVAWTRYS--QKDQLYLHIGLKPVRKSHYRANKVNLWLELVPHLHNL
acetilchol NLGN 1 Homo sapiens QDTKFIHTKPNRFEEVAWTRYS--QKDQLYLHIGLKPVRKSHYRANKVNLWLELVPHLHNL
acetilchol NLGN 2 Homo sapiens QDTKFIHTKPNRFEEVWVSKFN--SKKQYLYHIGLKPVRDNYRANKVAFWLELVPHLHNL
acetilchol NLGN 3 Homo sapiens QDTKFIHTKPNRFEEVAWSKYN--PKDQLYLHIGLKPVRDHYRANKVAFWLELVPHLHNL
acetilchol NLGN 4 Homo sapiens QDTKFIHTKPNRFEEVAWSKYN--PKDQLYLHIGLKPVRDHYRANKVAFWLELVPHLHNL

```

```

          670          680          690          700          710          720
acetilchol nlg 1 C. elegans GKETEPEVGEHHLLSDHFRKDSYFEGKTRHFSYANLPFPFPPMFPSPPELTTKPK---P
acetilchol Nlgn 1 Rat NDISQYTSSTTTKVPSNDITLRP---TRKNS-----TPVTSAPPTAKQDDPK---Q
acetilchol NLGN 1 Homo sapiens NDISQYTSSTTTKVPSNDITFRP---TRKNS-----VPVTSAPPTAKQDDPK---P
acetilchol NLGN 2 Homo sapiens H--TELETTTTRLPPVATRNPFRP--PAGAPG-----TRRPPPEATLPEPEPEP---Q
acetilchol NLGN 3 Homo sapiens HDMFHYTSTTTKVPSNDITRSSHII--TRRPNCKTWS--TKRPAISPAVSNENAQGSWNGDQ
acetilchol NLGN 4 Homo sapiens NEIFQYVSTTTKVPSNDMTSEFPG--TRRSPAKIWPTRKRALTPANNPKHSKDPKTEP

```

```

          730          740
acetilchol nlg 1 C. elegans SESPTLQTTTSEKAAAGSFTGKAL
acetilchol Nlgn 1 Rat QPSPFSVD--QRDYSTELS-----
acetilchol NLGN 1 Homo sapiens QPSPFSVD--QRDYSTELS-----
acetilchol NLGN 2 Homo sapiens RAYDRFPQDSRDYSTELS-----
acetilchol NLGN 3 Homo sapiens DAGPILLVFNPRDYSTELS-----
acetilchol NLGN 4 Homo sapiens EDTIVLLETKRDYSTELS-----

```

**C**

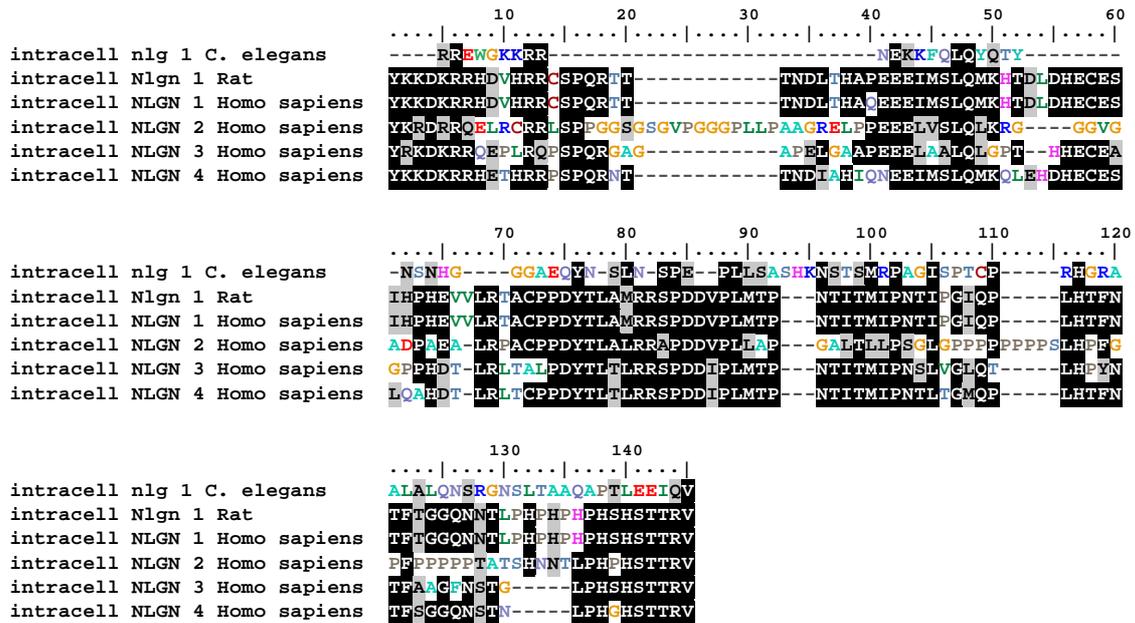
```

          10          20
transmem nlg 1 C. elegans GGVIFHCGRLLMNVCLLIIV-
transmem Nlgn 1 Rat -VTIAVGASLLFLNLAFAALY
transmem NLGN 1 Homo sapiens -VTIAVGASLLFLNLAFAALY
transmem NLGN 2 Homo sapiens -VTIAVGASLLFLNLAFAALY
transmem NLGN 3 Homo sapiens -VTIAVGASLLFLNLAFAALY
transmem NLGN 4 Homo sapiens -VTIAVGASLLFLNLAFAALY

```

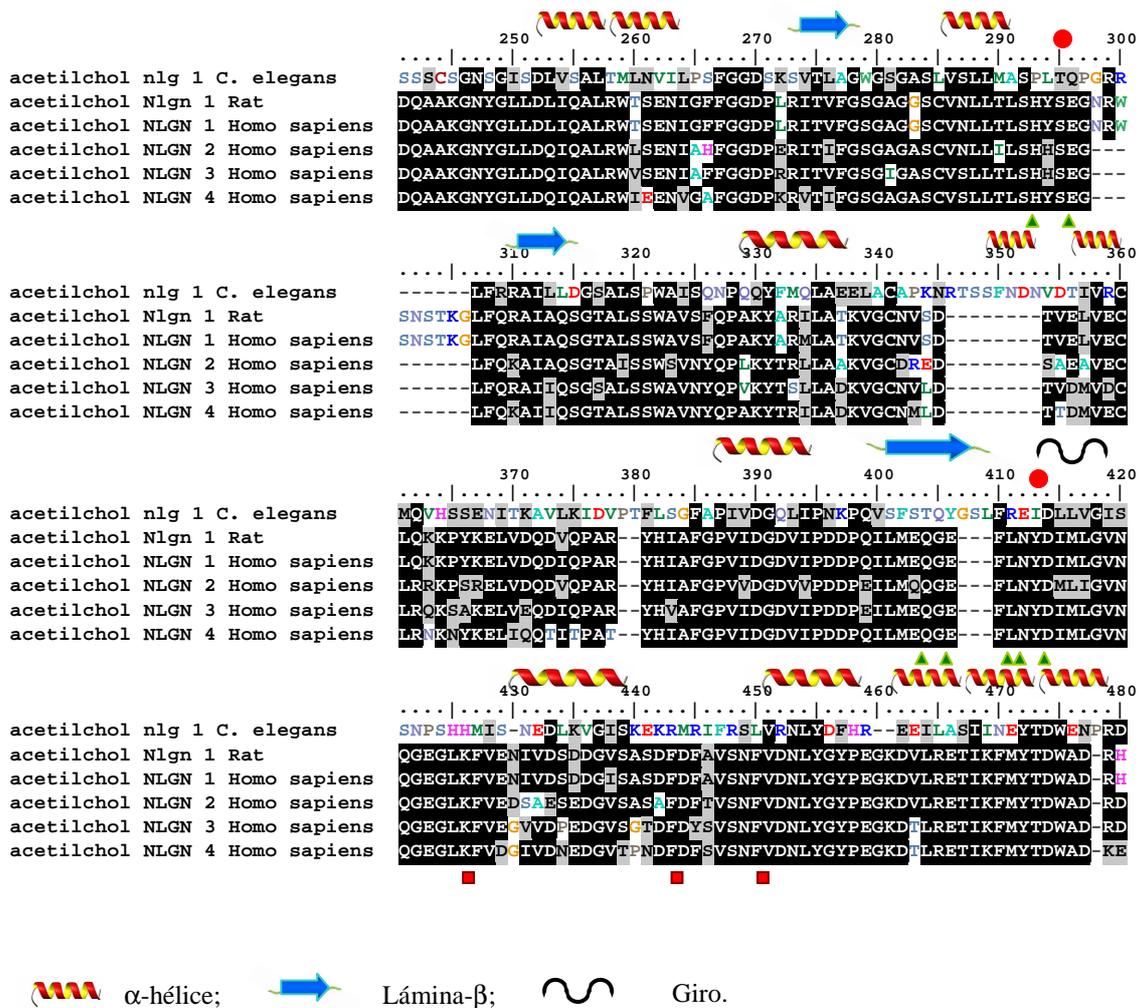
Figura 5. Continuación.

## D



**Figura 5.** Alineamiento de las secuencias de las neuroleuginas de *C. elegans*, rata y humanas mediante el método Clustal W. Se muestran los alineamientos correspondientes a la región del péptido señal (A), dominio “acetylcholinesterase-like” (B), transmembrana (C) e intracelular (D). Los cuadros negros dentro del alineamiento indican aminoácidos idénticos y los cuadros grises aminoácidos similares.

Con el objetivo de determinar si una neuroleugina de mamíferos era capaz de rescatar funcionalmente el fenotipo silvestre del mutante *nlg-1* (*knockout ok259*) de *C. elegans*, se estudió en detalle la región de interacción con neurexinas de las diferentes neuroleuginas de rata y humanos (Figura 6). Se calcularon los porcentajes de identidad y similaridad de los dominios “acetylcholinesterase-like” de la NLG-1 de *C. elegans* y de las neuroleuginas humanas, siguiendo el método “pairwise alignment” utilizando la matriz *Blosum62*. Se compararon dos a dos la NLG-1 de *C. elegans* con las NLGN1-4X humanas, obteniendo los siguientes resultados: NLG-1 vs NLGN1 (identidad: 28,9; similaridad: 44,2), NLG-1 vs NLGN2 (identidad: 26,0; similaridad: 42,7), NLG-1 vs NLGN3 (identidad: 26,1; similaridad: 44,1), NLG-1 vs NLGN4X (identidad: 28,7; similaridad: 47,5). Los cálculos de identidad y similaridad del resto de dominios de la proteína, se recogen en la Tabla 2. De igual manera, se calcularon los porcentajes de identidad y similaridad de los dominios “acetylcholinesterase-like” de la NLGN1 de rata y de las neuroleuginas humanas, siguiendo el mismo método. Los resultados obtenidos fueron los siguientes: NLGN1 vs NLGN1 (identidad: 96,01; similaridad: 96,47), NLGN1 vs NLGN2 (identidad: 65,39; similaridad: 76,73), NLGN1 vs NLGN3 (identidad: 70,50; similaridad: 80), NLGN1 vs NLGN4X (identidad: 71,66; similaridad: 80,66). Los cálculos de identidad y similaridad del resto de dominios de la proteína, se recogen en la Tabla 3.



**Figura 6.** Alineamiento de las secuencias de aminoácidos del dominio “acetylcholinesterase-like” correspondiente a la zona de unión neurexina/neuroliquina de las neuroliquinas de *C. elegans*, rata y humanas. Se utilizó el método Clustal W. Los elementos de la estructura secundaria de la NLGN1 de rata conservados en las neuroliquinas humanas se muestran arriba del alineamiento. Estas estructuras secundarias están conservadas en la secuencia de la proteína NLG-1 de *C. elegans*, según se dedujo a partir de los programas de predicción de estructuras proteicas “Swiss-Model” y “PDBsum”. El significado de cada elemento se especifica en el pie de Figura. Los cuadros negros dentro del alineamiento indican aminoácidos idénticos y los cuadros grises aminoácidos similares. Los triángulos verdes representan los residuos implicados en la interacción con  $\beta$ -neurexinas conservados en la neuroliquina de rata y humanas. Los cuadrados rojos indican la posición de mutaciones asociadas con autismo en NLGN3/NLGN4. Los puntos rojos sobre la secuencia de *C. elegans* indican los residuos de interacción con neurexina conservados (el residuo D402 se encuentra conservado y el residuo E297 es sustituido por Q).

Con los resultados obtenidos se eligió la secuencia de NLGN1 para la realización de la construcción traduccional de rescate funcional por presentar una mayor identidad en el dominio “acetylcholinesterase-like” con la proteína de *C. elegans* (28,9), a pesar de que la secuencia de NLGN4X tiene una identidad muy similar (28,7), presenta mayor similaridad (47,5 frente a 44,2) y la identidad de la región del péptido señal y el dominio intracelular sean también mayores. En el futuro sería muy interesante plantear experimentos de rescate funcional con NLGN4, una proteína específicamente ligada a autismo (Jamain, Quach et al. 2003).



**Tabla 2. Porcentaje de identidad y similitud entre la proteína NLG-1 de *C. elegans* y las proteínas NLGN1-4 humanas, y NLGN1 de rata.** Se representa el porcentaje de identidad y similitud calculado usando la matriz *BLOSUM62* según el método de “*Pairwise alignment*” de cada uno de los dominios de la proteína: **A**, péptido señal; **B**, “*Acetylcholinesterase-like*”; **C**, transmembrana; **D**, intracelular.

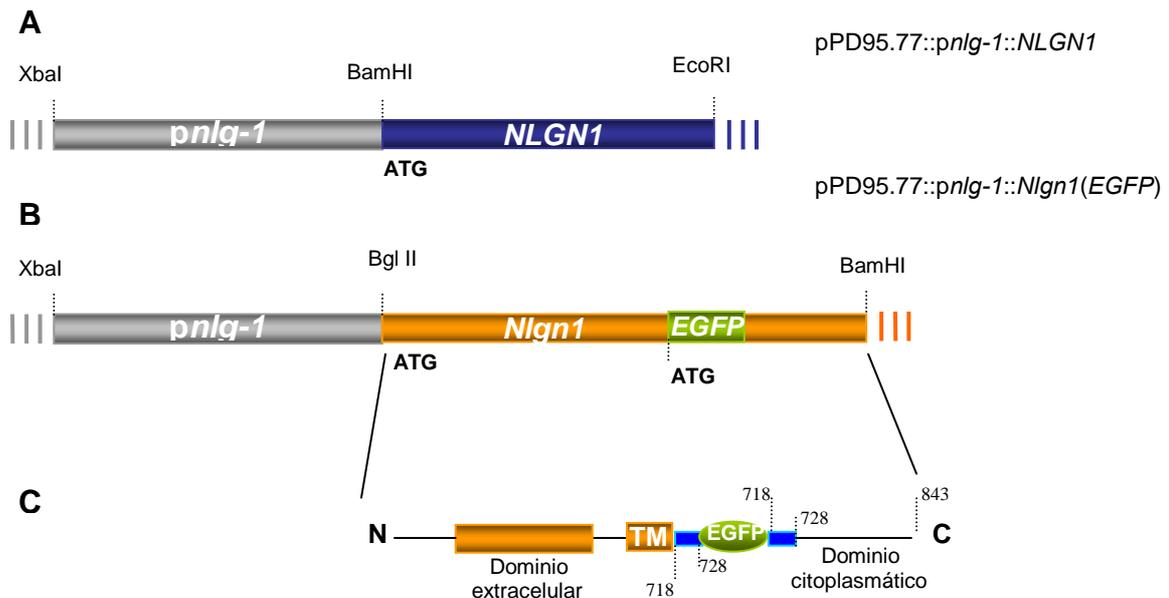
		<i>Homo sapiens</i>				<i>Rata</i>
		NLGN1	NLGN2	NLGN3	NLGN4X	NLGN1
<b>A</b>	Identidad	4,4	17,65	16,2	19,5	6,66
	Similitud	22,2	41,1	24,3	24,3	8,88
<b>B</b>	Identidad	28,9	26	26,1	28,7	27,84
	Similitud	44,2	42,7	44,1	47,5	43,61
<b>C</b>	Identidad	22,7	18,1	27,2	22,7	22,72
	Similitud	40,9	40,9	40,9	40,9	40,91
<b>D</b>	Identidad	9,52	14,49	12,71	17,5	14,06
	Similitud	22,22	23,91	22,03	28,33	25,78

**Tabla 3. Porcentaje de identidad y similitud entre la proteína NLGN1 de rata con las proteínas NLGN1-4 humanas, y NLG-1 de *C. elegans*.** Se representa el porcentaje de identidad y similitud calculado usando la matriz *BLOSUM62* según el método de “*Pairwise alignment*” de cada uno de los dominios de la proteína: **A**, péptido señal; **B**, “*Acetylcholinesterase-like*”; **C**, transmembrana; **D**, intracelular.

		<i>Homo sapiens</i>				<i>C. elegans</i>
		NLGN1	NLGN2	NLGN3	NLGN4X	NLG-1
<b>A</b>	Identidad	84,44	17,77	15,21	8	6,66
	Similitud	91,11	20	23,91	20	8,88
<b>B</b>	Identidad	96,01	65,39	70,51	71,66	27,84
	Similitud	96,47	76,73	80	80,66	43,61
<b>C</b>	Identidad	100	95,23	95,23	100	22,72
	Similitud	100	100	100	100	40,91
<b>D</b>	Identidad	99,2	38,02	56,34	70,4	14,06
	Similitud	99,2	49,29	69,04	79,2	25,78

## 2. Construcciones traduccionales de rescate con cDNAs de los genes *NLGN1* humano y *Nlgn1* de rata. Obtención de organismos transgénicos.

Para realizar el rescate funcional de mutantes de *C. elegans* deficiente en *nlg-1*, se usaron secuencias de cDNA correspondientes a los genes *NLGN1* humano y *Nlgn1* de rata. Ambas construcciones fueron realizadas en el vector de *C. elegans* de la serie pPD95 (Fire 1998).



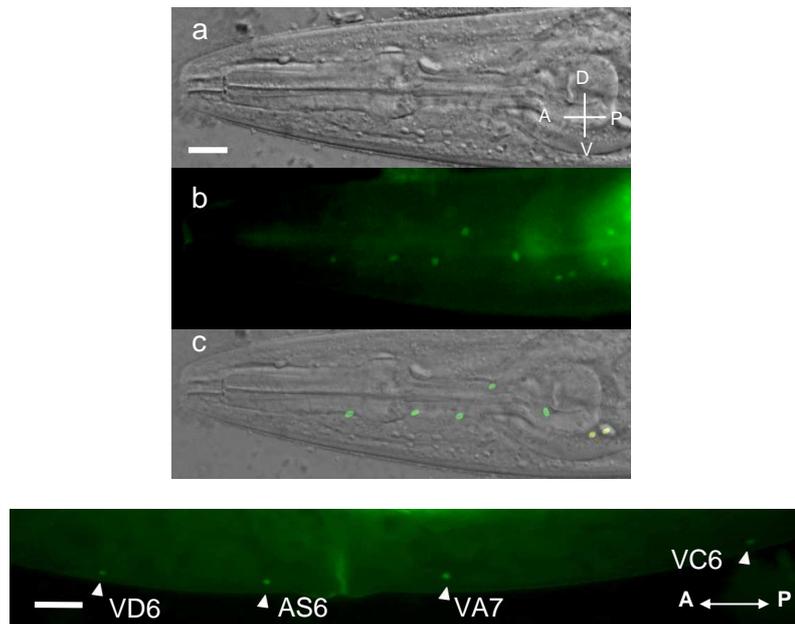
**Figura 8. Construcciones traduccionales usadas en el rescate funcional de mutantes deficientes *nlg-1*.** El cDNA del gen NLGN1 humano fue fusionado con el promotor del gen *nlg-1* de *C. elegans* (A). Para la construcción con el cDNA del gen de *Nlgn1* de rata, se empleó una construcción previa en la que estaba incluida la secuencia que codifica la proteína EGFP (Dresbach, Neeb et al. 2004) (B). En C se muestra en detalle la construcción Nlgn1 de rata, donde se detalla el dominio extracelular, citoplasmático y transmembrana (TM) de la proteína neuroliquina, y la proteína EGFP justo a continuación del dominio TM. Los rectángulos azules representan los residuos 718-728 repetidos flanqueando la secuencia codificante de EGFP, manteniéndose completo el dominio intracelular de la neuroliquina (residuos 718-843).

Para la realización de la construcción de rescate con la neuroliquina humana, se usó el cDNA del gen *NLGN1* correspondiente al clon *KIAA1070* (hj05602) (Kasuz DNA Research Institute). La secuencia correspondiente al cDNA de dicho gen fue amplificada y clonada mediante las enzimas de restricción *BamH I* y *EcoR I* (Figura 8A) en el vector pPD95.77::pnlg-1::gfp. En dicho vector, que era portador del promotor del gen *nlg-1* de *C. elegans*, se eliminó la secuencia correspondiente a GFP y se sustituyó con la secuencia codificante del cDNA del gen *NLGN1* humano (Figura 8A).

Para la realización de la construcción de rescate con la neuroliquina de rata se usó una previa cedida por Thomas Dresbach (*Ruprecht-Karls University, Heidelberg*) (Dresbach, Neeb et al. 2004; Wittenmayer, Korber et al. 2009). Esta construcción, clonada en el vector pCMV5, contenía la secuencia codificante correspondiente a la isoforma  $\alpha$ -neuroliquina 1 de rata (*Nlgn1*). Justo a continuación del dominio transmembrana se encontraba insertada la secuencia codificante de la proteína EGFP, evitando que interfiriese con el extremo C terminal del dominio intracelular (Figura 8B) (Dresbach, Neeb et al. 2004). El cDNA de *Nlgn1* con EGFP fue liberada del vector pCMV5 mediante las enzimas de restricción *Bgl II* y *BamH I* y clonada en el vector pPD95.77::pnlg-1::gfp que como en el caso anterior se eliminó la secuencia correspondiente a GFP y se sustituyó con la secuencia codificante del cDNA de *Nlgn1* de rata

con EGFP (Figura 8B). En este caso, la presencia de EGFP en esta construcción nos permitiría analizar la expresión de dicho cDNA en los organismos transgénicos obtenidos.

Para la obtención de organismos transgénicos portadores de la construcción traduccional de rescate pPD95.77::*pnlg-1::NLGNI* se microinyectaron animales mutantes *nlg-1 (ok259)*, coinyectando el plásmido de rescate junto con el plásmido pPD95.75::*pnrx-1::gfp*, que se usó como marcador de la transformación. Los animales transgénicos fueron seleccionados mediante la expresión del gen *nrx-1* en neuronas del sistema nervioso del nematodo (Figura 9). Las líneas transgénicas obtenidas no fueron estables. El porcentaje de la progenie que presentaba fluorescencia era del aproximadamente del 30-40 %.



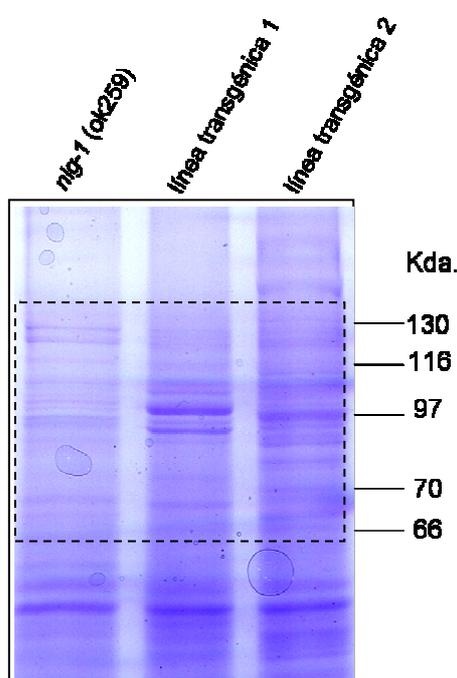
**Figura 9. Expresión del gen *nrx-1* de *C. elegans* usado como marcador de transformación junto con un plásmido expresando el cDNA del gen *NLGNI* humano, en animales mutantes *nlg-1 (VC228 nlg-1 (ok259) X; [pnrx-1::gfp; NLGNI]*. La expresión de GFP se detectó en los ganglios de la cabeza (imagen superior: **a**, imagen de óptica Nomarski; **b**, imagen de epifluorescencia; **c**, solapamiento de a y b), y en las motoneuronas AS6, VA7, VC6 y VD6 identificadas posicionalmente (indicadas con puntas de flecha) del cordón nervioso ventral (imagen inferior). Las imágenes fueron efectuadas con un aumento de 40x. El eje de coordenadas indican las posiciones anterior (A), posterior (P), ventral (V) y dorsal (D) del nematodo. La barra de escala del panel superior equivale a 10  $\mu$ m, y la del panel inferior 20 $\mu$ m.**

Para la obtención de organismos transgénicos portadores de la construcción traduccional de rescate pPD95.75::*pnlg-1::Nlgn1(EGFP)* se microinyectaron animales mutantes *nlg-1 (ok259)*, utilizando el sistema de selección con el antibiótico Neomicina (G-418), (Giordano-Santini, Milstein et al. 2011). En este caso se coinyectó el plásmido de rescate junto con el plásmido de selección Neo<sup>R</sup> pDD04NeoR (*pmyo-2::gfp*). Los animales transgénicos fueron seleccionados mediante el crecimiento y desarrollo en un medio con G-418.

### 3. Expresión de las proteínas neuroliguina 1 humana y de rata en mutantes *nlg-1* de *C. elegans*.

#### 3.1. Expresión de la neuroliguina 1 humana en *C. elegans*.

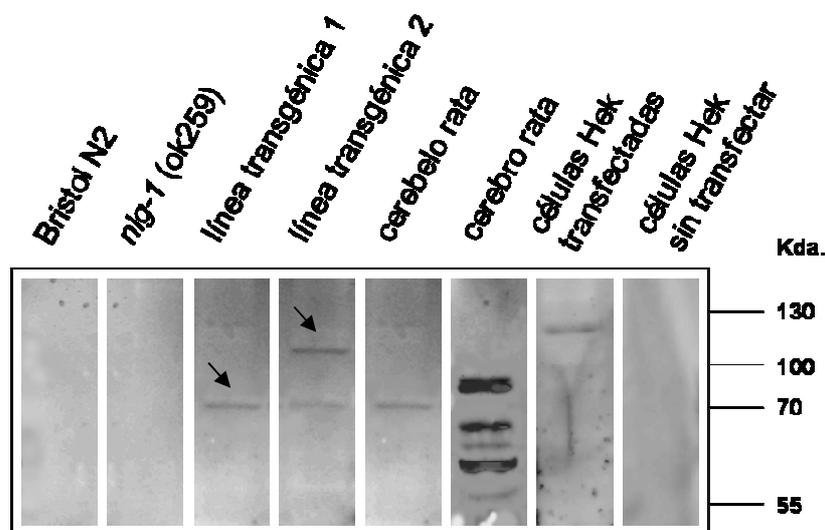
Los extractos proteicos de la estirpe *nlg-1 (ok259)* y de las líneas transgénicas donde se introdujo el gen *NLGN1* humano, fueron separados en un gel SDS-PAGE para visualizar la población proteica de cada estirpe (Figura 10). En el rango de tamaños aproximado de 66-130 KDa se observaron diferencias en bandas correspondientes a proteínas presentes en los extractos de las líneas transgénicas, lo que hacía suponer que ambas líneas podrían estar expresando el cDNA del gen *NLGN1*.



**Figura 10. Comparación de extractos proteicos de la estirpe VC228 *nlg-1 (ok259)*, y dos líneas transgénicas microinyectadas con el gen *NLGN1* humano.** Las proteínas de los extractos fueron separadas en un gel SDS-PAGE con un porcentaje de acrilamida al 12%; que fue teñido con azul Coomassie. El área marcada indica el rango de tamaños donde se observan diferencias entre los extractos. Cada extracto representa una cantidad de 20  $\mu$ g de proteína total.

Para confirmar la expresión de *NLGN1* en las líneas transgénicas se llevó a cabo análisis *western*. Para ello se utilizó un anticuerpo policlonal para el epitopo H-45 (aminoácidos 645-689 del dominio extracelular) de esta proteína. Como controles positivos se utilizaron extractos de cerebro y cerebelo de rata. Además como control positivo y negativo, se utilizaron también lisados de líneas celulares *Hek* transfectadas con HA-*Nlgn1* de rata y sin transfectar respectivamente (los lisados celulares procedían del Dr. Francisco Gómez-Scholl, Departamento Fisiología Médica y Biofísica, Universidad Sevilla; y las construcciones utilizadas para los experimentos de transfección proceden Scheiffle et al., (Scheiffle, Fan et al. 2000; Dean, Scholl et al. 2003). Como se puede observar en la Figura 11, el anticuerpo no reconoció ninguna proteína en los extractos proteicos correspondientes a la estirpe silvestre (Bristol N2), de la estirpe mutante *nlg-1* y de células *Hek* no transfectada con *Nlgn1*. Por el contrario si reconoció la presencia, supuestamente de *NLGN1* en las dos líneas de *C. elegans* transgénicas, y el

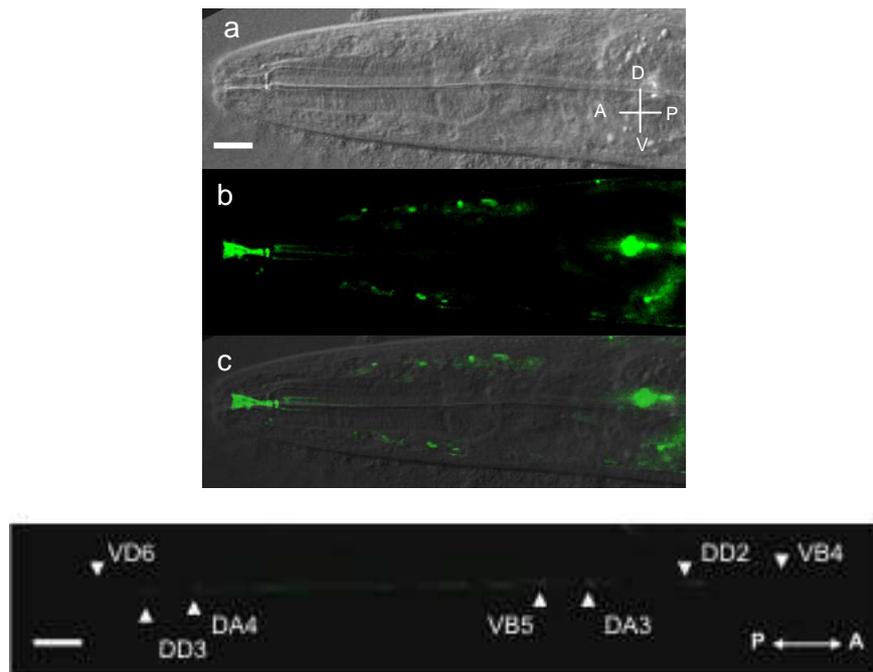
tamaño se correspondían con el de la isoforma detectada en extractos de cerebelo de rata. En la línea transgénica 2 se observó una segunda proteína, que podría corresponderse con otra de las isoformas de la neuroliquina-1, que presentaba un movimiento electroforéticamente ligeramente mayor que NLGN1 humana del lisado de células *Hek*. Sin embargo, puesto que el tamaño de la proteína NLGN1 de las células de mamífero es aproximadamente de 110 KDa, la proteína que aparece en extractos de cerebelo y del nematodo no tiene el tamaño correcto. Es probable que el tamaño observado sea debido a una degradación específica del extremo C-terminal que se observa algunas veces en extractos proteicos y que origina una proteína de 70-80 kDa (Peter Scheiffele, comunicación personal).



**Figura 11. Análisis *western* de extractos proteicos de líneas transgénicas (VC228 *nlg-1 (ok259)* X; [NLGN1]) expresando NLGN1 humana.** Como controles negativos se utilizaron extractos proteicos de las estirpes Bristol N2 y VC228 *nlg-1 (ok259)* X de *C. elegans* y un lisado de células *Hek* humanas no transfectadas con NLGN1. Como controles positivos se utilizaron extractos proteicos de cerebro y cerebelo de rata y un lisado de una línea celular *Hek* transfectada con HA-*Nlgn1* de rata. Las flechas indican las proteínas reconocidas por el anticuerpo anti-*Nlgn1* correspondientes a isoformas de la neuroliquina humana en *C. elegans*.

### 3.2. Expresión de la neuroliquina 1 de rata en *C. elegans*.

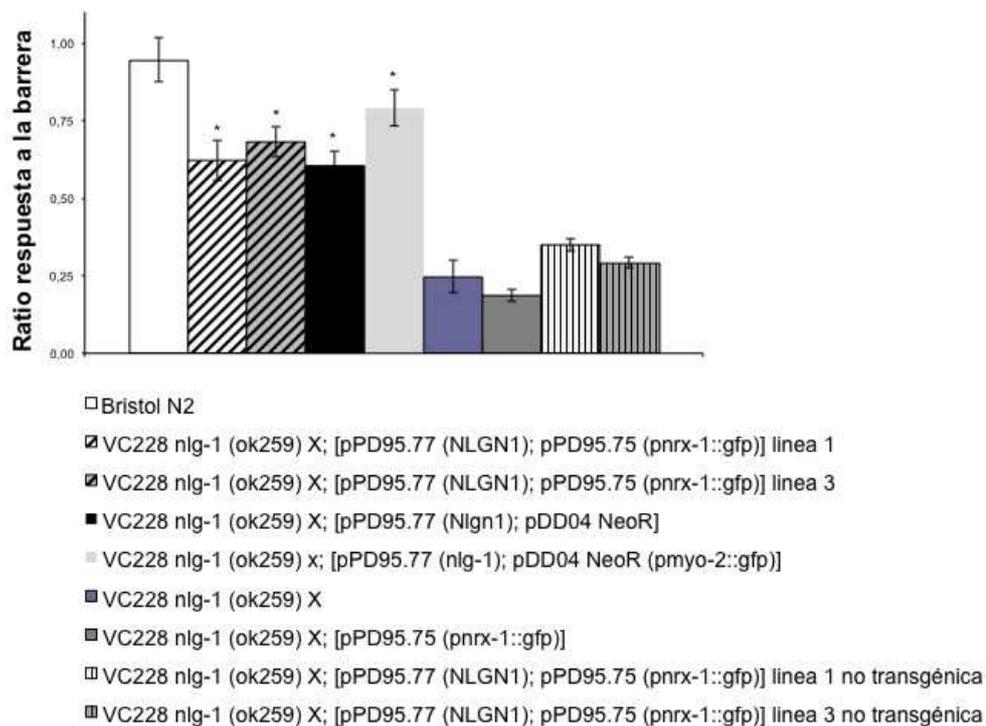
Puesto que la proteína NLGN1 de rata utilizada en la construcción fue microinyectada en *C. elegans* tenía insertada la proteína EGFP, la comprobación de que *Nlgn1* de rata se expresaba en las líneas transgénicas de *C. elegans* se llevó a cabo localizando la expresión de EGFP en el sistema nervioso de los animales transgénicos resistentes a G-418. Se pudo comprobar que en dos líneas transgénicas seleccionadas la proteína recombinante neuroliquina de rata combinada con la proteína EGFP se localizaba en las motoneuronas del cordón nervioso ventral y en neuronas de los ganglios de la cabeza (Figura 12). Concretamente en el cordón nervioso ventral se identificaron las motoneuronas VB4, VB5, VD6, DA3, DA4, DD2 y DD3, expresión que coincidía con las observadas utilizando el promotor del gen *nlg-1* en la estirpe transgénica GE24 *pha-1 (e2123)* III; [pC1 (*pha-1+*); *nrx-1::gpf*; *nlg-1::mCherry*], (ver Capítulo 4 de esta tesis).



**Figura 12. Expresión del gen *Nlgn1* de rata fusionado con la proteína EGFP en animales mutantes *nlg-1* (VC228 *nlg-1* (*ok259*) X; [pDD04 (Neo<sup>R</sup>); *Nlgn1::EGFP*].** Se observó la expresión de este gen en los ganglios de la cabeza (imagen superior: **a**, imagen de óptica Nomarski; **b**, imagen de epifluorescencia; **c**, solapamiento de a y b), y en las motoneuronas VB4, VB5, VD6, DA3, DA4, DD2 y DD3 del cordón nervioso ventral, marcadas con puntas de flecha blancas (imagen inferior). Las imágenes fueron adquiridas con un aumento de 40x. El eje de coordenadas indican las posiciones anterior (A), posterior (P), ventral (V) y dorsal (D) del nematodo. La barra de escala del panel superior equivale a 10  $\mu$ m y la del panel inferior 20  $\mu$ m.

#### 4. Rescate de fenotipos en mutantes de *C. elegans* deficientes en *nlg-1*.

La funcionalidad de las proteínas NLGN1 de rata y humana expresadas en mutantes de *C. elegans* deficientes en el gen *nlg-1*, fue determinada mediante el análisis fenotípico de los animales transgénicos. El primer fenotipo analizado fue la respuesta a alta osmolaridad, utilizando una solución 4M de fructosa. Los animales transgénicos deficientes en *nlg-1*, pero que expresaban la proteína NLG1 del nematodo, presentaron una respuesta ante el estrés osmótico similar a la observada en la estirpe silvestre (Figura 13). Los animales transgénicos deficientes en *nlg-1* que expresaban la proteína NLGN1 humana o de rata presentaron una respuesta similar a la anterior y claramente diferenciada del mutante *nlg-1* (Figura 13). Se utilizaron como controles negativos animales coinyectados con los plásmidos pPD95.77 (NLGN1) y pPD95.75 (*pnrx-1::gfp*), que habían perdido la expresión del marcador GFP y que consecuentemente habían perdido también el “*extrachromosomal transgenic array*” (“líneas no transgénicas” en la Figura 13). Estos resultados, junto con el de otros experimentos en el que también se rescató el fenotipo (datos no mostrados), apoyan el hecho de que las NLGN1 humana y de rata son funcionales en *C. elegans*.



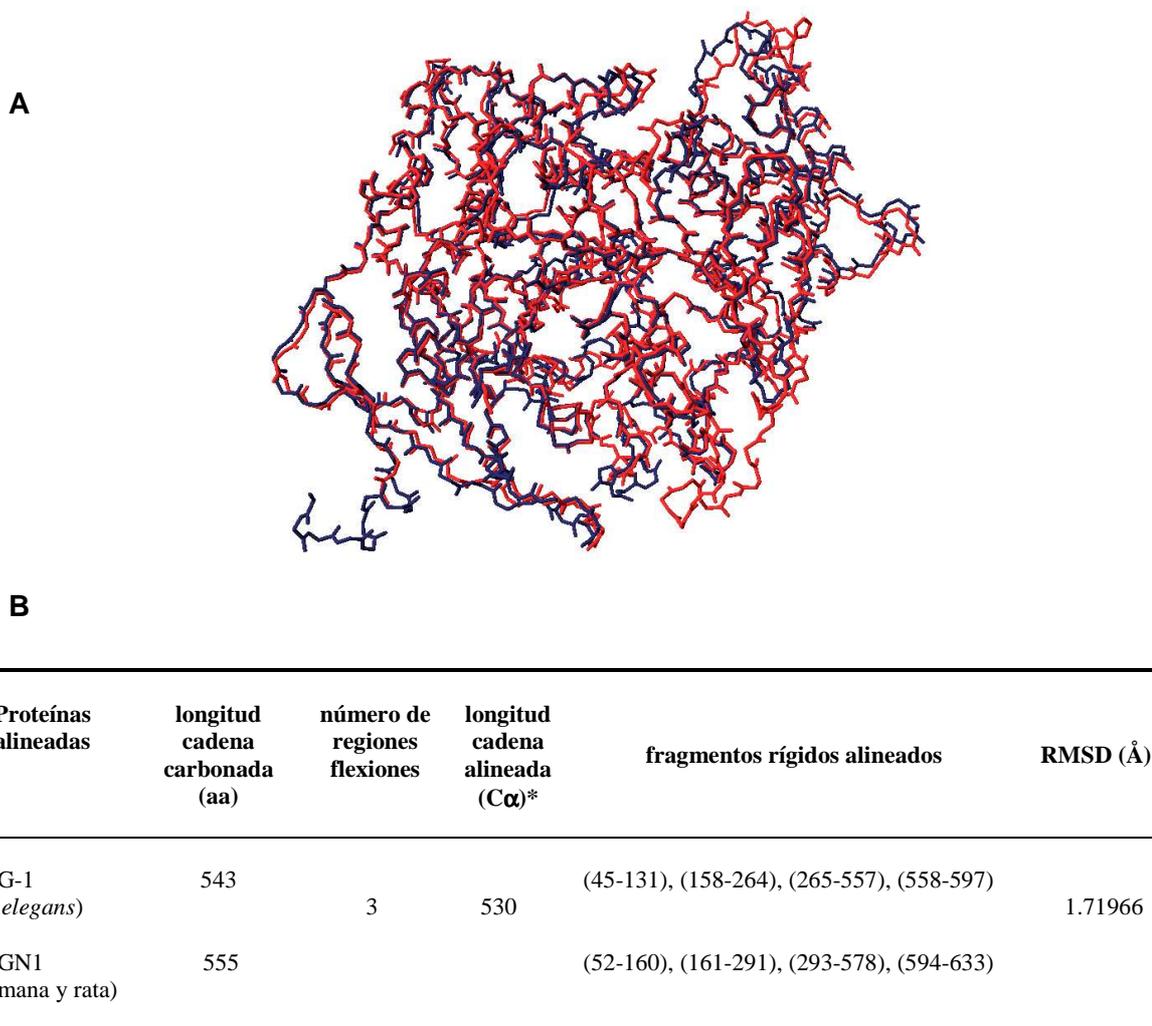
**Figura 13. Cuantificación del rescate funcional de la estirpe mutante VC228 *nlg-1 (ok259) X* con los genes *NLGN1* humano y *Nlgn1* de rata.** Se representa la capacidad de respuesta ante una barrera osmótica de una solución de fructosa 4M, de los animales portadores de cada uno de los transgenes comparada con la de animales *knockout* en *nlg-1*. Como estirpes controles se usaron la estirpe transgénica VC228 *nlg-1 (ok259) X; [nrx-1::gfp]* que expresa la proteína GFP bajo el control del promotor del gen *nrx-1*, y la estirpe transgénica de rescate VC228 *nlg-1 (ok259) X; [pPD95.77 (NLGN1); nrx-1::gfp]* que ha perdido el *array* portador del plásmido de rescate y el plásmido marcador. Se muestran los resultados de dos de las cuatro líneas transgénicas obtenidas portadoras de los genes *NLGN1* y *Nlgn1*. El \* indica una diferencia significativa ( $p \leq 0,001$ ) con la estirpe VC228 *nlg-1 (ok259) X* calculado mediante una prueba *t-Student*. Las barras de error indican la desviación estándar de al menos tres experimentos independientes.

En vista de estos resultados se realizó un alineamiento 3D entre las proteínas NLG-1 de *C. elegans* y NLGN1 humana y rata, para determinar la identidad estructural y comprobar la conservación a nivel de estructura entre ellas, obteniéndose un valor RMSD (*Root Mean Square Deviation*) de 1,71966 (Figura 14). Este valor indica una considerable identidad estructural, puesto que las secuencias proteicas de NLGN1 de humanos y rata son casi idénticas a nivel estructural y el valor RMSD calculado entre ellas es de 2,99076 sobre 3,00.

En la funcionalidad de la neuroliquina son importantes la participación de los motivos de unión a PSD-95 y “*Dendrite Targeting*” (Chen, Tari et al. 2010). Ambos motivos, situados en el dominio intracelular de la neuroliquina, son los encargados de contactar con el entramado intracelular de la neurona para contribuir con la respuesta sináptica. En la construcción de rescate con el gen *Nlgn1* de rata era clave que la inserción de la proteína EGFP no interrumpiera a estos dos motivos, por eso se decidió usar la construcción elegida dejando integro el dominio intracelular (Figura 8). El motivo de unión a PSD-95 está altamente conservado en todas las neuroliquinas de mamíferos. En *C. elegans* NLG-1 tiene dos residuos conservados: QV, (Figura

15A). En la secuencia del motivo “*Dendrite Targeting*”, *C. elegans* comparte 14 de los 32 residuos que forman este motivo con la NLGN1 humana y de rata (Figura 15B).

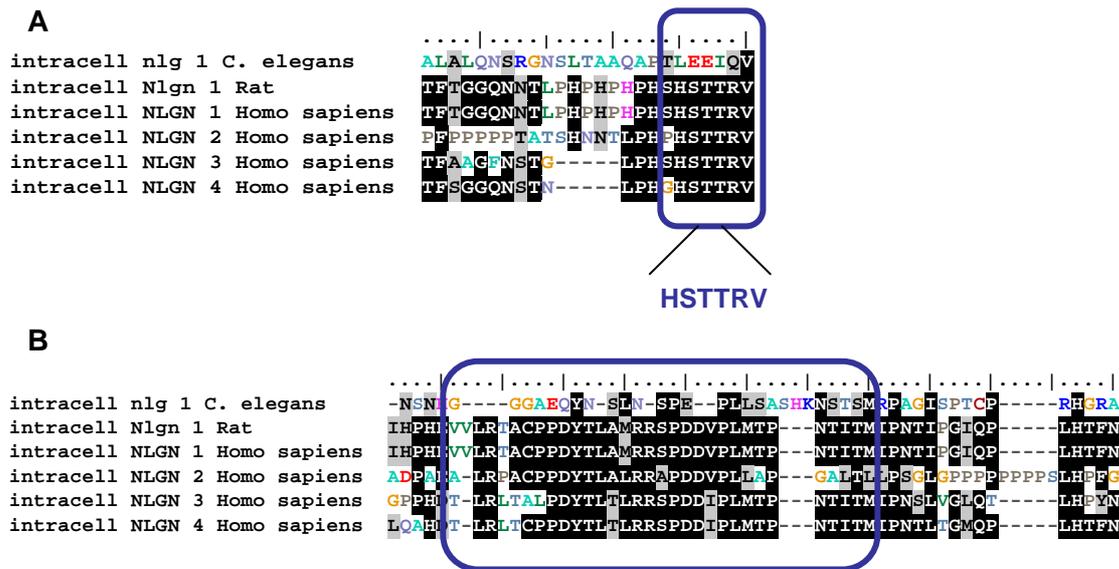
Teniendo en cuenta estos resultados a nivel estructural y de homología de las neuroliquinas de mamíferos con las de *C. elegans*, es factible pensar que exista un complementación funcional del circuito sináptico de los mutantes *nlg-1* del nematodo.



**Figura 14. Alineamiento estructural de las proteínas neuroliquina-1 de *C. elegans* y humana** **A.** Alineamiento de los esqueletos carbonados correspondientes a las proteínas NLG-1 de *C. elegans* (azul) y NLGN1 humana y rata (rojo). **B.** Resultados obtenidos por la plataforma bioinformática *FlexProt*, para el alineamiento y comparación 3D de proteínas (Shatsky, Nussinov et al. 2002). El parámetro RMSD (*Root Mean Square Deviation*) indica la medida de la distancia media entre los esqueletos carbonados de proteínas superpuestas. Este parámetro fue usado para la realización de una comparación cuantitativa entre ambas proteínas; comparando dos a dos los carbonos alpha de cada una de ellas.  $RMSD = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^{i=N} \sigma_i^2}$ ;

donde  $\sigma$  es la distancia entre N pares de Cα equivalentes. Las secuencias proteicas de NLGN1 humana y rata son casi idénticas a nivel estructural, el valor RMSD calculado entre ellas es de 2,99076 sobre 3,00.

\* Número de carbonos alpha (Cα) que componen el esqueleto carbonado de la proteína.



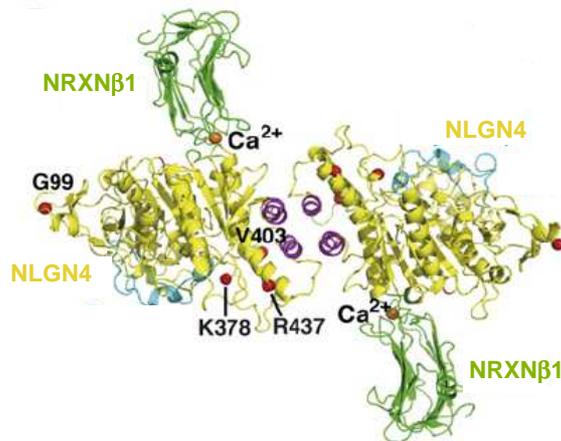
**Figura 15.** Comparación de los motivos de unión a PSD-95 (A) y “Dendrite Targeting” (B) de las neuroliguinas humanas y de rata con la NLG-1 de *C. elegans*. El motivo de unión a PSD-95 se encuentra conservado totalmente en todas las neuroliguinas humanas y de rata. Los cuadros azules marcan la secuencia proteica correspondiente a ambos motivos. En A se destaca la secuencia conservada de unión a PSD-95. El alineamiento de las secuencias proteicas fue realizado mediante el método Clustal W.

## 5. Efecto de mutaciones en los genes *NLGN1* y *nlg-1* en su funcionalidad.

Se han descrito varias mutaciones asociadas con autismo que se localizan en el dominio extracelular de las proteínas humanas NLGN3 y NLGN4 (Tabuchi and Sudhof 2002; Comoletti, De Jaco et al. 2004; Tabuchi, Blundell et al. 2007). Estas mutaciones se encuentran distantes del sitio de unión a neurexina (Fabrichny, Leone et al. 2007). En una de las mutaciones, la sustitución por Cys en el residuo Arg451 de NLGN3 (correspondiente al residuo Arg437 de NLGN4), provoca la retención de la proteína en el retículo endoplasmático no produciéndose su transporte hacia la membrana e impidiendo así la unión a NRX1 $\beta$  (Comoletti, De Jaco et al. 2004). En estudios in vivo, utilizando ratones *knockout* portadores de esta mutación, se observa un incremento de la actividad inhibitoria de GABA y una disminución en la interacción social con el resto de ratones (Tabuchi, Blundell et al. 2007).

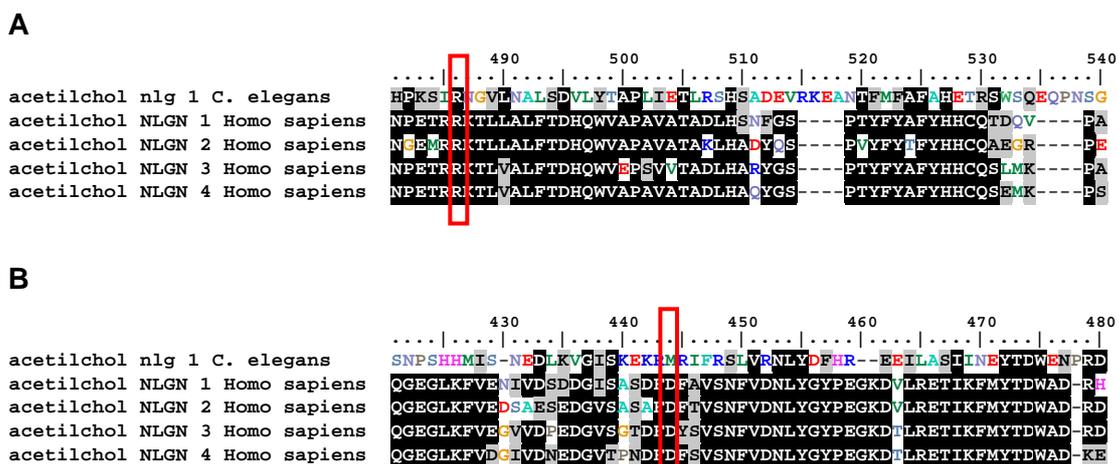
También han sido observadas en pacientes con autismo las mutaciones Gly99Ser, Lys378Arg y Val403Met, en el dominio extracelular de NLGN4. El residuo Gly99 se localiza en un giro que precede a la cadena  $\beta$ 3, no afectando al plegamiento de la proteína ni a su unión con neurexina. La mutación Val403 se localiza cercana del final de la hélice  $\alpha^2_{7,8}$  (Asn493-Leu406). Este residuo participa en el empaquetamiento de  $\alpha^2_{7,8}$  con el conjunto de cuatro hélices (mostradas en violeta en la Figura 16) que permiten la dimerización de la neuroliguina. Esta mutación se

traduce en un mal plegamiento de la región C-terminal de la proteína impidiendo así la formación de un dímero de neuroliquina funcional.



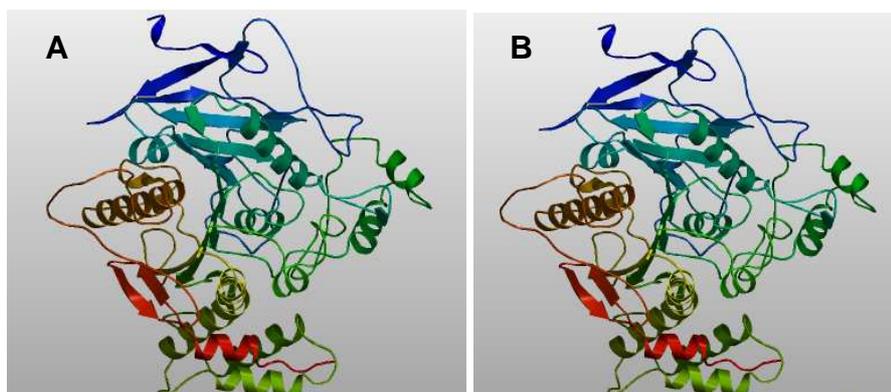
**Figura 16. Localización de algunas mutaciones en la NLGN4 humana descritas en autismo.** Se muestran las mutaciones en los residuos G99, K378, R437 y V403. En la Figura se muestra un dímero de dos moléculas de NLGN4 (representadas en amarillo) unidas mediante la zona de dimerización (mostrado con cuatro hélices violetas), y su unión a NRXNβ1 (mostrada en verde). Adaptado de Fabrichny et al., (Fabrichny, Leone et al. 2007).

Para determinar si las mutaciones descritas en algunos casos de autismo afectaban a la funcionalidad de NLGN1 en *C. elegans*, se seleccionaron las mutaciones Arg451Cys (exón 7, *NLGN3*) y Asp396X (exón 5, *NLGN4*) en dicha proteína (Jamain, Quach et al. 2003). La primera mutación se trata de una mutación de cambio de sentido, que como se ha descrito provoca la retención de la proteína en el retículo endoplasmático; mientras que la segunda se trata de una mutación sin sentido donde hay una sustitución del aminoácido Asp por un codón de fin de mensaje, produciéndose una proteína truncada no funcional. El residuo Arg451 se encuentra conservado en los genes *NLGN1* y *nlg-1*, y el residuo Asp396 solo en el gen *NLGN1* (Figura 17).



**Figura 17. Conservación de los residuos Arg451 (*NLGN3*) y Asp396 (*NLGN4*) en los genes *NLGN1* y *nlg-1*.** El residuo Arg451 de la proteína NLGN3 humana, se encuentra conservada en las proteínas NLGN1 humana y NLG-1 de *C. elegans* (A). El residuo Asp396 de la proteína NLGN4 humana se encuentra conservado solo en la proteína NLGN1 humana (B). Los cuadros rojos indican la posición de los residuos mutados. El alineamiento de las secuencias proteicas fue realizado mediante el método Clustal W.

Para estudiar el efecto conformacional de la mutación Arg451Cys en las proteínas NLGN1 humana y NLG-1 de *C. elegans* y Asp396X en NLGN1, se realizaron modelos tridimensionales teóricos para determinar defectos estructurales en las mismas (Figuras 19 y 21). En la proteína NLG-1 la mutación Arg451Cys produce dos láminas  $\beta$  (15 y 16) de mayor longitud (entre los residuos 543-557) que en la proteína silvestre, que afecta también a la horquilla  $\beta$  que unen a ambas (Figura 19B y C). Estas dos láminas se encuentran precedidas por la  $\alpha$  hélice 25 (Figura 19B) formando el conjunto  $\alpha$ hélice25-lámina $\beta$ 15-horquilla $\beta$ -lámina $\beta$ 16, que rodea a uno de los residuos que intervienen en la unión del catión  $\text{Ca}^{2+}$  necesario para el establecimiento de la interacción con la molécula de neurexina. Posiblemente la modificación de la estructura secundaria correspondiente al conjunto lámina $\beta$ 15-horquilla $\beta$ -lámina $\beta$ 16 por esta mutación, se podría traducir en la desestabilización o interrupción parcial de la unión del catión  $\text{Ca}^{2+}$ , que impediría la correcta unión con la neurexina.

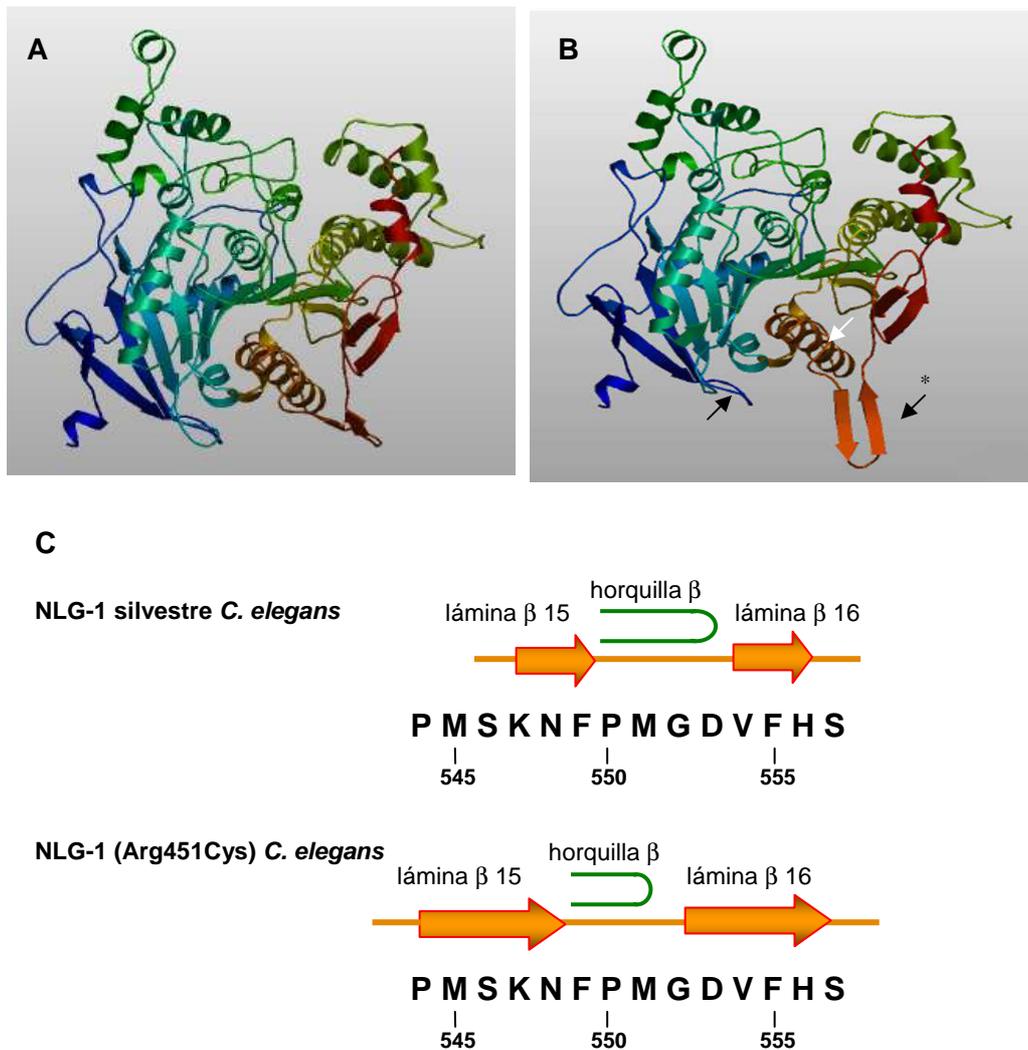


**Figura 18: Modelo tridimensional teórico de la proteína NLGN4 silvestre humana (A) y de la proteína originadas por la mutación Arg451Cys (B).** Ambos modelos fueron generados usando el motor bioinformático “Swiss-Model Proteomic serve” (Guex and Peitsch 1997; Schwede, Kopp et al. 2003; Arnold, Bordoli et al. 2006).

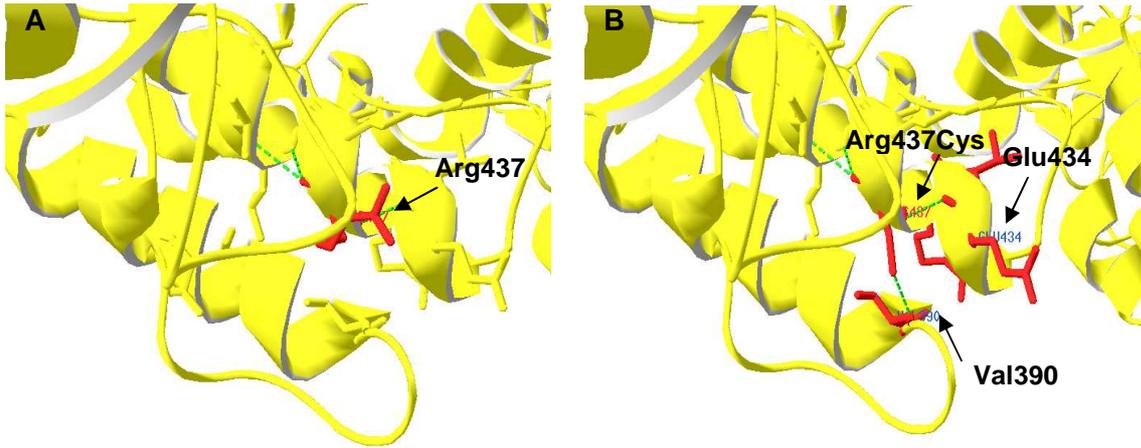
Mediante análisis bioinformático se estudió el efecto de la mutación Arg437Cys en la proteína NLG-1 de *C. elegans*, específicamente sobre la  $\alpha$ -hélice 25. Se observó la aparición de nuevas interacciones establecidas con el residuo Cys437 introducido. Las más destacadas, entre otras interacciones que se producen, son las del residuo Glu434 y con el residuo Val390. Éste último está localizado en la hélice (-1) que debido a un giro cambia su orientación en el espacio, y se encuentra enfrentada a otra región de la misma hélice (Figura 20). Esta interacción aporta un cierto grado de rigidez y tensión a la hélice que no se encuentra en la proteína silvestre.

En la proteína NLGN1, la mutación Arg451Cys no mostró ningún cambio conformacional detectable en relación a la proteína silvestre (Figura 21A y B). En la proteína NLGN4, esta mutación afecta al motivo  $\alpha^4_{7,8}$ , y como se ha comentado produce la retención de la proteína en el retículo endoplasmático (Comoletti et al., 2004), no observándose un cambio conformacional similar al de NLG-1 en la misma región de la proteína (Figura 19).

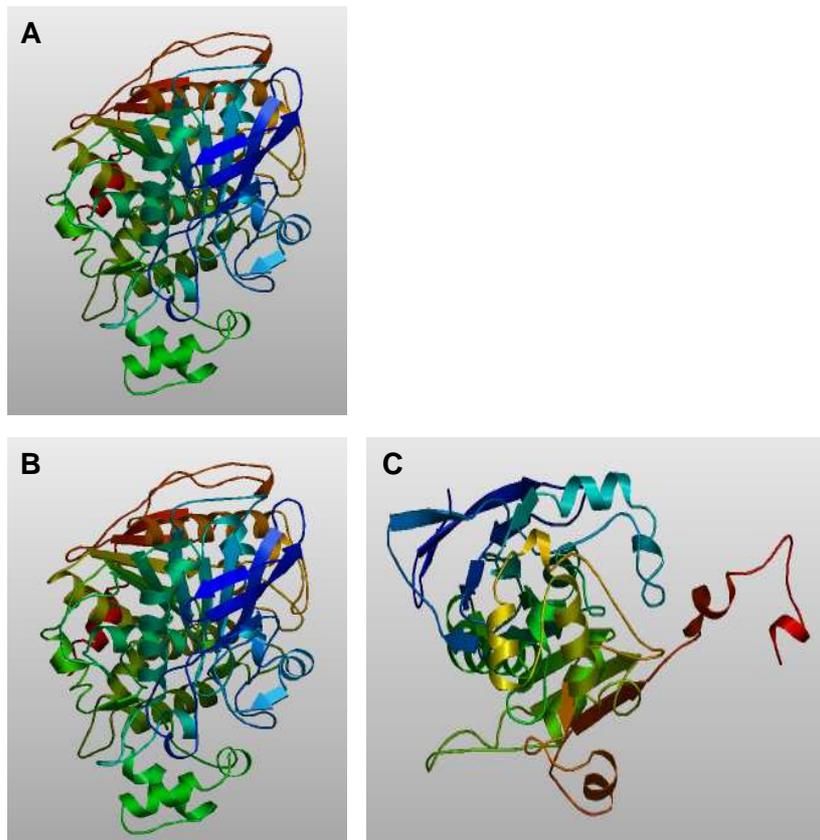
Como era de esperar, la mutación Asp396X produce un cambio drástico en la conformación espacial de NLGN1 (Figura 21C). Esta isoforma truncada carece de parte del dominio extracelular (residuos 396-697), así como del dominio transmembrana y citosólico. Aunque la secuencia correspondiente al péptido señal se encuentra intacta, la proteína truncada no tiene capacidad de anclaje a la membrana plasmática, ni de contactar con el resto de proteínas intracelulares.



**Figura 19. Modelo tridimensional teórico de la proteína NLG-1 silvestre de *C. elegans* (A) y de la proteína originada por la mutación Arg451Cys (B). Las flechas negras en B indican los cambios conformacionales producidos por la mutación, y la flecha blanca marca la  $\alpha$  hélice 25. C. Detalle del cambio en la estructura secundaria de la proteína NLG-1 (Arg451Cys) de *C. elegans* en el motivo estructural (correspondiente a las láminas  $\beta$  15 y 16) marcado con \* en B; se producen dos láminas de mayor longitud entre los residuos 543-557 que en la proteína silvestre. Ambos modelos fueron generados usando el motor bioinformático “Swiss-Model Proteomic serve” (Guex and Peitsch 1997; Schwede, Kopp et al. 2003; Arnold, Bordoli et al. 2006).**

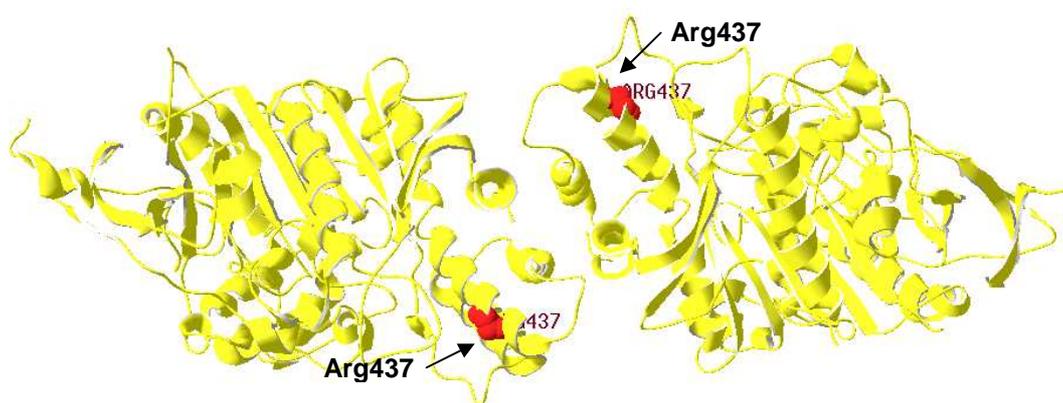


**Figura 20. Detalle de la  $\alpha$ -hélice 25 de la proteína NLG-1 de *C. elegans*.** En la Figura se muestra parte de la  $\alpha$ -hélice donde se localiza la mutación Arg437Cys insertada. En **A** se muestra la posición dentro de la hélice del residuo Arg437. En **B** se muestran las nuevas interacciones que se establecen con el residuo Cys437 introducido en la mutación. Los residuos aminoácidos se representan en rojo. Las interacciones entre residuos se representan mediante líneas punteadas verdes; la interacción establecida con el residuo Val390 no es visible por encontrarse por detrás del plano de la  $\alpha$ -hélice. El modelo fue realizado con la herramienta bioinformática *PDBviewer* (*Protein Data Bank*).



**Figura 21. Modelo tridimensional teórico de la proteína NLGN1 silvestre humana (A) y de la proteínas originadas por la mutación Arg451Cys (B) y Asp396X (C).** Ambos modelos fueron generados usando el motor bioinformático “*Swiss-Model Proteomic server*” (Guex and Peitsch 1997; Schwede, Kopp et al. 2003; Arnold, Bordoli et al. 2006).

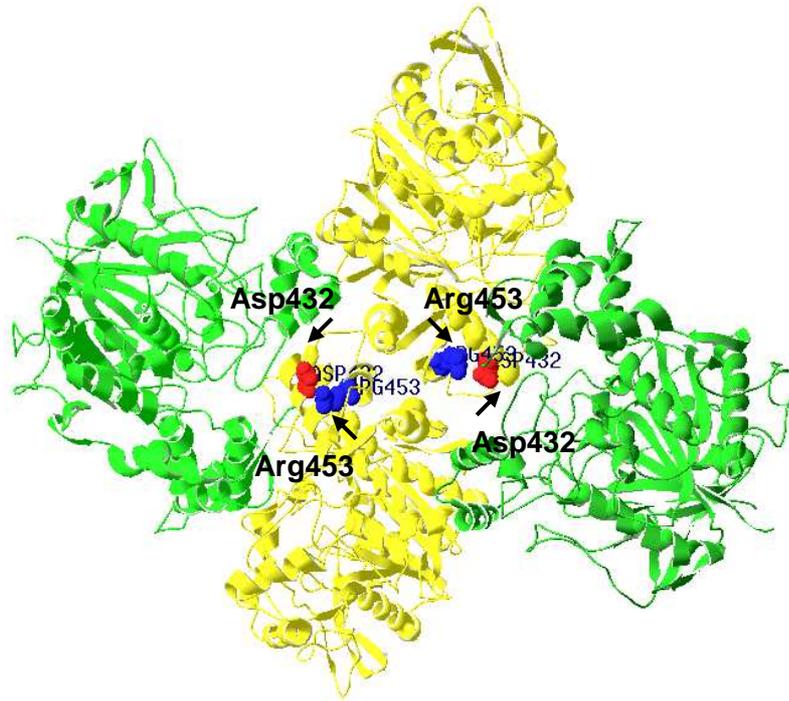
Mediante mutagénesis dirigida se introdujo la mutación Arg451Cys en los genes *NLGNI* (correspondiente al residuo Arg453) y *nlg-1* (correspondiente al residuo Arg437), y la mutación Asp396X en el gen *NLGNI* (correspondiente al residuo Asp432) (Figura 22 y 23). Las secuencias de los cDNAs portadores de las mutaciones descritas correspondientes a ambos genes, fueron introducidas en animales mutantes *nlg-1* mediante microinyección. El efecto de estas mutaciones en la funcionalidad de las neuroliquinas fue determinado mediante el análisis fenotípico de los animales transgénicos, y comparado con las líneas transgénicas portadoras de los genes funcionales *NLGNI* humano y *Nlgn1* de rata.



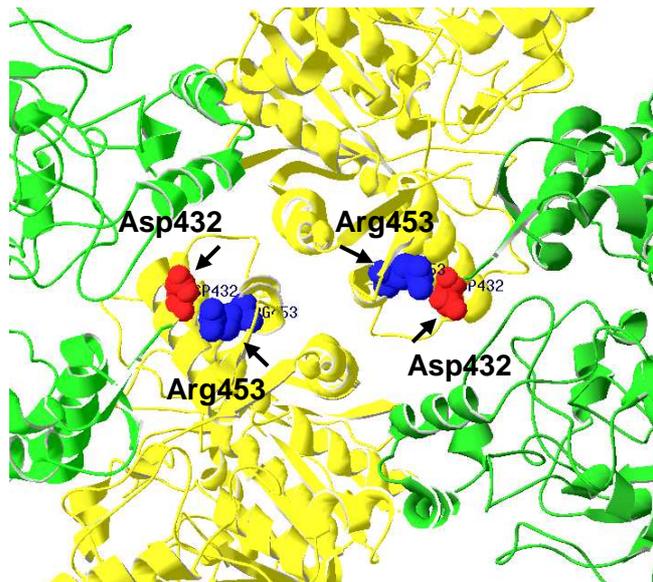
**Figura 22. Modelo tridimensional teórico de la proteína NLG-1 de *C. elegans*, donde se muestra el residuo Arg437 (marcado en rojo) que fue sustituido por el residuo Cys.** En el modelo se representa un dímero formado por dos monómeros de neuroliquina, representado en amarillo. El residuo Arg437 se encuentra señalado en ambos monómeros. El modelo fue realizado con la herramienta bioinformática PDBviewer (Protein Data Bank).

Se analizó la respuesta al estrés osmótico (solución 4M fructosa) en los animales transgénicos portadores de las mutaciones Arg453Cys en el gen *NLGNI*, Arg437Cys en el gen *nlg-1* y Asp396X en el gen *NLGNI*. Los animales portadores de la mutación Arg453Cys (*NLGNI*) y Arg437Cys (*nlg-1*), presentaron una disminución en la respuesta con respecto a las estirpes transgénicas portadoras de los genes *NLGNI* y *nlg-1* sin mutar. Esta disminución fue muy acusada en el caso de la mutación Arg437Cys (*nlg-1*) (Figura 24). Se observó una respuesta aún más atenuada en los animales transgénicos portadores de la mutación Asp396X (*NLGNI*) con respecto a la mutación Arg453Cys (*NLGNI*) (Figura 24). Esto era de esperar, puesto que la mutación Asp396X (*NLGNI*) provoca una proteína truncada no funcional (Figura 21C).

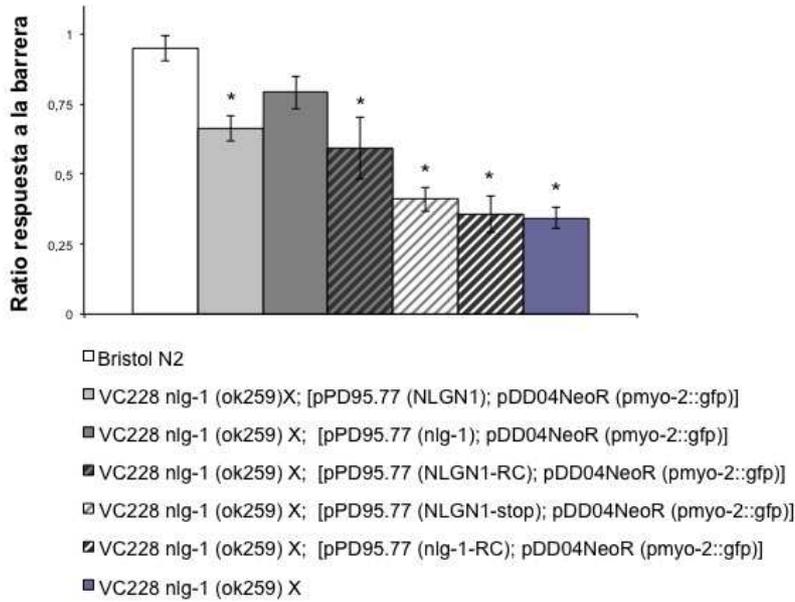
A



B



**Figura 23. A. Modelo tridimensional de la proteína NLGN1 humana**, donde se muestran los residuos Arg453 (marcado en azul) que fue sustituido por el residuo Cys, y el residuo Asp432 (marcado en rojo) que fue sustituido por un aminoácido de fin de mensaje. En el modelo se representa un dímero formado por dos monómeros de neuroliguina, representado en amarillo. A cada monómero de neuroliguina se une una molécula de neurexina, representada en verde. **B.** Vista detallada de la localización de las mutaciones descritas. Los residuos mutados aparecen señalados en cada uno de los monómeros de neuroliguina. El modelo fue realizado con la herramienta bioinformática *PDBviewer* (*Protein Data Bank*).



**Figura 24. Cuantificación del efecto de las mutaciones Arg453Cys (*NLGN1*), Asp396X (*NLGN1*) y Arg437Cys (*nlg-1*).** Se representa la capacidad de respuesta ante una barrera osmótica de una solución de fructosa 4M, de los animales portadores de cada una de las mutaciones con la de animales *knockout* en *nlg-1* y silvestres. Como estirpes controles se usaron dos estirpes transgénicas, portadoras de los genes *NLGN1* humano y *nlg-1* de *C. elegans*. El \* indica una diferencia significativa ( $p \leq 0,001$ ) con la estirpe silvestre Bristol N2 calculado mediante una prueba *t-Student*. Las barras de error indican la desviación estándar de al menos tres experimentos independientes.

# **Conclusiones**

1.- Se ha detectado una asociación significativa del alelo *5HTTLPR-S* del promotor del gen *SLC6A4* y una población homogénea de pacientes diagnosticados con autismo. Este alelo, que causa una menor expresión del transportador de serotonina, se transmitía de forma preferencial por la línea materna.

2.- En *Caenorhabditis elegans* los genes *nrx-1* y *nlg-1*, que codifican neurexina y neuroligina respectivamente, son ortólogos a los genes humanos *NRXN1* y *NLGNI* implicados en casos de autismo. Los dominios funcionales de estas proteínas están conservados en ambas especies.

3.- Los mutantes deficientes en neurexina y/o neuroligina de *C. elegans* presentan alteraciones del comportamiento, incluyendo el ciclo de defecación, la tasa de movimiento, la capacidad de exploración, la respuesta mecanosensorial y la capacidad de respuesta a choque osmótico. Los cambios en el comportamiento detectados están relacionados con la actividad de los neurotransmisores acetilcolina, GABA, dopamina y serotonina.

4.- Los patrones de expresión de los genes *nrx-1* y *nlg-1*, determinados mediante estirpes transgénicas obtenidas por la fusión de sus promotores con las secuencias codificantes de las proteínas GFP y/o mCherry; se circunscriben al sistema nervioso del nematodo, identificándose la expresión de los mismos en neuronas del cordón nervioso ventral y en ganglios de la cabeza.

5.- Se ha conseguido, en estirpes transgénicas que expresan el cDNA del gen *NLGNI* humano o *Nlgn1* de rata, el rescate funcional de mutantes de *C. elegans* deficientes en el gen *nlg-1*. Cuando el cDNA era portador de la mutación Asp396X descrita en casos de autismo, no se producía el rescate del fenotipo silvestre.

6.- Los resultados obtenidos en esta tesis permiten concluir que *C. elegans* es una alternativa prometedora, y que podría utilizarse como una herramienta útil para analizar mecanismos neurobiológicos básicos implicados en el autismo.

# **Bibliografía**

- Amir, R. E., I. B. Van den Veyver, et al. (1999). "Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2." Nat Genet **23**(2): 185-8.
- Amir, R. E., I. B. Van den Veyver, et al. (1999). "Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2." Nat Genet **23**(2): 185-8.
- Anderson, G. M., D. X. Freedman, et al. (1987). "Whole blood serotonin in autistic and normal subjects." J Child Psychol Psychiatry **28**(6): 885-900.
- Arac, D., A. A. Boucard, et al. (2007). "Structures of neuroligin-1 and the neuroligin-1/neurexin-1 beta complex reveal specific protein-protein and protein-Ca<sup>2+</sup> interactions." Neuron **56**(6): 992-1003.
- Arking, D. E., D. J. Cutler, et al. (2008). "A common genetic variant in the neurexin superfamily member CNTNAP2 increases familial risk of autism." Am J Hum Genet **82**(1): 160-4.
- Arnold, K., L. Bordoli, et al. (2006). "The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling." Bioinformatics **22**(2): 195-201.
- Auld, V. J., R. D. Fetter, et al. (1995). "Glotactin, a novel transmembrane protein on peripheral glia, is required to form the blood-nerve barrier in *Drosophila*." Cell **81**(5): 757-67.
- Avery, L. and J. Thomas (1997). "Feeding and Defecation." In C elegans II Edited by: Riddle DL. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Press: 679-716.
- Bacchelli, E. and E. Maestrini (2006). "Autism spectrum disorders: molecular genetic advances." Am J Med Genet C Semin Med Genet **142C**(1): 13-23.
- Bargmann, C. and I. Mori (1997). "Chemotaxis and Thermotaxis." In: Riddle DL, Blumenthal T, Meyer BJ and Priess JR, editors. C elegans II: Cold Spring Harbor.
- Bargmann, C. I., J. H. Thomas, et al. (1990). "Chemosensory cell function in the behavior and development of *Caenorhabditis elegans*." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **55**: 529-38.
- Barstead, R. J., L. Kleiman, et al. (1991). "Cloning, sequencing, and mapping of an alpha-actinin gene from the nematode *Caenorhabditis elegans*." Cell Motil Cytoskeleton **20**(1): 69-78.
- Baylis, H. A. (2005). "VAV's got rhythm." Cell **123**(1): 5-7.
- Ben Arous, J., S. Laffont, et al. (2009). "Molecular and sensory basis of a food related two-state behavior in *C. elegans*." PLoS One **4**(10): e7584.
- Berezikov, E., C. I. Bargmann, et al. (2004). "Homologous gene targeting in *Caenorhabditis elegans* by biolistic transformation." Nucleic Acids Res **32**(4): e40.
- Berkel, S., C. R. Marshall, et al. (2010). "Mutations in the SHANK2 synaptic scaffolding gene in autism spectrum disorder and mental retardation." Nat Genet **42**(6): 489-91.
- Biswas, S., R. J. Russell, et al. (2008). "Bridging the synaptic gap: neuroligins and neurexin I in *Apis mellifera*." PLoS One **3**(10): e3542.
- Blundell, J., C. A. Blaiss, et al. (2011). "Neuroligin-1 deletion results in impaired spatial memory and increased repetitive behavior." J Neurosci **30**(6): 2115-29.
- Blundell, J., K. Tabuchi, et al. (2009). "Increased anxiety-like behavior in mice lacking the inhibitory synapse cell adhesion molecule neuroligin 2." Genes Brain Behav **8**(1): 114-26.

- Bolliger, M. F., K. Frei, et al. (2001). "Identification of a novel neuroligin in humans which binds to PSD-95 and has a widespread expression." Biochem J **356**(Pt 2): 581-8.
- Bonaglia, M. C., R. Giorda, et al. (2001). "Disruption of the ProSAP2 gene in a t(12;22)(q24.1;q13.3) is associated with the 22q13.3 deletion syndrome." Am J Hum Genet **69**(2): 261-8.
- Bot, N., C. Schweizer, et al. (2011). "Processing of the synaptic cell adhesion molecule neurexin-3beta by Alzheimer disease alpha- and gamma-secretases." J Biol Chem **286**(4): 2762-73.
- Boucard, A. A., A. A. Chubykin, et al. (2005). "A splice code for trans-synaptic cell adhesion mediated by binding of neuroligin 1 to alpha- and beta-neurexins." Neuron **48**(2): 229-36.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-54.
- Branicky, R. and S. Hekimi (2006). "What keeps *C. elegans* regular: the genetics of defecation." Trends Genet **22**(10): 571-9.
- Brenner, S. (1974). "The genetics of *Caenorhabditis elegans*." Genetics **77**: 71-94.
- Brenner, S. (2003). "Nobel lecture. Nature's gift to science." Biosci Rep **23**(5-6): 225-37.
- Budreck, E. C. and P. Scheiffele (2007). "Neuroligin-3 is a neuronal adhesion protein at GABAergic and glutamatergic synapses." Eur J Neurosci **26**(7): 1738-48.
- Calahorra, F., E. Alejandre, et al. (2009). "Osmotic avoidance in *Caenorhabditis elegans*: synaptic function of two genes, orthologues of human NRXN1 and NLGN1, as candidates for autism." J Vis Exp(34).
- Calahorra, F. e. a. (2009). "A preliminary study of gene polymorphisms involved in the neurotransmitters metabolism of a homogeneous Spanish autistic group." Research in Autism Spectrum Disorders **3**: 438-443.
- Calahorra, F. e. a. (2009). "A preliminary study of gene polymorphisms involved in the neurotransmitters metabolism of a homogeneous Spanish autistic group." Research in Autism Spectrum Disorders **3**: 438-443.
- Cantwell, D. P. (1996). "Classification of child and adolescent psychopathology." J Child Psychol Psychiatry **37**(1): 3-12.
- Colbert, H. A. and C. I. Bargmann (1997). "Environmental signals modulate olfactory acuity, discrimination, and memory in *Caenorhabditis elegans*." Learn Mem **4**(2): 179-91.
- Comoletti, D., A. De Jaco, et al. (2004). "The Arg451Cys-neuroligin-3 mutation associated with autism reveals a defect in protein processing." J Neurosci **24**(20): 4889-93.
- Comoletti, D., R. E. Flynn, et al. (2006). "Gene selection, alternative splicing, and post-translational processing regulate neuroligin selectivity for beta-neurexins." Biochemistry **45**(42): 12816-27.
- Connors, S. L., K. J. Matteson, et al. (2006). "Plasma serotonin in autism." Pediatr Neurol **35**(3): 182-6.
- Consortium, C. e. S. (1998). "Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology." Science **282**(5396): 2012-8.
- Craig, A. M. and Y. Kang (2007). "Neurexin-neuroligin signaling in synapse development." Curr Opin Neurobiol **17**(1): 43-52.
- Chalfie, M. (2009). "GFP: lighting up life (Nobel Lecture)." Angew Chem Int Ed Engl **48**(31): 5603-11.

- Chalfie, M., and Sulston, J. (1981). "Developmental genetics of the mechanosensory neurons of *Caenorhabditis elegans*." Dev. Bio **82**: 358-370.
- Chalfie, M. and J. Sulston (1981). "Developmental genetics of the mechanosensory neurons of *Caenorhabditis elegans*." Dev Biol **82**(2): 358-70.
- Chamak, B. and D. Cohen (2003). "[Autism: toward a necessary cultural revolution]." Med Sci (Paris) **19**(11): 1152-9.
- Chen, K., E. O. Gracheva, et al. (2010). "Neurexin in embryonic *Drosophila* neuromuscular junctions." PLoS One **5**(6): e11115.
- Chen, S. X., P. K. Tari, et al. (2010). "Neurexin-neuroigin cell adhesion complexes contribute to synaptotropic dendritogenesis via growth stabilization mechanisms in vivo." Neuron **67**(6): 967-83.
- Chih, B., L. Gollan, et al. (2006). "Alternative splicing controls selective trans-synaptic interactions of the neuroigin-neurexin complex." Neuron **51**(2): 171-8.
- Ching, M. S., Y. Shen, et al. (2011). "Deletions of NRXN1 (neurexin-1) predispose to a wide spectrum of developmental disorders." Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet **153B**(4): 937-47.
- Chubykin, A. A., D. Atasoy, et al. (2007). "Activity-dependent validation of excitatory versus inhibitory synapses by neuroigin-1 versus neuroigin-2." Neuron **54**(6): 919-31.
- Dahlhaus, R. and A. El-Husseini (2010). "Altered neuroigin expression is involved in social deficits in a mouse model of the fragile X syndrome." Behav Brain Res **208**(1): 96-105.
- Dal Santo, P., M. A. Logan, et al. (1999). "The inositol trisphosphate receptor regulates a 50-second behavioral rhythm in *C. elegans*." Cell **98**(6): 757-67.
- De Jaco, A., M. Z. Lin, et al. (2011). "Neuroigin trafficking deficiencies arising from mutations in the alpha/beta-hydrolase fold protein family." J Biol Chem **285**(37): 28674-82.
- de la Escalera, S., E. O. Bockamp, et al. (1990). "Characterization and gene cloning of neurotactin, a *Drosophila* transmembrane protein related to cholinesterases." Embo J **9**(11): 3593-601.
- Dean, C., F. G. Scholl, et al. (2003). "Neurexin mediates the assembly of presynaptic terminals." Nat Neurosci **6**(7): 708-16.
- Devlin, B., E. H. Cook, Jr., et al. (2005). "Autism and the serotonin transporter: the long and short of it." Mol Psychiatry **10**(12): 1110-6.
- Dresbach, T., A. Neeb, et al. (2004). "Synaptic targeting of neuroigin is independent of neurexin and SAP90/PSD95 binding." Mol Cell Neurosci **27**(3): 227-35.
- Driscoll, M. and J. Kaplan (1997). "Mechanotransduction." C. elegans II edited by D. L. Riddle, T. Blumenthal, B. J. Meyer and J. R. Pries(Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor): 645-677.
- Durand, C. M., C. Betancur, et al. (2007). "Mutations in the gene encoding the synaptic scaffolding protein SHANK3 are associated with autism spectrum disorders." Nat Genet **39**(1): 25-7.
- Espelt, M. V., A. Y. Estevez, et al. (2005). "Oscillatory Ca<sup>2+</sup> signaling in the isolated *Caenorhabditis elegans* intestine: role of the inositol-1,4,5-trisphosphate receptor and phospholipases C beta and gamma." J Gen Physiol **126**(4): 379-92.
- Etherton, M. R., C. A. Blaiss, et al. (2009). "Mouse neurexin-1alpha deletion causes correlated electrophysiological and behavioral changes consistent with cognitive impairments." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(42): 17998-8003.

- Fabrichny, I. P., P. Leone, et al. (2007). "Structural analysis of the synaptic protein neuroligin and its beta-neurexin complex: determinants for folding and cell adhesion." Neuron **56**(6): 979-91.
- Faraone, S. V., R. H. Perlis, et al. (2005). "Molecular genetics of attention-deficit/hyperactivity disorder." Biol Psychiatry **57**(11): 1313-23.
- Feinberg, E. H., M. K. Vanhove, et al. (2008). "GFP Reconstitution Across Synaptic Partners (GRASP) defines cell contacts and synapses in living nervous systems." Neuron **57**(3): 353-63.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E. and Mello, C.C. (1998). "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*." Nature **391**: 806-811.
- Folstein, S. and M. Rutter (1977). "Infantile autism: a genetic study of 21 twin pairs." J Child Psychol Psychiatry **18**(4): 297-321.
- Folstein, S. E. and B. Rosen-Sheidley (2001). "Genetics of autism: complex aetiology for a heterogeneous disorder." Nat Rev Genet **2**(12): 943-55.
- Fombone, E. (2002). "Prevalence of childhood disintegrative disorder." Autism **6**(2): 149-57.
- Frances, A. and R. Ross (2003). "DSM-IV-TR."
- Fujita, E., H. Dai, et al. (2011). "Autism spectrum disorder is related to endoplasmic reticulum stress induced by mutations in the synaptic cell adhesion molecule, *CADM1*." Cell Death Dis **1**(6): e47.
- Fujiwara, M., P. Sengupta, et al. (2002). "Regulation of body size and behavioral state of *C. elegans* by sensory perception and the EGL-4 cGMP-dependent protein kinase." Neuron **36**(6): 1091-102.
- Gally, C., S. Eimer, et al. (2004). "A transmembrane protein required for acetylcholine receptor clustering in *Caenorhabditis elegans*." Nature **431**(7008): 578-82.
- Garber, K. (2007). "Neuroscience. Autism's cause may reside in abnormalities at the synapse." Science **317**(5835): 190-1.
- Geschwind, D. H. and P. Levitt (2007). "Autism spectrum disorders: developmental disconnection syndromes." Curr Opin Neurobiol **17**(1): 103-11.
- Giordano-Santini, R., S. Milstein, et al. (2011). "An antibiotic selection marker for nematode transgenesis." Nat Methods **7**(9): 721-3.
- Grady, D. L., A. Harxhi, et al. (2005). "Sequence variants of the DRD4 gene in autism: further evidence that rare DRD4 7R haplotypes are ADHD specific." Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet **136**(1): 33-5.
- Graf, E. R., X. Zhang, et al. (2004). "Neurexins induce differentiation of GABA and glutamate postsynaptic specializations via neuroligins." Cell **119**(7): 1013-26.
- Gray, J. M., J. J. Hill, et al. (2005). "A circuit for navigation in *Caenorhabditis elegans*." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(9): 3184-91.
- Guex, N. and M. C. Peitsch (1997). "SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling." Electrophoresis **18**(15): 2714-23.
- Guo, S. a. K., K.J. (1995). "par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed." Cell **81**: 611-620.
- Gupta, A. R. and M. W. State (2007). "Recent advances in the genetics of autism." Biol Psychiatry **61**(4): 429-37.
- Gutierrez, R. C., J. Hung, et al. (2009). "Altered synchrony and connectivity in neuronal networks expressing an autism-related mutation of neuroligin 3." Neuroscience **162**(1): 208-21.

- Haklai-Topper, L., J. Soutschek, et al. (2010). "The neurexin superfamily of *Caenorhabditis elegans*." Gene Expr Patterns.
- Hanahan, D. (1985). "Techniques or transformation of *Escherichia coli*." (G.B) Ed.D. M: Glover.
- Hart (2006). "Behavior." Wormbook.
- Hart, A. C. (2006). "Behavior." WormBook: 1-67.
- Hart, A. C. (2006). "Behavior." WormBook.
- Hart, A. C., S. Sims, et al. (1995). "Synaptic code for sensory modalities revealed by *C. elegans* GLR-1 glutamate receptor." Nature **378**(6552): 82-5.
- Hechtman, L. (1996). "Families of children with attention deficit hyperactivity disorder: a review." Can J Psychiatry **41**(6): 350-60.
- Ho, S. N., H. D. Hunt, et al. (1989). "Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction." Gene **77**(1): 51-9.
- Hobert, O. (2005). "Specification of the nervous system." WormBook: 1-19.
- Hobert, O., Moerman, D.G., Clark, K.A., Beckerle, M.C., and Ruvkun, G. (1999). "A conserved LIM protein that affects muscular adherens junction integrity and mechanosensory function in *Caenorhabditis elegans*." J. Cell Biol. **144**: 45-47.
- Hollander, E., A. Phillips, et al. (2005). "A placebo controlled crossover trial of liquid fluoxetine on repetitive behaviors in childhood and adolescent autism." Neuropsychopharmacology **30**(3): 582-9.
- Hoon, M., T. Soykan, et al. (2011). "Neuroigin-4 is localized to glycinergic postsynapses and regulates inhibition in the retina." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(7): 3053-8.
- Hunter, J. W., G. P. Mullen, et al. (2010). "Neuroigin-deficient mutants of *C. elegans* have sensory processing deficits and are hypersensitive to oxidative stress and mercury toxicity." Dis Model Mech **3**(5-6): 366-76.
- Hutvagner, G. a. Z., P.D (2002). "A microRNA in a multiple turnover RNAi enzyme complex." Science **297**: 2056-2060.
- Ichtchenko, K., T. Nguyen, et al. (1996). "Structures, alternative splicing, and neurexin binding of multiple neuroligins." J Biol Chem **271**(5): 2676-82.
- Iwasaki, K., D. W. Liu, et al. (1995). "Genes that control a temperature-compensated ultradian clock in *Caenorhabditis elegans*." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(22): 10317-21.
- Jamain, S., H. Quach, et al. (2003). "Mutations of the X-linked genes encoding neuroligins NLGN3 and NLGN4 are associated with autism." Nat Genet **34**(1): 27-9.
- Jamain, S., K. Radyushkin, et al. (2008). "Reduced social interaction and ultrasonic communication in a mouse model of monogenic heritable autism." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(5): 1710-5.
- Jorgensen, N., E. M., et al. (1997). "Neuronal plasticity." C. elegans II edited by D. L. Riddle, T. Blumenthal, B. J. Meyer and J. R. Pries (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor): 769-790.
- Kang, C. and L. Avery (2009). "Systemic regulation of starvation response in *Caenorhabditis elegans*." Genes Dev **23**(1): 12-7.
- Kaplan, J. M. and H. R. Horvitz (1993). "A dual mechanosensory and chemosensory neuron in *Caenorhabditis elegans*." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(6): 2227-31.
- Kattenstroth, G., E. Tantalaki, et al. (2004). "Postsynaptic N-methyl-D-aspartate receptor function requires alpha-neurexins." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(8): 2607-12.

- Kim, H. G., S. Kishikawa, et al. (2008). "Disruption of neurexin 1 associated with autism spectrum disorder." Am J Hum Genet **82**(1): 199-207.
- Kindt, K. S., V. Viswanath, et al. (2007). "Caenorhabditis elegans TRPA-1 functions in mechanosensation." Nat Neurosci **10**(5): 568-77.
- Klauck, S. M., F. Poustka, et al. (1997). "Serotonin transporter (5-HTT) gene variants associated with autism?" Hum Mol Genet **6**(13): 2233-8.
- Ko, J., C. Zhang, et al. (2009). "Neuroigin-1 performs neurexin-dependent and neurexin-independent functions in synapse validation." EMBO J **28**(20): 3244-55.
- Koehnke, J., X. Jin, et al. (2008). "Crystal structure of the extracellular cholinesterase-like domain from neuroigin-2." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(6): 1873-8.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-5.
- Lai, C. H., C. Y. Chou, et al. (2000). "Identification of novel human genes evolutionarily conserved in Caenorhabditis elegans by comparative proteomics." Genome Res **10**(5): 703-13.
- Laumonnier, F., F. Bonnet-Brilhault, et al. (2004). "X-linked mental retardation and autism are associated with a mutation in the NLGN4 gene, a member of the neuroigin family." Am J Hum Genet **74**(3): 552-7.
- Lawson-Yuen, A., J. S. Saldivar, et al. (2008). "Familial deletion within NLGN4 associated with autism and Tourette syndrome." Eur J Hum Genet **16**(5): 614-8.
- Lesch, K. P., D. Bengel, et al. (1996). "Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region." Science **274**(5292): 1527-31.
- Lim, M. H., H. W. Kim, et al. (2006). "Association of the DAT1 polymorphism with attention deficit hyperactivity disorder (ADHD): a family-based approach." Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet **141**(3): 309-11.
- Liu, D. W. and J. H. Thomas (1994). "Regulation of a periodic motor program in C. elegans." J Neurosci **14**(4): 1953-62.
- Locke C., B. K., Kautu B., Lee K., Caldwell K. and Caldwell G. (2008). "Paradigms for pharmacological characterization of C. elegans synaptic transmission mutants." Journal of Visualized Experiments.
- Mahoney T.R., L. S. a. N. M. L. (2006). "Analysis of synaptic transmission in Caenorhabditis elegans using an aldicarb-sensitivity assay." Nature Protocols **4**: 1772-1777.
- McDoughle, C. J., S. T. Naylor, et al. (1996). "A double-blind, placebo-controlled study of fluvoxamine in adults with autistic disorder." Arch Gen Psychiatry **53**(11): 1001-8.
- McIntire, S. L., E. Jorgensen, et al. (1993). "Genes required for GABA function in Caenorhabditis elegans." Nature **364**(6435): 334-7.
- McIntire, S. L., E. Jorgensen, et al. (1993). "The GABAergic nervous system of Caenorhabditis elegans." Nature **364**(6435): 337-41.
- McIntire, S. L., R. J. Reimer, et al. (1997). "Identification and characterization of the vesicular GABA transporter." Nature **389**(6653): 870-6.
- Mello, C. C. (2007). "Return to the RNAi world: rethinking gene expression and evolution (Nobel Lecture)." Angew Chem Int Ed Engl **46**(37): 6985-94.
- Miller K.G., A. A., Nguyen M., Crowell J.A., Johnson C.D and Rand J.B. (1996). "A genetic selection for Caenorhabditis elegans synaptic transmission mutants." Neurobiology **93**: 12593-12598.

- Miller, K. G., A. Alfonso, et al. (1996). "A genetic selection for *Caenorhabditis elegans* synaptic transmission mutants." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(22): 12593-8.
- Missler, M., W. Zhang, et al. (2003). "Alpha-neurexins couple Ca<sup>2+</sup> channels to synaptic vesicle exocytosis." Nature **423**(6943): 939-48.
- Moessner, R., C. R. Marshall, et al. (2007). "Contribution of SHANK3 mutations to autism spectrum disorder." Am J Hum Genet **81**(6): 1289-97.
- Nehrke, K., J. Denton, et al. (2008). "Intestinal Ca<sup>2+</sup> wave dynamics in freely moving *C. elegans* coordinate execution of a rhythmic motor program." Am J Physiol Cell Physiol **294**(1): C333-44.
- Newschaffer, C. J., L. A. Croen, et al. (2007). "The epidemiology of autism spectrum disorders." Annu Rev Public Health **28**: 235-58.
- Nishiyama, T., M. Notohara, et al. (2009). "Major contribution of dominant inheritance to autism spectrum disorders (ASDs) in population-based families." J Hum Genet **54**(12): 721-6.
- Okamoto, N., T. Kubota, et al. (2007). "22q13 Microduplication in two patients with common clinical manifestations: a recognizable syndrome?" Am J Med Genet A **143A**(23): 2804-9.
- Olson, P. F., L. I. Fessler, et al. (1990). "Glutactin, a novel *Drosophila* basement membrane-related glycoprotein with sequence similarity to serine esterases." Embo J **9**(4): 1219-27.
- Peters, M. A., T. Teramoto, et al. (2007). "A calcium wave mediated by gap junctions coordinates a rhythmic behavior in *C. elegans*." Curr Biol **17**(18): 1601-8.
- Petrenko, A. G., B. Ullrich, et al. (1996). "Structure and evolution of neurexophilin." J Neurosci **16**(14): 4360-9.
- Philibert, R. A., S. L. Winfield, et al. (2000). "The structure and expression of the human neuroligin-3 gene." Gene **246**(1-2): 303-10.
- Popova, N. K. (2006). "From genes to aggressive behavior: the role of serotonergic system." Bioessays **28**(5): 495-503.
- Powell, C. (2009). "Autism as synaptopathy: animal models based on genetic mutations in trans-synaptic cell adhesion molecules." INSAR, Chicago, 8th annual international meeting for autism research(abstract 122.01).
- Radyushkin, K., K. Hammerschmidt, et al. (2009). "Neuroligin-3-deficient mice: model of a monogenic heritable form of autism with an olfactory deficit." Genes Brain Behav **8**(4): 416-25.
- Rand, J. B., J. S. Duerr, et al. (2000). "Neurogenetics of vesicular transporters in *C. elegans*." Faseb J **14**(15): 2414-22.
- Reissner, C., M. Klose, et al. (2008). "Mutational analysis of the neurexin/neuroligin complex reveals essential and regulatory components." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(39): 15124-9.
- Robatzek, M. and J. H. Thomas (2000). "Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II regulates *Caenorhabditis elegans* locomotion in concert with a G(o)/G(q) signaling network." Genetics **156**(3): 1069-82.
- Rocheleau, C. E., Downs, W.D., Lin, R., Wittmann, C., Bei, Y., Cha, Y.H., Ali, M., Priess, J.R. and Mello, C.C. (1997). "Wnt signaling and an APC-related gene specify endoderm in early *C. elegans* embryos." Cell **90**: 707-716.
- Roeder, T. (2003). "Metabotropic histamine receptors--nothing for invertebrates?" Eur J Pharmacol **466**(1-2): 85-90.
- Rozic-Kotliroff, G. and N. Zisapel (2007). "Ca<sup>2+</sup> -dependent splicing of neurexin IIalpha." Biochem Biophys Res Commun **352**(1): 226-30.

- Ruiz-Rubio, M. and L. A. McInnes (2005). "Serotonin (5-hydroxytryptamine) and the etiology of autism." Studies in Natural Products Chemistry (Attaur Rahman ed. 30(Elsevier B. V.): 367-391.
- Rujescu, D., A. Ingason, et al. (2009). "Disruption of the neurexin 1 gene is associated with schizophrenia." Hum Mol Genet **18**(5): 988-96.
- Rutter, M. (2005). "Incidence of autism spectrum disorders: changes over time and their meaning." Acta Paediatr **94**(1): 2-15.
- Sabol, S. Z., S. Hu, et al. (1998). "A functional polymorphism in the monoamine oxidase A gene promoter." Hum Genet **103**(3): 273-9.
- Sanyal, S., R. F. Wintle, et al. (2004). "Dopamine modulates the plasticity of mechanosensory responses in *Caenorhabditis elegans*." Embo J **23**(2): 473-82.
- Sawin, E. R., R. Ranganathan, et al. (2000). "*C. elegans* locomotory rate is modulated by the environment through a dopaminergic pathway and by experience through a serotonergic pathway." Neuron **26**(3): 619-31.
- Scheiffele, P., J. Fan, et al. (2000). "Neurologin expressed in nonneuronal cells triggers presynaptic development in contacting axons." Cell **101**(6): 657-69.
- Schuske, K., A. A. Beg, et al. (2004). "The GABA nervous system in *C. elegans*." Trends Neurosci **27**(7): 407-14.
- Schwede, T., J. Kopp, et al. (2003). "SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server." Nucleic Acids Res **31**(13): 3381-5.
- Shatsky, M., R. Nussinov, et al. (2002). "Flexible protein alignment and hinge detection." Proteins **48**(2): 242-56.
- Shtonda, B. B. and L. Avery (2006). "Dietary choice behavior in *Caenorhabditis elegans*." J Exp Biol **209**(Pt 1): 89-102.
- Song, J. Y., K. Ichtchenko, et al. (1999). "Neurologin 1 is a postsynaptic cell-adhesion molecule of excitatory synapses." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(3): 1100-5.
- Stinchcomb DT., S. J. E., Carr S.H. and Hirsh D. (1985). "Extrachromosomal DNA transformation of *Caenorhabditis elegans*." Mol Cell Biol **5**: 3484-3496.
- Sudhof, T. C. (2008). "Neurologins and neurexins link synaptic function to cognitive disease." Nature **455**(7215): 903-11.
- Tabuchi, K., J. Blundell, et al. (2007). "A neurologin-3 mutation implicated in autism increases inhibitory synaptic transmission in mice." Science **318**(5847): 71-6.
- Tabuchi, K. and T. C. Sudhof (2002). "Structure and evolution of neurexin genes: insight into the mechanism of alternative splicing." Genomics **79**(6): 849-59.
- Talebizadeh, Z., D. Y. Lam, et al. (2006). "Novel splice isoforms for NLGN3 and NLGN4 with possible implications in autism." J Med Genet **43**(5): e21.
- Taniguchi, H., L. Gollan, et al. (2007). "Silencing of neurologin function by postsynaptic neurexins." J Neurosci **27**(11): 2815-24.
- Teramoto, T. and K. Iwasaki (2006). "Intestinal calcium waves coordinate a behavioral motor program in *C. elegans*." Cell Calcium **40**(3): 319-27.
- Thomas, J. H. (1990). "Genetic analysis of defecation in *Caenorhabditis elegans*." Genetics **124**(4): 855-72.
- Thomas, J. H. (1990). "Genetic analysis of defecation in *Caenorhabditis elegans*." Genetics **124**: 855-872.
- Ullrich, B., Y. A. Ushkaryov, et al. (1995). "Cartography of neurexins: more than 1000 isoforms generated by alternative splicing and expressed in distinct subsets of neurons." Neuron **14**(3): 497-507.
- Ushkaryov, Y. A., A. G. Petrenko, et al. (1992). "Neurexins: synaptic cell surface proteins related to the alpha-latrotoxin receptor and laminin." Science **257**(5066): 50-6.

- Vandenbergh, D. J., A. M. Persico, et al. (1992). "Human dopamine transporter gene (DAT1) maps to chromosome 5p15.3 and displays a VNTR." Genomics **14**(4): 1104-6.
- Varoqueaux, F., G. Aramuni, et al. (2006). "Neuroligins determine synapse maturation and function." Neuron **51**(6): 741-54.
- Varoqueaux, F., S. Jamain, et al. (2004). "Neuroigin 2 is exclusively localized to inhibitory synapses." Eur J Cell Biol **83**(9): 449-56.
- Von Stetina, S. E., M. Treinin, et al. (2006). "The motor circuit." Int Rev Neurobiol **69**: 125-67.
- Von Stetina, S. E., J. D. Watson, et al. (2007). "Cell-specific microarray profiling experiments reveal a comprehensive picture of gene expression in the C. elegans nervous system." Genome Biol **8**(7): R135.
- Waldman, I. D. and I. R. Gizer (2006). "The genetics of attention deficit hyperactivity disorder." Clin Psychol Rev **26**(4): 396-432.
- Wang, E., Y. C. Ding, et al. (2004). "The genetic architecture of selection at the human dopamine receptor D4 (DRD4) gene locus." Am J Hum Genet **74**(5): 931-44.
- Wang, K., H. Zhang, et al. (2009). "Common genetic variants on 5p14.1 associate with autism spectrum disorders." Nature **459**(7246): 528-33.
- Ward, S., N. Thomson, et al. (1975). "Electron microscopical reconstruction of the anterior sensory anatomy of the nematode *Caenorhabditis elegans*." J Comp Neurol **160**(3): 313-37.
- White, J., S. E., et al. (1986). "The structure of the nervous system of the nematode *C. elegans*." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci (314): 1-340.
- Williams, B. D., B. Schrank, et al. (1992). "A genetic mapping system in *Caenorhabditis elegans* based on polymorphic sequence-tagged sites." Genetics **131**(3): 609-24.
- Wittenmayer, N., C. Korber, et al. (2009). "Postsynaptic Neuroigin1 regulates presynaptic maturation." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(32): 13564-9.
- World-Health-Organization (1992). "The ICD-10 classification of mental and behavioural disorders [recurso electrónico] : clinical descriptions and diagnostic guidelines."
- Yan, J., J. Feng, et al. (2008). "Analysis of the neuroigin 4Y gene in patients with autism." Psychiatr Genet **18**(4): 204-7.
- Yan, J., K. Noltner, et al. (2008). "Neurexin 1alpha structural variants associated with autism." Neurosci Lett **438**(3): 368-70.
- Zhang, C., J. M. Milunsky, et al. (2009). "A neuroigin-4 missense mutation associated with autism impairs neuroigin-4 folding and endoplasmic reticulum export." J Neurosci **29**(35): 10843-54.
- Zwaigenbaum, L. (2010). "Advances in the early detection of autism." Curr Opin Neurol **23**(2): 97-102.

