



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“Estudios en la línea germinal del nemátodo Caenorhabditis elegans”.

T E S I S

PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A :

LAURA SILVIA SALINAS VELAZQUEZ



FACULTAD DE CIENCIAS UNAM

DIRECTORA DE TESIS: DRA. ROSA ESTELA NAVARRO GONZALEZ

2005



FACULTAD DE CIENCIAS SECCION ESCOLAR

m. 346250



REPUBLICA NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
 AVANCE LA  
 UNIDAD

**ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ**  
**Jefe de la División de Estudios Profesionales de la**  
**Facultad de Ciencias**  
**Presente**

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito: "Estudios en la línea germinal del nemátodo Caenorhabditis elegans".

realizado por Laura Silvia Salinas Velázquez

con número de cuenta 9517680-2 , quien cubrió los créditos de la carrera de:

Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis  
 Propietario

Dra. Rosa Estela Navarro González

*Rosa Navarro*

Propietario

Dr. Ernesto Maldonado Olvera

*[Firma]*

Propietario

Dr. Julio Morán Andrade

*[Firma]*

Suplente

Dra. Luisa Alvarina Alba Lois

*[Firma]*

Suplente

Biól. Carlos Leonardo Peraza Reyes

*[Firma]*

Consejo Departamental de Biología

FACULTAD DE CIENCIAS

*[Firma]*  
 M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez



Este trabajo se realizó bajo la dirección de la Dra. Rosa Estela Navarro González en el departamento de Biología Celular del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México. Agradecemos al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), donativo IN217102-3 así como al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), donativo 41548Q por su apoyo para la realización de este trabajo.

## DEDICATORIAS

### ***A mi mamá...***

Porque aún sin mi padre, haz logrado sacarnos adelante a mi y a mis hermanos con tu trabajo que día a día fue haciendo que esta tesis fuera posible. Por el gran cariño que te tengo y en agradecimiento a tus sacrificios, te dedico este trabajo.

### ***A Rosa...***

Por darme la oportunidad de realizar mi tesis contigo, por todas las cosas que me haz enseñado y por esa eterna paciencia que me tienes. Gracias por tu amistad y confianza.

### ***A mis hermanos...***

*Beto, César y David*, porque aún sin parecer afectuosa, los admiro y los quiero tanto que sé que sin ustedes, todo hubiera sido más difícil.

### ***A mi papá...***

Por estar siempre al pendiente de mí, por facilitarme realizar mis estudios y por contagiarme un poquito de esa pasión que tienes por la lectura. Gracias por dejarme ser.

### ***A Raúl...***

Por todo el apoyo que me haz brindado desde que te conocí, por tus consejos, por preocuparte siempre por mí, por ser tal y como eres. Pero sobre todo, por cuidarme y quererme tanto.

## **AGRADECIMIENTOS**

### **A Ernesto Maldonado**

Por toda la ayuda que me haz dado a lo largo de mi estancia en el laboratorio. Por tu confianza y por alentar de muchas maneras mi formación como estudiante.

### **A Mari y Rocío**

Por querer a mis hermanos y cuidar de mis sobrinos (Claudia, Aldair, Brenda y Abril) a quienes por cierto quiero mucho por hacer de la casa un lugar alegre con sus risas y gritos.

A Rocío por todo el apoyo que siempre le haz brindado a mi mamá.

### **A mis Amigos**

a *Salvador*, por apoyarme siempre en el trabajo y brindarme tu cariño sincero;

a *Ricardo Manuel* por tenerme confianza y dejarme ser en el trabajo;

a *Ricardo Maya* porque aunque no estemos tan cercanos como antes, siempre serás una persona a quien estimo mucho y

a *Felipe* porque aún con la diferencia de edades aprecio tu amistad y me enorgullece saber que eres capaz de cumplir todo lo que te propones.

### **A mis compañeros de Laboratorio**

*Marta, Fabiola, Adverqueydi, Carlos* y a la *Sra. Rocío*, por hacer del laboratorio un lugar muy agradable.

## AGRADECIMIENTOS

A la UNAM y a la Facultad de Ciencias por dirigir mi formación académica y por todas las facilidades otorgadas a lo largo de mis estudios.

A la Dra. Luisa Alba, al Dr. Julio Morán y al Biól. Leonardo Peraza por dedicar tiempo a la revisión de este trabajo, por aceptar ser parte del jurado así como por sus valiosos comentarios para la realización del mismo.

# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	2
1.1. El <i>C. elegans</i> como modelo de estudio .....	2
1.2. Desarrollo de la gónada somática y la línea germinal .....	3
1.2.1. La gónada del hermafrodita .....	8
1.2.2. La gónada del macho .....	8
1.3. Muerte Celular Programada (MCP) .....	9
1.4. Cambios Morfológicos .....	10
1.5. Muerte Celular Programada en la línea germinal del <i>C. elegans</i> .....	10
1.6. Los genes implicados en la apoptosis .....	11
1.7. Los genes de la degradación de los cuerpos apoptóticos .....	14
1.8. La muerte fisiológica de las células germinales .....	15
1.9. Apoptosis de células germinales en diversos organismos.....	16
1.10. El papel de daz-1 y cgh-1 .....	18
1.11. Apoptosis por daño al ADN .....	21
1.12. Apoptosis por daño al ADN en la línea germinal del <i>C. elegans</i> .....	21
1.13. Sensores de daño al ADN .....	23
1.14. Radicales libres y daños celulares .....	26
1.15. Reguladores de la respuesta antioxidante .....	28

<b>2. HIPÓTESIS</b> .....	29
<b>3. OBJETIVO GENERAL</b> .....	29
<b>3.1 OBJETIVOS PARTICULARES</b> .....	29
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	31
4.1. Mantenimiento de nemátodos y cepas utilizadas .....	31
4.2. Medio de cultivo para bacterias .....	31
4.3 Sincronización de animales.....	32
4.4. Montaje de nemátodos en placas de agar para el análisis microscópico .....	34
4.5. Especificaciones en el conteo de cuerpos apoptóticos.....	35
4.6. Cepas de nemátodos utilizadas .....	36
4.7 Clonación del gen <i>ced-1</i> .....	38
4.8. Formación de ADNc .....	39
4.9. Interferencia de ARN de los genes <i>ced-1</i> y <i>sek-1</i> .....	41
4.10. Selección de las condiciones óptimas para los experimentos de tensión .....	42
4.10.1. Curva de Tolerancia: tensión osmótica .....	42
4.10.2. Curva de Tolerancia: tensión oxidativa .....	43
4.10.3. Curva de Tolerancia: choque de calor.....	43
4.10.4. Curva de Tolerancia: tensión nutricional.....	44
4. 11. Tratamientos que inducen tensión en la gónada del <i>C. elegans</i> .....	45
4.11.1. Tensión oxidativa y osmótica.....	46

4.11.2. Choque de calor y tensión nutricional.....	47
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN: CAPÍTULO 1 .....</b>	<b>48</b>
5.1. Diversos tipos de tensión inducen la apoptosis de las células germinales en el <i>C. elegans</i> .....	48
5.2. La apoptosis inducida por tensión es independiente de la proteína EGL-1 .....	52
5.3. La apoptosis inducida por tensión no requiere a p53.....	55
5.4. Las cinasas del tipo MAPK son indispensables para inducir apoptosis de células germinales en respuesta a tensión celular .....	58
5.5 Discusión general .....	61
<b>6. CONCLUSIONES .....</b>	<b>65</b>
<b>7. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>66</b>
<b>8. CAPÍTULO 2 .....</b>	<b>68</b>
<b>9. APÉNDICE I .....</b>	<b>69</b>
<b>10. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>75</b>

## RESUMEN

La muerte celular programada, conocida también como apoptosis, es un proceso común que utilizan una amplia variedad de organismos para eliminar células innecesarias o aquellas que han sufrido algún daño en su genoma. La maquinaria de muerte celular la cual incluye factores pro y anti-apoptóticos se encuentra ampliamente conservada.

El nemátodo *Caenorhabditis elegans* presenta muerte celular programada tanto en el tejido somático como en la línea germinal. En este último tejido, bajo condiciones fisiológicas normales, la apoptosis de células germinales es indispensable para mantener la homeostasis de la gónada. Sin embargo, se sabe que el efecto de diversos agentes genotóxicos causan también una elevada muerte de células germinales.

Con estos antecedentes, el objetivo general de ese trabajo fue determinar el efecto de los diversos tipos de tensión tales como oxidativa, osmótica, por calor y ayuno sobre la apoptosis de células germinales en la gónada del nemátodo *C. elegans*. De manera específica, se determinó si este proceso ocurre por un mecanismo fisiológico, o si por el contrario, es el resultado de la activación de una vía de daño al ADN. Finalmente, se estudió el papel de algunas cinasas durante el proceso de muerte celular inducido por tensión.

En este trabajo se encontró que los diferentes tipos de tensión inducen la muerte de las células germinales a través de un mecanismo fisiológico y no por la vía de daño al ADN. Además, se encontró que las cinasas MEK-1 y SEK-1 son indispensables para inducir la apoptosis por tensión en la línea germinal .

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. EL *C. elegans* COMO MODELO DE ESTUDIO

El *C. elegans* fue inicialmente descrito por Maupas en 1900 y colocado en el subgénero *Caenorhabditis* por Osche en 1952. La cepa silvestre *Bristol* fue aislada por L. N. Staniland del Servicio Nacional de Agricultura en Londres, Inglaterra (Riddle *et al.*, 1997). En 1965, Sydney Brenner propuso al nemátodo *Caenorhabditis elegans* como un organismo modelo para hacer estudios sobre biología del desarrollo y neurociencias. Dentro de las características que presenta este organismo modelo, y lo hace útil para hacer análisis genéticos, están: el tener un ciclo de vida corto de tan solo 3 días, un tamaño de 1 mm, el poseer pocas células (~1000) y su transparencia, lo cual permite su observación directa al microscopio; además de presentar una alta producción de embriones, que en condiciones óptimas, oscila entre 250-300 hijos. Este organismo puede manejarse y cultivarse en grandes cantidades sobre cajas de petri o en cultivos líquidos, y aún cuando morfológicamente es simple cuenta con sistemas digestivo, excretor, muscular, nervioso y reproductor.

En el *C. elegans* se llevaron a cabo los primeros estudios relacionados con los procesos de desarrollo y muerte celular, resultados que dieron el Premio Nobel de Medicina y Fisiología a Sydney Brenner, John Sulston y Robert Horvitz en el 2002. Este modelo ha permitido también el análisis de procesos tales como la diferenciación celular y la formación de órganos. A pesar de lo anterior, uno de los problemas iniciales en el uso de este organismo fue la forma de almacenamiento tanto de la línea silvestre como de las diversas mutantes obtenidas. Esto fue resuelto cuando en 1969 John Sulston desarrolló métodos convenientes para el almacenamiento de cepas de nemátodos, técnica que resultó similar a aquella utilizada en líneas celulares de mamíferos y que incluye el uso de nitrógeno líquido.

El *C. elegans* es un nemátodo terrestre de vida libre y en el laboratorio se alimenta principalmente de bacterias tales como *Escherichia coli*. La alimentación se realiza a través de una faringe bilobulada, la cual bombea el alimento hasta el intestino. Bajo condiciones óptimas, el nemátodo alcanza la madurez sexual a los 3 días y con una adecuada alimentación a través de todo su ciclo de vida, así como condiciones adecuadas de crecimiento en el laboratorio, tanto el macho como el hermafrodita, viven hasta 17 días. El *C. elegans* tiene cuatro etapas larvarias conocidas como L1-L4 las cuales se caracterizan por la presencia de mudas. Después de la cuarta muda, los adultos son fértiles. El hermafrodita y el macho adulto presentan 959 y 1031 células somáticas, respectivamente (Wood, 1988).

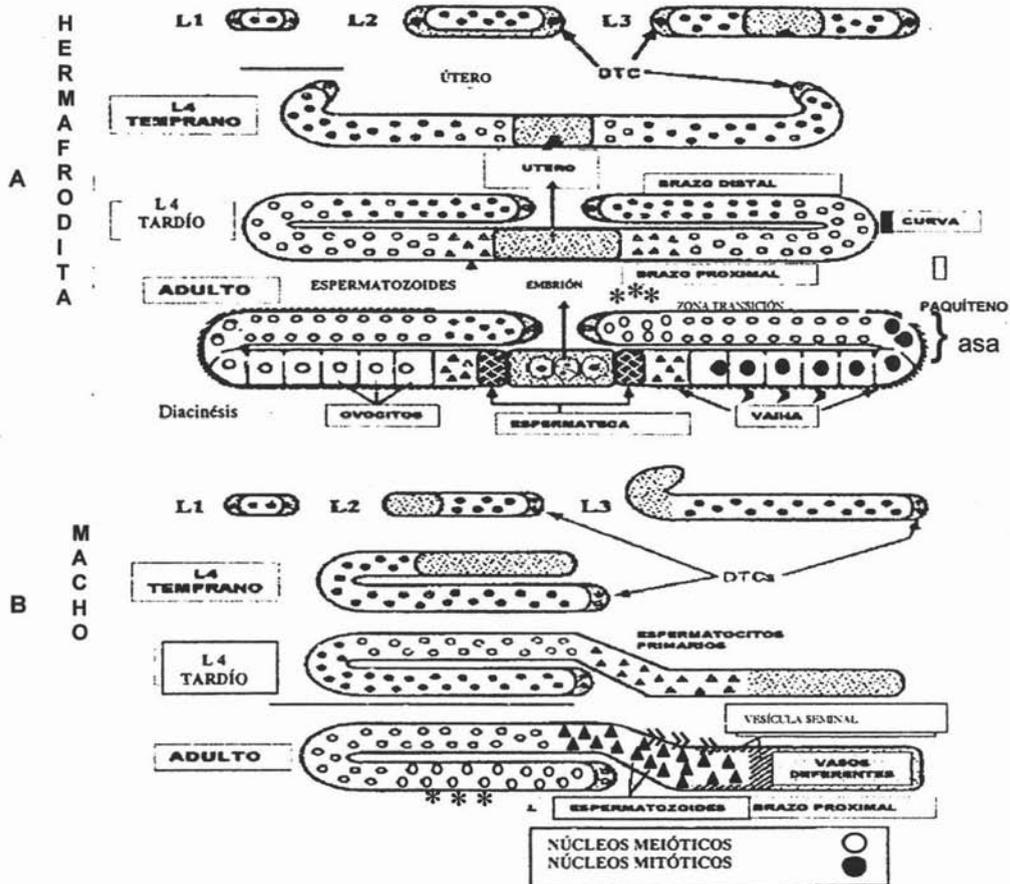
El *C. elegans* tiene 6 cromosomas, 5 autosómicos y uno sexual. Los hermafroditas son diploides para los seis cromosomas (XX), mientras que los machos lo son para los cromosomas autosómicos, presentando sólo un cromosoma sexual X (X0) (Wood, 1988). El tamaño del genoma haploide es de  $8 \times 10^7$  pares de bases, lo cual representa 8 veces el tamaño de *Saccharomyces cerevisiae* o la mitad del genoma de *Drosophila melanogaster* (Wood, 1988). Se cree que 2/3 partes de los genes humanos se encuentran representados en el genoma de este nemátodo (Riddle *et al.*, 1997).

En general, los diversos estudios que se llevan a cabo utilizando a este organismo se realizan con poblaciones de hermafroditas, debido a que existe una mayor proporción de estos que de machos. Los machos se originan espontáneamente dentro de poblaciones de hermafroditas debido a una mala segregación del cromosoma X durante el proceso de meiosis. La frecuencia de aparición de los machos es de 1 por cada 500 animales hermafroditas (Wood, 1988) aunque a partir de una cruce, se puede obtener el 50% de machos.

## **1.2. DESARROLLO DE LA GÓNADA SOMÁTICA Y LA LÍNEA GERMINAL**

En el *C. elegans*, tanto en machos como en hermafroditas, las larvas L1 eclosionan con un primordio gonadal que está formado por 4 células. Dos de

éstas, Z1 y Z4 son las llamadas precursoras de la gónada somática, mientras que las células encargadas de formar la línea germinal reciben el nombre de Z2 y Z3. Z1 y Z4 forman, en el caso de los hermafroditas, las células del extremo distal (DTC's), las células de la vaina, la espermateca y el útero (Hubbard *et al.*, 2000). En los hermafroditas, Z1 y Z4 generan 12 células durante el estadio L1. Durante L2, 10 células formadas a partir de Z1 y Z4 coalescen hacia el centro de la gónada. Este arreglo celular establece dos regiones separadas del tejido de la línea germinal con respecto a un grupo central de células somáticas: una anterior y una posterior. Conforme avanza el desarrollo larval, las células somáticas del centro de la gónada continúan dividiéndose para formar el útero y la espermateca. En el estadio L3 las regiones anterior y posterior se alargan y en L4 el tejido gira 180°C y continúa creciendo en dirección opuesta. Este cambio en la dirección de alargamiento forma una gónada en forma de "U". Una célula somática conocida como célula de la punta distal "*distal tip cell*" (DTC) se localiza en el extremo de cada uno de los tubos alargados. Durante todo el desarrollo post-embriionario del hermafrodita, Z1 y Z4 se dividen generando un linaje celular de aproximadamente 143 células, mismas que forman a las DTC, las células de la vaina, la espermateca y el útero (Hubbard *et al.*, 2000) (Figura 1).



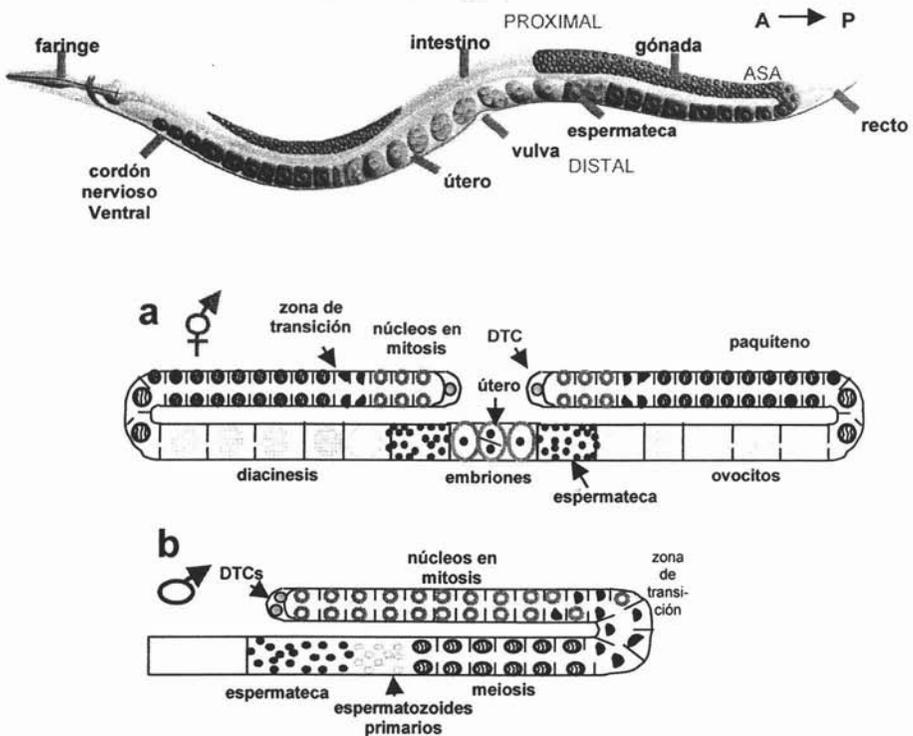
**Figura 1. Desarrollo de la línea germinal del *C. elegans* durante los diferentes estadios larvarios y en animales adultos.** Tanto en machos como en hermafroditas, la línea germinal se desarrolla a partir de los precursores Z2 y Z3. En el caso del hermafrodita adulto (A) la región distal muestra una población de núcleos en continua proliferación mitótica, llamadas células germinales (asteriscos \*). Estas células pasan por la zona de transición y entran a la profase I de la meiosis (círculos blancos). Conforme avanzan, entran a la fase de paquíteno (corchete ) y se celularizan, recibiendo, a partir de este punto, el nombre de ovocitos. Más adelante, en la porción proximal, los ovocitos entran en diacinesis (flechas >) y posteriormente, son fertilizados a su paso a través de la espermateca, momento en el que se completa la segunda fase de la meiosis. En el caso de los machos (B), las células germinales localizadas en la región distal (asteriscos \*) progresan a lo largo de la meiosis y forman a los espermatocitos primarios (triángulos), los cuales posteriormente, darán lugar a los espermatozoides (ángulos »). Modificado de Wood, 1988.

En los machos, Z1 y Z4 generan 10 células durante los estadios larvales L1 y L2. De éstas, 8 células se mueven únicamente hacia el extremo anterior originando una estructura asimétrica. Dos células somáticas (DTC's) se localizan en el extremo distal de la gónada. El tejido gonadal se desarrolla primero con una dirección anterior y luego posteriormente hacia la cloaca (Wood 1988). Durante L3 y L4, estas células forman las células somáticas de la gónada, los vasos deferentes y la vesícula seminal. Las diversas divisiones post-embrionarias de Z1 y Z4 origina la formación de un tejido celular de aproximadamente 56 células (Hubbard *et al.*, 2000). En general, aún cuando el desarrollo de la línea germinal y la gónada somática se lleva a cabo de forma separada, se sabe que esta última es indispensable para la formación de la línea germinal. La línea germinal es el tejido celular especializado que da lugar a la formación de ovocitos y espermatozoides (Hubbard *et al.*, 2000).

Después de la formación del cigoto ( $P_0$ ), una serie de divisiones celulares asimétricas da lugar a la formación de la célula germinal primordial, llamada  $P_4$ , de la cual se forman exclusivamente las células germinales por proliferación.  $P_4$  entra al interior del embrión durante el proceso de gastrulación, el cual corresponde a un estado de aproximadamente 28 células y se divide de forma simétrica en el estado de 100 células, formando los dos precursores de la línea germinal. Por lo tanto  $P_4$  y sus descendientes Z2 y Z3 son llamadas células germinales primordiales o PGCs por sus siglas en inglés. Los mecanismos que guían el proceso de asociación entre los precursores de la línea germinal y los de la gónada somática aún no están claros, sin embargo, se sabe que Z2 y Z3 no son requeridas para llevar a cabo dicha migración, ya que la eliminación de  $P_4$  genera larvas sin línea germinal pero con una gónada somática normal (Hubbard *et al.*, 2000).

En ambos sexos, la gónada forma una estructura dividida en tres regiones, la *región proximal*, el *asa* y la *región distal*. Tanto en los machos como en las hermafroditas, los ejes distal-proximal son utilizados para establecer la posición a lo largo del tubo gonadal. Por ello, una estructura distal se define

como aquella que se localiza lejos de la abertura gonadal, llamada vulva en los hermafroditas o cloaca en el caso de los machos. Una posición proximal define una estructura cercana a esta abertura. Cada una de estas regiones establece un momento particular del proceso de diferenciación de las células germinales debido a que en la *región proximal* éstas células se encuentran únicamente en mitosis, mientras que en el *asa* y en la *región distal*, las células germinales se desarrollan en ovocitos y posteriormente forman embriones, respectivamente (Figura 2).



**Figura 2. Diagrama de la gónada de un *C. elegans* hermafrodita adulto.** A/P indican la posición anterior y posterior, determinada por las estructuras centrales del animal, tales como la espermateca, el útero y la vulva. A través de esta última, los embriones son expulsados al exterior. **A. Estructura de la gónada del hermafrodita adulto.** La gónada del hermafrodita adulto está formada por dos tubos simétricos en forma de "U". En la figura se muestran tres regiones (proximal, asa y distal) en las que se divide la gónada. **B. Estructura de la gónada del macho adulto.** La gónada del macho adulto está formada por un tubo en forma de "J". Tomada y modificada de Navarro *et al.*, 2001.

### 1.2.1. LA GÓNADA DEL HERMAFRODITA

La gónada del hermafrodita adulto está formada por dos brazos tubulares, uno anterior y otro posterior. Cada uno de éstos, presenta en el extremo proximal una espermateca y ambos se encuentran unidos a un útero en común (Figura 2A). En el caso de los hermafroditas, la producción de esperma es transitoria, debido a que las primeras 40 células que entran en meiosis forman 160 espermatozoides los cuales se almacenan en la espermateca. Posteriormente, la espermatogénesis cesa e inicia la producción de ovocitos. La gónada del *C. elegans* es un sincicio en donde los núcleos tienen membranas parciales y por simplicidad las denominamos células germinales. La *región distal* está formada por una población de células germinales, las cuales se mantienen en mitosis constante gracias a la influencia de las DTC's. Lejos de la influencia de las DTC's, las células germinales entran en meiosis y se mueven hacia el asa. Los estadios de meiosis que se observan en la gónada son el paquíteno y la diacinesis. Los ovocitos se detienen en la profase de la meiosis I en la parte proximal de la gónada en donde esperan a ser fecundados por el espermatozoide para completar la meiosis (Figura 2A). Experimentos con láser han demostrado que las DTC's ejercen una influencia mitogénica sobre las células germinales adyacentes. Si éstas son destruidas, las células germinales cesan la división y entran a la meiosis. En el asa, algunas células germinales incrementan su volumen citoplasmático, son delimitadas por membranas y forman ovocitos, mientras que otras mueren por apoptosis (Wood, 1988).

### 1.2.2. LA GÓNADA DEL MACHO

La gónada del macho es una estructura individual en forma de "J". En el macho, el tejido somático en el extremo distal incluye dos células distales localizadas en el ápice, mientras que en la región conocida como *proximal*, se

localiza la espermateca, la cual almacena los espermatozoides. En el macho, la producción de esperma ocurre de forma continua (Wood, 1988). Al igual que en la gónada del hermafrodita, las células germinales del extremo distal se encuentran en mitosis. A lo largo del tubo de la gónada ocurren las divisiones mitóticas en dirección distal a proximal y se producen las espermatidas maduras. Éstas son almacenadas en la vesícula seminal y liberadas durante la cópula a través de los vasos deferentes (Figura 2B). En la parte posterior, el macho presenta un gancho formado de neuronas, músculo y estructuras hipodérmicas útiles para llevar a cabo el apareamiento. Este gancho es un abanico formado por 18 rayos sensores y 2 espículas las cuales son introducidas dentro de la vulva del hermafrodita para llevar a cabo la transferencia del esperma. Esta característica representa una de las principales diferencias morfológicas en comparación con el hermafrodita (Wood, 1988).

### **1.3. MUERTE CELULAR PROGRAMADA (MCP)**

De las 1 090 células somáticas generadas por el linaje celular del *C. elegans* hermafrodita, 131 sufren muerte celular programada presentando la misma secuencia de cambios morfológicos y la misma actividad de genes a lo largo del proceso. La muerte celular programada es un proceso común en muchos organismos multicelulares y ocurre a lo largo de todo el desarrollo, así como al final de los ciclos de vida de diversos organismos. La muerte celular programada es un mecanismo mediante el cual se eliminan las células que potencialmente son dañinas para el organismo o aquellas que han cumplido su función (Riddle *et al.*, 1997).

La MCP es básicamente un suicidio celular y el control de este proceso es crucial para el mantenimiento de la homeostasis de los individuos. Así, la alteración de los procesos de regulación generan un gran número de patologías, tales como el desarrollo del cáncer y enfermedades auto-inmunes. Por el contrario, la activación aberrante de la apoptosis contribuye a la muerte celular

extensa, característica de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer y el mal de Parkinson (Riddle *et al.*, 1997).

El término muerte celular programada fue inicialmente propuesto por Kerr *et al.* en 1972 para enfatizar que este tipo de muerte celular es morfológicamente muy distinto de la muerte por necrosis. Como su nombre lo dice, la MCP está mediada por un programa molecular específico activado por la célula. Al igual que en muchos organismos, en el *C. elegans*, existen diversos tipos celulares que sufren MCP, tales como células ectodérmicas, hipodérmicas, mesodérmicas, así como células asociadas a las neuronas (Riddle *et al.*, 1997).

#### **1.4. CAMBIOS MORFOLÓGICOS**

En el *C. elegans*, al igual que en otros sistema biológicos, las células que mueren por apoptosis sufren una serie de cambios morfológicos característicos, tales como el incremento en la refractibilidad del citoplasma y el núcleo, la condensación de la cromatina y la reducción en su volumen celular. Las células en apoptosis, también conocidas como cuerpos apoptóticos, se lisan formando diversos fragmentos de membrana y vacuolas autofágicas en el citoplasma. En general, los cuerpos apoptóticos desaparecen de forma gradual al ser degradados por las células de la vaina (Riddle *et al.*, 1997).

#### **1.5. MUERTE CELULAR PROGRAMADA EN LA LÍNEA GERMINAL DEL C. ELEGANS**

En el *C. elegans*, la primera ola de MCP ocurre principalmente durante el proceso de embriogénesis, alrededor de los 450 minutos de haber ocurrido la fertilización. Posteriormente, la segunda ola de muerte es observada en el estadio larval L1. En el caso del hermafrodita, después de este estadio, no se observa más muerte celular somática, mientras que en el linaje del macho se

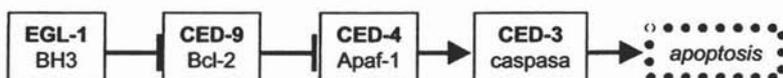
observan algunas muertes en el estadio L4. A diferencia del soma, en la línea germinal del hermafrodita adulto, la muerte celular programada es un proceso común. En este tejido, la muerte parece estar relacionada con los procesos de ovogénesis, debido a que en los estadios larvales y en los machos adultos este proceso no ocurre (Riddle *et al.*, 1997). Esta muerte se lleva a cabo en la región del sincicio, sitio donde los núcleos de las células germinales se encuentran en estado de paquíteno, mientras que el proceso está ausente en la región donde las células están en continua división mitótica. Una vez que la ovogénesis comienza, la muerte de las células germinales ocurre de forma continua y se estima que el 50% de las células germinales se muere por apoptosis a lo largo de todo el ciclo reproductivo. Esto representa la principal fuente de muerte celular presente en el organismo (Gummieny *et al.*, 1999).

Una parte central del proceso de muerte celular que no ha sido claramente determinada, es por qué las células germinales se mueren; sin embargo, existen tres hipótesis que tratan de explicar este proceso. La primer hipótesis, conocida como *muerte por negligencia*, establece que la falta de nutrientes y/o factores de crecimiento estimulan la muerte celular. La hipótesis de *muerte por defecto* está relacionada con la eliminación de aquellas células que han sufrido alguna mutación en su genoma; mientras que la *muerte por auto-sacrificio*, establece que las células funcionan también como células nodrizas sintetizando componentes citoplasmáticos necesarios para llevar a acabo la formación de un ovocito maduro y así, una vez que las células donan su citoplasma, éstas mueren por apoptosis (Tilly, 2001).

## **1.6. LOS GENES IMPLICADOS EN LA APOPTOSIS**

Diversos análisis genéticos han identificado más de 100 mutaciones que afectan la muerte celular programada en el *C. elegans* (Riddle *et al.*, 1997). En general, existen dos clases de genes que están involucrados en la muerte celular programada: 1) los genes de determinación, los cuales deciden qué

células van a morir y 2) los genes de ejecución, los cuales son necesarios para que se lleve a cabo la muerte celular. Los genes *ced-3* y *ced-4* (*cell abnormal death*) (Riddle *et al.*, 1997) son esenciales para que ocurra la muerte celular programada en el *C. elegans*. En los mutantes de *ced-3* y *ced-4* las células que normalmente deben morir sobreviven y los animales con estas mutaciones no tienen ningún defecto, sólo tienen más células, indicando que la MCP no es esencial en el desarrollo del *C. elegans*. CED-3 presenta una secuencia de aminoácidos muy similar a la de los miembros de la familia de proteasas de cisteína, conocidos como caspasas, y es la única presente en este organismo (Figura 3).



**Figura 3. Muerte celular programada en el *C. elegans*.** La activación del proceso de apoptosis requiere la función del factor pro-apoptótico EGL-1, el cual inactiva de forma eficiente a la proteína anti-apoptótica CED-9. El papel de ésta última consiste en inhibir a la proteína CED-4, la cual en ausencia de CED-9 hidroliza al precursor de CED-3, induciendo con ello la activación de la caspasa, proceso que desencadena la apoptosis.

El gen *ced-4* codifica para el homólogo de Apaf-1 de los mamíferos y su función es activar, a través de un proceso de hidrólisis, a la caspasa CED-3, iniciando con ello la muerte de diversas células. Genéticamente, por arriba de los genes *ced-3* y *ced-4*, actúa el gen *ced-9* (Riddle *et al.*, 1997) el cual previene la muerte celular al antagonizar la actividad de estos últimos y recibe el nombre de regulador negativo de la MCP o factor anti-apoptótico. La sobre-expresión del gen *ced-9* resulta en la supervivencia de aquellas células que en condiciones normales mueren, causando un fenotipo similar al que se observa en los animales que carecen de los genes *ced-3* y *ced-4*. La supervivencia de células destinadas a morir se observa también en mutantes heterocígonos u homocígonos para una mutación dominante de *ced-9* (*n1950*). Por el contrario, las mutaciones que reducen o eliminan la función de este gen causan que muchas células, que

en condiciones normales sobreviven, sufran muerte celular programada (Riddle *et al.*, 1997). El gen *ced-9* codifica para una proteína de 280 residuos de aminoácidos con una secuencia y estructura similar a la del proto-oncogen Bcl-2 de los mamíferos. De forma interesante, estas dos proteínas no sólo muestran secuencias similares, sino también una importante similitud funcional. Una evidencia de que estos genes presentan funciones similares se estableció cuando el gen humano *bcl-2* pudo prevenir la muerte celular en el *C. elegans* y pudo funcionar como sustituto en animales deficientes en la función de *ced-9*. Bcl-2 es una proteína integral de membrana que en mamíferos se localiza en el interior de la membrana mitocondrial y se ha sugerido que previene la muerte celular al participar en una ruta de tipo antioxidante. Sin embargo, estudios estructurales y de inmunofluorescencia sugieren que esta proteína no sólo está localizada en la mitocondria, sino también en el retículo endoplásmico y en el exterior de las membranas nucleares y su papel en una ruta de regulación antioxidante es aún tema en debate (Riddle *et al.*, 1997).

La mutación *ced-9(n1950)* reemplaza una glicina del dominio conservado BH1 que se encuentra en muchos miembros de la familia Bcl-2 y se cree que es necesario para que ocurra la interacción entre CED-9 y las proteínas proapoptóticas. Un excelente candidato para tal interacción es el dominio BH3 de la proteína EGL-1, el cual interacciona físicamente con CED-9 y es esencial para toda la muerte que ocurre a lo largo del desarrollo. La función de la proteína proapoptótica EGL-1 es inhibir la actividad de CED-9 (Figura 3) (Conradt and Horvitz, 1998).

A pesar de que existen muchas similitudes en la regulación genética de la muerte celular somática y de la línea germinal, se sabe que estos dos sistemas utilizan mecanismos diferentes para activar el proceso de MCP. Esto debido a que la mutación *ced-9(n1950gf)*, la cual previene completamente la muerte somática, tiene poco efecto sobre la muerte en la línea germinal. Desde que se encontró que las mutantes *ced-9(gf)* y principalmente la mutación de tipo *loss-of-function* del gen *egl-1*, suprimen la muerte somática, pero no afectan la muerte celular fisiológica de las células germinales, se propone que un factor

diferente puede ser usado para controlar la muerte que se presenta la línea germinal (Gumienny *et al.*, 1999).

## 1.7. GENES DE LA DEGRADACIÓN DE LOS CUERPOS APOPTÓTICOS

La fagocitosis de los cuerpos apoptóticos que se forman en la gónada del *C. elegans*, requiere la función de por lo menos seis genes: *ced-1*, *ced-2*, *ced-5*, *ced-6*, *ced-7* y *ced-10*, los cuales presentan homólogos en otros organismos. Mutantes en cualquiera de estos genes genera la acumulación de cuerpos apoptóticos en la línea germinal en comparación con animales silvestres (Figura 4). En estas mutantes, los cuerpos apoptóticos llegan a acumularse en la parte más proximal de la gónada debido a que conforme progresan los ovocitos a lo largo de la gónada arrastran consigo estas estructuras apoptóticas. Un séptimo gen, *ced-8*, se encuentra involucrado en la fagocitosis de cuerpos apoptóticos que se forman en el embrión, mientras que en el estado larval y en el adulto, este gen parece no jugar un papel importante en la degradación de células apoptóticas (Gumienny *et al.*, 1999).

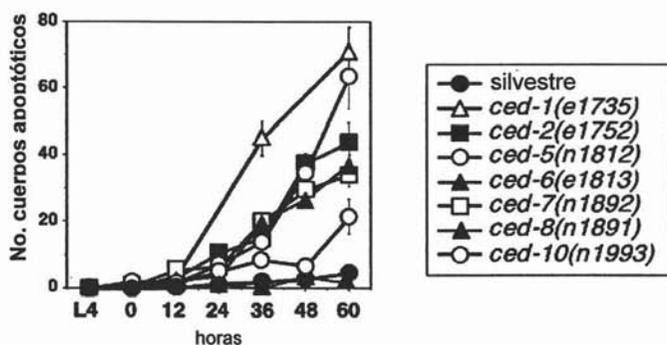


Figura 4. Efecto en la degradación de los cuerpos apoptóticos en las mutantes *ced-1*, *ced-2*, *ced-5*, *ced-6*, *ced-7*, *ced-8* y *ced-10*. La degradación de cuerpos apoptóticos requiere la activación de diversos genes de degradación: *ced-1*, *ced-2*, *ced-5*, *ced-6*, *ced-7* y *ced-10*. En mutantes en alguno de estos genes se causa la acumulación de cuerpos apoptóticos en el nemátodo. En esta gráfica se observa que mutaciones en cualquiera de los genes *ced* acumulan cuerpos apoptóticos conforme el animal envejece. Tomada de Gumienny *et al.*, 1999.

Al igual que los genes que se encargan de degradar los cuerpos apoptóticos, existen también genes que se encargan de degradar los remanentes de ácidos nucleicos de estas células. De este modo, una vez que ocurre la activación de la caspasa (CED-3), uno de los primeros eventos como consecuencia de esta activación es la degradación del ADN. Esto ocurre principalmente en aquellas regiones ricas en los nucleótidos A y T, produciendo fragmentos de entre 50 y 200 Kb. Estudios en ratón revelan un papel importante de la enzima ADNasa II durante la degradación del ADN a lo largo del proceso de apoptosis. En el *C. elegans*, los genes implicados en la degradación de ADN incluye a un grupo de enzimas llamadas ADNasa II, entre la que se incluye a la nucleasa, *NUC-1* (Daniel *et al.*, 2004). El producto del gen *nuc-1* (*nucleasa anormal*) se requiere para la degradación del ADN de aquellas células que han iniciado el proceso de apoptosis. Los cuerpos apoptóticos en mutantes de este gen, además de ser fácilmente detectados al utilizar el colorante vital DAPI, muestran en el interior de las vacuolas una gran cantidad de ADN sin degradar. Estas vacuolas con ADN aumentan en tamaño y número conforme el animal incrementa su edad. Además, se sabe que cuando la degradación de los cuerpos apoptóticos se bloquea, por ejemplo en mutantes *ced-5*, también se bloquea la degradación de ADN, indicando que al igual que en el soma, la apoptosis de células germinales requiere la degradación del ADN mediada por *nuc-1* (Gumienny *et al.*, 1999).

## **1.8. LA MUERTE FISIOLÓGICA DE LAS CÉLULAS GERMINALES**

En el *C.elegans*, bajo condiciones de crecimiento normal un hermafrodita silvestre produce cerca de 2 000 células germinales a lo largo de su ciclo reproductivo de los cuales aproximadamente la mitad mueren por apoptosis (Gummienny *et al.*, 1999). Este proceso llamado también muerte fisiológica de las células germinales, depende estrictamente del proceso de ovogénesis y se cree

que es necesario para mantener la homeostasis de la gónada (Gummienny *et al.*, 1999). Aún cuando se conocen bien los eventos moleculares que participan durante el proceso de apoptosis, poco se sabe acerca de por qué las células mueren. Por ello, nuestro objetivo es determinar si esta muerte masiva participa en la formación de un ovocito. Una posibilidad, es que a lo largo de la ovogénesis se utilice esta respuesta para eliminar aquellas células que han sufrido algún daño en el ADN. Si esto ocurre, cerca de la mitad de las células germinales deberán presentar mutaciones en su genoma para poder ser eliminadas por apoptosis, sin embargo, esta condición resultaría ineficiente por lo que se sugiere que la causa de muerte debe ser otra.

Una hipótesis establece que un determinado grupo celular, conocido como células nodrizas, donan su citoplasma a las células que formarán los ovocitos. El paso de componentes citoplasmáticos, tales como ARN mensajeros y proteínas, a través de puentes celulares que conectan a diversas células, garantiza el desarrollo adecuado de la célula germinal que más adelante, formará al ovocito. Posteriormente, estas células nodrizas mueren por un mecanismo de muerte celular fisiológica. Mutantes en la caspasa CED-3, las cuales no presentan muerte por apoptosis, muestran ovocitos con tamaños reducidos, sugiriendo que esta muerte es necesaria para alcanzar el desarrollo adecuado de los mismos (Lettre *et al.*, 2004). Sin embargo, estos animales tienen el mismo número de hijos que un animal silvestre poniendo en duda esta hipótesis. A pesar de esto, la hipótesis más aceptada es que la apoptosis de las células germinales asegura la homeostasis de los ovocitos y se encuentra altamente conservada desde organismos simples hasta humanos.

## **1.9. APOPTOSIS DE CÉLULAS GERMINALES EN DIVERSOS ORGANISMOS**

El pez cebra presenta una elevada muerte de ovocitos en la gónada no diferenciada alrededor de los 30 días de haber eclosionado la larva. Esta eliminación permite el desarrollo de los espermatocitos y con ello la

diferenciación de la gónada hacia tejido testicular mediada por los genes de determinación sexual o por un cambio hormonal en los peces. En este organismo, esta muerte es importante para que el desarrollo de la gónada de se realice de forma adecuada (Yamashita, 2003).

En el caso de la línea germinal de *Drosophila*, un grupo de 16 células germinales forman una estructura conocida como la cámara del huevo. Se sabe que la célula germinal que presenta la mejor conexión con el resto de las células, a través de diversas uniones celulares conocidas como *puentes citoplasmáticos*, formará al ovocito. El citoesqueleto sufre diversas modificaciones, que permiten la transferencia de citoplasma hacia el ovocito. A través de estas conexiones, las 15 células restantes, las cuales reciben el nombre de células nodrizas, donan sus componentes citoplasmáticos a la célula que más adelante formará el ovocito, facilitando con ello su diferenciación, crecimiento y desarrollo; para posteriormente morir por apoptosis. En *Drosophila*, mutantes deficientes en la caspasa, codificada por el gen *dcp-1*, son estériles debido a que se elimina la muerte apoptótica de las células nodrizas (Abrams *et al.*, 1993).

En las hidras, así como en los ctenóforos y las esponjas, miles de células se agregan para formar al ovocito y aunque muchas de estas células son potencialmente capaces de formar un ovocito, sólo una de ellas lo formará. En ocasiones, como en el caso de *Drosophila*, corresponde a aquella que se encuentra mejor localizada al centro del agregado celular. Por su parte, las células que no fueron seleccionadas como ovocitos se diferencian en células nodrizas y son fagocitadas por el ovocito. En estos organismos, las células apoptóticas pueden ser detectadas a partir del estadio 3 de la ovogénesis y conforme avanza el desarrollo el número celular se incrementa rápidamente, generando la acumulación de miles de células apoptóticas en el interior del ovocito. Algo que es interesante, es que la gran mayoría de las células nodrizas presentes en el interior del ovocito no mueren inmediatamente, sino que permanecen dentro de esta estructura incluso hasta que se forma y eclosiona el pólipo, proceso que llega a ocurrir hasta 12 meses después de la fertilización.

Durante este periodo largo de tiempo, las células nodrizas que no son degradadas muestran una morfología normal, y el uso de colorantes vitales tales como DAPI, han demostrado que estas células nodrizas muestran núcleos normales a pesar de tener una cromatina condensada. Se sabe que aún cuando las células nodrizas persisten dentro del ovocito por varios meses a lo largo de la embriogénesis, una vez que el pólipo eclosiona, éstas son eliminadas por apoptosis en un periodo de tan solo 3 días una vez que se inicia la embriogénesis (Technau *et al.*, 2003). En mamíferos, a diferencia de los peces, la muerte de células germinales en el testículo ocurre de forma continua y el control de la proliferación se lleva a cabo por un mecanismo selectivo de apoptosis. En ratas de cuatro semanas de edad el principal tipo celular que sufre apoptosis son los espermatocitos, mientras que en individuos adultos son principalmente las espermatogonias (Yamashita, 2003). En hembras, se sabe que la reducción en el número de ovocitos se lleva a cabo a través de mecanismos que involucran el proceso de muerte celular programada. En el caso de los humanos, diversos estudios han demostrado que existe una muerte masiva de ovocitos durante el desarrollo embrionario. Se sabe que se forman alrededor de 2 millones de ovocitos, de los cuales, más de la mitad sufre muerte apoptótica poco después del nacimiento (Tilly *et al.*, 2004). A pesar de que la muerte de las células germinales es un proceso conservado a lo largo de la evolución, poco sabemos acerca de los procesos que lo inician y si éste es necesario para la formación de gametos.

#### **1.10. EL PAPEL DE DAZ-1 Y CGH-1**

La muerte fisiológica de las células germinales del *C. elegans* requiere la activación de diversas vías de señalización, así como la participación de diversos genes. Para que las células mueran por apoptosis es necesario que completen la fase de la meiosis conocida como paquíteno y para ello, se requiere la activación de la vía ras/MPK-1 la cual incluye la activación de las

proteínas cinasas LET-60/Ras, LIN-45/Raf y MPK MAPK/ERK. Mutantes en alguno de estos componentes causa que las células germinales detengan la meiosis, provocando con ello la falta de ovocitos y la ausencia de apoptosis de estas células (Karashima *et al.*, 2000). Además, se sabe que esta vía tiene un papel importante durante el desarrollo de la vulva (Makoto *et al.*, 2000). Así, durante el desarrollo de la vulva, esta vía es activada por el factor de crecimiento epidérmico LIN-3 el cual a su vez es mediado por el receptor de tirosina cinasa, LET-23 (Makoto *et al.*, 2000).

El gen *daz-1* (por sus siglas en inglés *deleted in azoospermia*) juega un papel crucial en el desarrollo de la línea germinal durante el proceso de gametogénesis tanto en los vertebrados como en los invertebrados. Análisis detallados con el uso de microscopía de fluorescencia y de transmisión revelan que la pérdida de la función de *daz-1* causa múltiples anomalías entre las que se incluye una estructura de la cromatina aberrante, núcleos pequeños, ausencia del centro citoplasmático, así como celularización prematura (Maruyama *et al.*, 2005). En mutantes *daz-1* existe un elevado número de cuerpos apoptóticos los cuales son producidos a través de la activación de la ruta apoptótica. Se desconoce la función exacta de este gen en la muerte celular que ocurre en la línea germinal, sin embargo, se cree que los mutantes *daz-1* presentan una detención en el desarrollo de las células germinales, favoreciendo con ello que el periodo sensitivo de muerte sea mayor y como consecuencia exista una mayor probabilidad de morir. Se piensa que las células germinales incapaces de progresar más allá de estado de paquíteno, en un cierto periodo de tiempo, son destinadas a morir por MCP tanto en mutantes *daz-1* como en animales silvestres (Karashima *et al.*, 2000).

Un gen necesario para prevenir la apoptosis de la muerte celular fisiológica es *cgh-1* (*conserved germline RNA helicase*). Este gen se expresa específicamente en la línea germinal y se sabe que se encuentra asociado a partículas de ARN y proteínas presentes en la línea germinal. La inhibición de este gen por interferencia de ARN (ARNi) provoca la muerte de prácticamente

todos los ovocitos formados a través de la activación de una ruta de muerte fisiológica (Navarro *et al.*, 2001).

En un intento por identificar genes que afectan la apoptosis que ocurre en la línea germinal del nemátodo *C. elegans*, Lettre y colaboradores (2004) realizaron una búsqueda masiva de genes que podrían estar afectando este proceso por medio de ARN de interferencia. Se inactivó el 86% de alrededor de 19 500 genes (16 657 en total) utilizando una biblioteca de ARNi. Los autores encontraron 21 genes que causan un fenotipo *gla* (por sus siglas en inglés *germline apoptotic*). Además, con el uso de un análisis de epistasis los autores observaron que la gran mayoría de estos genes (16 de 21) dependen del factor transcripcional *p53* para llevar a cabo la activación del proceso de apoptosis en las células germinales. Además, este grupo de genes dependientes de *p53* dependen también de una ruta de respuesta seguida de un daño funcional a nivel del ADN. Estos datos sugieren que esta clase de genes, entre los que se incluye a *ape-1*, *rad-50*, *rad-51*, *pqn-60*, *ser-3* y *bmk-1*, podrían estar funcionando en la respuesta de daño a ADN. Es interesante que en este estudio se encontraron algunos genes que actúan de forma independiente a *p53*. Entre ellos se encuentra el homólogo de Bcl-2, *ced-9*; el gen *cpb-3* y la MAP cinasa de p38 (*pmk-3*). Tal vez estos genes, en conjunto con la activación de otros más, regulen la activación del proceso de muerte celular programada en la línea germinal del *C. elegans* (Lettre *et al.*, 2004).

Uno de los genes que causó el fenotipo *gla* fue CPB-3, uno de los cuatro miembros de la familia de proteínas CPEB presentes en el *C. elegans*. Se sabe que en los ovocitos de *Xenopus* y de algunos moluscos estas proteínas muestran una interacción física y funcional con p54, el ortólogo del gen *cgh-1* de *C. elegans*. La posibilidad de que CPB-3 y CGH-1 interaccionen y funcionen en el control de la apoptosis de las células germinales a través de un posible mecanismo de regulación traduccional está aún por determinarse (Lettre *et al.*, 2004).

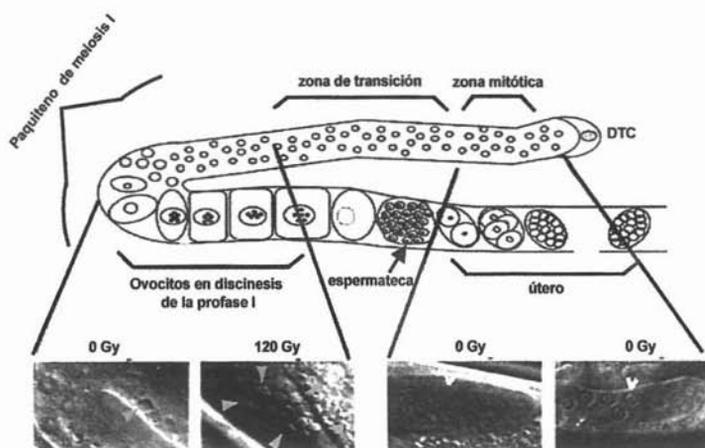
### **1.11. APOPTOSIS POR DAÑO AL ADN**

Un tipo común de muerte presente en diversos organismos es la llamada muerte por daño a ADN. Esta muerte es característica de aquellas células que han sufrido algún daño en su genoma como consecuencia de la exposición a radiación y/o a mutágenos químicos. Cuando estas células sufren alguna modificación en el ADN son eliminadas por apoptosis (Stergiou *et al.*, 2004). Un ejemplo son las células del intestino y las células de la piel que al estar en constante exposición a carcinógenos presentes en los alimentos o a la radiación UV muestran un elevado índice de muerte celular (Vaux, 1993).

Existen diversos mecanismos que aseguran la integridad celular, por ejemplo, aquellos que garantizan la fidelidad de la duplicación del genoma así como la correcta segregación de cromosomas en cada una de las divisiones celulares. Dependiendo de los diferentes niveles y de las funciones dentro de la cascada de señales, las proteínas involucradas en respuesta a un *daño al ADN* han sido clasificadas en *proteínas sensoras*, las cuales detectan el daño, *proteínas transductoras*, las cuales se encargan de transmitir la señal de que existe un daño presente y *proteínas efectoras* que se encargan de generar diversas respuestas específicas. Las células eucariontes han desarrollado señales bioquímicas complejas que activan numerosos procesos después de un daño en el ADN, entre los que se encuentran: un arresto temporal en el ciclo celular, la activación de una maquinaria de reparación y la activación del proceso de apoptosis. Muchos de los estudios sobre las rutas de respuesta seguidas por un daño al ADN, han sido obtenidos a partir de modelos biológicos que permiten hacer diversos análisis genéticos y moleculares entre los que se encuentran a *S. cerevisiae*, *Aspergillus*, *Drosophila* y el nemátodo *C. elegans* (Stergiou *et al.*, 2004).

### **1.12. APOPTOSIS POR DAÑO AL ADN EN LA LÍNEA GERMINAL DEL *C. elegans***

Cuando los nemátodos son expuestos a radiación ionizante se genera la detención del ciclo celular en la zona de proliferación, ocasionando con esto un decremento en el número de células germinales mitóticas. Sin embargo, durante la meiosis, poco después de que las células germinales han salido de paquíteno, si se incrementan las dosis de radiación ionizante se genera un aumento en la apoptosis de células germinales. Los cuerpos apoptóticos que se forman aparecen alrededor de las 2-3 horas de haber irradiado a los animales y persisten como discos altamente refráctiles durante un periodo de 20 a 60 minutos, antes de ser absorbidos por las células de la vaina (Figura 5) (Stergiou *et al.*, 2004).



**Figura 5. Efecto del uso de agentes genotóxicos en la línea germinal del hermafrodita adulto.** La exposición de animales a radiación ionizante ocasiona dos respuestas. Por un lado, las células que se encuentran en proliferación mitótica, sufren un arresto en el ciclo celular con una exposición de 120 Gy (rayos *gamma*) (recuadro derecho-flechas abiertas). Las células comprometidas en la meiosis son eliminadas por apoptosis (recuadro de la izquierda-flechas llenas). La exposición a 0 Gy representa los controles de cada una de las respuestas obtenidas. Modificado de Stergiou *et al.*, 2004.

La muerte inducida por daño al ADN utiliza la maquinaria central de apoptosis (Figura 3). Sin embargo, a diferencia de la muerte fisiológica, la muerte inducida por daño al ADN requiere de los genes EGL-1 y p53, indicando

que la maquinaria de respuesta por daño al ADN es similar a la que controla la muerte celular somática (Stergiou *et al.*, 2004).

### 1.13. SENSORES DE DAÑO A ADN

La función de diversas proteínas en el control de diferentes vías de señalización, garantizan el mantenimiento de la estabilidad genómica en respuesta a diversos estímulos. La pérdida de estas proteínas sensoras seguida por un daño al ADN ocasiona defectos severos en el desarrollo de los organismos. Por ello, el conocimiento de la función de estas proteínas permite entender los mecanismos mediante los cuales se mantiene la integridad del genoma. Diversos análisis genéticos en el genoma del *C. elegans* han establecido que la participación de estas proteínas juegan un papel importante en diversos procesos biológicos tales como: la reparación de defectos en la replicación mitótica, así como en intermediarios meióticos, entre otros (Stergiou *et al.*, 2004). Una de estas proteínas sensoras es MRT-2 (por sus siglas en inglés *mortal germline*) (Shawn and Hodgkin, 2000), la cual se requiere para el mantenimiento de los telómeros. Se sabe que en mutantes en este gen, los telómeros se acortan progresivamente a lo largo de las generaciones. Eventualmente, la falta de este gen provoca la fusión de los extremos de los cromosomas, la inestabilidad genómica y la esterilidad después de aproximadamente 15 generaciones. Del mismo modo, una mutación en el gen *clk-2(mn159)* (por sus siglas en inglés *clock-biological timing abnormality*) (Shawn *et al.*, 2001) ocasiona un crecimiento reducido, un decremento en el ciclo de vida de los animales, así como una reducción en la sobrevivencia de los individuos cuando éstos son expuestos a radiación ionizante. El gen *clk-2* codifica para una proteína de reparación necesaria cuando ocurre algún daño al ADN y participa en la reparación del daño durante la fase S de replicación. Los mutantes en este gen muestran un crecimiento, un bombeo faríngeo y un movimiento corporal lento en comparación con animales silvestres (Shawn *et al.*,

2001). Estos animales presentan defectos en el arresto del ciclo celular, así como en la inducción de muerte celular inducida por la radiación. Los animales son viables a 15°C o 20°C, pero muestran una letalidad embrionaria severa a 25°C y cuando crecen a temperaturas permisibles, estos mutantes presentan una reducción considerable en su progenie, así como hipersensibilidad a agentes que causan daños severos en el ADN como la luz UV, rayos X y al etilmetanosulfonato (Shawn *et al.*, 2001). Por otro lado, la mutante en el gen *rad-5* (Gartner *et al.*, 2000) (por similitud al gen *clock-biological timing abnormality*) presenta defectos en el control de la replicación durante la fase S y su eliminación completa resulta en la detención del desarrollo y en letalidad embrionaria (Stergiou *et al.*, 2004). Este gen codifica para una proteína reparadora que se activa en respuesta a un daño al ADN. Esta mutante fue identificada por ensayos de hipersensibilidad por radiación y se sabe que crece entre 15°C y 20°C. La proteína RAD-5 se requiere para la vía de reparación por daño al ADN en la línea germinal del *C. elegans* (Gartner *et al.*, 2000).

Existen genes involucrados en la reparación de los defectos producidos durante el proceso de meiosis. Se sabe que los cortes de la cadena doble del ADN, los cuales se generan después de una exposición a agentes genotóxicos o de manera normal durante los eventos de recombinación meiótica, eliminan aquellos fragmentos de ADN que han sufrido alguna anomalía o promueven la recombinación. Una de las proteínas que participa en la generación de cortes de cadena doble, eliminando con ello las mutaciones acumuladas durante el proceso de recombinación meiótica, es el producto del gen *spo-11* (por sus siglas en inglés *homolog of yeasts sporulation gene*) fue uno de los primeros genes meióticos recombinantes identificados y pertenece a una familia de proteínas ampliamente conservada necesarias durante el proceso de meiosis (Keeney *et al.*, 1997). Este gen codifica para una proteína de 45.5 KDa esencial para la formación de cortes de cadena doble en el ADN y diversos experimentos han mostrado que esta proteína se une al ADN de aquellas células que se encuentran en meiosis a través de una subunidad catalítica específica la cual repara los daños generados o activa el proceso de apoptosis (Keeney *et al.*,

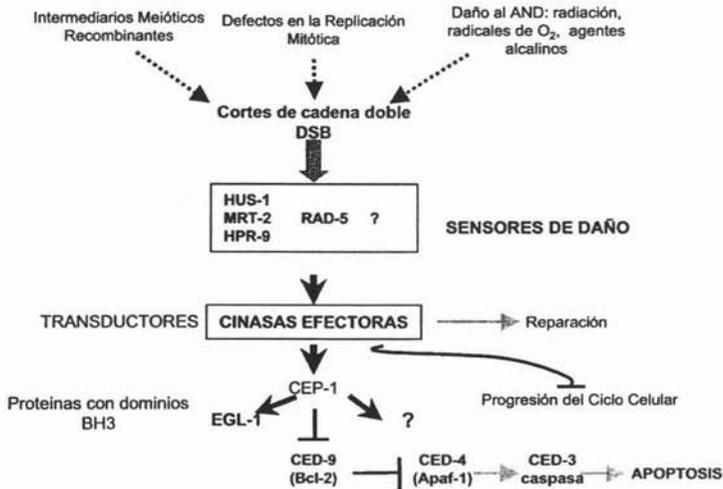
1997). En una mutante en *spo-11* se reducen los niveles de muerte celular sugiriendo que participa en una vía de respuesta para eliminar intermediarios de la recombinación que han sufrido algún tipo de daño al ADN (Stergiou *et al.*, 2004). Las mutantes en este gen, producen un número normal de embriones fertilizados aunque una parte importante muere durante la embriogénesis, observándose además una alta incidencia de machos lo cual es característico de defectos en la segregación cromosómica (Denburg *et al.*, 1998).

Otro de los genes que participan en el mantenimiento de la estabilidad genómica al regular la progresión del ciclo celular y al activar la apoptosis en respuesta por un daño al ADN, es p53, conocido en *C. elegans* como *cep-1* (Brent *et al.*, 2001; Schumacher *et al.*, 2001). En vertebrados, p53 es activado por diversas señales de tensión, tales como la hipoxia y la falta de alimento, mientras que en *Drosophila*, participa en la apoptosis inducida por tensión a causa de agentes genotóxicos (Derry *et al.*, 2001). En *C. elegans*, la apoptosis inducida por daño al ADN requiere específicamente al homólogo de p53, y se desconoce aún quién produce la detención del ciclo celular, ya que esta respuesta es independiente de p53 (Schumacher *et al.*, 2001).

En el *C. elegans*, tanto la mutante *cep-1(w40)*, la cual se sabe que codifica para una proteína trunca la cual carece de los dominios de unión a ADN, así como la eliminación del gen por interferencia de ARN, *cep-1(ARNi)*, presentan una letalidad embrionaria del 2%; sin embargo, en general los individuos son viables y fértiles. Se sabe que estas mutantes muestran una alta letalidad inducida por hipoxia además de que la eliminación de este gen causa un incremento en la producción de machos, sugiriendo que la proteína CEP-1 se requiere para la correcta segregación de los cromosomas durante el proceso de meiosis (Derry *et al.*, 2001).

A través de p53, y del uso de la maquinaria central de apoptosis, el daño al ADN activa la muerte de las células germinales mediante una vía de señalización que requiere la función de diversos genes, entre los que se incluye a *rad-5* y *mrt-2* (Figura 6). Sin embargo, se sabe que tanto estos genes de reparación como p53, no se requieren para la muerte somática debido a que en

los embriones en las mutantes *cep-1(w40)* y *cep-1(ARNi)* esta muerte ocurre de forma normal. Del mismo modo, p53 no se requiere para inducir la muerte fisiológica de las células germinales (Derry *et al.*, 2001).



**Figura 6. Apoptosis inducida por daño al ADN.** El daño al ADN causado por diversos agentes genotóxicos son detectados a través de proteínas control, tales como HUS-1 y MRT-2, las cuales participan en la maquinaria de reparación. El homólogo del gen *p53* en el *C. elegans*, CEP-1, activa transcripcionalmente al gen *egl-1*, dirigiendo con ello la activación del proceso de apoptosis. Tomado de Stergiou *et al.*, 2004.

En resumen, existen dos vías distintas por las cuales se activa la apoptosis de las células germinales en la gónada del *C. elegans*, la primera por daño al ADN y la segunda, la muerte fisiológica que ocurre de forma normal en la línea germinal y la cual tiene como función asegurar la homeostasis del tejido. Este último tipo de muerte, aún cuando se sabe que ocurre de forma masiva y que está presente en todos los individuos, se desconoce aún como es regulada.

#### 1.14. RADICALES LIBRES Y DAÑOS CELULARES

Las especies de oxígeno reactivas (EOR) son producto del metabolismo aerobio de diversos organismos tanto eucariontes como procariontes y se sabe que participan en rutas fisiológicas específicas durante el desarrollo. Las EOR son formadas por la excitación de una molécula de  $O_2$  o por su reducción parcial. Los efectos dañinos de las EOR sobre el ADN, las proteínas, los lípidos y otros componentes celulares, así como su papel en diversos procesos patológicos y en el envejecimiento, han sido bien establecidos (Hansberg, 2002). En el ADN, estas alteraciones, se incrementan considerablemente al añadir peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y radicales hidroxilo ( $OH^\cdot$ ) los cuales alteran tanto a las purinas como a las pirimidinas, así como a la desoxirribosa al generar rupturas en el ADN. Por su parte, los daños causados a las proteínas son ocasionados, principalmente, por el radical hidroxilo  $OH^\cdot$ , mientras que el oxígeno en singulete,  $^1O_2$  es más selectivo y reacciona particularmente con algunos aminoácidos (Hansberg, 2002). Aún con los daños generados a nivel de ADN y proteínas, se sabe que estas moléculas tienen además una función regulatoria al actuar en diferentes funciones celulares entre las que se incluye la proliferación celular, la inmunidad, la transducción de señales y el transporte de iones (Aguirre *et al.*, 2005). Esta visión alternativa, apoya la idea del papel de determinadas enzimas específicas tales como la NADPH oxidasa (NOX) la cual se sabe, produce EOR para regular varios procesos celulares. Esta enzima utiliza NADPH y  $O_2$  para generar superóxido ( $O_2^\cdot$ ) cuando las células son expuestas a patógenos a factores inflamatorios. Tanto la mitocondria como la enzima NOX son medios celulares importantes en la formación de EOR. La mitocondria genera niveles constantes de  $O_2^\cdot$  a través de los complejos I y III del la cadena de transporte de electrones y se sabe que esta molécula es convertida a  $H_2O_2$  por la superóxido dismutasa (SOD). Diversos estudios han implicado la función de NOX en diferentes procesos del desarrollo, tales como la formación de matriz extracelular en el nemátodo *Caenorhabditis elegans*, la formación de la raíz en *Arabidopsis thaliana* y el desarrollo de cuerpos fructíferos en los hongos (Aguirre *et al.*, 2005).

## 1.15. REGULADORES DE LA RESPUESTA ANTIOXIDANTE

Debido a que las EOR juegan un papel importante en diversos procesos del desarrollo, resulta necesario entender los mecanismos que utiliza la célula para detectar estas moléculas, así como los mecanismos mediante los cuales se ajustan los niveles dentro de la célula. Diversos estudios en microorganismos eucariontes han demostrado la activación de la vía de las cinasas activadas por mitógenos o MAPK por sus siglas en inglés, en respuesta a diversos estímulos tales como la presencia de EOR. Las cinasas también participan en otros procesos tales como: la transcripción, la progresión del ciclo celular, el re-arreglo del citoesqueleto y el movimiento celular, así como en la diferenciación y muerte celular programada (Bakkenist *et al.*, 2004).

En *S. cerevisiae* y *S. pombe*, una familia conservada de MAP cinasas, la cual incluye a *Hog1* y a *Spc1*, respectivamente, así como a las MAP cinasas de mamíferos p38 y JNK participan de manera crucial en la transducción de señales en respuesta a diferentes tipos de tensión. En *Saccharomyces pombe* la activación de la vía de las MAP cinasas incluye la función de una cinasa sensora (Mak1, Mak2/Mak3), una proteína reguladora de la respuesta (Prr1y Msc4) cuya función es activar a la MAPKKK inicial (Wis4/Win1), la cual a su vez activa a la MAPKK (Wis1), activando esta última a la MAPK (Spc1/Sty1). Tal y como ocurre en levaduras, los diversos organismos muestran vías a través de las cuales se genera una respuesta en presencia de diversos estímulos celulares (Aguirre *et al.*, 2005). En general, la función de la vía de las MAP cinasas es activar la expresión de determinados genes, a través de la activación de un factor transcripcional en presencia, por ejemplo, de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

## **2. HIPÓTESIS**

Se ha observado en otros sistemas que al exponer células a diferentes tipos de tensión éstas pueden llegar a morir a través de apoptosis. Por esta razón, creemos que cuando se expongan nemátodos a tensiones tales como: tensión oxidativa, osmótica, choque de calor y falta de alimentos, las células germinales de este organismo morirán bajo estas condiciones de tensión. La línea germinal es el único tejido que es capaz de sufrir apoptosis en el organismo adulto, ya que es el único que se encuentra en constante proliferación. Si existe apoptosis de las células germinales en respuesta a los diferentes tipos de tensión evaluadas es probable que mutantes en estas vías a tensión se encuentren afectadas en esta respuesta.

## **3. OBJETIVO GENERAL**

El objetivo general del trabajo es determinar el efecto de diferentes tipos de tensión como son: la tensión oxidativa, osmótica, el choque de calor y la falta de alimentos que produce sobre las células germinales de la gónada del nemátodo *Caenorhabditis elegans*. En el caso de que los diversos tipos de tensión mencionados provoquen muerte celular programada nos proponemos caracterizar las vías reguladoras implicadas en producir esta respuesta por medio del estudio de mutantes en dichas vías.

### **3.1. OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Determinar las condiciones necesarias para inducir la muerte de células germinales por medio de tensión en la gónada del nemátodo *C. elegans*. Para ello, se realizarán diversas pruebas variando las concentraciones de

agentes que induzcan tensión y se determinarán los tiempos de exposición a cada tratamiento.

2. Determinar si la muerte de células germinales inducida por tensión es regulada por la vía genotóxica o fisiológica de apoptosis que ocurren en la línea germinal del *C. elegans* o si es regulada por una nueva vía.
3. Estudiar el efecto de agentes que provocan tensión sobre la línea germinal de mutantes en genes de respuesta a tensión.

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1. MANTENIMIENTO DE NEMÁTODOS Y CEPAS UTILIZADAS**

El nemátodo *Caenorhabditis elegans* se creció en placas de medio NGM-Lite, a las cuales se les colocó sobre la superficie, unas gotas de un cultivo de 8-12 h de la cepa OP50-1 de *Escherichia coli*. El medio NGM-Lite (por sus siglas en inglés *Nematode Growth Medium*) (Brenner, 1974) incluye para un litro de medio:

<b>NaCl</b>	2 g
<b>Bactotripton</b>	4 g
<b>Fosfato de Potasio Monobásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)</b>	3 g
<b>Fosfato de Potasio Dibásico (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)</b>	0.5 g
<b>Colesterol</b>	0.008 g

Se agregaron 20 g de agar por litro de medio y se esterilizó por autoclave durante 20 minutos a 121°C a 15 libras (cm<sup>2</sup>) de presión. El medio se vació con ayuda de una pipeta en cajas de Petri de diferentes tamaños y se dejó enfriar a temperatura ambiente por una noche. Al día siguiente se agregaron aproximadamente 200 µl del cultivo de la cepa OP50-1 y se dejó incubar a temperatura ambiente durante toda la noche. Las cajas se pueden almacenar a 4°C por tiempo indefinido.

### **4.2. MEDIO DE CULTIVO PARA BACTERIAS**

Para crecer bacterias se utilizó medio líquido LB (Luria-Bertani) el cual incluye por litro:

<b>Triptona</b>	10 g
<b>Extracto de Levadura</b>	5 g
<b>NaCl</b>	5 g

Se esterilizó a 121°C durante 20 minutos. El medio sólido incluye 15 g de agar por cada litro de LB y la concentración de los antibióticos utilizados es: carbencilina 50 µg/ml, ampicilina y tetraciclina.

Para obtener un cultivo de la cepa OP50-1, una colonia aislada se inoculó en 30 ml de LB en presencia del antibiótico estreptomina a una concentración de 50 µg/ml, y se dejó crecer a 37°C durante toda la noche en agitación constante (250 rpm).

#### **4.3. SINCRONIZACIÓN DE ANIMALES**

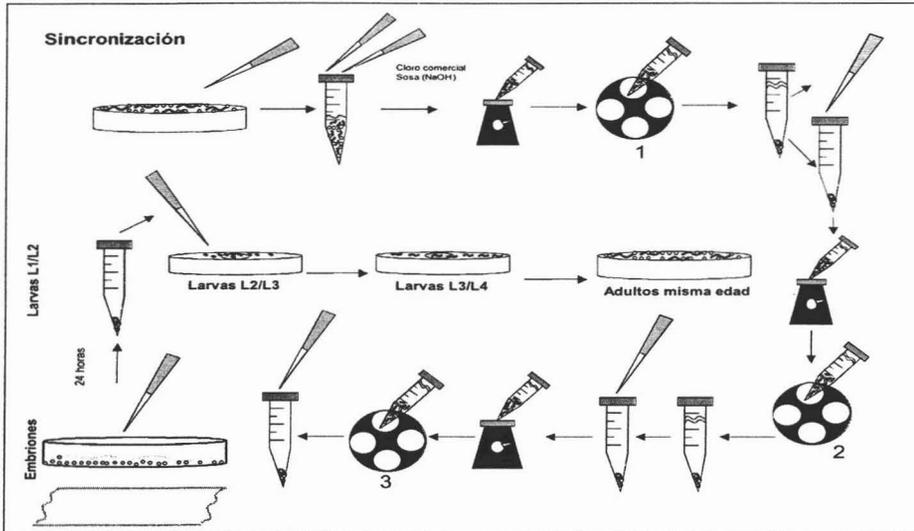
El proceso de sincronización tiene como objetivo tener poblaciones de animales de la misma edad. Estos individuos sincronizados, representan una población de individuos con prácticamente el mismo tiempo de desarrollo, por lo que los resultados y las observaciones obtenidas a partir de estos individuos representan un conjunto de datos homogéneos. El procedimiento se describe a continuación.

Para la obtención de embriones, se utilizó una placa con animales adultos grávidos, la cual se obtuvo creciendo 5 animales adultos por cuatro días antes de realizar este procedimiento. Los animales se lavaron con 1ml de amortiguador M9 (6 g NaHPO<sub>4</sub>, 3 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 g NaCl, 0.25 g MgSO<sub>4</sub> 7·H<sub>2</sub>O, para un litro de agua) y se colectaron en un tubo eppendorf, con un volumen de recuperado de aproximadamente 800 µl. Cuando el volumen obtenido fue inferior al mencionado, se agregó M9 hasta alcanzar este volumen y por el contrario, cuando el volumen obtenido excedió los 800 µl, se incubó en hielo durante 5 min, facilitando con esto que los animales se sedimentaran en el fondo del tubo permitiendo quitar el exceso de amortiguador.

A la mezcla de animales grávidos y M9 se le agregó solución de lisis, la cual incluye 200  $\mu$ l de NaOH 5 N y 400  $\mu$ l de cloro comercial. Esta mezcla se incubó durante 5 min a temperatura ambiente con agitación constante. La agitación constante, con ayuda del vortex, provoca que los animales se lisen y liberen a los embriones. Es importante no incubar por más tiempo, ya que los embriones pueden morir también con el tratamiento. Posteriormente se centrifugó en una minifuga (6000 rpm) durante 1 min y se retiró el sobrenadante dejando un volumen de alrededor de 100  $\mu$ l para evitar traer consigo la pastilla que contiene a los embriones.

Para eliminar el exceso de sosa y cloro se hicieron tres lavados agregando un ml de amortiguador M9, agitando y centrifugando por 1 min. Después del último lavado la pastilla se diluyó en 1 ml del amortiguador M9 y se colocó la mezcla en una caja Petri de vidrio de 5 cm, se agregó 1 ml más del mismo amortiguador y se tapó con Parafilm. Los embriones se incubaron a 20°C durante toda la noche.

Durante este periodo, los embriones concluyen la embriogénesis y las larvas L1 eclosionan deteniendo su desarrollo por la falta de alimento. Al día siguiente, se tomaron alrededor de 100 larvas L1 y se colocaron en una placa con comida. En este momento, en presencia de comida, las larvas reinician de forma sincronizada su crecimiento, obteniendo animales de la misma edad. Este método es útil para sincronizar el crecimiento de animales (Figura 7) y también es utilizado para descontaminar los cultivos de hongos y/o bacterias. El procedimiento de limpieza es básicamente es el mismo, aunque en este, los embriones no permanecen sin comida toda la noche, ya que después de ser obtenidos a partir del tratamiento con cloro e hidróxido de sodio, son colocados inmediatamente en placas con comida en un volumen de 15  $\mu$ l.

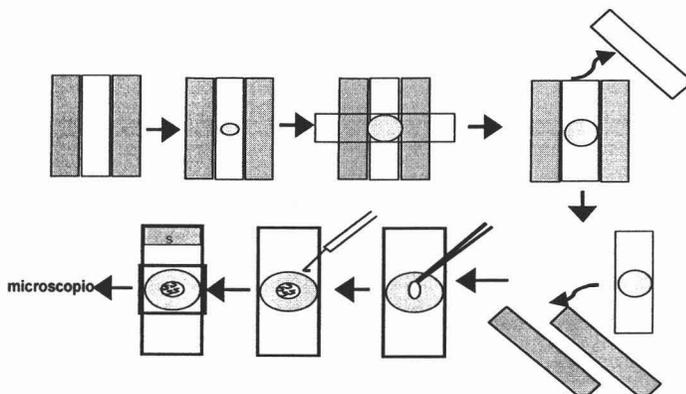


**Figura 7. Sincronización de los animales.** Este protocolo (descrito en el texto), el cual incluye el uso de hidróxido de sodio 5 N y cloro comercial, permite obtener animales de la misma edad. El uso de animales con edad homogénea, evita amplios intervalos de variación por efecto de la edad, en los datos obtenidos después de algún tratamiento. Este protocolo es también utilizado para eliminar contaminaciones por hongos y/o bacterias.

#### **4.4. MONTAJE DE NEMÁTODOS EN PLACAS DE AGAR PARA EL ANÁLISIS MICROSCÓPICO**

La observación de los nemátodos se llevó a cabo utilizando placas de agarosa al 2%, las cuales fueron hechas de la siguiente manera. Se pusieron dos portaobjetos, cubiertos con 3 capas de cinta adhesiva sobre cada una de sus caras para dar espesor y se colocó un portaobjetos libre de cinta adhesiva entre ellos (Figura 8). Se agregó una gota de agarosa al 2% disuelta en agua sobre el portaobjetos sin cinta y se colocó otro portaobjetos limpio sobre éste, de tal forma que la gota de agarosa se aplane. Una vez solidificada la agarosa, se retiró uno de los portaobjetos. El portaobjetos que contiene la agarosa se utiliza posteriormente para colocar 10 µl de azida de sodio 40 mM como anestesia y se

colocaron 10 animales, una vez que estos se dejan de mover se juntan en el centro con un cabello y se coloca un cubreobjetos encima.



**Figura 8. Montaje de los animales en placas de agarosa.** La observación de los animales sometidos a alguno de los diferentes tipos de tensión, así como los individuos control, se realizó montado animales en placas de agarosa, los cuales se elaboraron con agarosa al 2% en un empalme de portaobjetos a los que previamente se les colocó cinta adhesiva. Una vez teniendo la placa de agarosa, se colocaron 10  $\mu$ l de anestésico y se montaron los animales para su observación en el microscopio.

#### **4.5. ESPECIFICACIONES EN EL CONTEO DE CUERPOS APOPTÓTICOS**

El conteo de cuerpos apoptóticos se realizó estableciendo algunas especificaciones, tanto de los animales como de las gónadas observadas. Algunas de las características que se consideraron para este conteo celular fueron las siguientes.

A) *Homogeneidad de edades.* Los nemátodos utilizados en los diversos tratamientos, así como en las aquellos que representan la población control en cada uno de éstos, fueron individuos de edad homogénea obtenidos a partir del proceso de sincronización. Sin embargo, previo a la realización de los diversos tratamientos, se eligieron aquellos animales que presentaran un mayor parecido en la talla, y se descartaron aquellos individuos que mostraron un ligero o menor avance en el desarrollo.

B) *Visualización de gónadas.* En el *C. elegans*, uno de los brazos de la gónada se encuentra cubierto por el intestino, por ello, sólo las gónadas completamente visibles fueron incluidas en nuestros análisis estadísticos.

#### **4.6. CEPAS DE NEMÁTODOS UTILIZADAS**

Las cepas que se utilizaron a lo largo de trabajo están divididas en 3 grupos. El primero fue utilizado para determinar si la muerte observada ocurre o no mediante un proceso de apoptosis y se utilizaron las siguientes cepas: ***ced-1(e1735)***. Una mutante en este gen causa la degradación anormal de cuerpos apoptóticos favoreciendo su acumulación en la línea germinal (Riddle *et al.*, 1997). La Interferencia de ARN del gen *ced-1*, ***ced-1(ARNi)***, muestra animales con características similares a las encontradas en la cepa ***ced-1(e1735)***. La mutante ***ced-3(n717)*** y ***ced-4 (n1162)*** que codifican respectivamente para la única caspasa en el *C. elegans* y para el homólogo de Apaf-1 de mamíferos el cual se sabe es necesario para activar a la primera, son esenciales para que haya muerte celular programa por apoptosis (Riddle, et al., 1997). La cepa ***ced-5 (n1812)*** la cual es deficiente en la degradación de cuerpos apoptóticos (Riddle, et al., 1997). Una mutante en este gen, permite la acumulación transitoria de cuerpos celulares, así como una inadecuada migración de las células que forman al inicio del desarrollo a la línea germinal.

El segundo grupo fue utilizado para establecer si el incremento en apoptosis observada durante la realización de este trabajo es el resultado de una muerte fisiológica o por daño a ADN (como se explicará en la sección de resultados), se utilizaron mutantes en la vía de muerte fisiológica tales como: ***ced-9(n1950)*** las cuales reducen la muerte celular somática a través de la falta de interacción de la proteína para la que codifican con el factor pro-apoptótico EGL-1 (Riddle, et al., 1997); y la mutante ***egl-1(n1084n3082)*** en donde ocurre la apoptosis somática (Conradt and Horvitz, 1998). En la mutante ***mpk-1(ga117)*** las células germinales no progresan del estado de paquíteno de la

profase I de la meiosis, generando con ello la ausencia de ovocitos y la ausencia de apoptosis (Lackner and Kim, 1998).

Las cepas mutantes de la vía de daño al ADN que se utilizaron fueron: ***spo-11(ok79)*** la cual muestra errores en la segregación cromosómica y como consecuencia una alta tasa de letalidad embrionaria (Keeney et al., 1997); las mutantes en el gen ***mrt-2*** muestran una progresiva pérdida de cromosomas, así como un alta hipersensibilidad a gentes que causan daño al ADN. Después de 14 generaciones, los animales se vuelven estériles debido a la acumulación de daños en el ADN (Shawn and Hodgkin, 2000). La mutante ***clk-2 (mn159)*** es hipersensible al daño al ADN ocasionado por luz UV, rayos X y compuestos como el etilmetanosulfonato (Shawn et al., 2001); ***him-7 V (e1480)*** la cuál produce alrededor del 3% de machos en su progenie debido a un error en la segregación de sus cromosomas, además de presentar una proporción ligeramente elevada de esperma inviable (Riddle, et al., 1997). La mutante ***cep-1(w40)***, en la cuál el homólogo del gen p53 de *C. elegans* está ausente, muestra una letalidad embrionaria elevada de alrededor del 2%, aunque en general estos animales son viables y fértiles. Los embriones muestran un patrón normal de apoptosis somática, sugiriendo que CEP-1 no se requiere para la muerte celular que ocurre en el soma, mientras que la línea germinal de esta mutante, es sensible a radiación ionizantes, a hipoxia y a tensión por radiación ionizante (Brent et al., 2001).

El tercer grupo se utilizó para conocer el papel de algunas cinasas en el proceso de muerte celular y se utilizaron a las cepas: ***mek-1 (ks54)***, este gen codifica para una MAP cinasa cinasa similar a la MAPKK de mamíferos, MKK7. La delección de este gen, causa hipersensibilidad a metales pesados, así como a la falta de alimento (Kawasaki et al. 1999); ***pmk-3 (0k169)*** que codifica para una MAP cinasa (*pmk-3*) con secuencia muy similar a la MAP cinasa p38 de mamíferos. *pmk-3* es una de las tres isoformas presentes en el genoma del *C. elegans* y su mutación causa hipersensibilidad a diversos tipos de tensión, principalmente a la presencia de patógenos (Berman et al., 2001). Las mutantes utilizadas se crecieron a 20°C bajo el protocolo descrito previamente.

#### **4.7. CLONACIÓN DEL GEN *ced-1***

550 bases de la región codificadora de *ced-1* se clonaron a partir de ARN extraído de animales silvestres (N2) de varios estadios del desarrollo. La extracción de ARN se hizo de la siguiente manera. Se lavó con 1 ml de agua desionizada una caja con animales de edades heterogéneas. Los animales colectados se colocaron en un tubo eppendorf al que se le agregó 400 µl de trizol, se mezcló, posteriormente se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Posteriormente, se descongeló el tubo a temperatura ambiente y se vació el contenido en un mortero con nitrógeno líquido y las muestras se homogenizaron. Una vez homogenizadas las muestras se pasaron a un tubo y se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente. La mezcla se centrifugó por 10 min a la máxima velocidad y la fase acuosa fue transferida a un tubo nuevo. Se le agregaron 200 µl de cloroformo, por cada ml de Trizol, se mezcló durante 15 segundos e incubó de 2-3 min a temperatura ambiente. Al término de este tiempo, se centrifugó, se tomó la fase acuosa, la cual contiene ARN, se precipitó agregando 0.5 ml de isopropanol y se incubó a temperatura ambiente durante un periodo de 10 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se centrifugó y la pastilla se lavó con 1 ml de etanol al 75% para eliminar las sales. La pastilla se dejó secar a temperatura ambiente por 10 min y se resuspendió en 90 µl de agua libre de ARNasas.

Usando este procedimiento las muestras quedan libres prácticamente de ADN; sin embargo, para eliminar cualquier traza de este, se agregaron 10 µl de amortiguador de la reacción de la transcriptasa reversa (Invitrogen), 1 µl de ADNasa libre de ARNasa, se incubó 1 hora a  $37^{\circ}\text{C}$ , se agregaron 100 µl de fenol-cloroformo-isoamílico y se mezcló. La muestra se centrifugó, se extrajo la fase acuosa, a la cual se le agregaron 100 µl de cloroformo y se centrifugó nuevamente por 2 min. La muestra se precipitó agregando 1 µl de glucógeno (AMBION) y 100 µl de isopropanol para ARN y se incubó a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 30 min. Posteriormente, se centrifugó durante 10 min a  $4^{\circ}\text{C}$ , se eliminó el

sobrenadante y se agregaron 500 µl de etanol al 75%. Se centrifugó durante 5 min a 4°C y la pastilla se lavó con 1 ml de etanol al 75%, se centrifugó a 4°C y se desechó el sobrenadante. La pastilla se dejó secar a temperatura ambiente durante 10 min y se resuspendió en 90 µl de amortiguador TE libre de ARNasas. Se cuantificó el ARN con el uso del espectrofotómetro a 260 de densidad óptica. El ARN se almacenó a -20°C.

#### **4.8. FORMACIÓN DE ADN complementario (ADNc)**

Para la formación de ADNc a partir de ARN, se utilizó el ARN proveniente del paso anterior y se realizó una reacción de transcripción inversa siguiendo las recomendaciones del proveedor (Invitrogen, EU).

Para la reacción se utilizaron los siguientes reactivos: H<sub>2</sub>O DEPC, 10 mM dNTP's, oligo dT 5.5 ug/µl, amortiguador RT 10X, MgCl<sub>2</sub> 25 mM, DTT 0.1 M y 50 unidades de la enzima transcriptasa reversa (SuperScript II RT). Como control negativo se hizo una reacción sin ARN. La reacción de ADNc se realizó a 42°C por 50 min y posteriormente para detener la reacción, se incubó a 70°C durante 15 min y se colocó en hielo. Para eliminar el ARN de doble cadena se agregó 1 µl de ARNasa H y se incubó por 20 min a 37°C.

Para aislar el ADNc del gen *ced-1* se realizó una reacción de PCR a partir del ADNc obtenido utilizando los oligos *ced-1* 5':

CGGAATTCATGCGTCTCATTCTCC y *ced-1* 3':

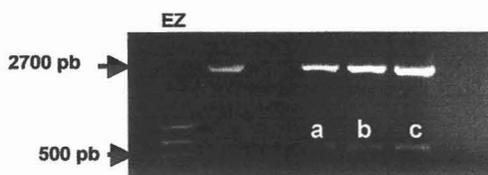
CGGAATTCCTTGTACAGATAC. El programa de PCR se diseñó con las siguientes características:

1. 95°C por 4 min
2. 95°C por 30 seg
3. 55°C por 45 seg *alineación*
4. 72°C por 50 seg *extensión*, se regresó al paso 2, 25X veces
5. 72°C por 4 min y
6. 25°C continuamente.

Para la reacción se utilizó H<sub>2</sub>O grado milli Q, amortiguador Taq 10X, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, dNTP's, 100 ng/μl de los oligonucleótidos ced-1 3' y ced-1 5', 1 μl de enzima Taq polimerasa y 5 μl de ADNc en un volumen final de reacción de 50 μl. Al término del ciclo, se purificó el producto de PCR siguiendo el protocolo de purificación de PCR del estuche QIAquick (Qiagen EU).

El producto de PCR fue clonado en el vector "TOPO" de la compañía invitrogen, el cual tiene la característica de ser lineal y en cada extremo posee una timina que no está apareada. Esta timina es compatible con la adenina no apareada que flanquea los productos de PCR producidos por la Taq polimerasa.

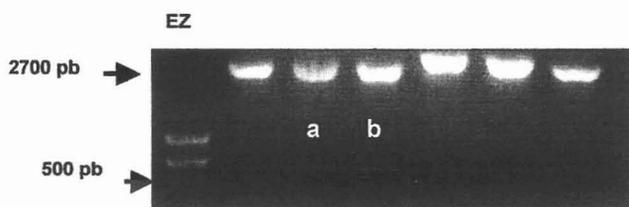
La ligación y transformación se llevó a cabo siguiendo protocolos estándares (Sambrook and Russell, 2001). Para identificar las colonias que contenían el evento de ligación deseado se extrajeron los plásmidos a partir de las bacterias obtenidas del proceso de transformación utilizando el estuche "QIAprep Spin Miniprep Kit Protocol" (Qiagen). Los plásmidos obtenidos fueron digeridos con *EcoRI* y se corrieron en un gel de agarosa (Figura 9). Se encontraron 3 plásmidos que contenían el evento esperado: una banda de aproximadamente 2790 pb representando el vector y una banda de aproximadamente 600 pb representando al gen *ced-1*. Los plásmidos 1 y 2 fueron nombrados: *pSS1* y *pSS1b*.



**Figura 9. Digestión de los plásmidos.** La figura muestra la digestión de los diferentes productos de plásmidos obtenidos a partir de colonias independientes. La digestión se llevó a cabo utilizando la enzima *EcoRI*. Las bandas a, b y c presentan un peso molecular esperado de 550 pb.

El fragmento de 600 pb de *ced-1* fue sub-clonado en el vector pPD129.36 siguiendo técnicas estándares y utilizando los sitios *EcoRI* incorporados durante el PCR (Ravi *et al.*, 2000). Este vector cuenta con un sitio de clonación múltiple

flanqueado por dos promotores de la polimerasa T7. Este vector es utilizado para inducir transcripción de genes en bacterias y producir ARN de doble cadena (Ravi *et al.*, 2000). Se obtuvieron dos plásmidos a partir de 6 colonias analizadas los cuáles fueron nombrados: *pSS2* y *pSS2b* (Figura 10).



**Figura 10. Digestión de plásmidos con *EcoRI*.** La figura representa la digestión de los productos de 6 plásmidos. El gel muestra dos bandas (a y b) las cuales corresponden a las colonias 4 y 6, con un peso aproximado de 600 pb. La digestión se llevó a cabo utilizando la enzima *EcoRI*.

El plásmido *pSS2* fue utilizado para transformar bacterias de la cepa HT115 (DE3) de *E. coli* debido a que esta cepa carece de ARNasa de tipo III, la cual en condiciones normales degrada ARN de doble cadena (Timmons y Fire, 1998). El uso de esta cepa permite que se lleve a cabo la interferencia de ARN.

#### **4.9. INTERFERENCIA DE ARN DE LOS GENES *ced-1* y *sek-1***

El gen *sek-1* fue clonado por Rosa Navarro y su clonación se describe en el capítulo 2. Para inducir la transcripción de los genes *ced-1* y *sek-1* a partir de los promotores T7 y producir ARN de doble cadena se realizó el siguiente protocolo: se creció el cultivo a una densidad óptica de 0.6 a 37° C en presencia de los antibióticos ampicilina y tetraciclina a una concentración de 50 µg/ml y 12.5 µg/ml, respectivamente. Se agregó 0.4 mM de IPTG y se continuó la incubación por 2 h a 37°C. Al término de la incubación las bacterias se recuperaron por centrifugación, se resuspendieron en un medio que incluye 25 ml de LB, 25 ml de glicerol al 50%, 0.4 mM de IPTG, 50 µg/ml de ampicilina y 12.5 µg/ml tetraciclina, posteriormente se hicieron alícuotas de 1 ml las cuales fueron congeladas inmediatamente y almacenadas a -80°C (Timmons, 2001). El

medio de cultivo es NGM-Lite (descrito previamente), adicionado con 30 g de agar, 50 µg/ml ampicilina y 12.5 µg/ml tetraciclina. Una alícuota de un ml de bacterias inducidas con el gen de interés se centrifugó a 8000 rpm durante 2 min. Se retiró el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 100 µl de medio LB que contiene 50 µg/ml ampicilina, 12.5 µg/ml tetraciclina e 0.4 mM de IPTG. Cincuenta µl de bacterias con medio se colocaron sobre la superficie de las cajas y se dejaron secar a temperatura ambiente. Éstas se pueden almacenar a 4°C hasta por una semana.

#### **4.10. SELECCIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS PARA LOS EXPERIMENTOS DE TENSIÓN**

Con el objetivo de establecer las mejores condiciones de tensión en cada uno de los tratamientos que inducen muerte de las células germinales, se hicieron curvas de tolerancia utilizando animales adultos de 1 día de la cepa *ced-1(e1735)*. En cada una de las condiciones se analizó el porcentaje de mortalidad de los animales expuestos a cada tratamiento, así como el nivel de muerte celular como consecuencia de la condición utilizada. Éste último se midió contando el número de cuerpos apoptóticos en la gónada del *C. elegans*. Se eligió el tratamiento en donde se observaron niveles elevados de muerte de células germinales y que no muestra mortalidad de los animales. Los tratamientos utilizados consisten de dos etapas: la primera es un tratamiento líquido, el cual incluye a la tensión oxidativa y osmótica, y la segunda, un tratamiento en sólido que induce la muerte celular al utilizar el choque de calor y la falta de alimento.

##### **4.10.1. Curva de tolerancia: tensión osmótica**

Para encontrar niveles elevados de muerte celular en cloruro de sodio sin causar muerte de los animales expuestos, se probaron concentraciones de 1,

35, 70, 105 y 175 mM de este compuesto. La principal mortalidad de individuos fue observada en las concentraciones de 105 y 175 mM de cloruro de sodio, en donde se encontró un porcentaje de 10 y 30%, respectivamente de animales muertos en este tratamiento. La mayor proporción de muerte de células germinales se obtuvo utilizando una concentración de cloruro de sodio de 70 mM al mostrar un promedio de 19 cuerpos apoptóticos por animal tratado y no se observaron animales muertos en esta concentración. Es importante mencionar que aún cuando el uso de NaCl excede los 70 mM, el número de cuerpos apoptóticos se encuentra por debajo del promedio obtenido en esta última concentración (Figura 11b).

#### **4.10.2. Curva de tolerancia: tensión oxidativa**

Para encontrar la condición que induce muerte de células germinales por tensión oxidativa sin matar a los animales tratados, se utilizaron cuatro diferentes concentraciones de paraquat: 1, 5 10 y 15 mM. Con el uso de este herbicida se observó que la tasa de mortalidad se incrementó significativamente al utilizar una concentración de 15 mM de este compuesto (Figura 11a). Niveles por debajo de esta concentración no mostraron un aumento en la mortalidad de los animales tratados. Por su parte, la muerte de células germinales se incrementó, comparado con la población control, hasta 3 veces más cuando se utilizó una concentración de paraquat de 10 mM. El promedio de cuerpos apoptóticos alcanzado con esta concentración fue de 16 unidades por animal.

#### **4.10.3. Curva de tolerancia: choque de calor**

En el caso de la inducción de muerte celular por efecto de un choque de calor, se probaron dos condiciones diferentes (Figura 11c). Por un lado, se sometieron a los animales a una temperatura de 30°C y se observó la mortalidad de los individuos así como el nivel de muerte celular ocasionado bajo esta condición. Por el otro lado, se expusieron animales a una temperatura mayor de

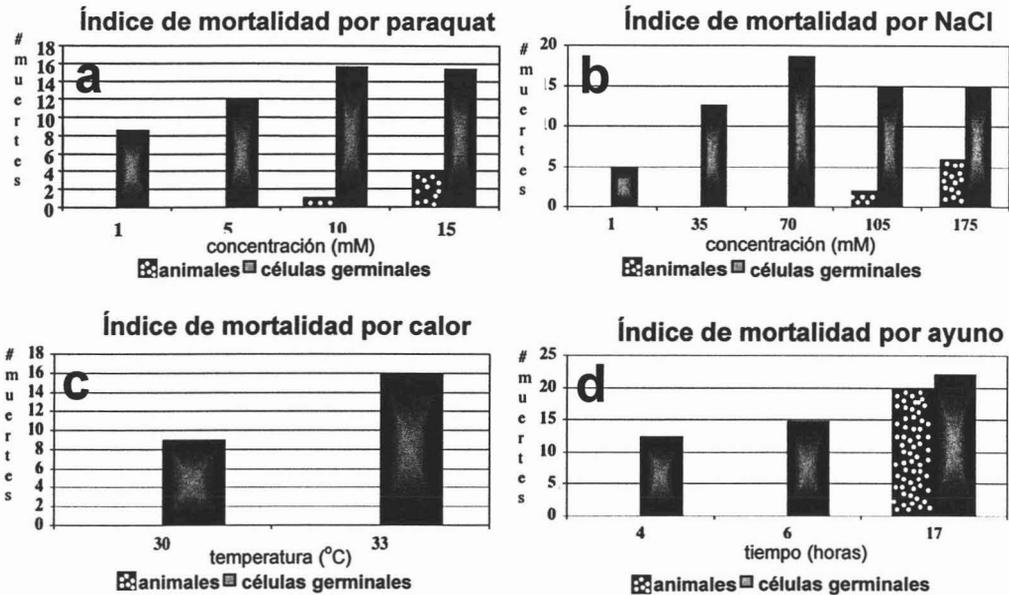
33°C y del mismo modo se obtuvieron los parámetros antes mencionados. En ambas condiciones, la mortalidad de los animales fue nula, mientras que el principal incremento en la muerte de células germinales se obtuvo a 33°C. El promedio de cuerpos apoptóticos obtenido como consecuencia de un choque de calor a esta temperatura fue de 16 unidades.

#### **4.10.4. Curva de tolerancia: tensión nutricional**

Con el objetivo de establecer el tiempo necesario para inducir el mayor nivel de muerte celular en la línea germinal del nemátodo sin generar una tasa de mortalidad elevada, se sometieron a los animales a la falta de alimento durante períodos de 4, 6 y 17 horas. Los resultados obtenidos muestran una mortalidad completa en aquellos animales que permanecieron sin alimento durante un periodo de 17 horas (Figura 11d), mientras que los intervalos de 4 y 6 horas no ocasionaron la muerte de ningún animal. El intervalo de 6 horas representa una condición adecuada para inducir muerte de células germinales y el promedio de muerte celular fue de 15 cuerpos apoptóticos por individuo.

Las mejores condiciones para cada tratamiento fueron 70 mM de NaCl para inducir tensión osmótica, 10 mM de paraquat para inducir tensión oxidativa, 33°C para inducir choque de calor y un período de 6 horas de ayuno para inducir muerte de células germinales por tensión nutricional (Figura 11).

## Curvas de Tolerancia



**Figura 11. Curvas de tolerancia de las diferentes formas de tensión utilizadas.** En cada uno de los tratamientos utilizados se cuantificó el total de animales muertos al término del tratamiento (barras con puntos blancos), así como el promedio de células germinales muertas (barras lisas). Los ensayos de tolerancia se realizaron utilizando a la cepa *ced-1(e1735)* la cual es deficiente en la degradación de cuerpos apoptóticos permitiendo hacer conteos directos de muerte en cada uno de los tratamientos realizados. **a: Tensión oxidativa (10 mM).** En este gráfico se muestra el nivel de tolerancia cuando los animales son expuestos a diversas concentraciones de paraquat. Nótese que la concentración de 10 mM representa una mayor índice de muerte celular, así como una reducida tasa de mortalidad. **b: Tensión Osmótica (70 mM).** La concentración adecuada para inducir muerte de células germinales por tensión osmótica es de 70 mM debido a que en esta condición se observa en el pico más alto de apoptosis y una mortalidad nula. **c: Choque de calor a 33°C.** Utilizando una temperatura de 33°C se obtiene una mayor inducción de muerte en la línea germinal del nemátodo sin muerte de animales. Temperaturas mayores matan a los animales. En **d: Tensión Nutricional.** A las seis horas se indujo una elevada muerte de células germinales y las gónadas de los animales aún tenían una morfología normal. La visualización de las gónadas se hizo utilizando microscopía tipo Nomarski.

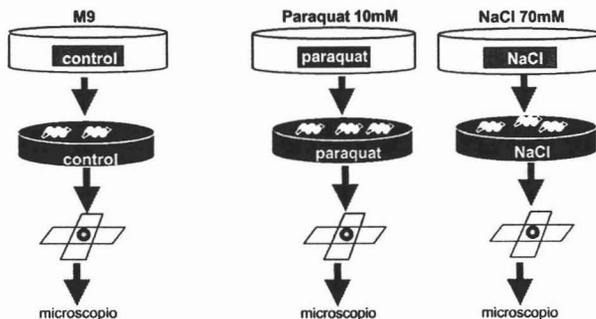
### 4. 11. TRATAMIENTOS QUE INDUCEN TENSIÓN EN LA GÓNADA DEL *C.*

#### *elegans*

#### 4.11.1. Tensión oxidativa y osmótica

La inducción de la muerte celular por efecto de tensión oxidativa, se obtuvo colocando animales en una caja de petri de vidrio con una solución que contiene 10 mM de paraquat disuelto en amortiguador M9, durante una hora, mientras que la muerte como consecuencia de un choque osmótico, se generó colocando a los animales en cajas de petri en una solución 70 mM de cloruro de sodio en amortiguador M9, durante una hora. Para evitar que el líquido se evapore, las cajas fueron selladas con Parafilm. En cada uno de los tratamientos se colocaron alrededor de 30 animales y se incubaron por 1 h a 20°C. Después de este tiempo y con la finalidad de eliminar el exceso de los compuestos utilizados, los animales fueron lavados con amortiguador M9 y posteriormente colocados en cajas con comida durante una hora. Los animales se recuperaron del tratamiento y se movieron a cajas con comida en donde se dejó secar el exceso de líquido dejando la caja destapada por 5 minutos en la incubadora a 20° C.

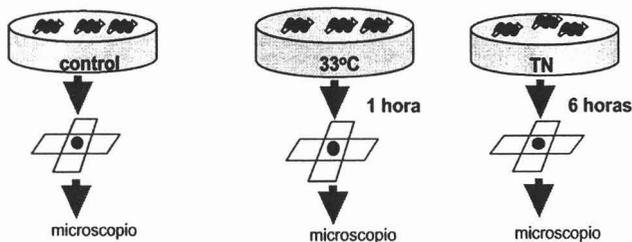
Fue importante no incubar por más tiempo en estas condiciones, debido a que los animales son sensibles a la desecación. El intervalo de tiempo en el cual los animales permanecen en presencia de alimento lo llamamos periodo de recuperación y es de una hora. Este período resulta necesario para que los animales se alimenten debido a que durante el tratamiento en solución líquida, estos dejan de comer. Después de este periodo los animales fueron montados en placas de agarosa y observados al microscopio (Figura 12). La población control fue representada por animales que permanecieron sólo en amortiguador M9.



**Figura 12. Tensión oxidativa y osmótica.** La inducción de la muerte celular, la cual se consigue utilizando 70 mM de NaCl y 10 mM paraquat, se realiza en condiciones líquidas por lo que es necesario someter a los animales a una fase de recuperación debido a que éstos permanecen sin alimento durante el tratamiento. Después de este periodo en presencia de comida, las gónadas son observadas utilizando microscopía de tipo Nomarski.

#### **4.11.2. Choque de calor y tensión nutricional**

A diferencia de los tratamientos mencionados, la inducción de muerte celular por choque de calor y tensión nutricional se realizó en condiciones sólidas debido a que los animales permanecieron en todo momento en cajas de medio NGM-Lite con agar. La inducción de muerte, por efecto de un choque de calor, se obtuvo colocando una placa con aproximadamente 20 nemátodos, siempre en presencia de alimento, en un baño maría a 33°C durante una hora. Pasado este tiempo, los animales fueron montados y observados al microscopio. En este tratamiento los animales control permanecieron en incubación a 20°C. Por otro lado, la tensión nutricional se obtuvo colocando 30 animales en una placa de agar sin comida durante un periodo de 6 horas. Después de este tiempo de tratamiento, los animales fueron observados al microscopio (Figura 13). En estas condiciones, los animales control fueron animales que permanecieron en presencia de alimento.



**Figura 13. Choque de calor y tensión nutricional.** La inducción de la muerte celular con un choque de calor a 33°C o de tensión nutricional por 6 horas, son tratamientos que se realizan en medio sólido. Después del tratamiento, las gónadas son observadas utilizando microscopía de tipo Nomarski.

## **5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN: CAPÍTULO 1**

La apoptosis es un mecanismo necesario para mantener la homeostasis de la gónada, así como para asegurar el desarrollo adecuado del organismo. En el *C. elegans*, se sabe que durante el desarrollo del animal cerca de la mitad de las células germinales que se producen a lo largo de todo el ciclo de vida mueren por muerte celular programada. Estudios en *Drosophila* y otros organismos apoyan la idea de que esta muerte es necesaria para garantizar el desarrollo de los ovocitos. Se sabe además que esta muerte es un proceso exclusivo de la ovogénesis por lo que durante etapas larvarias y en animales machos esta muerte no se observa.

Los resultados de esta tesis se dividen en dos capítulos; este primer capítulo contiene datos de animales que fueron sincronizados con un tratamiento de hidróxido de sodio, cloro y tensión nutricional que se describe en Materiales y Métodos. Debido a que este trabajo está evaluando la respuesta de la línea germinal a diferentes condiciones de tensión y que algunas de las mutantes empleadas son sensibles a estos tratamientos, decidimos eliminar este método de sincronización que es tan utilizado actualmente y que además contiene condiciones severas de tensión que afectan nuestros resultados. Para la segunda parte del trabajo (descrita en el Capítulo 2) los animales fueron sincronizados moviendo animales L4 un día antes de cada experimento a una caja nueva para que todos tuvieran edades parecidas.

Durante la realización de este trabajo encontramos que las respuestas de las mutantes sensibles a tensión variaban dependiendo del tipo de método para homogenizar las edades de los animales. Incluso, las respuestas de estas mutantes es opuesta dependiendo del tipo de sincronización de edades que se utilice. Al final se discutirá la discrepancia de estos resultados.

### **5.1. Diversos tipos de tensión inducen la apoptosis de las células germinales en el *C. elegans*.**

Para inducir tensión oxidativa, se utilizó paraquat (metil viológeno) el cual se sabe es un compuesto que interfiere en el transporte de electrones y genera superóxido. La acumulación de este ion ocasiona eventos de oxidación en diversos sistemas celulares (Hansberg, 2002). La inducción de tensión osmótica se realizó utilizando 70 mM de cloruro de sodio. La capacidad de controlar el balance osmótico es esencial para la vida de los organismos. Un aumento en la temperatura en los sistemas biológicos, ocasiona la alteración de la actividad de determinadas enzimas así como la desnaturalización masiva de proteínas y el rearrreglo de los lípidos que forman parte de la membrana plasmática, modificándose con ello la fluidez de los solutos y otras moléculas. La falta de alimento o factores de crecimiento ocasiona también diversas alteraciones celulares y se sabe que esta condición induce la muerte fisiológica de las células características de la línea germinal. El choque de calor se obtuvo colocando a los animales a una temperatura de 33°C, mientras que la tensión nutricional se consiguió privándolos del alimento durante un periodo de 6 horas.

Inicialmente, los tratamientos fueron realizados en la cepa silvestre (N2) y se encontró que, aún cuando estos animales silvestres mostraron un incremento de muerte, éstos sólo lograron alcanzar en promedio niveles de alrededor de 2 cuerpos apoptóticos por animal en cada uno de los tratamientos (Figura 14b, Tabla 1). En estos animales, los niveles de inducción fueron de 2.4 y 2.9 en los tratamientos de NaCl y paraquat, mientras que los niveles de inducción de muerte en los tratamientos de calor y ayuno fueron de 1.6 y 2.9, respectivamente. Debido a que en la cepa silvestre la degradación de los cuerpos apoptóticos ocurre en tan solo una hora suponemos que se observan pocas células en apoptosis debido a que están siendo eliminadas rápidamente. Por esta razón decidimos utilizar a la mutante *ced-1 (e1735)*, la cual es incapaz de absorber los cuerpos apoptóticos permitiendo su acumulación y, con ello, facilitando el conteo directo. Las mutantes en el gen *ced-1* expuestas a los diferentes tipos de tensión mencionados anteriormente mostraron un incremento significativo en la muerte de sus células germinales. Los animales sometidos a

los diferentes tipos de tensión tuvieron un promedio de 13 cuerpos apoptóticos comparados con 4 cuerpos presentes en su respectivo control (Figura 14a, Tabla 1). En esta mutante, los niveles de inducción fueron de 3 y 3.5 en los tratamientos de NaCl y paraquat, mientras que los niveles de inducción por calor y tensión nutricional fueron de 2.7 y 3.6, respectivamente. Cuando se eliminó el gen *ced-1* por medio de interferencia de ARN, *ced-1(ARNi)* estos animales mostraron un incremento significativo de muerte celular con un promedio de alrededor de 7 cuerpos (Figura 14b, Tabla 1). Estos animales presentaron un elevado índice de muerte celular debido a que los niveles de inducción de apoptosis fueron, en el caso del tratamiento por NaCl de 2.3 y de 2.4 por efecto del paraquat, de forma similar los tratamientos por choque de calor y tensión nutricional, mostraron niveles de inducción de 2.1 y 2, cada uno. Para hacer los experimentos con el ARN de interferencia se alimentaron animales con bacterias que produjeron ARN de doble cadena. Para estudiar que el efecto en el incremento de la apoptosis se debe a la tensión y no a la inducción de la expresión de un gen, se alimentaron animales silvestres (N2) con bacterias que contienen el plásmido pPD129.36 sin gen (plásmido vacío). Estos animales mostraron en promedio 0.5 cuerpos apoptóticos por gónada, este resultado es similar al de la cepa silvestre alimentada con la cepa OP50-1 (N2 PV Figura 14b, Tabla 1). Este resultado confirma que el incremento en la apoptosis de las células germinales es específico y no se debe a la inducción de la expresión utilizada para inducir ARN de doble cadena.

Ya que el incremento en la muerte de células germinales se observa más claramente utilizando mutantes en el gen *ced-1*, decidimos corroborar que este fenómeno es una respuesta general del nemátodo y no de una cepa en particular. Por ello, decidimos utilizar otra cepa que presenta el mismo defecto en la degradación de los cuerpos apoptóticos. La mutante *ced-5(n1812)* mostró al igual que la cepa *ced-1(e1735)* un incremento en la apoptosis de células germinales mostrando una inducción de 3, tanto en NaCl como en paraquat, y una inducción de 2.9 y 2.5 en las tensiones por calor y falta de alimento, corroborando así que el incremento en la apoptosis es respuesta a una

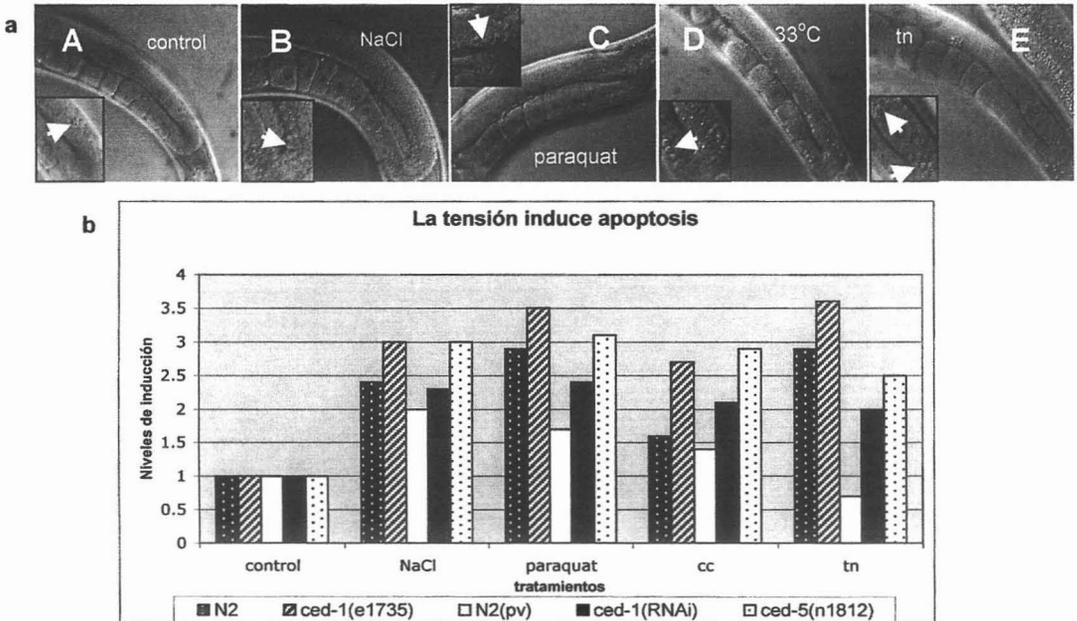
condición de tensión es una respuesta general y no una respuesta de animales con un cierto genotipo (Figura 14b, Tabla 1).

CEPA	control	NaCl	paraquat	choque de calor	tensión nutricional
<i>N2</i>	1 ±0.7 (30)	1.7±0.2 (15)	2.0±0.3 (11)	1.1±0.2 (30)	2.0 ± 0.3 (44)
<i>ced-1(e1735)</i>	3.9±0.3 (49)	11.6±0.6 (52)	13.7±0.8 (40)	10.7±0.7 (32)	13.8±0.9 (41)
<i>N2 (pv)</i>	0.3±0.2 (10)	0.6±0.2 (21)	0.5±0.2 (17)	0.4±0.2 (15)	0.2 ±0.1 (19)
<i>ced-1(ARNi)</i>	6.7±0.5 (18)	15.5±0.7 (15)	16.0±0.5 (22)	13.8±0.5 (41)	13.6±0.7 (21)
<i>ced-5(n1812)</i>	3.3±0.3 (28)	9.9±0.8 (25)	10.3±0.5 (29)	9.6±0.7 (14)	8.2 ±0.7 (33)

**Tabla 1. Apoptosis inducida por tensión.** La tabla muestra los datos obtenidos en las diferentes cepas utilizadas en cada uno de los tratamientos. El primer valor representa el promedio de cuerpos apoptóticos de por lo menos dos experimentos independientes, ± el valor que representa el error del promedio (SEM) y entre paréntesis se muestra el número de animales observados en cada tratamiento. La cepa silvestre (*N2*) así como las mutantes *ced-1(e1735)* y *ced-5(n1812)* fueron alimentadas con la cepa de *E. coli* OP50-1. Los animales con interferencia del gen *ced-1* se alimentaron con la cepa HT115, la cuál fue inducida previamente para inducir ARN de doble cadena del gen *ced-1* y por último, como control negativo, se alimentaron animales con la cepa HT115 con un plásmido vacío y al cual se denota *N2(PV)*. Los experimentos se realizaron a 20°C.

En la mutante *ced-1(e1735)* se observa que el mayor índice de muerte se obtiene al someter a los animales en tensión por paraquat y por la falta de alimento, mientras que en la mutante *ced-5(n1812)* esta inducción ocurre principalmente con el uso de paraquat. Nótese que aún cuando se incrementa el nivel de muerte celular en animales silvestres (*N2*) y en animales silvestres alimentados con comida que contiene el plásmido vacío, *N2(PV)* estos valores oscilan ampliamente entre los diferentes tratamientos utilizados, encontrando incluso que el efecto de la tensión nutricional (tn) en animales *N2(PV)* no causa un incremento en la muerte de las células germinales. Esto puede deberse a que en estos animales la degradación de cuerpos apoptóticos ocurre tan rápidamente que no es posible hacer un conteo real de las células que se están muriendo como consecuencia del tratamiento. La Figura 14 muestra la formación de cuerpos apoptóticos inducida por los cuatro tratamientos en la gónada del *C.*

*elegans*. La formación de cuerpos apoptóticos ocurre principalmente en el sitio de la gónada conocida como el *asa*.



**Figura 14. La tensión induce la apoptosis de las células germinales.** Los animales sometidos a los diferentes tipos de tensión inducen de forma significativa un incremento de muerte celular en la gónada del *C. elegans* (flechas). (a) A-E: Fotografías de tipo Nomarski de la cepa *ced-1(e1735)*. Como se muestran en las fotos, los cuerpos apoptóticos se localizan en la región de la gónada conocida como el *asa*. (b) Gráfica que muestra los niveles de inducción de muerte celular obtenida en cada uno de los tratamientos realizados. La mayor inducción se observa en las mutantes *ced-1(e1735)* y *ced-5(n1812)*. Nótese que la tensión oxidativa y osmótica muestran un comportamiento similar en los niveles de inducción en las diferentes mutantes tratadas. N2= animales silvestres y N2(PV) animales silvestres alimentados con la bacteria que produce el plásmido vacío ; cc= choque de calor, tn= tensión nutricional.

## 5.2. La apoptosis inducida por tensión es independiente de la proteína EGL-1

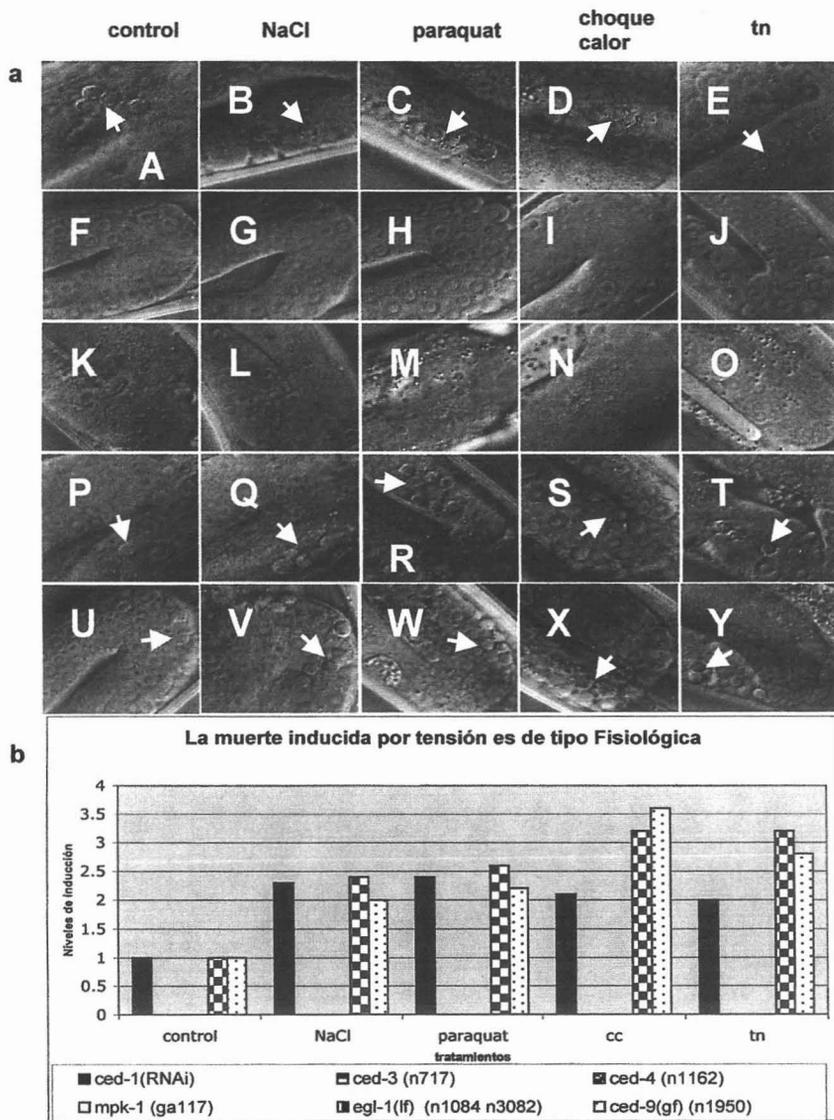
Para saber si la muerte celular inducida por los diferentes tipos de tensión ocurre a través de una vía de apoptosis, o por medio de otro tipo de muerte

celular programada, se utilizó una mutante en *ced-3(n717)* la única caspasa del *C. elegans* y la mutante *ced-4(n1162)* que codifica para el activador de esta caspasa y homólogo de Apaf-1 en mamíferos. Las mutantes *ced-3(n717)* y *ced-4(n1162)* no mostraron inducción de muerte celular en los tratamientos de tensión a los que fueron sometidos (Figura 15, Tabla 2).

CEPA	control	NaCl	paraquat	choque de calor	tensión nutricional
<i>ced-1(ARNi)</i>	6.7±0.5 (18)	15.5±0.7 (15)	16.0±0.5 (22)	13.8±0.5 (41)	13.6±0.7 (21)
<i>ced-3(n717); ced-1(ARNi)</i>	0±0 (40)	0±0 (19)	0±0 (15)	0±0 (38)	0±0 (36)
<i>ced-4(n1162); ced-1(ARNi)</i>	0.1±0 (19)	0.1±0 (20)	0±0 (21)	0.1±0 (14)	0.1±0 (31)
<i>mpk-1(ga11); ced-1(ARNi)</i>	0±0 (24)	0±0 (29)	0±0 (35)	0±0 (28)	0±0 (22)
<i>egl-1(lf)(n1084); ced-1(ARNi)</i>	5.3±0.4 (47)	12.4±0.8 (34)	13.8±0.7 (33)	16.9±0.9 (39)	16.9±1 (33)
<i>ced-9 (n1950); ced-1(ARNi)</i>	3.9±0.4 (28)	7.7±0.4 (39)	8.7±0.4 (41)	14±1 (24)	10.9±0.5 (37)

**Tabla 2. La apoptosis de células germinales inducida por tensión es de tipo fisiológica.**

Los datos de la tabla muestran los diferentes valores obtenidos en las cepas listadas en cada uno de los diferentes tratamientos. El primer valor representa el promedio de cuerpos apoptóticos, ± el valor que representa el error del promedio (SEM) y entre paréntesis se muestra el número de animales observados en cada tratamiento. Todas las cepas utilizadas fueron incubadas a 20°C.



**Figura 15. La muerte inducida por tensión es de tipo fisiológica. (a)** Fotografías de gónadas tomadas con microscopía tipo Nomarski de animales que fueron sometidos a los 4 diferentes tipos de tensión. Las flechas muestran la presencia de cuerpos apoptóticos. La mutante CED-4 mostró la misma respuesta que la observada en la caspasa CED-3. A-E: *ced-1(ARNi)*; F-J: *ced-3*; K-O: *mpk-1*; P-T: *egl-1(lf)*; U-Y: *ced-9(gf)*. Las flechas señalan los cuerpos apoptóticos. **(b)** El gráfico muestra los niveles de inducción obtenidos en cada una de las mutantes. Tanto la mutante en la caspasa *ced-3*, *ced-4* y la mutante de uno de los genes que participan en la vía de ras/MAPK, *mpk-1* mostraron una inducción nula al ser sometidos

en los diferentes tipos de tensión. El resultado obtenido con la CED-3 y CED-4 apoyan la idea de que la muerte que se está produciendo en la gónada del animal es de tipo apoptótica y no por algún otro tipo de muerte, como la necrosis. cc= choque de calor, tn= tensión nutricional.

Las mutantes *ced-9(n1950gf)* y *egl-1(n1084n3082lf)* mostraron un incremento de muerte apoptótica como consecuencia de la exposición a los cuatro diferentes tipos de tensión. En el caso de la mutante *ced-9*, los tratamientos que inducen tensión osmótica y oxidativa presentaron una inducción similar de alrededor de 2 unidades, mientras que los tratamientos por calor y tensión nutricional arrojaron un incremento de apoptosis de células germinales de 3.6 y 2.8, respectivamente. Por su parte, la mutante *egl-1* mostró un incremento de apoptosis principalmente en los tratamientos por calor y ayuno con un nivel de inducción de 3.2 en cada una de estas tensiones. De forma similar, la tensión inducida por cloruro de sodio y paraquat generó un incremento de muerte celular de 2.4 y 2.6, respectivamente.

### **5.3. LA APOPTOSIS INDUCIDA POR TENSIÓN NO REQUIERE A p53**

El gen supresor de tumores p53 juega un papel importante en el mantenimiento de la estabilidad genómica al regular la progresión del ciclo celular y al activar la apoptosis en respuesta a un daño al ADN. Su homólogo en *C. elegans*, CEP-1 no se requiere para la muerte celular programada que ocurre en las células somáticas, por el contrario, este gen es indispensable para proteger a las células de la muerte que ocurre en la línea germinal seguida por un daño al ADN. En *Drosophila*, el homólogo de p53 también participa en la apoptosis inducida por agentes genotóxicos. El daño al ADN activa la apoptosis de células germinales a través de una ruta conservada que incluye al mismo *cep-1* y genes que sensan o reparan daño al ADN como: *rad-5* y *mrt-2* entre otros y ninguno de estos genes se requiere para que ocurra muerte de tipo fisiológica en la línea germinal.

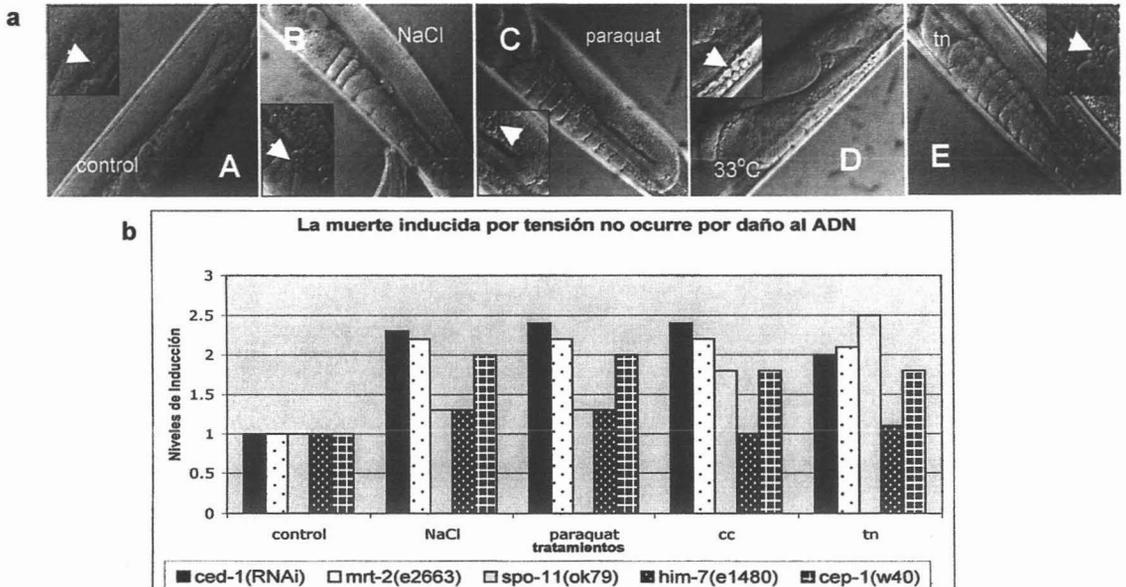
Con el objetivo de confirmar que la muerte inducida por tensión ocurre por una vía fisiológica y no por un daño al ADN, se utilizaron mutantes en esta última vía de activación y se sometieron a los tratamientos por paraquat, cloruro de sodio, calor y ayuno. Se determinó el promedio de cuerpos apoptóticos, así como los niveles de inducción en cada una de estas mutantes (Tabla 3).

CEPA	control	NaCl	paraquat	choque de calor	tensión nutricional
<i>ced-1(ARNi)</i>	6.7±0.5 (18)	15.5±0.7 (15)	16±0.5 (22)	13.8±0.5 (41)	13.6±0.7 (21)
<i>mrt-2(e2663); ced-1(ARNi)</i>	8.7±0.8 (23)	19.2±1.1 (37)	19±0.6 (35)	19.3±0.9 (32)	18.6±0.9 (35)
<i>spo-11(ok79); ced-1(ARNi)</i>	5.9±0.5 (32)	7.6±2.3 (25)	7.7±0.8 (23)	10.8±1.3 (6)	14.7±2 (6)
<i>him-7(e1480); ced-1(ARNi)</i>	12.1±0.7 (17)	15.4±0.7 (23)	15.7±0.8 (24)	12±0.7 (22)	13.8±0.8 (26)
<i>cep-1(w40), ced-1(ARNi)</i>	11.7±0.6 (35)	23.5±1 (34)	23.2 ±0.7 (38)	21.5±0.9 (47)	21.6±0.7 (31)

**Tabla 3. La apoptosis inducida por tensión no ocurre por daño al ADN.** La tabla muestra los datos obtenidos en las diferentes cepas utilizadas en cada uno de los tratamientos. El primer valor representa el promedio de cuerpos apoptóticos, ± el valor que representa el error del promedio (SEM) y entre paréntesis se muestra el número de animales observados en por lo menos dos experimentos independientes. Todas las cepas utilizadas fueron crecidas en comida *ced-1(ARNi)* a 20°C.

El papel dañino de los radicales libres está bien establecido por lo que al someter a los animales a diferentes tipos de tensión esperábamos que las EOR que se producen en estos tratamientos activaran a p53. Sorprendentemente, la mutante *cep-1(w40)* sigue teniendo elevados niveles de apoptosis en respuesta a los diferentes tipos de tensión apoptosis en respuesta a los diferentes tipos de tensión. Este resultado indica que durante nuestros tratamientos no se está produciendo daño al ADN (Tabla 3, Figura 16). Los mutantes en este gen presentaron una inducción de muerte celular de 2 unidades tanto en presencia de cloruro de sodio como con paraquat, mientras que los tratamientos por choque de calor y falta de alimento mostraron una inducción de 1.8 en ambos

casos (Tabla 3). Para confirmar que la apoptosis inducida por tensión no produce ningún tipo de tensión por daño al ADN se sometieron mutantes en esta respuesta a los distintos tratamientos. La mutante en el gen de daño a ADN *mrt-2(e2663)* se comporta de la misma manera que la cepa *cep-1(w40)* confirmando que la muerte celular inducida por tensión no es del tipo genotóxico. Esta mutante mostró niveles de inducción de 2.2 tanto en el tratamiento con cloruro de sodio, paraquat y choque de calor, mientras que los niveles de inducción en el tratamiento por ayuno fue de 2.1 unidades. En contraste, las mutantes en los genes *spo-11(ok79)* y *him-7(e1480)* ya no presentan una inducción de apoptosis en respuesta a tensión oxidativa, osmótica y por choque de calor. Incluso en la mutante *him-7* no hay inducción de apoptosis por la falta de alimento (Tabla 3, Figura 16). Los niveles de inducción son prácticamente nulos y oscilan en general entre 1 y 1.5 células, sin embargo, la mutante *spo-11* mostró un incremento en la muerte de células germinales en el tratamiento que induce tensión nutricional, mostrando un nivel de 2.5. Estos datos no apoyan nuestra hipótesis de que la muerte inducida por tensión nutricional es de tipo fisiológica.



**Figura 16. La muerte inducida por tensión no requiere a p53. (a)** La figura muestra fotografías tipo Nomarski de la cepa *cep-1(w40);ced-1(ARNi)* en la que se observa un incremento en la formación de

cuerpos apoptóticos cuando los animales son sometidos a distintos tratamientos. Las flechas indican la presencia de cuerpos apoptóticos. (b) El gráfico muestra los niveles de inducción de cada una de las mutantes de daño al ADN las cuales fueron sometidas a los tratamientos que inducen tensión. La falta de estos sensores de daño a ADN no inhiben la apoptosis ocasionada por tensión. cc= choque de calor, tn= tensión nutricional.

#### **5.4. LAS CINASAS DEL TIPO MAPK SON INDISPENSABLES PARA INDUCIR APOPTOSIS DE CÉLULAS GERMINALES EN RESPUESTA A TENSIÓN CELULAR.**

Las MAPKs (por sus siglas en inglés *mitogen-activate protein kinases*) activan una amplia variedad de respuestas celulares entre las que se incluye la mitosis, la respuesta a diferentes tipos de tensión, movilidad y muerte celular programada, entre otros. En el *C. elegans*, esta cascada de señalización es activada en respuesta a patógenos así como a factores de virulencia los cuales inducen apoptosis en la línea germinal. La inducción de muerte celular programada es utilizada como un mecanismo de protección contra el ataque por patógenos tal y como ocurre cuando los animales son alimentados con *Salmonella typhimurium* (Aballay, 2001). Como parte de esta vía de respuesta, se sabe que las MAPKs MEK-1 y SEK-1 muestran un papel de protección en la apoptosis que ocurre en la línea germinal en respuesta a patógenos debido a que en mutantes en los genes correspondientes muestran un incremento en la muerte de células germinales. Se sabe además que estos animales son más sensibles a morir ante ciertos patógenos (Aballay, 2003).

Como los diferentes tipos de tensión empleados en este trabajo inducen apoptosis en la línea germinal del *C. elegans* nos propusimos estudiar si mutantes en la respuesta a la tensión están afectadas en este proceso. Decidimos utilizar mutantes en la vía de las cinasas tipo MAP (MAPK). Dos de las vías de las MAPK, la de la cinasa p38 y la de JNK están involucradas en la protección de animales de la tensión por metales, falta de alimento y ataque por patógenos (Aballay *et al.*, 2003). Algunos componentes de la vía p38 que se utilizaron en el trabajo fueron: la mutante en la MAPKK *sek-1(ag1)* y la mutante

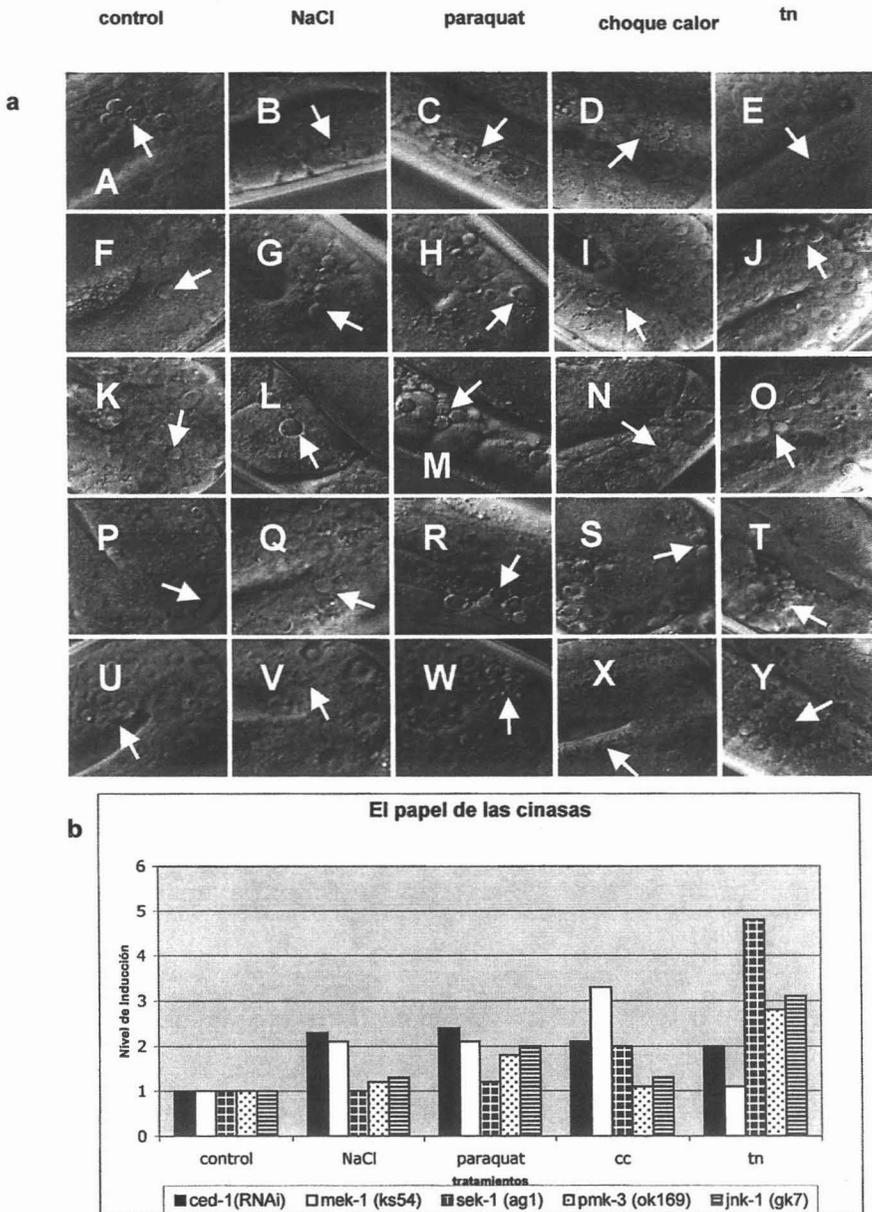
*pmk-3(ok169)*. De la vía de JNK-1 se utilizaron a la mutante *mek-1ks54*) (MAPKK) y la mutante en la MAPK *jnk-1(gk7)*. Es importante mencionar que debajo de la vía de p38 existen otras dos MAPK que son *pmk-3* y *pmk-2* de las cuales no existían mutantes al iniciar nuestro trabajo.

En ausencia de las cinasas SEK-1, JNK-1 y PMK-3 no se observó un incremento importante en la apoptosis inducida por la tensión oxidativa, osmótica y el choque de calor indicando que estas cinasas son importantes para inducir esta respuesta (Tabla 4, Figura 17). La falta de estas cinasas ocasionó en general niveles de inducción de alrededor de 1.3. Sin embargo en tensión nutricional observamos un incremento considerable en la apoptosis inducida por tensión en las mutantes *sek-1*, *jnk-1* y *pmk-3*. En estas condiciones, la mutante *mek-1* parece tener un aumento parecido al de la silvestre en presencia de tensión oxidativa, osmótica y choque de calor y al contrario de las otras cinasas no responde a la tensión nutricional (Tabla 4, Figura 17). Estos datos sugieren que las cinasas SEK-1, JNK-1 y PMK-3 son necesarias para inducir apoptosis en respuesta a la tensión osmótica, oxidativa y el choque de calor mientras que la cinasa MEK-1 es necesaria además para la inducción de apoptosis por falta alimento.

CEPA	control	NaCl	paraquat	choque de calor	tensión nutricional
<i>ced-1(ARNi)</i>	6.7±0.5 (18)	15.5±0.7 (15)	16.0±0.5 (22)	13.8±0.5 (41)	13.6±0.7 (21)
<i>mek-1(ks54); ced-1(ARNi)</i>	0.9±0.3 (35)	1.9 ±0.3 (37)	1.9±0.3 (43)	3.0±0.4 (29)	1.0±0.4 (10)
<i>sek-1(ag1); ced-1(ARNi)</i>	4.5±0.5 (11)	4.6±0.6 (15)	5.4±0.5 (15)	9.0±0.8 (15)	21.7±1.3 (17)
<i>pmk-3(ok169); ced-1(ARNi)</i>	6.3±0.4 (33)	7.3±0.4 (37)	11.4±0.6 (32)	7.2±0.4 (35)	17.8±0.8 (51)
<i>jnk-1(gk7); ced-1(ARNi)</i>	4.3±0.5 (26)	5.8±0.5 (36)	8.4±0.9 (34)	5.8±0.5 (33)	13.4±0.7 (33)

**Tabla 4. La vía de las MAPKs regula la apoptosis de las células germinales inducida por tensión.** Los datos muestran los resultados obtenidos en las diferentes cepas en cada uno de los tratamientos. El primer valor representa el promedio de cuerpos apoptóticos, ± el valor que representa el

error del promedio (SEM) y entre paréntesis se muestra el número de animales observados en cada tratamiento. Todas las cepas utilizadas fueron incubadas a 20°C.



**Figura 17. Papel de diversas cinasas en la muerte de células germinales inducida por tensión en la gónada del *C. elegans*. (a) Fotografías de gónadas tomadas con microscopía tipo**

Nomarski de animales que fueron sometidos a los cuatro diferentes tipos de tensión. Las flechas muestran la presencia de cuerpos apoptóticos. Las fotos muestran a las mutantes: **A-E:** *ced-1(ARNi)*; **F-J:** *pmk-3(ok169);ced-1(ARNi)*; **K-O:** *jnk-1(gk7);ced-1(ARNi)*; **P-T:** *sek-1(ag1);ced-1(ARNi)*; **U-Y:** *mek-1(ks54);ced-1(ARNi)*. **(b).** El gráfico muestra los niveles de inducción de apoptosis de células germinales en las cinasas sometidas a los diferentes tratamientos. cc= choque de calor, tn= tensión nutricional.

## **5.5. DISCUSIÓN GENERAL**

El *C. elegans* produce a lo largo de todo su periodo reproductivo alrededor de 2000 células germinales de las cuales aproximadamente la mitad mueren por muerte celular programada. Interesados en conocer el efecto de la tensión sobre la muerte de células germinales, se sometieron animales a diferentes tipos de tensión y se encontró que en todos los tratamientos existe un incremento en la apoptosis de estas células. La línea germinal fue el único tejido que respondió a los tratamientos debido a que es el único sistema que se encuentra en constante proliferación. Algo interesante es que los animales *ced-1(e1735)* y *ced-1(ARNi)*, los cuales presentan una deficiencia en la degradación de cuerpos apoptóticos, muestran niveles de muerte celular diferentes. La mutante *ced-1(e17350)* presenta un nivel de inducción mayor en comparación con los animales *ced-1(ARNi)*. Sin embargo, aún cuando las diferencias fueron ligeramente distintas, los animales *ced-1(ARNi)* presentaron un notable incremento en la apoptosis de células germinales por efecto de los tratamientos que inducen tensión.

Una vez establecido que la tensión induce la apoptosis de las células germinales, se corroboró que este proceso ocurre a través de la activación de la maquinaria apoptótica debido a que en mutantes *ced-3(n717)* y *ced-4(n1162)* no se detectó muerte de células germinales, descartando la activación de un proceso de necrosis. Del mismo modo, se sabe que la muerte apoptótica requiere la salida de las células germinales de paquíteno a través de la activación de la vía MAPK/Ras, debido a que en la mutante *mpk-1(ga117)* no se observó muerte celular.

A pesar de que la muerte celular somática y fisiológica utilizan la misma maquinaria de ejecución (CED-3 y CED-4) ambos procesos son regulados de forma diferente. Tanto en una mutante con ganancia de función en el gen *ced-9(n1950gf)*, así como en una mutante con pérdida de función del gen *egl-1(n1084n3082lf)* la muerte somática no ocurre. Sin embargo, mientras la muerte somática está ausente en estas mutantes, la muerte de células germinales en la gónada del animal no se encuentra afectada. Los elevados niveles de muerte en estas mutantes sugiere que la apoptosis ocasionada por los tratamientos que inducen tensión ocurre de manera independiente a la proteína EGL-1, sugiriendo con ello la existencia de un factor pro-apoptótico que inhibe la función de CED-9 y permitiendo que se active la maquinaria de muerte celular de tipo apoptótica. Se desconoce aún cual es el elemento que regula de forma específica la muerte de las células germinales.

Con lo anterior, y a través del uso de mutantes de daño al ADN, se logró establecer que la muerte inducida por tensión es de naturaleza fisiológica. En este trabajo se encontró que de las cuatro mutantes de daño al ADN utilizadas, sólo, *mrt-2(e2663)* y *cep-1(w40)* mostraron un incremento significativo de muerte celular en todos los tratamientos utilizados. Por el contrario, la mutante *him-7(e1480)* no mostró un incremento de muerte en ninguno de los tratamientos, mientras que en la mutante *spo-11(ok79)* esta respuesta de muerte sólo se observó en los tratamientos de choque de calor y tensión nutricional. Estos resultados apoyan de manera parcial nuestra hipótesis de trabajo donde sugerimos que la muerte observada ocurre por una vía fisiológica y no por algún daño al ADN. Sin embargo, cuando estas mutantes no son tratadas con cloro e hidróxido de sodio como medio para homogenizar edades, se observa un elevado incremento de muerte celular (Capítulo 2: Figura 4, Tabla 1) sugiriendo, con estos datos, una respuesta fisiológica frente a los diferentes tipos de tensión.

Finalmente, con el objetivo de establecer la vía que participa en la respuesta a la tensión, se encontró que las cinasas JNK-1 y PMK-3 están involucradas de manera parcial en respuesta a tensión, debido a que éstas

participan sólo en aquella muerte ocasionada por NaCl y calor. Se dice que estas cinasas son indispensables en dichas condiciones debido a que no existe un incremento de muerte celular en los tratamientos mencionados. Por su parte, la MAPKK, MEK-1 es necesaria sólo para la muerte ocasionada por tensión nutricional debido a que los demás tratamientos incrementan los niveles de apoptosis aún en ausencia de esta MAPKK. Por el contrario, la MAPKK, SEK-1 es indispensable sólo para la muerte inducida por cloruro de sodio y paraquat. Estas respuestas diferenciales sugieren la posibilidad de que existe la activación de una ruta específica, dada por el tipo de tensión específica que se utiliza. Si esto ocurre, la respuesta por la presencia de paraquat y cloruro de sodio estará modulada por la vía de SEK-1. Algo que resulta interesante, es que cuando las mutantes de las cinasas no son sometidas al tratamiento de sincronización, se observa una respuesta diferente. Bajo estas condiciones, la MAPKK, MEK-1 es indispensable para la muerte inducida por cloruro de sodio, paraquat y choque de calor (Capítulo 2: Figura 5) debido a que en estas condiciones no existe un incremento de muerte celular. Por el contrario, la muerte inducida por tensión nutricional, no es regulada por MEK-1 debido a que aún en ausencia de éste existe un incremento significativo de muerte celular con alrededor de dos niveles de inducción. Es notable que la respuesta que se obtiene con animales sincronizados coincide con la obtenida en animales sin sincronizar, sólo que al revés. Por su parte, aunque la MAPKK, SEK-1 presenta diferencias de muerte celular entre los animales sincronizados y no sincronizados, debido a que en el primero regula la muerte inducida por cloruro de sodio y paraquat, mientras que en el segundo no regula ningún tipo de tensión, es importante notar que la ausencia de este gen reduce en cierta medida la muerte de células germinales en comparación con animales silvestres: *ced-1(ARNi)*.

Aunque desconocemos el motivo de estas discrepancias, cabe mencionar que posiblemente el tratamiento de sincronización esté generando una respuesta anticipada cuando los embriones son sometidos al cloro e hidróxido de sodio, así como a la falta de alimento durante varias horas. Probablemente, el tratamiento de sincronización ocasiona la activación de una o varias vías de

respuesta, la cual permite a los embriones resistir y sobrevivir el tratamiento de lisis. Esta vía de respuesta podría permanecer activa de manera latente en los individuos a lo largo del desarrollo sirviendo como un mecanismo de respuesta adaptativo para futuros eventos de tensión. Tal vez, la permanencia de esta vía activada ocasione que los animales, cuando son sometidos a los cuatro diferentes tipos de tensión, respondan de manera diferencial, que cuando éstos provienen de un evento sin sincronizar, debido a que en éste último, no existe una vía previamente activada que responda a los tratamientos.

En resumen, nosotros encontramos que diversos tipos de tensión inducen la muerte celular en la línea germinal del nemátodo *C. elegans*. Independientemente del tipo de tratamiento utilizado para homogenizar las edades de los animales, la inducción de apoptosis en respuesta a tensión es independiente de las proteínas EGL-1 y p53. Esto es un resultado inesperado ya que, se esperaba que la tensión provocada en estos experimentos indujera una respuesta de daño al ADN y por lo tanto la participación de p53 fuera necesaria. También de manera independiente al tipo de tratamiento para sincronizar animales, la vía de las cinasas MAPK es indispensable para inducir apoptosis por tensión. Mutantes dobles en los genes *sek-1* y *mek-1* son incapaces de inducir apoptosis en respuesta a las tensiones osmótica, oxidativa y al choque de calor. Un dato muy interesante es que en una doble mutante, *mek-1(ks54)*, *sek-1(ARNi)* aún existe inducción de apoptosis en respuesta a tensión nutricional sugiriendo la presencia de otra vía reguladora a este tipo de respuesta.

## 6. CONCLUSIONES

- La línea germinal del nemátodo *Caenorhabditis elegans* presenta un incremento en la apoptosis de células germinales por efecto de los diferentes tipos de tensión tales como: tensión oxidativa, osmótica, choque de calor y tensión nutricional. En general, la inducción de muerte se incrementa alrededor de 2 veces, aunque la tensión por falta de alimento puede presentar un mayor efecto.
- La muerte de las células germinales inducida por las diferentes formas de tensión es de naturaleza apoptótica debido a que mutantes en esta vía no muestran apoptosis en la línea germinal como consecuencia de las tensiones utilizadas.
- La vía MPK/Ras es indispensable para que exista muerte celular fisiológica inducida por tensión.
- La muerte celular inducida por diversos tipos de tensión ocurre de manera independiente a la proteína EGL-1 estableciéndose así que la muerte observada es de tipo fisiológica.
- La muerte inducida por tensión no requiere al gen *cep-1*, homólogo de p53 de mamíferos.
- Las MAPKK MEK-1 y SEK-1 son las encargadas de inducir apoptosis en respuesta a tensión osmótica, oxidativa y choque de calor.
- La apoptosis inducida por falta de alimento no requiere a las MAPKKs MEK-1 ni SEK-1 y aún desconocemos la vía encargada de este tipo de respuesta.
- El tratamiento de sincronización de animales, el cual incluye condiciones de tensión, afecta considerablemente la respuesta de algunos genes de la vía de daño a ADN y de las MAPKKs. Desconocemos la razón de dicho fenómeno pero creemos que alguna de estas cinasas es activada durante este tratamiento y por ello, los animales responden de diferente manera.

## 7. PERSPECTIVAS

Con el objetivo de establecer de manera precisa la vía de activación por efecto de los diferentes tipos de tensión, se pretende dar continuidad a la línea de trabajo presentada hasta el momento. Esto debido a que no sólo existe un gran interés en poder establecer la vía que se activa, sino también en diferenciar si los diferentes tipos de tensión inducen la activación de una vía en general, o si por el contrario, existe una especialización de respuesta para cada condición. Si esto último ocurre, resultará interesante conocer las condiciones ambientales que generan la expresión de genes específicos.

Para lo anterior, se propone el uso de una metodología diferente la cual incluye una técnica de mutagénesis dirigida para encontrar el gen específico que se requiere para determinados estímulos ambientales, como el nutricional.

Por otro lado, se puede realizar un microarreglo de genes específicos de la línea germinal, el cual nos permita analizar los niveles de expresión de ARN de ciertos genes, cuando el organismo se encuentra bajo condiciones que inducen muerte de células germinales y de esta manera estudiar la respuesta de la línea germinal a los diferentes tipos de tensión.

También nos proponemos estudiar por qué las MAPKs responden diferente cuando los animales son sincronizados. Inicialmente trataremos a estas mutantes con cloro, hidróxido de sodio y tensión nutricional por varias horas para determinar la respuesta de estas enzimas y mutantes a estos tratamientos. Creemos que alguno de estos tratamientos es el responsable de la activación de una vía que protege a los animales de los siguientes tratamientos de tensión que realizamos.

Por otro lado, sería interesante disectar la respuesta de cada uno de los genes de la vía de las MAPK para determinar si alguno de ellos es responsable de responder a cierto tipo de estímulo.

Durante la realización de este trabajo observamos que las mutantes en los genes *mek-1* y *sek-1* tienen menos hijos (Figura 6, Capítulo 2) y

frecuentemente son estériles. También nos proponemos estudiar si estas MAKs juegan algún otro papel en el desarrollo de la línea germinal, independientemente de inducir apoptosis.

## **8. CAPÍTULO 2**

Resumen del artículo: Las MAPKKs MEK-1 y SEK-1 regulan la apoptosis de las células germinales en respuesta a tensión en el *C. elegans*.

En el *C. elegans* dos vías diferentes de muerte de células germinales han sido caracterizadas: una es inducida en respuesta a agentes genotóxicos e involucra el dominio BH3 de la proteína EGL-1 y a la proteína de respuesta daño al ADN, p53. La segunda ruta de muerte conocida como vía fisiológica, parece eliminar el exceso de células germinales durante la ovogénesis para mantener la homeostasis de la gónada y es activada por mecanismos desconocidos. Para entender mejor el mecanismo involucrado en la muerte de células germinales, se investigó el papel de diferentes rutas de respuesta en este fenómeno. Expusimos animales un día de adultos a agentes o condiciones que producen tensión oxidativa, osmótica, choque de calor y a la falta de alimento. Se determinó el índice de apoptosis realizando conteos de cuerpos apoptóticos en la línea germinal. Se encontró que todos los tipos de tensión probados inducen muerte de las células germinales a través de una vía fisiológica, pero independiente de p53 y EGL-1. Encontramos que las MAPK cinasas MEK-1 y SEK-1 fueron esenciales para la muerte de las células germinales inducida por tensión.

Artículo sometido a publicación: *Death Cell and Differentiation*, Junio del 2005

The mitogen activated kinase kinases MEK-1 and SEK-1 regulate  
stress-induced apoptosis in the *C. elegans* germline

Salinas L. S.<sup>1</sup>, Maldonado E.<sup>2</sup> and Navarro R.E.<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Biología Celular and <sup>2</sup>Genética Molecular, Instituto de Fisiología  
Celular, UNAM. Apartado Postal 70-600. México DF 04510, MEXICO

+ (52) (55) 56 22 56 39

+(52) (55) 56 22 56 11 FAX

\*Corresponding author (e-mail: [mnavarro@ifc.unam.mx](mailto:mnavarro@ifc.unam.mx))

Running title: Stress-induced apoptosis and the MAPK pathway

## Abstract

In *C. elegans* two different germ cell death pathways have been characterized: one is induced in response to genotoxic agents, and involves the BH-3 domain protein EGL-1 and DNA damage response protein p53. The second one, known as physiological pathway, presumably eliminates excess germ cells during oogenesis to maintain gonad homeostasis and is activated by unknown mechanisms. To further understand the mechanisms involved in germ cell death, we investigated the role of different stress responses in this phenomenon. We exposed one-day old animals to agents or conditions that produce oxidative, osmotic, heat shock or nutrient starvation stress, and determined the apoptosis rate by counting corpses in the germline. We found that all these types of stress induced germ cell death through the physiological pathway, but independently of p53 and EGL-1. We also found that the MAPK kinases MEK-1 and SEK-1 were essential for stress-induced germ cell death.

Keywords: germ cell, germline, apoptosis, *C. elegans*, MAPK, p53 and stress

## Introduction

In several organisms some germ cells die by apoptosis during the process of gametogenesis and three hypotheses could explain this phenomenon: Germ cells die because 1) they are limited for nutrients or growth factors, 2) they have defective genomes, or 3) they served a purpose as nurse cells<sup>1</sup>. Although germ cell apoptosis has been documented in many organisms we still do not understand why or how this process takes place. The nematode *Caenorhabditis elegans* has proved to be an excellent model organism to study many biological processes due to its easy manipulation, and high conservation of its genes during evolution. The *C. elegans* hermaphrodite gonad consists of two identical U shaped tubes that are bound by the uterus (Figure 1a). The most distal part of each tube maintains a population of mitotically active stem cells. During the L4 larval stage the first 40 cells that move away from the distal region enter meiosis and culminate in formation of 160 sperm that are stored in the spermatheca. Oocytes are formed around the loop area where they are surrounded by membranes and grow significantly in size due to the accumulation of a large amount of cytoplasm<sup>2</sup>. The *C. elegans* gonad is a syncytium in which nuclei are partially enclosed by membranes, and it lacks a well-defined population of nurse cells. However, approximately fifty percent of germ cells die through the so-called physiological pathway<sup>3</sup>. This germ cell death occurs in the loop area precisely where oogenesis takes place, suggesting that some of these cells die to contribute their cytoplasm to the forming oocytes, and to maintain gonad homeostasis<sup>3</sup>. The most intriguing aspect of physiological germ cell death is how it is regulated. This type of apoptosis is independent of the BH3 domain protein, EGL-1, which regulates somatic cell death during embryogenesis and is also independent of the transcription factor p53 known in *C. elegans* as CEP-1<sup>4:5</sup>. Six genes are required for the physiological cell death pathway in the *C. elegans* germline: CGH-1, an RNA helicase that protects oocytes from apoptosis<sup>6</sup>, and five other genes isolated in a genome-wide RNAi screening<sup>7</sup>. Unfortunately, we still do not understand how any of these genes regulate apoptosis in the *C. elegans* germline.

A different type of germ cell death has been observed when nematodes are exposed to genotoxic agents. This pathway is dependent on EGL-1, DNA damage checkpoint enzymes and p53<sup>8,4,5</sup>, and it is known as the genotoxic pathway. Both physiological and genotoxic pathways converge at the classic apoptosis machinery: the anti-apoptotic protein CED-9 (the human BCL-2 homolog), the caspase activator and APAF homolog CED-4 and CED-3, the only *C.elegans* caspase (Figure 1b)<sup>3,8</sup>.

We used *C. elegans* to test how external factors can affect germ cell death and try to understand how apoptosis can be induced and regulated in response to these conditions. We found that germ cell death can be induced in response to different stress conditions that include oxidative, osmotic, heat shock and starvation stress. Unexpectedly, we found that stress-induced apoptosis is independent from proteins EGL-1 and p53, which are essential for the genotoxic pathway induction. These findings were intriguing since we would have expected stress to induce the genotoxic pathway in the *C. elegans* germline, however we found that stress specifically triggers the physiological pathway.

We also found that the mitogen activated kinase kinases (MAPKK) MEK-1 and SEK-1 are essential for stress-induced apoptosis. Mutants in corresponding genes are as well affected in the physiological germ cell death pathway and might have a role in other aspects of germline function.

## Results

### Different forms of stress induces germ cell death

Germ cell death in *C. elegans* is frequently measured in strains that lack the ability to degrade corpses<sup>3,8</sup>. One of the most used strain is *ced-1(e1735)*<sup>9</sup>, which is unable to absorb dead cells so that corpses remain for several hours, whereas in a wild type the process of apoptosis is completed within one hour<sup>10</sup>. We used either the *ced-1(e1735)* strain or animals modified by *ced-1* RNA interference (RNAi) to perform our experiments<sup>11</sup>. One-day old *ced-1(e1735)* animals usually show up to five corpses in each gonad arm (Fig. 2a and Table 1). We exposed *ced-1(e1735)* animals to oxidative,

osmotic, heat shock and starvation stresses using 10mM paraquat, 70mM sodium chloride, 33° C for one hour and 6 h of food deprivation, respectively (see Material and Methods for details). Consistently, we observed that all these conditions resulted in increased apoptosis levels. The highest levels of germ cell death were induced by nutrient starvation (2.5 fold), (Figs. 2e-f) followed by two-fold increases in oxidative, osmotic and heat shock stress (Fig. 2b-d and f). We will refer to this type of germ cell apoptosis as stress-induced germ cell death. We corroborated that stress-induced germ cell death in *ced-1(e1735)* animals is equivalent to that observed in strain *ced-5(n1812)*, another engulfment defective mutant, and *ced-1(RNAi)* animals which demonstrates that our observations are not strain specific<sup>12</sup> (Figure 2f, Figure 3a-e and Table 1). Although animals with different genetic backgrounds responded slightly different to the same stress conditions (Table 1), we always detected increased cell death in the presence of our tested stress conditions. Wild type animals (N2) exposed to the same stress conditions showed no corpse accumulation (Figure 2F and Table 1), probably because germ cells corpses are degraded quickly<sup>3</sup>. Attempts to use acridine orange, as alternative apoptosis detection method in wild type animals was not successful for heat shock, osmotic and nutrient starvation stress: it has been shown that under heat shock and nutrient starvation pharyngeal pumping stops, suggesting that under these conditions treated animals are unable to uptake the dye<sup>13</sup>. Therefore, we decided to continue to monitor apoptosis by corpse visualization using the *ced-1(e1735)* or *ced-1(RNAi)* backgrounds. It has been shown that germ cell death is exclusive from the oogenesis process<sup>3</sup>. Consistently, we found that stress-induced germ cell death was detected only in the hermaphrodite germline during oogenesis and not in L4 animals or male gonads (data not shown). In contrast to germline, stress did not influence the rate of somatic cell apoptosis that occurs during development (data not shown).

To corroborate that we were detecting apoptosis and not other type of programmed cell death we tested mutants *ced-3(n717)*, affected in the only known *C. elegans* caspase, and *ced-4(n1162)* in which CED-3 is present but fails to be activated due to lack of CED-4<sup>14</sup>. Since CED-3 is required for apoptosis, it was expected that strains impaired in CED-3 function would not show an elevated number of corpses when exposed to stress conditions. Indeed, when cell death pathway mutants, *ced-3(n717)* and

*ced-4(n1162)*, with a *ced-1(RNAi)* background were exposed to osmotic, oxidative, heat shock and starvation, we did not detect any increase in germ cell death (Figs. 3f-o and Table 1) suggesting that stress treatments specifically induce the apoptotic pathway.

### **Stress-induced germ cell apoptosis is related to the germ cell death physiological pathway**

Activation of the ras/MAPK pathway, which is required for germ cells to exit pachytene, is also essential for germ cell death in *C. elegans*<sup>3</sup>. We tested the *mpk-1(ga117)* mutant, defective in the *C. elegans* homolog of the mitogen activated kinase Erk, under stress conditions. As shown in Figure 3p-t and Table 1 corpses were not detected in the inspected gonads of *mpk-1(ga117); ced-1(RNAi)* animals, suggesting that stress-induced germ cell death also requires the activation of the ras/MAPK pathway.

Somatic and physiological cell deaths share the same basic machinery, but are regulated differently. In a *ced-9(n1950gf)* (BCL-2) gain of function mutation and in an *egl-1(n1084n3082)* (BH-3 domain) loss of function mutant the somatic cell apoptosis is prevented while physiological pathway occurs normally<sup>3</sup>. To distinguish between somatic and physiological cell death pathways we asked how *ced-9(n1950gf)* and *egl-1(n1084n3082)* mutants behave during stress conditions. As shown in Figures 3u-y and Table 1, stress induced death rates in a *ced-9(n1950gf); ced-1(RNAi)* mutant. A similar result was observed with an *egl-1(n1084n3082); ced-1(RNAi)* animal (Figs. 3z-d' and Table 1). These data suggest that the stress-induced germ cell apoptosis is independent of the somatic cell apoptosis pathway.

### **p53 and cell cycle checkpoint components are not required to activate stress-induced apoptosis**

When *C. elegans* is exposed to genotoxic agents like gamma radiation or N-ethyl-N-nitrosourea the germline undergoes cell cycle arrest of mitotic proliferating cells and an augmented apoptosis in meiotic pachytene cells. This cell death is known as genotoxic pathway since it is not induced in checkpoint mutants affected in DNA repair

and elimination of compromised cells<sup>8</sup>. The tumor suppressor protein p53 has been implicated in apoptosis induced by genotoxic stress in *Drosophila*, *C. elegans* and mammals<sup>4; 5; 15; 16; 17</sup>. When the *C. elegans* p53 homolog (*cep-1*) is eliminated the genotoxic pathway is prevented<sup>5,4</sup>. When a *cep-1 (w40); ced-1(RNAi)* or *cep-1(gk138); ced-1(RNAi)* mutants were subjected to stress conditions we still observed germ cell death induction (Figs 4a-f, Table 1 and data not shown) indicating that unlike the genotoxic pathway, the stress-induced germ cell apoptosis is not regulated by p53.

To better compare both types of induced-apoptosis (stress versus DNA damage), we tested mutants affected in checkpoint genes that are essential for the genotoxic pathway<sup>8</sup>. The gene *mrt-2* is a homolog of *S. pombe rad1* and *S. cerevisiae rad17* and is required for telomere maintenance. The checkpoint genes *spo-11* and *him-7* are both involved in monitoring meiotic recombination and are required for DNA-damage germ cell death<sup>8</sup>. We detected 1.9- to 3-fold induction in germ cell death in the gonads from *mrt-2 (e2633)*, *spo-11 (ok79)* and *him-7 (e1480)* mutants (using *ced-1(RNAi)* background) when subjected to stress conditions (Figure 4f and Table 1). Taken together, our results show that stress-induced germ cell apoptosis and the genotoxic pathway are differently regulated.

### **The map kinases MEK-1 and SEK-1 are essential for stress-induced germ cell death**

Since stress-induced germ cell death was produced by different forms of stress (paraquat, salt, heat shock and starvation), we reasoned that mutants affected in general stress responses might also have defects in stress-induced germ cell apoptosis. We decided to study mutants in the mitogen-activated kinases (MAPKs) signaling pathway. It has been shown that conditions like heat and osmotic shock, cytokines, protein synthesis inhibitors, antioxidants and UV exposure activate the JNK and p38 kinase pathways in different organisms<sup>18</sup>. JNK signaling is regulated by MKK4/7, a member of the MAPKK family. Lack of the *mkk-4 C. elegans* homolog results in an egg-laying defect in adult hermaphrodites<sup>19</sup>. In *C. elegans* MKK7 has two homologs, JKK-1 and MEK-1<sup>19; 20; 21</sup>. Mutants in *jkk-1* show an altered coordination of body movement via type-D GABAergic motor neurons<sup>20</sup>. *mek-1* disruption results in hypersensitivity to

heavy metals and starvation<sup>21</sup> and therefore this gene appeared as a good candidate to mediate stress-induced apoptosis. When tested in our germ cell death analysis, *mek-1(ks54); ced-1(RNAi)* mutants showed much lower levels of stress-induced apoptosis in response to salt, paraquat, heat shock and starvation treatments (1.4, 1.5, 1.6 and 2.1 fold-increase, respectively) when compared to *ced-1(RNAi)* animals (Figs. 5a-j, u and Table 1). These results suggest that *mek-1* plays a role in regulation of stress-induced germ cell death. However, *mek-1(ks54); ced-1(RNAi)* gonads still show some levels of germ cell death induction, indicating that physiological cell death is still occurring (Figure 6a).

Two members of the MAPKK family named MKK3/6 regulate the p38 pathway. The MKK3/6 homolog SEK-1 protects *C. elegans* from *Salmonella enterica* pathogenesis, which triggers germ cell death in the gonad by a different, non-physiological pathway, dependent on EGL-1<sup>22;23;24</sup>. We tested the response of *sek-1(RNAi); ced-1(e1735)* animals to different types of stress, and we found that this MAPK kinase is not required for apoptosis induced by oxidative, osmotic, heat shock or starvation stress (Figs. 5K-O, U and Table I).

It has been shown that JNK and p38 pathways interact<sup>25</sup>; therefore, we decided to study the stress-induced germ cell apoptosis in the absence of both pathways. Animals lacking both *mek-1* and *sek-1* genes (*mek-1(ks54); sek-1(RNAi); ced-1(e1735)*) were unable to induce apoptosis in response to osmotic, oxidative and heat shock (Figure 5 p-t, u and Table 1). Unexpectedly, in the absence of *mek-1* and *sek-1* we still observed starvation-induced apoptosis, suggesting a different pathway that might regulate the response to this type of stress (Figure 5 t and u and Table 1). During the course of our experiments we notice that mutants in the MAPK pathway are affected in the physiological germ cell death pathway (Figure 6a). Mutants in *mek-1(ks54)* show fewer cell death than *sek-1(RNAi)*, and *mek-1(ks54); sek-1(RNAi)* double mutants showed slightly fewer physiological germ cell death than mutants in *mek-1* alone. We observed that mutants in the MAPK pathway produced fewer offspring than wild type and frequently tend to become sterile (Figure 6b). *mek-1(ks54)* and double mutants *mek-1(ks54); sek-1(RNAi)* animals had 70% fewer offspring than wild type while *sek-1(RNAi)* animals produced 30% less progeny. Interestingly, no significant embryo lethality is observed in *mek-1* and *sek-1* genetic backgrounds. In summary, our results showed that

MAPKKs MEK-1 and SEK-1 are required for germline apoptosis induced by oxidative, osmotic and heat shock stress but not by nutrient starvation. In addition, our results showed that these MAPKKs are important not only for physiological germline apoptosis but other aspects of germline function, related to offspring production.

## Discussion

### Germ cell death and the environment

Fifty percent of germ cells die through the so-called physiological pathway in *C. elegans* to maintain gonad homeostasis<sup>3</sup>; however, higher levels of apoptosis could be induced when animals are exposed to genotoxic agents like gamma-irradiation or N-ethyl-nitrosourea through the genotoxic pathway, or during pathogens infection. Here we describe another mechanism through which germ cell death could be induced upon exposure to oxidative, osmotic, heat shock, or starvation stress, which we have named stress-induced germ cell death (Figure 2). Unexpectedly, stress induced germ cell death did not occur through the known genotoxic pathway (Figure 4).

Environment also influences germ cell survival in mammalian oocytes, in which exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons, aromatic amines and N-nitrosamines accelerates cell death<sup>1</sup>. Ovaries from *Drosophila* not well fed are greatly reduced in size, and their ovarioles contain few, if any, vitellogenic stages. This starvation triggers germ cells to undergo apoptosis<sup>26</sup>. The damaging effects of ROS on DNA, proteins, lipids and other cell components and their role in pathological processes and aging are well established<sup>27</sup>. In *C. elegans*, the mutation of the *mev-1* gene, which encodes a subunit of complex II electron transport chain, lead to overproduction of ROS that induce heritable mutations not only in mitochondrial but also nuclear DNA<sup>28</sup>. Recently, ROS have been described as secondary messengers to control different cellular functions such as immunity, cell proliferation, cell differentiation, signal transduction and ion transport<sup>29,30</sup>. Besides the ROS production by mitochondria, enzymes localized in the cell membrane like NADPH oxidases can produce ROS in a regulated fashion (reviewed by<sup>30</sup>). We speculate that stress conditions tested in this paper are not strong enough to

induced DNA damage, and that these conditions lead to producing ROS, which would work as germline apoptosis and differentiation signals. It will be interesting to determine whether osmotic, oxidative, heat shock and starvation stress actually cause ROS production and if higher levels of ROS are able to induce germ cell death through EGL-1 and p53 and, therefore, induce the genotoxic pathway.

### **The role of the mitogen-activated kinases (MAPKs) in the protection of germ cells from apoptosis**

Mitogen-activated kinases (MAPKs) cascades are highly conserved in all eukaryotes and orchestrate diverse cellular activities, including mitosis, programmed cell death, stress response, motility and metabolism (reviewed by <sup>18-31</sup>). Wada and Penninger <sup>32</sup> have recently reviewed the role of MAPKs during apoptosis in mammals. The use of model organisms like *C. elegans* has brought some insights into the function of MAPKs in the context of a whole organism. In *C. elegans* MAPKs are also involved in the resistance to pathogens <sup>23;33</sup>. Virulence factors trigger unknown somatic signals that induce apoptosis in the *C. elegans* germline. The induction of programmed cell death serves a protective role when *C. elegans* encounters a pathogen attack. Mutants in the caspase pathway (*ced-4* and *ced-3*, and the BH-3 domain *egl-1*) do not show increased germ cell death in response to pathogens, and overall survival rate of animals to those pathogen is decreased <sup>24</sup>. So far, it is unknown how germline cell death is related to pathogen defense. The MAPKs MEK-1 and SEK-1 have a protective role in germline apoptosis during pathogenic infection; mutants in the corresponding genes do not show elevated pathogen-induced germ cell death <sup>22; 23;33</sup>.

Here we showed that MEK-1 and SEK-1 were essential for germ cell death induced by heat shock, oxidative and osmotic stress (Figure 5f-u). Although both, infection by pathogens and the different kinds of stresses induces apoptosis in the germline and both involve the MAPKs pathways, it is important to notice that the downstream activator of apoptosis is different in these cases. Induction of apoptosis by pathogens is dependent of the BH3 domain protein EGL-1 <sup>24</sup>, whereas we found that stress-induced germ cell death is independent of this protein. On the other hand germ cell

death induced by starvation is only slightly dependent on MEK-1 and SEK-1 pathways (Figure 5t and u). The MAPKKs MEK-1 and SEK-1 are necessary to activate at least two types of apoptosis in *C. elegans*; however, it will be interesting to dissect the downstream aspects of MAPKs pathways to understand how these proteins can mediate apoptosis through different and possibly independent pathways.

An interaction between the MEK-1 and SEK-1 pathways in metal resistance and pathogenesis has been suggested<sup>25,33</sup>. Kim *et al.* (2004) has shown that the MAPKK MEK-1 specifically activates its MPK (KGB-1), whereas the MPK, PMK-1, traditionally activated by SEK-1 can also be regulated by MEK-1. On the other hand, no participation of SEK-1 has been shown during the activation of JNK in *C. elegans* metal stress resistance<sup>33</sup>. Here we show that mutations in *mek-1* have a partial effect in stress-induced germ cell death whereas *sek-1(RNAi)* has only a slight reduction (Figure 5f-u). Interestingly, when both pathways are absent, oxidative, osmotic or heat shock stress fail to induce apoptosis (Figure f-u). These data are consistent with an interaction between these pathways or may suggest that both pathways are required for protection from stress-induced apoptosis.

In a genome-wide RNAi screening Lettre *et al.* (2004) found that a mutant defective in the MAPK PMK-3 presents more germ cell death than the wild type during its reproductive life<sup>7</sup>. On the other hand, we found that the upstream activator of PMK-3, SEK-1, shows reduced levels of physiological germ cell death, compare with the wild type under the same circumstances (Figure 6a). Although we do not know the reasons for this discrepancy, we speculate that since SEK-1 is a MAPKK that regulates at least three downstream effectors, including PMK-3, the absence of SEK-1 would show a more complex phenotype. In the absence of SEK-1 components of this, and other MAPK pathways, may be deregulated and trigger a stress signal that induces germ cell death.

It is interesting that mutants in the MAPK pathway show less germ cell death during their reproductive lifetime (Figure 6a), present fewer offspring than wild type and some of these mutants are frequently sterile (Figure 6b). These data suggest that mutants in the MAPK pathway may play an important role in other aspects of germline development.

It will be interesting to study the relationship between stress and germ cell development, and determined if ROS play a role in its regulation as well as understand the roles of the MAPK pathway in *C. elegans* germline development.

## Materials and Methods

### Strains

Maintenance and genetic manipulation of *C. elegans* were carried out according to standard procedures. All strains were grown at 20° C. The following strains have been described previously in <sup>34</sup> or in the references therein: wild type N2 bristol, *ced-1(e1735)*, *ced-3(n717)*, *ced-4(n1162)*, *ced-5(n1812)*, *ced-9(n1950gf)*, *him-7(e1480)*. *mpk-1(gal117)* <sup>35</sup>; *spo-11(ok79)* <sup>36</sup>; *mrt-2(e2663)* <sup>37</sup>; *egl-1(n1084 n3082)* <sup>38</sup>; *cep-1(w40)* <sup>4</sup>; *cep-1(gk138)* <sup>7</sup> and *mek-1 X(ks54)* <sup>21</sup>.

### Cell corpse assays

Animals were mounted in agar pads that contained a drop of 40 mM NaN3 dissolved in M9 to anesthetize them, and were observed using Nomarski optics to visualize cell corpses <sup>3</sup>. Usually only one gonad arm per animal was accessible for visualization. In the *ced-5(n1812)* strain, where distal tip cell (DTC) migration is frequently affected, only animals showing normal DTC migration were used for our studies. Excel (Microsoft) was used to calculate average standard deviations (SEM) and P values (by Student's *t* test). Images were obtained on a Nikon Eclipse E600 equipped with an AxioCam digital camera (Zeiss), and processed in Photoshop 7 (Adobe).

### Growth conditions previous to treatments

Animals were grown in NGM plates seeded with *E. coli* strains OP50-1 or HT115 carrying the corresponding RNAi feeding vector for three days at 20° C. L4 animals were moved to NGM plates seeded with indicated food source and the incubation period

was continued for 24 h. After this period of time animals were referred to one-day old animals. Standard synchronization of animals was avoided since the bleach and starvation treatments, used to allow animals to reach the same age, are stress conditions that altered the results. During the course of our experiments we noticed that animals that were starved, contaminated, grown at high temperatures or bleached, showed increased cell corpse numbers than usual. We strongly recommend allowing animals to grow under healthy conditions for at least two generations before starting any stress experiment.

### **Osmotic and Oxidative Stress**

To choose stress doses for each inducing agent we tested different concentrations of sodium chloride (35-175 mM) and paraquat (1-15mM) and determined the amounts that induced cell death without killing the *ced-1(e1735)* animals.

One-day old adult animals (~30) were placed in 200  $\mu$ l of M9 (control), M9-containing 70 mM NaCl (osmotic stress) or 10 mM paraquat (oxidative stress) for one hour at 20°C. After the incubation period one ml of M9 was added to dilute the solutions, animals were recovered by pipeting and were placed in NGM-seeded plates. Lids were left open for 5 min to allow full draining of liquid, then dishes were closed and animals were allowed to recover for 55 more minutes at 20° C. (It was important not to leave the lids off for the entire recovery period since the incubator airflow might cause dehydration to animals). Finally, the animals were mounted and observed in the microscope as described previously to determine cell corpse numbers.

### **Heat shock and starvation stress**

We subjected *ced-1(1735)* animals to heat shock temperatures ranging from 30-33° C and found that 33° C induced germ cell death in higher proportion without killing the animals. With periods of starvation longer than 6 h we observed high accumulation of corpses but gonad appearance was dramatically altered; therefore we starved animals for only 6 h since this resulted in healthy-looking gonads and increased germ cell death.

To induce heat shock, several one-day adult animals were placed in NGM plates

seeded with the appropriate strain. Plates were sealed with parafilm and floated in a 33° C water bath for one hour. For starvation experiments several animals were placed in NGM plates without food source and incubated at 20° C for 6 h. For these stress conditions control animals were incubated in seeded-NGM plates for the same period of time at 20° C. Immediately after each treatment animals were mounted and observed in the microscope as previously described.

## RNAi studies

To facilitate visualization of cell corpses we took advantage of the *ced-1* mutation. *ced-1* animals accumulate apoptotic cells for longer periods of time due to defects in the corpse degradation machinery. We used RNA interference (RNAi) in the *ced-1* gene to analyze germ cell death in several strains. The following primers were used: 5' -CGGAATTCATGCGTCTCATTCTCC- 3' and 5' -CGGAATTCCTACTTGTACAGATAC- 3'. A fragment containing the first 550 base pairs of *ced-1* (starting from ATG) was isolated from *C. elegans* cDNA by PCR. The *ced-1* product was digested with EcoRI, cloned into the feeding vector pPD129.36, and the resulting plasmid was transformed into the *E. coli* strain HT115<sup>11</sup>.

A fragment of ~600 base pairs from the *sek-1* gene was cloned from exon 4 to exon 6 using cDNA from *C. elegans*. Primers were: 5' -CGGAATTCGAATCAAATCATCAATC- 3' and 5' -CGGAATTCTCATTGATAAACCGAGC- 3'. This *sek-1* fragment was cloned, as previously described for *ced-1*, into the feeding vector to perform RNAi.

To induce double stranded RNA in bacteria we followed standard procedures<sup>11</sup>. Briefly, bacterial cultures were allowed to grow to OD 0.6 at 37° C, after that 0.4 mM IPTG was added and incubation was prolonged for 2 hours at same temperature. Bacteria were collected and resuspend in LB containing-antibiotics (50µg/ml ampicillin and 12.5 µg/ml tetracycline), 0.4 mM IPTG and 25% glycerol. One ml aliquots were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -70° C. Aliquots were thawed, centrifuged, and the pellet was resuspend in 100 µl LB containing antibiotics and IPTG. Fifty µl of

bacteria were seeded per 60 mm NGM plates containing antibiotics. Plates were stored at 4° C for up to one week.

## **Acknowledgements**

We thank Dr. Claudia Kent for kindly editing and critically reading this manuscript, and Drs. Keith Blackwell and Jesús Aguirre for helpful discussions. We thank the *C. elegans* Genetics Center, which is supported by NIH's National Center for Research Resources, for providing strains. This work was supported by grants from UNAM-PAPIIT (IN217102-3) to REN and EM and CONACYT (41518-Q) to REN.

## References

1. Tilly, JL (2001) Commuting the death sentence: how oocytes strive to survive. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2: 838-48
2. Schedl, T (1997) Developmental genetics of the germ line. In *C. elegans II*, Riddle, DL, Blumenthal, T, Meyer, BJ and Priess, JR eds (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY) pp. 241-170
3. Gumienny, TL, Lambie, E, Hartwig, E, Horvitz, H R and Hengartner, M O (1999) Genetic control of programmed cell death in the *Caenorhabditis elegans* hermaphrodite germline. *Development* 126: 1011-22
4. Derry, WB, Putzke, AP and Rothman, JH (2001) *Caenorhabditis elegans* p53: role in apoptosis, meiosis, and stress resistance. *Science* 294: 591-5
5. Schumacher, B, Hofmann, K, Boulton, S and Gartner, A (2001) The *C. elegans* homolog of the p53 tumor suppressor is required for DNA damage-induced apoptosis. *Curr Biol.* 11: 1722-7
6. Navarro, RE, Shim, EY, Kohara, Y, Singson, A and Blackwell, TK (2001) *cgh-1*, a conserved predicted RNA helicase required for gametogenesis and protection from physiological germline apoptosis in *C. elegans*. *Development* 128: 3221-32
7. Lettre, G, Kritikou, EA, Jaeggi, M, Calixto, A, Fraser, AG, Kamath, RS, Ahringer J. and Hengartner, MO (2004) Genome-wide RNAi identifies p53-dependent and -independent regulators of germ cell apoptosis in *C. elegans*. *Cell Death Differ.* 11: 1198-203
8. Gartner, A, Milstein, S, Ahmed, S, Hodgkin, J. and Hengartner, MO (2000) A conserved checkpoint pathway mediates DNA damage--induced apoptosis and cell cycle arrest in *C. elegans*. *Mol Cell.* 5: 435-43
9. Zhou, Z, Hartwig, E and Horvitz, HR (2001) CED-1 is a transmembrane receptor that mediates cell corpse engulfment in *C. elegans*. *Cell* 104: 43-56
10. Hedgecock, EM, Sulston, JE and Thomson, JN (1983). Mutations affecting programmed cell deaths in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Science* 220: 1277-9
11. Timmons, L, Court, D L and Fire, A (2001) Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Gene* 263: 103-12
12. Wu, Y C and Horvitz, H R (1998) *C. elegans* phagocytosis and cell-migration protein CED-5 is similar to human DOCK180. *Nature* 392: 501-4
13. Jones, D and Candido, E P (1999) Feeding is inhibited by sublethal concentrations of toxicants and by heat stress in the nematode *Caenorhabditis elegans*: relationship to the cellular stress response. *J Exp Zool.* 284: 147-57
14. Yuan, JY. and Horvitz, HR (1990). The *Caenorhabditis elegans* genes *ced-3* and *ced-4* act cell autonomously to cause programmed cell death. *Dev Biol.* 138: 33-41
15. Ollmann, M, Young, LM, Di Como, CJ, Karim, F, Belvin, M, Robertson, S, Whittaker, K, Demsky, M, Fisher, WW, Buchman, A, Duyk, G, Friedman, L.

- Prives, C and Kopczynski, C (2000) *Drosophila* p53 is a structural and functional homolog of the tumor suppressor p53. *Cell* 101: 91-101
16. Brodsky, M H, Nordstrom, W, Tsang, G, Kwan, E, Rubin, GM and Abrams, JM (2000) *Drosophila* p53 binds a damage response element at the reaper locus. *Cell* 101: 103-13
  17. Jin, S, Martinek, S, Joo, WS, Wortman, JR, Mirkovic, N, Sali, A, Yandell, MD, Pavletich, NP., Young, MW and Levine, AJ (2000) Identification and characterization of a p53 homologue in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 7301-6
  18. Pearson, G, Robinson, F, Beers Gibson, T, Xu, BE, Karandikar, M, Berman, K and Cobb, MH (2001) Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev.* 22: 153-83
  19. Villanueva, A, Lozano, J, Morales, A, Lin, X, Deng, X, Hengartner, MO and Kolesnick, RN (2001) jkk-1 and mek-1 regulate body movement coordination and response to heavy metals through jnk-1 in *Caenorhabditis elegans*. *Embo J.* 20: 5114-28
  20. Kawasaki, M, Hisamoto, N, Iino, Y, Yamamoto, M, Ninomiya-Tsuji, J and Matsumoto, K (1999) A *Caenorhabditis elegans* JNK signal transduction pathway regulates coordinated movement via type-D GABAergic motor neurons. *Embo J* 18: 3604-15
  21. Koga, M, Zwaal, R, Guan, K L, Avery, L and Ohshima, Y (2000). A *Caenorhabditis elegans* MAP kinase kinase, MEK-1, is involved in stress responses. *Embo J* 19: 5148-56
  22. Aballay, A, Drenkard, E, Hilbun, LR and Ausubel, FM (2003) *Caenorhabditis elegans* innate immune response triggered by *Salmonella enterica* requires intact LPS and is mediated by a MAPK signaling pathway. *Curr Biol.* 13: 47-52
  23. Kim, DH, Feinbaum, R, Alloing, G, Emerson, FE, Garsin, DA, Inoue, H, Tanaka-Hino, M, Hisamoto, N, Matsumoto, K, Tan, MW and Ausubel, FM (2002) A conserved p38 MAP kinase pathway in *Caenorhabditis elegans* innate immunity. *Science* 297: 623-6
  24. Aballay, A and Ausubel, FM (2001) Programmed cell death mediated by ced-3 and ced-4 protects *Caenorhabditis elegans* from *Salmonella typhimurium*-mediated killing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 2735-9
  25. Kim, DH, Liberati, NT, Mizuno, T, Inoue, H, Hisamoto, N, Matsumoto, K and Ausubel, FM (2004) Integration of *Caenorhabditis elegans* MAPK pathways mediating immunity and stress resistance by MEK-1 MAPK kinase and VHP-1 MAPK phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 10990-4
  26. Drummond-Barbosa, D and Spradling, AC (2001) Stem cells and their progeny respond to nutritional changes during *Drosophila* oogenesis. *Dev Biol.* 231: 265-78
  27. Halliwell, BaG, JMC (1999) *Free radicals in biology and medicine*, Clarenton Press; Oxford University Press.
  28. Hartman, P, Ponder, R, Lo, HH and Ishii, N (2004) Mitochondrial oxidative stress can lead to nuclear hypermutability. *Mech Ageing Dev.* 125: 417-20
  29. Finkel, T (2003). Oxidant signals and oxidative stress. *Curr Opin Cell Biol.* 15: 247-54

30. Aguirre, J, Rios-Momberg, M, Hewitt, D and Hansberg, W (2005) Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes. *Trends Microbiol.* 13: 111-8
31. Gallo, KA and Johnson, GL (2002) Mixed-lineage kinase control of JNK and p38 MAPK pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 663-72
32. Wada, T and Penninger, JM (2004) Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. *Oncogene* 23: 2838-49
33. Mizuno, T, Hisamoto, N, Terada, T, Kondo, T, Adachi, M, Nishida, E, Kim, D H, Ausubel, FM and Matsumoto, K (2004). The *Caenorhabditis elegans* MAPK phosphatase VHP-1 mediates a novel JNK-like signaling pathway in stress response. *Embo J.* 23: 2226-34
34. Riddle, DL, Blumenthal, T, Meyer, BJ and Priess, JR, Eds. (1997) *C. elegans II*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press
35. Lackner, MR and Kim, SK (1998) Genetic analysis of the *Caenorhabditis elegans* MAP kinase gene *mpk-1*. *Genetics* 150: 103-17
36. Dernburg, AF, McDonald, K, Moulder, G, Barstead, R, Dresser, M and Villeneuve, AM (1998). Meiotic recombination in *C. elegans* initiates by a conserved mechanism and is dispensable for homologous chromosome synapsis. *Cell* 94: 387-98
37. Ahmed, S and Hodgkin, J (2000). MRT-2 checkpoint protein is required for germline immortality and telomere replication in *C. elegans*. *Nature* 403: 159-64
38. Conratt, B and Horvitz, HR (1998). The *C. elegans* protein EGL-1 is required for programmed cell death and interacts with the Bcl-2-like protein CED-9. *Cell* 93: 519-29

## Titles and legends to figures

**Figure 1. Structure of the hermaphrodite gonad and the cell death pathways in *C. elegans*.** a) Hermaphrodite gonad consists of two U shaped tubes that are bound by the uterus (U). At the distal end of each gonad arm, the somatically derived distal tip cell (DTC) maintains a self-renewing mitotic stem cell population through direct contact. Although germline cells initially form a syncytium, we refer to them as cells for simplicity. The first 40 germ cells that enter meiosis form 160 sperm (S), and then afterwards only oocytes (O) are produced. Cellularization occurs in the gonad loop, as germ cells progress from the pachytene to diakinesis stages. It is estimated that fifty percent of germ cells die (corpse) through the so-called physiological pathway during oogenesis as they exit pachytene in the loop area. Fertilization occurs in the spermatheca (S) while eggs leave the proximal gonad end. Embryos (E) are transiently stored in the uterus. b) Several pathways can lead to cell death in *C. elegans* and converge in a core apoptosis machinery that consist of the anti-apoptotic protein CED-9 which inhibits the caspase activator CED-4 and the caspase CED-3. Mammal homologs for each protein are indicated in parenthesis. Somatic cell death during early embryogenesis and larval stages is regulated through the pro-apoptotic protein EGL-1. The genotoxic pathway requires DNA damage checkpoint genes, the transcriptional activator CEP-1, and EGL-1 whereas physiological pathway is induced through an unknown mechanism independent of EGL-1.

**Figure 2. Different stress conditions induce germ cell death.** Nomarski views of *ced-1(e1735)* hermaphrodite gonads. Distal part of the gonad is up and left. One-day old animals were incubated for one hour in M9 without treatment (a), or in the presence of 70 mM sodium chloride (b), and 10 mM paraquat (c). After incubation time, animals were transferred to NGM seeded plates and allowed to recover for one hour, anesthetized and mounted for corpse visualization under microscope. For heat shock, one-day old animals were incubated in NGM seeded plates in a water bath at 33° C for one hour (d). To test starvation, animals were transferred to NGM plates without food and incubated at 20° C for 6 h (E) before animals were mounted for microscope observation. White arrows in

insets indicate corpses. Graph (f) show fold induction levels of germ cell apoptosis using the conditions and genetic backgrounds indicated.

**Figure 3. Stress-induced germline apoptosis is independent of EGL-1.** Nomarski views of the loop area of one-day old animals with the following backgrounds: *ced-1(RNAi)* (a-e), *ced-3(n717); ced-1(RNAi)* (f-j), *ced-4(n1162), ced-1(RNAi)* (k-o), *mpk-1(gal17); ced-1(RNAi)* (p-t), *ced-9(n1950); ced-1(RNAi)* (u-y) and *egl-1(n1084n3082); ced-1(RNAi)* (z-d'). Animals were treated as controls (a, f, k, p, u and z), or treated with sodium chloride (b, g, l, q, v, a'), paraquat (c, h, m, r, w, b'), heat shock (d, i, n, s, x, and c') or starved (e, j, o, t, y, d') as indicated in Material and Methods, were mounted to quantify corpses (white arrows) under the microscope.

**Figure 4. CEP-1, the *C. elegans* p53 homolog, and checkpoint genes are not required for germ cell death induction under stress conditions.** *cep-1(w40); ced-1(RNAi)* one-day old animals were treated under the following conditions: a) Control, b) 70 mM sodium chloride, c) 10 mM paraquat, d) Heat shock at 33° C, and e) 6 h of food deprivation as indicated in Material and Methods. Animals were mounted and observed under microscope to quantify corpses (white arrows). Insets show details of each gonad loop. Graph (f) show fold induction levels of germ cell apoptosis using the conditions and genetic backgrounds indicated.

**Figure 5. The MAPKKs, MEK-1 and SEK-1, are essential for stress-induced germ cell apoptosis.** Nomarski microscopy of the loop area of gonads from *ced-1(e1735)* (a-e), *mek-1(ks54); ced-1(RNAi)* (f-j), *ced-1(e1735); sek-1(RNAi)* (k-o) and *ced-1(e735); sek-1(RNAi), mek-1(ks54)* (p-t). Animals from the indicated genetic backgrounds were treated with 70mM sodium chloride (b, g, l, q), 10 mM paraquat (c, h, m, r), heat shock at 33° C (d, i, n, s) or starved for 6 h (e, j, o, t) and mounted for observation under microscope. a, f, k, p are controls for each genetic background. Graph (u) show fold induction levels of germ cell apoptosis using the conditions and genetic backgrounds indicated.

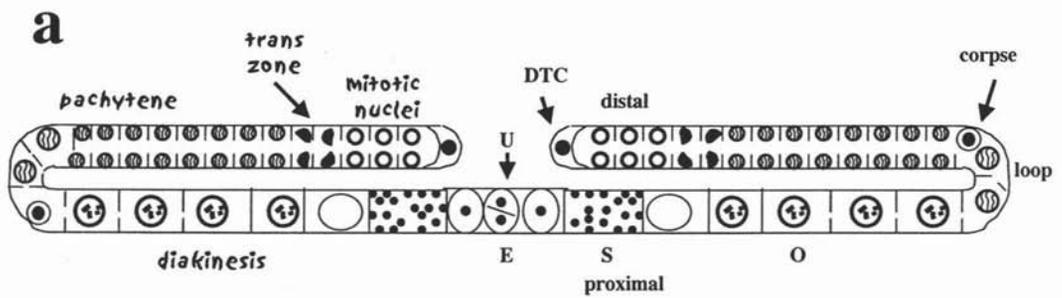
**Figure 6. MAPKs are required for stress-induced apoptosis and germline function.**

a) Animals with indicated backgrounds were grown at 20° C and scored for germ cell death under Nomarski microscopy at L4, 1, 2 and 3 days of development. Averages of at least two independent experiments with a minimum of 15 animals each are shown with SEM. b) Animals from indicated backgrounds were individually incubated as L4, transferred to new plates every 24h for 3 days and incubated at 20° C. Plates were scored every 24h after transfer for dead embryos, and offspring. Offspring percentages of two independent experiments with at least 15 animals each are shown. *mek-1(ks54); ced-1(RNAi)* and *ced-1(e1735); sek-1(RNAi)*, *mek-1(ks54)* have up to 1.4% of dead embryos compared to wild type (0%), whereas *ced-1(e1735); sek-1(RNAi)* animals show only 0.2% of embryo lethality suggesting that low numbers of progeny are not due to defects during embryogenesis. Some *mek-1(ks54)* animals were often sterile and were not scored for this experiment.

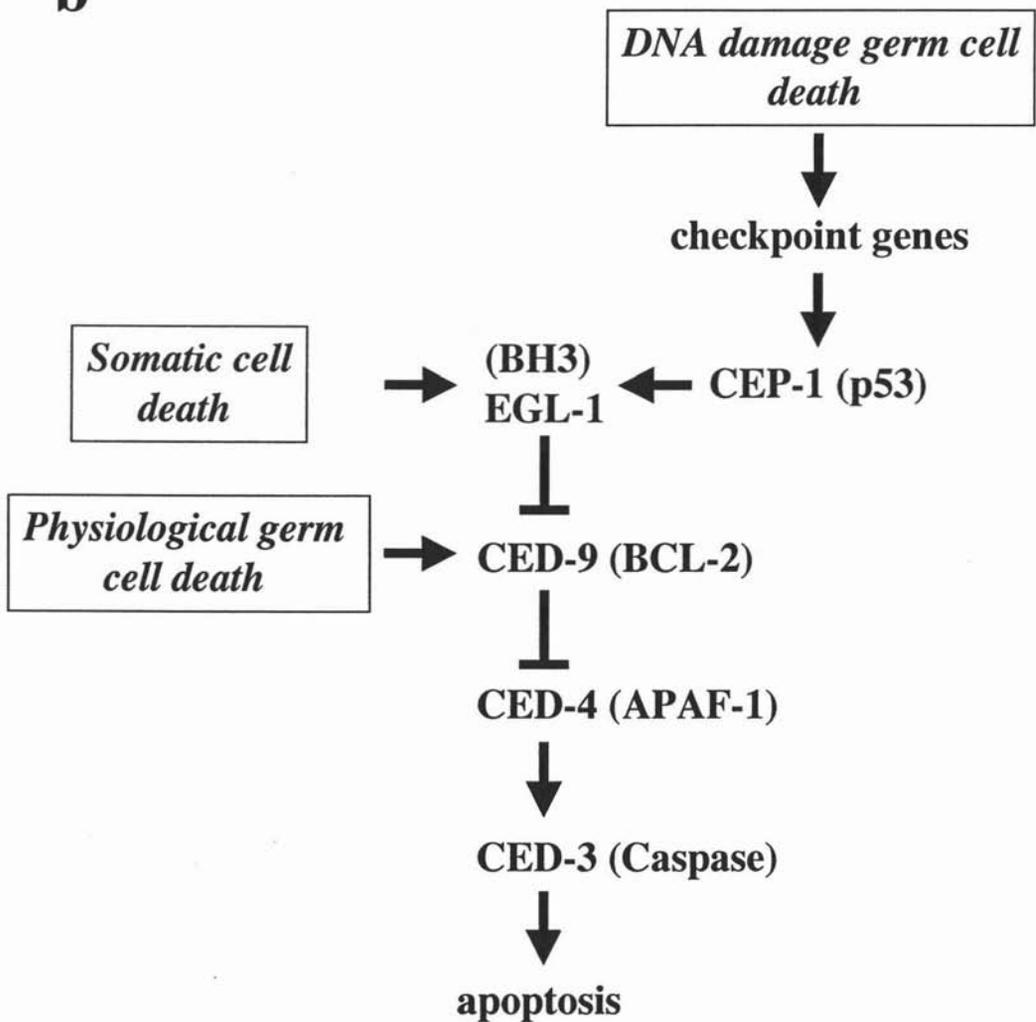
**Table 1** Several genes regulate stress-induced germ cell death.

Genotype	Control	Salt	Paraquat	Heat shock	Starvation
N2 (empty plasmid)	1.1 ± 0.2 (48)	1.2 ± 0.2 (57)	1.9 ± 0.2 (47)	0.9 ± 0.1 (40)	1.2 ± 0.1 (47)
<i>ced-1(RNAi)</i>	6.4 ± 0.4 (30)	12.8 ± 0.3 (39)	12.7 ± 0.5 (35)	14.1 ± 0.4 (53)	24.2 ± 0.4 (50)
<i>ced-1(e1735)</i>	4.9 ± 0.1 (33)	P=1.76E-19 9.5 ± 0.3 (31)	P=5.91E-14 11.7 ± 0.3 (33)	P=3.89E-23 12.0 ± 0.4 (23)	P=8.76E-28 12.4 ± 0.3 (37)
<i>ced-5(n1812)</i>	5.8 ± 0.2 (28)	P=2.39E-21 13.3 ± 0.3 (39)	P=4.13E-28 13.2 ± 0.3 (39)	P=2.8E-25 12.4 ± 0.3 (36)	P=4.19E-34 12.4 ± 0.3 (35)
<i>ced-3(n717); ced-1(RNAi)</i>	0.0 ± 0.0 (34)	P=4.44E-26 0.0 ± 0.0 (43)	P=2.4E-26 0.0 ± 0.0 (40)	P=1.14E-24 0.0 ± 0.0 (37)	P=1.23E-24 0.0 ± 0.0 (45)
<i>ced-4(n1162); ced-1(RNAi)</i>	0.0 ± 0.0 (33)	0.0 ± 0.0 (39)	0.0 ± 0.0 (38)	0.0 ± 0.0 (42)	0.0 ± 0.0 (39)
<i>mpk-1(gu117); ced-1(RNAi)</i>	0.0 ± 0.0 (28)	0.0 ± 0.0 (39)	0.0 ± 0.0 (33)	0.0 ± 0.0 (34)	0.0 ± 0.0 (38)
<i>ced-9(n1950gf); ced-1(RNAi)</i>	8.0 ± 0.2 (41)	15.8 ± 0.4 (36)	18.1 ± 0.6 (38)	13.2 ± 0.6 (49)	22.0 ± 0.6 (43)
<i>egl-1(n1086n3082); ced-1(RNAi)</i>	5.9 ± 0.3 (39)	P=1.14E-28 12.1 ± 0.3 (37)	P=1.50E-25 13.5 ± 0.3 (37)	P=4.85E-12 11.7 ± 0.5 (39)	P=3.73E-37 13.5 ± 0.3 (39)
<i>cep-1(w40); ced-1(RNAi)</i>	12.3 ± 0.6 (31)	P=2.98E-25 25.0 ± 0.8 (27)	P=2.72E-30 20.9 ± 1.0 (24)	P=1.01E-17 25.5 ± 0.7 (51)	P=2.5E-31 29.9 ± 0.6 (34)
<i>mrr-2(e2663); ced-1(RNAi)</i>	7.7 ± 0.6 (35)	P=3.51E-18 15.9 ± 0.6 (32)	P=1.29E-10 15.8 ± 0.6 (32)	P=1.04E-20 22.0 ± 1 (70)	P=6.01E-32 23.5 ± 0.8 (47)
<i>him-7(e1480); ced-1(RNAi)</i>	6.3 ± 0.8 (30)	P=1.10E-13 13.4 ± 0.5 (32)	P=1.74E-13 12.1 ± 0.6 (38)	P=1.05E-16 16.1 ± 0.6 (38)	P=4.23E-25 19.0 ± 1 (29)
<i>spo-1(ok79); ced-1(RNAi)</i>	6.0 ± 0.4 (33)	P=3.24E-12 12.8 ± 0.5 (30)	P=9.62E-09 12.9 ± 0.6 (32)	P=2.00E-17 15.4 ± 0.7 (33)	P=2.37E-15 18.2 ± 0.6 (29)
<i>mek-1(ks4); ced-1(RNAi)</i>	3.9 ± 0.3 (35)	P=8.44E-14 5.5 ± 0.5 (35)	P=7.12E-14 6.0 ± 0.4 (22)	P=3.30E-18 6.2 ± 0.4 (32)	P=4.95E-22 8.2 ± 0.5 (33)
<i>ced-1(e1735); sek-1(RNAi)</i>	8 ± 0.3 (32)	P=8.31E-03 15.1 ± 0.4 (41)	P=1.4E-04 15 ± 0.6 (32)	P=7.54E-06 14 ± 0.6 (41)	P=9.41E-11 19.1 ± 0.4 (38)
<i>mek-1(ks4); ced-1(e1735); sek-1(RNAi)</i>	4.6 ± 0.3 (30)	P=1.44E-21 3.9 ± 0.3 (30)	P=1.38E-14 4.1 ± 0.2 (34)	P=3.44E-11 4.2 ± 0.4 (43)	P=1.43E-28 10.4 ± 0.6 (31)
		P=0.12	P=0.22	P=0.51	P=5.58E-11

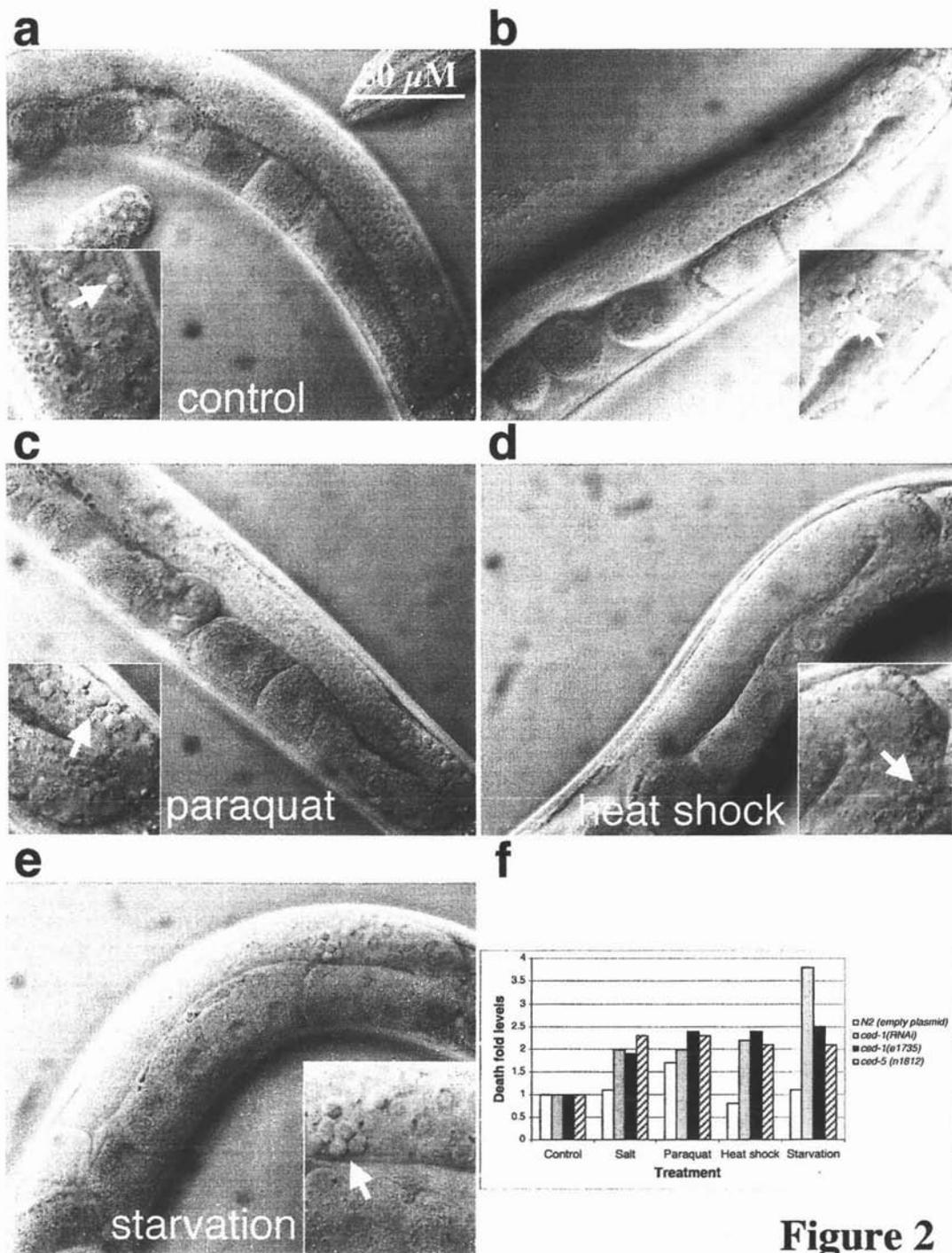
One-day old animals with different genetic backgrounds were subjected to indicate conditions (see details in material and methods), and observed under microscope to detected corpses. Average numbers of corpses per animal are shown along with SEM. P values are derived from comparison with control under each set of conditions. Number of gonads observed (one per animal) is shown in parenthesis. For each condition results of at least two independent experiments are shown. As RNAi control we used N2 animals feed with strain HT115 carrying plasmid pPD129.35 (empty plasmid).



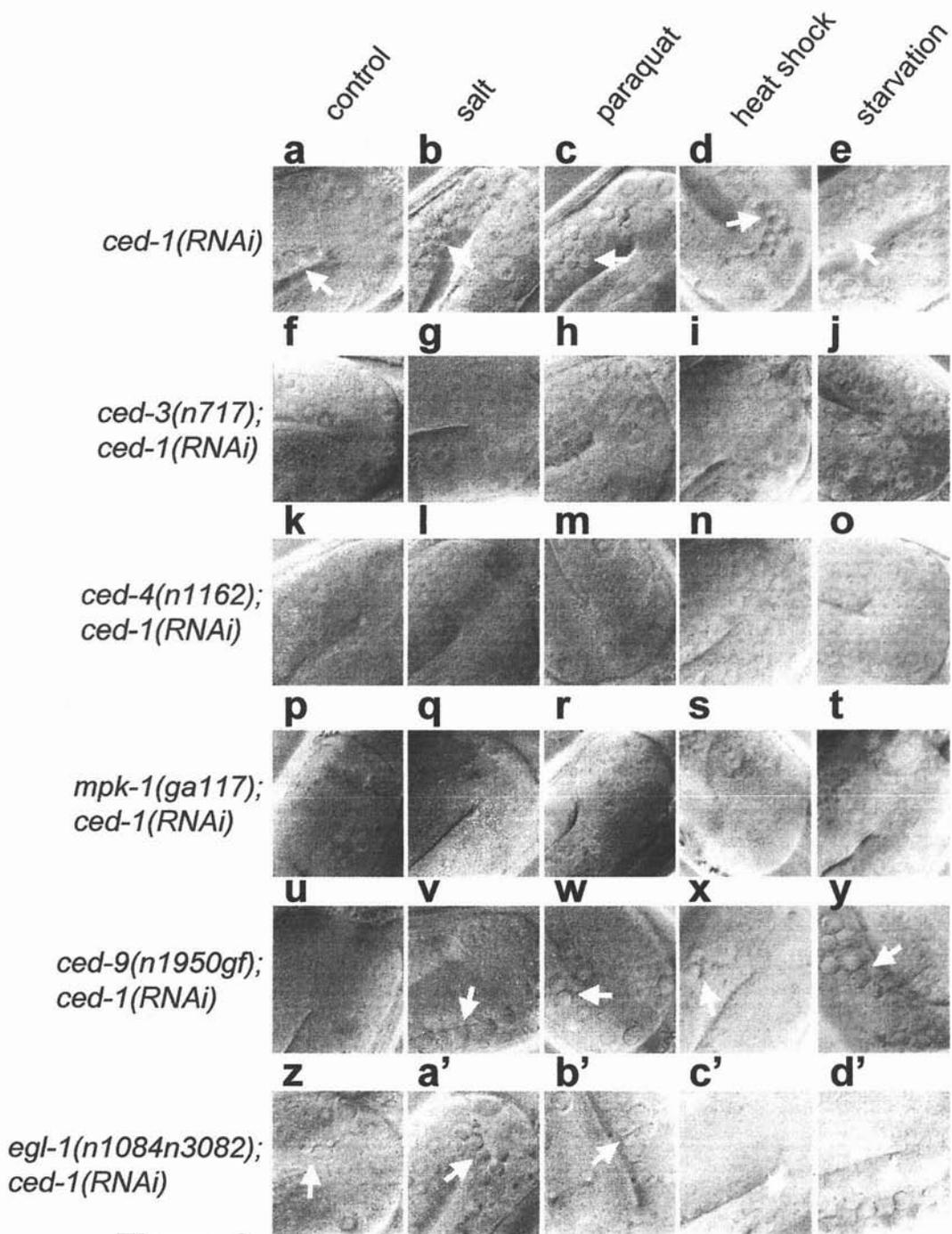
**b**



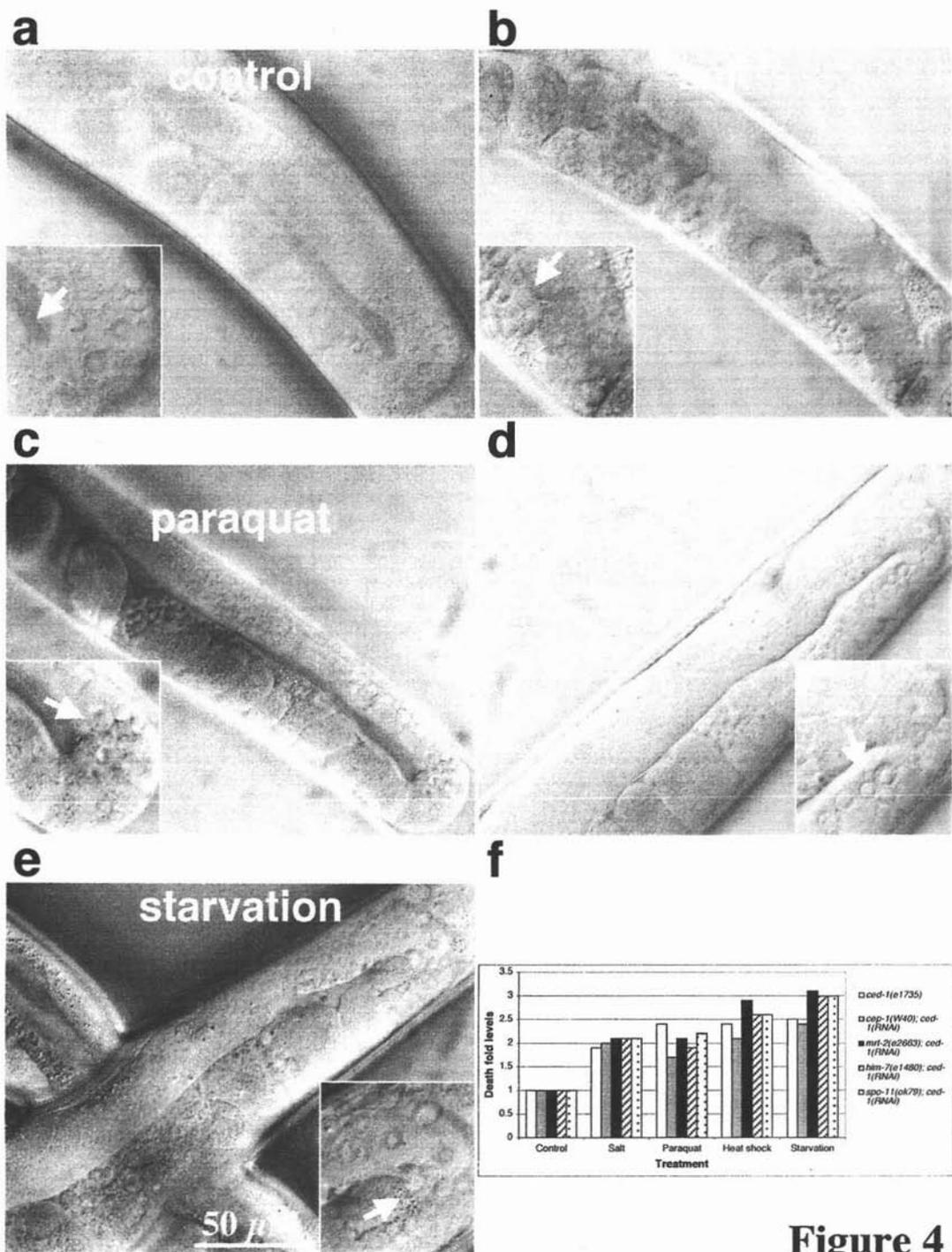
**Figure 1**



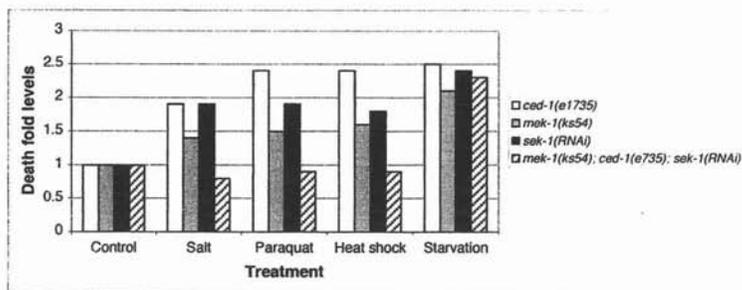
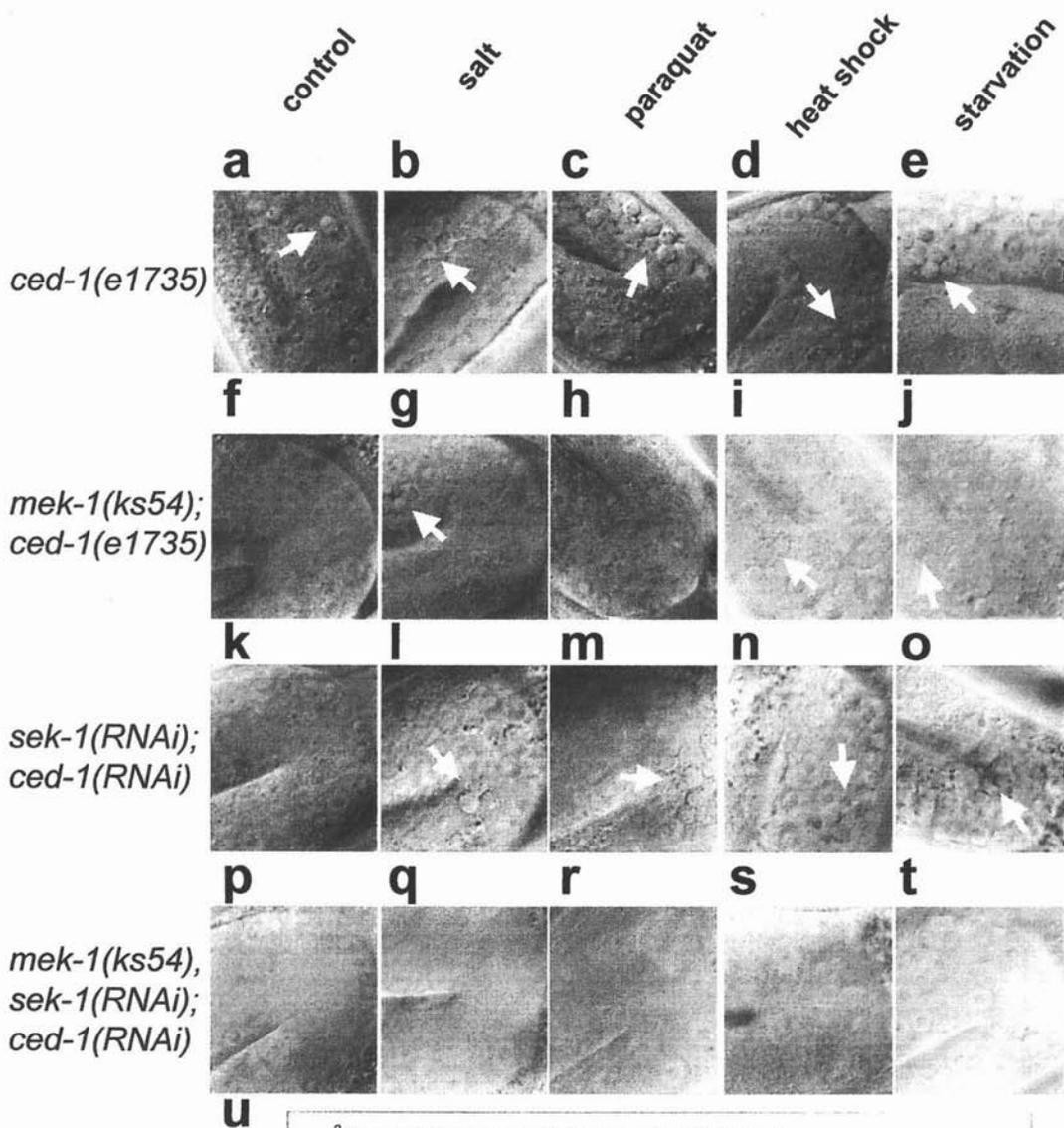
**Figure 2**



**Figure 3**

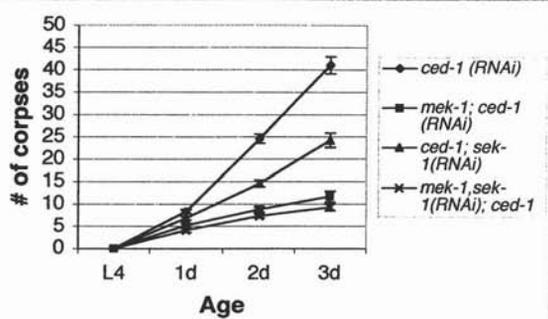
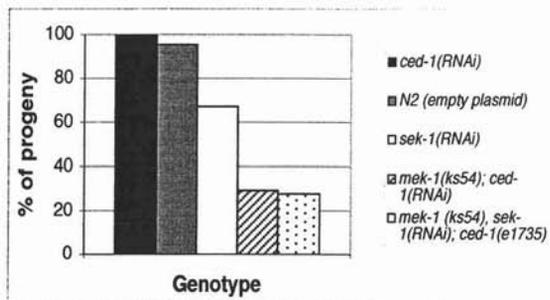


**Figure 4**



**Figure 5**

# Figure 6

**a****b**

## 9. APÉNDICE I

### **“Estudio de vasa una helicasa esencial para la función de la línea germinal en *C. elegans*”**

Nota aclaratoria: el gen *vasa* de *C. elegans* a sido renombrado *vbh-1* debido a su alta homología con los genes *vasa* y *belle* de *Drosophila melanogaster* (vasa-belle RNA helicase).

#### **Introducción**

La helicasa de ARN del tipo “DEAD box” de *Drosophila melanogaster*, VASA, es indispensable para la función de la línea germinal de este organismo. Mutantes que carecen de esta proteína al momento de nacer mueren durante el desarrollo embrionario, ya que la línea germinal no se forma. Mutantes en *vasa* que tienen la proteína materna durante el desarrollo embrionario sobreviven pero son incapaces de producirla durante su crecimiento, desarrollándose como animales adultos estériles (Lasko and Ashburner, 1988). Se sabe que VASA interacciona con factores de inicio de la traducción, lo que indica que esta proteína tiene algún tipo de participación en su regulación (Lasko and Ashburner, 1988). VASA es indispensable para que algunos mensajeros de la línea germinal sean traducidos durante la embriogénesis. Otra helicasa de ARN, indispensable para la función de la línea germinal en *Drosophila* es BELLE. La falta de esta proteína produce esterilidad en animales adultos (Johnstone *et al.*, 2005). A pesar de que VASA y BELLE se han estudiado en *Drosophila* y otros organismos aún desconocemos la función de estas proteínas en la línea germinal. Con el propósito de estudiar la función de estas proteínas en *C. elegans* se identificó el homólogo de estos genes. Curiosamente el gen de *C. elegans* que denominamos *vbh-1* (vasa belle RNA helicase) se parece a ambas proteínas.

## **Estudio de la expresión de *vbh-1*.**

Nuestro objetivo es estudiar el patrón de expresión de la helicasa de ARN, VBH-1, durante el desarrollo del nemátodo *C. elegans*. Para realizar este objetivo decidimos estudiar el patrón de expresión y localización de esta proteína *in vivo* por medio de la realización de una fusión de VBH-1 con la proteína verde fluorescente.

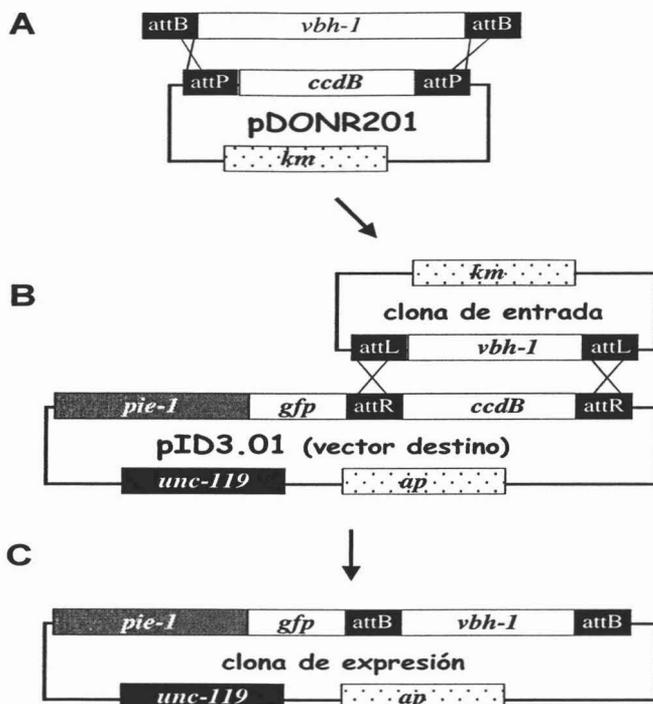
La expresión de este tipo de transgenes en la línea germinal del *C. elegans* es difícil, debido a que este tejido tiende a apagar los genes que se encuentran expresados varias veces. Para evitar que haya varias copias del transgen a expresar recientemente se ha empezado a realizar transformación de *C. elegans* por medio de bio-balística.

## **Efecto de la pérdida de la función de *vasa* en el *C. elegans*.**

Para estudiar el efecto de la pérdida del gen *vbh-1* en *C. elegans* decidimos hacer interferencia de RNA o RNAi. Esta técnica consiste en apagar la expresión de un gen, de una manera específica, por medio de la introducción de RNA de doble cadena. En el caso particular del *C. elegans*, el RNA de doble cadena puede ser producido en una bacteria que se utiliza como alimento para los nemátodos. Una vez que los animales ingieren el RNA de doble cadena, este se transporta al cuerpo produciendo la degradación específica del gen. El alumno Sergio Zonszein construyó los plásmidos pSZ1 y pSZ2 los cuales contienen un fragmento de 400 pb o el gen completo, respectivamente, de *vbh-1* flanqueado por los promotores del fago T7. Estos plásmidos fueron utilizados para transformar la cepa HT115 de *E. coli*, la cual carece de RNAasa III. La expresión de *vbh-1* en *E. coli* se indujo por medio de IPTG y el RNA de doble cadena se forma espontáneamente dentro de la bacteria. Estas bacterias acumulan RNA de doble cadena del gen *vbh-1* y son utilizadas para alimentar animales y producir RNAi de este gen. La falta del gen *vbh-1* en *C. elegans* provoca esterilidad tanto en animales hermafroditas como machos. Utilizando

anticuerpos contra marcadores específicos del proceso de gametogénesis, logramos determinar que los espermatozoides son la causa principal de la esterilidad (Navarro *et al.*, en preparación). Actualmente nos encontramos estudiando cuáles son los defectos en los espermatozoides con el fin de entender la función de esta proteína durante la espermatogénesis.

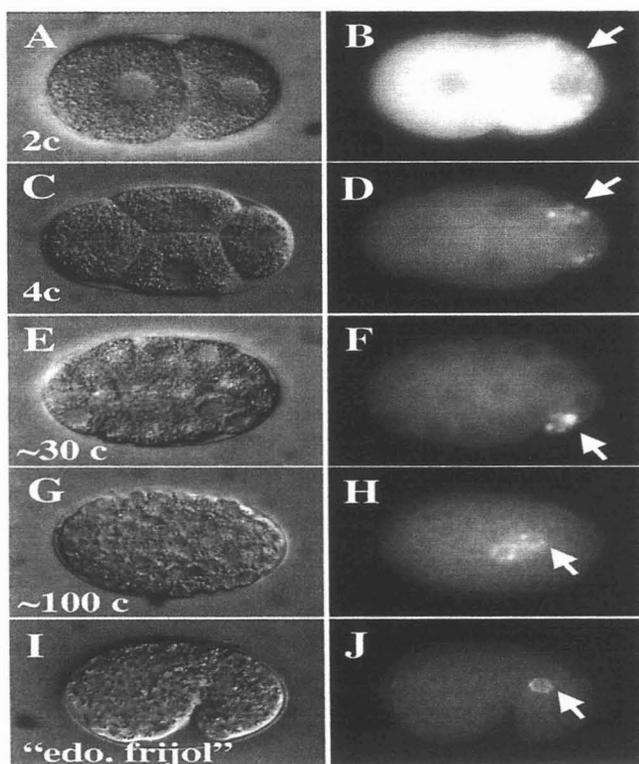
Con el propósito de estudiar la expresión de *vbh-1 in vivo* se realizó una fusión del gen reportero GFP. Esta fusión contiene el promotor de un gen específico de línea germinal *pie-1*. Para la construcción del plásmido se utilizaron dos oligonucleótidos que amplifican la región codificadora de VBH-1 del ATG al codón de término. Se usó la tecnología Gateway (invitrogen) para la construcción de este plásmido. Esta consiste en el uso de recombinasas para sustituir nuestro gen de estudio en un plásmido destino. El plásmido destino fue construido en el laboratorio de la Dra. Geraldine Seydoux (pID3.01) y contiene el promotor de *pie-1*, la región codificadora del reportero GFP y el gen tóxico *ccdB* flanqueados por sitios de recombinación (Figura 1). Por medio de reacciones de recombinación se sustituyó el gen *ccdB* por el gen de *vbh-1*. Esta fusión quedó de la siguiente forma: PIE-1:GFP:VBH-1 y al plásmido le denominamos pBOM1. Este plásmido fue mezclado con perlas de oro que fueron utilizadas para disparar a una gran cantidad de nemátodos. El plásmido pBOM1 también contiene al gen *unc-119* y por ello puede rescatar a mutantes en este gen que están paralizadas. Después de varios días los animales que fueron disparados con nuestra construcción fueron analizados y se seleccionaron los animales que eran capaces de moverse como animales silvestres. Estos animales fueron incubados por tres días a 24° C y su progenie fue analizada en el microscopio para determinar si tenían la fluorescencia.



**Figura 1. Estrategia de clonación.** Para realizar la fusión GFP se utilizó la tecnología de clonación llamada GATEWAY (Invitrogen). Este método está basado en la recombinación del fago lambda, donde las regiones *attB* recombinan con casetes *attP*, y las regiones *attL* son usadas para recombinar con secuencias *attR*. Una de las principales ventajas de esta tecnología es que conserva el marco de lectura abierto. A. Usando a la enzima *BP clonasa* los productos de PCR recombinan con el llamado vector donador (pDONR201) para formar así la clona de entrada. B. En la segunda reacción, la clona de entrada reacciona con el vector destino (pID3.01) en presencia de la enzima *LR clonasa* para formar la clona de expresión final. C. La clona de expresión contiene la fusión *gfp:vbh-1* bajo el control de las regiones reguladores de *pie-1* y el gen *unc-119* como marcador selectivo. *km*= resistencia a kanamicina, *ap*= resistencia a ampicilina y *ccdB*= el producto de este gen interfiere con la girasa de ADN de *E. coli*, inhibiendo con ello el crecimiento de la bacteria.

Se obtuvieron 10 líneas transgénicas que representan un evento de integración distinto y donde cada una de estas líneas poseen el mismo patrón de fluorescencia. La fusión PIE-1:GFP:VBH-1 se expresa en el citoplasma de células germinales y somáticas durante la embriogénesis temprana (Figura 2).

De la misma manera esta fusión se expresa en los gránulos P de las células germinales (Figura 2). Estos datos corroboran nuestras observaciones previas en donde utilizando un anticuerpo específico contra VBH-1 habíamos detectado a VBH-1 en las células germinales del *C. elegans*.



**Figura 2. Expresión *in vivo* de VBH-1 durante la embriogénesis.** Los embriones en cada uno de los estados indicados en la figura fueron montados y observados por DIC (A, C, E, G e I) y utilizando microscopía fluorescente (B, D, F, H y J). VBH-1 está asociado a estructuras granulares conocidas como *gránulos P*, las cuales almacenan RNAs mensajeros. Las flechas señalan gránulos P o en estadios avanzados hacia células germinales (puntos claros).

Esta fusión va a ser muy útil para buscar genes que afectan la expresión de *vbh-1* por medio de RNA de interferencia y será también utilizada para aislar más componentes de los gránulos P por medio de inmunoprecipitaciones. Con estos resultados se llevarán a cabo diversos experimentos los cuales permitirán

entender con mayor detalle el papel de la helicasa de RNA *vbh-1* durante la formación de la línea germinal en el nematodo *C. elegans*.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

1. Aballay A. and F. Ausubel. **Programmed cell death mediated by *ced-3* and *ced-4* protects *Caenorhabditis elegans* from *Salmonella typhimurium*-mediated killing.** PNAS (2001) 98(5):2735-2739
2. Aballay A., E. Drenkard, L. R. Hilbun and F. M. Ausubel. ***Caenorhabditis elegans* Innate Immune Response Triggered by *Salmonella enterica* Required intact LPS and Is Mediated by a MAPK Signal Pathway.** Current Biology (2003) 13: 47-52
3. Abrams J. M., K. White, L. I. Fessler and H. Steller. **Programmed cell death during *Drosophila* embryogenesis.** Development (1993) 117:29-43
4. Aguirre J., M. Ríos-Momberg, D. Heewit and W. Hansberg. **Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes.** TRENDS in Microbiology (2005) 20:1-8
5. Bakkenist C. J. and M. B. Kastan **Initiating Cellular Stress Response.** Cell (2004) 118:9-17
6. Berman K., J. McKay, L. Avery and M. Cobb. **Isolation and Characterization of *pmk(1-3)*: Three p38 homologs in *Caenorhabditis elegans*.** Molecular cell Biology Research Communications (2001) 4:337-344
7. Brenner S. **The genetics of *Caenorhabditis elegans*.** Genetics (1974) 77:71-94
8. Carrera P, Johnstone O, Nakamura A, Casanova J, Jackle H. and Lasko P. **VASA mediates translation through interaction with a *Drosophila* yIF2 homolog.** Molecular Cell (2000) 5(1):181-187
9. Conradt B. and H. R. Horvitz. **The *C. elegans* protein EGL-1 Is required for Programmed Cell Death and Interacts with the Bcl-2-like Protein CED-9.** Cell (1998) 93: 519-529
10. Danial N. N. and S. J. Korsmeyer. **Cell Death: control Points.** Cell (2004) 116:205-219
11. Denburg A. F., K. McDonald, G. Moulder, R. Barstead, M. Dresser and A. M. Villeneuve. **Meiotic recombination in *C. elegans* Initiates by a Conserved Mechanism and Is Dispensable for Homologous Chromosome Synapsis.** Cell (1998) 94:387-398
12. Derry W. B., A. P. Putzke and J. H. Rothman. ***Caenorhabditis elegans* p53: Role in Apoptosis, Meiosis, and Stress Resistance.** Science (2001) 294: 591-595
13. Gartner A., S. Milstein, S. Ahmed, J. Hodking and M.O. Hengartner. **A Conserved Checkpoint Pathway Mediates DNA Damage-Induced Apoptosis and Cell Cycle Arrest in *C. elegans*.** Molecular Cell (2000) 5:435-443
14. Gummienny T. L., E. Lambie, E. Hartweg, H. R. Horvitz and M. O. Hengartner. **Genetic control of programmed cell death in the**

- Caenorhabditis elegans* hermaphrodite germline.** Development (1999) 126:1011-1022
15. Hansberg W. 2002. **Biología de las especies de oxígeno reactivas.** Mensaje Bioquímico, Vol XXVI. Depto. Bioquímica, Fac. Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México.
  16. Hubbart J. A. and D. Greenstein. **The *Caenorhabditis elegans* Gonad: A Test Tube for Cell and Developmental Biology.** Developmental Dynamics (2000) 218: 2-22
  17. Johnson J., J. Canning, T. Kaneko, J. K. Pru and J. L. Tilly. **Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary.** Nature (2004) 428(6979):145-150
  18. Johnstone O., R. Deuring, R. Bock, P. Linder, M. T. Fuller and P. Lasko. **Belle is a *Drosophila* DEAD-box protein required for viability and in the germ line.** Developmental Biology (2004) 277:92-101
  19. Karashima T., A. Sugimoto and M. Yamamoto. ***Caenorhabditis elegans* homologue of the human azoospermia factor DAZ is required for oogenesis but not for spermatogenesis.** Development (2000) 127:1069-1079
  20. Kawasaki M., N. Hisamoto, Y. Iino, M. Yamamoto, J. Ninomiya-Tsuji and K. Matsumoto. **A *Caenorhabditis elegans* JNK signal transduction pathway regulates coordinated movement via type-D GABAergic motor neurons.** EMBO Journal (1999) 18:3604-3615
  21. Keeney S., C. N. Giroux and N. Kleckner. **Meiosis-Specific DNA Double-Strand Breaks Are Catalyzed by Spo11, a Member of a Widely Conserved Protein Family.** Cell (1997) 88: 375-384
  22. Lackner M. R. and S. K. Kim. **Genetic Analysis of the *Caenorhabditis elegans* MAP kinase Gene *mpk-1*.** Genetics (1998) 150:103-117
  23. Lasko, P. F. and Ashburner, M. **The product of the *Drosophila* gene *vasa* is very similar to eukariotic initiation factor-4A.** Nature (1998) 335:611-617
  24. Letre G., E. A. Kritikou, M. Jaeggi, A. Calixto, A. G. Fraser, R. S. Kamath, J. Ahringer and M. O. Hengartner. **Genome-wide RNAi identifies p53-dependent and-independent regulators of germ cell apoptosis in *C. elegans*.** Cell Death and Differentiation (2004):1-6
  25. Makoto K., R. Zwaal, K. L. Guan, L. Avery and Y. Ohshima. **A *Caenorhabditis elegans* MAP kinase kinase, is involved in stress response.** EMBO Journal (2000) 19(19):5148-5156
  26. Maruyama R., S. Endo, A. Sugimoto and M. Yamamoto. ***Caenorhabditis elegans* DAZ-1 is expressed in proliferating germ cells and directs proper nuclear organization and cytoplasmatic core formation during oogenesis.** Developmental Biology (2005) 277:142-154
  27. Navarro R. E., E. Y. Shim, Y. Kohara, A. Singson and K. Blackwell. ***cgh-1*, a conserved predicted RNA helicase required for gametogenesis and protection from physiological germline apoptosis in *C. elegans*.** Development (2001) 128:1-12

28. Pellettieri J., Reinke V., Kim S. K. and Seydoux G. **Coordinate activation of maternal protein degradation during the egg-to-embryo transition in *C. elegans***. *Development Cell* (2003) 5(3):451-462
29. Praitis V, Casey E, Collar D. and Austin J. **Creation of low-copy integrated transgenic lines in *Caenorhabditis elegans***. *Genetics* (2001) 157(3): 1217:1226
30. Ravi, S. K., M. Martínez-Campos, P. Zipperlen, A. G. Fraser and J. Ahringer. **Effectiveness of specific RNA-mediated interference through ingested double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans***. *Genome Biology* (2000) 2(1):1-10
31. Riddle D. L., T. Blumenthal, B. J. Myer and J. R. Priess. 1997. **C. ELEGANS II**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1222
32. Sambrook J. and D. W. Russell. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press
33. Schumacher B., K. Hofmann, S. Boulton and A. Gartner. **The *C. elegans* homolog of the p53 tumor suppressor is required for DNA damage-induced apoptosis**. *Current Biology* (2001) 11: 1722-1727
34. Shawn A. and J. Hodgkin. **MRT-2 checkpoint protein is required for germline immortality and telomere replication in *C. elegans***. *Nature* (2000) 403:159-164
35. Shawn A., A. Alpi, M. O. Hengartner and A. Gartner. ***C. elegans* RAD-5/CLK-2 defines a new DNA damage checkpoint protein**. *Current Biology* (2001) 11:1934-1944
36. Stergiou L. and M. O. Hengartner. **Death and more: DNA damage response pathways in the nematode *C. elegans***. *Cell Death and Differentiation* (2004) 11: 21-28
37. Technau U., M. A. Miller, D. Bridge and R. Steele. **Arrested apoptosis of nurse cells during *Hydra* oogenesis and embryogenesis**. *Developmental Biology* (2003) 260: 191-206
38. Tilly J. L. **Commuting the death sentence: How oocytes strive to survive**. *Nature Reviews* (2001) 2: 838-848
39. Timmons L., A. Fire. **Specific interference by ingested dsRNA**. *Nature* (1998) 395:854
40. Timmons L., D. L. Court and A. Fire. **Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans***. *Gene* (2001):103-112
41. Vaux D. L. **Toward an understanding of the molecular mechanisms of physiological cell death**. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1993) 90:786-789
42. Wood, W. B. 1988. **The nematode *Caenorhabditis elegans***. Ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 667pp
43. Yamashita M. **Apoptosis in zebrafish development**. *Comparative Biochemistry and Physiology* (2003) 136:731-742