



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Localización y función de las proteínas MAI-1 y MAI-2 en el *Caenorhabditis elegans*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias

PRESENTA:

Laura Paulette Fernández Cárdenas

Dra. Rosa Estela Navarro González
Instituto de Fisiología Celular

Dra. Marietta Tuena Sangri (Instituto de Fisiología Celular)
Dr. José de Jesús García Trejo (Facultad de Química)

MÉXICO, D. F. Marzo, 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

“Cada vez me convenzo más de que sólo los poetas pueden
escribir sobre la ciencia”

Armando Gómez Puyou

INTEGRANTES DEL JURADO

Presidente:	Dr. Armando Gómez Puyou
Vocal:	Dra. María Soledad Funes Argüelles
Vocal:	Dr. Jesús Chimal Monroy
Vocal:	Dr. Diego González Halphen
Secretario:	Dra. María Imelda López Villaseñor

Este trabajo se realizó bajo la dirección de la Dra. Rosa Estela Navarro González en el Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México y constituye parte del proyecto de investigación apoyado por el donativo PAPIIT-UNAM (IN225509 y IN207412), así como por el donativo CONACYT (50896-Q y 103856-Q).

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

- A la Universidad Nacional Autónoma de México por haberme otorgado formación académica. Por la oportunidad de integrarme a un ambiente donde se propicia el intercambio de ideas y el respeto.
- A la Dra. Rosa Navarro por ser mi guía y motivarme todos los días a ser una mejor estudiante.
- Al Dr. Armando Gómez Puyou y a la Dra. Marietta Tuena Sangri por sus opiniones críticas, por escucharme y por transmitirme en todo momento su pasión por la ciencia.
- Al Dr. Luis Felipe Jiménez y a la Dra. Lourdes Agredano Moreno por su asesoría y ayuda en la microscopía electrónica.
- Al Dr. Roberto Coria Ortega y a Leticia García Gutierrez por su organización y colaboración en la gestión académica relacionada con esta maestría. Gracias por ayudarme y asesorarme en todo momento.
- A Laura Silvia Salinas Velázquez por su participación en el desarrollo de éste proyecto, así como su asistencia técnica que fue indispensable en el presente trabajo.
- A José Luis Ramos Balderas por su participación en el desarrollo de éste proyecto, así como su asistencia técnica en el presente trabajo.
- A la Q.F.B María Concepción José Núñez y a la Q.F.B Beatriz Aguirre López por su asistencia técnica.
- A María del Rocío Camarillo Villegas por su apoyo y ayuda en el laboratorio.
- A los ingenieros Gerardo Coello, Juan Manuel Barbosa e Ivette Rosas por su asesoría en el área de computo.
- A los miembros del jurado: Dr. Armando Gómez Puyou, Dra. María Soledad Funes Argüello, Dr. Jesús Chimal Monroy, Dr. Diego González Halphen y Dra. María Imelda López Villaseñor por sus observaciones y correcciones a esta tesis.
- Al personal de la biblioteca del Instituto de Fisiología Celular por ayudarme a la adquisición de bibliografía y préstamo de libros.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

- A mi mamá Laura y a mi papá Chucho por su amor, su apoyo incondicional, su fuerza, gracias por creer en mi como nadie lo hace. Gracias por hacerme tan feliz.
- A mis abuelitos Socorro y Luis por levantarse todos los días con una sonrisa e iluminar mi día, porque al igual que mis padres son mi ejemplo.
- A mis tíos y tías: Eva, Pepe, Gera, Taide, Luis, Javier, Carlos, Norma, Paty, Coco, Gallo, Lucy, Agustín, Toño†, Ne, Lau, Soco y Marcela. Por proteger a las sobrinas, por su amor, alegría y consejos. Tengo una familia increíble. Gracias.
- A mis primas y primos: Marianis, Melis, Luigi, Monchis, Priscila y Ayline. Gracias porque con pocas palabras y muchas sonrisas hacen mi vida hermosa y sencilla.
- Al novio, gracias Gopetito por ser mi mejor amigo, por tu paciencia, tu confianza, tu franco y sencillo cariño.
- A Caaarla, Den, mi Adrianita, Lulú, Janike y Damara. Gracias por preocuparse por mi y hacerme sonreír siempre.
- A Fewer, Wendell, Victor, Diego y Goyo por su cariño y su buen humor.
- A Emma, gracias por estos años de amistad, por ser tan directo y por ayudarme tanto, eres un gran ejemplo.
- A Paulina, a quien tuve la fortuna de conocer en las clases de la maestría, con quien realicé trabajos y estudié. Gracias por compartir conmigo los nervios y las risas.
- A Gabriela, Daniel, Silvia (hermana), Laura, Giovanni, Ari, Javier, Emmanuel, Pedro e Isabel, porque a lo largo de estos dos años no solo me enseñaron las técnicas y a trabajar con el gusano, sino que me apoyaron y ubicaron en todo momento, aún cuando estaban ocupados contestaban mis preguntas. Hacen del laboratorio un lugar cálido, lleno de risas y matices, soy muy afortunada de haberlos conocido.
- A mi amigo Alfredo (Hola!) por ser mi brújula científica.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	2
INTRODUCCIÓN	3
La mitocondria. Estructura y función.	5
La ATP Sintasa.	6
Estructura de la F ₀ F ₁ ATP sintasa.	
Dimerización y oligomerización de las ATP sintasas y su efecto en la formación de crestas mitocondriales.	9
La proteína inhibidora de la ATPasa: IF ₁ .	11
Las proteínas MAI-1 y MAI-2 son similares a la IF ₁ en <i>C. elegans</i> .	13
ORGANISMO MODELO	16
Embriogénesis y desarrollo larvario de <i>C. elegans</i> .	17
El sistema reproductor del <i>C. elegans</i> .	19
Apoptosis de la línea germinal del <i>C. elegans</i> .	20
OBJETIVOS	22
MATERIALES Y MÉTODOS	23
Cepas de <i>C. elegans</i> .	23
Mantenimiento de nematodos.	23
Construcción de los transgenes <i>mai-2::gfp</i> y <i>mCherry::mai-1</i> por medio de la Tecnología Gateway®.	24
Biobalística.	29
Montaje de nematodos en placas de agar para microscopía Nomarski.	31
RNA de interferencia (RNAi) de los genes <i>mai-1</i> y <i>mai-2</i> .	32
Extracción de RNA y síntesis de cDNA.	34
Western blot.	35
Conteo de progenie.	36
Conteo de cuerpos apoptóticos.	36
Microscopía electrónica.	36
RESULTADOS	38
Los animales transgénicos <i>mai-2::gfp</i> y <i>mCherry::mai-1</i> se expresan diferencialmente durante la embriogénesis.	38
El transgénico <i>mai-2::gfp</i> se expresa en prácticamente todos los tejidos del nematodo mientras que el transgénico <i>mCherry::mai-1</i> se expresa en tejidos muy específicos.	40
El transgénico <i>mai-2::gfp</i> co-localiza con el transgen <i>xmSi01 [Pmex-5::tom-20::mcherry-tbb-3'UTR; Cbr-unc-119(+)]</i> en la mitocondria.	41
Determinación del patrón de expresión de los animales transgénicos <i>mai-2::gfp</i> y <i>mCherry::mai-1</i> .	43
Los animales transgénicos <i>mai-2::gfp</i> y <i>mCherry::mai-1</i> se expresan en compartimentos celulares distintos.	47
El RNA de interferencia silenció considerablemente la expresión de los genes <i>mai-1</i> y <i>mai-2</i> .	48
Los animales <i>mai-2(RNAi)</i> presentaron una pérdida en la estructura de crestas mitocondriales.	52
Los animales <i>mai-1(RNAi)</i> y <i>mai-2(RNAi)</i> no presentaron defectos en la fertilidad pero sí un incremento en la apoptosis fisiológica.	53
Los animales <i>mai-1(RNAi)</i> y <i>mai-2(RNAi)</i> muestran un incremento discreto en la apoptosis	

fisiológica de la gónada.	54
DISCUSIÓN	56
CONCLUSIONES	60
PERSPECTIVAS	61
BIBLIOGRAFÍA	62

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diversidad en la ultraestructuras mitocondriales.	5
Figura 2. Representación esquemática de la F ₀ F ₁ ATP sintasa de mitocondrias de levadura.	7
Figura 3. Modelo de la organización estructural de la ATP sintasa.	10
Figura 4. Impacto de la IF ₁ en el consumo de ATP y $\Delta\psi_m$.	12
Figura 5. El operón del gen <i>mai-1</i> .	14
Figura 6. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las proteínas IF ₁ y sus homólogos encontrados en <i>C. elegans</i> .	14
Figura 7. Embriogénesis del <i>C. elegans</i> .	18
Figura 8. Ciclo de vida del <i>C. elegans</i> .	19
Figura 9. El sistema reproductivo del adulto hermafrodita.	19
Figura 10. Representación de la técnica de Multiste Gateway® Three Fragment Vector Construction Kit que se utilizó para elaborar los transgen <i>mai-2::gfp</i> y <i>mCherry::mai-1</i>	25
Figura 11. Elaboración de la quimera GFP- <i>mai-2</i> -3'UTR.	25
Figura 12. Confirmación de las construcciones promotor <i>mai-2::pDONR</i> TM 221 P4-P1r, <i>mai-2::pDONR</i> TM 221 y GFP- <i>mai-2</i> -3'UTR:: <i>pDONR</i> TM 221 P2r-P3.	27
Figura 13. Confirmación de las construcciones promotor <i>mai-1::pDONR</i> TM 221 P4-P1r y <i>mai-1</i> -3'UTR:: <i>pDONR</i> TM 221 P2r-P3.	28
Figura 14. La biobalística es una técnica que se utiliza para introducir DNA al <i>C. elegans</i> .	29
Figura 15. Preparación de una placa de agarosa.	32
Figura 16. Clonación de los genes <i>mai-1</i> y <i>mai-2</i> en el plásmido pPD129.36 L4440.	33
Figura 17. Mecanismo de silenciamiento en <i>C. elegans</i> .	34
Figura 18. El transgénico <i>mai-2::gfp</i> se expresa a lo largo de la embriogénesis del <i>C. elegans</i> .	39
Figura 19. El animal transgénico <i>mai-1::mCherry</i> se expresa en etapas tardías de la embriogénesis.	40
Figura 20. Los animales transgénicos <i>mai-2::gfp</i> y <i>mCherry::mai-1</i> se expresan en	

todos los estadios larvarios y en el adulto de una manera diferencial.	41
Figura 21. El transgénico <i>mai-2::gfp</i> colocaliza en la mitocondria con el transgénico <i>xmSi01</i> .	42
Figura 22. Relación izquierda-derecha de la gónada con respecto al intestino.	43
Figura 23. El transgen <i>mai-2::gfp</i> se expresa en las sección anterior del nematodo (cabeza).	44
Figura 24. El transgénico <i>mai-2::gfp</i> se expresa en los órganos de la parte media del nematodo.	44
Figura 25. El animal transgénico <i>mai-2::gfp</i> se expresa en la parte posterior (cola) del nematodo.	45
Figura 26. El transgénico <i>mCherry::mai-1</i> se expresa en ciertas neuronas de las cabeza del <i>C. elegans</i> .	46
Figura 27. El animal transgénico <i>mCherry::mai-1</i> se localiza en el citoplasma del intestino y en algunas neuronas de la sección media y posterior del nematodo.	46
Figura 28. Los animales transgénicos <i>mai-2::gfp</i> y <i>mCherry::mai-1</i> no co-localizan en el nematodo.	47
Figura 29. La expresión del RNA mensajero de <i>mai-2</i> disminuye en animales <i>mai-2(RNAi)</i> por el contrario el RNA mensajero de <i>mai-1</i> aumenta en animales <i>mai-1(RNAi)</i> .	49
Figura 30. La expresión del transgénico <i>mai-2::gfp</i> , así como la acumulación de la proteína MAI-2 disminuye considerablemente al silenciar su gen por medio de RNAi.	50
Figura 31 La expresión del transgénico <i>mCherry::mai-1</i> disminuye considerablemente en aquellos animales <i>mai-1(RNAi)</i> excepto en neuronas.	51
Figura 32. La morfología de las crestas mitocondriales de los animales <i>mai-2(RNAi)</i> se ve desorganizada.	53
Figura 33. Los animales <i>mai-1(RNAi)</i> y <i>mai-2(RNAi)</i> no presentaron defectos en la fertilidad.	54
Figura 34. Los animales <i>mai-1(RNAi)</i> y <i>mai-2(RNAi)</i> presentaron un aumento discreto pero significativo en la apoptosis fisiológica.	55

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cepas.	23
Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para incorporar los sitios <i>attB</i> a los fragmentos amplificados para la elaboración del transgen <i>mai-2::gfp</i> .	26
Tabla 3. Oligonucleótidos que se utilizaron para incorporar los sitios <i>attB</i> a los fragmentos amplificados para la elaboración del transgen <i>mCherry::mai-1</i> .	28

ABREVIATURAS

3'UTR	Región no traducida en el 3' de un mRNA
ATP	Adenosín trifosfato
C-terminal	Carboxilo terminal
CaM	Calmodulina
DEPC	Dietilpirocarbonato
DTT	Ditiotreitol
DNA	Ácido desoxiribonucleico
FADH₂	Flavin adenín dinucleótido
F₁	Segmento hidrofílico de la F ₀ F ₁ que contiene los sitios catalíticos
F₀	Segmento hidrofóbico de la F ₀ F ₁ que transporta iones
GFP	Proteína verde fluorescente
H⁺	Protón
IAA	Ácido iodoacético
IF₁	La proteína inhibidora endógena
IPTG	Isopropil β-tiogalactosidasa
kDa	Kilodaltones
kb	Kilobases
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
N-terminal	Amino terminal
NGM-LITE	Medio para crecer gusanos
MAI-1/2	Proteína inhibidora mitocondrial de la ATPasa
NADH	Nicotinamida adenín dinucleótido (forma reducida)
ORF	Marco de lectura abierto
Oligo	Oligomicina
pb	Pares de bases
PBS	Amortiguador, de las siglas en inglés <i>Phosphate Buffered Saline</i>
Pi	Ortofosfato
PV	Plásmido vacío
RNA	Ácido ribonucleico
RPM	Revoluciones por minuto
SDS	Detergente dodecil sulfato de sodio
TBS	Amortiguador, de las siglas en inglés <i>Tris Buffered Saline</i>
Tris	Tris (Hidroximetil) aminobutano

RESUMEN

En el *Caenorhabditis elegans* se han encontrado dos proteínas similares a la proteína inhibidora de la ATPasa nombradas MAI-1 y MAI-2. Las proteínas MAI-1 y MAI-2 pueden inhibir a la F_0F_1 ATPasa de levadura pero la inhibición de MAI-1 es pH independiente. La fusión de la proteína MAI-2::GFP se predijo tiene una localización mitocondrial en levadura, mientras que MAI-1::GFP se localizó en el citoplasma de la levadura. Las propiedades de MAI-2 sugiere ser la proteína homóloga a la proteína inhibidora de la ATPasa (IF_1) ampliamente estudiada en bovino y en levadura, mientras que la proteína MAI-1 se expresa únicamente en el género *Caenorhabditis* y se desconoce su función en el nematodo.

Con base a estos antecedentes, en este trabajo se estudió la localización de las proteínas MAI-1 y MAI-2 en el *Caenorhabditis elegans* vivo, para esto se hicieron animales transgénicos a los cuales nombramos *mCherry::mai-1* y *mai-2::gfp* respectivamente. Se encontró que el transgen *mai-2::gfp* se expresó a lo largo de todos los tejidos del gusano, asociado a mitocondrias, además se observó su expresión en todos los estadios embrionarios y larvarios. El animal transgénico *mCherry::mai-1*, por el contrario se expresó en tejidos específicos como en neuronas de la cabeza y cola del nematodo, en intestino e hipodermis, su expresión comienza a partir del estadio de gastrula en el embrión y en todos los estadios larvarios.

Por otro lado, se estudió el fenotipo al silenciar a los genes *mai-1* y *mai-2* por RNAi, se decidió evaluar la eficiencia de la disminución de la expresión, encontramos que es posible silenciar a *mai-2* de manera eficiente mientras que de manera parcial a *mai-1*. Los animales *mai-1(RNAi)* y *mai-2(RNAi)* no tienen defectos en la fertilidad, el movimiento, crecimiento o en el desarrollo, sin embargo se observó un aumento discreto pero significativo en la apoptosis fisiológica de la línea germinal y como resultado preliminar en los animales *mai-2(RNAi)* se observó una disminución en las crestas mitocondriales.

INTRODUCCIÓN

La Mitocondria. Estructura y función.

La mitocondria (del griego “mitos” que significa hebra) es un organelo dinámico, que se ha descrito morfológicamente en todos los tejidos animales o vegetales. En 1960, se descubrió el DNA mitocondrial, lo que llevó a la postulación sobre el origen de la mitocondria por endosimbiosis. Esta teoría propone que una célula nucleada fagocitó a un organismo procarionte aerobio en su interior y como resultado ambos organismos se beneficiaron en términos de protección, energía y aporte de DNA (revisado en Martin y Mentel., 2010).

El estudio de la mitocondria se ha enfocado principalmente en las importantes funciones bioenergéticas que dentro de ella ocurren como: la fosforilación oxidativa, el ciclo de Krebs, la biosíntesis del grupos hemo, la β -oxidación de los ácidos grasos y el metabolismo de ciertos aminoácidos (Ernester y Schatz, 1981). Recientemente, el interés por el estudio de la mitocondria se ha extendido a otras áreas, tal es el caso de la biogénesis de los centros hierro-azufre (Fe-S) (Lill y Muhlenhoff., 2006), la importación de proteínas al interior de la mitocondria (Neupert y Herrmann., 2007) y al papel de la mitocondria en el control de la apoptosis (Jiang y Wang., 2004). Debido a su importancia en el metabolismo, la disfunción de las mitocondrias se ha relacionado a un gran número de enfermedades humanas, incluyendo neuropatías, miopatías y cáncer (Wallace, 2005). Además, la acumulación de mutaciones en el DNA mitocondrial resulta en el envejecimiento prematuro de ratones, sugiriendo que la disfunción mitocondrial no solo precede, sino que es un factor causal del envejecimiento en mamíferos (Trifunovic *et al.*, 2004).

La mitocondria es un organelo conformado por dos membranas: interna y externa. La membrana externa rodea completamente a la membrana interna generando un espacio intermembranal entre sí (Rasmussen, 1995). La membrana externa cuenta con diversas proteínas que forman canales no selectivos que permiten el paso de iones y proteínas pequeñas, mientras que la membrana interna tiene una permeabilidad restringida y específica, muy parecida a la membrana plasmática. La

membrana interna delimita a la matriz mitocondrial donde en el ciclo de Krebs se producen moléculas de alto potencial reductor tales como el NADH y FADH₂, moléculas que donan electrones a los complejos (I y II) respectivamente de la cadena respiratoria. Posteriormente los electrones se transfieren de los complejos I y II, a la poza de quinonas y de allí al complejo III, al IV y al aceptor final de electrones que es el O₂ el cual se reduce a H₂O. La transferencia de electrones que se da por los cuatro complejos multiproteicos crea un gradiente electroquímico que se acopla a la enzima ATP sintasa para la síntesis de ATP (Yoshida *et al.*, 2001).

Una característica importante de la membrana interna mitocondrial es que en ella pueden distinguirse dos regiones: una membrana interna fronteriza y otra que forma invaginaciones que ingresan a la matriz mitocondrial llamadas crestas mitocondriales (Figura 1A; Zick *et al.*, 2009). Las crestas se unen a la membrana interna fronteriza por medio de uniones y presentan una gran variabilidad de ultraestructuras de tipo lamelar y tubular, dependiendo del tejido en el que se localicen, el estado fisiológico y el desarrollo del organismo (Frey y Manella, 2000; Zick *et al.*, 2009). Se sabe que diversas enfermedades causadas por desórdenes mitocondriales, pueden mostrar defectos en la estructura y en el arreglo de las crestas (Figura 1D y E). Un ejemplo de ello es el síndrome de Barth, el cual es un desorden mitocondrial causado por mutaciones en el gen *tafazzin*, el cual codifica una proteína involucrada en la síntesis de fosfolípidos mitocondriales como la cardiolipina (Bione *et al.*, 1996). Las mitocondrias de los pacientes con el síndrome de Barth presentan mitocondrias gigantes con una disminución y desarreglo de la membrana interna mitocondrial, en particular se observan crestas concéntricas o en forma de panal de abeja (Acehan *et al.*, 2007). Se ha reportado que diversas enfermedades causan aberraciones en la ultraestructura de la mitocondria como el Alzheimer, la enfermedad de Parkinson y el síndrome de Wolf-Hirschhorn (Zick *et al.*, 2009).

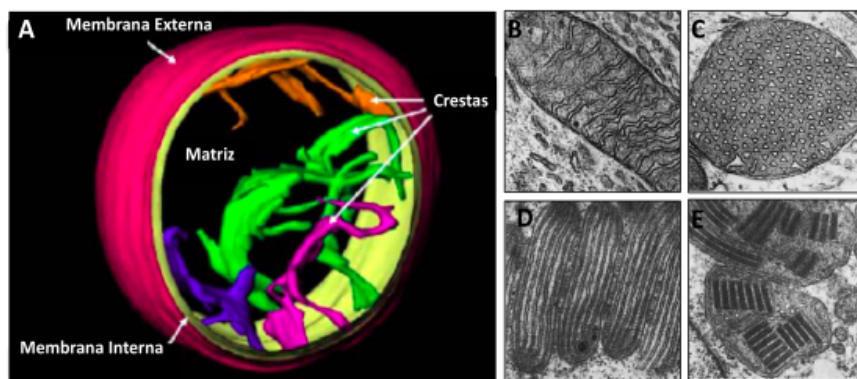


Figura 1. Diversidad en las ultraestructuras mitocondriales. (A) Modelo de las membranas mitocondriales por crio-tomografía. Diferentes tipos de crestas mitocondriales en condiciones no patológicas (B-C) y en condiciones patológicas en humanos (D-E). (B) Músculo cardíaco. (C) Astrocito. (D-E) Mitocondrias de pacientes con polimiositis crónica y con el fenómeno de Raynaud. Imágenes tomadas de Manella, 2006 (A) y Zick *et al.*, 2009 (B-E).

La ATP Sintasa.

El trifosfato de adenosina (ATP) es la principal molécula para almacenar y transferir energía en las células. El ATP es un nucleótido libre conformado por la base nitrogenada adenina, un azúcar ribosa y tres grupos fosfatos. Los grupos fosfatos se unen entre sí por medio de enlaces de alta energía llamados enlaces fosfoanhídridos. Cuando un enlace fosfoanhídrido se rompe por medio de una reacción de hidrólisis, la energía es liberada y el ATP se convierte a bifosfato de adenosina (ADP) y fosfato (Pi). A su vez, el ADP puede liberar energía cuando se remueve el segundo grupo fosfato para formar monofosfato de adenosina (AMP). La reacción de hidrólisis de los enlaces del ATP se acopla a reacciones que requieren energía o endergónicas (revisado en Lane, 2010).

La síntesis de ATP a partir de ADP y Pi, es la reacción más prevalente en el mundo de la biología. En los organismos de los dominios eukaria, arquea y bacteria, el ATP se sintetiza por dos clases de translocasas de iones: la ATP sintasa (F_0F_1) de tipo F en los dominios bacteria y eukaria y la ATP sintasa (A_0A_1) de tipo A en arquea. También existe una ATP sintasa en bacteria y eukaria, evolutivamente relacionada con las ATP sintasas de tipo F y A, localizadas en vacuolas y en membranas relacionadas con vías de secreción, estas ATP sintasas (V_0V_1) son de tipo V y generalmente son hidrolíticas (ATPasas).

Las ATP sintasas de tipo A, V y F son enzimas que actúan de manera reversible y consisten de un mosaico de proteínas arregladas en dos porciones estructurales y funcionales. La porción catalítica se denomina A_1 , V_1 y F_1 respectivamente y la porción membranal con función de translocador de iones se denomina A_o , V_o y F_o , respectivamente. Las tres clases de ATP sintasas, sintetizan o hidrolizan el ATP, por medio de un mecanismo mecánico rotatorio, acoplado a la generación o utilización del gradiente de los iones H^+ o Na^+ (revisado en García-Hernández E., Fernández-Velasco A., 2008)

Las ATP sintasas se encuentran embebidas en membranas celulares. En el caso del dominio bacteria y arquea, la enzima se localiza en la membrana plasmática y en el dominio eukaria se localizan en la membrana interna mitocondrial o en la membrana de los tilacoides en el cloroplastos (revisado en García-Hernández E., Fernández-Velasco A., 2008). Por otra parte, en endotelio (Burwick *et al.*, 2005, Cortes-Hernández *et al.*, 2005, Moser *et al.*, 1999), hepatocitos (Martínez *et al.*, 2003) y otros tipos celulares humanos, se ha detectado una ATP sintasa en la membrana plasmática que se ha propuesto tiene función de receptor a ligandos no relacionados con la síntesis de ATP.

Estructura y mecanismo catalítico de la F_oF_1 ATP sintasa.

La ATP sintasa mitocondrial es un complejo oligomérico de aproximadamente 750 kDa. Se compone de una porción F_o de naturaleza hidrofóbica, capaz de transportar protones o Na^+ , una porción F_1 de naturaleza hidrofílica que contiene seis sitios para acomodar nucleótidos (de los cuales tres son catalíticos) y un cuello lateral. En levadura, la porción hidrofílica F_1 está conformada por las subunidades: $\alpha_3\beta_3\delta\gamma\epsilon$, la porción hidrofóbica F_o está conformada por las subunidades: a, c_{10} , f, g, h, i y k, mientras que el estator lateral está compuesto de las subunidades b, OSCP, A6L y d (Figura 2; revisado en Yoshida *et al.*, 2001; revisado en García-Hernández E., Fernández Velasco A., 2008)

En condiciones fisiológicas, la cadena de transporte de electrones produce en el espacio intermembranal un potencial electroquímico de iones H^+ ($\Delta\mu H^+$), que son

transportados a la matriz mitocondrial por la porción F_0 causando la rotación del anillo de subunidades c , que a su vez hace rotar a las subunidades $\gamma\epsilon$ de la porción F_1 . La rotación de γ alterna la estructura de las subunidades β catalíticas para que el ATP se pueda sintetizar. En la reacción reversa, la hidrólisis de ATP en la porción F_1 induce la rotación de γ ocasionando la rotación de la porción F_0 en la dirección reversa, dando como resultado el bombeo de protones al espacio intermembranal (revisado en Yoshida *et al.*, 2001).

Durante un ciclo de hidrólisis de ATP, los tres sitios activos en la subunidad β , cambian secuencialmente de conformación: abierta (O), semicerrada (C') y cerrada (C). La conformación abierta puede aceptar la molécula de ATP y hacer enlaces químicos en el sitio activo ocasionando el cierre del sitio (C). El ATP se hidroliza, provocando un re-arreglo en los residuos del sitio activo formando el estado semicerrado. Finalmente, el $ADP+P_i$ se liberan del sitio catalítico dando lugar a la conformación abierta. En la hidrólisis o en la síntesis de ATP, el estado del nucleótido puede determinar la orientación de γ de manera secuencial y reversible (revisado en Yoshida *et al.*, 2001).

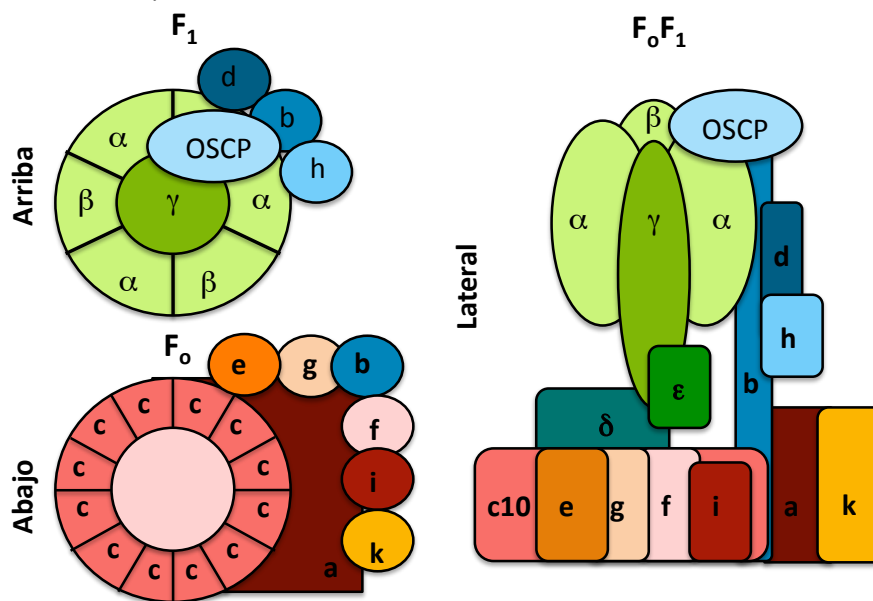


Figura 2. Representación esquemática de la F_0F_1 ATP sintasa de mitocondria. La ATP sintasa en tres diferentes perspectivas. La parte superior comprende a los componentes hidrofílicos y la parte inferior comprende a los componentes hidrofóbicos (Modificado de García-Hernández E., Fernández Velasco A., 2008)

La estructura de la subunidad F_0c se resolvió por resonancia magnética nuclear (Girvin *et al.*, 1998). La proteína “c” en su forma monomérica está formada de dos hélices transmembranales antiparalelas conectados por un asa hidrofílica y se oligomerizan formando un cilindro simétrico de 10-14 subunidades (Figura 2). En eucariontes, las subunidades e, g, f, i, k y A6L (en levadura esta última se denomina subunidad 8; Figura 2) son subunidades supernumerarias cuya función no es del todo clara, sin embargo las subunidades A6L, f, e, i se ha demostrado ayudan al ensamblado de la porción F_0 y por lo tanto son indispensables para la función del complejo enzimático (Vaillier *et al.*, 1999).

Las subunidades a y b (subunidades no rotatorias) se encuentran a un lado del oligómero F_0c (Figura 2). En la interfase de las subunidades a y c, durante la síntesis de ATP, se lleva a cabo el transporte de protones, que genera el torque (fuerza que hace rotar un objeto) y por lo tanto la rotación de γ . El aminoácido de la subunidad c que facilita el transporte de protones es el Asp61 (carga negativa); (numeración seguida de *Escherichia coli*) y está localizado en la mitad de la hélice del extremo C-terminal, rodeado de una cavidad formada por dos residuos de Gly localizados en la hélice del extremo N-terminal. La subunidad a contiene el residuo Arg210 (carga positiva) que posiciona a dos subunidades c en estado vacío. La subunidad a forma un hemicanal que da acceso a los protones al Asp61 de la subunidad c, posteriormente un protón del medio se introduce al hemicanal y ocupa una subunidad c, neutralizando la carga del Asp61, esto lleva a la rotación unidireccional del oligómero de c y permite la liberación del protón y su transporte hacia el otro lado de la membrana (Fillingame *et al.*, 2003).

La ATP sintasa mitocondrial cuenta con una subunidad adicional que se encarga de regular su actividad enzimática. En los mamíferos se le conoce como IF_1 y en la levadura como Inh1, en este último organismo, la proteína inhibidora se estabiliza con otras dos proteínas llamadas Stf1 y Stf2 (por las siglas en inglés de factores de estabilización) las cuales incrementan la acción inhibidora sobre la ATP sintasa (Ichikawa *et al.*, 1990).

Dimerización y oligomerización de las ATP sintasas y su efecto en la formación de crestas mitocondriales.

Además de su actividad enzimática, la F_0F_1 ATP sintasa desempeña un papel importante en la determinación de la estructura de las crestas mitocondriales (Allen, 1995; Zick *et al.*, 2008). La asociación de los dímeros de la F_0F_1 ATP sintasa en oligómeros de mayor complejidad se propuso como el mecanismo responsable de la tubulación de la membrana interna mitocondrial y por lo tanto de la formación de crestas. Por otro lado, un modelo matemático predice que la oligomerización de ATP sintasas forma listones de dímeros a lo largo de las crestas mitocondriales tubulares provocando que la membrana adquiera una curvatura que incrementa de manera localizada la concentración de protones, optimizando las condiciones catalíticas de síntesis (Strauss *et al.*, 2008).

Por microscopía electrónica se han observado que las estructuras diméricas de las ATP sintasas de la alga unicelular *Polytomella* (Dudkina *et al.*, 2005), corazón de bovino (Minauro-Sanmiguel *et al.*, 2005) y de levadura (Dudkina *et al.*, 2006) forman ángulos entre los monómeros que mantienen las porciones F_1 separadas, sugiriendo que la dimerización se debe a las subunidades localizadas en la porción F_0 , especialmente a las subunidades e, g (Figura 3A; Arnold *et al.*, 1998) y a (Wittig *et al.*, 2008;).

Por otro lado, existen dos mecanismos para explicar como los dímeros se ensamblan en estructuras oligoméricas: (1) unión de los dominios membranales vía subunidades e y g (Figura 3B); (2) por medio de la proteína inhibidora de la ATPasa (IF_1) de mitocondria (Figura 3B; revisado en Wittig y Schägger, 2009).

En las levaduras que carecen de las subunidades e, g o b, se han observado defectos en la estructura de las crestas mitocondriales, en estas mutantes las crestas forman anillos concéntricos similares a los aros de una cebolla (Paumard *et al.*, 2002; Soubannier *et al.*, 2002). Celotto *et al.*, (2006) revelaron en *Drosophila* que mutantes del gen ATP6, que codifica para la subunidad a de la porción F_0 , tienen defectos en la ultraestructura de la membrana interna, dando lugar a un alto porcentaje de

mitocondrias aberrantes con apariencia de panal de abeja. Mutaciones puntuales en el gen ATP6, se han relacionado con encefalomielopatías como la enfermedad de NARP (neuropatía, ataxia y retinitis pigmentosa) o MLS (síndrome de Leigh por herencia materna; Schon *et al.*, 2001).

Se ha observado que la IF_1 como dímero inhibe la hidrólisis de ATP (Cabezón *et al.*, 2000a) y a su vez promueve la dimerización de las porciones F_1 (Cabezón *et al.*, 2000b). Algunos trabajos que sustentan lo observado por Cabezón *et al.* (2000b) se observaron en hígado de rata, donde la proteína IF_1 promueve la dimerización de ATP sintasas (García *et al.*, 2006) y en células HeLa donde se observó que la densidad de crestas mitocondriales incrementa con la sobre-expresión de IF_1 , al igual que la cantidad de dímero. En este mismo trabajo, al disminuir la expresión de IF_1 de manera temporal por medio de siRNA, se observó una disminución dramática de crestas mitocondriales (Campanella *et al.*, 2008). En contraste con los resultados del grupo de Campanella, Fujikawa *et al.* (2012) no observaron diferencias en la ultraestructura de las crestas mitocondriales en células HeLa al disminuir de manera permanente la expresión de IF_1 por medio de siRNA (transducción retroviral). Esta posible diferencia entre datos podría deberse a los métodos utilizados para disminuir la expresión del mensajero de IF_1 .

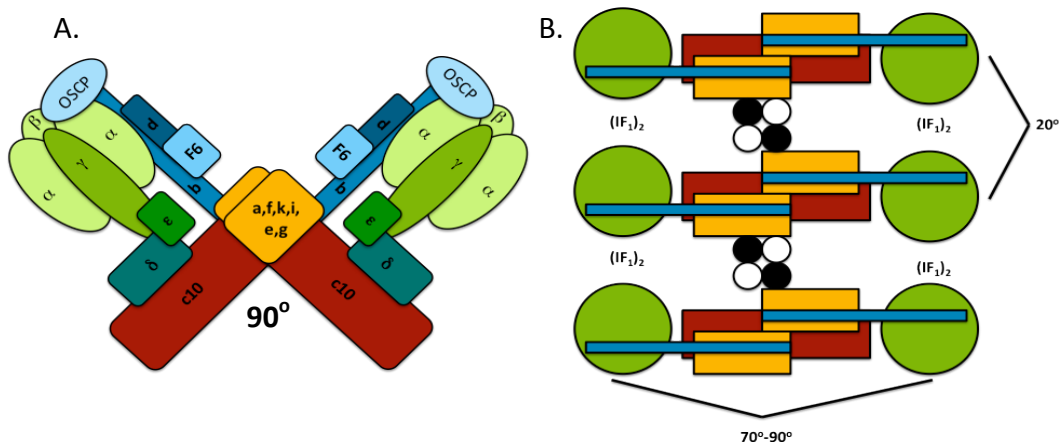


Figura 3. Modelo de la oligomerización de la ATP sintasa. (A) Modelo de la ATP sintasa dimérica. Este modelo se basa en la dimerización de los monómeros de la ATP sintasa vía subunidades de la F_0 (B) Modelo de los dímeros de ATP sintasa formando una estructura oligomérica. La vista es desde la matriz hacia la membrana interna mitocondrial. Se muestran los roles de las subunidades e, g (círculos en blanco y negro) y la proteína inhibidora dimérica $(IF_1)_2$ en la oligomerización de los dímeros de ATP

sintasa. Los ángulos grandes (70–90°) ocurre entre los monómeros de ATP sintasas y se nombran dímero verdaderos, mientras que los ángulos pequeños (20°) caracterizan la interfase entre dímeros vecinos y se conocen como pseudodímeros. Modificado de Wittig y Schägger, 2009.

La proteína inhibidora de la ATPasa: IF₁.

Las enzimas que transducen energía están sujetas a mecanismos regulatorios. Algunas de las subunidades que conforman a la ATP sintasa ayudan a su regulación catalítica. En bacterias y cloroplastos la regulación se da por la subunidad ϵ mientras que en mitocondrias se da por la proteína inhibidora de la ATPasa (IF₁). Se han encontrado y aislado homólogas de esta proteína a partir de mitocondrias de: corazón de bovino (Pullman y Monroy, 1963), rata (Cintrón y Pedersen, 1979), humano (Ichikawa y Ogura, 2003), levadura (Matsubara *et al.*, 1981) y *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*; Ichikawa *et al.*, 2006), este último organismo cuenta con dos proteínas similares a la IF₁ nombradas MAI-1 y MAI-2 (Spieth *et al.*, 1993).

Para preservar el ATP, la IF₁ regula su hidrólisis, reacción que se efectúa en la porción F₁ de la ATPasa expuesta hacia la matriz de la membrana interna mitocondrial. Cuando el potencial de membrana es bajo, la IF₁ se une a la porción F₁ e inhibe la hidrólisis del ATP, sin afectar la síntesis de ATP en la fosforilación oxidativa, mientras que cuando el potencial de membrana es alto, se libera del sitio inhibitorio y la síntesis de ATP puede ocurrir en presencia de ADP+P_i (revisado en Campanella *et al.*, 2009b).

La IF₁ es una proteína de 84 aminoácidos, es capaz de percibir cambios en el pH gracias a cinco histidinas de las cuales tres están en la interfase del dímero. La región inhibidora se encuentra en el extremo N-terminal de la proteína mientras que en el extremo C-terminal puede interaccionar con otra proteína IF₁ formando la estructura antiparalela que puede unir a dos porciones F₁ y dimerizarla (Campanella *et al.*, 2001). Su estructura cristalográfica muestra que una gran porción de la cadena polipeptídica tiene una estructura secundaria de α -hélice y es activa como dímero a pH de 6.7, mientras que en condiciones básicas (pH 8.0), forma un tetrámero, estado oligomérico incapaz de unirse a la F₀F₁ ATPasa (Cabezón *et al.*, 2000a).

El grupo de Campanella (2008) exploró la consecuencia de la manipulación de los niveles de la proteína IF₁ en el consumo de ATP y el potencial electroquímico de

membrana ($\Delta\psi_m$), el $\Delta\psi_m$ de células HeLa con una sobre-expresión de IF_1 se colapsa rápidamente cuando la cadena respiratoria se inhibe en condiciones de hipoxia/isquemia (disminución de la concentración de oxígeno, aceptor final de electrones de la cadena respiratoria), mientras que la concentración de ATP se preserva por más tiempo hasta que otros consumidores de ATP lo degradan. Por otro lado, en células donde la expresión de IF_1 está disminuida, el $\Delta\psi_m$ se mantiene en un estado de equilibrio por un largo periodo de tiempo, esto ocurre a expensas del ATP, el cual se degrada rápidamente. Una vez que el ATP se agota, la $\Delta\psi_m$ se colapsa debido a que no hay sustrato para que la ATP sintasa mantenga el $\Delta\psi_m$ (Figura 4; Campanella *et al.*, 2008).

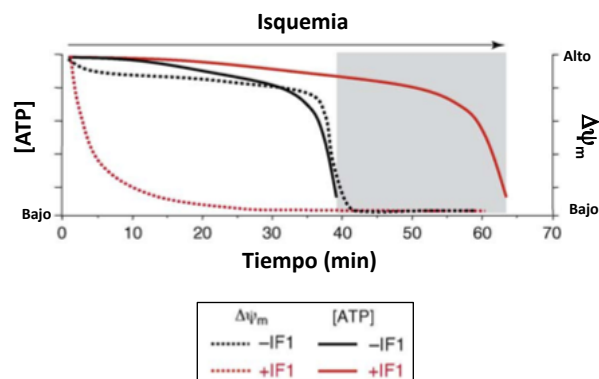


Figura 4. Impacto de la IF_1 en el consumo de ATP y $\Delta\psi_m$. La proteína IF_1 inhibe el consumo de ATP y promueve el colapso del $\Delta\psi_m$. Ver detalles en el texto de arriba. Imagen tomada de Campanella *et al.*, 2009b.

En condiciones similares al daño por isquemia, se ha encontrado que la proteína IF_1 , protege a las células de la muerte celular. Campanella *et al.*, (2008) expusieron células HeLa y C2C12 a condiciones anóxicas y deprivadas de glucosa. Con la ayuda del yoduro de propidio se cuantificó la muerte celular. Aquellas células con sobre-expresión de IF_1 , tuvieron una disminución en la muerte celular comparado con células control, mientras que células que tienen una disminución en la expresión de IF_1 mostraron un aumento en la muerte celular.

Posteriormente, el mismo grupo (Campanella *et al.*, 2009) encontraron que la supresión de IF_1 favorece la producción de ROS (especies reactivas de oxígeno) como consecuencia de las condiciones reductoras que existen en la célula y el incremento en

el $\Delta\psi_m$, condiciones que llevan a la célula a un estado bioenergéticamente menos competente. El incremento en ROS induce la autofagia mitocondrial, que lleva a la disminución del volumen mitocondrial. Estos datos sugieren que las mitocondrias que carecen de IF₁ funcionan incorrectamente ocasionando un incremento en los niveles de ROS y haciéndolas así blanco de autofagia y afectando finalmente el volumen mitocondrial.

Como resumen, la IF₁ es una proteína que mantiene los niveles de ATP, disminuye la muerte celular, que promueve la dimerización de ATP sintasas, interviene en la formación de crestas mitocondriales y que funciona como una proteína de control de calidad mitocondrial.

Las proteínas MAI-1 y MAI-2 son similares a la IF₁ en *C. elegans*.

En el nematodo *C. elegans* se encontraron dos proteínas que son similares a la proteína inhibidora de la ATPasa mitocondrial, denominadas MAI-1 y MAI-2 (Ichikawa *et al.*, 2006). El gen que codifica para la proteína inhibidora de ATPasa mitocondrial 1 (*mai-1*), se localiza en el cromosoma X, junto con los genes gliceraldehído 2 fosfato deshidrogenasa (*gpd-2*) y gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (*gpd-3*), los cuales constituyen una unidad transcripcional policistrónica (Figura 5; Spieth *et al.*, 1993; Blumenthal y Gleason., 2003). La transcripción de estos genes es regulada por un promotor común y únicamente los genes *gpd-2* y *gpd-3* se procesan por trans-splicing (procesamiento del mRNA, en el cual una secuencia líder separa los mRNAs de un operón; Spieth *et al.*, 1993). Los operones que se transcriben por esta maquinaria tienen un sitio de trans-splicing en una región intergénica en el extremo 5' del gen (Figura 5). Las proteínas GPD-2 y GPD-3 son enzimas que además de su función glicolítica son necesarias para la sobrevivencia del *C. elegans* en condiciones de anoxia y altas temperaturas, sin embargo se desconoce el mecanismo por el cual ayudan al incremento de la sobrevivencia en estas condiciones. Por otro lado, el gen *mai-2* se localiza en el cromosoma IV y no se localiza en un operón.

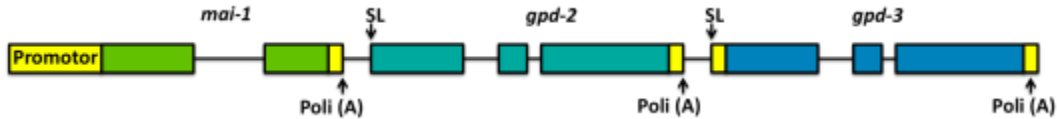


Figura 5. El operón del gen *mai-1*. El operón de *mai-1*, está formado por los genes *mai-1*, *gpd-2* y *gpd-3*. Las cajas representan a los exones y las líneas representan intrones y regiones intercistrónicas. Todos los genes se transcriben por un promotor común, dando lugar a un mRNA policistrónico que se convierte en un mRNA monocistrónico. Este proceso ocurre por el corte y la poliadenilación del 3' acompañado del proceso de trans-splicing en la region 5' de cada gen (SL indica la secuencia de transplicing). El gen *mai-1* es el único de los genes en el operón que no se procesan por trans splicing (Modificado de Blumenthal y Gleason, 2003).

La proteínas MAI-1 y MAI-2 pueden inhibir a la F_0F_1 ATPasa de levadura a pH de 6.7 debido a que la secuencia mínima inhibidora de MAI-1 y MAI-2 es parecida a la IF_1 de levadura (Figura 6; Ichikawa *et al.*, 2006). Sin embargo, existen diferencias entre la inhibición producida por MAI-1 y MAI-2. En particular MAI-1 no presenta el Glu21 y las histidinas de la interfase se encuentran ausentes produciendo una inihición pH independiente (Ichikawa *et al.*, 2006).

Otra característica importante sobre la secuencia de aminoácidos de MAI-1 es que no cuenta con una secuencia de importación mitocondrial a comparación de MAI-2 que sí cuenta con ella.

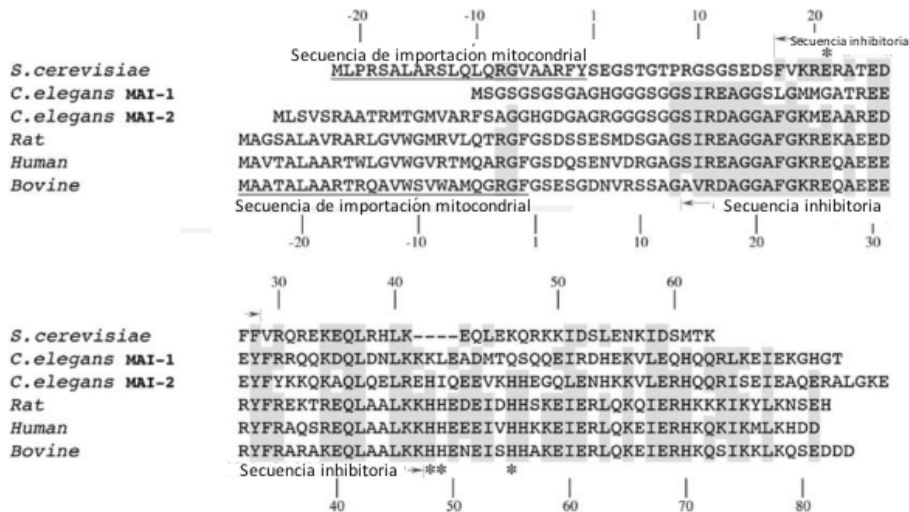


Figura 6. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las proteínas IF_1 y sus homólogos encontrados en *C. elegans*. La secuencia de aminoácidos de las proteínas IF_1 de *C. elegans* (MAI-1 y MAI-2) se compara con la secuencia de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*), rata, humano y bovino. En gris se señalan los aminoácidos idénticos y sustituciones conservados, la secuencia de importación mitocondrial se encuentra subrayada, los asteriscos señalan los aminoácidos detectores de pH y se señala la secuencia para ejercer la inhibición de la ATPasa. Tomado de Ichikawa *et al.*, 2006.

La estructura secundaria de MAI-1 y MAI-2 se estudió por medio de dicroísmo circular y se encontró que están formadas principalmente por hojas β , es similar a la de levadura (Ichikawa *et al.*, 2006; Ichikawa y Ogura, 2003) y distinta a la estructura secundaria de la IF₁ de bovino, formada principalmente de α -hélices, estructura necesaria en la inhibición de la actividad de la F₀F₁ ATPasa (Cabezón *et al.*, 2003). Ichikawa sugiere que la IF₁ cambia a una α -hélice cuando hace contacto con la porción F₁ de la ATPasa dando lugar a la inhibición.

Por medio de fusiones con la proteína GFP, se estudió la localización de MAI-1 y MAI-2 en levadura (Ichikawa *et al.*, 2006). Se encontró que MAI-2::GFP se localiza en mitocondrias, mientras que MAI-1::GFP se localiza en el citosol. Las propiedades de MAI-2, localización mitocondrial e inhibición pH dependiente, son las mismas que presentan la IF₁ de mamíferos y levadura, sugiriendo que MAI-2 es la proteína homóloga a la IF₁ de *C. elegans*. Mientras que las propiedades de MAI-1, inhibición pH independiente y localización citoplásmica, la hacen distinta a la IF₁. Ichikawa *et al.*, (2006) sugieren que la proteína MAI-1 puede estar regulando a la F₀F₁ ATP sintasa localizada en membrana plasmática en conjunto con la proteína calmodulina (CaM), la proteína MAI-1 conserva una región de unión a CaM (Tyr32-Leu42) al igual que las proteínas IF₁ (Contessi *et al.*, 2005), sin embargo la expresión de esta proteína es única del género *Caenorhabditis* y su función es desconocida.

ORGANISMO MODELO

El *C. elegans* es un nematodo de vida libre, que habita en muchas partes del mundo y se alimenta de microorganismos, principalmente de bacterias. Es un buen modelo de estudio en múltiples campos como la biología celular y del desarrollo, la genética, la neurobiología y el envejecimiento. Algunas ventajas que presenta el organismo son: ciclo de vida corto, genoma completamente secuenciado, propagación sencilla y tamaño pequeño (1 mm de largo en estado adulto). El animal puede mantenerse en el laboratorio en placas de agar o medio líquido, cultivados con bacteria *Escherichia coli* (*E. coli*) como fuente de alimento. Su ciclo de vida tiene una duración de tres días en condiciones ideales y también puede sobrevivir en condiciones no favorables, cambiando a un estado de diapausa conocido como la larva Dauer, estadio que le permite sobrevivir de 4 a 8 veces más de lo normal (Cassada y Russell, 1975). Debido a que el animal es transparente, sus células pueden visualizarse con facilidad por medio de microscopía diferencial de interfase. La descripción anatómica del animal entero se ha completado por microscopía electrónica y su linaje celular, el cual es constante entre individuos ha sido descrito con detalle (Brenner, 1973; Byerly *et al.*, 1976; Sulston *et al.*, 1983; Wood, 1988; Lewis y Fleming, 1995).

El *C. elegans* presenta dos tipos de sexos: una hermafrodita que se autofertiliza con los cromosomas sexuales XX y un macho con cromosoma sexual (X0). Los machos surgen en baja frecuencia en condiciones naturales (0.1%), pero con mayor frecuencia (50%) a través de cruzas entre un nematodo hermafrodita y un macho. La autofertilización de las hermafroditas permite a los gusanos homócigos generar progenie idéntica y las cruzas con machos facilitan aislar y mantener mutantes, así como eliminar mutaciones del genoma.

Una ventaja adicional de este modelo es que existe un gran número de mutantes accesibles para la investigación. Además, las mutantes pueden generarse por métodos químicos, exposición a radiación ionizante o por el método de MOS DEL (técnica que consiste en generar una ruptura de la doble cadena del DNA por medio de la movilización de un transposon *Mos1* adyacente a la región que se desea deletar; la

ruptura se repara utilizando como templado el DNA inyectado que cuenta con un marcador de selección, Frokjaer-Jensen *et al.*, 2010).

Embriogénesis y desarrollo larvario de *C. elegans*.

Para que un embrión recién fertilizado complete la embriogénesis y eclosione una larva del huevo deben transcurrir aproximadamente 14 horas a una temperatura de 20°C (Figura 7A). Durante el proceso de fertilización, un ovocito maduro pasa a través de la espermateca (tubo que contiene espermatozoides) y es fertilizado, ya sea por el espermarmatozoide del hermafrodita o por los espermatozoides de un macho. Después de 30 minutos post-fertilización, el cigoto desarrolla una membrana vitelina y otras dos de quitina y colágena haciéndolo impermeable y permitiendo el desarrollo afuera del útero.

La embriogénesis se puede dividir en dos fases: (1) proliferación celular y (2) organogénesis/morfogénesis (Figura 7B; Sulston *et al.*, 1983). La etapa de proliferación (0-350 minutos) se divide en dos fases: la primera fase (0-150 minutos) abarca la formación del cigoto hasta la generaciónn de seis células fundadoras (AB, E, MS, C, D y P₄), estas células tienen distintas propiedades, definidas por su tasa de división y la naturaleza de su progenie, mientras que en la segunda etapa (150-350 minutos) ocurren divisiones celulares seguidas de la gastrulación y concluye con el comienzo de la organogénesis (Burcher y Seydoux, 1994). La gastrulación comienza en el estadio de 28 células, en esta etapa las células hijas de E migran al interior del embrión, seguidas de la célula P₄ y algunas células descendientes de MS, C, D y AB.

Al término de la etapa de proliferación, el embrión es un esferoide de 671 células, organizado en tres capas germinales: el ectodermo, que da lugar a la hipodermis y neuronas; el mesodermo, que genera la faringe y la pared muscular; y el endodermo que da lugar a la línea germinal e intestino. Durante la organogénesis/morfogénesis (6 hrs a 14 hrs) ocurre la diferenciación de las células sin que ocurran divisiones adicionales, el embrión se elonga y toma la forma de un animal con tejidos y órganos diferenciados. La morfogénesis comienza con el estadio de frijol, las primeras contracciones musculares ocurren en el minuto 430 y el dimorfismo

sexual se observa en el minuto 510 cuando las neuronas CEMs mueren en el animal hermafrodita y cuando las neuronas HSNs, que son específicas de hermafroditas, mueren en el macho. Posteriormente, la larva puede moverse dentro del huevo, sugiriendo un desarrollo avanzado en la motricidad, el bombeo de la faringe inicia en el minuto 760 y finalmente la larva eclosiona en el minuto 800 (von Ehrenstein y Schierenberg, 1980; Sulston *et al.*, 1983; Bird y Bird, 1991).

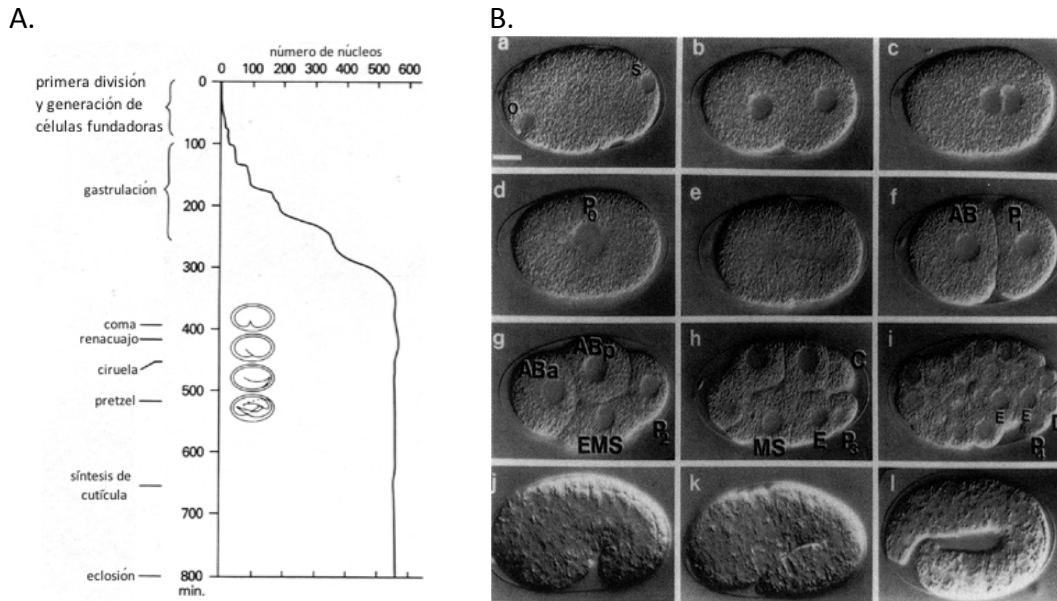


Figura 7. Embriogénesis de *C. elegans*. A. Se muestra en el eje de la ordenada el tiempo de los eventos importantes de la embriogénesis y la elongación del embrión (estadio de coma, renacuajo, ciruela y pretzel) y en las abscisas se muestra la gráfica del número de núcleos. La fertilización ocurre en el minuto -50. Tomado de Sulston *et al.* (1983). B. (a) Embrión recién fertilizado con los pronúcleos del ovocito (o) y el del espermatozoide (s); (b) migración del pronúcleo y formación de la pseudo-división; (c) unión de los pronúcleos; (d) rotación del uso mitótico en el eje anterior-posterior; (e) primera división mitótica; (f) embrión de dos células; (g) embrión de cuatro células; (h) embrión de ocho células; (i) embrión iniciando la gastrulación; (j) embrión en estadio de comma; (k) embrión en estadio de renacuajo y (l) embrión en estadio de pretzel.

El desarrollo post-embionario comienza en cuanto la larva comienza alimentarse, si la larva no se alimenta su crecimiento se arresta (6-10 días) y muere. En presencia de comida, el 10% de las células continúan dividiéndose dando lugar a células de la hipodermis, sistema nervioso y muscular. Las células germinales comienzan a dividirse 7 horas después de que la larva eclosionó y continúan proliferando hasta la etapa de adulto. El animal en condiciones normales pasa por cuatro estadios larvarios (L1, L2, L3 y L4) hasta llegar al estadio adulto (Figura 8), cada

uno de los cuatro estadios larvares se definen por la muda de cutícula, durante el cambio de cutícula la larva detiene el bombeo de la faringe y entra a un estado de letargo.

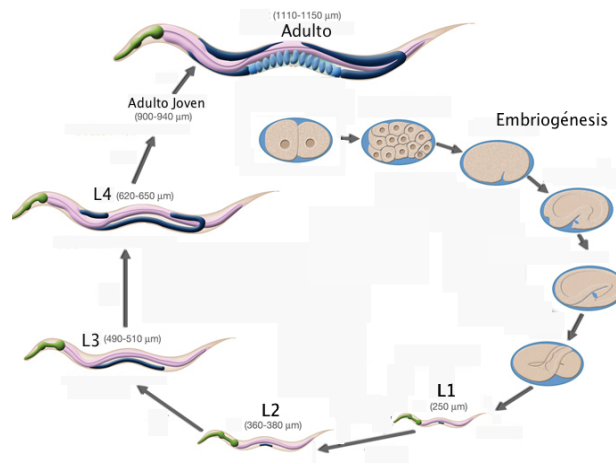


Figura 8. Ciclo de vida del *C. elegans*. El desarrollo comienza con la fase de la embriogénesis que comienza con la la formación del embrión de dos células y termina con la eclosión de la larva L1. Después de cuatro fases larvares (L1-L4) se alcanza la diferenciación completa en el organismo adulto. En verde se muestra la faringe, en rosa el intestino y en azul la gónada en desarrollo. Tomado de WORMATLAS, Altun *et al.*, 2010-2012.

El sistema reproductor del *Caenorhanditis elegans*.

El sistema reproductivo del nematodo produce gametos, así como la estructura y ambiente para que ocurra la fertilización y se depositen los embriones. Se puede dividir en dos secciones: (1) la gónada somática y el aparato para depositar embriones y (2) la línea germinal (Figura 9). La gónada somática y la línea germinal forman dos brazos en forma de U unidos a un útero.

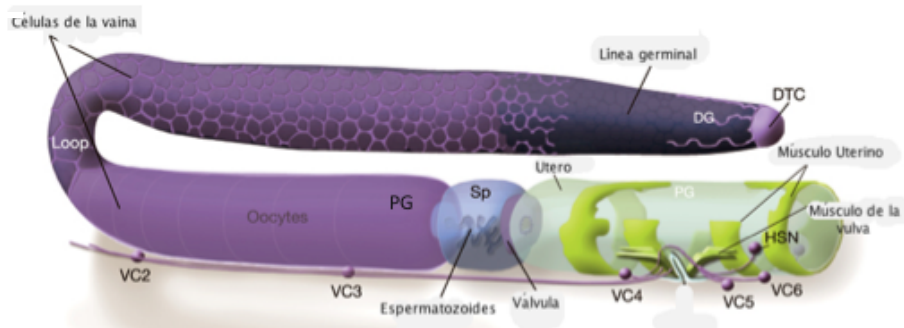


Figura 9. El sistema reproductivo del adulto hermafrodita. Un brazo de la gónada del nematodo separado del resto de las partes del cuerpo, formada de una célula somática distal (DTC), una gónada distal (DG) y la gónada proximal (PG), seguida de la espermateca (Sp) y el útero. Se muestra neuronas motoras VC2-6 y HSNL/R encargadas controlar la expulsión de los embriones por la vulva. Tomado de WORMATLAS, Altun *et al.*, 2010-2012.

El animal hermafrodita produce aproximadamente 300 embriones por autofertilización. La fertilización también se puede lograr por la introducción del espermatozoide de los machos a la vulva del hermafrodita, a través del proceso de copulación. En la gónada proximal, los ovocitos maduran y se ovulan de forma lineal hacia la espermateca donde son fertilizados. Los embriones fertilizados se dirigen al útero y salen a través de la vulva.

La gónada somática se refiere a la gónada que no comprende a la línea germinal, comprende cinco tejidos, cada uno con una función específica y características anatómicas particulares: (1) la célula distal (DTC); (2) las células de la vaina; (3) la espermateca; (4) la válvula espermateca-útero y (5) el útero. Todas las células de la gónada somática se derivan de las células fundadoras Z1 y Z4 presentes en la gónada primordial de la larva L1.

Las células de la línea germinal descienden de las células Z2 y Z3 (Schedl., 1997). En el estadio de L4, aproximadamente 37 células mitóticas proximales (por brazo de gónada) se diferencian para formar espermatozoides y posteriormente las células de la línea germinal se diferencian exclusivamente a ovocitos durante la etapa de adulto. Las células de la línea germinal distal se encuentran en un sincisio, conectadas unas a otras por medio de un canal central llamado raquis. La línea germinal exhibe una polaridad distal-proximal (Figura 9); con las células mitóticas en la gónada distal y células meióticas en el resto de la gónada.

En la gónada proximal los ovocitos se arrestan en la profase I de la meiosis y comienzan su maduración, señales del ovocito maduro y la proteína MSP, de las siglas en inglés *major sperm protein*, proveniente de los espermatozoides, promueve la contracción de las células de la vaina (Miller *et al.*, 1998) y la dilatación de la espermateca, la cual que se mueve hacia el ovocito por la contracción de las células de la vaina, lo introduce y se cierra. El ovocito es fertilizado, la meiosis se completa, hay un re-arreglo del citoplasma y comienza la secreción de la envoltura del embrión.

Apoptosis de la línea germinal del *C. elegans*.

La apoptosis fisiológica de la línea germinal es frecuente en condiciones

normales (ausencia de estrés) y ocurre durante la producción de ovocitos durante el estadio de adulto del hermafrodita. La apoptosis fisiológica elimina a la mitad de las células germinales que se generan y se cree es necesaria para proveer componentes citoplásmicos a las células que darán lugar a los ovocitos (Hengartner, 1997). El paso de componentes citoplásmicos como RNA mensajeros y proteínas, a través de puentes celulares que conectan a diversas células garantiza el desarrollo adecuado de la línea germinal. Cuando una célula germinal muere se celulariza formando un núcleo con poco citoplasma, la célula forma un cuerpo apoptótico, que evita la difusión de los factores pro-apoptóticos al resto de las células germinales sinciciales y finalmente es fagocitado por las células de la vaina (Gartner *et al.*, 2005). Mutantes en la caspasa CED-3 presentan ovocitos pequeños y un menor número de progenie bajo ciertas condiciones (Gumienny *et al.*, 1999).

La mayoría de las mutaciones que afecta el desarrollo de la muerte por apoptosis que ocurre en el soma también afecta a la línea germinal. La expresión de los genes *ced-3* y *ced-4* son requeridos para que las células germinales mueran, mientras que *ced-9* es requerido para proteger de la muerte a las células germinales. También, en el caso que exista una mutación en las células fagocíticas, ocurre una acumulación de cuerpos apoptóticos entre la línea germinal sincicial y las células de la vaina.

OBJETIVOS

1) Determinar la localización de las proteínas MAI-1 y MAI-2 de *C. elegans in vivo* por medio de fusiones con proteínas reporteras (transgenes).

- a. Generar animales transgénicos que expresan las fusiones: [*Pmai-1::mCherry::mai-1-3'UTR; Cbr-unc-119(+)*] y [*Pmai-2::mai-2::GFP::mai-2-3'UTR; Cbr-unc-119(+)*].
- b. Identificar el patrón de expresión de las proteínas MAI-1 y MAI-2 unidas a las proteínas reporteras a lo largo del desarrollo embrionario y larvario.
- c. Identificar en que órganos o tejidos se expresan las proteínas MAI-1 y MAI-2 unidas a las proteínas reporteras.

2) Estudiar los efectos de la falta de expresión de los genes *mai-1* y *mai-2*, utilizando RNA de interferencia.

- a. Evaluar la eficiencia del silenciamiento de los genes *mai-1* y *mai-2*.
- b. Determinar el efecto del silenciamiento de los genes *mai-1* y *mai-2* en la fertilidad del *C. elegans*.
- c. Determinar el efecto del silenciamiento de los genes *mai-1* y *mai-2* en la apoptosis de las células germinales del nematodo.
- d. Evaluar el efecto de silenciar el gen *mai-2* en la morfología mitocondrial.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas de *C. elegans*. Las cepas de los nematodos que se utilizaron en este trabajo se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Cepas. Se muestra el nombre de la cepa, su genotipo o nombre del transgen y la temperatura a la cual se crecieron.

Cepa	Genotipo de la cepa	Temperatura
N2	Silvestre	20°C
<i>mCherry::mai-1</i>	[<i>Pmai-1::mCherry::mai-1-3'UTR</i> ; <i>Cbr-unc-119(+)</i>]	24°C
<i>mai-2::gfp</i>	[<i>Pmai-2::mai-2::gfp::mai-2-3'UTR</i> ; <i>Cbr-unc-119(+)</i>]	24°C
xmSi01	[<i>Pmex-5::tom-20::mcherry-tbb 3'UTR</i> ; <i>Cbr-unc-119(+)</i>]	24°C
<i>ced-1::gfp</i>	<i>P_{lin-7}::ced-1::gfp</i>	24°C
<i>unc-119(ed3)</i>	<i>unc-119 (-)</i>	24°C

Mantenimiento de nematodos. Las diferentes cepas se crecieron en cajas de medio NGM-LITE sólido, que contiene: 2 g de NaCl, 4 g de bacto triptona, 3 g fosfato de potasio monobásico (KH₂PO₄), 0.5 g fosfato de potasio dibásico (K₂HPO₄) y 0.008 g de colesterol, al medio se agregaron 20 g de agar por litro de medio y se esterilizó por autoclave. El medio fue vertido en cajas Petri desechables estériles y se dejaron secar a temperatura ambiente durante toda la noche. Posteriormente, se agregó 200 µL de un cultivo fresco de bacteria *E. coli* OP50-1 en el centro de la placa de medio NGM-LITE. Las cajas con medio NGM-LITE y bacteria *E. coli* OP50-1, se incubaron a temperatura ambiente durante toda la noche, con el objetivo de formar un tapete uniforme sobre la placa de medio NGM-LITE. Las cajas se almacenaron a 4°C indefinidamente.

Para crecer las bacterias *E. coli* OP50-1, se utilizó el medio estéril Luria Bertani (LB) que contiene: 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura y 5 g de NaCl a 1 litro de agua destilada y además se añadió el antibiótico estreptomina a una concentración final de 50 µg/mL. Una colonia de bacteria OP50-1 se agregó al medio LB y se dejó crecer a 37°C durante toda la noche en agitación constante (250 rpm).

Construcción de los transgenes *mai-2::gfp* y *mCherry::mai-1* por medio de la Tecnología Gateway®. El transgen se construyó con la tecnología Multiste Gateway® Three Fragment Vector Construction Kit (Invitrogen), esta técnica facilita la construcción de un plásmido de expresión que contiene tres módulos genéticos, e.j. (1) elemento 5', (2) gen de interés y (3) elemento 3', gracias a que utiliza el sistema de recombinación sitio específico (*att*) del bacteriófago lambda que facilita la integración de su genoma en el cromosoma de *E. coli*.

La recombinación basada en el fago lambda involucra dos componentes principales: las secuencias de recombinación de DNA (sitios *att*) y las proteínas que median la reacción de recombinación catalizadas por una mezcla de enzimas que se unen a los sitios *att*; las enzimas se encargan de juntar, cortar y unir covalentemente el DNA. Las proteínas de recombinación difieren dependiendo si lambda utiliza la vía lisogénica o lítica. La vía lisogénica es catalizada por la integrasa (Int) del bacteriófago lambda y por el factor hospedero de integración (IHF) de *E. coli* (BP Clonasa II™), mientras que la vía lítica es catalizada por las proteínas Int y una excisionasa (Xis) del bacteriófago lambda además de IHF de *E. coli* (LR Clonasa II™).

Los sitios *attB*, *attP*, *attL* y *attR* son los sitios de recombinación que se utilizan en la Tecnología Gateway®. Los sitios *attB* siempre recombinan con los sitios *attP* en una reacción mediada por el mix de enzimas BP Clonasa II™ ($attB \times attP \rightarrow attL \times attR$). La reacción BP es la base para obtener los vectores de entrada formados por la reacción entre los plásmidos donadores (pDONR™) y los productos de PCR. Por otro lado, *attL* siempre recombina con los sitios *attR* en una reacción mediada por la mezcla de enzimas LR Clonasa II™ ($attL \times attR \rightarrow attB \times attP$). La reacción LR es la base para clonar los vectores de entrada en un plásmido destino (Figura 10).

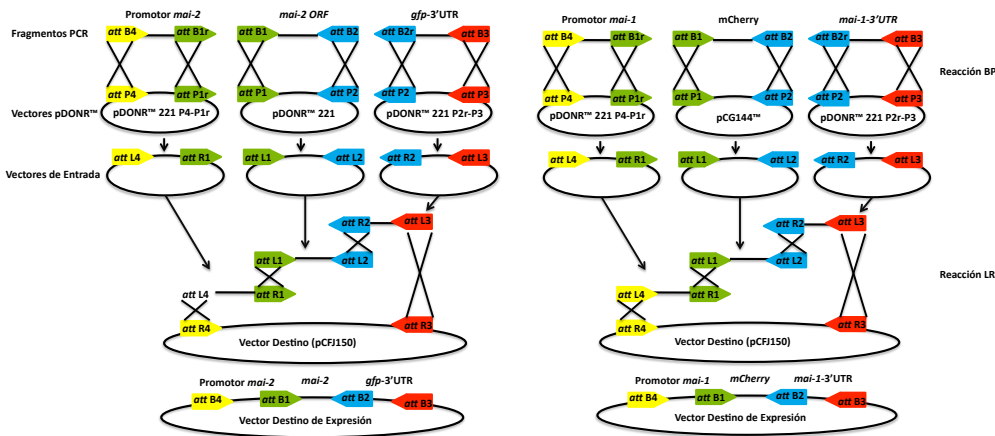


Figura 10. Representación de la técnica de Multistep Gateway® Three Fragment Vector Construction Kit que se utilizó para elaborar los transgen *mai-2::gfp* (derecha) y *mCherry::mai-1* (izquierda). El sentido de la flecha representa la dirección de la secuencia *att* y las cruces representan la recombinación homóloga entre los sitios *att*.

Las características del transgen *mai-2::gfp* son: (1) el gen *mai-2* se encuentra regulado bajo su propio promotor; (2) el gen *gfp* se fusionó en el extremo 3' de *mai-2*, ya que al traducirse esta proteína cuenta con una secuencia de importación mitocondrial en el extremo N-terminal; (3) el gen *mai-2* conserva sus intrones, donde pueden encontrarse secuencias reguladoras y (4) se fusionó el extremo 3' UTR al extremo 3' de la *gfp*. El extremo 3' UTR es importante en la regulación de la traducción del mensajero.

Debido a que *mai-2* tiene una secuencia de importación mitocondrial, la *gfp* se añadió al extremo C-terminal fusionada con el 3' UTR de *mai-2*, la quimera se obtuvo solapando las secuencias por PCR (Figura 11). Esta técnica consiste en amplificar por PCR dos fragmentos por separado, posteriormente se hace un segundo PCR en el cual se incuban los dos fragmentos y los oligonucleótidos complementarios se solapan obteniendo una quimera (Heckman *et al.*, 2007).

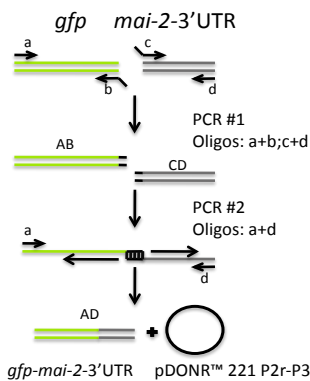


Figura 11. Elaboración de la quimera *gfp-mai-2-3'UTR*. Los genes se amplifican por separado, el fragmento *gfp* (verde) se amplificó por los oligonucleótidos a y b mientras que *mai-2-3'UTR* se amplificó por los oligonucleótidos c y d (gris). Posteriormente se hace un segundo PCR donde se incuban los dos fragmentos AB y CD en concentraciones equimolares, junto con los oligonucleótidos a y d. Los oligonucleótidos b y c son complementarios y se solapan, el resto de los nucleótidos de los fragmentos AB y CD se sintetizan (flechas continuas).

Para elaborar los vectores de entrada fue necesario amplificar por PCR la el inserto que se desea clonar a los plásmidos donadores usando como templado DNA genómico. Se diseñaron tres pares de oligonucleótidos (sentido y antisentido) y un par de oligonucleótidos *gfp-mai-2-3'UTR* (sentido) y *gfp-mai-2-3'UTR* (antisentido) para amplificar y solapar las secuencias *gfp* y 3'UTR (Tabla 2).

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para incorporar los sitios *attB* a los fragmentos amplificados para la elaboración del transgen *mai-2::gfp*. El par de oligonucleótidos *attB4* y *attB1r* amplificaron el promotor *mai-2*, los oligos *attB1* y *attB2* amplificaron al fragmento *mai-2*, los oligonucleótidos *attB2r* y *gfp-mai-2-3'UTR* (antisentido) amplificaron al gen de la *gfp*, mientras que los oligonucleótidos *gfp-mai-2-3'UTR* (sentido) y *attB3* amplificaron al 3'UTR del gen de *mai-2*. Se indica con letras resaltadas la secuencia *attB* y en letras no resaltadas la secuencia complementaria al fragmento de interés que se desea amplificar.

Nombre	Secuencia	Tm (°C)	Tamaño (bases)
<i>attB4</i>	GGGGACA CTTTGTATAGAAAAGTTG ATTCGTTTGGTAGACGAGG	64	46
<i>attB1r</i>	GGGGACTG CTTTTTGTACAAACTTG ATTCTGAAAATTGAGTGAATTAGAGAG	64	53
<i>attB1</i>	GGGGACA AGTTTGTACAAAAAGCAGGCTCA ATGCTCAGCGTTTCAAGAGCCG	69	53
<i>attB2</i>	GGGGACC ACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTCC TTCCTTCCGAGGGCACGC	71	52
<i>attB2r</i>	GGGGAC AGCTTCTTGTACAAAGTGGGA ATGAGTAAAGGAGAAGAAGTCTTCACTG	67	56
<i>GFP-mai-2-3'UTR</i> (antisentido)	GACTAGCTCGCGTTCTGTACTGCAAATTTGTATAGTTCGTCATGCCATG	66	54
<i>GFP-mai-2-3'UTR</i> (sentido)	CATGGCATGGACGAACATACAAATAATTTGCAGTACAAGAACGCGAGCTAGTC	66	54
<i>attB3</i>	GGGGACA CTTTGTATAATAAAGTTG CCTCTATAATTTCTCTATAAAGCTTGTC	63	56

Los fragmentos amplificados por PCR se identificaron por su tamaño en un gel de agarosa al 1%. Posteriormente, se procedió a las clonaciones del producto de PCR en los plásmidos donadores por medio de una reacción reacción BP (reacción que transfiere los productos de PCR flanqueados por los sitios *attB* a un vector donador que contiene sitios *attP*). El promotor de *mai-2* (1796 pb) se clonó en el plásmido pDONR™ P4-P1r, el gen *mai-2* (800 pb) se clonó en el plásmido pDONR™ 221 y la quimera *gfp-3'UTR* (*gfp* 900 pb, 3'UTR 200 pb, total 1100 pb) en el plásmido pDONR™ P2r-P3 (Figura 10). Las reacciones se incubaron toda la noche a 25°C, al día siguiente se incubaron 10 minutos en presencia de proteinasa K a 37°C y posteriormente la reacción se transformó en la bacterias *E. coli* DH5- α . Las construcciones promotor *mai-2::pDONR™* P4P1R, *mai-2:: pDONR™* 221 y *gfp-3'UTR::pDONR™* P2r-P3 se confirmaron por PCR utilizando los oligonucleótidos M13 que flanquean el sitio de inserción (Figura 12) y también por secuenciación

Finalmente, los tres vectores de entrada se recombinan en el plásmido destino pCFJ150 (Frokjaer-Jensen *et al.*, 2008) por medio de una reacción LR (Figura 10). El

plásmido destino pCFJ150 contiene el gen *Cbr-unc-119* que ayudará a seleccionar a los gusanos con el fenotipo *Unc-119(-)* que hayan incorporado el transgen mediante un rescate de movilidad (ver siguiente sección). La reacción LR se incubó toda la noche a 25°C, al día siguiente se incubó con la proteinasa K a 37°C durante 10 minutos y se transformó en *E. coli* DH5- α . La construcción pCFJ150::*Pmai-2*::*mai-2*::*gfp-mai-2-3'UTR* se confirmó por medio de la digestión con enzimas de restricción y por secuenciación.

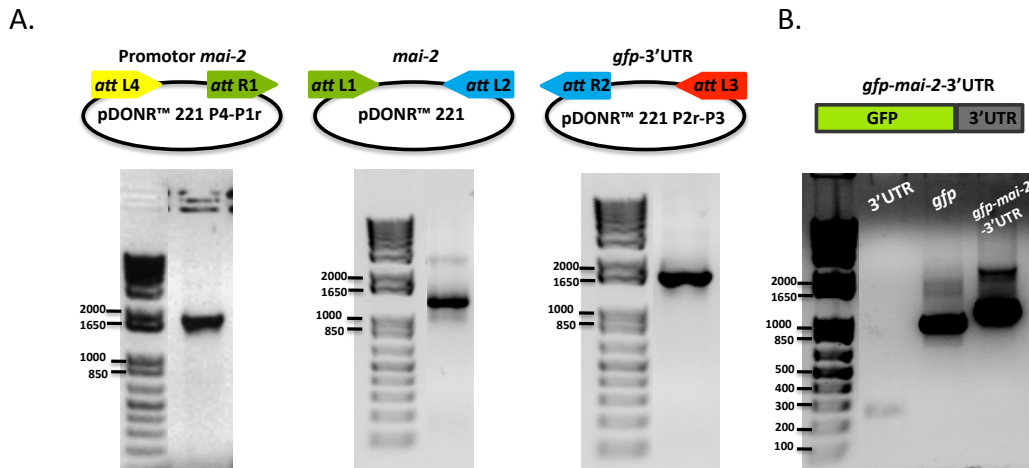


Figura 12. Confirmación de las construcciones promotor *mai-2*::pDONR™ 221 P4-P1r, *mai-2*::pDONR™ 221 y *gfp-mai-2-3'UTR*::pDONR™ 221 P2r-P3. A. Se amplificaron por PCR los insertos: promotor *mai-2* (1796 pb), *mai-2* (800 pb) y *gfp-mai-2-3'UTR* (1100 pb) con los oligonucleótidos M13, que flanquean los sitios de inserción. B. Se fusionaron los fragmentos de la *gfp* (900 pb) y *mai-2-3'UTR* (200 pb) por PCR para formar una quimera de 1100 pb.

El transgen *mCherry::mai-1* se realizó de la misma manera que la construcción *mai-2::gfp*. Las características de este transgen son: (1) el gen *mai-1* se encuentra regulado bajo su propio promotor; (2) la mCherry se fusionó en el extremo 5' de *mai-1*; (3) el gen *mai-1* conserva sus intrones, donde pueden encontrarse secuencias reguladoras y (4) se incluyó el 3'UTR del gen *mai-1* que es importante en la regulación de la traducción.

Se amplificó por PCR el promotor de *mai-1* y *mai-1-3'UTR* añadiendo al inserto los sitios *attB*. Los oligonucleótidos que se utilizaron para amplificar el promotor de *mai-1* y *mai-1-3'UTR* se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Oligonucleótidos que se utilizaron para incorporar los sitios *attB* a los fragmentos amplificados para la elaboración del transgen *mCherry::mai-1*. El par de oligos *attB4* y *attB1r* se utilizaron para amplificar el promotor de *mai-1*, mientras que *attB2r* y *attB3* se utilizaron para amplificar el gen de *mai-1*. Se indica con letras resaltadas la secuencia *attB* y en letras no resaltadas la secuencia complementaria al fragmento de interés que se desea amplificar.

Nombre	Secuencia	Tm (°C)	Tamaño (bases)
<i>attB4</i>	GGGGACTTTGTATAGAAAAGTTG TTTGTTTTGATGTGCTTT	61	41
<i>attB1r</i>	GGGGACTGCCTTTTTGTACAAACTTG TCATCTGTTTTGATTCCTG	64	46
<i>attB2r</i>	GGGGACAGCTTCTCTGTACAAAGTGGAG ATGTCAGGATCTGGAAGTG	67	47
<i>attB3</i>	GGGGACAACCTTGTATAATAAAGTTG ACTTTATTGAGAAGGCCATTTATATAC	62	54

Por medio de la reacción BP se clonó el fragmento del promotor *mai-1* (2000 pb) en el plásmido pDONR™P4-P1r y el fragmento *mai-1-3'UTR* (2100 pb) en el plásmido pDONR™P2r-P3 (Figura 13), la mCherry se adquirió comercialmente en el plásmido pDONR™221 (pCG144; Addgene). Las reacciones se dejaron incubando toda la noche a 25°C, al día siguiente se incubó la reacción durante 10 minutos en presencia de proteinasa K a 37°C y posteriormente la reacción se transformó en la bacterias *E. coli* DH5- α . Los vectores de entrada se confirmaron por secuenciación.

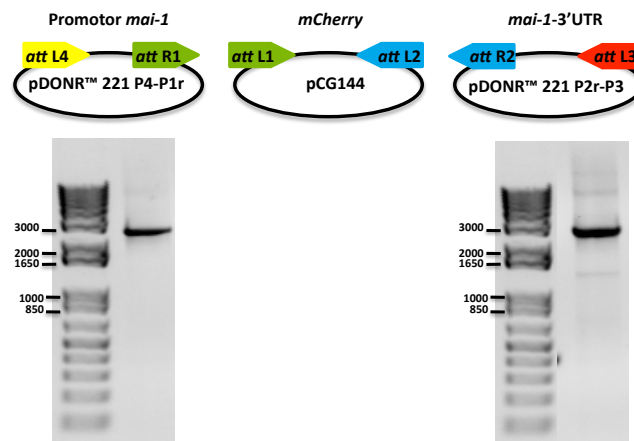


Figura 13. Confirmación de las construcciones promotor *mai-1::pDONR™221 P4-P1r* y *mai-1-3'UTR::pDONR™221 P2r-P3*. A. Se amplificaron por PCR, los insertos promotor *mai-1* (2000 pb) y *mai-1-3'UTR* (2100 pb) con los oligonucleótidos M13 que flanquean los sitios de inserción.

Los tres vectores de entrada, al igual que para *mai-2::gfp*, por medio de la reacción LR se clonaron en el plásmido destino pCFJ150. La reacción LR se incubó durante toda la noche a 25°C, al día siguiente se incubó con proteinasa K a 37°C durante 10 minutos y se transformó en *E. coli* DH5- α . Finalmente, la construcción pCFJ150::*Pmai-1::mcherry::mai-1-3'UTR* se confirmó por medio de la digestión con enzimas de restricción y por secuenciación.

Biobalística. La biobalística ha mejorado la elaboración de animales transgénicos desde que se descubrió que es un método de transformación que facilita la integración de transgenes al DNA cromosomal (Praitis *et al.*, 2001). El DNA se añade a partículas de oro, que se disparan con alta velocidad hacia un gran número de animales. Algunos de los animales transformados que se generan, contienen el arreglo integrado al cromosoma, mientras que otros pueden generar arreglos extracromosomales (Figura 14). El uso de la cepa mutante en el gen *unc-119*, fenotipo Unc-119(-), facilita la selección de los animales que expresan el transgen. La cepa mutante *unc-119(ed3)* es viable pero su movilidad no es coordinada, además es incapaz de formar Dauers (estadio de diapausa que permite al nematodo sobrevivir largos periodos de tiempos en ausencia de alimento y en otras condiciones de estrés). Un animal mutante en el gen *unc-119*, transformado con un transgen que además de los elementos regulatorios y el gen de interés contenga el gen *unc-119*, va a poder sobrevivir el ayuno cambiando a una larva Dauer y recuperar la coordinación de la movilidad, mientras que los animales no transformados con el transgen permanecen inmóviles y morirán en ausencia de alimento.

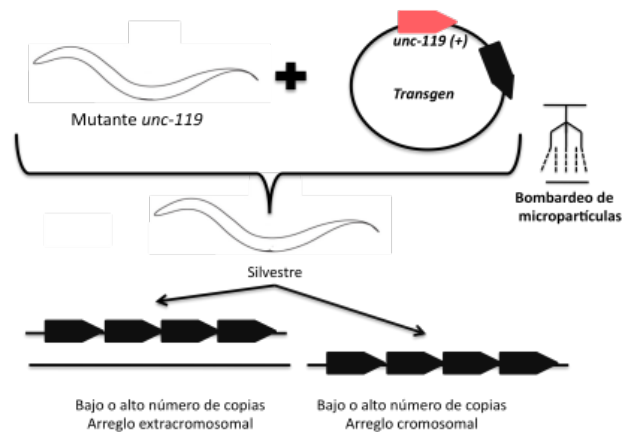


Figura 14. La biobalística es una técnica que se utiliza para introducir DNA al *C. elegans*. Los animales transgénicos pueden marcarse por un fenotipo de ganancia de función, como el rescate de la mutante Unc-119(-). La técnica de la balística puede dar arreglos extracromosomales o arreglos integrados al cromosoma.

Antes de iniciar el bombardeo es importante tener un gran número de animales mutantes *unc-119(ed3)*, se necesitan de 1-1.5mL de una pastilla formada por animales limpios por cada construcción que se lleve a cabo, los animales se lavaron en

esterilidad con medio M9 (3g KH_2PO_4 , 6g Na_2HPO_4 , 5g NaCl, 1mL 1M MgSO_4 en 1L de agua y se esteriliza por autoclave). Los animales limpios se colocaron en 10 cajas medianas (6cm de diámetro) en un medio enriquecido con peptona (1.2g de NaCl, 20 g de peptona, 25g de agar en 1L de agua destilada esterilizada). El medio se dejó enfriar y se agregó 1mL de colesterol (5mg/mL en alcohol etílico absoluto), 1mL de MgSO_4 , 25mL de amortiguador de fosfatos (pH 6.0) y se añadió la cepa *E. coli* NA-22 (la cepa NA-22 a comparación de la cepa *E. coli* OP50-1 forma un tapete más grueso de bacterias y constituye una mayor fuente de alimento que rinde para un mayor número de nematodos).

Para bombardear a los animales se utilizaron 30mg de partículas de oro, lavadas 3 veces con 70% (v/v) de alcohol etílico seguido de agua estéril y se resuspendieron en 500 μL de glicerol al 50% (v/v). A 100 μL de suspensión se añadieron 30 μL del vector de expresión (50-100 ng/ μL), 100 μL de 2.5M de CaCl_2 y 40 μL de 0.1M de espermidina. La mezcla se lavó 2 veces en 280 μL de 70% (v/v) de alcohol etílico y finalmente se resuspendió en 100 μL de alcohol etílico al 100%.

El bombardeo se realizó en un equipo Biolistic PDS-1000/He de BioRad. Antes del bombardeo, el equipo se limpió con alcohol etílico al 70% y todas las piezas de la cámara se lavaron y esterilizaron. Se colocaron 10 μL de la suspensión de partículas de oro impregnadas con el DNA en los adaptadores con microacarreadores y dentro de la cámara en el fijador de microacarreadores. Se abrió la válvula de gas y se aseguró que la presión de He fuera mayor a 2200 psi, se utilizó como indicador de la presión de disparo un disco de ruptura de 2000 psi. Dentro de la cámara debe hacerse un vacío de 27 pulgadas de Hg, cuando se alcanza el vacío se presiona HOLD, posteriormente se presiona el botón de FIRE y se sostiene hasta que el disco de ruptura se rompe. Para abrir la puerta de la cámara se debe liberar el vacío. Los animales bombardeados se recuperaron en 30 cajas grandes (15cm de diámetro) con medio enriquecido con peptona, el antimicótico nistatina, la bacteria *E. coli* NA-22 y se incubaron a 24°C durante 7-14 días. Después de ese tiempo los animales se seleccionaron siguiendo el criterio de que la cepa mutante *unc-119(ed3)* no puede formar Dauers y se mueren en

condiciones de ayuno, haciendo fácil la selección de los gusanos rescatados sobrevivientes.

Para el animal transgénico *mai-2::gfp*, 12 de 30 cajas mostraron sobrevivientes con el fenotipo silvestre, fenotipo Unc-119(+). Las 12 cajas se tomaron como eventos transformados donde cada caja se consideró como una línea transgénica. A continuación se evaluó la expresión del transgen *mai-2::gfp* mediante microscopía de fluorescencia, la línea 6 mostró una buena fluorescencia tanto en soma como en la línea germinal, por lo que se eligió la línea 6 para caracterizar el patrón de expresión del transgénico. En el caso del transgénico *mCherry::mai-1*, 14 de 30 cajas mostraron sobrevivientes con el fenotipo silvestre, Unc-119(+). La línea 14 mostró una buena fluorescencia en la línea somática, por lo que se eligió para caracterizar el patrón de expresión.

La línea 6 del transgen *mai-2::gfp* se segrega de manera mendeliana, mientras que la línea 14 del transgen *mCherry::mai-1* se segrega de manera no mendeliana, sugiriendo que esta última contiene un arreglo extracromosomal.

Montaje de nematodos en placas de agar para microscopía Nomarski. Para visualizar en el microscopio a los animales se prepararon placas de agarosa que dan soporte a los nematodos evitando que se deformen o exploten al colocar el cubreobjetos. Para preparar las placas fue necesario poner un portaobjetos entre dos portaobjetos que tengan una capa de cinta adhesiva. La agarosa al 2% (w/v) se fundió y se colocó una gota en el portaobjetos central, evitando la formación de burbujas en la agarosa. Rápidamente, se colocó un portaobjetos de manera perpendicular, sobre la gota de agarosa fundida, presionando delicadamente (Figura 15). Finalmente, se dejó solidificar y se retiró el portaobjetos deslizándolo hacia una dirección. Una vez que el colchón de agarosa solidificó, se agregaron 10 μ L del anestésico tetramisol (10mM) disuelto en M9 (3g KH₂PO₄, 6g Na₂HPO₄, 5g NaCl, 1mL 1M MgSO₄ en 1L de agua y se esteriliza por autoclave) y se colocaron los animales, los cuales en presencia de la anestesia quedan inmovilizados

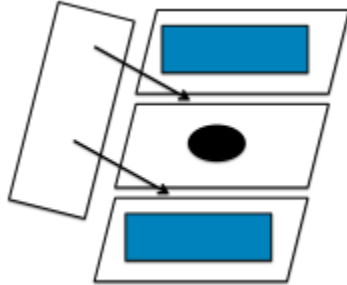


Figura 15. Preparación de una placa de agarosa.

La placa de agarosa con gusanos anestesiados servirá para visualizar los nemátodos por medio de microscopía Nomarski, la cual nos ayuda a visualizar estructuras en el nematodo vivo y permite observar una sección óptica con diferentes índices de refracción (como el núcleo y el citoplasma), generando contraste que da un efecto similar al 3D.

RNA de interferencia (RNAi) de los genes *mai-1* y *mai-2*. Para silenciar a los genes *mai-1* y *mai-2*, se introdujo el RNA de doble cadena (dsRNA) al animal por medio del alimento (Figura 17). Se expresó el dsRNA, por medio de la clonación del fragmento que se desea silenciar entre dos promotores del bacteriófago T7 en el plásmido pPD129.36 L4440. Para realizar la clonación de los genes *mai-1* y *mai-2* en el plásmido pPD129.36 L4440, se diseñaron oligonucleótidos para amplificar a cada uno de los genes a partir del codón de inicio hasta el codón de paro. Los oligonucleótidos que se utilizaron para amplificar al gen *mai-1* fueron: 5'ggaattcatgtcaggatctggaagtg3' (sentido) y 5'ggggtaccttatgttccgtgtcctttc3' (antisentido), mientras que los oligonucleótidos que se utilizaron para amplificar a *mai-2* fueron: 5'gcggatccttattcctttccgagggc3' (sentido) y 5'gctctagaatgctcagcgtttcaaga3' (antisentido). A partir de cDNA se amplificaron los genes por PCR, posteriormente los fragmentos amplificados y el plásmido pPD129.36 L4440 se digirieron con enzimas de restricción (New England BioLabs). Para la clonación de *mai-1* en el pPD129.36 L4440 se utilizaron las enzimas *EcoRI* y *KpnI* y para la clonación de *mai-2* pPD129.36 L4440 se utilizaron las enzimas *XbaI* y *BamHI* (Figura 16A). Los fragmentos digeridos se incubaron toda la noche a 16°C con la DNA T4 ligasa. Las ligaciones se transformaron por choque de calor a la cepa de *E. coli* DH5- α . Se purificaron los plásmidos por

minipreps siguiendo las recomendaciones del proveedor QIAGEN QIAprep Spin Miniprep Kit y se corroboró la clonación del inserto con la digestión de las construcciones por enzimas de restricción (Figura 16B) y por secuenciación. Finalmente, las construcciones *mai-1*::pPD129.36 L4440 y *mai-2*::pPD129.36 L4440 se transformaron en la cepa de *E. coli* HT115(DE3), esta cepa codifica para la polimerasa T7 gracias a un promotor lactosa inducible y además es deficiente en la RNasa III que ayuda a la preservación del RNA de doble cadena. La clonación de los genes *mai-1* y *mai-2* fue realizada por el Biólogo Jose Luis Ramos Balderas y confirmados por la Bióloga Silvia Salinas Velázquez en el laboratorio.

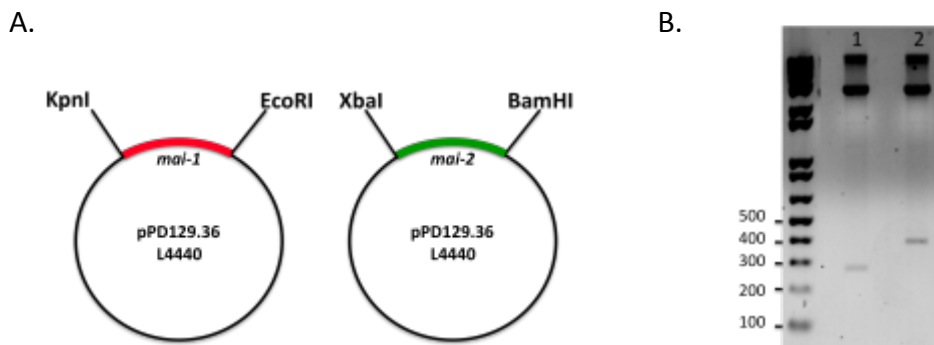


Figura 16. Clonación de los genes *mai-1* y *mai-2* en el plásmido pPD129.36 L4440. A. El ORF de *mai-1* se clonó sin intrones del ATG a la secuencia de paro en los sitios *KpnI* y *EcoRI* del plásmido pPD129.36, mientras que *mai-2* se clonó sin intrones del ATG a la secuencia de paro en los sitios *XbaI* y *BamHI* del plásmido pPD129.36. B. Se realizó una digestión para comprobar la clonación del inserto, en el carril (1) se observa el fragmento del gen *mai-1* con un tamaño de 267pb y en el carril (2) se encuentra *mai-2* con un tamaño de 330pb.

Se creció un precultivo de las bacterias HT115(DE3) con las construcciones *mai-1*::pPD129.36 L4440 y *mai-2*::pPD129.36 L4440 en medio LB con los antibióticos ampicilina (50µg/mL) y tetraciclina (12.5µg/µL) durante toda la noche a 250 rpm a 37°C. Al día siguiente, se creció un cultivo de 500mL de medio 2XYT (16g de triptona, 10g de extracto de levadura y 5g de NaCl en 1L de agua) con ampicilina (50µg/mL), tetraciclina (12.5µg/µL) y 5mL del precultivo. Cuando las bacterias llegaron a una densidad óptica de 0.4-0.6, se indujo la síntesis de dsRNA con 0.4 mM de IPTG. El cultivo se dejó crecer por 2 horas más a 37°C. Al término de las 2 horas se centrifugó para formar una pastilla la cual se resuspendió en 25mL de medio 2XYT con ampicilina (50µg/mL), tetraciclina (12.5µg/µL), IPTG (0.4mM) y 25mL de glicerol estéril al 50%

(v/v). Se hicieron alícuotas de 1mL de bacterias con el dsRNA acumulado, se congelaron en nitrógeno líquido y guardaron a -70°C .

Para silenciar a los genes *mai-1* y *mai-2* por RNAi, se descongelaron las alícuotas y se centrifugaron a 5,900g durante 2 minutos en una microcentrífuga. Se extrajo el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 100 μL de medio LB con ampicilina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), tetraciclina (12.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) e IPTG (0.4mM). 50 μL de bacterias se añadieron a una caja mediana (6cm de diámetro) de medio NGM-LITE con ampicilina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), tetraciclina (12.5mg/ μL) e IPTG (0.4mM). Con la ayuda de un asa bacteriológica se expandieron las bacterias para formar un tapete en el centro de la caja, las cajas se pusieron a secar en una campana de flujo laminar durante 15 minutos. Posteriormente, 5-6 gusanos en estadio L4 (filial 0) se añadieron a la caja con comida, se seleccionaron larvas en estadio L4 de la filial 1 y se separaron del resto de los estadios con la finalidad de tener una población homogénea de gusanos en un único estadio.

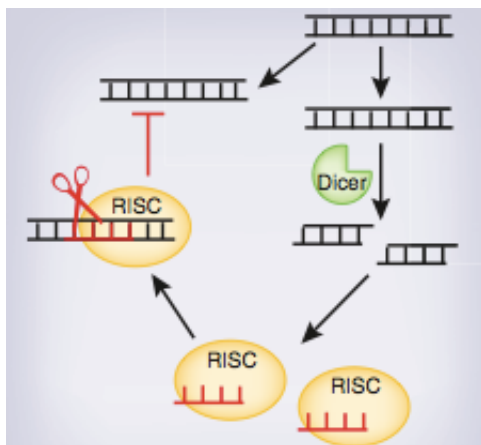


Figura 17. Mecanismo de silenciamiento en *C. elegans*. La bacteria *E. coli* HT115(DE3) acumula el dsRNA del fragmento que se quiere silenciar. El gusano ingiere el dsRNA, una vez dentro del gusano, el dsRNA pasa del intestino a casi todas las células del animal. La endonuclease Dicer corta el dsRNA en fragmentos de 19-22 pb llamados siRNA (*small interfering RNA*). Los siRNAs se acoplan con el complejo multiproteico RISC (*RNAi-induced silencing complex*) y reconocen el RNA mensajero blanco dando una señal de degradación.

Extracción de RNA y síntesis de cDNA. Para la extracción de RNA de los animales control (PV), *mai-1(RNAi)* y *mai-2(RNAi)* se colectó a los animales y se lavaron en medio M9 para remover la bacteria *E. coli* OP50-1. Los gusanos se mezclaron con 500 μL de Trizol (Invitrogen) y se congelaron a -70°C . La mezcla se descongeló y se vació en un mortero con nitrógeno líquido donde se homogenizaron hasta romper la cutícula de los gusanos. Posteriormente, el homogenado se recuperó en tubos Eppendorf a los cuales se les agregó 100 μL de cloroformo a cada muestra. Se

incubó el homogenado con el cloroformo durante 3 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugó a 16,100g durante 15 minutos a 4°C. Con mucho cuidado se extrajo la fase superior en donde se encuentra el RNA. Para precipitarlo se añadió 250µL de isopropanol y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente; al término se centrifugó a 16,100g durante 10 minutos a 4°C, para formar una pastilla. La pastilla se lavó con 500µL de alcohol etílico al 70% (v/v) para eliminar las sales, se retiró por decantación y se dejó secar durante 5 minutos, para evitar restos de alcohol etílico en el RNA que puede afectar las reacciones de síntesis de cDNA y PCR. Finalmente, se resuspendió en 30µL de agua DEPC (0.1%) a 60°C en agitación constante durante 10 minutos. El RNA se cuantificó en un espectrofotómetro NanoDrop 2000 a 340nm.

A partir de 5µg del RNA extraído se sintetizó el cDNA siguiendo las indicaciones del proveedor ImProm-IITM Reverse Transcription System de Promega.

Western blot. Se colectaron 100 animales adultos de las diferentes condiciones en 9µL de agua, 2.4µL de DTT (1M) y 2µL de amortiguador de carga (0.6mL 1M Tris-HCl (pH 6.8), 5 mL de 50% (v/v) glicerol, 2mL de 10% (w/v) de SDS, 1 mL de 1% (w/v) de azul de bromofenol en 0.9mL de agua). Las muestras se calentaron a 95°C por 5 minutos y se cargaron en un gel de acrilamida al 12% (Protein Methods, Daniel Bollag *et al.*, 1996). El gel se corrió a 100 volts (V) de manera constante hasta que el frente de corrida llegó 5mm por arriba de la parte inferior del gel. Posteriormente, se transfirieron las proteínas a una matriz de nylon (Millipore, Immobilon-P) a 0.5 amperes (A) durante 2 horas a 4°C.

Para evitar el reconocimiento no específico de los anticuerpos se bloqueó la membrana con leche 5% (w/v) diluida en TBS (10mM de Tris-HCl, pH 7.5 y 150 mM de NaCl en 1 L de agua)/TWEEN-20 0.1% durante 1 hora. Posteriormente, se incubó con el anticuerpo primario diluido (1:1000) en leche 5% toda la noche. Al día siguiente, el exceso de anticuerpo primario se retiró con 5 lavados de TBS/TWEEN-20 0.1% (v/v). con duración de 5 minutos y se incubó durante 1 hora con el anticuerpo secundario acoplado a la peroxidasa de rábano, diluido (1:1000) en leche al 5% (w/v). El exceso de

anticuerpo secundario se removió por medio de 3 lavados con TBS/TWEEN-20 0.1% (v/v). Finalmente, se agregó luminol (Kit Elmer) a la membrana y la señal en forma de luz, como consecuencia de la oxidación del luminol por la peroxidada de rábano, se detectó exponiendo una placa fotográfica a la membrana durante 10 minutos.

Conteo de progenie. Para el conteo de progenie se colocó un hermafrodita L4 en una caja chica (3cm de diámetro) a la que se llamó caja 1 y a las 24 horas se cambió el gusano a una caja nueva, a la que se llamó caja 2, en el segundo día se contó el número de larvas así como el número de embriones muertos en la caja 1. Después de 24 horas, se movió el mismo animal de la caja 2 a una nueva caja a la que se llamó caja 3, en el tercer día se contó el número de lavas y embriones muertos de la caja 2. Finalmente, en el cuarto día se realizó el conteo de larvas y embriones muertos de la caja 3. La estrategia de transferir al animal en cajas nuevas cada 24 horas durante 3 días, permite hacer un mejor conteo del número de embriones no eclosionados y de larvas, para tener una mejor aproximación del número de hijos que tiene un animal hermafrodita.

Conteo de cuerpos apoptóticos. Para determinar la apoptosis fisiológica en condiciones control (plásmido vacío; PV), gusanos *mai-1(RNAi)* y *mai-2(RNAi)*, se utilizó la cepa transgénica *ced-1::gfp*. La proteína CED-1 se expresa en células responsables de fagocitar los cuerpos apoptóticos de la gónada del nematodo y al estar marcada con GFP se facilita el conteo de cuerpos apoptóticos.

Los gusanos *ced-1::GFP* se montaron en placas de agarosa y se observaron al microscopio excitándolos con luz ultravioleta para detectar la emisión de la proteína GFP. El conteo de cuerpos apoptóticos se realizó siguiendo las siguientes especificaciones: (1) los gusanos que se utilizaron fueron adultos de 1 día, obtenidos por la selección y separación de larvas L4 un día antes del experimento; (2) únicamente las gónadas completamente visibles y con una fluorescencia intensa y clara fueron contadas.

Microscopía electrónica. Los animales se fijaron en glutaraldehído al 2.5% y paraformaldehído 4% en amortiguador PBS (pH 7.2). Posteriormente se deshidrataron

en una serie de etanol a concentraciones graduales, finalizando con 3 cambios a óxido de propileno. La preinclusión se llevó a cabo con una mezcla de óxido de propileno y resina epóxica, en proporción 1:1 durante 16 horas para después evaporar el óxido de propileno. Se hizo la inclusión de la muestra en moldes y se polimerizó en una estufa a 60°C por 16 horas. Se obtuvieron cortes ultrafinos de la zona de interés con un ultramicrotomo (Leica Ultracut R) y se colocaron los cortes en una rejilla de cobre cubierta de formvar. Se contrastaron los cortes con acetato de uranilo al 5% y citrato de plomo al 0.5%. Finalmente, se examinaron los cortes en un microscopio electrónico JEOL 1010 operando a 80 kV.

RESULTADOS

Los animales transgénicos *mai-2::gfp* y *mCherry::mai-1* se expresan diferencialmente durante la embriogénesis.

Ichikawa *et al.* (2006) estudiaron la localización de las proteínas MAI-1::GFP y MAI-2::GFP del *C. elegans* fusionadas a la GFP en levaduras vivas. Estas construcciones fueron hechas con la GFP en el carboxilo terminal y se expresan bajo el control del promotor *GAL1*. Este grupo encontró que la fusión MAI-1::GFP se localiza en el citoplasma, mientras que la MAI-2::GFP se localiza en las mitocondrias de la levadura. Debido al patrón de localización y sus características bioquímicas, concluyeron que la proteína MAI-2 es la más parecida a la IF₁ de mamíferos. Este estudio nos da información de las propiedades de las proteínas pero no de su expresión *in vivo* en el nematodo; organismo de mayor complejidad celular que la levadura y en donde existen mecanismos reguladores de la expresión de estas proteínas.

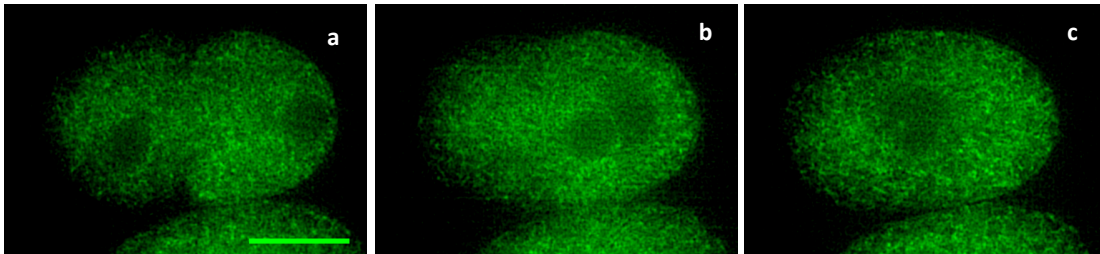
El transgen *mai-2::gfp* se insertó en el plásmido pCFJ105 a partir de la Tecnología Gateway® y se introdujo por biobalística a gusanos Unc-119(-), que presentan pérdida en la motilidad. El plásmido pCFJ150 además de la construcción tiene el gen *unc-119*; en aquellas líneas de animales bombardeados donde se observó una ganancia de motilidad, se analizó la fluorescencia y finalmente se seleccionó la línea de estudio.

Se caracterizó la expresión de la cepa transgénica *mai-2::gfp* a lo largo del desarrollo embrionario. Debido a que los embriones tempranos se encuentran en el útero del nematodo, se disecaron a los animales para extraerlos y estos se montaron en placas de agarosa.

Se encontró la expresión del transgénico *mai-2::gfp* en el citoplasma de todas las células embrionarias. La expresión se observó desde la formación del cigoto (Figura 18A, a-c), a lo largo de la etapa de proliferación (Figura 18B, a-f) y en la etapa de organogénesis y morfogénesis (Figura 18B, g-l). En el embrión de ~30 células, durante la etapa de proliferación de la embriogénesis (Figura 18B,d), se notó un aumento en la

expresión de *mai-2::gfp* en 4 células, de las cuales por el momento desconocemos su linaje celular.

A.



B.

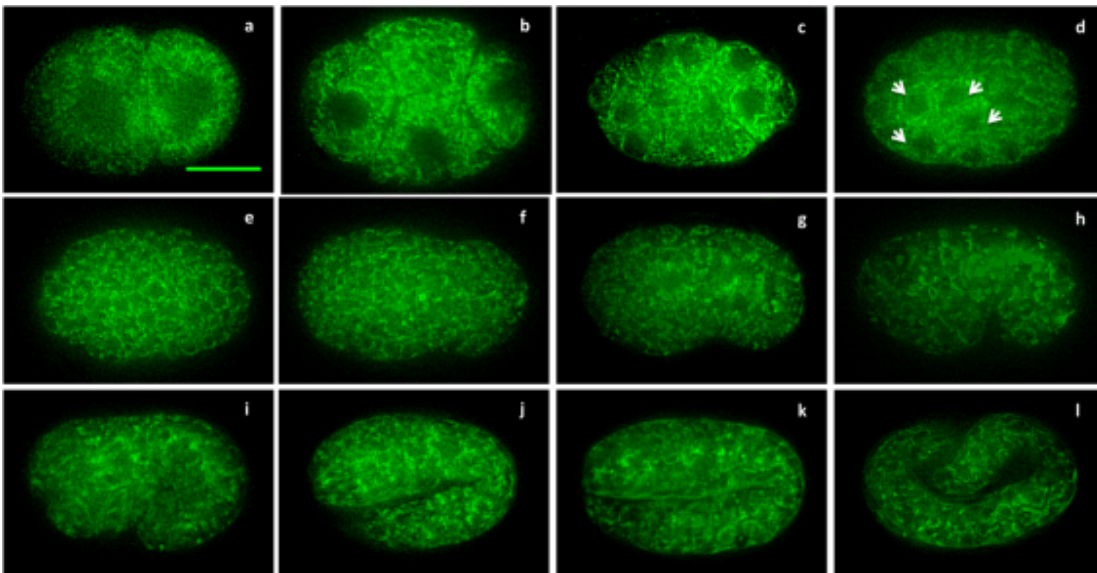


Figura 18. El transgénico *mai-2::gfp* se expresa a lo largo de la embriogénesis del *C. elegans*. (A) Se observó la expresión del transgénico en la formación del cigoto, en (a') se forma la pseudodivisión provocado por las contracciones de la membrana anterior del embrión, (b') el pronúcleo de el ovocito migra hacia la parte posterior del embrión hacia el pronúcleo del espermatozoide, finalmente (c') los pronúcleos migran al centro y comienza la mitosis. (B) La proteína MAI-2::GFP se localiza en el citoplasma de las células a lo largo del desarrollo embrionario de *C. elegans*. En el embrión de 30 células se observó un aumento en la expresión del transgen (flechas blancas) en cuatro células no identificadas. Barra 16 μm .

Para estudiar la expresión de MAI-1 durante la embriogénesis se hizo el transgénico *mCherry::mai-1*, el cual comienza a expresarse durante la gastrulación del nematodo, cuando el embrión tiene ~190 células (Figura 19a). La expresión de *mCherry::mai-1* ocurre en ciertas células a diferencia de la expresión de la cepa *mai-2::gfp*. Cuando el embrión termina la etapa de proliferación y comienza la etapa de

morfogénesis se puede apreciar la expresión del transgénico en neuronas en la parte anterior y en el intestino en la parte media y posterior del embrión (Figura 19d).

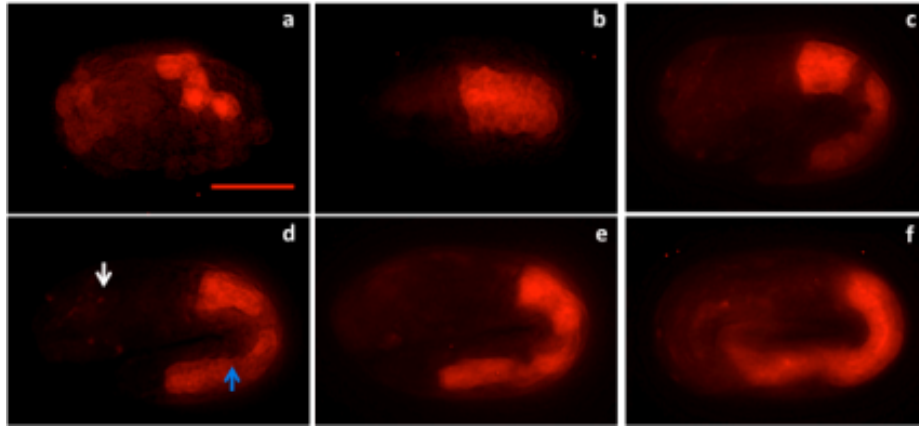


Figura 19. El animal transgénico *mai-1::mCherry* se expresa en etapas tardías de la embriogénesis. Se detectó la expresión de la proteína MAI-1 fusionada con la mCherry durante la gastrulación del embrión (a) que corresponde a la Figura 18d y durante la morfogénesis (b-f). No se observó una expresión en todas las células del embrión sino de manera localizada en las neuronas señalado por una flecha blanca (d) e intestino señalada por una flecha azul (d). Barra 16 μ m.

El transgénico *mai-2::gfp* se expresa en prácticamente todos los tejidos del nematodo mientras que el transgénico *mCherry::mai-1* se expresa en tejidos muy específicos.

Para caracterizar la expresión de los transgénicos *mai-2::gfp* y *mCherry::mai-1* a lo largo de los estadios larvarios (L1, L2, L3 y L4) y el estadio de adulto, se sincronizaron a los animales con la finalidad de obtener una población de la misma edad. A partir del estadio de L1, se monitoreó el desarrollo de los nematodos en los tiempos correspondientes a la muda de cutícula (Byerly *et al.*, 1976) y se montaron en placas de agar para visualizarlos por microscopía tipo Nomarski y de fluorescencia.

Se encontró que los transgénicos *mai-2::gfp* y *mCherry::mai-1* se expresan a lo largo de todos los estadios larvarios y en el estadio de adulto, sin embargo, su expresión es distinta (Figura 20). Desde el estadio L1 hasta el estadio de adulto el transgénico *mai-2::gfp* se expresó de manera general en el sistema nervioso, en el epitelio, en el sistema muscular, en el digestivo y en el reproductivo, mientras que la expresión de la cepa *mCherry::mai-1* se observó desde el estadio L1 hasta el estadio de adulto en las neuronas de la cabeza, parte media, cola e intestino del gusano.

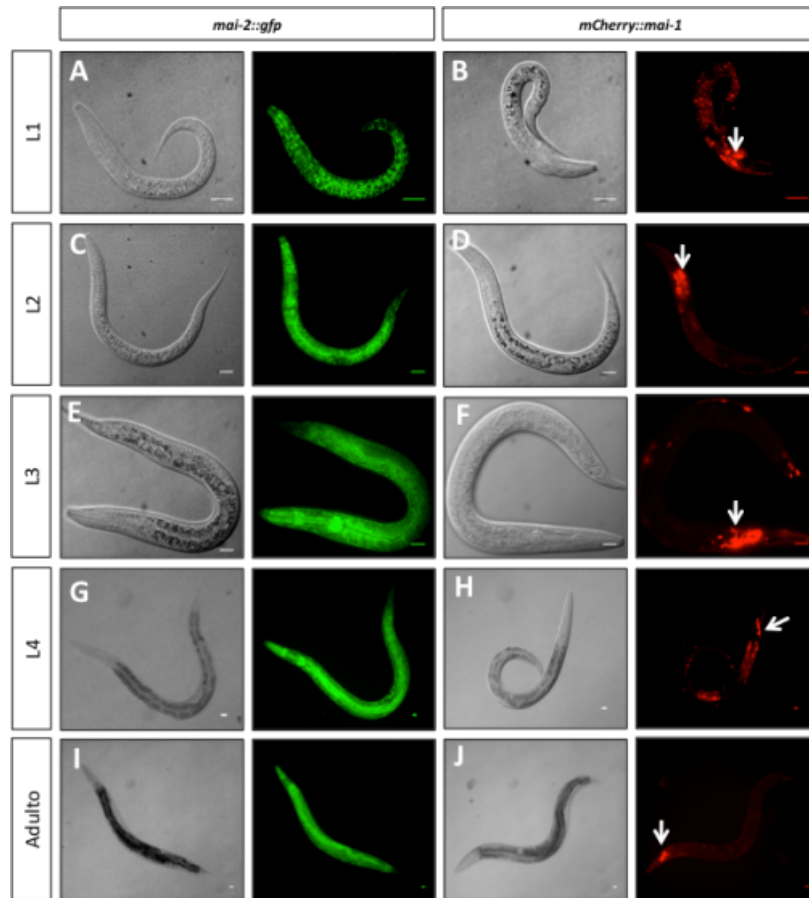


Figura 20. Los animales transgénicos *mai-2::gfp* y *mCherry::mai-1* se expresan en todos los estadios larvarios y en el adulto de una manera diferencial. Partiendo de una población homogénea de animales L1, se monitoreó el desarrollo larvario y el estadio de adulto. Los transgénicos se expresan a lo largo de los estadios larvarios L1, (A-B), L2 (C-D), L3 (E-F), L4 (G-H) y adulto (I-J). En el transgénico *mai-2::gfp* se observó expresión en todos los tejidos del nematodo mientras que en *mCherry::mai-1* se expresó principalmente en el intestino y en determinadas neuronas de la cabeza (flecha blanca), parte media y cola del gusano. Barra=16µm.

El transgénico *mai-2::gfp* co-localiza con el transgen *xmSi01 [Pmex-5::tom-20::mcherry-tbb-3'UTR; Cbr-unc-119(+)]* en la mitocondria.

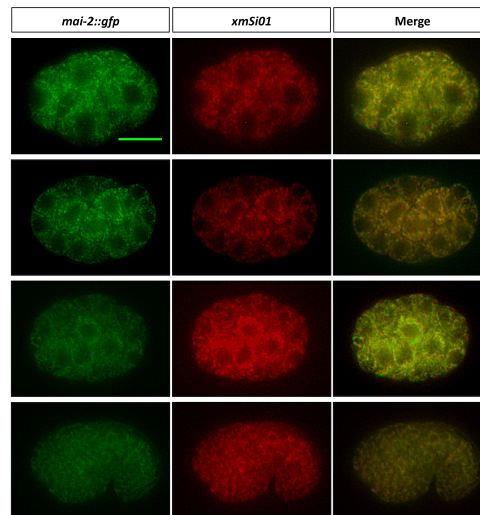
Ichikawa *et al.* (2006) encontraron que la proteína MAI-2 cuenta con una secuencia de importación mitocondrial que la dirige a las mitocondrias de las levaduras. También estudió que la proteína MAI-2 inhibe a la ATPasa de levadura de manera pH dependiente. Debido a que estas características son las mismas que las de la IF_1 de mamífero o levadura, Ichikawa determinó que la proteína MAI-2 era la proteína inhibidora de la ATPasa del *C. elegans*.

Además de estos antecedentes, el transgénico *mai-2::gfp* se expresa en un patrón que sugiere redes mitocondriales, por lo que se decidió determinar la localización celular de la proteína MAI-2::GFP. Para probar esta hipótesis, se realizó una

crucía con una cepa transgénica que se expresa en la mitocondria. Se utilizó el transgénico *xmSi01* que expresa a la proteína transmembranal TOM-20, la cual se localiza en la membrana externa de la mitocondria, etiquetada con la proteína reportera mCherry (Villanueva-Chimal, E. y Navarro, R.E. sin publicar). El transgénico *xmSi01* se expresa en mitocondrias de embriones y en la línea germinal del nematodo, esto se debe a que el gen *tom-20* está bajo el control del promotor de *mex-5*, que induce la expresión constitutiva en la línea germinal.

Se observó en los animales provenientes de la crucea *mai-2::gfp* y *xmSi01* que la expresión de ambos transgenes co-localiza tanto en embriones (Figura 21A) como en la línea germinal de *C. elegans* (Figura 21B). Estos datos sugieren que la proteína MAI-2::GFP se localiza en la mitocondria del nematodo.

A.



B.

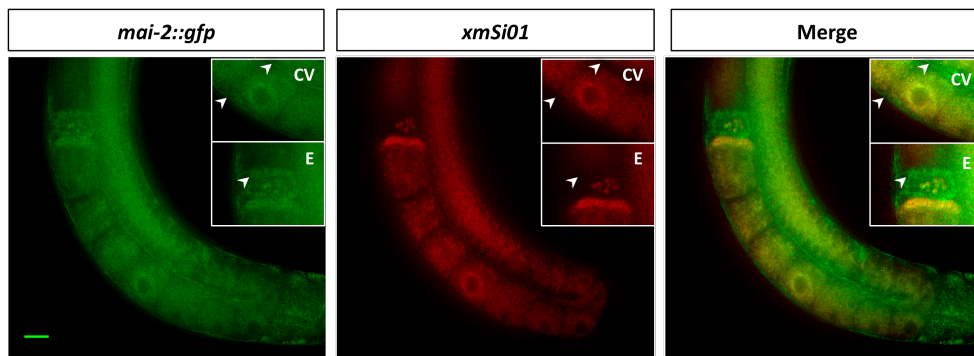


Figura 21. El transgénico *mai-2::gfp* colocaliza en la mitocondria con el transgénico *xmSi01*. A. Se encontró colocalización de las proteínas TOM-20 fusionada a mCherry y MAI-2::GFP en diferentes estadios embrionarios. B. Debido a que el transgénico *xmSi01* se expresa únicamente en la línea germinal del nematodo, la co-localización sólo se observó en este tejido. Barra 16 μm .

Determinación del patrón de expresión de los animales transgénicos *mai-2::gfp* y *mCherry::mai-1*.

Para estudiar con detalle la localización de la expresión del transgénico *mai-2::gfp* en el cuerpo del nematodo, se observaron diferentes planos focales en diferentes secciones de larvas L4. Por medio de microscopía Nomarski y la guía del manual de Anatomía por Nomarski del *C. Elegans* (Yochem, 2005) se identificaron los núcleos celulares y se establecieron los planos focales de estudio. Debido a que el animal es asimétrico, los planos focales se estudiaron de izquierda a derecha; para saber si el animal yace sobre su lado derecho o izquierdo se utilizó la relación de la gónada con respecto al intestino y la vulva para distinguir el plano dorsal y ventral (Figura 22).

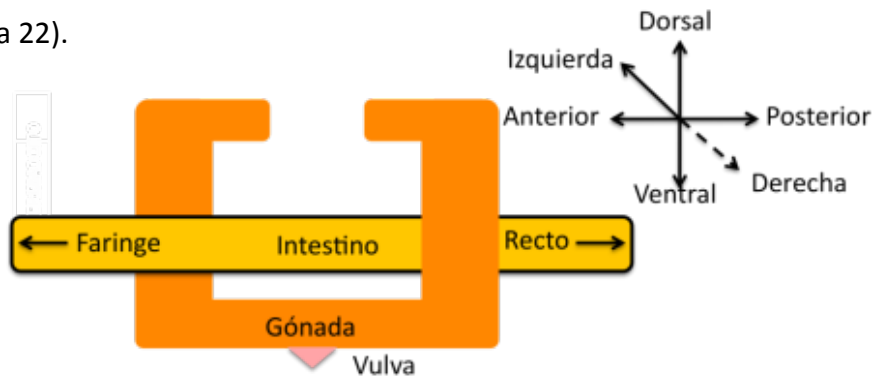


Figura 22. Relación izquierda-derecha de la gónada con respecto al intestino. Si el gusano yace sobre el lado derecho, el brazo posterior de la gónada se encuentra por arriba del intestino, mientras que el anterior se encuentra por debajo.

Se observó que *mai-2::gfp* se expresa de manera importante en la cabeza del *C. elegans*. En el plano focal izquierdo, se expresa en el citoplasma de las células epiteliales, constituida por las células sincisiales de la hipodermis y las células epiteliales especializadas (Figura 23A); cambiando el enfoque un incremento, se observó la expresión en células musculares de la pared muscular del nematodo y alrededor de los núcleos neuronales, localizados entre el metacarpus (M), el bulbo terminal (BT) en la zona del istmo de la faringe (Figura 23B). En los siguientes dos planos, en la parte central del gusano se encontró la localización de *mai-2::gfp* en el músculo de la faringe y en la célula excretora que forma parte del sistema excretor del nematodo encargado de la regulación osmótica e iónica (Figura 23C,D).

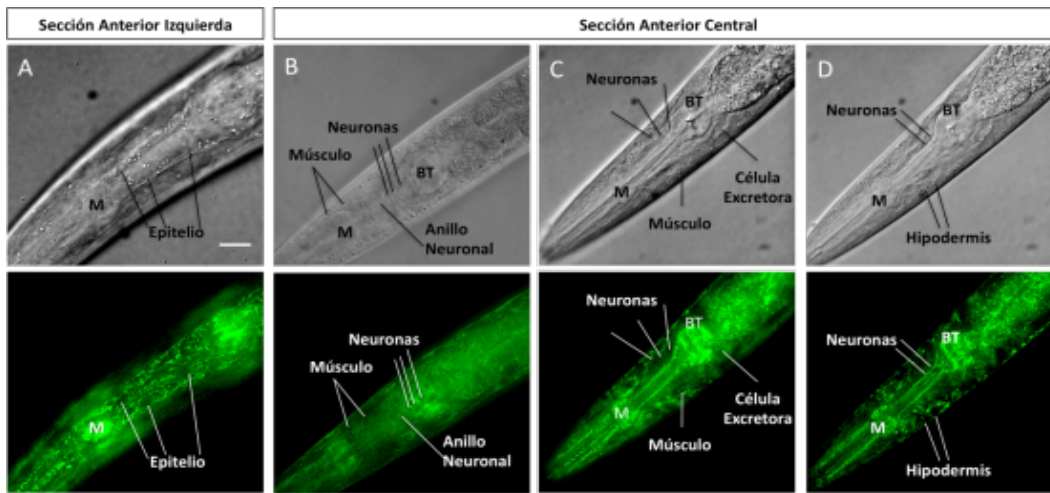


Figura 23. El transgen *mai-2::gfp* se expresa en las sección anterior del nematodo (cabeza). El transgen *mai-2::gfp* se localiza en (A) las células epiteliales, (B) las células musculares, en las neuronas, (C y D) en la célula excretora y en el músculo de la faringe. Barra 16 μ m.

En la sección media anterior del animal se encontró que *mai-2::gfp* se expresa en las células de la válvula faringe-intestino y en el intestino (Figura 24A). En la parte media izquierda, el transgénico se localiza en las células epiteliales de la hipodermis, células “seam” y en las mitocondrias de las células musculares (Figura 24B), moviendo el enfoque hacia la derecha en la sección media, se observó que la proteína se localiza en las células de la vulva y también se distingue a la célula distal de la gónada (Figura 24C). En la sección media posterior, se observó expresión del transgénico *mai-2::gfp* en la gónada, alrededor de los núcleos de las células germinales, en la espermateca y en el útero (Figura 24D).

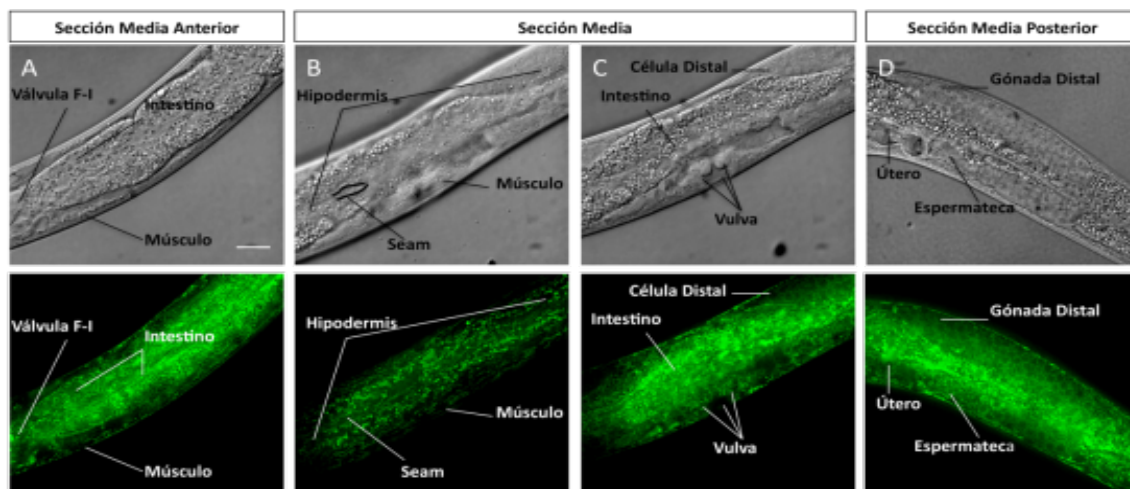


Figura 24. El transgénico *mai-2::gfp* se expresa en los órganos de la parte media del nematodo. La proteína MAI-2::GFP se localiza en (A) el intestino y músculo, (B) el epitelio (células de la hipodermis y “seam”), (C) la vulva y (D) la células de la línea germinal, el útero y la vulva. Barra 16 μ m.

Se estudió la expresión del animal transgénico *mai-2::gfp* en la sección posterior del nematodo. En el plano izquierdo se observó a MAI-2::GFP en las células sincisiales de la hipodermis, células “seam”, en las neuronas de la cola y en el músculo (Figura 25 A,B), mientras que en el plano focal central se observó en el citoplasma de las células rectales (Figura 25C).

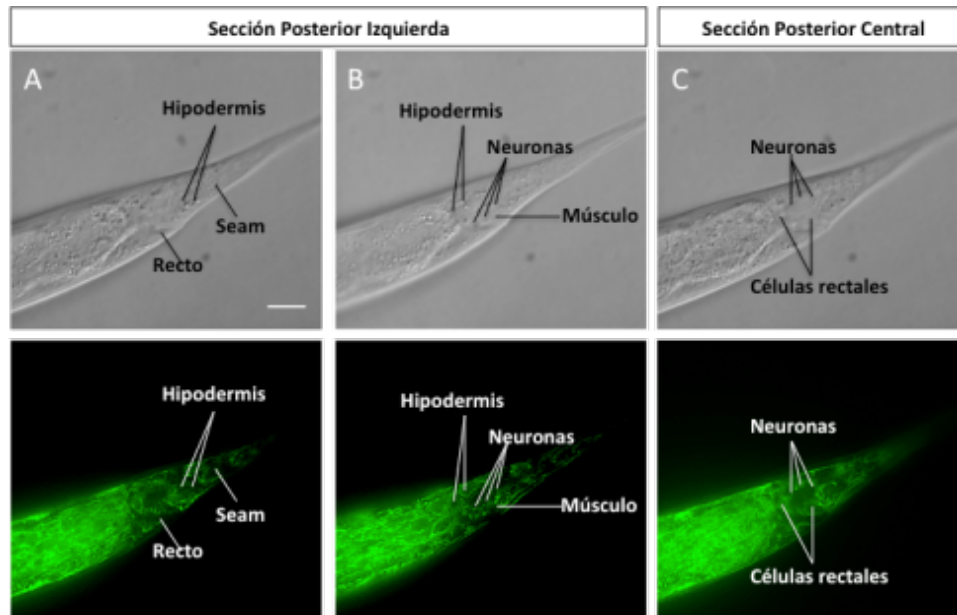


Figura 25. El animal transgénico *mai-2::gfp* se expresa en la parte posterior (cola) del nematodo. La proteína MAI-2::GFP se localiza en (A) el epitelio (hipodermis y células seam), (B) neuronas, músculo y (C) células rectales. Barra 16 μm .

Por otro lado, se estudio la localización del transgénico *mCherry::mai-1* de la misma manera que se hizo con el transgénico *mai-2::gfp*. Se estudió la sección anterior del nematodo y se observaron diferentes planos focales de izquierda a derecha. Se encontró que el transgénico *mCherry::mai-1* se localiza en las neuronas localizadas en el istmo de la faringe, en la zona sináptica del anillo neuronal, zona donde un gran número de cuerpos neuronales forman sinapsis (Figura 26A-D). También, se observó en dendritas provenientes de neuronas del anillo neuronal, que se extienden a la punta de la nariz del gusano (Figura 26B, flecha blanca).

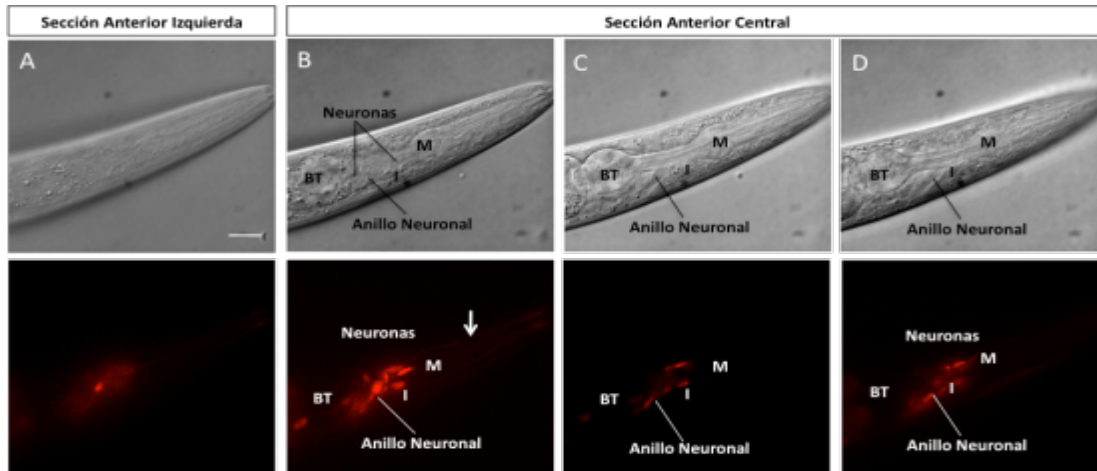


Figura 26. El transgénico *mCherry::mai-1* se expresa en ciertas neuronas de las cabezas del *C. elegans*. (A-D) Se observó la expresión en neuronas específicas, en la zona del istmo (I) de la faringe, entre el metacarpus (M) y el bulbo terminal (BT) y en dendritas (Figura 26B, flecha blanca). Barra 16 μm .

Se estudió la expresión del animal transgénico *mCherry::mai-1* en la parte media y posterior del nematodo. Se encontró expresión en la hipodermis (Figura 27A), a lo largo del intestino y en neuronas localizadas en el cordón ventral neuronal (Figura 27B). En la parte posterior del nematodo se observó la expresión del transgénico en neuronas de la cola del *C. elegans* (Figura 27C).

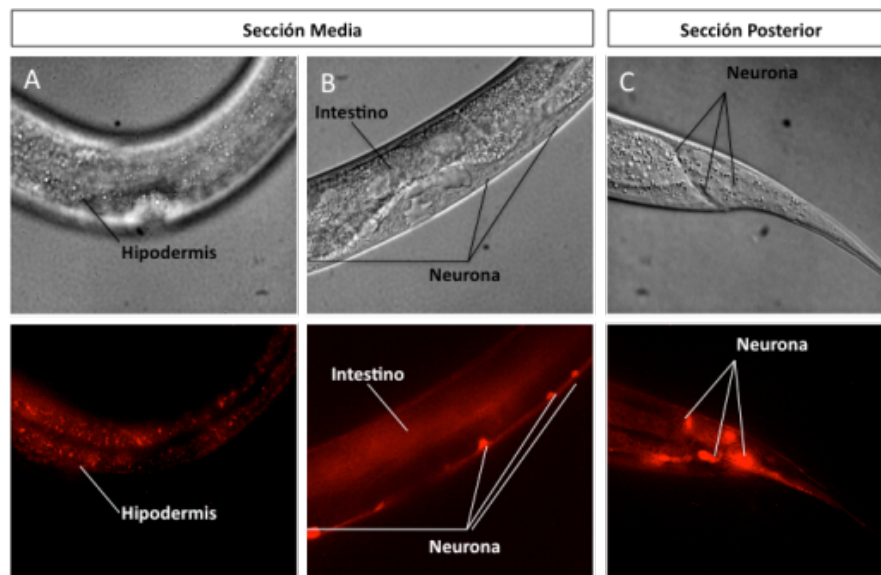


Figura 27. El animal transgénico *mCherry::mai-1* se localiza en el citoplasma del intestino y en algunas neuronas de la sección media y posterior del nematodo. El transgen se expresa (A) en la hipodermis, (B) a lo largo del intestino y (C) en las neuronas del cordón neuronal ventral y en las neuronas de la cola del nematodo

Los animales transgénicos *mai-2::gfp* y *mCherry::mai-1* se expresan en compartimientos celulares distintos.

Se estudió la expresión simultánea de los animales transgénicos *mai-2::gfp* y *mCherry::mai-1* en el nematodo, con el objetivo de conocer la relación espacial de expresión de ambos genes. El experimento se realizó cruzando a los animales transgénicos hermafroditas *mai-2::gfp* y con animales machos del animal transgénico *mCherry::mai-1*, los animales transgénicos que acarreaban la expresión de las dos construcciones fueron estudiados de la misma manera que se describió anteriormente. Se encontró que aunque las proteínas MAI-2::GFP y mCherry::MAI-1 se expresan en células neuronales e intestinales, no existe una co-localización evidente entre estos transgenes (Figura 28). Esto puede deberse a que ambas proteínas se localizan intracelularmente en estructuras distintas. Se sugiere que el transgen *mai-2::gfp* se localiza en las mitocondrias, mientras que no sabemos con precisión la localización intracelular del transgen *mCherry::mai-1*.

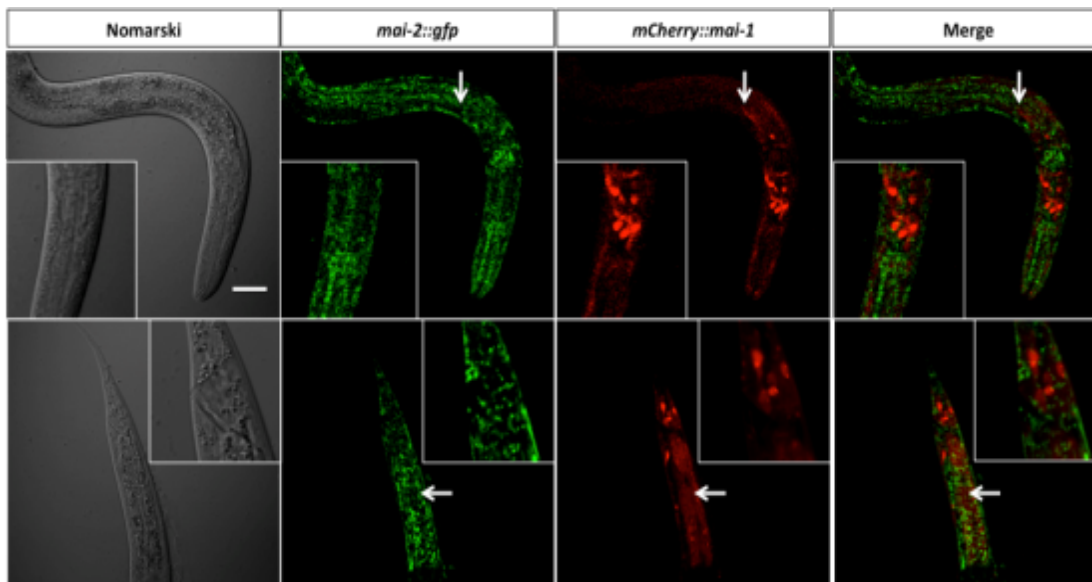


Figura 28. Los animales transgénicos *mai-2::gfp* y *mCherry::mai-1* no co-localizan en el nematodo. Por medio de la cruce entre los transgenes *mai-2::gfp* y *mCherry::mai-1* se encontró que las proteínas transgénicas no co-localizan en células neuronales e intestinales (flecha). Sin embargo, pueden encontrarse en las mismas células solo que en compartimientos diferentes. Barra 16µm.

El RNA de interferencia silenció considerablemente la expresión de los genes *mai-1* y *mai-2*.

Para estudiar el efecto de la disminución de la expresión de los genes *mai-1* y *mai-2* por medio del estudio de fenotipos, se silenció la expresión de los genes por medio de RNA de interferencia (RNAi). Para hacer RNAi se amplificaron por medio de PCR los genes *mai-1* y *mai-2* a partir de cDNA y se clonaron por separado en el plásmido pPD129.36 L4440 al cual en ausencia de insertos, nos referiremos a él como plasmado vacío (PV).

Para hacer RNAi por alimentación, los animales se alimentan con bacterias HT115(DE3) que acarrean RNA de doble cadena expresado a partir de los plásmidos pPD129.36 (PV), pPD129.36 L4440::*mai-1* y pPD129.36 L4440::*mai-2*. Una vez en el intestino del nematodo, el RNA de doble cadena se introduce a prácticamente todas las células a través del transportador de dsRNA (SID-1), con excepción de las neuronas que no cuentan con este transportador (Winston *et al.*, 2002). Una vez dentro de las células del nematodo el RNA de doble cadena es procesado por Dicer y ensamblado en el complejo RISC donde se lleva a cabo la degradación del mensajero de los genes de manera específica (Meister y Tuschel., 2004). Para hacer el RNAi se colocaron cuatro a cinco animales del estadio larvario L4 en cajas con bacterias que expresan cada construcción, se dejaron crecer hasta adultos y reproducirse generando la progenie, (F1). Los animales de la generación F1 se colectaron para analizar la eficacia del silenciamiento por medio de RT-PCR, por medio de la fluorescencia de los transgenes y por la cantidad de proteína por Western blot.

Para analizar por medio de RT-PCR la eficiencia del silenciamiento de los genes *mai-1* y *mai-2*, se crecieron animales PV, *mai-1(RNAi)* y *mai-2(RNAi)*, se colectaron para extraer el RNA por medio de Trizol (Invitrogen) para sintetizar el cDNA. Posteriormente, los genes *mai-1* y *mai-2* se amplificaron por medio de PCR.

Se observó una disminución en el mensajero de *mai-2* en aquellos animales *mai-2(RNAi)* comparado con la expresión de *mai-2* de los animales control (PV). La expresión del gen *mai-2* no se ve afectada por el silenciamiento de *mai-1* en los

animales *mai-1(RNAi)* (Figura 29A). Estos datos sugieren que es posible silenciar la expresión de *mai-2* y que el silenciamiento es específico.

Por otro lado, se observó un aumento en la expresión del mensajero de *mai-1* en animales *mai-1(RNAi)* comparado con la expresión de *mai-1* en los animales control (PV). La expresión de *mai-1* no se ve afectada por el silenciamiento de *mai-2* en los animales *mai-2(RNAi)* (Figura 29B). El gen *mai-1* se encuentra en un operón junto con los genes *gpd-2* y *gpd-3*, por lo que estudiar la expresión del gen contiguo *gpd-2* nos ayudaría a saber si el incremento en la expresión de *mai-1* en los animales *mai-1(RNAi)* se deba a un aumento en la transcripción de todo el operón como un mecanismo regulatorio en respuesta a la disminución de la expresión de *mai-1*.

Por medio de RT-PCR se estudió la expresión de *gpd-2* en animales control (PV) y animales *mai-1(RNAi)*. Se observó que no hay diferencia en los niveles de expresión del RNA mensajero del gen *gpd-2* con respecto al control (PV) sugiriendo que el aumento del mensajero de *mai-1*, no se debe al incremento de la transcripción del operón (Figura 29B). Otro posible mecanismo para explicar este fenómeno sería una posible estabilización del mensajero de *mai-1* debido a la presencia del RNA de interferencia.

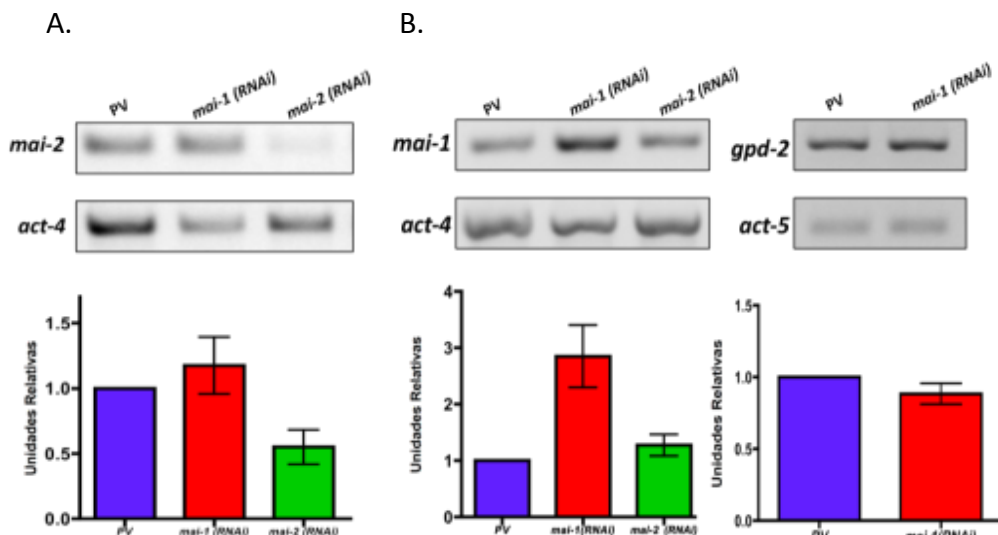


Figura 29. La expresión del RNA mensajero de *mai-2* disminuye en animales *mai-2(RNAi)* por el contrario el RNA mensajero de *mai-1* aumenta en animales *mai-1(RNAi)*. Por medio de RT-PCR se estudió la eficiencia de la disminución de la expresión de los genes *mai-1* y *mai-2* en animales RNAi. (A) El mensajero de *mai-2* disminuye en los animales *mai-2(RNAi)* comparado con animales control (PV) n=3. (B) El mensajero de *mai-1* aumenta inesperadamente en los animales *mai-1(RNAi)*, n=3, mientras

que el gen continuo en el operón *gpd-2* no se altera, sugiriendo que el incremento en la expresión de *mai-1* no se debe a un aumento de transcripción sino a la estabilización del mensajero n=3.

Corroboramos la eficiencia del silenciamiento midiendo directamente los niveles de expresión de la proteína transgénica MAI-2. Se alimentó al transgénico *mai-2::gfp* con bacterias HT115(DE3) que acarrean el plásmido vacío (pPD129.36 L4440) y al plásmido pPD129.36 L4440::*mai-2* y se analizó la fluorescencia de la F1 del transgénico. Se observó una disminución considerable en la fluorescencia de *mai-2::gfp* con respecto al control después del silenciamiento del gen *mai-2* (Figura 30A) indicando que el silenciamiento de este gen está también disminuyendo significativamente a la proteína MAI-2::GFP.

Por otro lado, se utilizó el anticuerpo anti-GFP para estudiar la eficiencia del silenciamiento de la cantidad de la proteína MAI-2::GFP en animales control (PV) y *mai-2(RNAi)* por medio de Western blot. Se observó una única banda de 35 kDa que corresponde al peso de MAI-2 (10 kDa) más el peso molecular de la proteína GFP (25 kDa). En los animales *mai-2(RNAi)* se observó una disminución considerable de la acumulación de la proteína MAI-2::GFP comprado con el control (PV) después del silenciamiento de *mai-2* (Figura 30B).

Por medio de estas tres técnicas: (1) RT-PCR; (2) fluorescencia y (3) Western blot, se pudo comprobar que de manera eficiente es posible disminuir la expresión de *mai-2* por RNAi.

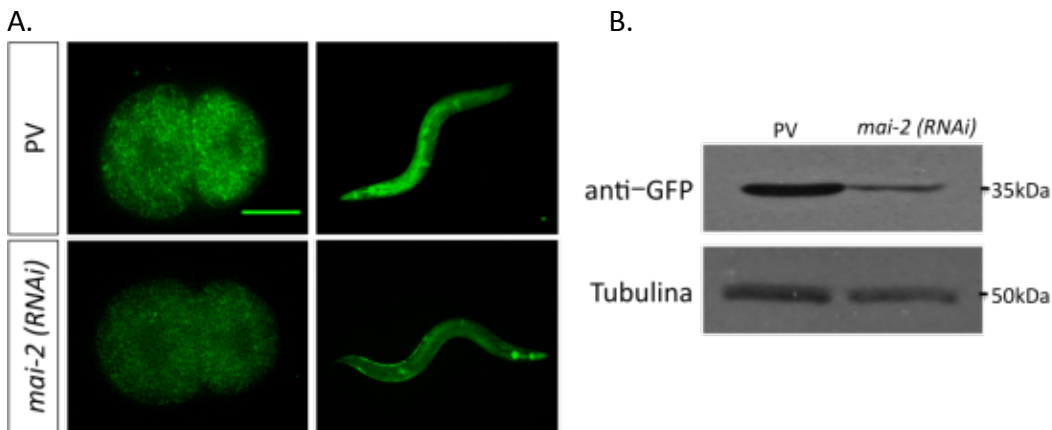


Figura 30. La expresión del transgénico *mai-2::gfp*, así como la acumulación de la proteína MAI-2 disminuye considerablemente al silenciar su gen por medio de RNAi. (A) Los animales de la cepa *mai-2::gfp*, PV y *mai-2 (RNAi)*, se montaron en placas de agarosa para comparar los niveles de fluorescencia entre los animales control y RNAi. Se observó la disminución de la fluorescencia tanto en embriones

(dos células) como en el animal entero. (B) Se realizó Western blot a partir de extractos proteicos provenientes de animales de la cepa *mai-2::gfp*, PV y *mai-2 (RNAi)*, se utilizó el anticuerpo anti-GFP, que reconoce de manera específica a la proteína GFP fusionada a MAI-2 (35 kDa). Se observó la disminución de la proteína MAI-2::GFP en los animales *mai-2 (RNAi)* comparada con animales control (PV).

Al igual que para el gen *mai-2*, se verificó por medio de fluorescencia la eficiencia del RNAi para el gen *mai-1*. Se utilizó a la cepa transgénica *mCherry::mai-1* la cual se alimentó de bacteria HT115(DE3) que acarrea el plásmido vacío (pPD129.36 L4440) y al plásmido pPD129.36 L4440::*mai-1*. Las bacterias previamente fueron inducidas con IPTG, para que acumularan el dsRNA y posteriormente los animales RNAi se observaron por microscopía de fluorescencia.

Se encontró que la fluorescencia de los animales transgénicos *mai-1 (RNAi)* disminuye en la hipodermis e intestino comparado con el control (PV), sin embargo la señal prevalece en neuronas y sus procesos en la cabeza, cuerpo y cola del nematodo (Figura 31). Generalmente, la técnica de RNAi por alimento es muy robusta en las células del *C. elegans* en excepción de las neuronas, debido a que estas células no expresan el transportador de RNA de doble cadena, SID-1, necesario para propagar la señal de RNAi de las células del animal a las neuronas. Por medio de la comparación de los niveles de fluorescencia entre los animales control (PV) y *mai-1(RNAi)* se observó la disminución de expresión de la proteína mCherry::MAI-1 de manera considerable en tejidos como la hipodermis y en el intestino, demostrando que el RNAi si se lleva a cabo aunque de manera ineficiente en las neuronas.

Debido a que no contamos con un anticuerpo contra la proteína mCherry no pudimos probar por Western blot la eficiencia del silenciamiento.

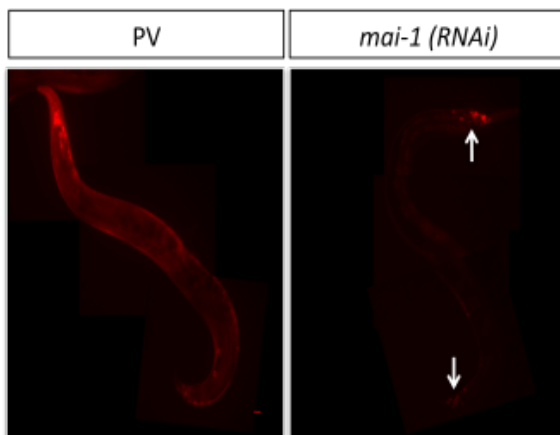


Figura 31 La expresión del transgénico *mCherry::mai-1* disminuye considerablemente en aquellos animales *mai-1(RNAi)* excepto en neuronas. Los animales transgénicos de la cepa *mCherry::mai-1*, PV y *mai-1 (RNAi)*, se montaron en placas de agarosa para comparar los niveles de fluorescencia entre los animales control y RNAi. Se observó la disminución de la fluorescencia en hipodermis e intestino, sin embargo la señal prevaleció en neuronas.

Los animales *mai-2 (RNAi)* presentaron una pérdida en la estructura de crestas mitocondriales.

Campanella y colaboradores (2008), encontraron una disminución en la formación de crestas mitocondriales al disminuir la expresión de la IF₁ en células HeLa por medio de siRNA. En ese estudio proponen que la IF₁ promueve la dimerización de ATP sintasa, favoreciendo la formación de crestas mitocondriales. De acuerdo con este antecedente y sabiendo que MAI-2 se encuentra en la mitocondria, la morfología mitocondrial por medio de microscopía electrónica en animales *mai-2(RNAi)* en estadio de adulto.

La cepa silvestre (N2) se incubó en presencia de la bacteria HT115(DE3) que acarrea RNA de doble cadena del plásmido vacío (pPD129.36 L4440) como un control y en presencia del plásmido pPD129.36 L4440::*mai-2*. Los animales control y *mai-2(RNAi)* se colectaron y se llevaron a la Unidad de Microscopía Electrónica (Facultad de Ciencias) donde se fijaron ambas muestras para hacer cortes y visualizarlas en el microscopio electrónico en una colaboración con el Dr. Luis F. Jiménez.

En las fotografías tomadas por microscopía electrónica se observó que las mitocondrias del músculo de la faringe y del intestino del animal control (PV), muestran una estructura con evidentes crestas tubulares (Figura 32). Por otro lado, como resultado preliminar, en los animales *mai-2(RNAi)* se observaron crestas desorganizadas, con una pérdida de la estructura tubular, característica que se observa en el control (PV).

Las mitocondrias del control (PV) y *mai-2(RNAi)* presentaron diferentes tamaños, esto se debe a la gran variedad de formas y tamaños que puede tener este organelo o al sitio de corte, no a un fenotipo ocasionado por la disminución de la expresión del gen *mai-2*.

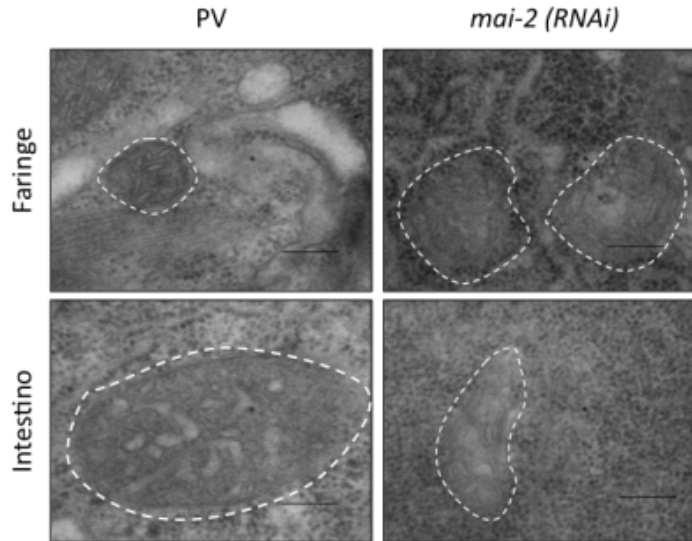


Figura 32. La morfología de las crestas mitocondriales de los animales *mai-2(RNAi)* se ve desorganizada. Se realizaron cortes de animales silvestres PV y *mai-2(RNAi)* en estadio de adulto y por medio de microscopía electrónica se observó en los tejidos de faringe e intestino, una desorganización de crestas en los animales *mai-2(RNAi)*, comparado con la morfología tubular de los animales silvestres. Las mitocondrias se delimitan con una línea discontinua.

Los animales *mai-1(RNAi)* y *mai-2(RNAi)* no presentaron defectos en la fertilidad pero sí un incremento en la apoptosis fisiológica.

Con el objetivo de estudiar el efecto de silenciar la expresión de los genes *mai-1* y *mai-2* por medio del estudio de fenotipos en la biología del desarrollo del nematodo, se silenció la función de los genes *mai-1* y *mai-2* por medio de RNAi (Figura 31 y 30) y se valoró su efecto en el organismo. Se encontró que los animales *mai-1(RNAi)* y *mai-2(RNAi)*, no presentan un fenotipo evidente en condiciones fisiológicas: su desarrollo, crecimiento, estructura anatómica y motilidad es igual a la cepa silvestre.

Con la finalidad de estudiar si la función de las proteínas MAI-1 y MAI-2 están relacionadas con la fertilidad del nematodo se hizo un análisis detallado del número de hijos que tienen los animales *mai-1(RNAi)* y *mai-2(RNAi)* comparados con los animales control (PV). Este experimento se realizó siguiendo animales individuales de la cepa silvestre (PV), animales *mai-1(RNAi)* y *mai-2(RNAi)* mientras tuvieron progenie (aproximadamente 3 días). Los animales se seleccionaron como larvas L4 y se colocaron de manera individual en una caja Petri con la bacteria HT115(DE3) que

expresa el PV y el dsRNA de los genes *mai-1* o *mai-2*. Los animales se movieron individualmente a cajas nuevas cada 24 horas hasta que dejaron de tener hijos (3 días después). Cada 24 hrs de haber transferido al adulto a la caja nueva se revisó al microscopio estereoscópico el número de larvas que había en las cajas de Petri.

Se observó que el número de progenie de los animales *mai-1(RNAi)* (107%) y *mai-2 (RNAi)*(93%) no presentaron disminución en el número de hijos con respecto al PV (100%) (Figura 33).

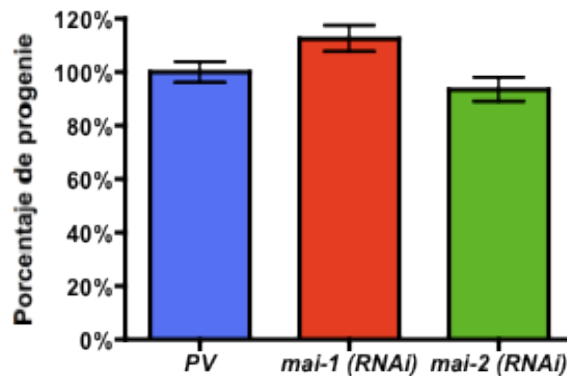


Figura 33. Los animales *mai-1(RNAi)* y *mai-2(RNAi)* no presentaron defectos en la fertilidad. Los animales en estadio L4 se incubaron en presencia de bacteria HT115(DE3) que acarrea el plásmido vacío y los plásmidos: pPD129.36 L4440::*mai-1* y pPD129.36 L4440::*mai-2*. Los animales se movieron individualmente a cajas nuevas cada 24 horas hasta que dejaron de tener hijos (3 días después) y la progenie se contó. No se encontraron diferencias significativas entre los animales *mai-1(RNAi)* y *mai-2(RNAi)* en el número de hijos por gusano con respecto al control (PV). Se realizaron dos experimentos, n=17, donde los animales plásmido vacío (PV) tuvieron un promedio de 239 hijos, los animales *mai-1(RNAi)* tuvieron 260 hijos, mientras que los animales *mai-2(RNAi)* tuvieron 223 hijos.

Los animales *mai-1(RNAi)* y *mai-2(RNAi)* muestran un incremento discreto en la apoptosis fisiológica de la gónada.

Campanella *et al.* (2009) encontraron que la proteína IF₁ protege de la muerte celular a células HeLa expuestas a hipoxia y privadas de glucosa. Al disminuir la expresión de la IF₁ por siRNA, observaron un incremento en la muerte celular de las células HeLa. Por lo tanto se investigó si los animales *mai-1(RNAi)* y *mai-2(RNAi)* presentan un aumento en la apoptosis en particular si se alteraba la apoptosis fisiológica de la gónada, la cual puede observarse en animales adultos.

Para facilitar el conteo de cuerpos apoptóticos se utilizó a la cepa *ced-1::gfp*, la cual expresa al transgen *Plim-7::ced-1::gfp*. La proteína CED-1 es una proteína

transmembranal que se expresa en células fagocíticas y que cuando hace contacto con un cuerpo apoptótico, la proteína se agrega alrededor del él. Bajo el promotor *lim-7*, se dirigió a esta construcción a las células de la vaina de la gónada, encargadas de fagocitar a las células germinales muertas (Zhou *et al.*, 2001).

Los animales de la cepa *ced-1::gfp* PV o *mai-2(RNAi)* en estadio de adulto se observaron con microscopía de fluorescencia para determinar los cuerpos apoptóticos por brazo de gónada. Los animales control (PV) presentaron un promedio de seis cuerpos apoptóticos por brazo de gónada, mientras que los animales *mai-1(RNAi)* y *mai-2(RNAi)* presentaron un incremento discreto pero significativo de 8.5 y 7.5 cuerpos apoptóticos por brazo de gónada respectivamente (Figura 34) sugiriendo que MAI-1 y MAI-2 tienen un efecto en la muerte celular por apoptosis.

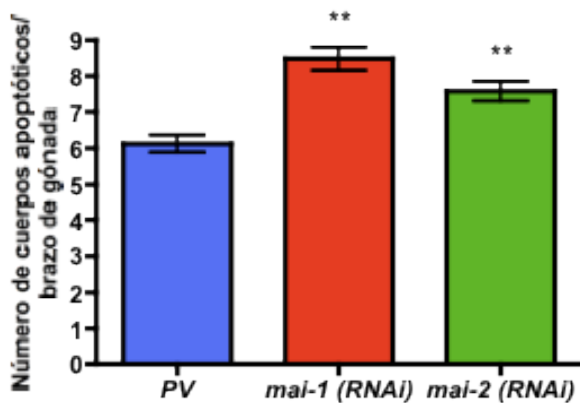


Figura 34. Los animales *mai-1(RNAi)* y *mai-2(RNAi)* presentaron un aumento discreto pero significativo en la apoptosis fisiológica. Los animales de la cepa *ced-1::gfp*, animales control (PV), *mai-1(RNAi)* y *mai-2(RNAi)* en estadio de adulto se colocaron en colchones de agarosa para contar los cuerpos apoptóticos por brazo de gónada. En los animales *mai-1(RNAi)* y *mai-2(RNAi)* se observó un aumento significativo en la apoptosis fisiológica con respecto al control ($p < 0.01$). El experimento se repitió seis veces, $n = 135$

DISCUSIÓN

Se ha encontrado que la F_0F_1 ATP sintasa se localiza en la membrana plasmática de células endoteliales (Moser *et al.*, 1999) y en hepatocitos (Martínez *et al.*, 2003) ejerciendo una función de receptor celular para ligandos aparentemente no relacionados con la síntesis de ATP. En hepatocitos, la actividad de ATP sintasa ectópica se encontró regulada por la proteína IF_1 y en endotelio se encontró que además de la mitocondria, está localizada en la membrana plasmática (Cortés-Hernández *et al.*, 2005). Además se ha identificado que interacciona con la proteína CaM y forma el complejo IF_1 - Ca^{2+} -CaM afuera de la mitocondria (Contessi *et al.*, 2005). Estos trabajos demuestran que además de su función conocida y ampliamente descrita como inhibidora de la reacción de hidrólisis de la ATPasa en la mitocondria, la IF_1 tiene un rol fisiológico en el citoplasma. Resulta interesante que en el género *Caenorhabditis* existen dos proteínas inhibidoras de la ATPasa, llamadas MAI-1 y MAI-2, que se codifican por dos genes independientes, localizados en cromosomas distintos y que respectivamente se predice tienen una localización citoplásmica y mitocondrial (Ichikawa *et al.*, 2006).

Con el objetivo de entender la localización de las proteínas MAI-1 y MAI-2 en el nematodo *in vivo*, hicimos los animales transgénicos *mCherry::mai-1* y *mai-2::gfp*. A diferencia de los transgenes del grupo de Ichikawa *et al.* (2006) que se expresaron bajo el promotor *gal-1* y se estudiaron en la levadura, nuestros transgenes se encuentran regulados bajo el promotor de cada uno de los genes, conservan intrones y el 3'UTR de cada gen; secuencias de regulación que favorecieron la expresión de los transgenes en el nematodo.

Ichikawa *et al.* (2006) encontraron que la proteína MAI-2 se asocia a redes mitocondriales en levadura e inhibe a la ATPasa de levadura de manera pH dependiente, concluyendo que la proteína MAI-2 es la proteína homóloga a IF_1 . Apoyando los datos de Ichikawa *et al.* (2006) en este trabajo por primera vez se observó el patrón de expresión de la IF_1 en un organismo completo y vivo. Encontramos que la proteína MAI-2 se expresa constitutivamente en el citoplasma, asociado a las

mitocondrias del nematodo. La expresión ocurre en todos los tejidos del organismo y su expresión se observó en todas las etapas embrionarias y larvianas. A diferencia de los animales transgénicos *mai-2::gfp*, los animales *mCherry::mai-1* se expresan en el citoplasma e inclusive no puede descartarse que también esté presente en los núcleos de las células neuronales. La expresión ocurre en tejidos específicos del animal, tal es el caso de la hipodermis, neuronas y en el intestino. Además a diferencia de la proteína MAI-2, MAI-1 comienza a expresarse en estadios embrionarios tardíos, la detección de la expresión comenzó en la etapa de gástrula. La localización de la proteína MAI-1 fue inesperada y abre la pauta para el diseño de estrategias de silenciamiento de su expresión más eficientes y ensayos fenotípicos con el objetivo de entender su función en estos tejidos.

Por otro lado, en este estudio se evaluó la eficiencia del silenciamiento de la expresión por medio de RNAi de los genes *mai-1* y *mai-2*, con el objetivo de utilizar esta metodología para evaluar el efecto, por medio del estudio de fenotipos en el animal entero, de la disminución de las proteínas MAI-1 y MAI-2 en la biología del desarrollo del nematodo y en la biología mitocondrial.

El silenciamiento de la expresión de *mai-2* se consideró eficiente, ya que se observó una disminución considerable en el mensajero de *mai-2*, en la fluorescencia y cantidad de proteína de MAI-2::GFP en los animales *mai-2(RNAi)* comparados con el control (PV), sin embargo al evaluar la eficiencia del silenciamiento de *mai-1* en los animales *mai-1(RNAi)* por medio de la fluorescencia del transgen *mCherry::mai-1*, se observó una disminución considerable en la fluorescencia de la hipodermis y a los largo del intestino comparado con el control (PV), pero su expresión permanece intensa en las neuronas. Pudimos concluir que sí es posible silenciar de manera parcial la expresión de *mai-1* por medio de RNAi.

Por otro lado, por medio de RT-PCR se observó un aumento en la expresión del mensajero de *mai-1*, cuando se gen silenció con RNAi. El gen *mai-1* forma parte de un operón junto con los genes *gpd-2* y *gpd-3*, al estudiar la expresión de *gpd-2* en los animales *mai-1(RNAi)* no se observó un aumento en la expresión de *gpd-2*, sugiriendo

que no ocurre un aumento en la transcripción del operón. Más bien, en condiciones de silenciamiento, la estabilidad y la acumulación del mensajero aumentan como consecuencia del arresto en la traducción del mensajero.

Posteriormente se evaluó el fenotipo de los nematodos al silenciar a los genes *mai-1* y *mai-2*. Se encontró que los animales *mai-1(RNAi)* y *mai-2(RNAi)*, no presentan un fenotipo evidente en condiciones fisiológicas: su desarrollo, crecimiento, estructura anatómica, motilidad y número de progenie es silvestre. Lo que nos obliga en un futuro a retar a los animales RNAi a condiciones de anoxia o a privación de alimento. La anoxia resultaría una situación de estrés interesante para evaluar en los animales *mai-1(RNAi)* y *mai-2(RNAi)*. Padilla *et al.* (2006) estudiaron que *gpd-2* y *gpd-3*, genes continuos en el operón de *mai-1*, son indispensables para la sobrevivencia del nematodo en condiciones de anoxia; se ha visto que los genes que se encuentran en operones del *C. elegans* generalmente tienen funciones relacionadas, por lo que *mai-1* podría estar relacionado con la sobrevivencia del nematodo en condiciones de anoxia (Blumenthal y Gleason., 2003). Además, en situaciones de anoxia la proteína MAI-2 se une a la ATPasa para prevenir la hidrólisis de ATP y mantener las funciones celulares. La privación de glucosa es un estrés que evita la recuperación de la homeostasis de ATP proveniente de la glucólisis y permitiría con mayor facilidad observar un fenotipo. Estos tipos de estrés ya han sido aplicados por Campanella *et al.* (2008) y Fujikawa *et al.* (2012), lo que les permitió estudiar el fenotipo provocado como consecuencia de la disminución de la expresión de IF₁ en células HeLa y levaduras respectivamente.

En este trabajo evaluamos el efecto del silenciamiento de los genes *mai-1* y *mai-2* en la apoptosis fisiológica de las células germinales y se encontró que los animales *mai-1(RNAi)* y *mai-2(RNAi)* tienen un aumento discreto pero significativo en el número de cuerpos apoptóticos. Estos datos sugieren que las proteínas tienen un efecto protector ante la muerte por apoptosis de las células germinales. Nuestros datos sustentan lo observado por el grupo de Campanella *et al.* (2008) que encontraron que al silenciar a la IF₁ en células HeLa aumenta la muerte celular en condiciones de estrés (anoxia y privación de glucosa). La disminución de la proteína MAI-2 podría según

Campanella *et al.* (2009) incrementar el potencial de membrana y aumentar la producción de especies reactivas de oxígeno, situación de estrés que podría inducir la muerte de las células germinales por apoptosis (Salinas *et al.* 2006) .

Por último, Campanella *et al.* (2008) evaluaron la morfología de las crestas mitocondriales en animales con la IF₁ silenciada por siRNA y encontraron que las mitocondrias de células HeLa, presentan crestas desorganizadas y una disminución dramática en el número de crestas. Por otro lado, Fujikawa *et al.* (2012), al disminuir permanentemente con una infección retroviral la expresión de IF₁ en células HeLa, no encontraron ningún defecto en la ultraestructura de las mitocondrias. Fujikawa *et al.*, (2012) explican que esto podría deberse a que el método para silenciar la expresión de IF₁ es permanente a comparación de Campanella *et al.*, (2008) cuyo método de silenciamiento es temporal y cualquier cambio morfológico temporal podría haber sido ignorado por ellos. En este trabajo, como resultado preliminar, también evaluamos la morfología mitocondrial por microscopía electrónica y encontramos que los animales *mai-2(RNAi)* tienen una pérdida en el arreglo tubular de las crestas mitocondriales, sin embargo no se observó una disminución evidente en el número de crestas mitocondriales como lo observó Campanella *et al.* (2008). Las diferencias posiblemente son consecuencia de que estos estudios se realizaron en animales vivos, donde la disminución de IF₁ es efectiva y permanente, al igual que Fujikawa *et al.*,(2012), por lo que pudimos haber ignorado la disminución temporal de crestas observadas por el grupo Camapanella *et al.* (2008).

CONCLUSIONES

1. El patrón de expresión de los animales *mai-2::gfp* se observó en el sistema epitelial, muscular, digestivo, reproductivo, nervioso y excretor.
2. El patrón de expresión de los animales transgénicos *mCherry::mai-1* se observó únicamente en determinadas neuronas de la cabeza, cola y parte media del nematodo, en hipodermis y en las células intestinales.
3. La proteína MAI-2::GFP se expresa durante la fertilización, etapas de proliferación y durante las etapas de morfogénesis/organogénesis de la embriogénesis.
4. La proteína mCherry::MAI-1 se expresa en etapas tardías de la embriogénesis.
5. Los animales transgénicos *mCherry::mai-1* y *mai-2::gfp* se expresaron a lo largo de todos los estadios larvarios y en el adulto.
6. Las proteínas MAI-2::GFP y mCherry::MAI-1 no presentaron una colocalización evidente.
7. Por medio de las técnicas de Western blot, fluorescencia y RT-PCR se comprobó que es posible por medio de RNAi silenciar de manera eficiente la expresión de *mai-2*.
8. Por medio de RT-PCR se observó un aumento en la expresión del mensajero de *mai-1* en animales *mai-1(RNAi)*, sin embargo por medio de la fluorescencia de los animales *mCherry::mai-1* se observó una disminución de la proteína mCherry::MAI-1 en la hipodermis y en el intestino, por lo que es posible de manera parcial silenciar la expresión de *mai-1*.
9. Los animales *mai-1(RNAi)* y *mai-2(RNAi)* no presentaron defectos en la movilidad, la fertilidad, la estructura anatómica, el desarrollo y el crecimiento.
10. Los animales *mai-1(RNAi)* y *mai-2(RNAi)* presentaron un aumento discreto, pero significativo, en la apoptosis de la línea germinal.
11. Como resultado preliminar, los animales *mai-2(RNAi)* presentaron un desarreglo discreto en la organización de las crestas mitocondriales

PERSPECTIVAS

1) Se estudiará la función de las proteínas MAI-1 y MAI-2 por separado y en conjunto en el desarrollo del nemátodo *C. elegans*.

Se silenciará la expresión de *mai-1*, *mai-2* y *mai-1/2* por medio de RNA de interferencia y se analizará: i) la fertilidad y letalidad embrionaria por medio del conteo de larvas y embriones muertos (únicamente para *mai-1/2*); ii) la morfología del sistema reproductor por medio de microscopía Nomarski y iii) la apoptosis fisiológica (únicamente para *mai-1/2*) y por diferentes tipos de estrés (oxidativo, hipoxia, ayuno, calórico y daño a DNA).

2) Se evaluará la función mitocondrial de los animales *mai-2(RNAi)*.

Se silenciará por medio de RNA de interferencia la expresión de *mai-2* y en el animal entero y se determinará: i) la estructura mitocondrial por medio de microscopía electrónica; ii) el consumo de oxígeno por medio de oximetría; iii) la concentración de ATP se determinará por luciferil-luciferasa y los niveles de especies reactivas de oxígeno se cuantificarán con ayuda de diclorofluoresceína; iv) se aislará la ATP sintasa por solubilización con digitonina de los animales RNAi y se cuantificará la cantidad de ATPasa monomérica y dimérica por medio de geles azules nativos.

3) Se determinará la localización anatómica de la proteína MAI-1.

Se identificarán las neuronas en las que se expresa la proteína mCherry::MAI-1. Como se conoce la localización y función de algunas neuronas en *C. elegans*, podría por medio de cruces entre la cepa *mCherry::mai-1* y diferentes cepas transgénicas conocer su función.

BIBLIOGRAFÍA

Acehan D., Y. Xu, D.L. Stokes, M. Schlame, (2007). "Comparison of lymphoblast mitochondria from normal subjects and patients with Barth syndrome using electron microscopic tomography." *Lab Invest* 87(1): 40-48

Allen R. (1995). "Membrane tubulation and proton pumps". *Protoplasma* 189:1-8.

Arnold, I., Pfeiffer, K., Neupert, W., Stuart, R.A., y Schagger, H. (1998). "Yeast mitochondrial F_0F_1 -ATP synthase exists as a dimer: identification of three dimer-specific subunits". *EMBO J* 17:7170-7178

Bione, S., P. D'Adamo, E. Maestrini, A.K. Gedeon, P.A. Bolhuis, D. Toniolo (1996). "A novel X-linked gene, G4.5, is responsible for Barth syndrome". *Nat. Genet.* 12:385-389

Bird A.F. and Bird J. (1991). "The structure of nematodes". Academic Press, California

Blumenthal, T. y Gleason, K.S. (2003). "*Caenorhabditis elegans* operons: form and function". *Nature reviews Genetics* 4:112-20

Bucher, E.A. y Seydoux, G. (1994). "Gastrulation in the nematode *Caenorhabditis elegans*". *Sem. Dev. Biol.* 5:121-130.

Burwick, N. R., M. L. Wahl, Fang, J. Moser, T. L Li, B. Capaldi, R. A. Kenan, D. Pizzo, S. V. Zhong, Z. (2005). "An Inhibitor of the F1 subunit of ATP synthase (IF_1) modulates the activity of angiotensin on the endothelial cell surface." *J Biol Chem* 280(3): 1740-1745

Byerly, L., Cassada, R.C. y Russell, R.L. (1976) "The life cycle of the nematode *Caenorhabditis elegans*". *Dev. Biol.* 51:23-33

Cabezón, E., Butler, P.J., Runswick, M.J., y Walker, J.E. (2000a). "Modulation of the oligomerization state of the bovine F_1 -ATPase inhibitor protein, IF_1 , by pH". *J Biol Chem* 275:25460-25464

Cabezón, E., Arechaga, I., Jonathan, P., Butler, G., y Walker, J.E. (2000b). "Dimerization of bovine F_1 -ATPase by binding the inhibitor protein IF_1 ". *J Biol Chem* 275:28353-28355

Cabezón, E., Runswick, M.J., Leslie, A.G., and Walker, J.E. (2001). "The structure of bovine IF_1 , the regulatory subunit of mitochondrial F-ATPase". *EMBO J* 20, 6990-6996

Campanella, M., Casswell, E., Chong, S., Farah, Z., Wieckowski, M.R., Abramov, A.Y., Tinker, A., and Duchon, M.R. (2008). "Regulation of mitochondrial structure and

function by the F_1F_0 -ATPase inhibitor protein, IF₁". Cell Metab 8:13-25

Campanella, M., Seraphim, A., Abeti, R., Casswell, E., Echave, P., and Duchen, M.R. (2009a). "IF₁, the endogenous regulator of the F_0F_1 -ATP synthase, defines mitochondrial volume fraction in HeLa cells by regulating autophagy". Biochim Biophys Acta 1787: 393-401

Campanella, M., Parker, N., Tan, C.H., Hall, A.M., and Duchen, M.R. (2009b). "IF₁: setting the pace of the F_1F_0 -ATP synthase" Trends Biochem Sci 34:343-350.

Cassada, R.C., y Russell, R.L. (1975). "The dauer larva, a post-embryonic developmental variant of the nematode *Caenorhabditis elegans*." Dev Biol 46:326-342

Celotto, A.C. Frank, S.W. McGrath, T. Fergestad, W.A. Van Voorhies, K.F. Buttle, C.A. Mannella, M.J. Palladino. (2006). "Mitochondrial encephalomyopathy in *Drosophila*" J. Neurosci. 26:810–820

Cintron, N.M., Pedersen, P.L. (1979). "Purification of an ATPase inhibitor peptide fraction from rat liver mitochondria". Methods Enzymol 55:408-414

Contessi, S., Haraux, F., Mavelli, I., and Lippe, G. (2005). "Identification of a conserved calmodulin-binding motif in the sequence of F_0F_1 -ATP synthase inhibitor protein". J Bioenerg Biomembr 37:317-326

Contessi, S., Comelli, M., Cmet, S., Lippe, G., Mavelli, I. (2007). "IF(1) distribution in HepG2 cells in relation to ecto- F_0F_1 -ATP synthase and calmodulin". J Bioenerg Biomembr 39, 291-300

Cortes-Hernandez, P., Dominguez-Ramirez, L., Estrada-Bernal, A., Montes-Sanchez, D.G., Zentella-Dehesa, A., de Gomez-Puyou, M.T., Gomez-Puyou, A., Garcia, J.J. (2005). "The inhibitor protein of the F_0F_1 -ATP synthase is associated to the external surface of endothelial cells. Biochem Biophys Res Commun 330: 844-849

Daniel M. Bollag, Stuart J. Edelstein (1991). Protein Methods, Ed. Wiley-Liss, Páginas 108-123

Dudkina, N.V., Heinemeyer, J., Keegstra, W., Boekema, E.J., Braun, H.P. (2005). "Structure of dimeric ATP synthase from mitochondria: an angular association of monomers induces the strong curvature of the inner membrane" FEBS Lett 579, 5769-5772

Dudkina, N.V., Sunderhaus, S., Braun, H.P., Boekema, E.J. (2006). "Characterization of dimeric ATP synthase and cristae membrane ultrastructure from *Saccharomyces* and *Polytomella* mitochondria". FEBS Lett 580, 3427-3432

Ernster, L., G. Schatz (1981). "Mitochondria: a historical review". J Cell Biol 91:227s–255s

Fillingame, R.H., Angevine, C.M., Dmitriev, O.Y. (2003). "Mechanics of coupling proton movements to c-ring rotation in ATP synthase". FEBS Lett 555:29-34

Fujikawa, M., Imamura, H., Nakamura, J., Yoshida, M. (2012). "Assessing actual contribution of IF₁, inhibitor of mitochondrial F₀F₁, to ATP homeostasis, cell growth, mitochondrial morphology, and cell viability". J Biol Chem 287:18781-18787

Frey, T. G. and C. A. Mannella (2000). "The internal structure of mitochondria." Trends Biochem Sci 25(7):319-324

Frokjaer-Jensen, C., Davis, M.W., Hollopeter, G., Taylor, J., Harris, T.W., Nix, P., Lofgren, R., Prestgard-Duke, M., Bastiani, M., Moerman, D.G., (2010). "Targeted gene deletions in *Caenorhabditis elegans* using transposon excision" Nat Methods 7: 451-453

García-Hernández E., Fernández Velasco A. (2008). Advances in Protein Physical Chemistry, Ed. Transworld Research Network, 17: 351-385

García, J.J., E. Morales-Ríos, P. Cortés-Hernandez, J.S. Rodríguez-Zavala (2006) "The inhibitor protein (IF1) promotes dimerization of the mitochondrial F₀F₁-ATP synthase" Biochemistry 45:12695–12703

Gartner, P. Boag, and T. Blackwell (2008). "Germline Survival and Apoptosis" WormBook, ed. The C. elegans Research Community, WormBook, <http://www.wormbook.org>

Girvin, M.E., Rastogi, V.K., Abildgaard, F., Markley, J.L., Fillingame, R.H. (1998). "Solution structure of the transmembrane H⁺-transporting subunit c of the F₀F₁-ATP synthase". Biochemistry 37, 8817-8824

Gumienny, T.L., Lambie, E., Hartweg, E., Horvitz, H.R. Hengartner, M.O. (1999) "Genetic control of programmed cell death in the *Caenorhabditis elegans* hermaphrodite germline". Development 126: 1011-1022

Heckman KL, Pease LR. (2007) "Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension". Nat Protoc.;2(4):924-32

Hengartner, M.O. (1997). "Apoptosis and the shape of death". Dev. Genet. 21:245-248

Ichikawa N, Yoshida Y, Hashimoto T, Ogasawara N, Yoshikawa H, Imamoto F., Tagawa K (1990). "Activation of ATP hydrolysis by an uncoupler in mutant mitochondria lacking an intrinsic ATPase inhibitor in yeast" J Biol Chem 265:6274–6278

Ichikawa N, Ogura C. (2003). "Overexpression, Purification, and Characterization of Human and Bovine Mitochondrial ATPase Inhibitors: Comparison of the Properties of Mammalian and Yeast ATPase Inhibitors" J Bioenerg Biomembr 35:399–407

Ichikawa, N., Ando, C., Fumino, M. *Caenorhabditis elegans* MAI-1 protein, which is similar to mitochondrial ATPase inhibitor (IF₁), can inhibit yeast FOF1-ATPase but cannot be transported to yeast mitochondria. (2006) Journal of bioenergetics and biomembranes 38: 93-9

Jiang, X. y X. Wang (2004). "Cytochrome c-mediated apoptosis". Annu Rev Biochem 73:87–106.

Lane, N. (2010). "Why Are Cells Powered by Proton Gradients?" Nature Education 3(9):18

Lewis, J.A., Fleming J.T. (1995). "Basic culture methods. In *Caenorhabditis elegans*, Modern biological analysis of an organism" (ed. Epstein, H.F. and Shakes, D.C.). Chapter 1. pp 4-27. Academic Press, California

Lill, R., U. Muhlenhoff (2006). "Iron–sulfur protein biogenesis in eukaryotes: components and mechanisms". Annu Rev Cell Dev Biol. 22: 457–486

Martin, W., Mentel, M. (2010) The Origin of Mitochondria. Nature Education 3(9):58

Matsubara H, Hase T, Hashimoto T, Tagawa K (1981). "Amino Acid Sequence of an Intrinsic Inhibitor of Mitochondrial ATPase from Yeast" J Biochem 90:1159–1165

Meister, G., Tuschl, T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. Group 431, 343-349 (2004).

Mendenhall, A.R., La Rue, B., Padilla, P. (2006). "Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase mediates anoxia response and survival in *Caenorhabditis elegans*". Genetics 174, 1173-87

Miller, M.A., Nguyen, V.Q., Lee, M.H., Kosinski, M., Schedl, T., Caprioli, R.M., Greenstein, D. (2001). "A sperm cytoskeletal protein that signals oocyte meiotic maturation and ovulation". Science 291: 2144-2147

Minauro-Sanmiguel, F., Wilkens, S., Garcia, J.J. (2005). "Structure of dimeric mitochondrial ATP synthase: novel F₀ bridging features and the structural basis of

mitochondrial cristae biogenesis". Proc Natl Acad Sci U S A 102, 12356-12358

Moser, T.L., Stack, M.S., Asplin, I., Enghild, J.J., Hojrup, P., Everitt, L., Hubchak, S., Schnaper, H.W., Pizzo, S.V. (1999). Angiostatin binds ATP synthase on the surface of human endothelial cells. Proc Natl Acad Sci U S A 96, 2811-2816

Neupert, W. y J.M. Herrmann. (2007) "Translocation of proteins into mitochondria". Annu Rev Biochem. 76:723–749

Paumard, P., Arselin, G., Vaillier, J., Chaignepain, S., Bathany, K., Schmitter, J.M., Brethes, D., Velours, J. (2002). "Two ATP synthases can be linked through subunits i in the inner mitochondrial membrane of *Saccharomyces cerevisiae*". Biochemistry 41, 10390-10396

Praitis, V., Casey, E., Collar, D., Austin, J. (2001) "Creation of low-copy integrated transgenic lines in *Caenorhabditis elegans*". Genetics 157:1217–1226

Pullman, M.E., Monroy, G.C. (1963). "A Naturally Occurring Inhibitor of Mitochondrial Adenosine Triphosphatase". J Biol Chem 238:3762-3769

Rasmussen, N. (1995). "Mitochondrial structure and the practice of cell biology in the 1950s" J Hist Biol 28:381–429

Salinas, L.S., Maldonado, E., Navarro, R.E. (2006). "Stress-induced germ cell apoptosis by a p53 independent pathway in *Caenorhabditis elegans*". Cell Death Differ 13, 2129-2139

Sánchez-Cenizo, L., Laura Formentini, Marcos Aldea, Alvaro D. Ortega, Paula García-Huerta, María Sanchez-Arago., Jose M. Cuezva (2010). Up-regulation of the ATPase inhibitory factor 1 (IF₁) of the mitochondrial H⁺-ATP synthase in human tumors mediates the metabolic shift of cancer cells to a Warburg phenotype. The Journal of biological chemistry 285, 25308-13

Schedl, T. (1997). "Developmental Genetics of the Germ Line". In *C. elegans II* (ed. D. L. Riddle et al.). chap. 10. pp. 417-500. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York

Schon E., S. Santra, F. Pallotti, M.E. Girvin (2001). "Pathogenesis of primary defects in mitochondrial ATP synthesis" Semin. Cell. Dev. Biol. 12:441–448

Soubannier V., J. Vaillier, P. Paumard, B. Couлары, J. Schaeffer, J. Velours (2002). "In the absence of the first membrane-spanning segment of subunit 4(b), the yeast ATP synthase is functional but does not dimerize or oligomerize" J. Biol. Chem. 277:10739–10745.

Spieth, J., Brooke, G., Kuersten, S., Lea, K., Blumenthal, T. (1993). "Operons in *C. elegans*: polycistronic mRNA precursors are processed by trans-splicing of SL2 to downstream coding regions". *Cell* 73:521-532

Strauss, M., Hofhaus, G., Schroder, R.R., Kuhlbrandt, W. (2008). Dimer ribbons of ATP synthase shape the inner mitochondrial membrane. *EMBO J* 27, 1154-1160

Sulston, J.E., Schierenberg, E., White, J.G., Thomson, J.N. (1983). "The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*." *Dev Biol* 100: 64-119

Timmons, L., Fire, (1998). "Specific interference by ingested dsRNA". *Nature* 395(6705):854

Trifunovic, A. Wredenberg, M. Falkenberg, J.N. Spelbrink, A.T. Rovio, C.E. Bruder, Y.M. Bohlooly, S. Gidlof, A. Oldfors, R. Wibom, J. Tornell, H.T. Jacobs, N.G. Larsson, (2004). "Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase". *Nature* 429:417-423

Vaillier, J., Arselin, G., Graves, P.V., Camougrand, N., Velours, J. (1999). "Isolation of supernumerary yeast ATP synthase subunits e and i. Characterization of subunit i and disruption of its structural gene ATP18". *J Biol Chem* 274:543-548

Von Ehrenstein, G., Schierenberg, E. (1980). "Cell lineages and development of *Caenorhabditis elegans* and other nematodes". In *Nematodes as biological models Vol. I, Behavioral and developmental models* (ed. Zuckerman, B.M.). Chapter 1. pp 2-68. Academic Press, New York

Wallace (2005). "A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine". *Annu Rev Genet* 39:359-407

Winston, W. M., Molodowitch, C., Hunter, C. P. (2002). Systemic RNAi in *C. elegans* requires the putative transmembrane protein SID-1. *Science*, 295:2456-9

Wittig, I., Velours, J., Stuart, R., Schagger, H. (2008). Characterization of domain interfaces in monomeric and dimeric ATP synthase. *Mol Cell Proteomics* 7:995-1004.

Wittig, I., and Schagger, H. (2009). "Supramolecular organization of ATP synthase and respiratory chain in mitochondrial membranes". *Biochim Biophys Acta* 1787:672-680.

Wood, W.B.. (1988). "Introduction to *C. elegans* biology". In *The nematode C. elegans* (ed. W.B. Wood). Chapter 1. pp 1-16. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York

WormAtlas, Altun, Z.F., Herndon, L.A., Crocker, C., Lints, R. and Hall, D.H. (ed.s) 2002-2012. <http://www.wormatlas.org>

Yochem, J. Nomarski images for learning the anatomy, with tips for mosaic analysis (January 24, 2006), *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.100.1, <http://www.wormbook.org>.

Yoshida M., E. Muneyuki, T. Hisabori (2001). "ATPase synthase-A marvellous engine" 2:669-677

Zeiser E, Christian Frøkjær-Jensen, Erik Jorgensen, Julie Ahringer (2001). "MosSCI and Gateway Compatible Plasmid Toolkit for Constitutive and Inducible Expression of Transgenes in the *Caenorhabditis elegans* Germline" PLoS One. 2011;6(5)

Zick, M., R. Rabl, Reichert, A.S. (2009). "Cristae formation-linking ultrastructure and function of mitochondria." *Biochim Biophys Acta* 1793(1): 5-19

Zheng Zhou, Erika Hartweg, H. Robert Horvitz. (2001) CED-1 Is a Transmembrane Receptor that Mediates Cell Corpse Engulfment in *Caenorhabditis elegans* Cell, Vol. 104, 43–56