

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

El silenciamiento del gen *oma-1* afecta la expresión de *ced-9/bcl-2* en las células germinales del nemátodo *Caenorhabditis elegans*

TESIS

Que para obtener el título de
Licenciado en Investigación Biomédica Básica

Presenta
Javier García Morfín

Directora de tesis
Dra. Rosa E. Navarro González

México, D.F., Febrero 2014



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.

El silenciamiento del gen *oma-1* afecta la expresión de *ced-9/bcl-2* en las células germinales del nematodo *Caenorhabditis elegans*

RESUMEN

La apoptosis es un tipo de muerte celular programada altamente conservada en los metazoarios, cuya vía molecular fue descrita en el nematodo de vida libre *Caenorhabditis elegans*. Además de la apoptosis normal o fisiológica que se lleva a cabo en la gónada de este nematodo, es posible inducir la apoptosis por diversos tipos de estrés, como oxidativo, osmótico, de calor, y por daño a DNA. Aunque en todos estos casos se conocen, al menos parcialmente, las vías moleculares de las cuales dependen, se desconocía cómo se induce la apoptosis por estrés nutricional. Recientemente en nuestro laboratorio se ha encontrado que durante el ayuno la expresión de la proteína anti-apoptótica CED-9 (homóloga a Bcl-2 en humanos) disminuye; esto debido a la acumulación de LIN-35/Rb. En el presente trabajo encontramos que esta disminución en la expresión de CED-9/Bcl-2 en condiciones de ayuno siempre ocurre, independientemente del efecto que tenga el silenciamiento de diversos genes sobre la apoptosis por estrés nutricional. Este hallazgo nos sugiere que en el aumento de la apoptosis en condiciones de ayuno, existe otro punto regulatorio más adelante en la vía. Por otro lado, observamos que la disminución de la expresión de CED-9/Bcl-2 no siempre correlaciona con el aumento en la apoptosis fisiológica. Finalmente, encontramos que al silenciar el gen *oma-1* la expresión de *ced-9* disminuyó, tanto a nivel de RNA mensajero como de proteína, a pesar de que no se observó un efecto directo en la apoptosis.

Este trabajo se realizó bajo la dirección de la Dra. Rosa Estela Navarro González en el Instituto de Fisiología Celular, perteneciente a la Universidad Nacional Autónoma de México. Para la realización de este trabajo de investigación se recibió apoyo del donativo PAPIIT UNAM (IN207412) y CONACyT (103856-Q).

AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente la asesoría técnica, el consejo siempre oportuno y el apoyo incondicional de la M. en C. Laura Silvia Salinas Velázquez.

A la Unidad de Biología Molecular, la Unidad de Microarreglos y a la Unidad de Cómputo.

A mi máxima casa de estudios, por brindarme todas las oportunidades para mi desarrollo académico.

A mis compañeros de laboratorio.

A mi familia y amigos, por ser soporte incansable.

ÍNDICE

Introducción	1
<i>C. elegans</i> como modelo de estudio.....	1
RNA de interferencia en <i>C. elegans</i>	3
La gónada de <i>C. elegans</i>	4
Gónada somática en el hermafrodita	5
Línea germinal del hermafrodita	6
Apoptosis en <i>C. elegans</i>	9
Maquinaria central de la apoptosis.....	10
Apoptosis en la línea germinal de <i>C. elegans</i>	12
Apoptosis en la línea germinal inducida por estrés	14
Antecedentes	17
Hipótesis	22
Objetivo	22
Objetivos Particulares	22
Materiales y Métodos	23
Resultados	30
La expresión de la proteína CED-9 no se modifica durante el ayuno al silenciar diversos genes	30
El silenciamiento de ciertos genes afecta la acumulación de CED-9	32
El silenciamiento del gen <i>oma-1</i> afecta la acumulación de CED-9.....	34
Análisis de la expresión del mensajero de <i>ced-9</i> durante el silenciamiento de los genes <i>oma-1</i> y <i>oma-2</i>	37
Efecto del silenciamiento de los genes <i>oma-1</i> y <i>oma-2</i> sobre la apoptosis de las células germinales	39
Análisis de la apoptosis dependiente de <i>cep-1</i> durante el silenciamiento de los genes <i>oma-1</i> y <i>oma-2</i>	42
Discusión	45
La expresión de CED-9 disminuye en condiciones de ayuno aunque no aumente la apoptosis de las células germinales	45
No siempre existe una correlación entre la apoptosis fisiológica elevada y la baja expresión de CED-9	45
El silenciamiento del gen <i>oma-1</i> provoca una disminución en la expresión de <i>ced-9</i> , a nivel de proteína y de mRNA	47
Relación entre el silenciamiento de <i>oma-1</i> y apoptosis fisiológica.....	49
Conclusiones	50
Apéndice	51
Referencias	57

INTRODUCCIÓN

El nematodo *Caenorhabditis elegans* como modelo de estudio

Caenorhabditis elegans es un nematodo de aproximadamente 1 mm de largo en estado adulto, de vida libre, que habita en el suelo. Se distribuye prácticamente por todo el mundo y se alimenta principalmente de bacterias. La cepa silvestre *Bristol* (también conocida como N2) fue aislada por L. N. Staniland del Servicio Nacional de Agricultura en Londres, Inglaterra [Riddle et al. 1997] en la década de los sesentas, aunque fue Sydney Brenner el científico que propuso a *C. elegans* como modelo de estudio. Gracias a la transparencia del nematodo en todas sus etapas del desarrollo, fue posible la descripción del destino celular de todas las células formadas durante el embrión, siguiéndolas hasta la etapa adulta [Sulston et al. 1977]. Al día de hoy sigue siendo un gran modelo en la biología del desarrollo, de manera que S. Brenner, J. E. Sulston y R. H. Horvitz fueron galardonados con el Premio Nobel de Fisiología en 2002 por proponer a *C. elegans* como organismo modelo y realizar los primeros avances en su estudio.

Entre las características que impulsaron a *C. elegans* como un buen modelo de estudio, se encuentran: su ciclo de vida corto, de aproximadamente 3 días bajo condiciones óptimas de temperatura y alimento; la facilidad para ser propagado, ya que cada hermafrodita tiene aproximadamente 300 hijos durante su ciclo de vida; la existencia de dos sexos por dosis cromosómica sexual, un hermafrodita (XX) capaz de autofertilizarse y un macho con una baja ocurrencia (XO), lo que posibilita realizar cruza genéticas. Además es sencillo de mantener en el laboratorio, típicamente en cajas de Petri con agar con *E. coli* como fuente alimenticia.

Su morfología es simple, de tan sólo 959 células somáticas en el hermafrodita y 1031 células en el macho, cuenta con sistemas anatómicos básicos, tales como nervioso, digestivo, excretor, muscular y reproductor [Altun et al. 2009]. Además es posible saber la expresión temporal y espacial de proteínas específicas mientras el organismo está vivo, ya que *C. elegans* fue el

primer organismo en el que fue posible la expresión de transgénicos con la proteína verde fluorescente (o GFP, por sus siglas en inglés “Green Fluorescent Protein”) [Chalfie et al. 1994], valiéndole este trabajo el Premio Nobel de Química a Martin Chalfie en 2008. De esta manera, se cuenta con una amplia colección de transgénicos y mutantes accesibles y las cepas pueden mantenerse congeladas en nitrógeno líquido por largos periodos de tiempo.

En condiciones adecuadas de crecimiento, *C. elegans* puede vivir aproximadamente 20 días, pero bajo condiciones extremas ambientales puede entrar en un periodo de latencia que prolonga su vida entre 4 y 8 veces más, llamado dauer [Russell et al. 1975]. Normalmente este nematodo tiene cuatro etapas larvianas conocidas como L1-L4, caracterizadas por mudas en la cutícula (Fig. 1). Después de la cuarta muda (aproximadamente 2 días post fertilización), son considerados adultos y son fértiles.

El genoma de este nematodo fue el primer genoma de un organismo multicelular en secuenciarse [*C. elegans* Sequencing Consortium, 1998]; consta de 6 cromosomas, 5 autosómicos y uno sexual, siendo los hermafroditas diploides para los seis cromosomas (XX), y los machos presentando sólo un cromosoma sexual (X0). El genoma es de aproximadamente 100 millones de pares de bases, distribuidos en alrededor de 19500 genes. Se estima que 2/3 partes de los genes humanos se encuentran representados en el genoma de *C. elegans* [Riddle et al. 1997].

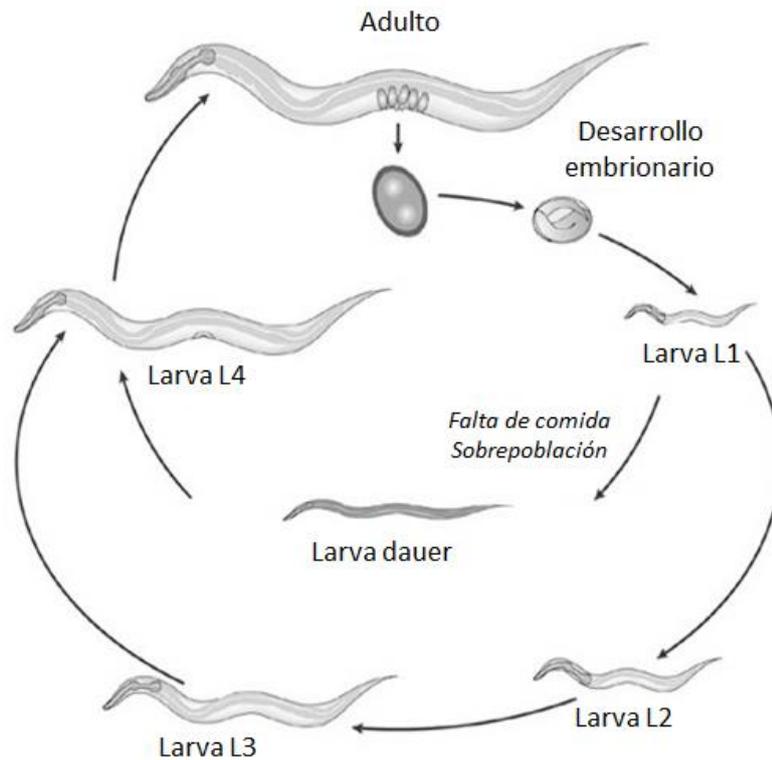


Fig. 1. Ciclo de vida del nematodo *Caenorhabditis elegans*.

La embriogénesis dura aproximadamente 9 h después de la fertilización. Al eclosionar, si las condiciones son favorables, la larva L1 pasa a L2 en 12 h. En etapa L2 la larva pasa por un desarrollo de 8 h y realiza la muda para entrar a L3 donde vuelve a pasar el mismo tiempo para desarrollarse hasta el estadio L4. Cuando han pasado 10 h en L4 se realiza la última muda, entrando a la etapa sexualmente activa de la adultez, comenzando a fertilizar ovocitos y a deponer los embriones en el medio. Si las condiciones ambientales son adversas durante la etapa L1 (falta de comida o sobrepoblación), la larva entra a estadio Dauer, en el que puede sobrevivir hasta 4 meses; cuando el ambiente vuelve a ser favorable, esta larva dauer entra directamente a estadio L4. Tiempos estimados a 22°C. Información tomada de Altun et al. 2009. Imagen modificada de Jorgensen et al. 2002.

RNA de interferencia en *C. elegans*

En *C. elegans* fue descrito por primera vez el mecanismo de RNA de interferencia (RNAi), el cual consiste en la degradación de un RNA mensajero específico a través de la síntesis y procesamiento de un RNA de doble cadena (dsRNA) complementario a dicho mensajero, representando una fenocopia de la mutación [Fire et al. 1998]. En este mecanismo, el RNA de doble cadena es cortado en pequeños fragmentos de aproximadamente 22 nucleótidos, para

luego ser presentados al mRNA blanco, permitiendo así su degradación. Este trabajo les valió el Premio Nobel de Fisiología a Andrew Z. Fire y a Craig C. Mello en 2006.

La inducción de RNAi en *C. elegans* puede hacerse a través de la inyección de las moléculas de dsRNA directamente en la gónada [Fire et al. 1998]. Posteriormente se descubrió que al alimentar a los animales con bacterias que expresan el dsRNA, también puede llevarse a cabo un silenciamiento efectivo y penetrante [Timmons et al. 1998]. Esto es posible gracias a la proteína transmembranal SID-1, la cual toma el dsRNA del lumen del intestino y lo transporta al interior de la célula [Feinberg et al. 2003]. Por otro lado el organismo cuenta con RNA polimerasas dependientes de RNA que amplifican la señal, haciendo que el efecto del RNAi sea sistémico.

Gracias al RNAi pueden realizarse experimentos de genética reversa, donde el estudio se comienza con la secuencia del gen en lugar de un fenotipo mutante. De este modo, se pueden estudiar la función de todos los genes de una misma familia, algo que no es fácil de hacer con mutantes; incluso es posible estudiar la función de un gen involucrado en algún proceso de interés en otro organismo, como ha sucedido en el caso del estudio de vías genéticas en enfermedades neurodegenerativas en humanos, usando a *C. elegans* como modelo de estudio [Calahorra et al. 2011]. Del mismo modo, el RNAi como herramienta permite el estudio de genes de los que aún no se tienen alelos mutantes disponibles.

La gónada del *C. elegans*

El sistema reproductivo es un tejido dimórfico sexualmente en este nematodo, ya que mientras los hermafroditas tienen ambos gametos sexuales para autofertilizarse, los machos sólo producen espermatozoides. El sistema reproductivo en los hermafroditas produce gametos maduros y provee la estructura y el ambiente celular para la fertilización y la expulsión de embriones; puede

ser dividido en tres estructuras principales: la gónada somática, la línea germinal y el aparato depositador de embriones (que suele considerarse parte de la gónada somática).

Gónada somática en el hermafrodita

La gónada somática forma dos tubos (o brazos) simétricos en forma de U, unidos en un útero común, que desemboca en la vulva. Consta específicamente de la célula de la punta distal (DTC, por sus siglas en inglés "Distal Tip Cell"), las células de la vaina, la espermateca y el útero (Fig. 2). La gónada está organizada en un arreglo próximo-distal, siendo la parte distal la que más se acerca a la DTC y la zona proximal aquella que corresponde al sitio más cercano al útero [Lints et al. 2009].

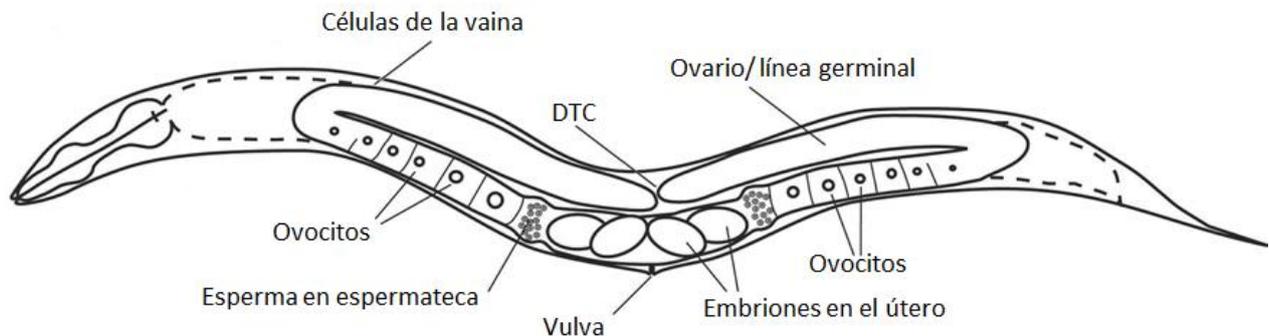


Fig. 2. Anatomía básica de la gónada del *C. elegans* hermafrodita.

Esquema que muestra la distribución de la gónada en el animal completo. La gónada es una estructura formada por dos tubos en forma de U que convergen en un útero común. A la izquierda se tiene la boca y a la derecha el ano. En el esquema se indican las partes de la gónada, la cual está organizada en un arreglo próximo-distal (DTC-útero, respectivamente). Modificada de Gumienny et al. 1999.

La DTC es una célula somática única en el hermafrodita, localizada en la punta de cada brazo de la gónada, cubriendo entre 6 y 10 células germinales. Tiene dos funciones principales: la elongación de los brazos de la gónada durante su desarrollo y la promoción de mitosis y/o

inhibición de la meiosis en las células germinales. La ablación (comúnmente hecha por láser) de esta célula, causa que todos los núcleos mitóticos en la línea germinal entren a meiosis, haciendo progresar así todos los núcleos meióticos hasta que se convierten en gametos maduros. Esto sucede porque la DTC regula el mantenimiento de un nicho de células mitóticas a través de la vía de transducción Notch [Lints et al. 2009]; mientras que esta célula expresa el ligando LAG-2, las células de la línea germinal expresan el receptor GLP-1, bloqueando así la entrada a meiosis (o promoviendo la mitosis). Cuando las células germinales se alejan de la DTC, éstas comienzan el proceso de meiosis [Lints et al. 2009].

Las células de la vaina son cinco pares de células que forman un epitelio, cubriendo así a las células germinales en cada brazo de la gónada. Esta asociación íntima es necesaria para varios aspectos del desarrollo de la línea germinal, por ejemplo, son responsables de la proliferación de las células germinales y de la salida del paquíteno de estas células para formar los gametos [McCarter et al. 1997]. En el adulto, las células de la vaina son encargadas de fagocitar las células germinales que mueren por apoptosis; mientras que en la parte proximal son necesarias para la maduración de los ovocitos y la ovulación [Lints et al. 2009].

La espermateca es un tubo en forma de acordeón que contiene el esperma y, por tanto, es el sitio donde ocurre la fertilización del ovocito (Fig. 3). Para finalizar, en la parte más proximal a la vulva se encuentra el espacio uterino, que recibe a los embriones recién fertilizados mientras progresan durante la embriogénesis y son expulsados por la vulva al medio ambiente, ya que este proceso puede ser completamente extra uterino [Sulston et al. 1983].

La línea germinal del hermafrodita

Las células germinales del *C. elegans* hermafrodita producen gametos femeninos y masculinos; mientras que los ovocitos son producidos durante la vida adulta del nematodo, los espermatozoides son producidos durante la etapa larvaria L4, los cuales son utilizados en la

etapa adulta del animal para fertilizar los ovocitos. El desarrollo de las células germinales exhibe una polaridad distal-proximal, con una población de células mitóticas localizada en el extremo distal de la gónada, y otra población, ésta de células en meiosis, extendiéndose proximalmente en un gradiente de progresión con etapas sucesivas, madurando hacia la parte más proximal, sucediendo la gametogénesis (Fig. 3) [Lints et al. 2009].

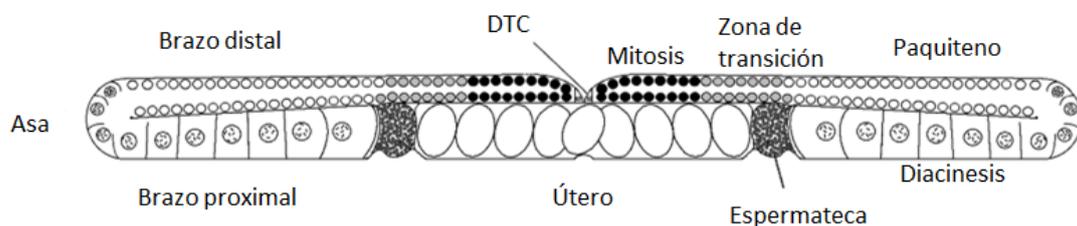


Fig. 3. Proceso de diferenciación de las células germinales del hermafrodita.

Esquema que muestra la diferenciación de las células germinales durante su progresión por la gónada de un animal hermafrodita adulto. En la zona más distal (más cercana a la DTC) se encuentran los núcleos en mitosis; conforme pierden la influencia de la DTC (zona de transición), estas células entran a meiosis, siendo la etapa del paquíteno la más característica. En la zona del asa o vuelta comienzan la diacinesis y más proximalmente sucede la celularización y maduración del ovocito. La fertilización ocurre en el útero y el embrión pasa al útero. Se muestran los nombres de cada zona. Modificada de Zarkower, 2006.

La zona previa a la vuelta de la gónada es un sincicio, esto es, las células germinales tienen membranas incompletas y están conectadas entre sí por un citoplasma común. Como ya se mencionó, en la parte más distal se encuentran sólo núcleos en mitosis y esta zona se conforma por aproximadamente 20 células desde la DTC hacia la parte proximal de la gónada [Lints et al. 2009]. Una vez que las células germinales entran a meiosis, se forma el complejo sinaptonémico y los cromosomas sufren recombinación homóloga. La alineación de cromosomas y la alteración de la organización nuclear inician en la zona de transición (aproximadamente con 10 núcleos de longitud después de la zona de mitosis) y la recombinación meiótica es completada en el

paquiteno. La progresión del paquiteno al diploteno requiere la vía de señalización de la cinasa de la proteína activada por mitógenos (o MAPK, por sus siglas en inglés "Mitogen-Activated Protein Kinase"). Al llegar a la diacinesis, los cromosomas se condensan y forman los seis divalentes, observados en los ovocitos [Hubbard et al. 2005].

La gametogénesis comprende las últimas etapas del desarrollo del nematodo, ya que es en la etapa L4 cuando ocurre la espermatogénesis y en el estado adulto cuando comienza la ovogénesis. Como en otras especies, la espermatogénesis produce un gameto mótil, aunque en este caso, en lugar de tener un flagelo, cuenta con un pseudópodo para movilizarse. Además, durante la ovogénesis, se observa un incremento notable en el volumen citoplasmático del gameto femenino, produciendo de esta manera una célula suficientemente provista para la embriogénesis temprana [Hubbard et al. 2005].

La maduración del ovocito ocurre al estar cerca de la espermateca, justo antes de la ovulación, y es estimulada por la proteína principal del esperma (MSP, por sus siglas en inglés "Major Sperm Protein") [Miller et al. 2001]. Durante la maduración ocurre la ruptura de la envoltura nuclear, el núcleo se vuelve menos obvio a la vista, el ovocito se vuelve esférico debido a rearrreglos corticales, y el arreglo cromosomal cambia, comenzando a alinearse para la metafase [Lints et al. 2009].

Otros efectores que influyen en la maduración del ovocito que han sido identificados son las proteínas con dominio de dedos de zinc OMA-1 y OMA-2; las cuales son requeridas de manera redundante en la maduración y la ovulación, ya que el silenciamiento de alguna de ellas por sí sola, no produce ningún fenotipo [Detwiler et al. 2001]. En los animales mutantes para estas dos proteínas, la activación de la MAPK no es sostenida y la ruptura de la envoltura nuclear no ocurre. Se ha propuesto que OMA-1 y OMA-2 funcionan sobre dos reguladores conservados del ciclo celular, la cinasa relacionada a MYT1 WEE-1.3 y el homólogo a la cinasa dependiente de

ciclina CDK-1 [Detwiler et al. 2001]. Además, al tener dominios de dedos de zinc, estas proteínas podrían funcionar como reguladoras de la traducción o en la estabilización de mensajeros.

Apoptosis en *C. elegans*

La apoptosis es un tipo de muerte celular programada común en muchos organismos multicelulares y ocurre a lo largo de todo el desarrollo. Es un mecanismo por el cual se eliminan las células que potencialmente son dañinas para el organismo o aquellas que han cumplido su función [Riddle et al. 1997]. La apoptosis es un proceso que está bajo un programa molecular específico, ya que es crucial para el mantenimiento de la homeostasis de los individuos. Así, la alteración de los procesos de regulación genera patologías, tales como el desarrollo del cáncer o enfermedades autoinmunes. Por el contrario, la activación aberrante de la apoptosis contribuye a la muerte celular extensa, característica de enfermedades neurodegenerativas como el mal de Parkinson [Riddle et al. 1997].

La muerte celular programada es un proceso altamente conservado entre invertebrados y vertebrados. Entre 1970 y 1980, el trabajo en el nematodo *Caenorhabditis elegans* dio como resultado información invaluable para el entendimiento del proceso de muerte celular. Se encontró que exactamente 131 de 1090 células somáticas morían invariablemente durante el desarrollo del nematodo, debido a que el linaje de cada célula destinada a morir y el momento de muerte son altamente reproducibles [Sulston et al. 1997]. Dicho trabajo les valió el Premio Nobel de Fisiología en 2002 a los investigadores Sydney Brenner, John E. Sulston y Robert Horvitz, quienes además de descifrar el linaje celular del nematodo, definieron la vía genética de la muerte celular programada. Mutantes de este nematodo fueron caracterizadas y experimentos genéticos llevaron rápidamente al descubrimiento de más de 12 genes involucrados en este tipo de muerte celular programada [Hedgecock et al. 1983; Ellis et al. 1986; Hengartner et al. 1992].

Además de la primer etapa de la apoptosis ya mencionada, denominada “muerte celular en el desarrollo”, que ocurre durante la embriogénesis y las primeras etapas del desarrollo de la larva en tejidos somáticos, se observa otra etapa de muerte celular llamada “apoptosis fisiológica” en la etapa adulta de los organismos hermafroditas [Conradt et al. 2005]. La apoptosis de las células germinales ocurre en la zona de paquíteno en la región del asa de la gónada como parte del programa de ovogénesis; se estima que dicha apoptosis fisiológica remueve aproximadamente el 50% de las células ovogénicas de manera estocástica [Gumienny et al. 1999]. Se cree que algunas de las células de la línea germinal funcionan como nodrizas, sintetizando componentes citoplasmáticos necesarios para llevar a cabo la formación de un ovocito maduro, contribuyendo con su citoplasma y muriendo después por apoptosis [Gumienny et al. 1999].

Maquinaria central de la apoptosis

Aunque a la fecha se han identificado más de 100 mutaciones que afectan la muerte celular en el *C. elegans*, en todos los casos se necesitan a los genes *ced-3* y *ced-4*. Mutaciones en estos genes producen animales que viven, aunque tienen más células, indicando así que la inhibición de la apoptosis en *C. elegans* no tiene un efecto de sobrevivencia durante el desarrollo del nematodo (como ocurre en otros organismos como los mamíferos). CED-3 es una proteína similar en función a la de los miembros de la familia de proteasas de cisteína, conocidos como caspasas [Alnemri et al. 1996; Yuan et al. 1993]. El genoma del nematodo tiene tres genes adicionales parecidos a las caspasas (*csp-1*, *csp-2* y *csp-3*), pero actualmente es poco claro si alguno de estos genes está involucrado en la muerte celular programada [Shaham, 1998]. Por otro lado, el gen *ced-4* codifica para el homólogo de la proteína Apaf-1 de mamíferos, cuya función es activar, mediante un proceso de hidrólisis, a la caspasa CED-3, desencadenando así la muerte celular [Seshagiri et al. 1997].

Por otro lado, se encontró al gen *ced-9*, el cual protege a las células de la apoptosis. Mutaciones de pérdida de función en este gen causan letalidad embrionaria, ya que promueve muerte celular ectópica de células que normalmente están destinadas a sobrevivir [Hengartner et al. 1992]. Dicho gen codifica para una proteína similar al producto del proto oncogen humano *bcl-2*, el cual juega un papel similar en la prevención de la apoptosis en mamíferos [Hengartner et al. 1994]. *ced-9* y *bcl-2* son miembros de una familia que juega papeles importantes en regular la apoptosis en diversos organismos [Conradt et al. 2005].

El gen *egl-1* codifica para una proteína pequeña con un motivo BH3 (región 3 homóloga a Bcl-2), que ha demostrado unirse directamente a miembros de la familia de Bcl-2 [Conradt et al. 1998]. De esta manera, estos genes actúan en una misma vía genética, en la cual *egl-1* actúa arriba de *ced-9* para inducir la muerte celular, *ced-9* actúa arriba de *ced-4* para inhibir la muerte y *ced-4* actúa arriba de *ced-3* para desencadenar la muerte celular (Fig. 4) [Conradt et al. 1998].



Fig. 4. Maquinaria central de apoptosis en *C. elegans*.

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

Análisis bioquímicos y celulares de EGL-1, CED-9, CED-4 y CED-3 han proveído información importante acerca de cómo estas proteínas actúan para regular la activación de la muerte celular programada durante el desarrollo de *C. elegans*. Se ha demostrado que en células de mamífero y en experimentos *in vitro*, la proteína CED-4 interactúa físicamente con CED-9 [Spector et al.

1997]; en experimentos *in vivo* en embriones se ha demostrado que estas proteínas colocalizan en la superficie de la mitocondria y que la localización de CED-4 depende de CED-9 [Chen et al. 2000]. Por otro lado la expresión ectópica de *egl-1* en embriones de *C. elegans* da como resultado una translocación de CED-4 a la membrana perinuclear y apoptosis ectópica [Chen et al. 2000]. Esta translocación de CED-4 de la mitocondria a la membrana del núcleo parece ser iniciada por la unión de EGL-1 a CED-9, induciendo un cambio conformacional en CED-9, promoviendo así la liberación de CED-4 del complejo CED-9/CED-4 [Conradt et al. 1998; del Peso et al. 1998]. Este evento deja libre a la proteína CED-4 para oligomerizarse y reclutar a CED-3, estando así en cercanía suficiente para la autoactivación de la caspasa [Yang et al. 1998].

El mecanismo por el cual CED-3 es activada parece ser distinto de los mecanismos que activan las caspasas en mamíferos, los cuales pueden ser la liberación del citocromo c de la mitocondria y el ensamblaje del oligómero Apaf-1/caspasa-9 llamado apoptosoma (activación de caspasa-9), la formación de los trímeros de caspasa-8 inducidos por la activación de los receptores de muerte (activación de caspasas-8), o activación proteolítica directa de las caspasas ejecutoras río abajo de la vía (como caspasa-3 y caspasa-6) por caspasas iniciadoras que actúan río arriba (como caspasa-8 y caspasa-6) [Conradt et al. 2005].

Apoptosis en la línea germinal de *C. elegans*

Bajo condiciones normales de crecimiento, *C. elegans* produce cerca de 2000 células germinales a lo largo de su ciclo reproductivo, de las cuales, aproximadamente la mitad mueren por apoptosis [Gumienny et al. 1999]. Esta muerte celular, llamada apoptosis fisiológica, ocurre normalmente en la gónada durante la producción de ovocitos, por lo que solamente es observada en los hermafroditas adultos. La apoptosis fisiológica ocurre principalmente en la región de la vuelta de la gónada, que es donde los ovocitos salen del paquiteno y están en

transición al diploteno. Como estas células están en un sincicio, los núcleos que están en proceso de morir se celularizan para formar un cuerpo que contiene muy poco citoplasma; este cuerpo, denominado cuerpo apoptótico, es fagocitado por las células de la vaina vecinas. El proceso de fagocitosis que sucede en estas células es el mismo en los cuerpos apoptóticos somáticos (Fig. 5).

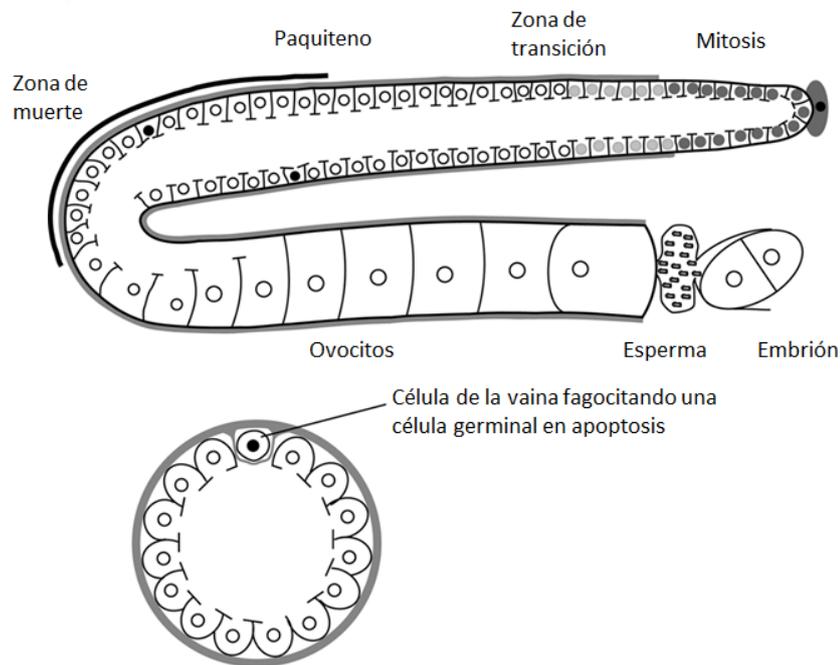


Fig. 5. Apoptosis en la línea germinal de *C. elegans*.

A. Esquema de la gónada que muestra las zonas de progreso de la ovogénesis. La apoptosis ocurre en la llamada asa o vuelta de la gónada, antes de que los ovocitos se celularicen y continúen la meiosis en la fase de diacinesis. **B.** Se muestra una representación de un corte transversal a la gónada de *C. elegans* con un núcleo en apoptosis siendo rodeado por las células de la vaina para su posterior fagocitosis. Modificado de Gartner et al. 2008.

La apoptosis fisiológica ocurre de manera normal en la ovogénesis y es ejecutada por la maquinaria central, incluyendo CED-9, CED-4 y CED-3; sin embargo su inducción no es dependiente de EGL-1 por lo que difiere de la apoptosis somática en este aspecto. Así, la activación de la apoptosis fisiológica depende de un mecanismo aún desconocido [Gumienny et al. 1999].

El evento de apoptosis fisiológica en *C. elegans* está ampliamente conservado en los eucariontes, incluidos los humanos. Durante la profase meiótica, los ovocitos en desarrollo de los mamíferos están interconectados y comparten componentes citoplasmáticos entre ellos. Alrededor o justo después del nacimiento, dos tercios de estos ovocitos en desarrollo mueren por apoptosis y, con esto, las conexiones citoplásmicas se rompen y los ovocitos se celularizan, formando los folículos primordiales [Gartner et al. 2008]. El paralelismo con *C. elegans* es notable, ya que la apoptosis en los ovocitos de mamíferos ocurre justo en la transición del paquiteno al diploteno. Es por esto que se ha vuelto interesante la búsqueda de mecanismos que regulen la apoptosis fisiológica en *C. elegans*, ya que de tal manera se podría investigar el posible papel que dichos mecanismos tendrían durante la ovogénesis de los mamíferos.

Apoptosis en la línea germinal inducida por estrés

El descubrimiento de la apoptosis fisiológica en la línea germinal de *C. elegans*, planteó la posibilidad de inducir dicha apoptosis por algún estrés ambiental, siendo el primero en probarse el daño a DNA. El material genético es constantemente enfrentado a estrés genotóxico, ya sea durante el mantenimiento o la replicación de éste, por lo cual pueden ocurrir errores en la duplicación del DNA. En respuesta a esto, las células activan vías de control de daño a DNA para repararlo, arrestar transitoriamente el ciclo celular, o definitivamente encender una señal de apoptosis para evitar que un daño genético dañe la homeostasis del organismo. De este modo, estudios centrados en respuestas al daño en DNA por radiación ionizante revelaron el primer ejemplo de apoptosis inducida por daño a DNA en *C. elegans* (Fig. 6) [Gartner et al. 2000].

Uno de los genes necesarios para la respuesta apoptótica inducida por radiación ionizante en *C. elegans* es *cep-1*, el cual es homólogo al factor de transcripción en mamíferos p53 [Schumacher et al. 2005]. Dicha homología se basa en que CEP-1 puede unirse, aunque con baja afinidad, a los sitios consenso de p53 en humanos; además que análisis estructurales indican que algunas

características de unión a DNA están conservadas en CEP-1 [Huyen et al. 2004]. En respuesta a la radiación ionizante, CEP-1 induce la transcripción del gen *egl-1* [Schumacher et al. 2005], evento conservado en mamíferos, donde p53 induce transcripcionalmente la expresión de las proteínas con dominio BH3, PUMA y Noxa [Oda et al. 2000; Yu et al. 2001]; esto indicaría que dicho evento es una red de regulación conservada que explica la apoptosis como consecuencia del daño a DNA.

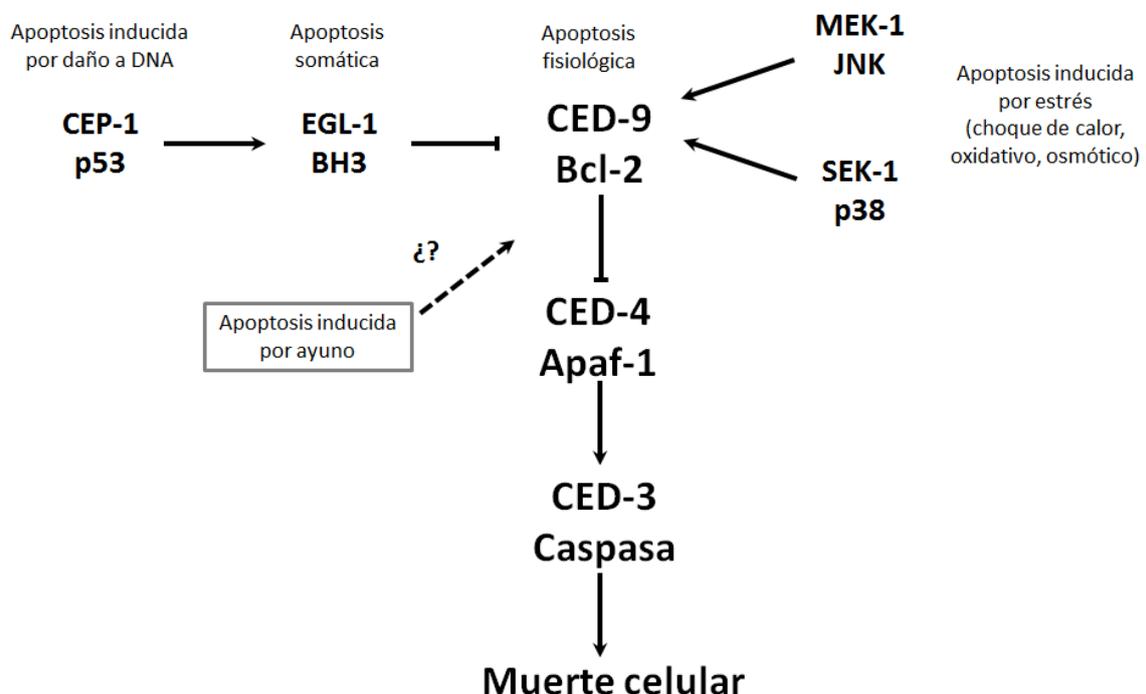


Fig. 6. Apoptosis inducida por estrés en la línea germinal de *C. elegans*.

Diagrama que muestra un resumen de las vías conocidas que inducen apoptosis en la línea germinal en respuesta a distintos tipos de estrés. Aún cuando la apoptosis somática y la fisiológica convergen en la activación de la maquinaria central *ced-9/ced-4/ced-3*, los efectores que activan esta vía son distintos.

Por otro lado, se ha demostrado que CEP-1 está implicado en fenómenos adicionales a la respuesta al control de integridad del DNA. Recientemente se encontró que el RNAi de genes que se expresan en la línea germinal aumenta la apoptosis durante la ovogénesis. Este proceso, que se denominó como apoptosis inducida por silenciamiento, es dependiente de *cep-1*,

sugiriendo así que la vía de respuesta a DNA dañado está involucrada en dicho proceso [Adamo et al. 2012]. Ya que se ha propuesto que el RNAi es un mecanismo de respuesta ante intrusos genómicos que pudieran dañar la información en el DNA, los autores de este trabajo propusieron que este mecanismo puede llevar a la eliminación de células germinales en las que haya activación de transposones o incluso de alguna infección viral [Adamo et al. 2012].

Otras clases de estrés que no comprometen directamente la integridad genómica, como el oxidativo, el estrés por calor, osmótico o nutricional, inducen también apoptosis en la gónada [Salinas et al. 2006]. La apoptosis inducida por estos tipos de estrés no requiere a *egl-1* ni a *cep-1*, lo cual sugeriría que dicho proceso está ligado a la vía de apoptosis fisiológica o a un mecanismo paralelo independiente de *egl-1*. Se sabe que la inducción de apoptosis por estrés oxidativo, osmótico y de calor depende de la actividad de las vías de cinasas activadas por estrés p38 y JNK, SEK-1 y MEK-1 en *C. elegans*, respectivamente (Fig. 6) [Salinas et al. 2006]. Esta inducción también requiere a *abl-1*, un descubrimiento intrigante, ya que *abl-1* antagoniza la inducción de la apoptosis mediada por *cep-1*. Sin embargo, el estrés nutricional induce apoptosis por un mecanismo independiente de SEK-1, MEK-1 y ABL-1 [Salinas et al. 2006].

Recientemente se ha encontrado que durante el estrés nutricional en *C. elegans*, *ced-9* disminuye sus niveles de expresión, tanto a nivel de proteína como de mensajero [Lascarez et al. manuscrito en preparación]. Se propone que dicha disminución sea llevada a cabo por la represión transcripcional del gen *lin-35*, homólogo en *C. elegans* del gen del Retinoblastoma (Rb) en mamíferos, ya que su mensajero se traduce activamente durante el ayuno y su proteína aumenta sus niveles de expresión [Lascarez et al. manuscrito en preparación]. Esto nos indicaría que es por medio de la disminución de *ced-9* a distintos niveles que la apoptosis aumenta durante el ayuno.

ANTECEDENTES

En nuestro grupo de trabajo estamos interesados en el estudio del mecanismo de apoptosis de las células germinales, tanto a nivel fisiológico como el inducido por estrés. Con el objetivo de identificar proteínas involucradas en dichos procesos, se está llevando a cabo un escrutinio genético en el laboratorio. Primero, en un microarreglo se compararon niveles de expresión de genes específicos de la gónada (i.e., genes que se expresan en células germinales, independientemente de su acción en espermatogénesis u ovogénesis) en condiciones normales y en condiciones de estrés por ayuno durante 6 h [Silva, 2007]. Esto se hizo con el objetivo de identificar genes que estuvieran participando en la respuesta ante el estrés por ayuno [Ver introducción; Salinas et al. 2006].

En este análisis por microarreglos se encontró que 264 genes cambiaron su expresión cuando los animales fueron sometidos a estrés nutricional; de estos, 122 mostraron un aumento en los niveles de mRNA mientras que 142 disminuyeron su expresión [Silva, 2007]. Se tomó un grupo de 64 genes para analizar la apoptosis, tanto fisiológica como inducida por ayuno, silenciándolos por RNAi [Silva, datos sin publicar].

Para analizar los niveles de apoptosis se utilizaron animales de la cepa transgénica CED-1::GFP. Esta cepa expresa la proteína CED-1, que está en las células de la vaina y está involucrada en la fagocitosis de los cuerpos apoptóticos de la gónada, unida a la proteína verde fluorescente (GFP) [Zhou et al. 2001]. De este modo, se pueden observar a los animales en un microscopio de fluorescencia para poder cuantificar los cuerpos apoptóticos en la línea germinal.

En el análisis de apoptosis, se encontraron genes que se requieren para inducir la muerte celular durante el estrés nutricional, mientras otros genes no se requieren en este proceso. Nos enfocamos en el análisis de los primeros, ya que esto nos podría guiar a la descripción de los componentes de respuesta en la apoptosis inducida por ayuno.

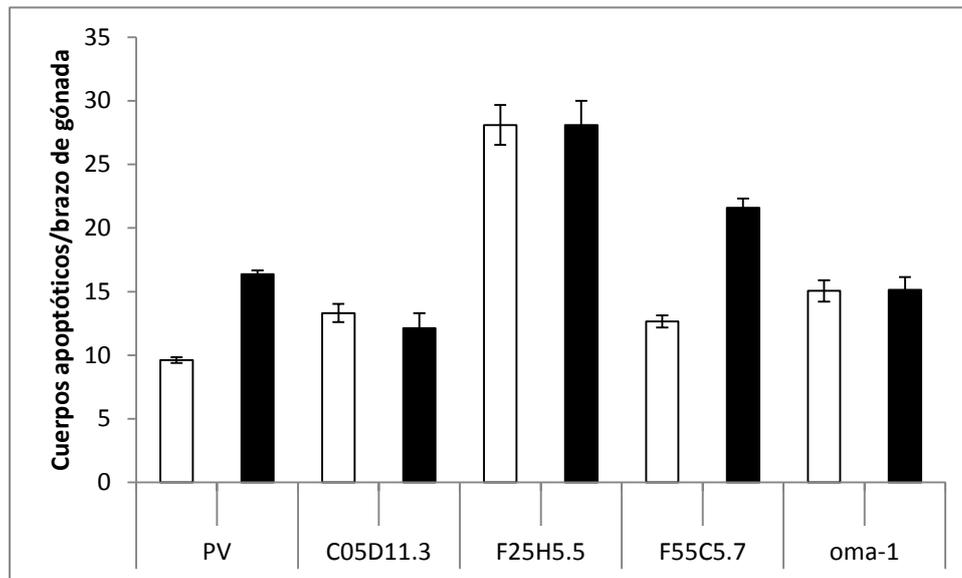
Entre los genes que aumentan su expresión durante el ayuno, se analizaron los siguientes [Silva, 2007, datos sin publicar] (Tabla 1; Gráfica 1).

Gen silenciado	Tipo de proteína o dominio que posee	Apoptosis fisiológica	Apoptosis por ayuno
C05D11.3	Tioredoxina	=	=
F25H5.3	Claspina	↑	=
F55C5.7	Homóloga a la cinasa delta de la proteína ribosomal S6	=	↑
<i>oma-1</i>	Dedos de zinc tipo TIS11 con motivo CCCH	=	=

Tabla 1. Genes que aumentan su expresión durante el ayuno y el efecto que produce su silenciamiento en la apoptosis fisiológica y por ayuno.

Se muestran los genes silenciados, el tipo de proteína para la que codifican y el efecto que produce su silenciamiento sobre la apoptosis fisiológica y por ayuno. Las flechas (↑) indican un aumento de al menos 70% comparado con el plásmido vacío [Silva, 2007]. El signo de igual (=) indica que no hay una diferencia en la apoptosis observada, ya que la diferencia con el plásmido vacío es igual o menor al 40% [Silva, 2007].

De esta manera, en la tabla se muestra que el silenciamiento de los genes C05D11.3, F25H5.3 y F55C5.7 aumenta la apoptosis fisiológica observada; así como silenciar los genes C05D11.3, F25H5.3 y *oma-1* impide a los animales aumentar la apoptosis durante el ayuno. La información del tipo de proteína o dominio que posee fue tomada de la base de datos de *C. elegans*, Wormbase (sitio web, <http://www.wormbase.org>, versión WS238, fecha 18-05-2013).



Gráfica 1. Efecto en la apoptosis fisiológica y por ayuno durante el silenciamiento de genes que aumentaron sus niveles de expresión durante dicha condición.

Se contaron cuerpos apoptóticos observados en la gónada de animales adultos jóvenes de la cepa CED1::GFP. Debajo de las barras se indican los genes silenciados en los animales bien alimentados o control (barras blancas), o durante las condiciones de ayuno (6 h sin comida; barras negras). Se utilizó el plásmido vacío (PV) como control de silenciamiento. N de al menos 20 en cada condición. Las barras de error representan el error estándar de la muestra. Gráfica modificada de Silva, 2007 y Silva, datos sin publicar.

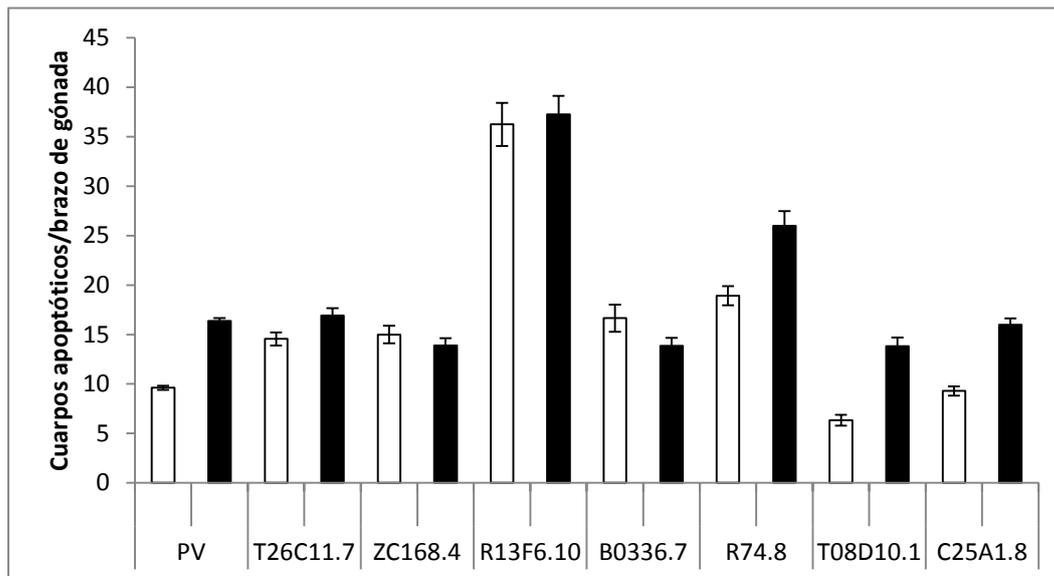
De la misma manera, entre los genes que disminuyen su expresión durante el ayuno, se analizaron los que se mencionan a continuación [Silva, 2007, datos sin publicar] (Tabla 2; Gráfica 2).

Gen silenciado	Tipo de proteína o dominio que posee	Apoptosis fisiológica	Apoptosis por ayuno
T26C11.7	Proteína homeobox de clase CUT	=	=
ZC168.4	Ciclina B	=	=
R13F6.10	Homóloga a la cinasa delta de la proteína ribosomal S6	↑	=
B0336.7	Dominio THAP de unión a DNA	↑	=
R74.8	Homología con la isoforma 1 de la caldesmona en humanos	↑	=
T08D10.1	Homología con la subunidad alfa del factor de transcripción nuclear Y	=	↑
C25A1.8	Lectina de tipo C	=	↑

Tabla 2. Genes que disminuyen su expresión durante el ayuno y el efecto que produce su silenciamiento en la apoptosis fisiológica y por ayuno.

Se muestran los genes silenciados, el tipo de proteína para la que codifican y el efecto que produce su silenciamiento sobre la apoptosis fisiológica y por ayuno. Las flechas (↑) indican un aumento de al menos 70% comparado con el plásmido vacío [Silva, 2007]. El signo de igual (=) indica que no hay una diferencia en la apoptosis observada, ya que la diferencia con el plásmido vacío es igual o menor al 30% [Silva, 2007].

Del mismo modo, en la Tabla 2 se muestran los genes, el tipo de proteína o de dominio que poseen, los niveles de apoptosis fisiológica y el comportamiento de la apoptosis por estrés nutricional al silenciarlos. La información del tipo de proteína o dominio que posee también fue obtenida de la base de datos de *C. elegans*, como se mencionó anteriormente.



Gráfica 2. Efecto en la apoptosis fisiológica y por ayuno en el silenciamiento de genes que disminuyeron sus niveles de expresión durante dicha condición.

Se contaron cuerpos apoptóticos observados en la gónada de animales adultos jóvenes de la cepa CED1::GFP. Debajo de las barras se indican los genes silenciados en los animales bien alimentados o control (barras blancas), o durante las condiciones de ayuno (6 h sin comida; barras negras). Se utilizó el plásmido vacío (PV) como control de silenciamiento. N de al menos 20 en cada condición. Las barras de error representan el error estándar de la muestra. Modificada de Silva, 2007 y Silva, datos sin publicar.

Ya que la vía o los elementos moleculares que activan la apoptosis por ayuno, otro miembro de nuestro grupo de trabajo analizó la expresión de las proteínas de la maquinaria central de apoptosis durante un ayuno de 6 h [Láscarez et al. manuscrito en preparación]. Aunque no se encontró un cambio en la expresión de CED-3 y CED-4 durante el estrés, se encontró que CED-9 disminuía su expresión hasta hacerse indetectable.

Recordando que CED-9 es el homólogo de Bcl-2, se evaluó el estado del transcrito, encontrándose una disminución en el mensajero de *ced-9* durante nuestras condiciones de ayuno. Esto nos arroja un primer dato sobre a qué nivel está siendo regulada la apoptosis por ayuno, ofreciéndonos la oportunidad de buscar genes que, al silenciarse, afecten la expresión de CED-9 y, quizá, tengan que ver con la apoptosis por ayuno [Láscarez et al. manuscrito en preparación].

HIPÓTESIS

La expresión de la proteína anti-apoptótica CED-9 es afectada cuando son silenciados genes que incrementan la apoptosis fisiológica o genes que impiden a los animales responder al ayuno.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar la expresión de la proteína anti-apoptótica CED-9 durante el silenciamiento de genes que afectan la apoptosis de las células germinales del *C. elegans*.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Estudiar por medio de Western blot la expresión de CED-9 al silenciar genes que no inducen apoptosis por ayuno.
2. Estudiar por medio de Western blot la expresión de CED-9 al silenciar genes que incrementan la apoptosis fisiológica.
3. Estudiar la expresión de *ced-9* a nivel de mRNA y proteína al silenciar los genes *oma-1* y *oma-2*.
4. Estudiar qué efecto tiene el silenciamiento de los genes *oma-1* y *oma-2* sobre la apoptosis.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas utilizadas y mantenimiento.

Las cepas utilizadas en este estudio fueron la silvestre N2 (Bristol), mantenida a 20°C; *cep-1(gk138);ced-1::gfp* y la cepa *P_{lim-7}ced-1::gfp*, mantenidas a 24°C. Todos los experimentos fueron llevados a cabo a la temperatura de 24°C. Los animales fueron mantenidos en cajas de Petri con medio NGM-Lite (2 g NaCl, 4 g bactotripton, 3 g KH₂PO₄, 0.5 g K₂HPO₄, 8 mg colesterol, 20 g agar, disueltos en 1 L de H₂O y esterilizado en autoclave). Como alimento se utilizó la cepa de *E. coli* OP50-1.

Sincronización de animales

En una caja mediana de Petri se colocaron cinco animales en estadio L4 a 24°C. Cuando la caja estaba llena de animales adultos (aproximadamente 3 días después), se colectaron en amortiguador M9 (para 1 L: 3 g KH₂PO₄, 6 g Na₂HPO₄, 5 g NaCl, 1 M MgSO₄, esterilizado en autoclave). Por cada volumen de M9, se colocó la mitad de una solución de hipoclorito de sodio comercial Cloralex® y un cuarto de NaOH 5N. La mezcla se agitó por cinco minutos con intervalos de 15 segundos cada minuto de agitación en el vortex. El volumen total se centrifugó en una micro-centrífuga Corning® durante un minuto. Posteriormente se descartó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla (donde se encuentran los embriones) en amortiguador M9. Se hicieron tres lavados. Al final, la pastilla se resuspendió en 1 mL de amortiguador M9, el volumen se colocó en un vaso de precipitados pequeño, se tapó con Parafilm® y se dejó en la incubadora a 24°C toda la noche, esto para que todos los embriones eclosionaran y quedaran temporalmente arrestados en etapa larvaria L1. Al día siguiente, el volumen se centrifugó en tubos de 1.5 mL, se retiró la mayor parte del sobrenadante y la mezcla de los animales sincronizados fue transferida a una caja Petri con las condiciones deseadas.

RNAi

Las bacterias con el plásmido respectivo para producir el RNA de doble cadena (dsRNA) de interés se crecieron toda la noche en 5 mL de medio LB a 37°C. Al día siguiente el volumen fue centrifugado (3 min. a 8300 rpm en una microcentrífuga), descartándose la mayoría del sobrenadante y resuspendiendo la pastilla en aproximadamente 200 µL de sobrenadante para sembrarse sobre cajas de Petri medianas (100 mm de diámetro). Para inducir la transcripción de los insertos en cada plásmido y mantenerlos, el medio de crecimiento NGM-Lite estuvo suplementado con Ampicilina (50 µg/mL), Tetraciclina (12.5 µg/mL) e IPTG (1 mM), además de usarse 30 g/L de agar. Bacterias con el plásmido pPD129.36 sin inserto, se utilizaron como control de silenciamiento (plásmido vacío o PV).

Western Blot

Para extraer proteína, se colectaron alrededor de 100 animales por condición en amortiguador PBS 1X. Se agregó DTT a una concentración final de 2.4 mM y solución de carga con SDS. La electroforesis fue en geles de acrilamida en condiciones desnaturalizantes, y la transferencia se realizó en cámara húmeda. Los anticuerpos primarios utilizados fueron anti-CED-9, IgG policlonal de conejo 1:500 (Santa Cruz Biotechnology) y anti-Tubulina, policlonal de rata 1:1000 (Sigma-Aldrich). Se utilizaron también los anticuerpos secundarios de cabra anti-rata y cabra anti-conejo, ambos en concentración de 1:1000 (Thermo Scientific). Los análisis densitométricos fueron realizados con el software ImageJ®.

Extracción de RNA y RT-PCRs

Aproximadamente 300 animales por condición, sincronizados en etapa L1, se mantuvieron 3 días hasta que alcanzaron el estado adulto. Posteriormente los animales se lavaron con M9 hasta que se observó un sobrenadante transparente (sin bacterias) y se congelaron en 500 µL de TRIzol®. Posteriormente se descongelaron las muestras y se agregaron perlas de vidrio (previamente

esterilizadas por autoclave y tratadas con agua DEPC) para someterse 10 minutos en agitación. Se tomó el sobrenadante y se procedió a extraer el RNA según las recomendaciones del fabricante. El RNA fue cuantificado en un NanoDrop® y se comprobó la integridad del RNA obtenido por medio de un gel de agarosa. Se realizó una reacción de síntesis de cDNA para cada muestra, iniciando de la misma concentración de RNA, utilizando el kit de RT-PCR de Promega® siguiendo el protocolo del fabricante.

Para detectar los mensajeros de *oma-1* se utilizaron los siguientes oligos, con una Tm de 68°C y un producto de amplificación de 293 pb

Delantero 5'-AATATGGCACATCGGCCAGCTAG-3'
 Reverso 5'- CCTGGCATTGGAGAGAATGGTCC-3'

Para el caso de la detección de los mensajeros de *oma-2* se utilizaron los siguientes oligos, con una Tm de 68°C y un producto de amplificación de 388 pb

Delantero 5'- ACTCGTCCAATCAGTCCGTTTG -3'
 Reverso 5'- AGGTGCTTGGCAATGTCCATG -3'

El programa de PCR utilizado para amplificar tanto al gen *oma-1* como a *oma-2* fue el siguiente:

1. 94°C 5 min.
2. 94°C 50 seg.
3. 68°C 50 seg. (*)
4. 72°C 50 seg.
5. GOTO 2 28X
6. 72°C 5 min.
7. 25°C 1 min.

(*) El mismo programa fue utilizado para amplificar el gen de *act-4*, salvo que la Tm en este caso fue de 60°C.

Cruza *cep-1(gk138)* x *P_{lim-7}ced-1::gfp*

Para analizar el efecto de la apoptosis inducida por *cep-1* durante el silenciamiento de genes en la línea germinal [Adamo et al. 2012], se realizó la cruce del transgénico *P_{lim-7}Ced-1::gfp* (referido simplemente como CED-1::GFP), cepa que permite observar y cuantificar cuerpos apoptóticos,

con una mutante en el gen *cep-1(gk138)*. La mutación *cep-1(gk138)* tiene una deleción de 1600 pares de bases, fácilmente rastreable por PCR (Fig. 7). Se diseñaron tres oligonucleótidos para poder seguir la cruza por PCR: uno reverso (Rev), uno delantero (Fwd) y uno delantero interno (Fwd Interno). Los oligonucleótidos Fwd y Rev amplifican un fragmento de 2063 pb en animales silvestres (WT) y uno de 343 pb en la mutante de *cep-1* (Fig. 7).

La secuencia de los oligos utilizados se muestra a continuación:

Rev	5'-AATTGGTACAGCGACTTCTCT-3'
Fwd	5'-GTAAACATTTTCAGTTTGTGAAATACG-3'
Fwd interno	5'-GACCAATACTACTGCACAGG-3'

El programa de PCR utilizado para amplificar el gen de *cep-1* fue el siguiente:

1. 94°C 2 min.
2. 94°C 30 seg.
3. 50°C 30 seg. +1°C/ciclo
4. 72°C 1:20 min.
5. GOTO 2 8X
6. 94°C 30 seg.
7. 55°C 30 seg.
8. 72°C 1:20 min.
9. GOTO 6 30X
10. 72°C 3 min.
11. 25°C 1 min.

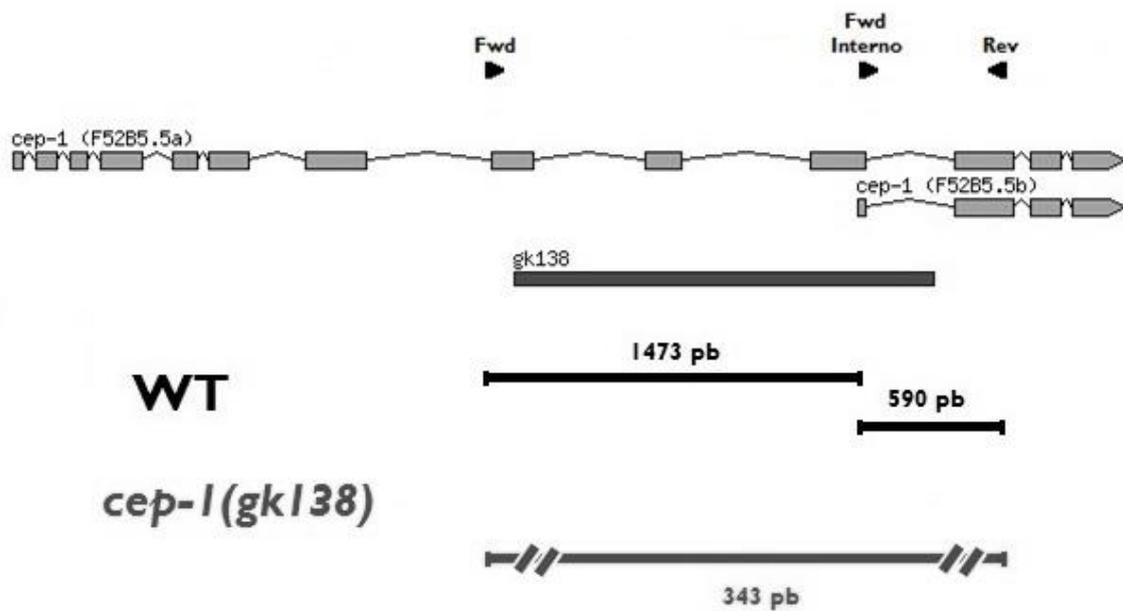


Fig. 7. Topología del gen *cep-1* y ubicación de los oligonucleótidos.

Se muestra la topología del gen *cep-1*, marcándose los exones con cajas y los intrones por líneas. Se muestran los oligonucleótidos utilizados para seguir la mutación (Fwd: delantero; Rev: reverso), así como el tamaño y la posición de la delección en la mutación (caja indicada como *gk138*). Las líneas negras muestran los fragmentos amplificados por los oligonucleótidos. WT indica los amplicones de la cepa silvestre (arriba) y *cep-1(gk138)* indica el amplicón de la cepa mutante (abajo).

Debido a la dificultad de amplificar fragmentos de tamaño tan diferente (2063 pb y 590 pb) con un mismo programa de PCR, se mezclaron los tres oligonucleótidos en una reacción para observar una diferencia entre los animales silvestres y mutantes. Así, en los animales *cep-1(gk138)* se amplifica un fragmento de 343 pb, mientras que en la cepa silvestre el fragmento amplificado es de 590 pb (Fig. 8A; Fig. 7).

Para realizar la cruce se colocaron cinco machos de la cepa *ced-1::GFP* por un hermafrodita de la cepa mutante *cep-1(gk138)* a 24°C. A los tres días se verificó que la cruce fuera exitosa (debido a la presencia de machos), se seleccionaron 10 animales L4 y se separaron en cajas individuales. Cuando estos tuvieron progenie, se observó en el microscopio de fluorescencia al hermafrodita parental, esto para confirmar que acarreará el transgen *ced-1::gfp*. Los 8 animales que presentaron fluorescencia se sometieron a una lisis para realizarse una PCR, con el objetivo

de verificar si eran portadores de la mutación, utilizando para ello los oligonucleótidos Fwd y Rev. Se encontró que todos los animales acarreaban la mutación, amplificándose en todos los casos un fragmento de aproximadamente 343 pb (Fig. 8B).

Una vez que se confirmó la existencia del alelo mutante, la progenie volvió a separarse en cajas individuales. Se revisó la existencia de fluorescencia en el parental y se lisaron los animales para realizar una PCR, utilizándose nuevamente los tres oligonucleótidos. Se encontró que en dos casos, los animales eran heterocigos para la mutación, amplificándose un fragmento de 343 pb y otro de 590 pb, mientras que en un tercer caso, sólo se amplificó el fragmento de 343 pb, lo cual indicó que se había obtenido la mutación en homocigosis (Fig. 8C).

Se comprobó una vez más que la siguiente generación fueran homociga para la mutación y se procedió a realizar un estudio funcional. Se sabe que el gen *cep-1* se requiere para inducir apoptosis en la línea germinal por radiación ultravioleta (UV) [Sterhiou et al. 2007], por lo que se sometieron a los animales mutantes de la cruce a un estrés por radiación (UV), dosificándose 1000 μ J de energía y dejándolos recuperar 3:30 h. Una vez transcurrido el tiempo de recuperación, los animales se montaron al microscopio de fluorescencia para contar los cuerpos apoptóticos observados en la gónada. Mientras que en el control CED-1::GFP se ve una inducción del 64% de la apoptosis por radiación UV (Fig. 8D), en la cruce *cep-1(gk138):CED-1::GFP* no se observa tal inducción, indicándonos esto que la cepa es funcional al ser incapaz de responder a la radiación UV (Fig. 8D). Esto nos confirmó que los animales acarrean la mutación en *cep-1*.

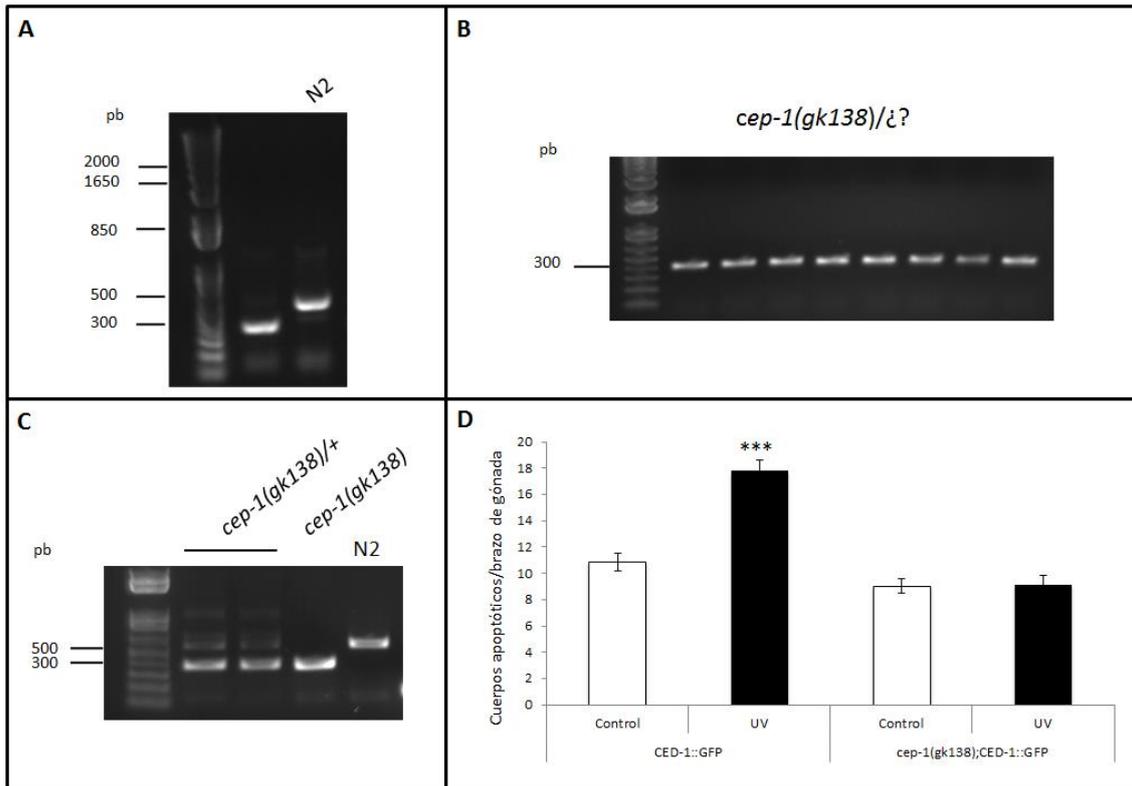


Fig. 8. Cruza entre la cepa transgénica CED-1::GFP y la cepa mutante *cep-1(gk138)*.

A. PCR usando tres oligonucleótidos para distinguir entre los fragmentos de amplificación de la cepa silvestre y la cepa mutante; el tamaño de banda esperado es de 590 pb y 343 pb respectivamente. **B.** PCR usando los oligos Fwd y Rev para identificar a los animales que acarrean la mutación en *cep-1*. Todos los animales tuvieron el alelo mutante, con una amplificación de 343 pb en todos los casos. **C.** PCR para identificar a los animales que tengan la mutación en homocigosis (amplificación de 343 pb) utilizando los tres oligos (Fwd, Fwd interno y Rev) en animales de la siguiente generación. **D.** Para comprobar la funcionalidad de la cruz se realizó una irradiación por UV (1000 μ J, con recuperación de 3:30 h). La mutación en *cep-1* impide responder a los animales a un estrés por radiación UV. Se analizaron al menos 36 animales por condición. Se llevó a cabo una prueba t de Student, *** $p < 0.001$

Detección de cuerpos apoptóticos

Los cuerpos apoptóticos fueron contados en gusanos adultos de las cepas *cep-1(gk138);ced-1::gfp* y *P_{lim-7}ced-1::gfp*. Los animales se montaron sobre colchones de agarosa al 2% en portaobjetos y se visualizaron en un microscopio de epifluorescencia Nikon® Eclipse 6000.

RESULTADOS

La expresión de la proteína CED-9 no se modifica durante el ayuno al silenciar diversos genes.

Con el propósito de analizar qué genes pudiesen estar involucrados en la reducción de la expresión de CED-9 durante el ayuno, se tomaron algunos candidatos a partir del análisis de microarreglos hecho previamente en el laboratorio [Silva, 2007]. Como control se seleccionaron genes que al silenciarse, respondieran al ayuno (i.e. con un nivel de inducción de 1.7, que corresponde al plásmido vacío); como experimentales se tomaron genes que no respondieran al ayuno (nivel de inducción entre 0.9 y 1.1), y habiendo entre estos, una subcategoría de genes que presentaban una apoptosis fisiológica elevada (que el nivel de inducción de la apoptosis fisiológica fuera igual o mayor a 1.7 con respecto al control).

Nuestro primer objetivo fue analizar durante condiciones de ayuno, el efecto del silenciamiento de los genes seleccionados en la expresión de CED-9. Como control de silenciamiento se utilizaron bacterias que contenían el vector sin inserto (referido como plásmido vacío, PV). Para inducir la síntesis de RNA de doble cadena, se usaron bacterias que contuvieran plásmidos con el inserto de los genes de interés. La inducción se realizó en cajas de agar sólido suplementadas con IPTG y antibióticos (ver Materiales y métodos); posteriormente se colocaron gusanos N2 (silvestres) en etapa larvaria L4 en las cajas Petri con la condición de silenciamiento correspondiente (generación P0). Cuando la generación filial F1 llegó a la etapa adulta, se separó en dos grupos. Por un lado se tenían animales bien alimentados (control) y por el otro, animales sometidos a un ayuno en cajas de agar sin comida durante seis horas. Finalizada la incubación, se colectaron entre 80 y 100 animales por condición para analizar la expresión de CED-9 por Western blot (Fig. 9).

Se observaron algunos fenotipos asociados al silenciamiento, esto confirmó que el RNA de interferencia (RNAi) estaba funcionando. El ejemplo más notorio fue el silenciamiento del gen C05D11.3, el cual tiene un efecto en la progenie, ya que bajo estas condiciones de silenciamiento fue evidente la disminución de hijos de los hermafroditas. Por otro lado, con el ayuno, se observaron en estos animales muertes por 'bagging', esto es, que los hermafroditas no expulsaron los embriones y estos eclosionaron dentro, provocando la muerte de la madre.

Como puede observarse en el control (Fig. 9A), después de un ayuno de 6 h, la expresión de CED-9 disminuye [Láscarez, manuscrito en preparación]. El anticuerpo contra CED-9 reconoce varias bandas que no se detectan cuando se silencia el gen, sugiriendo que son formas alternativas de la proteína o productos de degradación [Láscarez et al. manuscrito en preparación]. Como era de esperarse, al disminuir la expresión de los genes cuyo silenciamiento no afecta la respuesta al ayuno (T26C11.7, ZC168.4, C05D11.3), la expresión de CED-9 se ve igualmente disminuida (Fig. 9B). Inesperadamente, al analizar la expresión de CED-9 en los animales donde se silenciaron genes que impiden la respuesta de las células germinales al ayuno (R13F6.10, B0666.7, F25H5.3 R74.8, T08D10.1, F55C5.7, C25A1.8, *oma-1*), los niveles de CED-9 también disminuyeron (Fig. 9C).

Nuestros resultados demuestran que en los genes evaluados, independientemente si los genes se requieren para inducir apoptosis por ayuno o no, los niveles de CED-9 disminuyen con el ayuno de los nematodos. Estos resultados nos indican que el mecanismo que disminuye la expresión de CED-9 y que inicia la respuesta de apoptosis por ayuno, no se afecta durante el silenciamiento de estos genes, sugiriendo una participación en otra parte de la vía.

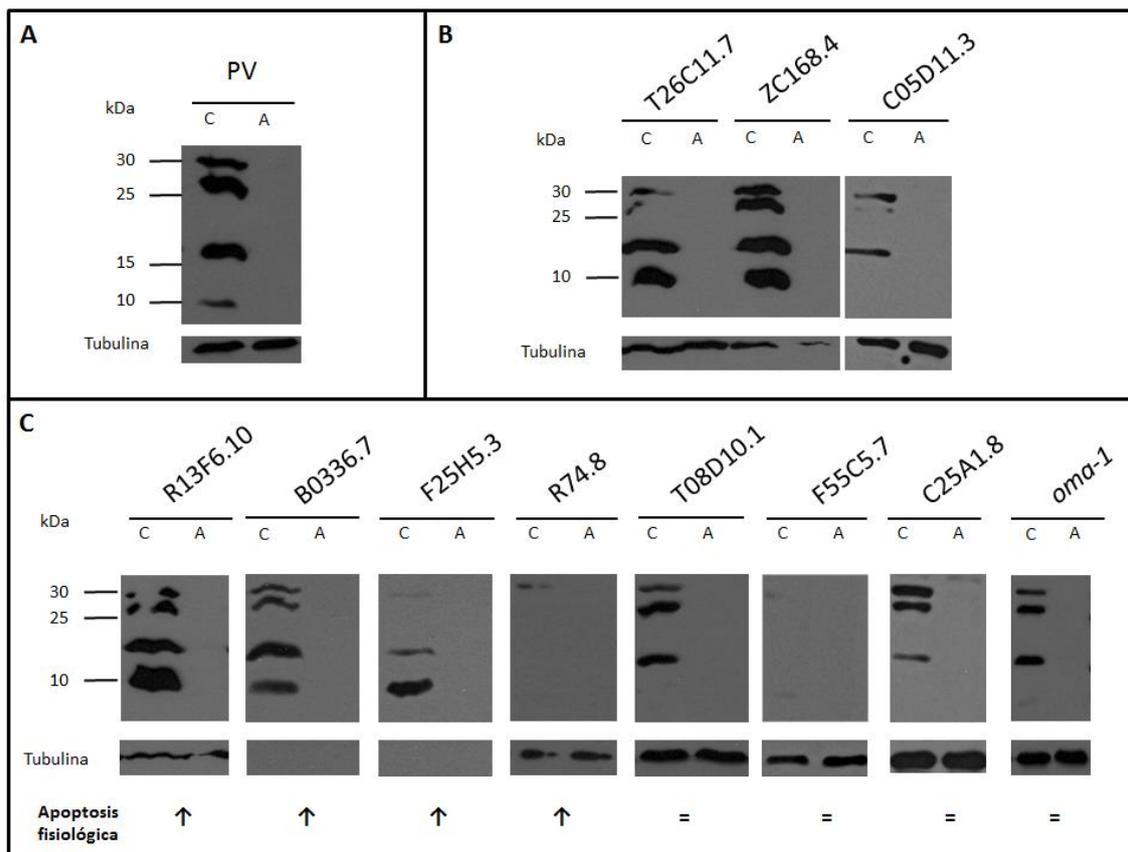


Fig. 9. La expresión de CED-9 siempre disminuye en condiciones de ayuno al silenciarse genes que responden de manera distinta a la apoptosis por dicho estrés.

Animales con un silenciamiento en los genes indicados fueron sometidos a condiciones control (C) o de ayuno por 6 horas (A). Se extrajo proteína y se analizó por Western blot utilizando un anticuerpo contra CED-9. El peso esperado de la proteína es de 31.8 kDa. **A.** Western blot representativo de animales que se alimentaron del plásmido vacío (PV), utilizado como control de silenciamiento. **B.** Western blot de animales RNAi en genes cuyo silenciamiento no tiene efecto en la respuesta apoptótica de las células germinales al ayuno. **C.** Western Blot de animales RNAi en genes cuyo silenciamiento impide el aumento en la apoptosis durante el ayuno. Se indican los niveles de apoptosis fisiológica (AF) al silenciar cada gen, cuando son iguales al control (=), o con apoptosis fisiológica elevada (↑). El anticuerpo anti-tubulina (50kDa) se utilizó como control de carga.

El silenciamiento de ciertos genes afecta la acumulación de CED-9

Un dato interesante es que la acumulación de CED-9 disminuyó al silenciarse los genes F25H5.3, C05D11.3, B0336.7, F55C5.7 y R74.8 en condiciones control (Fig. 9B y C); estos genes codifican para proteínas con distintas propiedades, así que no pueden agruparse al menos por motivos u homología (Ver Apéndice: Información general de genes). Para confirmar estos datos, se realizó un segundo ensayo de Western blot con animales bien alimentados en

dichas condiciones de silenciamiento. De este modo la comparación sería directa, ya que los Western blot de la Figura 1 se realizaron en ocasiones diferentes. Los animales sometidos al RNAi fueron colectados en la etapa adulta (~70 nematodos) y procesados para someterse a una electroforesis en gel de acrilamida y realizar el protocolo de Western Blot.

Para hacer un análisis semicuantitativo del resultado obtenido, se realizó una densitometría con la banda correspondiente al peso de CED-9 (31.8 kDa), tomándose como referencia al control y corrigiendo los datos con la expresión de tubulina (Fig. 10). Se observó una disminución en la acumulación de CED-9 durante el silenciamiento por RNAi de los genes F25H5.3, B0336.7 y F55C5.7, disminuyéndose a un 6%, 25% y 51% respectivamente. Por otro lado, mientras que en los animales C05D11.3 (RNAi) no se obtuvo ningún cambio, los animales R74.8(RNAi) presentaron un aumento del 51% (Fig. 10).

Es interesante notar que el silenciamiento de los genes F25H5.3 y B0336.7 induce un aumento en la apoptosis fisiológica [Silva, 2007], lo cual correlaciona con la disminución de CED-9 descrita en este trabajo. Además, en el caso de C05D11.3, donde el silenciamiento no tiene un efecto en la apoptosis fisiológica, se observa que los niveles de CED-9 son similares a los del control. Por otro lado, silenciar el gen F55C5.7, cuyo silenciamiento no tiene efecto en los niveles de apoptosis fisiológica observados, y a R74.8, cuyo silenciamiento aumenta la apoptosis fisiológica, no presentan una correlación con los niveles de apoptosis observados.

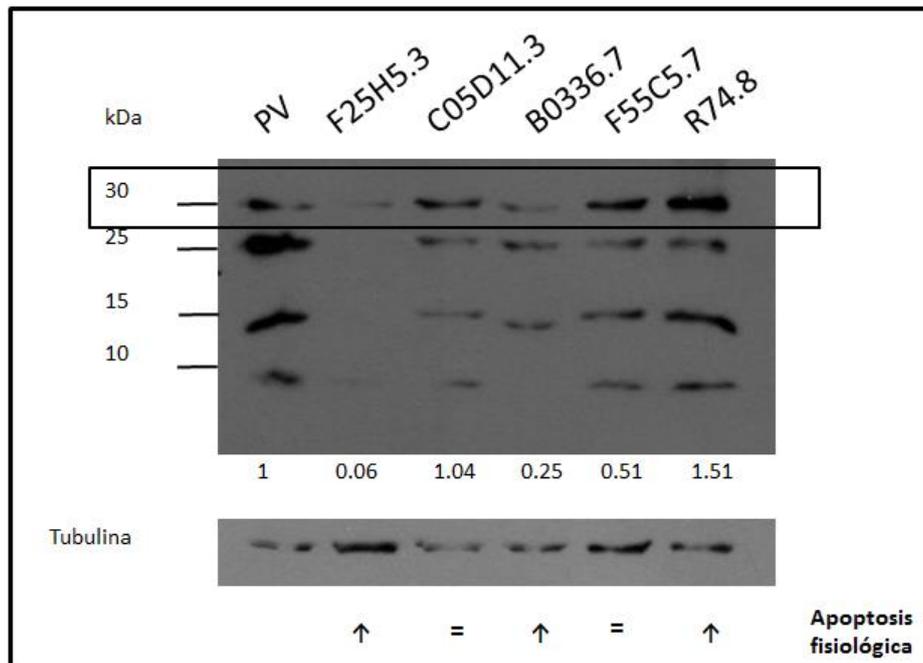


Fig. 10. La acumulación de CED-9 varía durante el silenciamiento de los genes analizados.

Análisis tipo Western blot mostrando la acumulación de la proteína CED-9 durante el silenciamiento de los genes indicados. Se utilizó al plásmido vacío (PV) como control de silenciamiento y como referencia para analizar los niveles de expresión de CED-9 durante el silenciamiento de los demás genes. Los resultados de la densitometría con respecto al plásmido vacío (y corregidos con tubulina) se muestran abajo. El peso esperado es de 31,8 KDa para CED-9, por lo que fue dicha banda la utilizada para el análisis densitométrico (recuadro). Los niveles de apoptosis fisiológica (AF) al silenciar cada gen se muestran abajo, en donde se denominan como (=) si son iguales al control, o como (↑) si aumentan la apoptosis fisiológica. La tubulina se utilizó como control de carga (50 kDa).

El silenciamiento del gen *oma-1* afecta la acumulación de CED-9

Entre los genes cuyo silenciamiento afecta la respuesta de las células de la línea germinal al ayuno, se encontró a *oma-1* (Fig. 9) [Silva, 2007]. Este gen codifica para una proteína de dedos de zinc involucrada en la maduración de los ovocitos de *C. elegans* [Detwiler et al. 2001]. Aunque el gen *oma-2*, su parálogo, no se encontró entre los genes con expresión desregulada en el microarreglo de ayuno, se decidió hacer un experimento donde se silenciaran los genes *oma-1* y el gen *oma-2* por separado, así como a ambos genes simultáneamente (*oma-1/oma-2*), ya que se ha observado que la actividad de ambos genes es redundante [Detwiler et al. 2001].

Se sincronizaron animales silvestres y se sometieron al silenciamiento de *oma-1*, *oma-2* y *oma-1/oma-2* desde la etapa larvaria L1, debido a que el doble silenciamiento de los genes *oma-1/2* produce esterilidad, impidiendo obtener la F1 después del silenciamiento. Se colectaron aproximadamente 100 animales adultos jóvenes (24 h post L4), se lisaron y se cargaron los extractos en un gel de poliacrilamida. Se realizó el procedimiento de Western blot tal como se describió previamente.

Se observó una reducción en la expresión de CED-9 durante el silenciamiento del gen *oma-1*, mientras que no hubo efecto cuando se silenció el gen *oma-2* o cuando se silenciaron ambos genes a la vez (Fig. 11). Este dato fue inesperado, ya que se esperaba que el silenciamiento de ambos genes fuera más eficiente sobre el fenotipo observado, por lo que procedimos a verificar la eficiencia del silenciamiento.

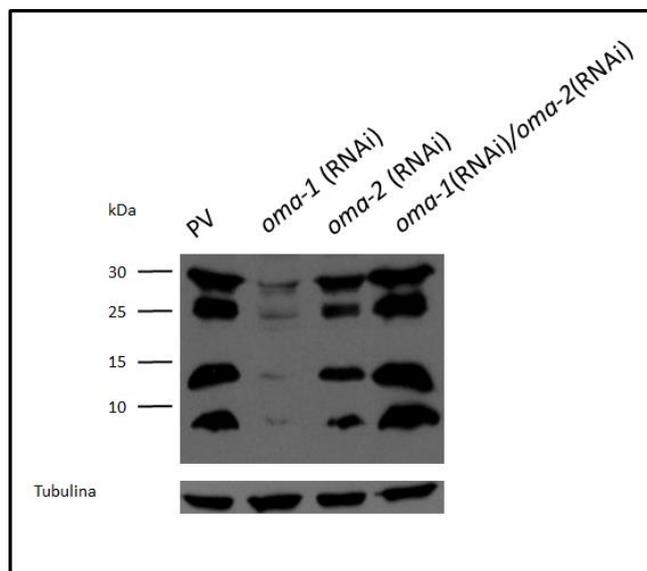


Fig. 11. La acumulación de la proteína CED-9 disminuye al silenciar el gen *oma-1*.

Se sincronizaron animales de la cepa N2 y se colocaron en la etapa larvaria L1 en las condiciones de silenciamiento indicadas. Se colectaron 100 animales adultos jóvenes (24 h post L4) por condición, se lisaron y los extractos se cargaron en un gel de poliacrilamida desnaturalizante. El gel se transfirió y la membrana se incubó con el anticuerpo contra CED-9. El resultado muestra una disminución en la expresión de la proteína CED-9 durante el silenciamiento de *oma-1*. Abajo se muestra la tubulina (50 kDa) como control de carga. Se utilizó el plásmido vacío (PV) como control de silenciamiento. Western blot representativo de dos experimentos.

Para corroborar la eficiencia del silenciamiento de los genes *oma-1* y *oma-2*, se extrajo RNA de aproximadamente 300 animales que crecieron en la condición de RNAi correspondiente desde la etapa larvaria L1. Una vez que los animales alcanzaron la etapa adulta, se lavaron, colectaron en M9 y posteriormente el amortiguador se cambió por TRIzol® para extraer RNA. Se verificó la integridad del RNA en un gel de agarosa y se preparó cDNA partiendo de la misma cantidad de RNA (25µg) para todas las muestras, usando el kit de Promega®.

Se procedió a realizar RT-PCRs para cada gen, utilizando al gen *act-4* como control de amplificación (Fig. 12). Se observó que en el cDNA de los animales *oma-1*(RNAi) y en el de *oma-1*(RNAi)/*oma-2*(RNAi), la cantidad del RNA disminuyó considerablemente, a un 19% y 16% respectivamente, indicando así un silenciamiento eficiente. También se observó que el silenciamiento de *oma-1* no afecta la expresión de *oma-2* (Fig. 12), sugiriendo que el silenciamiento es específico. Al amplificar el cDNA de *oma-2*, se encontró que la expresión en animales *oma-2*(RNAi) y en *oma-1*(RNAi)/*oma-2*(RNAi), se redujo a un 14% y un 5% respectivamente (Fig. 12). Se observó que al silenciar el gen *oma-2* se produce una disminución en la expresión de *oma-1*, sugiriendo un silenciamiento cruzado.

Nuestros datos nos indican que hay una reducción eficiente en el RNA mensajero de los genes *oma-1* y *oma-2* cuando dichos genes se silencian por RNA de interferencia, aunque en el caso de *oma-2* el silenciamiento resultó no ser tan específico.

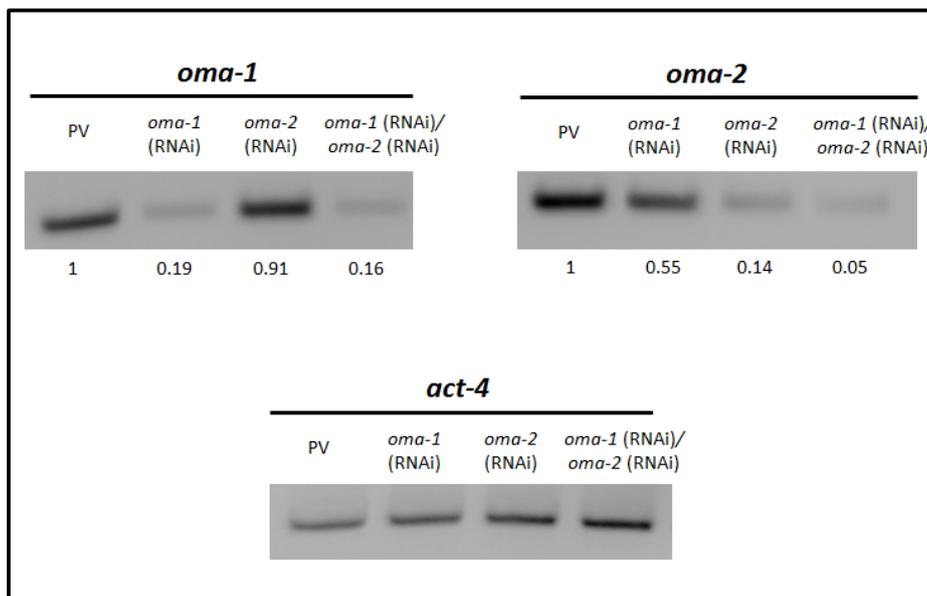


Fig. 12. El silenciamiento de los genes *oma-1* y *oma-2* es eficiente.

Animales adultos de un día, sometidos desde L1 a un silenciamiento en los genes *oma-1*, *oma-2* y *oma-1/oma-2* fueron lavados y colectados con M9. Posteriormente el amortiguador se sustituyó por TRIzol®. Se les extrajo RNA, se sintetizó cDNA y se realizaron los ensayos de RT-PCRs para evaluar la eficiencia del silenciamiento. En negritas se muestra el gen amplificado y debajo de la línea se indica la condición de silenciamiento estudiado. Abajo se muestra la amplificación del gen *act-4* como control de amplificación. Se utilizó el plásmido vacío (PV) como control de silenciamiento. Los números muestran el porcentaje de expresión con respecto al control, normalizado con *act-4*. El fragmento amplificado para el gen *oma-1* es de 292 pb y el de *oma-2* es de 240 pb.

Análisis de la expresión del RNA mensajero de *ced-9* durante el silenciamiento de los genes *oma-1* y *oma-2*

Como se observó una reducción en la acumulación de la proteína de CED-9 al silenciar el gen *oma-1*, se decidió evaluar los niveles del mensajero de esta proteína anti-apoptótica durante la mismas condiciones de silenciamiento. Para esto se realizó una curva de ciclos en el cDNA que se sintetizó en el experimento anterior, proveniente de RNA de animales con silenciamiento en los genes *oma-1*, *oma-2* y *oma-1/2* (Fig. 12).

Como control se amplificó el gen *act-4* (panel superior, Fig. 13). En el panel inferior se muestra la amplificación de *ced-9* en las muestras de cDNA indicadas (Fig. 13). Si bien se observa una

disminución en el RNA mensajero de *ced-9* en el caso de *oma-1*(RNAi), esta disminución es mucho más evidente en el doble RNAi *oma-1/-2*.

Esto nos lleva a concluir que durante el silenciamiento del gen *oma-1*, tanto la proteína como el mensajero de *ced-9* disminuyen. En el caso del doble silenciamiento *oma-1/-2*, sólo el RNA mensajero de *ced-9* disminuye, aunque vale la pena recordar que los niveles de la proteína se mantienen normales en estas condiciones.

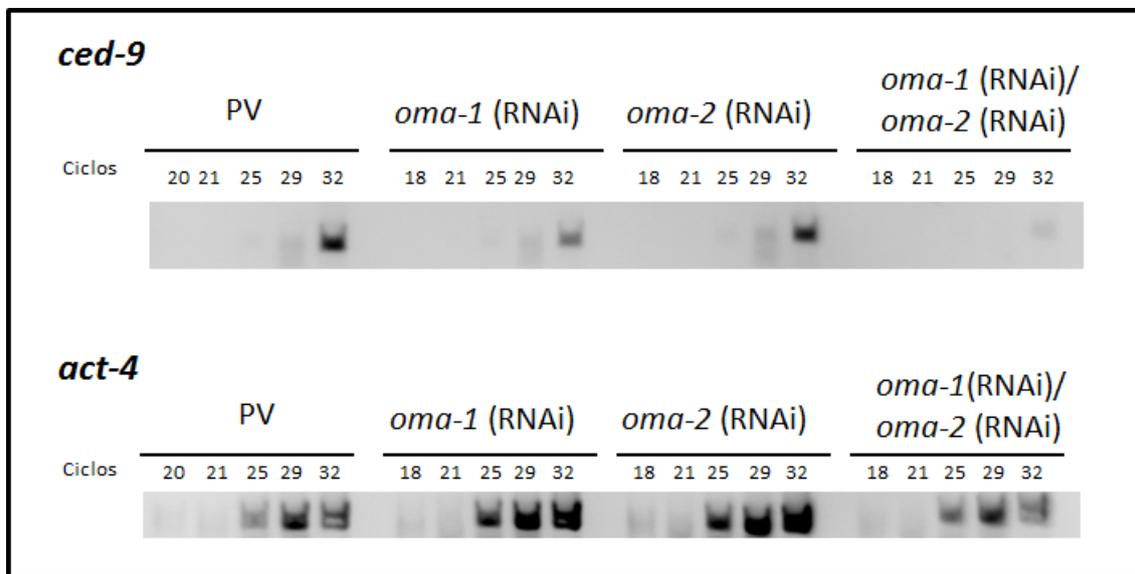


Fig. 13. Expresión del RNA mensajero de *ced-9* durante el silenciamiento de los genes *oma-1* y *oma-2*.

Se realizó una curva de ciclos amplificando los RNA mensajeros de los genes *act-4* y *ced-9* (indicados en negritas) a partir del cDNA de las condiciones indicadas. Se muestra el número de ciclos bajo cada línea. Sobre la línea, se indica la muestra de cDNA de la cual se está amplificando. Imagen representativa de dos amplificaciones.

Efecto del silenciamiento de los genes *oma-1* y *oma-2* sobre la apoptosis de las células germinales

Al observarse una disminución en la acumulación de la proteína CED-9 en los animales *oma-1(RNAi)*, se decidió evaluar si esto tendría un efecto en la apoptosis fisiológica. Para esto, se utilizaron animales de la cepa transgénica CED-1::GFP (Antecedentes; Zhou et al. 2001). Estos animales fueron sincronizados y sometidos al silenciamiento de los genes *oma-1*, *oma-2* y *oma-1/oma-2* desde la etapa larvaria L1. Animales adultos jóvenes que comenzaban a producir embriones en cada condición, fueron montados sobre portaobjetos con agar para ser observados por microscopía de fluorescencia y así determinar el número de cuerpos apoptóticos (Fig. 14; Tabla 3).

El promedio de cuerpos apoptóticos observados en los animales control fue de 8.25 por brazo de la gónada y no se encontró diferencia al silenciar a los genes *oma-1* y *oma-2* (cuyos promedios fueron de 8.98 y 8.65 respectivamente). Sin embargo, los animales *oma-1(RNAi)/oma-2(RNAi)* mostraron un aumento significativo con respecto al control (prueba t de student, $p < 0.005$), ya que se obtuvo un promedio de 10.97 cuerpos apoptóticos por brazo de gónada. Es interesante notar que la disminución en la abundancia de CED-9 en los animales *oma-1(RNAi)*, no se ve reflejada en cambio alguno en la apoptosis durante este silenciamiento. Sin embargo, llama la atención que el doble silenciamiento de los genes *oma-1/-2* induzca un aumento en la apoptosis fisiológica, aunque los niveles de acumulación de CED-9 no se vean afectados en estas condiciones.

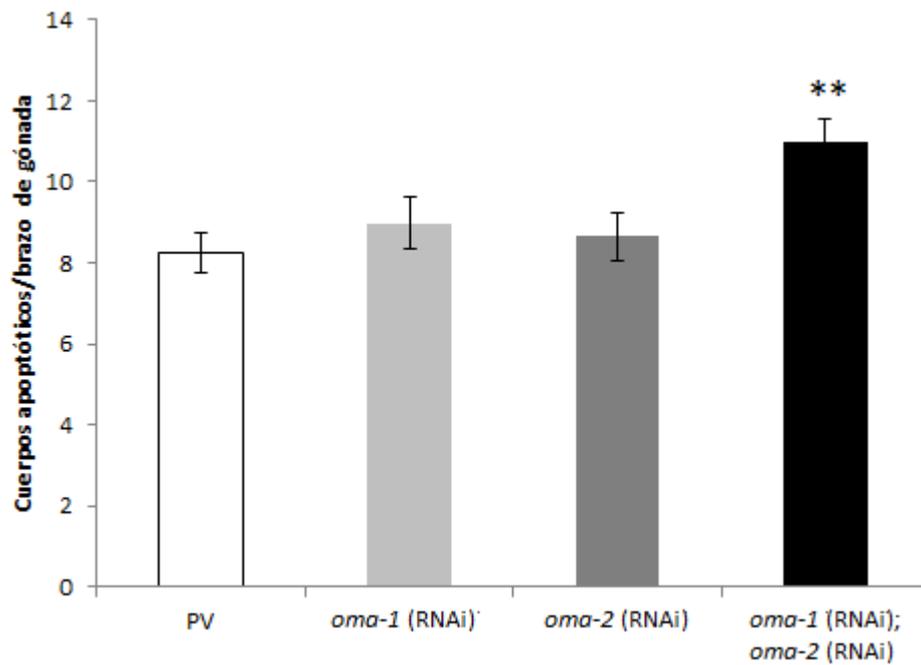


Fig. 14. La apoptosis fisiológica se incrementa discretamente al silenciar los genes *oma-1* y *oma-2* simultáneamente

Se contaron cuerpos apoptóticos por gónada en animales adultos de un día de la cepa CED-1::GFP, tras el silenciamiento de los genes *oma-1*, *oma-2* y *oma-1/oma-2*. Como control de silenciamiento se utilizó el plásmido vacío (PV). Los experimentos se realizaron a 24°C. Se contaron al menos 55 animales por condición. El experimento se realizó por duplicado. Se llevó a cabo una prueba t de Student, ** $p < 0.005$

RNAi	Promedio de cuerpos apoptóticos por brazo de gónada	Nivel de inducción	SEM	n
PV	8.25	1	0.50	59
<i>oma-1</i>	8.98	1.09	0.64	56
<i>oma-2</i>	8.65	1.05	0.60	63
<i>oma-1/oma-2</i>	10.97	1.33	0.59	61

Tabla 3. Apoptosis fisiológica producida por el silenciamiento de los genes *oma-1* y *oma-2*

Se contaron cuerpos apoptóticos por gónada en animales adultos de un día, tras el silenciamiento de los genes *oma-1*, *oma-2* y *oma-1/oma-2* (Fig. 5). Como control de silenciamiento se utilizó el plásmido vacío (PV). El conteo se realizó en la cepa transgénica CED-1::GFP a 24°C. El nivel de inducción indica cuánto se induce la apoptosis con respecto al control (PV=1). Se muestra el error estándar de la muestra (SEM) y el número de gónadas analizadas (n). El experimento se realizó por duplicado.

Análisis de la apoptosis dependiente de *cep-1* durante el silenciamiento de los genes *oma-1* y *oma-2*.

Al analizar la apoptosis fisiológica de la línea germinal durante el doble silenciamiento de los genes *oma-1* y *oma-2*, se encontró un aumento significativo ($p < 0.005$) en el número de cuerpos apoptóticos observado en el doble RNAi. Esto puede deberse a un fenómeno de apoptosis inducida por RNA de doble cadena, donde el RNAi de genes que se expresan en la línea germinal induce un aumento en la apoptosis, el cual es dependiente del gen *cep-1* (el homólogo en *C. elegans* de p53) [Adamo et al. 2012].

Para descartar este fenómeno, se evaluó la apoptosis fisiológica silenciando los genes *oma-1/-2* en la cepa mutante *cep-1(gk138);ced-1::gfp* (Ver Materiales y métodos, Fig. 8). Para ello se sometieron a poblaciones sincronizadas de animales L1 a RNA de doble cadena por alimentación de los genes *oma-1* y *oma-2*, utilizándose como control de silenciamiento al plásmido vacío. La apoptosis se cuantificó en animales adultos de un día en el microscopio de fluorescencia.

Se observó una ligera disminución en el número de cuerpos apoptóticos por brazo de gónada en los animales *oma-1*(RNAi) y *oma-2*(RNAi), con un promedio observado de 4.6 y 4.4 respectivamente (Fig. 15; Tabla 4). Sin embargo no se encontró diferencia significativa en esas poblaciones al compararse con el plásmido vacío, que tuvo un promedio de 5.8 cuerpos apoptóticos (prueba t de Student). Se observó además que el nivel de apoptosis observado en los animales *oma-1*(RNAi)/*oma-2*(RNAi), con un promedio registrado de 5.7 cuerpos apoptóticos, es prácticamente el mismo que el del control. Esto nos indica que el aumento observado anteriormente (Fig. 14) se debía a una muerte celular inducida por RNA de doble cadena. Esto nos indica que, aunque el silenciamiento de *oma-1* tiene un efecto sobre la expresión de CED-9,

esto no se ve reflejado en la apoptosis, quedando por investigar qué otro proceso biológico involucra a CED-9, y de qué manera OMA-1 regula su expresión.

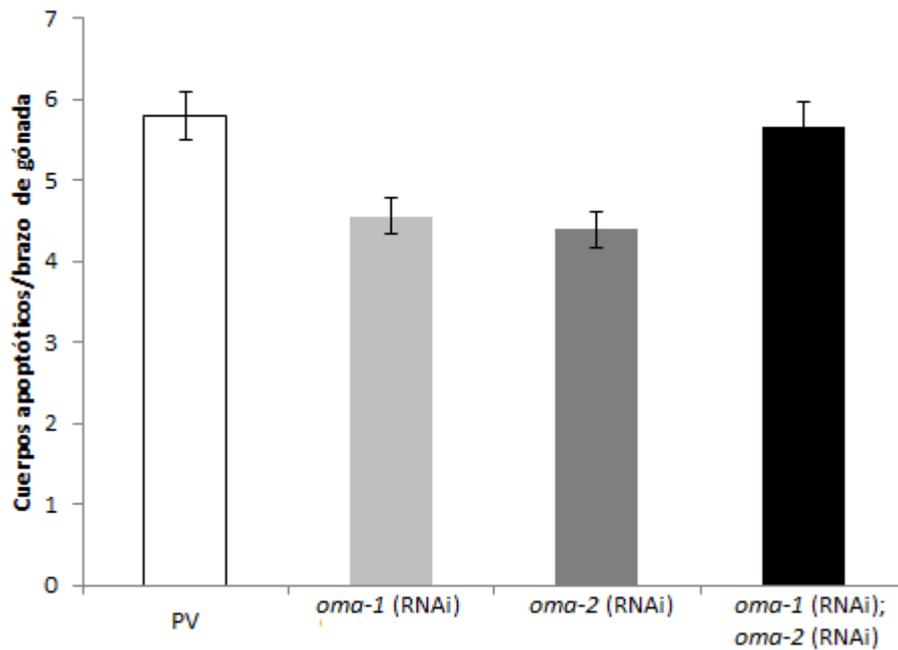


Fig. 15. El silenciamiento simultáneo de los genes *oma-1* y *oma-2* produce una apoptosis fisiológica por RNA de doble cadena dependiente de *cep-1*.

Se contaron cuerpos apoptóticos por gónada en animales adultos de un día, tras el silenciamiento de los genes *oma-1*, *oma-2* y *oma-1/oma-2*. Como control de silenciamiento se utilizó el plásmido vacío (PV). El experimento se realizó con la cepa *cep-1(gk138);CED-1::GFP* a 24°C. Se contaron por lo menos 50 animales por condición. El experimento se realizó por duplicado.

RNAi	Promedio de cuerpos apoptóticos por brazo de gónada	Nivel de inducción	SEM	n
PV	5.79	1	0.29	52
<i>oma-1</i>	4.56	0.79	0.22	59
<i>oma-2</i>	4.40	0.76	0.21	63
<i>oma-1/oma-2</i>	5.67	0.98	0.31	72

Tabla 4. Apoptosis fisiológica durante el silenciamiento de los genes *oma-1* y *oma-2* en un fondo mutante para *cep-1*.

Se contaron cuerpos apoptóticos por gónada en animales adultos de un día, tras el silenciamiento de los genes *oma-1*, *oma-2* y *oma-1/oma-2* en la cepa *cep-1(gk138);CED-1::GFP* a 24°C (Fig. 6). Como control de silenciamiento se utilizó el plásmido vacío (PV). El nivel de inducción indica cuánto se induce la apoptosis con respecto al control (PV=1). Se muestra el error estándar de la muestra (SEM) y el número de gónadas contado (n). El experimento se realizó por duplicado.

DISCUSIÓN

La expresión de CED-9 disminuye en condiciones de ayuno aunque no aumente la apoptosis de las células germinales

Al tener un grupo de genes que al silenciarse no muestran una respuesta en la apoptosis durante el ayuno, esperábamos que la causa fuera una expresión sostenida de la proteína anti-apoptótica CED-9. Sin embargo, encontramos que la expresión de dicha proteína disminuye en condiciones de ayuno. Esto nos sugiere que la baja expresión de CED-9 es un mecanismo robusto y que puede existir otro punto de regulación más adelante en la vía.

No siempre existe una correlación entre la apoptosis fisiológica elevada y la baja expresión de CED-9

Se estudiaron cuatro genes cuyo silenciamiento provoca una apoptosis fisiológica elevada. Esperábamos que su silenciamiento en condiciones normales de crecimiento tuviera un efecto en la expresión de CED-9, es decir, a mayor apoptosis fisiológica, menor expresión de proteína anti-apoptótica. Esta premisa resultó cierta para el caso del gen F25H5.3, ya que al silenciarse, se redujo la expresión de CED-9. Este gen codifica para una de las dos piruvato cinasas existentes en *C. elegans*. Experimentos en mutantes para este gen han demostrado que la proteína es esencial para el desarrollo embrionario, mostrando expresión desde el sistema reproductivo en el adulto hasta los primeros blastómeros, sin embargo en el presente estudio no se cuantificó la progenie durante el silenciamiento por RNAi. Aunque no hay ningún reporte en la literatura sobre alguna piruvato cinasa afectando la expresión de proteínas anti-apoptóticas, la disminución que se observa en la expresión de CED-9 puede deberse a que F25H5.3 está dentro de un operón. El otro gen dentro del operón es *eef-2*, el cual codifica para un homólogo del factor de elongación de traducción 2, una proteína de unión a GTP esencial para la fase de elongación durante la síntesis de proteínas. Queda por determinar si el silenciamiento dirigido del

gen F25H5.3 afecta también la expresión de EEF-2, ya que se ha visto que el silenciamiento por RNAi hacia un gen de un operón podría tener efecto en la expresión de otros genes dentro del mismo operón [Bosher et al. 1999].

También observamos una disminución en la expresión de CED-9 durante el silenciamiento del gen B0336.7, lo cual correlaciona con el aumento observado en la apoptosis fisiológica en estas condiciones. Este gen codifica para dos isoformas de una proteína con dominio THAP, el cual se une a DNA [Wormbase]; otras proteínas con tal dominio son LIN-15, LIN-36 y HIM-17, las cuales interactúan con la proteína LIN-35, homólogo en *C. elegans* de la proteína Rb (retinoblastoma), con capacidad anti-apoptótica. La proteína THAP1 en humanos tiene una función pro-apoptótica que depende del dominio THAP en el carboxilo terminal [Roussigne et al. 2003]. En humanos se ha demostrado una interacción de THAP1 con la proteína pro-apoptótica Par-4 (para la cual no hay un homólogo, al menos a nivel de secuencia proteica, en *C. elegans*). Par-4 es una proteína que disminuye la expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 [Qiu et al. 1999] y se ha propuesto que THAP1 funciona como un factor de transcripción unido a DNA y utiliza su interacción con Par-4 para disminuir los niveles de Bcl-2 y promover así la apoptosis. En *C. elegans* se conoce poco sobre el gen B0336.7, por lo que sería interesante estudiar si existe relación entre éste y *lin-35/Rb* y/o *ced-9*.

En el caso del gen F55C5.7, cuyo silenciamiento no incrementa la apoptosis fisiológica, la expresión de CED-9 disminuyó en un 50%. Se predice que F55C5.7 codifica para un homólogo de la cinasa delta de la proteína ribosomal S6 (RPS6KC1) en humano [Wormbase]. Este gen se encuentra en un operón junto con F55C5.8, el que también por homología, se predice que codifica para la isoforma 1 de la partícula de reconocimiento de la señal de la proteína de 68 kDa (SRP68). De ambas proteínas se tiene escasa información, tanto en *C. elegans* como en humanos, quedando por confirmar si es el silenciamiento de F55C5.7 el que disminuye la expresión de CED-9 y no sea efecto de F55C5.8 [Bosher et al. 1999].

Otro caso similar fue el que presentó el silenciamiento del gen R74.8, ya que mostró una apoptosis fisiológica elevada y, a su vez, un aumento en la expresión de CED-9 en aproximadamente un 50%. Se sabe muy poco sobre este gen, apenas que tiene homólogos con otros miembros del género *Caenorhabditis*. Coincidentemente, este gen se encuentra también dentro de un operón, junto con el gen R74.7, el cual codifica para un homólogo en humano de la isoforma 2 de la RNA metiltransferasa 1 ribosomal putativa, de la cual tampoco hay mucha información.

Aunque observamos algunos casos en donde existe una correlación entre una baja expresión de CED-9 y un aumento en la apoptosis fisiológica, esto no fue una constante. Esto nos sugiere que hay otros puntos de regulación en la vía de inducción de apoptosis que quedan por descubrir.

El silenciamiento del gen *oma-1* provoca una disminución en la expresión de *ced-9*, a nivel de proteína y de mRNA

Un hallazgo que nos pareció interesante en este trabajo, fue que el silenciamiento de *oma-1* baja la expresión de CED-9. Esto no se esperaba, ya que en el primer experimento (Fig. 1), la expresión de CED-9 durante el silenciamiento de *oma-1* es normal. Lo que difiere del experimento posterior (Fig. 3) es la etapa en la cual el silenciamiento fue llevado a cabo; mientras en los experimentos de la Figura 1 el silenciamiento se hizo desde los animales en L4 y se analizó a la primera generación filial, los resultados de la Figura 3 muestran experimentos hechos en poblaciones sincronizadas de animales L1, analizándose esta misma población cuando logran alcanzar el estado adulto. Ya que *oma-1* y *oma-2* son redundantes, puede ser que la falta del gen *oma-1* en el animal parental, de alguna manera active otros para que toda función se lleve a cabo normalmente; mientras que en los animales cuyo silenciamiento empieza en la etapa larvaria L1, el silenciamiento podría tener un efecto más inmediato.

Es inesperado que el gen homólogo *oma-2* no tenga el mismo efecto. Más aún es sorprendente que el doble silenciamiento *oma-1/oma-2* no tenga un efecto sobre la expresión de CED-9. Una posible explicación es que, aunque las proteínas OMA-1 y OMA-2 son prácticamente idénticas cuando se alinean los dos dedos de zinc que cada una posee, tienen un 64% de identidad al comparar las secuencias proteicas completas [Detwiler et al. 2001]. Una posible explicación de por qué OMA-1 (y no OMA-2) está implicada en la disminución de CED-9, podría estar en la naturaleza de las proteínas de la familia TIS11. Se sabe que los miembros de esta familia en mamíferos, pueden unirse a otras proteínas a través de sus extremos amino-terminales sin que los dedos de zinc estén involucrados [Baou et al. 2009]. De manera interesante, al alinearse los extremos N-terminal de OMA-1 y OMA-2, estos sólo tienen una homología del 37%, mientras que la homología en la región carboxilo-terminal es del 66%. Estas diferencias podrían sugerir que OMA-1 podría unirse a otras proteínas que modifiquen su afinidad o selectividad por ciertos RNAs.

Otra posible explicación es que la expresión de OMA-1 y OMA-2 es ligeramente diferencial en la gónada, ya que OMA-1 es detectable antes de que los ovocitos se celularicen, mientras que OMA-2 está expresada en ovocitos completamente celularizados [Detwiler et al. 2001]. De manera interesante, se ha visto a CED-9 expresarse de manera enriquecida en el asa de la gónada, que es la zona donde ocurre la apoptosis, esto es, antes de que se celularicen los ovocitos [Park et al. 2006]. Esto indica que tanto OMA-1 como CED-9 se encuentran expresados en el mismo sitio, sugiriendo que hay una correlación en la expresión de OMA-1 y CED-9. Para corroborar esto, sería interesante hacer una proteína de fusión CED-9::mCherry, ya que hay animales transgénicos OMA-1::GFP disponibles [Nishi, 2005] y comprobar si la expresión de ambas proteínas coincide tanto espacial como temporalmente.

En mamíferos se sabe que los dedos de zinc de las proteínas TIS11 interaccionan con elementos ricos en adenina y uridina (AREs, por sus siglas en inglés AU Rich Elements) [Baou,

2009]. Una de las proteínas con AREs en la región 3'-no traducida es Bcl-2. De manera interesante, al analizar las regiones no traducidas en el 3' del mensajero de *bcl-2* en otras especies, se encontraron estos elementos en los mRNA del humano, ratón, pollo e incluso, en el ortólogo de *bcl-2* en *C. elegans*, *ced-9* [Schiavone et al. 2000]. En un trabajo reciente, se demostró que en efecto, la proteína OMA-1 es capaz de unir secuencias ricas en secuencias UA(A/U) [Kaymak et al. 2013]. Una búsqueda de dichos motivos en la región 3'UTR de *ced-9*, mostró que la secuencia presenta 14 de estos motivos de unión a OMA-1, reforzando la hipótesis de que la proteína se une al mRNA de *ced-9*. Para confirmar una interacción física entre OMA-1 y el mRNA de *ced-9*, podría hacerse un ensayo de cambio de corrida electroforética o EMSA (por sus siglas en inglés Electrophoretic Movement Shift Assay).

Un dato contradictorio es que, aunque se observa una disminución del mensajero de *ced-9* en el doble RNAi *oma-1/oma-2*, esto no se refleja en la acumulación de la proteína. Esto podría explicarse si OMA-1 se une de manera transitoria al mRNA de *ced-9*, y al no estar ambas proteínas, es posible que el mRNA sea capturado o estabilizado por otras proteínas de unión a RNA, e incluso, por otras proteínas de la familia TIS11 con una especificidad menor o variable. En *C. elegans* se han encontrado varias proteínas, al analizar la homología de los residuos presentes en los dedos de zinc [Pagano et al. 2007]. Incluso, se ha propuesto que OMA-1 requiere de factores adicionales para aumentar la especificidad con la que une a sus mRNA blancos [Kaymak et al. 2013].

Relación entre el silenciamiento de *oma-1* y la apoptosis fisiológica

Al observarse una menor cantidad de CED-9 durante el silenciamiento de *oma-1*, esperábamos encontrar algún efecto en la apoptosis fisiológica. Inesperadamente, al silenciar *oma-1* la apoptosis fisiológica no cambia; sin embargo se observó un aumento en la apoptosis durante el doble silenciamiento *oma-1/-2*. Posteriormente comprobamos que este aumento en la apoptosis

fisiológica se debía a un fenómeno de apoptosis inducida por silenciamiento, el cual depende de *cep-1/p53* [Adamo et al. 2012]. Aún queda por determinar qué efecto tiene la baja en la expresión de CED-9 en la fisiología del animal.

CONCLUSIONES

En el presente trabajo se encontró que la disminución en la acumulación de la proteína anti-apoptótica CED-9 no es el único requisito para que ocurra una inducción de apoptosis por ayuno. Parece haber otro punto de regulación en la vía. Además, en la mayoría de los casos, una disminución en la acumulación de CED-9 sí correlacionó con un aumento en la apoptosis fisiológica. Por otro lado, encontramos que el silenciamiento en la expresión del gen *oma-1* provoca una disminución en la expresión del mRNA de *ced-9* y su proteína. Sin embargo, este efecto no tuvo una correlación con la inducción de la apoptosis fisiológica, quedando por determinar qué consecuencias tiene la baja expresión de *ced-9* en animales *oma-1* (RNAi).

APÉNDICE

Análisis de la apoptosis dependiente de *cep-1* durante el silenciamiento de genes con apoptosis fisiológica elevada

Entre los genes cuyo silenciamiento imposibilitaban responder al ayuno a los nematodos, varios de ellos tenían una apoptosis fisiológica elevada; estos son R74.8, R13F6.10, F55C5.7 y B0336.7 [Silva, 2007]. Con esto en mente, se quiso elucidar si dicho aumento en la apoptosis se debía a un fenómeno de RNA de doble cadena, como en el caso de *oma-1*(RNAi)/*oma-2*(RNAi) (Fig. 6).

Se sincronizaron animales de la cepa *cep-1(gk138);CED-1::GFP* para alimentarse desde la etapa L1 con las bacterias conteniendo los plásmidos correspondientes para el silenciamiento de cada gen: R74.8, R13F6.10, F55C5.7 y B0336.7. Una vez que estos fueron adultos jóvenes, se contaron los cuerpos apoptóticos en la gónada (Fig. A1, Tabla A1).

Los datos obtenidos nos refieren que no hay una disminución en la apoptosis fisiológica que dependa de *cep-1*, ya que no se observó alguna diferencia estadísticamente significativa entre los animales control (*CED-1::GFP*) (Fig. A1, barras blancas), y los mutantes para *cep-1* (*CED-1::GFP/cep-1(gk138)*) (Fig. A1, barras negras).

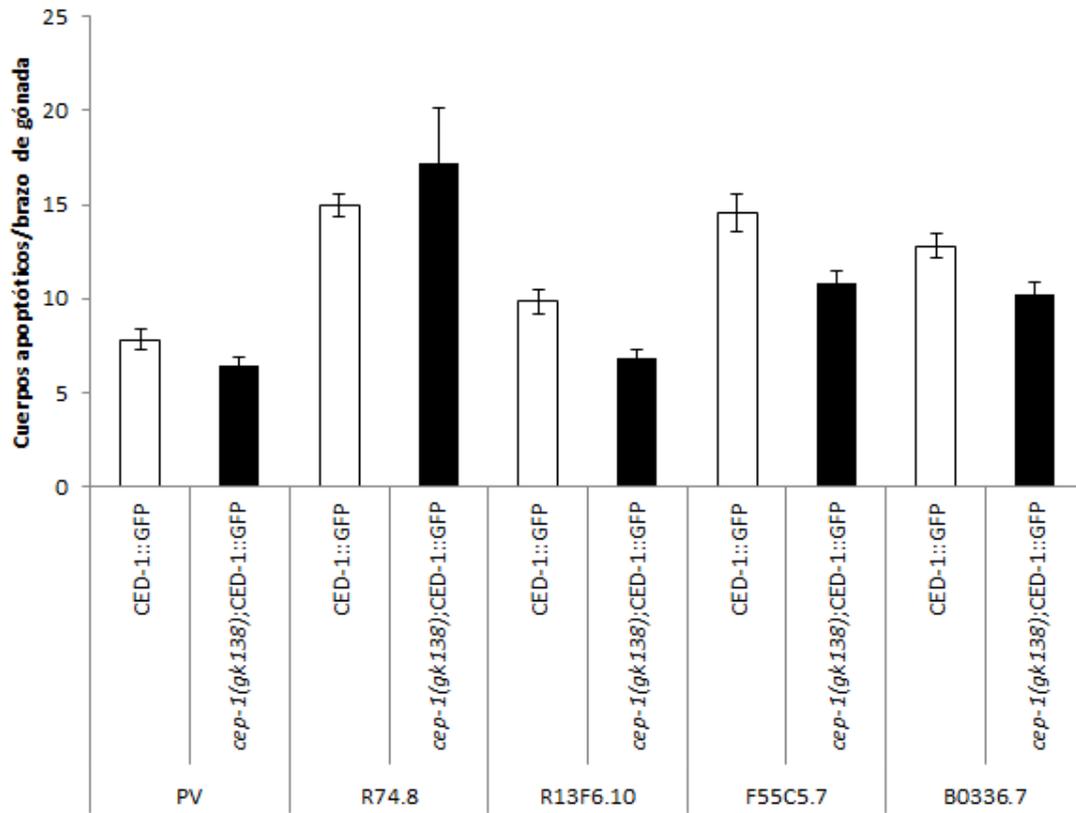


Fig. A1. Apoptosis dependiente de *cep-1*.

Análisis de apoptosis fisiológica (utilizando la cepa CED-1::GFP) y la apoptosis dependiente de *cep-1* (medida con la cepa *cep-1(gk138);CED-1::GFP*) al silenciar genes cuya apoptosis fisiológica es elevada. n al menos de 30 en cada caso. Experimento realizado por duplicado.

RNAi	Genotipo	Promedio de cuerpos apoptóticos por brazo de gónada	SEM	n
PV	CED-1::GFP	7,82	0,54	40
	<i>cep-1(gk138); CED-1::GFP</i>	6,4	0,44	20
R74.8	CED-1::GFP	14,96	0,58	67
	<i>cep-1(gk138); CED-1::GFP</i>	17,23	2,90	51
R13F6.10	CED-1::GFP	9,83	0,63	52
	<i>cep-1(gk138); CED-1::GFP</i>	6,82	0,49	39
F55C5.7	CED-1::GFP	14,55	1,00	40
	<i>cep-1(gk138); CED-1::GFP</i>	10,8	0,63	30
B0336.7	CED-1::GFP	12,79	0,67	40
	<i>cep-1(gk138); CED-1::GFP</i>	10,24	0,61	25

Tabla A1. Apoptosis dependiente de *cep-1*.

Análisis de apoptosis fisiológica (utilizando la cepa CED-1::GFP) y la apoptosis dependiente de *cep-1* (medida con la cepa *cep-1(gk138);CED-1::GFP*) al silenciar genes cuya apoptosis fisiológica es elevada (Fig. 8) a 24°C. Como control de silenciamiento se utilizó el plásmido vacío (PV). Se muestra el error estándar de la muestra (SEM) y el número de gónadas analizadas (n). El experimento se realizó por duplicado.

Fenotipos observados

Entre los genes que se silenciaron, el fenotipo más evidente en los animales fue el observado durante el silenciamiento de C05D11.3. Durante el RNAi en este gen, se observó un efecto en la progenie, viéndose claramente disminuida. Más aún, en las condiciones de ayuno (6 h), una parte considerable de los animales murió por 'bagging', el cual es un estado donde los hermafroditas no expulsan los embriones en condiciones de ayuno largo, y estos se desarrollan hasta eclosionar y matar al progenitor alimentándose de él desde el interior. Esto no se observó en ninguna otra condición. El gen C05D11.3 codifica para una proteína con dominio de tioredoxina, ortólogo de la proteína TXNDC9 en humanos. La proteína se expresa en embriones y más tarde en el desarrollo, en neuronas, la faringe y la vulva; en esta última se presenta la mayor transcripción en adultos. Ya que se sabe que en embriones temprano, C05D11.3 se requiere para una elongación rápida en la elongación de microtúbulos, podría explicarse la disminución en la progenie que se observó. También, una posible explicación al fenómeno observado en los animales ayunados, puede ser que el gen C05D11.3 esté involucrado con la señalización envuelta en el proceso de bagging por su expresión en la vulva, tratándose quizá de un regulador en esta respuesta somática de retener los embriones durante el ayuno.

Información general de los genes que aumentan su expresión durante el ayuno

C05D11.3. Codifica para una proteína con dominio de tioredoxina, ortóloga a la proteína en humanos TXNDC9; en embriones de una célula, esta proteína es requerida para la rotación normal del centrosoma nuclear, la citocinesis y la formación de los husos mitóticos, aunque su expresión en adultos también se extiende a neuronas, faringe y vulva [Wormbase]. Cuando animales C05D11.3(RNAi) fueron sometidos al ayuno, estos no respondieron al estrés (Gráfica 1).

F25H5.3. Codifica el homólogo en *C. elegans* de la Claspina, un componente del *checkpoint* de la fase S, que regula negativamente la progresión del ciclo celular; el silenciamiento por RNAi resulta en una baja letalidad embrionaria [Wormbase]. Aunque dicho silenciamiento hace al animal incapaz de responder al estrés por ayuno, se ve un aumento en la apoptosis fisiológica, obteniéndose un nivel de inducción respecto al control de 2.9 (Gráfica 1).

F55C5.7. Codifica para una proteína homóloga a la cinasa delta de la proteína ribosomal S6 [Wormbase]. El silenciamiento produce una respuesta al ayuno como la del control, con un nivel de inducción de 1.7, sin embargo no se ve un cambio en la apoptosis fisiológica (Gráfica 1).

oma-1. Es requerido junto con su parálogo *oma-2* en la maduración del ovocito [Ver introducción; Detwiler. 2001]; de manera interesante, sólo el gen *oma-1* y no *oma-2* apareció aumentado en el microarreglo [Silva, 2007]. Al silenciarse por RNAi, impide que haya una respuesta en la apoptosis durante el ayuno; y aunque se observe un nivel de inducción de 1.57 en la apoptosis fisiológica (Gráfica 1, barras blancas), se consideró como aumento importante a partir de un nivel de inducción de 1.7.

Información general de los genes que disminuyen su expresión durante el ayuno

T26C11.7. No tiene homólogos más que con otros nematodos del mismo género [Wormbase]. Al silenciarse este gen por RNAi, se observó un aumento discreto, con un nivel de inducción de 1.5, en la apoptosis fisiológica, sin embargo se encontró que los animales silenciados fueron incapaces de responder al ayuno.

ZC168.4. Codifica un homólogo de la ciclina B que aparentemente es requerido para la embriogénesis y la fertilidad [Wormbase]. El silenciamiento de este gen por RNAi presentó características similares al de T26C11.7.

R13F6.10. Su silenciamiento produce un fenotipo de anomalía en el ensamblaje de la región central durante la meiosis [Wormbase]. El silenciamiento de este gen impide también una respuesta al ayuno, sin embargo se observa un aumento considerable en la apoptosis fisiológica, con un nivel de inducción de 3.8 (Gráfica 2, barras blancas).

B0336.7. Codifica para dos isoformas por splicing de una proteína con dominio THAP (de unión a DNA), con homología probable con el factor pro-apoptótico THAP1 en humano [Wormbase]. Su silenciamiento provocó un aumento en la apoptosis fisiológica (Gráfica 2).

R74.8. La proteína que produce es homóloga a la isoforma 1 de la caldesmona en humanos [Wormbase]. Aunque se observó un nivel de inducción de 1.4 tras el silenciamiento durante el ayuno, no se consideró como una respuesta equiparable a la del control (Gráfica 2). Sin embargo sí se observó un aumento en la apoptosis fisiológica (nivel de inducción: 2).

T08D10.1. Tiene homología predicha con la subunidad alfa del factor de transcripción nuclear Y [Wormbase]. Tras el silenciamiento, se observó una respuesta al ayuno (nivel de inducción: 2.2). De modo interesante, se encontró una apoptosis fisiológica ligeramente disminuida (nivel de inducción: 0.7) (Gráfica 2).

C25A1.8. Codifica para una lectina de tipo C y que se encontró con una expresión aumentada durante la infección patogénica en el nematodo [Wormbase]. El silenciamiento no tuvo algún efecto en la apoptosis fisiológica y aunque se observó una ligera respuesta ante el ayuno (nivel de inducción: 1.3), se tomó como si no respondiera a este tipo de estrés (Gráfica 2).

REFERENCIAS

- Adamo, A., Woglar, A., Silva, N., Penkner, A., Jantsch, V., La Volpe, A. (2012) Transgene-mediated cosuppression and RNA interference enhance germline apoptosis in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 3440-3445
- Alnemri, E.S., Livingston, D.J., Nicholson, D.W., Salvesen, G., Thornberry, N.A., Wong, W.W., Yuan, J. (1996) Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 87, 171.
- Altun, Z.F., Hall, D.H. (2009) Introduction. In *WormAtlas*.doi:10.3908/wormatlas.1.1
- Baou, M., Jewell, A., Murphy, J.J. (2009) TIS11 family proteins and their roles in posttranscriptional gene regulation. *J. Biomed. Biotechnol.* ID 634520
- Bosher, J.M., Dufourcq, P., Sookhareea, S., Labouesse, M. (1999) RNA interference can target pre-mRNA: consequences for gene expression in a *Caenorhabditis elegans* operon. *Genetics* 153, 1245-1246
- C. elegans* Sequencing Consortium (1998) Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science* 282, 2012-2018
- Calahorra, F., Ruiz-Rubio, M. (2011) *Caenorhabditis elegans* as an experimental tool for the study of complex neurological diseases: Parkinson's disease, Alzheimer's disease and autism spectrum disorder. *Invert. Neurosci.* 11, 73-83
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W., Prasher, D.C. (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263, 802-805.
- Chen, F., Hersh, B.M., Conradt, B., Zhou, Z., Riemer, D., Gruenbaum, Y., Horvitz, H.R. (2000) Translocation of *C. elegans* CED-4 to nuclear membranes during programmed cell death. *Science* 287, 1485-1489
- Conradt, B., Horvitz, H.R. (1998) The *C. elegans* protein EGL-1 is required for programmed cell death and interacts with the Bcl-2-like protein CED-9. *Cell* 93, 519-529
- Conradt, B., Xue D. Programmed cell death (2005) *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.32.1, <http://www.wormbook.org>.
- del Peso, L., Gonzalez, V.M., Nuñez, G. (1998) *Caenorhabditis elegans* EGL-1 disrupts the interaction of CED-9 with CED-4 and promotes CED-3 activation. *J. Biol. Chem.* 273, 33495-33500
- Detwiler, R., Reuben, M., Li, X., Rogers, E., Lin, R. (2001) Two zinc finger proteins, OMA-1 and OMA-2, are redundantly required for oocyte maturation in *C. elegans*. *Dev. Cell.* 1, 187-199
- Ellis, H.M., Horvitz, H.R. (1986) Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell* 44, 817-829

- Farley, B.M., Pagano, J.M., Ryder, S.P. (2008) RNA target specificity of the embryonic cell fate determinant POS-1. *RNA* 14, 2685-2697
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., Mello, C.C. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806-811
- Feinberg, E. H., Hunter, C. P. (2003) Transport of dsRNA into cells by the transmembrane protein SID-1. *Science* 301, 1545-1547
- Gartner, A., Milstein, S., Ahmed, S., Hodgkin, J., Hengartner, M.O. (2000). A conserved checkpoint pathway mediates DNA damage-induced apoptosis and cell cycle arrest in *C. elegans*. *Mol. Cell* 5, 435–443
- Gartner, A., Boag, P.R., Blackwell, T.K. (September 4, 2008) Germline Survival and Apoptosis, *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook doi/10.1895/wormbook.1.145.1, <http://www.wormbook.org>
- Gumienny, T.L., Lambie, E., Hartwig, E., Horvitz, H.R., Hengartner, M.O. (1999) Genetic control of programmed cell death in the *Caenorhabditis elegans* hermaphrodite germline. *Development* 126, 1011–1022
- Hedgecock, E.M., Sulston, J.E., Thomson, J.N. (1983) Mutations affecting programmed cell deaths in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Science* 220, 1277–1279
- Hengartner, M.O., Ellis, R.E., Horvitz, H.R. (1992) *Caenorhabditis elegans* gene *ced-9* protects cells from programmed cell death. *Nature* 356, 494–499
- Hengartner, M.O., Horvitz, H.R. (1994) *C. elegans* cell survival gene *ced-9* encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene *bcl-2*. *Cell* 76, 665-676
- Hubbard, E.J.A., Greenstein, D. (September 1, 2005) Introduction to the germ line. *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.18.1, <http://www.wormbook.org>.
- Huyen, Y., Jeffrey, P.D., Derry, W.B., Rothman, J.H., Pavletich, N.P., Stavridi, E.S., Halazonetis, T.D. (2004) Structural differences in the DNA binding domains of human p53 and its *C. elegans* ortholog CEP-1. *Structure* 12, 1237–1243
- Jorgensen, E.M., Mango, E. (2002) The art and design of genetic screens: *Caenorhabditis elegans*. *Nat. Rev. Genet.* 3, 356-369
- Kaymak, E., Ryder, S.P. (2013) RNA recognition by the *C. elegans* oocyte maturation determinant OMA-1. *J. Biol. Chem.* (Manuscript)
- Lints, R., Hall, D.H. 2009. Reproductive system, overview. In *WormAtlas*. doi:10.3908/wormatlas.1.21

- McCarter, J., Bartlett, B., Dang, T., Schedl, T. (1997) Soma-germ cell interactions in *Caenorhabditis elegans*: multiple events of hermaphrodite germline development require the somatic sheath and spermathecal lineages. *Dev. Biol.* 181, 121-143
- 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, 2144-21447
- Nishi, Y., Lin, R. (2005) DYRK2 and GSK-3 phosphorylate and promote the timely degradation of OMA-1, a key regulator of the oocyte-to-embryo transition in *C. elegans*. *Dev. Biol.* 288, 139-149
- Oda, E., Ohki, R., Murasawa, H., Nemoto, J., Shibue, T., Yamashita, T., Tokino, T., Taniguchi, T., Tanaka, N. (2000) Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* 288, 1053–1058
- Ogura, K., Kishimoto, N., Mitani, S., Gengyo-Ando, K., Kohara, Y. (2003) Translational control of maternal glp-1 mRNA by POS-1 and its interacting protein SPN-4 in *Caenorhabditis elegans*. *Development* 130, 2495-2503
- Pagano, J.M., Farley, B.M., McCoig, L.M., Ryder, S. P. (2007) Molecular basis of RNA recognition by the embryonic polarity determinant MEX-5. *J. Biol. Chem.* 282, 8883-8894
- Park, D., Jia, H., Rajakumar, V., Chamberlin, H.M. (2006) Pax2/5/8 proteins promote cell survival in *C. elegans*. *Development* 133, 4193-4202
- Qiu, G., Ahmed, M., Sells, S.F., Mohiuddin, M., Weinstein, M.H., Rangnekar, V.M. (1999) Mutually exclusive expression patterns of Bcl-2 and Par-4 in human prostate tumors consistent with down-regulation of Bcl-2 by Par-4. *Oncogene* 18, 623-631
- Riddle, D.L., Blumenthal, T., Myer, B.J., Priess, J.R. (1997) *C. elegans* II. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1222
- Roussigne, M., Cayrol, C., Clouaire, T., Amalric, F., Girard, J.P. (2003) THAP1 is a nuclear proapoptotic factor that links prostate-apoptosis-response-4 (Par-4) to PML nuclear bodies. *Oncogene* 22, 2432-2442
- Russell, R. L., Cassada, R. C. (1975) The dauerlarva, a post-embryonic developmental variant of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* 46, 326-42
- 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
- Schiavone, N., Rosini, P., Quattrone, A., Donnini, M., Lapucci, A., Citti, L., Bevilacqua, A. Nicolin, A., Capaccioli, S. (2000) A conserved AU-rich element in the 3' untranslated region of bcl-2 mRNA is endowed with a destabilizing function that is involved in bcl-2 down-regulation during apoptosis. *FASEB J.* 14, 174-184
- Schumacher, B., Hofmann, K., Boulton, S., Gartner, A. (2001) The *C. elegans* homolog of the p53 tumor suppressor is required for DNA damage-induced apoptosis. *Curr. Biol.* 11, 1722–1727

- Schumacher, B., Hanazawa, M., Lee, M.H., Nayak, S., Volkmann, K., Hofmann, E.R., Hengartner, M., Schedl, T., and Gartner, A. (2005) Translational repression of *C. elegans* p53 by GLD-1 regulates DNA damage-induced apoptosis. *Cell* 120, 357–368
- Seshagiri, D., Miller, L.K. (1997) *Caenorhabditis elegans* CED-4 stimulates CED-3 processing and CED-3-induced apoptosis. *Curr. Biol.* 7, 455-460
- Shaham, S. (1998) Identification of multiple *Caenorhabditis elegans* caspases and their potential roles in proteolytic cascades. *J. Biol. Chem.* 273, 35109-35117
- Silva, C.G. 2007. Apoptosis en la línea germinal del nematodo *Caenorhabditis elegans*. Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México, México. 50-63
- Spector, M.S., Desnoyers, S., Hoepfner, D.J., Hengartner, M.O. (1997) Interaction between the *C. elegans* cell-death regulators CED-9 and CED-4. *Nature* 385, 653–656.
- Stergiou, L., Doukometzidis, K., Sandoel, A., Hengartner, M.O. (2007) The nucleotide excision repair pathway is required for UV-C-induced apoptosis in *Caenorhabditis elegans*. *Cell Death Differ.* 14, 1129-1138
- Sulston, J.E., Horvitz, H.R. (1977) Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* 56, 110–156
- 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
- Tabara, H., Hill, R.J., Mello, C.C., Priess, J.R., Kohara, Y. (1999) *pos-1* encodes a cytoplasmic zinc-finger protein essential for germline specification in *C. elegans*. *Development* 126, 1-11
- Timmons, L., Fire, A. (1998) Specific interference by ingested dsRNA. *Nature* 395, 854
- Von Roretz, C., Di Marco, S., Mazroui, R., Gallouzi, I.E. (2011) Turnover of AU-rich-containing mRNAs during stress: a matter of survival. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* 2, 336-347
- Wormbase, sitio web, <http://www.wormbase.org>, versión WS238, fecha 18-05-2013
- Yang, X., Chang, H.Y., Baltimore, D. (1998) Essential role of CED-4 oligomerization in CED-3 activation and apoptosis. *Science* 281, 1355–1357
- Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H.M., Horvitz, H.R. (1993) The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell* 75, 641–652
- Yu, J., Zhang, L., Hwang, P.M., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. (2001) PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells. *Mol. Cell* 7, 673–682
- Zarkower, D. Somatic sex determination (February 10, 2006), *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.84.1, <http://www.wormbook.org>

Zhou, Z., Hartwig, E., Horvitz, H.R. (2001) CED-1 is a transmembrane receptor that mediates cell corpse engulfment in *C. elegans*. *Cell* 104, 43–56

*Tengo por imposible conocer las partes en tanto partes sin conocer al todo,
pero tengo por no menos imposible la posibilidad de conocer al todo sin conocer
singularmente a las partes.*

Pascal

*La ciencia no es más que la investigación de un milagro
inexplicable, y el arte, la interpretación de ese milagro.*

Ray Bradbury