



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

REGULACIÓN DE LA APOPTOSIS INDUCIDA POR AYUNO EN LA GÓNADA DE
Caenorhabditis elegans

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Doctor en Ciencias

PRESENTA:
LAURA IVÓN LÁSCAREZ LAGUNAS

TUTOR PRINCIPAL
DRA. ROSA ESTELA NAVARRO GONZÁLEZ
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
DRA. TZVETANKA DIMITROVA DINKOVA
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM
DR. WILHELM HASBERG TORRES
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM

MÉXICO, D. F. octubre, 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.

Este trabajo se realizó bajo la dirección de la Dra. Rosa Estela Navarro González en el Departamento de Biología Celular y del Desarrollo del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Este trabajo se realizó con el apoyo de proyectos del CONACyT (50896-Q y 103856-Q), y del Programa de Apoyo a la Innovación e Investigación Tecnológica (PAPIIT-UNAM IN225509 e IN207412).

Laura Ivón Láscarez Lagunas recibió una beca durante la realización de sus estudios de Doctorado por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, México) con número de registro 99139 y una beca para la conclusión de estudios del Programa de Apoyo a la Innovación e Investigación Tecnológica (PAPIIT-UNAM IN207412).

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Rosa Estela Navarro González por la dirección de este proyecto. Por haberme permitido ser miembro de su grupo de trabajo y haberme compartido su experiencia. Por todo el apoyo brindado, sus valiosas enseñanzas, ideas, discusiones, sugerencias y su dedicación y compromiso con este proyecto.

A la Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova (miembro del Comité Tutor) por su colaboración en la realización de este proyecto, sus discusiones, sugerencias y su dedicación para este proyecto.

Al Dr. Wilhelm Hansberg Torres (miembro del Comité Tutor) por sus discusiones y sugerencias durante la realización de este proyecto.

A los miembros del jurado de examen: Dra. María de Lourdes Massieu Trigo, Dra. Hilda María Lomelí Buyoli, Dra. Susana Castro Obregón, Dra Denhi Schnabel Peraza y Dra. Mahara Angélica Valverde Ramírez por toda la paciencia y dedicación en la revisión de esta tesis. Sus comentarios ayudaron en gran medida a mejorar este trabajo.

A la M. en C. Silvia Salinas Velázquez por su asistencia técnica.

Al Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP) por el apoyo brindado para la asistencia a Congresos durante la realización de este proyecto.

A la Dra. Laura Ongay Larios y al personal de la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular: Guadalupe Códiz Huerta y Minerva Mora Cabrera por la asistencia técnica en la realización de este trabajo.

Al Dr. Jorge Ramírez Salcedo y al personal de la Unidad de Microarreglos de la UNAM: Lorena Chávez González, José Luis Santillán Torres y Simón Guzmán Torres por la construcción e hibridización de los microarreglos.

Al personal de la Unidad de Cómputo del Instituto de Fisiología Celular: Ana María Escalante, Ivette Rosas, Gerardo Coello, Juan Manuel Barbosa y Francisco Pérez por su asistencia técnica.

Al Dr. Carlos Giovanni Silva García y el Q.F.B. Daniel Paz Gómez por las aportaciones técnicas e intelectuales en la realización de este proyecto.

Esta tesis tiene una dedicatoria especial para ustedes, quienes más amo en la vida:

A mi amado esposo Carlos, porque llenas mi vida de magia, por la eterna fe que tienes en mí y por tu amor extraordinario. Gracias, porque despertaste en mí el sentimiento más maravilloso que me acompaña todos los días, porque me has hecho crecer y reconciliarme con la vida tantas veces, porque simplemente sin ti las cosas no suceden.

A mis padres, María Antonieta y José, porque son mi raíz, mi punto de encuentro, mi origen y mi apoyo incondicional. La vida me premio convirtiéndome en su hija, y ustedes colmaron mi existencia de bendiciones. Mi galería está llena de las fotos mentales que me enseñaste a tomar, papá. Mi corazón está plagado del amor que me diste sin medida, mamá.

A mis hermanos, Iraí y José Antonio, mis grandes maestros, mis cómplices, testigos de mi historia y partes de mi corazón. Porque no importa que tan lejos vaya ustedes van siempre conmigo. Ustedes son mis mejores amigos, el mejor equipo de mi vida.

A mi Cami, porque eres una personita que me llena de amor y de ilusiones. Por tu infinita ternura y esa especialidad que tienes de hacerme sonreír.

INDICE

RESUMEN	1
I INTRODUCCIÓN	3
1.1 Generalidades del modelo de estudio	3
1.2 Ciclo de vida de <i>C. elegans</i>	4
1.3 Anatomía de la gónada de <i>C. elegans</i>	5
1.4 Efectos del estrés sobre las células germinales	7
1.4.1 Muerte celular por apoptosis	8
1.4.1.1 El fenómeno de apoptosis en <i>C. elegans</i>	9
1.4.1.2 ¿Por qué mueren las células germinales durante la ovogénesis?	13
1.4.1.2.1 Apoptosis de las células germinales en <i>C. elegans</i>	14
1.4.1.2.1.1 Inducción de apoptosis de las células germinales por estrés.	15
1.4.1.2.1.1.1 Apoptosis inducida por infecciones	16
1.4.1.2.1.1.2 Apoptosis inducida por daño al DNA.	17
1.4.1.2.1.1.3 Apoptosis inducida por estrés osmótico, oxidativo y térmico.	18
1.4.1.2.1.1.4 Apoptosis inducida por exposición a metales	18
1.4.1.2.1.1.5 Apoptosis inducida por Ayuno	19
1.4.2 Formación y agregación de partículas ribonucleoproteicas (RNPs o Gránulos de RNA)	19
1.4.2.1 Gránulos germinales	19
1.4.2.2 Cuerpos de procesamiento	20
1.4.2.3 Gránulos de estrés	21
1.4.2.4 Gránulos de RNA en la gónada de <i>C. elegans</i>	24
1.4.3 Efectos particulares del ayuno en la gónada	27
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	30
III. OBJETIVOS	31
3.1 Objetivo General	31
3.2 Objetivos Particulares	31
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	32
4.1 Crecimiento y mantenimiento de cepas.	32
4.1.1 Crecimiento de gusanos a gran escala	33

4.2 Silenciamiento de genes por RNA de interferencia (RNAi)	34
4.3 Clonación de genes	35
4.4 Tratamientos de estrés utilizados	36
4.5 Cuantificación de cuerpos apoptóticos	37
4.6 Extracción de RNA total	37
4.7 Northern Blot	39
4.8 Cuantificación de la expresión de RNA mensajero mediante PCR semicuantitativo	42
4.9 Cuantificación de la expresión de RNA mensajero mediante PCR en tiempo real	42
4.10 Evaluación de los niveles de traducción mediante perfiles polisomales	44
4.11 Extracción de RNA de los gradientes de sacarosa y RT-PCR	45
4.12 Detección de proteínas mediante ensayos tipo Western Blot	47
4.13 Detección de la expresión de proteínas en tejidos mediante inmunotinciones	48
4.12 Microscopía, procesamiento de imágenes y estadística	49
V RESULTADOS Y DISCUSIÓN	50
CAPÍTULO 1: El papel de los genes que codifican para proteínas que se asocian con gránulos de RNA en la apoptosis de las células germinales de <i>C. elegans</i> .	51
5.1.1 Análisis de los genes obtenidos a partir de un microarreglo	51
5.1.2 Escrutinio por RNAi.	53
5.1.2.1 Escrutinio para encontrar genes que participan en la regulación de la apoptosis fisiológica.	53
5.1.2.2 Escrutinio para encontrar genes involucrados en la apoptosis inducida por ayuno	56
5.1.2.3 Escrutinio para encontrar genes que participan en la regulación de la apoptosis por diferentes tipos de estrés.	58
5.1.3 Niveles de expresión de los genes involucrados en la respuesta al ayuno.	63
5.1.4 DISCUSION	66
5.1.5 CONCLUSIONES	71
CAPÍTULO 2: El papel de los genes que codifican para proteínas que se asocian con gránulos de RNA en la formación de gránulos.	72

5.2.1 Participación de las proteínas que se asocian con gránulos de RNA en la formación de gránulos de CGH-1.	72
5.2.2 La formación de gránulos como resultado del silenciamiento del gen <i>cey-2</i> requieren de las proteínas TIAR-1, GLA-3 y GLH-1	80
5.2.3 La formación de gránulos como resultado del silenciamiento del gen <i>pgl-1</i> requieren parcialmente de la proteína TIAR-1 y GLA-3.	85
5.2.4 DISCUSIÓN	89
5.2.5 CONCLUSIONES	93
CAPÍTULO 3: Mecanismo de inducción de apoptosis durante el ayuno.	94
5.3 “LIN-35/Rb causes starvation-induced germ cell apoptosis via ced-9/Bcl-2 downregulation in <i>C. elegans</i> ”	94
CAPÍTULO 4: Pistas sobre el mecanismo de inducción de apoptosis durante el ayuno de la proteína GLA-3	114
5.4.1 Expresión de la maquinaria de apoptosis durante el ayuno en la cepa mutante <i>gla-3(op312)</i>	114
5.4.2 Perfil polisomal de la mutante <i>gla-3(op312)</i> en condiciones control y de ayuno.	116
5.4.3 DISCUSIÓN	119
5.4.4 CONCLUSIONES	122
5.5 DISCUSION GENERAL	123
VI REFERENCIAS	128
VII ANEXOS	137

RESUMEN

Las células germinales son las encargadas de mantener la continuidad de las especies por lo que la correcta regulación de su desarrollo y el mantenimiento de la homeostasis en la línea germinal resultan cruciales para los organismos. Uno de los mecanismos que mantiene la homeostasis en este tejido es la apoptosis, a pesar de esto, se desconoce cómo se desencadena este proceso. Cambios en las condiciones ambientales (estrés) pueden incrementar la apoptosis de las células germinales en varios organismos. En *C. elegans* el choque de calor, el estrés osmótico, el estrés oxidativo y el ayuno incrementan la apoptosis de las células germinales. La vía de las MAPKKs está implicada en la regulación de la apoptosis inducida por choque de calor, estrés osmótico y estrés oxidativo sin embargo, en el ayuno se desconocía el mecanismo. Para que la apoptosis de las células germinales se active requiere que la proteína transmembranal CED-9(BCL2) libere a CED-4(APAF1), el cual a su vez activará a la caspasa CED-3. En este trabajo, estudiamos la expresión de los genes de la maquinaria de apoptosis (*ced-9*, *ced-4* y *ced-3*) y algunos de sus principales reguladores (*lin-35/Rb*, *dpl-1/DP*, *efl-1/E2F* y *efl-2/E2F*) en condiciones de ayuno. Observamos que *ced-9* baja sus niveles de expresión mientras que *ced-4*, *lin-35* y *dpl-1* aumentan sus niveles en ayuno. Además encontramos que el ayuno induce una reducción en la tasa de traducción y que esto afecta diferencialmente a los genes estudiados. De manera general nuestros datos sugieren que durante el ayuno la expresión de LIN-35 se incrementa y esto tiene una influencia negativa sobre *ced-9*. Este evento combinado con una traducción ineficiente del RNA mensajero de *ced-9* genera una reducción importante en los niveles de su proteína, lo que induce apoptosis. Aunado a esto, la proteína DPL-1/DP incrementa sus niveles de expresión generando una regulación positiva de CED-4 reforzando así el desencadenamiento de la muerte celular. Además, por

medio de un escrutinio de RNAi, identificamos genes involucrados en la apoptosis fisiológica e inducida por diferentes tipos de estrés. Encontramos que varios de estos genes están involucrados también con la regulación de la formación de gránulos de RNA, los cuales han sido propuestos como sitios de regulación de RNA en la respuesta al estrés.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades del modelo de estudio

Caenorhabditis elegans es un animal de vida libre que mide aproximadamente 1.2 mm de longitud en estado adulto. Es miembro del phylum Nematoda, el cual se compone de animales no segmentados con largos cuerpos cilíndricos. Este nematodo habita en el suelo, se distribuye prácticamente en cualquier parte del mundo y se alimenta de microorganismos [1]. La especie se compone básicamente de organismos hermafroditas pero ocasionalmente se presentan machos (0.1%). La estructura de un animal adulto hermafrodita es anatómicamente simple y está compuesto exactamente por 959 células somáticas mientras que el macho tiene 1031. Ambos sexos constan básicamente de los mismos tejidos los cuales son el epitelial, el nervioso, el muscular, el excretor, el alimentario y el reproductivo [2].

C. elegans, es uno de los organismos modelo más utilizados y su biología ha sido estudiada a un nivel muy detallado. El linaje celular de este organismo ha sido mapeado detalladamente, por lo que, cada división, migración y muerte celular que ocurre a partir de que se forma el embrión hasta el organismo adulto es completamente conocida y ocurre de manera constante. Aunado a su biología simple y bien caracterizada, estos animales poseen muchas características que los hacen organismos experimentales ideales. Entre ellas están el de poseer una embriogénesis rápida (14 h) y un ciclo de vida corto (el estadio de adulto se alcanza a los 3 días a 20°C) (Figura 1). Además, *C. elegans* es transparente lo que permite una fácil observación de su desarrollo y pueden ser mantenidos como hermafroditas mediante autofecundación o como machos, lo que facilita su manejo en el laboratorio. En el laboratorio, los animales son alimentados a base de una dieta de *E. coli* en placas simples de agar y pueden sobrevivir a condiciones ambientales adversas como el

ayuno [3]. El genoma de este organismo está completamente secuenciado, tiene aproximadamente 20,000 genes de los cuales el 40% está conservado y tiene homólogos con genes caracterizados en otros organismos metazoarios, sugiriendo que el análisis experimental de estos genes conservados generará información relevante para muchos organismos [4].

1.2 Ciclo de vida de *C. elegans*

De manera similar a otros nematodos, el ciclo de vida de *C. elegans* se compone de un estadio embrionario, cuatro estadios larvales (L1-L4) y un estadio adulto (Figura 1). La embriogénesis en este organismo dura aproximadamente 14 h y está dividida en dos etapas.

La primera de ellas consta de un período de multiplicación celular que va de los 0 a los 330-350 min post-fertilización. Al final del período de proliferación, el embrión es de forma esférica y está organizado en tres capas germinales; el ectodermo que da lugar a la hipodermis y las neuronas, el mesodermo que genera la faringe y el músculo y el endodermo que da origen a la línea germinal y el intestino [2]. La segunda etapa implica morfogénesis y diferenciación de tejidos sin divisiones celulares adicionales. Inicia entre las 5.5-6 h y culmina a las 12-14 h post-fertilización. Al término de esta etapa, la estructura anatómica del animal está completamente establecida y ya no cambia durante el desarrollo post-embionario. El desarrollo post-embionario comienza 3 h después de la eclosión de la larva y está regulado por la presencia de comida. Normalmente el animal pasa a través de cuatro estadios larvarios (L1-L4) antes de llegar al estadio adulto (Figura 1).

El final de cada estadio larvario está marcado por una muda en donde una nueva cutícula estadio-específica se sintetiza sustituyendo a la cutícula vieja [2]. Cuando el organismo llega al estadio adulto comienza su periodo reproductivo. El hermafrodita es capaz de producir aproximadamente 300 embriones en un periodo de 2-3 días, después los

animales empiezan a perder vigor gradualmente y luego mueren en un periodo de dos a tres semanas (Figura 1) [5].

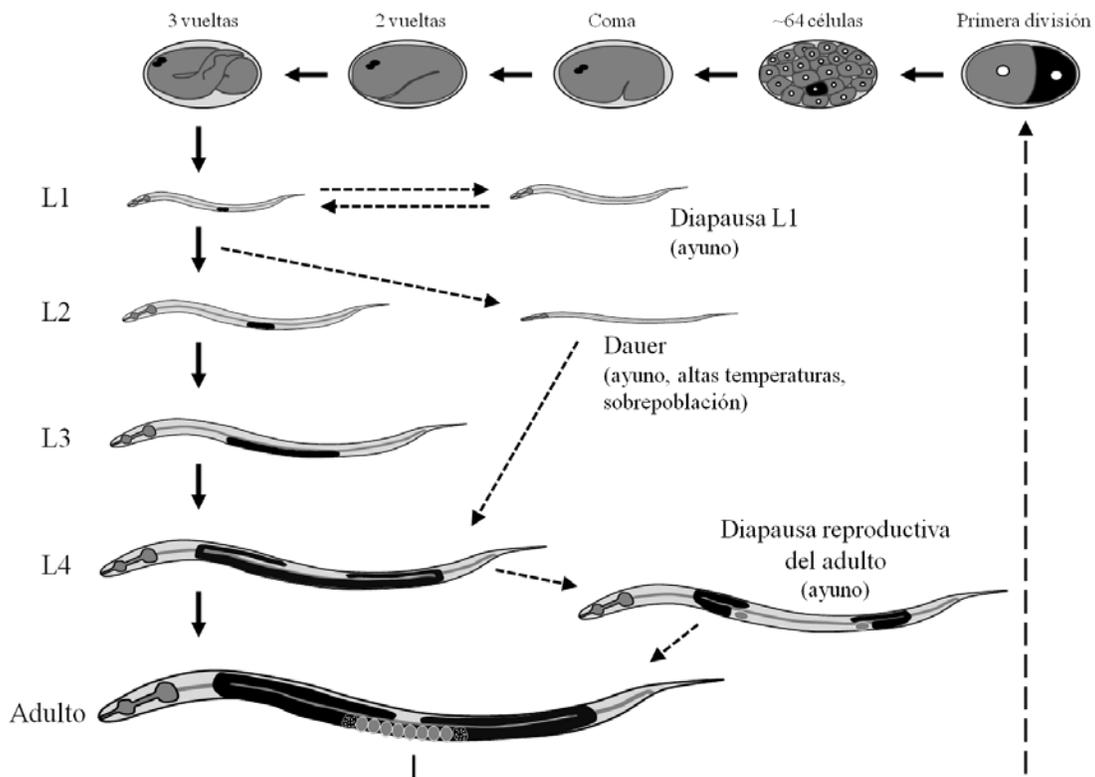


Figura 1. Ciclo de vida del nematodo *C. elegans*. En el esquema se muestran el desarrollo embrionario, las cuatro etapas larvales L1, L2, L3 y L4, y el estado adulto. Si los animales son privados de comida detienen su crecimiento en tres diferentes etapas: al inicio del estadio larvario L1, a finales del estadio L1 (“dauer”) y a mediados del estadio L4 (diapausa reproductiva del adulto). Cuando las condiciones de alimentación se restablecen, los animales continúan su desarrollo.

1.3 Anatomía de la gónada de *C. elegans*

La línea germinal está compuesta de células especializadas que dan origen a los ovocitos y espermatozoides. Las células germinales comparten ciertas particularidades, entre ellas están que son pluripotentes e inmortales. Esto significa que dan origen a todos los tipos celulares de la siguiente generación y preservan las especies. Además de que son las únicas células en el organismo capaces de hacer meiosis. [6]. En *C. elegans*, como en muchos otros organismos en donde la línea germinal está predeterminada, las células

germinales se separan de las células somáticas en una etapa muy temprana de la embriogénesis. Para fines de este estudio nos centraremos en la descripción de la anatomía de la gónada del hermafrodita adulto (Figura 2).

La gónada de los adultos hermafroditas de *C. elegans* es un sincicio, lo que quiere decir que los núcleos que van a dar origen a los gametos comparten un citoplasma común. Sin embargo, para fines prácticos a los núcleos de la gónada con membranas parciales les denominaremos células germinales. La gónada está compuesta por dos brazos idénticos en forma de U que se encuentran unidos por el útero. Cada brazo tiene una polaridad distal a proximal, la parte más distal del brazo se encuentra en contacto con una célula de origen somático denominada célula de la punta distal (CPD). La CPD expresa un factor de crecimiento del tipo Notch (LAG-2) el cual promueve la proliferación mitótica de las células germinales adyacentes formando un nicho de células troncales totipotenciales.

Conforme las células germinales se alejan de la célula distal, la señal de mitosis se pierde y las células inician la meiosis (zona de transición) entre más se alejan las células germinales de la CPD progresan en la meiosis hasta formar espermátides u ovocitos maduros en la zona proximal (Figura 3). Las primeras 40 células germinales de cada brazo de la gónada se convierten en aproximadamente 160 espermatozoides que se almacenan en cada espermateca. Una vez que las espermátidas se han formado durante la etapa larvaria L4, la gónada inicia la producción de ovocitos la cual continua durante el resto del periodo reproductivo del animal [7-9]. Durante la ovulación, el ovocito pasa a la espermateca donde es fertilizado y el embrión es expulsado al útero. Durante la ovogénesis, los ovocitos acumulan una enorme cantidad de citoplasma que contiene RNA mensajeros (RNAs); de los cuales algunos son traducidos y otros son silenciados para prevenir una prematura diferenciación y garantizar un correcto desarrollo embrionario [10].

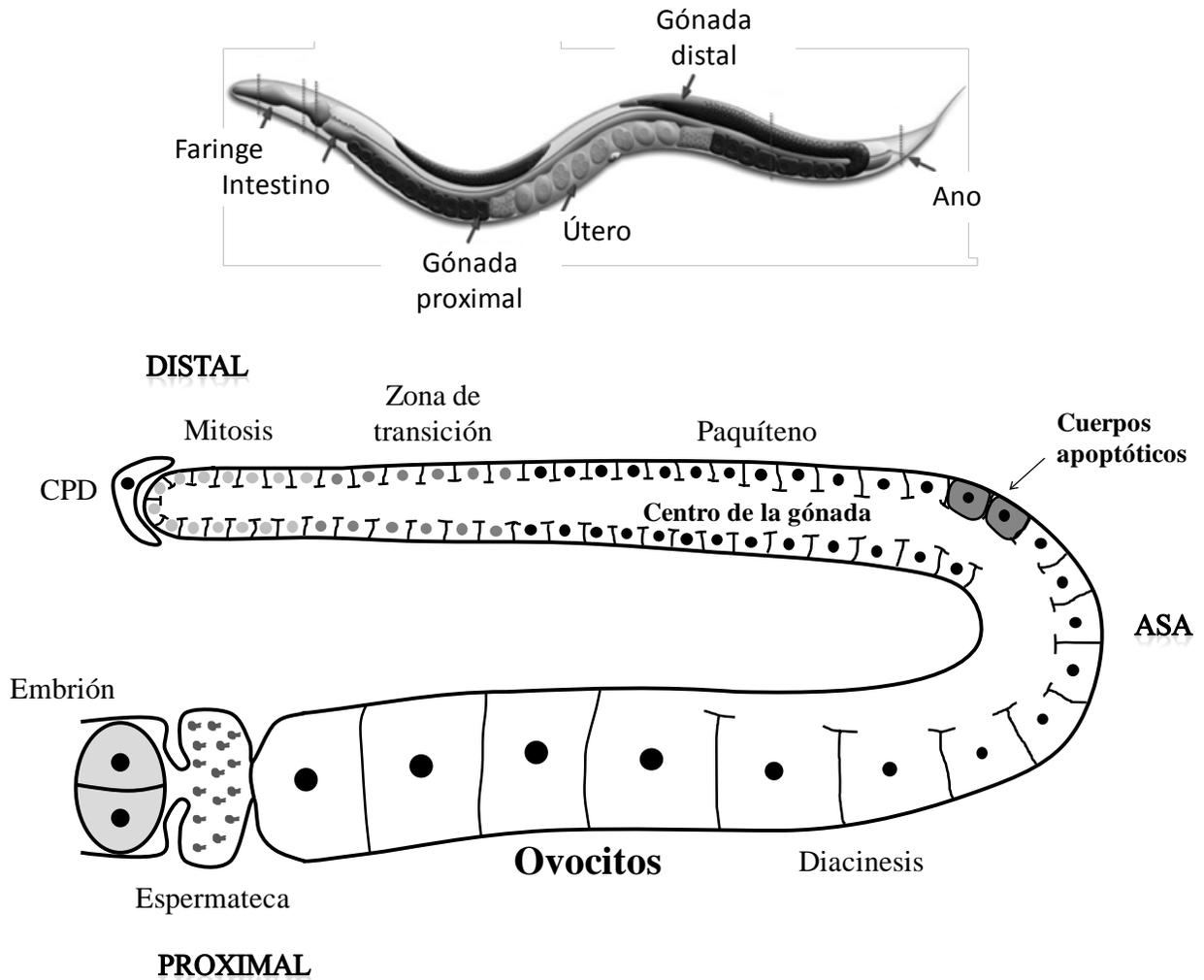


Figura 2. Esquema de la gónada del hermafrodita adulto de *C. elegans*. Arriba) Representación esquemática de la anatomía general de un adulto hermafrodita adulto se muestran los dos brazos de la gónada conectados por el útero central (modificado de [2]). Abajo) Se muestra uno de los brazos de la gónada. Las células germinales están envueltas por membranas parciales formando un sincicio. El desarrollo de los ovocitos ocurre de la zona distal a la proximal. La zona de transición corresponde al estado de la célula que pasa de la mitosis y entra a la meiosis. Las espermátidas son almacenados en la espermateca y se producen en el estadio larvario L4. La apoptosis de las células germinales generalmente se observa en la zona del asa. En la región más proximal de la gónada se muestran los ovocitos completamente formados y la espermateca. CPD= célula distal de la punta.

1.4 Efectos del estrés sobre las células germinales

Comúnmente los organismos enfrentan condiciones ambientales adversas que podemos definir como estresantes. Dichas condiciones incluyen radiación UV, cambios de temperatura, falta de alimento, exposición a agentes oxidantes, drogas, toxinas e hipoxia.

La exposición de las células al estrés desencadena respuestas que frecuentemente requieren de cambios en la expresión de genes que participan, entre otros procesos, en la muerte celular programada, la progresión del ciclo celular y la diferenciación. Las respuestas al estrés de las células germinales son de vital importancia debido a la apremiante necesidad de prevenir y/o reparar el daño en la línea germinal asegurando con ello la eliminación del daño en la progeñe. Para los propósitos de este trabajo a continuación describiremos algunas de las respuestas que se desencadenan en la línea germinal de *C. elegans* como consecuencia de la exposición a condiciones de estrés las cuales incluyen la apoptosis y la formación de gránulos de RNA.

1.4.1 Muerte celular por apoptosis

Existen tres tipos de muerte celular clasificados en base a la apariencia morfológica de este proceso: la necrosis, la muerte por autofagia y la apoptosis. La necrosis es usualmente una respuesta al daño extremo (agresiones ambientales) como una deprivación severa de oxígeno y fuentes de energía, la exposición a toxinas y las temperaturas extremas [11] y al parecer no requiere de la activación de genes específicos, sus principales características incluyen un aumento en el volumen celular que finalmente culmina en la ruptura de la membrana plasmática liberando su contenido intracelular, lo cual puede dañar a las células vecinas [12].

La muerte por autofagia y la apoptosis en cambio requieren de la activación de genes específicos por lo que se les clasifica dentro del subgrupo de muerte celular programada. El término autofagia es utilizado para describir los procesos celulares implicados en la degradación y el reciclaje de proteínas y organelos [13]. La muerte celular por autofagia es un proceso espacialmente restringido en el cual partes del citoplasma son secuestradas por vacuolas de doble membrana digeridas por hidrolasas lisosomales [14].

Finalmente, la apoptosis se caracteriza por la condensación de la cromatina, la reducción en el volumen celular, la fragmentación del DNA y la pérdida del potencial de membrana mitocondrial. Las células en apoptosis forman pequeños cuerpos redondos rodeados por una membrana que contiene organelos citoplasmáticos intactos o fragmentos del núcleo. Estos cuerpos apoptóticos resultan de la condensación celular progresiva y son fagocitados por células vecinas [12]. En muchos organismos, la apoptosis es requerida para el desarrollo normal y la homeostasis de los tejidos; sin embargo también puede ser inducida de manera anormal en muchas patologías [13].

1.4.1.1 El fenómeno de apoptosis en *C. elegans*

El proceso de apoptosis en *C. elegans* está dividido en cuatro pasos que ocurren de manera secuencial [15, 16]. El primer paso consiste en la activación de la muerte celular. En segundo lugar se activa la maquinaria central de apoptosis. En el tercer paso se ejecuta el proceso de apoptosis, el cual incluye la fragmentación del DNA cromosomal y la fagocitosis de la célula en apoptosis por una célula vecina. Finalmente, en el cuarto paso la célula fagocitada es degradada (Figura 3). Los genes que actúan en la señalización de muerte afectan solamente a células específicas (Figura 3). En contraste, los genes que funcionan del segundo al cuarto paso son comunes en la mayoría de las células que mueren por apoptosis (Figura 3).

La apoptosis es un destino común de las células de *C. elegans* y puede ocurrir en tres diferentes estados del desarrollo de este organismo. La apoptosis somática ocurre en los tejidos somáticos durante el desarrollo embrionario (250-450 min. post-fertilización) y el desarrollo post-embrionario (estadio L2) [17, 18]. La apoptosis fisiológica ocurre en la gónada del adulto hermafrodita [19].

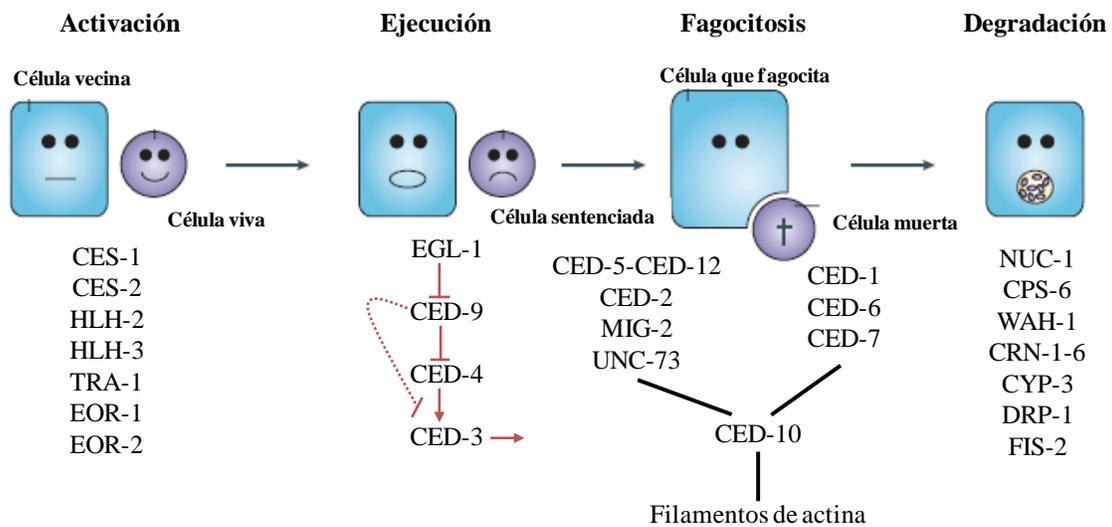


Figura 3. Proceso de apoptosis en *C. elegans*. El proceso de apoptosis en *C. elegans* se compone básicamente de 4 pasos: activación, ejecución, fagocitosis y degradación. Debajo de cada etapa se indican las proteínas que participan en cada proceso. Modificado de [16].

La ejecución de la apoptosis en *C. elegans*, requiere de una maquinaria central de apoptosis constituida por las proteínas CED-9, CED-4 y CED-3 [15] (Figura 4). CED-9 es el único miembro anti-apoptótico de la familia BCL-2 (linfoma de células B tipo 2) en el nematodo que protege a las células de la muerte por apoptosis [20]. La pérdida de la función de *ced-9* en los animales conduce a la muerte de las células que normalmente están destinadas a vivir, mientras que la ganancia de función en este gen protege a las células de la apoptosis [20]. CED-4 (el homólogo del factor activador de la proteasa apoptótica 1 (APAF-1) [21] es una proteína adaptadora pro-apoptótica cuya ausencia ocasiona que las células sobrevivan a la señal de apoptosis [22]. CED-3 es una proteasa del tipo cisteín-aspartato (posee una cisteína en el sitio catalítico y corta después de un aspartato) homóloga a las caspasas en mamíferos y es la única proteína en *C. elegans* que se requiere para inducir apoptosis [23].

La apoptosis en este nematodo generalmente involucra la activación transcripcional del gen *egl-1* (el cual codifica para una proteína con dominio BH3) [24]. EGL-1 antagoniza a CED-9, el cual a su vez antagoniza a CED-4. En condiciones normales la proteína CED-9 se encuentra anclada a la superficie de la membrana externa de la mitocondria y está unida a un dímero de CED-4 y de esta manera inhibe la apoptosis [25, 26]. Cuando EGL-1 se une a CED-9 hay un cambio conformacional en dicha proteína resultando en la liberación de CED-4 [25]. Este evento conduce a la oligomerización de CED-4, lo cual forma un octámero que une a dos moléculas del zimógeno de la caspasa CED-3 activando así al apoptosoma (Figura 4) [26]. Los componentes y la forma de activación del apoptosoma de mamíferos difieren de los de *C. elegans*. El apoptosoma en mamíferos está conformado por siete moléculas de APAF1, siete moléculas de citocromo C liberadas de la mitocondria y siete moléculas de la pro-caspasa 9. La formación de esta estructura se induce por la acción de proteínas con dominio BH3 y esto permite la activación de la caspasa CASP-9 [27]. Dos diferencias estructurales parecen explicar la pérdida de la participación del citocromo C en esta activación [28]. Primero, la proteína CED-4 no contiene el dominio WD40, el cual está presente en APAF1 y es el sitio de unión al citocromo C. Segundo, APAF1 mantiene una forma de autoinhibición debido a que su dominio CARD interacciona con el dominio WD40. En contraste, CED-4 está unido a CED-9 para prevenir su oligomerización y acceso a CED-3 inhibiendo así la apoptosis.

Las células en apoptosis en *C. elegans* son fagocitadas rápidamente por las células vecinas y posteriormente degradadas en su interior por fagolisosomas. En la fagocitosis participan dos vías principales: la primera está compuesta por el heterodímero de CED-5-CED-12 y sus reguladores CED-2, MIG-2 y UNC-73. El segundo grupo de moléculas involucradas en la fagocitosis está compuesto por el receptor de membrana CED-1 y su

adaptador proteico CED-6 [29-34]. El transportador proteico tipo ABC, CED-7, pertenece a este conjunto; aunque no se conoce del todo su función se ha propuesto que promueve el reconocimiento del cuerpo apoptótico por CED-1 a través de un ligando fosfolipídico que se libera ya sea por transporte activo o por un mecanismo de flipasa [34]. Ambos grupos de genes convergen en la activación de CED-10 que participa en la reorganización de los filamentos de actina (Figura 3) [35].

Finalmente, la degradación del DNA de la célula fagocitada está a cargo de proteínas con actividad de nucleasa. Estas proteínas incluyen a NUC-1, CPS-6, WAH-1, CRN-1 a -6, CYP-13, DRP-1 y FIS-2 [36-41] (Figura 3). La reducción o pérdida de la actividad de NUC-1, CPS-6, WAH-1, CRN-1 a -6 y CYP-13 resulta en la acumulación de células positivas para TUNEL en el embrión de *C. elegans* [37-41]. Estudios genéticos y de análisis de fenotipo indican que estos genes actúan en diferentes vías para promover la degradación del DNA de las células fagocitadas. *cps-6*, *wah-1*, *crn-1*, *crn-4*, *crn-5* y *cpy-13* actúan juntos en una vía y *crn-2* y *crn-3* actúan en una vía independiente [38-40]. Las proteínas DRP-1 y FIS-2 actúan a nivel mitocondrial en una vía para facilitar la degradación de la célula fagocitada [36].

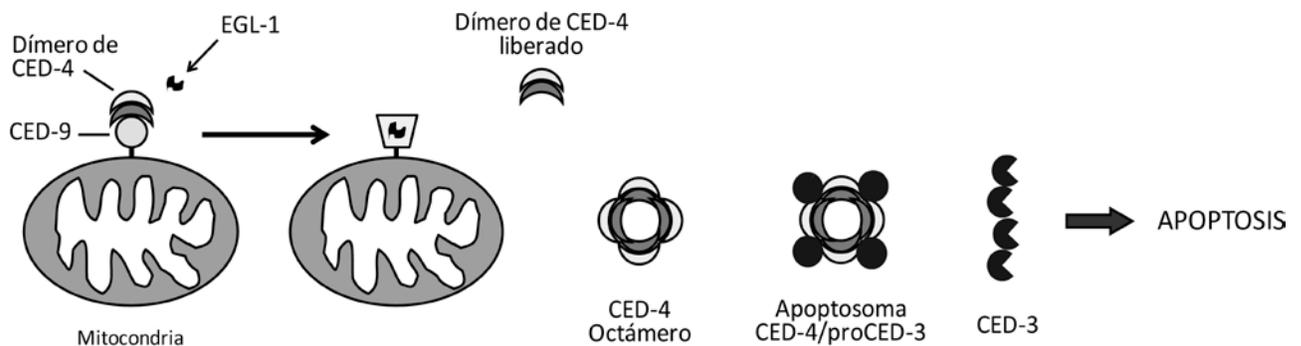


Figura 4. Maquinaria central de apoptosis y modelo de la activación de la apoptosis en *C. elegans*. En células vivas los dímeros de CED-4 son secuestrados por CED-9 en la superficie externa de la mitocondria y son mantenidos en su conformación inactiva. Las células destinadas a morir por apoptosis sintetizan la proteína pro-apoptótica EGL-1. La unión de dicha proteína a CED-9 induce un cambio conformacional que resulta en la liberación del dímero de CED-4 del complejo

CED-9-CED-4. Una vez libres cuatro dímeros de CED-4 se asocian en un octámero que recluta moléculas de proCED-3 para formar el complejo denominado apoptosoma. CED-3 se autoactiva y se desencadena la apoptosis.

1.4.1.2 ¿Por qué mueren las células germinales durante la ovogénesis?

La apoptosis de células germinales, específicamente durante la ovogénesis, ha sido observada en diversos organismos. Aunque se propone que su función es la de eliminar células nodriza o células dañadas, su regulación es aún desconocida. Se han propuesto tres hipótesis para explicar este proceso [42]. En la primera se sugiere que las células germinales compiten por los nutrientes que permiten su sobrevivencia; por lo que si estos son limitados o la célula no puede acceder a ellos muere por la falta de los mismos. Este tipo de muerte se observa en *Drosophila melanogaster* en donde una dieta baja en proteínas induce un aumento en la apoptosis de las células germinales (Drummond-Barbosa and Spradling 2001). También en *C. elegans*, se ha observado que el ayuno incrementa la apoptosis de las células germinales [43, 44]. La segunda hipótesis explica la apoptosis como resultado del daño al DNA de la célula. Por ejemplo, se ha observado que en nematodos sometidos a radiación ionizante se detiene la progresión del ciclo celular resultando en un decremento del número de células germinales [45]. Esta hipótesis también incluye errores en la meiosis [42, 46]. La última hipótesis sugiere que las células destinadas a morir sirven como células nodrizas para el transporte de organelos, RNAm y proteínas dentro de otros ovocitos. Dichas células son eliminadas una vez que han llevado a cabo su función este sería el caso de las células nodrizas de *Drosophila*, *Hydra* y probablemente *C. elegans* [19, 42].

1.4.1.2.1 Apoptosis de las células germinales en *C. elegans*

El primer estudio en el que se analizó la apoptosis en la línea germinal de *C. elegans* reveló que esta muerte celular ocurre bajo condiciones normales por lo que se denomina apoptosis fisiológica [19]. En *C. elegans* la apoptosis de las células germinales ocurre únicamente en ovocitos por lo que solo ha sido observada en hermafroditas adultos. Este tipo de apoptosis se observa en la región del asa de la gónada, en la cual las células germinales salen del estado de paquiteno de la profase I de la meiosis para entrar a diploteno (Figura 2). Cuando una célula germinal inicia la apoptosis es rápidamente fagocitada por el epitelio que envuelve a la gónada y forma un cuerpo apoptótico que contiene muy poco citoplasma. El mecanismo de fagocitosis para los cuerpos apoptóticos de la línea germinal es el mismo que para los cuerpos apoptóticos somáticos [19].

La apoptosis fisiológica es ejecutada por la misma maquinaria de apoptosis que opera en el soma. Sin embargo, la inactivación de CED-9 no depende de la proteína proapoptótica EGL-1 [19]. Se tiene evidencia de que el gen *lin-35*, el homólogo en *C. elegans* del factor de regulación transcripcional de retinoblastoma Rb, regula parcialmente la inducción de la apoptosis fisiológica inhibiendo la expresión del gen *ced-9* [47]; sin embargo un mecanismo alternativo opera para la inducción de la apoptosis fisiológica que no ha sido bien esclarecido.

Aunque la función de la apoptosis de las células germinales no se entiende completamente se sabe que es un proceso importante para la fertilidad del animal. Se piensa que la apoptosis fisiológica ayuda a la redistribución de recursos para los ovocitos en desarrollo. El bloqueo de la apoptosis de las células germinales por una mutación en el gen *ced-3* provoca un decremento en el tamaño y la calidad de los ovocitos, el cual se incrementa con la edad [48].

1.4.1.2.1.1 Inducción de apoptosis de las células germinales por estrés

Existen cuatro tipos de condiciones que inducen apoptosis a través de vías independientes (Figura 5). El primero de ellos se debe a infecciones ya sea por patógenos como *Salmonella typhimurium* y *Salmonella entérica* [49, 50] o por virus (Figura 5B) [51]. El segundo tipo es ocasionado por el estrés genotóxico que causa un daño al DNA (Figura 5C)[52]. El tercer tipo de apoptosis se puede inducir por estrés osmótico, oxidativo, térmico y la exposición a metales (Figura 5D) [44, 53, 54] y finalmente el cuarto tipo de inducción de apoptosis es por estrés nutricional (Figura 5E) [44, 55]. A continuación se describirá en qué consiste cada uno de estos.

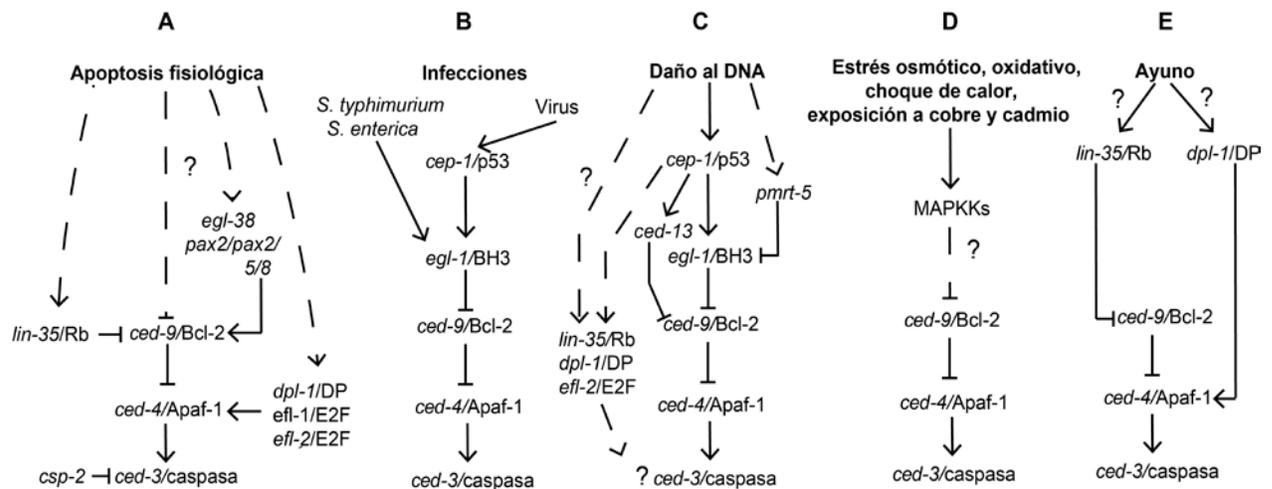


Figura 5. Tipos de inducción de la apoptosis en la línea germinal de *C. elegans*. A-E) Diferentes vías de inducción de apoptosis convergen en la maquinaria central de apoptosis (CED-9, CED-4 y CED-3). En el esquema se indican los genes que participan en cada vía. A) La apoptosis fisiológica es desencadenada por una vía aún desconocida que requiere parcialmente a los genes *lin-35/Rb*, *dpl-1/DP*, *efl-1/E2F* y *efl-2/E2F*. Las proteínas EGL-38 y PAX-2 activan la transcripción de *ced-9* mientras que LIN-35 la reprime. DPL-1, EFL-1 y EFL-2 son reguladores transcripcionales de *ced-3* y *ced-4*. La actividad antiapoptótica de CSP-2 consiste en inhibir la autoactivación del zimógeno pro-CED-3 en condiciones de sobrevivencia. B) Las infecciones por patógenos como *S. typhimurium* y *S. entérica* inducen apoptosis a través de la activación de *egl-1/BH3*. Las infecciones por virus (RNAi y cosupresión) requieren del gen *cep-1/p53* para inducir apoptosis. C) El daño a DNA induce apoptosis a través de la activación de *cep-1/p53* y *egl-1/BH3*. *lin-35*, *dpl-1*, y *efl-2* actúan río abajo o en paralelo a *cep-1/p53* y *ced-13* controlando la expresión de genes blanco no identificados. *pmrt-5* actúa como inhibidor de la apoptosis debido a la radiación. D) El estrés osmótico, oxidativo, el choque de calor y la exposición a metales como cobre y cadmio requieren de

la vía de la MAPKKs: JNK y p38 para activar la apoptosis y son independientes de CEP-1 y EGL-1. E) **Resultados de este trabajo.** La inducción de apoptosis por ayuno requiere de los genes *lin-35/Rb* y *dpl-1/DP*, los cuáles disminuyen la expresión del gen *ced-9* y aumentan la expresión de *ced-4* respectivamente. Las líneas continuas representan interacciones genéticas confirmadas. Las líneas punteadas indican interacciones genéticas no confirmadas. El homólogo en mamíferos de cada gen se indica después de la diagonal. Los signos de interrogación indican que la vía todavía no ha sido esclarecida.

1.4.1.2.1.1.1 Apoptosis inducida por infecciones

El nematodo *C. elegans* se alimenta en el laboratorio de una cepa de *Escherichia coli* no patógena (OP50). La exposición de los animales a bacterias patógenas como *Salmonella typhimurium*, y *S. enterica*, desencadena la apoptosis de las células germinales del organismo en un proceso dependiente de la proteína EGL-1 (Figura 4B) [49, 50]. Aunque se desconoce el mecanismo de inducción de apoptosis ante una infección, la apoptosis de las células germinales juega un papel importante durante la respuesta a un ataque por patógenos ya que los animales mutantes en *ced-3* y *ced-4* mueren más rápidamente que la cepa silvestre cuando son sometidos a este tipo de infecciones [49, 50].

También se ha visto que el silenciamiento de genes por medio de la cosupresión o RNAi induce la apoptosis de las células germinales en *C. elegans* [51]. La vía de apoptosis mediada por silenciamiento requiere de proteínas como CEP-1/p53 y SIR 2.1 (Figura 4B). El fenómeno de cosupresión es inducido por la introducción en la línea germinal de múltiples copias de un gen específico de este tejido lo cual genera el silenciamiento del gen endógeno correspondiente [56]. El RNAi consiste en la introducción de RNA de doble cadena para el silenciamiento de genes. El RNAi y la cosupresión de genes han sido propuestos como mecanismos de defensa en contra de de la invasión por secuencias repetidas, transposones, virus y transgenes exógenos [56].

1.4.1.2.1.1.2 Apoptosis inducida por daño al DNA

En *C. elegans* el daño al DNA no induce apoptosis en las células somáticas pero sí en las germinales [52]. Cuando los nematodos son sometidos a diferentes tipos de estrés genotóxico como son: la Radiación Ionizante (IR), la radiación por UV, los agentes alquilantes y la incorporación errónea de uracilo al DNA se induce un incremento en la apoptosis de células germinales [52, 57-60]. La apoptosis de las células germinales inducida por daño a DNA requiere de la maquinaria central de apoptosis CED-9, CED-4 y CED-3. La activación de esta maquinaria es a través de CEP-1, el homólogo de p53 en mamíferos [61]. CEP-1 promueve la transcripción de *egl-1* y la acumulación de esta proteína provoca que se interrumpa la interacción de CED-9-CED-4 desencadenando la apoptosis [61]. Durante el daño al DNA CEP-1 también activa la transcripción de *ced-13* el cual tiene un dominio BH3 que puede unirse a CED-9 durante la radiación para inducir apoptosis (Figura 4C) [62].

Por otro lado, las proteínas LIN-35, DPL-1 y EFL-2 también regulan la apoptosis inducida por daño a DNA a través de la expresión de genes no identificados que probablemente actúen por debajo o en paralelo de *ced-9*, *ced-4* y *ced-3* [47]. Por debajo y/o en paralelo con *cep-1* la proteína SIR-2.1 se transloca del núcleo al citoplasma ubicándose en la periferia nuclear donde colocaliza transitoriamente con CED-4, desencadenando la apoptosis [63]. PRMT-5 protege a las células germinales de la apoptosis durante el daño al DNA mediante la formación de un complejo con CEP-1 y CBP-1 el cual reprime la transcripción de *egl-1*. PMRT 5 es la única proteína que inhibe la apoptosis de las células germinales durante el daño al DNA (Figura 4C) [64].

1.4.1.2.1.1.3 Apoptosis inducida por estrés osmótico, oxidativo y térmico

Otra de las vías de inducción de apoptosis de las células germinales es la que se desencadena por factores que no alteran la integridad genética. En nuestro laboratorio se observó que la exposición al estrés osmótico, estrés oxidativo y choque de calor induce un incremento en la apoptosis de las células germinales [44]. Esta vía de apoptosis es independiente tanto de la proteína guardián del genoma CEP-1/p53 como de EGL-1 (Figura 4D). Este tipo de apoptosis es inducida por la vía de las MAPKs [44]. Animales mutantes en las cinasas tipo MAPKK *mek-1* y *sek-1* así como en la cinasa antagonista de p53 (ABL-1), no son capaces de inducir apoptosis en respuesta al estrés osmótico, oxidativo y/o choque de calor.

1.4.1.2.1.1.4 Apoptosis inducida por exposición a metales

La exposición de los nematodos a algunos metales como el cobre y el cadmio es otro de los estímulos que induce apoptosis de las células germinales [53, 54]. La exposición de nematodos al cobre incrementa el número de células germinales en apoptosis de una manera dosis-dependiente. La apoptosis inducida por exposición al cobre no depende de los genes *egl-1* y *abl-1*. Sin embargo, este tipo de apoptosis depende parcialmente de genes implicados en las respuestas de daño al DNA como *hus-1*, *clk-2* y *cep-1*[54]. Esto indica que probablemente la exposición a cobre induce daño al DNA. Este tipo de muerte depende de la activación de la vía de las MAPKKs: JNK y p38 con la excepción de *pmk-3* [54].

La exposición de animales a dosis no letales de cadmio incrementa la apoptosis de las células germinales en un proceso dosis-dependiente [53]. La apoptosis inducida por cadmio no depende de *cep-1/p53*; sin embargo si depende de otros genes implicados en la respuesta de daño a DNA como *hus-1* [53]. Al igual que en el caso del cobre, el cadmio induce apoptosis a través de las cascadas de señalización de las MAPKKs: JNK y p38 [53].

1.4.1.2.1.1.5 Apoptosis inducida por Ayuno

El ayuno incrementa el número de células germinales que mueren por apoptosis de una manera independiente de los genes *egl-1*, *cep-1*, *mek-1*, *sek-1* o *abl-1* [44]. El mecanismo de inducción de apoptosis por ayuno es una de las aportaciones de este trabajo y será descrito en los resultados de esta tesis.

1.4.2 Formación y agregación de partículas ribonucleoproteicas (RNPs o Gránulos de RNA)

Además de la apoptosis otro de los mecanismos de respuesta de la línea germinal ante el estrés es la agregación de RNPs o Gránulos de RNA. Los gránulos citoplasmáticos de RNA son estructuras ribonucleoproteicas no membranosas que han sido implicados en la regulación postranscripcional. Existen diferentes clases de gránulos de RNA, los cuales pueden compartir componentes y llegar a utilizar mecanismos similares para regular a los RNAs que contienen. Entre ellos encontramos a los gránulos germinales, los cuerpos de procesamiento o cuerpos P, los gránulos de estrés y los gránulos neuronales [65, 66]. Debido a sus funciones como reguladores de la expresión de RNAs, la formación y/o perturbación de estos gránulos es crítica para una respuesta celular adecuada a los estímulos externos [65, 66].

1.4.2.1 Gránulos germinales

Una de las características más importantes para el desarrollo y función de las células germinales es la presencia de los gránulos germinales. Dependiendo del organismo y el estadio en el que se observen, estos gránulos han sido nombrados de diferente forma, gránulos polares en *Drosophila melanogaster*, gránulos P en *Caenorhabditis elegans*, gránulos germinales en *Xenopus laevis* y cuerpos cromatoides en mamíferos [67-69]. Su función principal consiste en almacenar RNAs y proteínas importantes para el desarrollo

de las células germinales en el embrión temprano y el establecimiento de la línea germinal para la siguiente generación [65]. Los gránulos germinales dirigen la localización de RNAs maternos dentro del ovocito o el embrión temprano, reprimen la traducción de ciertos RNAs, estabilizan RNAs específicos y regulan la traducción de algunos RNAs temporal y/o espacialmente [68, 69]. Dentro de las proteínas identificadas como componentes de los gránulos germinales, encontramos tres clases que son particularmente abundantes: helicasas de RNA con caja tipo DEAD (Vasa, Belle, Me31B, Rck/p54, eIF4A), proteínas con dominio Tudor (TDRD1, RNF17, TDRD4, TDRD6) y proteínas Piwi [67].

En *C. elegans*, los gránulos P están asociados a poros nucleares por lo que se encuentran rodeando la envoltura nuclear durante la mayor parte del desarrollo de las células germinales; sin embargo, en ovocitos maduros y durante la embriogénesis temprana, estos gránulos se despegan y se distribuyen en el citoplasma [69, 70]. Dentro de los componentes descritos que se encuentran en los gránulos P están proteínas involucradas en el mecanismo de RNA de interferencia (DCR-1, DRH-3, EGO-1, CSR-1, PRG-1 y WAGO-1); componentes del splicing (proteínas Sm); componentes de cuerpos de procesamiento (CGH-1 y DCP-2); componentes de gránulos de estrés (PAB-1 y TIAR-2); factores de inicio de la traducción IFE-1 (eIF4E); y otras proteínas de unión a RNA como PGL-1/-2/-3, GLH-1/-2/-3/-4 y CAR-1 [69, 71, 72].

A pesar de que los gránulos P han sido ampliamente estudiados y se sabe que son importantes para promover el desarrollo de las células germinales en el embrión se desconoce de qué manera actúan [73].

1.4.2.2 Cuerpos de procesamiento

Los cuerpos de procesamiento son estructuras citoplasmáticas que están presentes todo el tiempo en las células en condiciones normales. Ante diferentes estímulos (como el

estrés) los cuerpos P pueden aumentar su tamaño. Su función es la regulación de los RNAs mediante la eliminación de su cap, su degradación o la represión de su traducción. Se han descrito más de 60 proteínas que participan como componentes de los cuerpos de procesamiento [74, 75]. La mayoría de éstas proteínas participan en procesos de eliminación del cap y represión de la traducción [74, 75].

Entre las proteínas que se encuentran en los cuerpos de procesamiento están las activadoras de la eliminación del cap Edc3 y Lsm1-7, el complejo enzimático de eliminación del cap Dcp1-Dcp2, y factores que funcionan tanto como represores de la traducción como activadores de la eliminación del cap Scd6, Rck y Pat 1 [74]. Otros factores de decaimiento como la exonucleasa 5'-3' Xrn1 y las subunidades del complejo de deadenilasa (CCR4/POP2/NOT) también se localizan en los cuerpos de procesamiento [74]. Los cuerpos de procesamiento contienen además proteínas que regulan a los microRNAs (miRNA) como Ago2, ALG-1 y GW182, proteínas involucradas en el decaimiento mediado sin sentido (NMD) SMG7 y Dpf1-3, y el factor de inhibición de eIF4E (eIF4E-T) [74]. Los RNAs que entran a los cuerpos de procesamiento pueden ser degradados o almacenados para después salir de ellos y continuar con su traducción [76, 77] (Figura 6E).

1.4.2.3 Gránulos de estrés

En respuesta al estrés, las células eucariotas reprograman el metabolismo del RNAm con la finalidad de contender con éste y adaptarse a las nuevas condiciones. Se ha observado que diferentes tipos de estrés como el aumento de la temperatura, el estrés oxidativo, la isquemia y las infecciones virales desencadenan un súbito arresto en la traducción mediante el desensamblaje de los polisomas [78]. Los RNAs liberados durante la represión de la traducción son dirigidos a los gránulos de estrés dando origen a su

formación (SGs, sus siglas en inglés) [65, 78]. Los gránulos de estrés contienen proteínas como los factores de inicio de la traducción que conforman el complejo de pre-inicio no canónico 48S (eIF3, eIF4A, eIF4G, PABP-1 y subunidades pequeñas del ribosoma)[79].

Se conocen más de 100 proteínas en mamíferos involucradas en la formación de gránulos de estrés [80]. El ensamblaje de los gránulos de estrés lo podemos clasificar en tres etapas [66]. En la primera etapa, la fosforilación inducida por estrés de la Ser51 del eIF2 α reduce los niveles del complejo ternario eIF2–GTP–tRNA^{iMet}. En ausencia de este complejo ternario, la formación del complejo de pre-inicio de la traducción 48S es interrumpido, produciendo un complejo 48S no canónico traduccionalmente inactivo e incapaz de reclutar la subunidad 60S del ribosoma ocasionando que disminuya la tasa de inicio de la traducción (Figura 6B).

La segunda etapa comprende la agregación primaria y establecimiento de la estructura central de los gránulos de estrés. Esta agregación esta mediada por proteínas de unión a RNA que se unen al RNAm del complejo de inicio de la traducción no canónico 48S, tales como: TIA-1, TIAR, TTP, BRF1, FMRP, FXR1, CPEB, G3BP y SMN. Después de esta agregación, se unen otras proteínas que carecen de las propiedades de unirse al RNAm, éstas son reclutadas en los gránulos de estrés a través de interacciones proteína-proteína con proteínas que componen la estructura central de estos gránulos como TIA-1 (SRC3, FAST y PMR1) o con componentes ribonucleoprotéicos del complejo 48S (TRAF2) (Figura 6C).

En la tercera etapa, los transcritos específicos son dirigidos a los gránulos de estrés para su almacenamiento o para ser transferidos a los cuerpos de procesamiento para su degradación (Figura 6D) [79]. Una característica importante de los gránulos de estrés es que los procesos en los que participan son reversibles, esto es, los RNAm que están en los

gránulos de estrés pueden regresar a los polisomas reiniciando su traducción una vez que las condiciones de estrés han pasado y por lo tanto los gránulos de estrés desaparecen (Figura 6F).

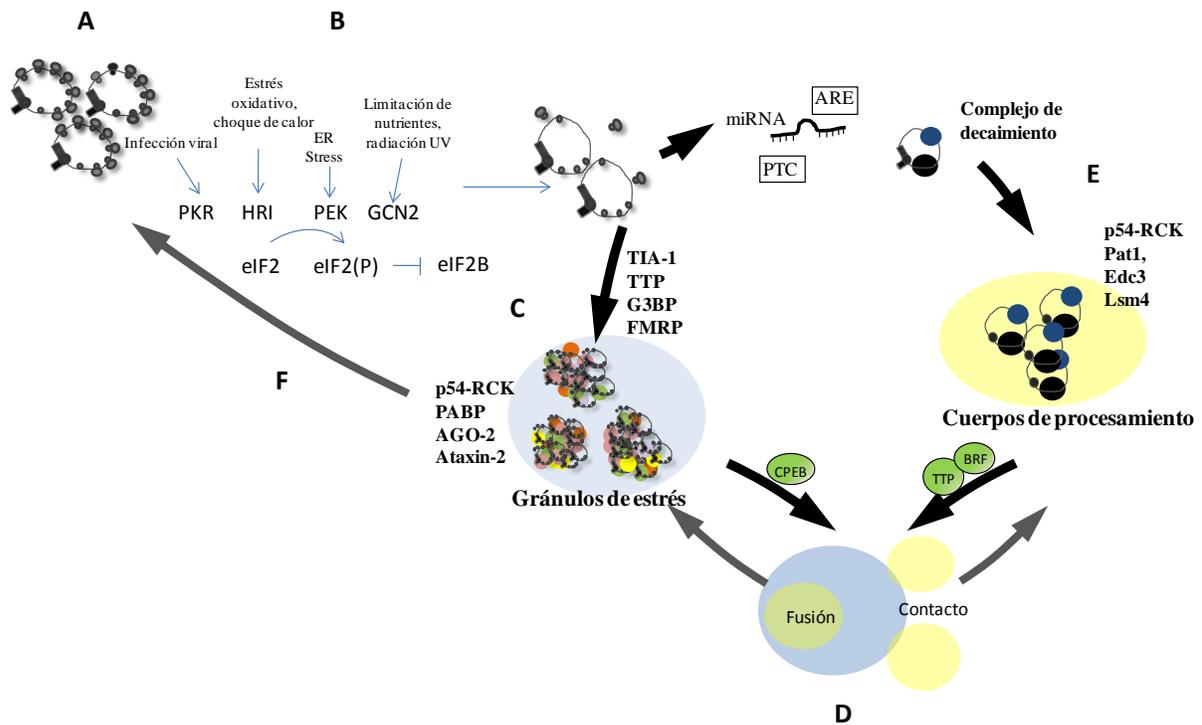


Figura 6. Esquema general de la formación e interacción de los gránulos de estrés y los cuerpos de procesamiento. A) En condiciones normales los RNAs con cap y poliadenilados son traducidos en los polisomas. B) Bajo condiciones de estrés, la activación de las cinasas de respuesta a estrés PERK, GCN2, HRI o PKR conduce a la fosforilación de eIF2 inhibiendo con ello la traducción global. Como consecuencia, el complejo de pre-inicio de la traducción no canónico 48S se acumula. C) Proteínas de unión a RNA como TIA-1 y G3BP que contienen dominios tipo prion dirigen el ensamblaje del complejo de pre-inicio de la traducción no canónico 48S dentro de los gránulos de estrés (azul). D) Los cuerpos de procesamiento (amarillo) son frecuentemente observados en contacto o fusionados con los gránulos de estrés (azul). CPEB1, TTP y BRF1 promueven la asociación de los cuerpos de procesamiento con los gránulos de estrés. E) Los RNAs son específicamente degradados si tienen un codón de terminación prematuro (PTC), si se asocian a miRNAs o si contienen elementos ricos en AU (ARE). Los RNAs marcados para su degradación junto con enzimas claves de la degradación de RNAm se ensamblan en los cuerpos de procesamiento en condiciones normales. La helicasa de RNA Rck y las proteínas de agregación como Pat1, Edc3 y Lsm4 son importantes para la formación de los cuerpos de procesamiento. F) Una vez que las condiciones de estrés han pasado los RNA mensajeros pueden regresar a los polisomas reiniciando su traducción.

1.4.2.4 Gránulos de RNA en la gónada de *C. elegans*

En la gónada de *C. elegans* existe una gran cantidad de proteínas que se expresan en el citoplasma de manera diferenciada. Algunas de estas proteínas forman agregados citoplasmáticos y han sido involucradas en la regulación del RNAm [10, 71, 81]. Sin embargo y con la excepción de los gránulos germinales en *C. elegans*, no se conoce la dinámica de la formación de los gránulos de RNA, ni los componentes que los definen. Los primeros estudios se han centrado en tratar de caracterizar a los gránulos de RNA en *C. elegans* y han visto que comparten muchas proteínas [82-85]. PUF-2, CAR-1, MEX-3 y GLD-1 son algunas de las proteínas que se encuentran en estos gránulos. Dichas proteínas son de unión a RNAm tal como la mayoría de los componentes de estos gránulos [65]. Además, éstos gránulos presentan ortólogos de componentes presentes en cuerpos de procesamiento en mamíferos como RCK (CGH-1) y Dcp2c (DCP-2), así como de gránulos de estrés PABP-1 (PAB-1) y TIA-1/TIAR (TIAR-2) [84, 85].

Se ha descrito un tipo específico de gránulos de RNA denominado cuerpos de almacenamiento [82]. Los cuerpos de almacenamiento están presentes en el citoplasma de la gónada de *C. elegans* en condiciones normales y están compuestos por las proteínas CGH-1(Rck) y CAR-1(Lsm) (Figura 7A) [82]. Los ortólogos en mamíferos de estas proteínas (Rck y Lsm) forman parte de los cuerpos de procesamiento (Figura 6). En contraste a la función principal de los cuerpos de procesamiento (degradación de RNAs), la función propuesta para los cuerpos de almacenamiento en *C. elegans* es la regulación de un conjunto de RNAs maternos específicos para prevenir su degradación en la gónada [81, 82].

La distribución normal de los gránulos de RNA de la gónada de *C. elegans* cambia drásticamente como consecuencia de la exposición a algunos tipos de estrés o si la

ovulación se detiene [84, 86]. Por ejemplo, los gránulos germinales y los cuerpos de almacenamiento se agrandan y diversifican cuando la maduración del ovocito es bloqueada en ausencia de espermatozoides o en respuesta a un choque de calor o estrés osmótico [82, 84, 85]. Bajo estas condiciones algunos gránulos acumulan principalmente proteínas que están presentes en los cuerpos de procesamiento como son enzimas de eliminación del cap generando los denominados cuerpos dcP (DCAP-2-enriched granules related to P bodies), mientras que otros acumulan RNAs reprimidos traduccionalmente como *cgh-1* y *car-1* generando los cuerpos grP(germ line RNP granules related to P bodies (Figura 7B). Algunos gránulos acumulan uno de los ortólogos en *C. elegans* de la proteína TIA-1 (T-cell restricted intracellular antigen), la cual en mamíferos es marcador de gránulos de estrés (Figura 7B) [82, 85]. Además en nuestro laboratorio se demostró que durante el ayuno se forman gránulos que acumulan *cgh-1* en el centro de la gónada (Figura 7B) [87, 88].

Una posible explicación para el engrandecimiento de estos gránulos durante el estrés o la detención de la ovogénesis es la prevención de la degradación de RNA o de la traducción prematura de RNAs maternos cuando la fertilización es retrasada. Como mencionamos anteriormente el estrés ambiental suele inhibir la síntesis global de proteínas ocasionando con ello que los RNAs liberados de los polisomas se acumulen en los gránulos de estrés y en los cuerpos de procesamiento. Si los gránulos que se forman/engrandecen en *C. elegans* contienen polisomas desensamblados y representan la consecuencia morfológica de un arresto traduccional no ha sido estudiado en este nematodo.

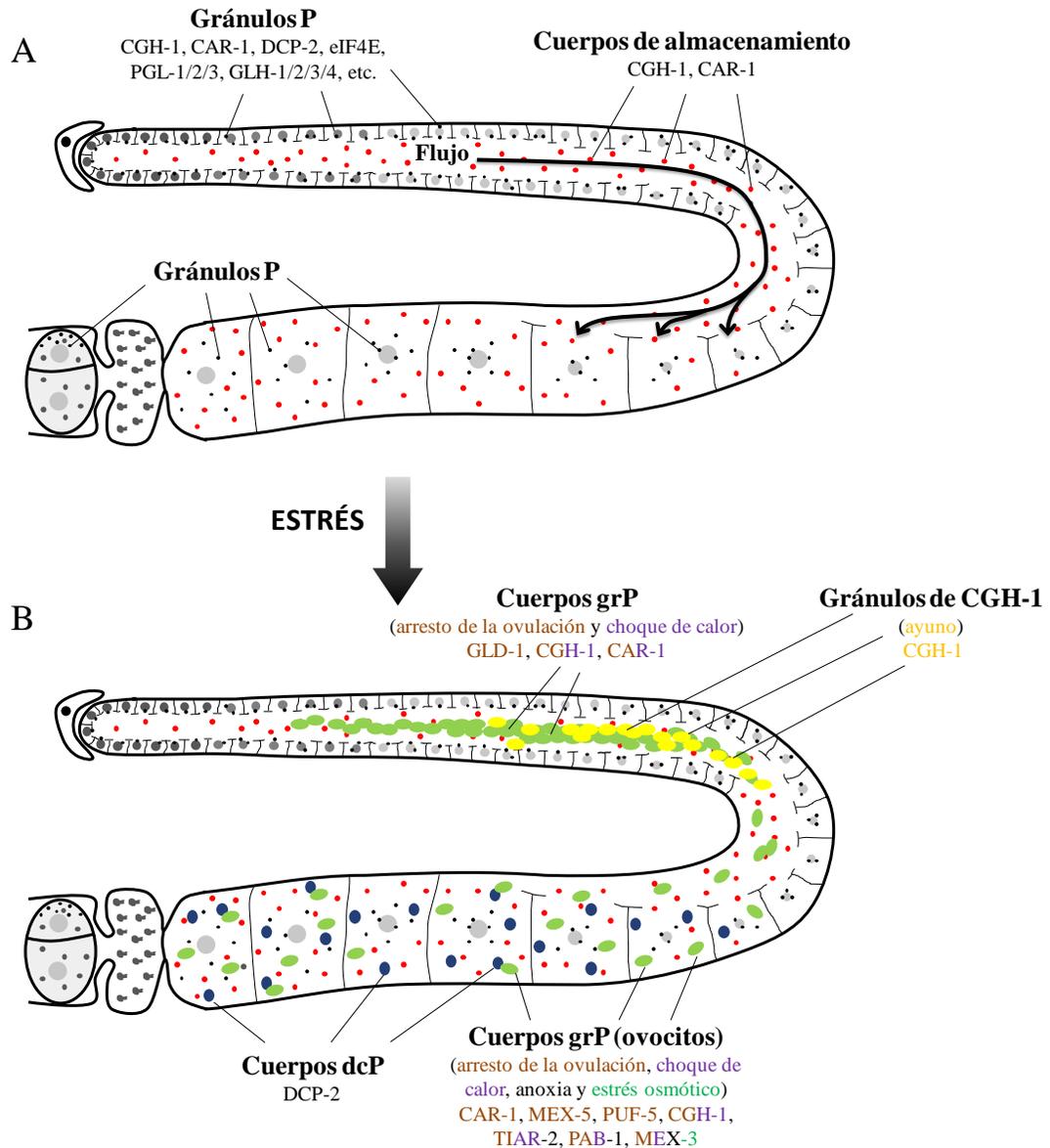


Figura 7. Esquema de la gónada que muestra la distribución de gránulos de RNA en condiciones normales y de estrés. (A) Los gránulos de RNA que se observan en condiciones normales son gránulos germinales y los cuerpos de almacenamiento. (B) Después de la detención de la ovulación o el estrés ambiental se forman los cuerpos grP en el centro de la gónada y en los ovocitos, mientras que los cuerpos dcP solo se forman en los ovocitos. El ayuno induce la formación de gránulos positivos para CGH-1 en el centro de la gónada.

1.4.3 Efectos particulares del ayuno en la gónada

La falta de alimento es un reto al que comúnmente se enfrentan los organismos en su ambiente natural. La forma en que los organismos responden a la falta de alimento está estrechamente vinculado con el envejecimiento, la obesidad, el cáncer y la muerte celular. Específicamente en *C. elegans*, la falta de alimento condiciona diversas respuestas dependiendo del estado de desarrollo del animal. Mediante diferentes mecanismos este nematodo es capaz de entrar a estadios alternativos de desarrollo o diapausas que le permiten sobrevivir hasta encontrar una fuente de alimento. El primero de estos estadios alternos se presenta cuando la larva eclosiona en condiciones de ausencia de comida. Bajo estas condiciones la larva 1 (L1) entra en un estado de dormancia denominada diapausa L1. En la diapausa L1 el organismo es capaz de sobrevivir de 6-10 días [89]. Durante la diapausa L1 hay una reducción global en la expresión génica; mientras que algunos genes metabólicos son diferencialmente regulados.

Durante la diapausa L1 la transcripción de genes involucrados en el crecimiento y desarrollo se detiene; sin embargo la RNA polimerasa II se encuentra posicionada sobre los promotores de dichos genes, indicando que la regulación transcripcional es probablemente un aspecto importante en el mantenimiento y salida de este estado [90].

Si el estrés continúa las larvas L1 pueden entrar en un estadio alterno que se denomina “dauer” (del alemán, duradero) [91] (Figura 1). Durante el estado de “dauer” el nematodo deja de comer y puede sobrevivir alrededor de cuatro meses. La formación de la larva dauer conlleva al establecimiento de un progresivo arresto del ciclo celular incluyendo a las células germinales. La inhibición de la proliferación de la línea germinal en estado de dauer requiere de los genes *daf-18* y *aak-1*[92]. Sin embargo, la dinámica específica de la alteración del desarrollo de la línea germinal en las larvas dauer no se

conoce aún. La diapausa “dauer” finaliza cuando el animal censa condiciones ambientales favorables [91].

Un tercer estado de diapausa se presenta cuando los animales hermafroditas L4 o adultos son expuestos al ayuno y se conoce como diapausa reproductiva del adulto (Figura 1) [93, 94]. Esta diapausa se caracteriza por una reducción dramática de la gónada durante la ovogénesis. Esta reducción ocurre en los primeros 10 días de ayuno manteniendo tan solo un nicho de alrededor de 35 células germinales por brazo de la gónada [93]. Sorprendentemente, aun después de 30 días de ayuno en esta diapausa los animales sobreviven y pueden restablecer su gónada por completo 72 h después de haber sido alimentados. Los animales recuperados son capaces de producir progenie si aun tienen espermatozoides o si son cruzados con un macho [93, 94]. Se piensa que la apoptosis es un factor importante para la extensión del potencial reproductivo de los animales ayunados ya que la reducción de la gónada no ocurre en animales mutantes para la caspasa [93].

En el laboratorio se demostró que el ayuno por 6 h induce un incremento en la apoptosis de las células germinales en animales hermafroditas adultos de 1 día, sin ocasionar severas alteraciones en la morfología de la gónada [44]. Sin embargo el mecanismo mediante el cual se induce apoptosis bajo estas condiciones no se conocía y dilucidarlo fue el principal objetivo de esta tesis. La inducción de apoptosis por ayuno no depende de las proteínas EGL-1 ni CEP-1, lo cual sugiere que comparte características con la apoptosis fisiológica. Además tampoco requiere de las MAPKKs *mek-1* y *sek-1* las cuales si están implicadas en la inducción de apoptosis por choque de calor, estrés osmótico y estrés oxidativo [44]. Con el propósito de encontrar genes reguladores de la apoptosis inducida por ayuno se realizó un microarreglo donde se compararon animales bien alimentados con animales sometidos a 6 h de ayuno. El análisis de los genes obtenidos en el

microarreglo, la participación de un grupo concreto de genes en la inducción de apoptosis por ayuno así como el mecanismo de inducción de apoptosis durante este tipo de estrés son parte de los resultados de esta tesis.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las respuestas de las células germinales al estrés son de suma importancia para evitar la transmisión de daño a la progenie. La inducción de apoptosis en la gónada parece ser un mecanismo que mantiene la calidad de los ovocitos durante el estrés. En particular el ayuno induce una respuesta apoptótica que ayuda a los organismos a sobrevivir en condiciones adversas preservando además su capacidad reproductiva. Los mecanismos de respuesta al estrés están asociados con cambios en la expresión génica a diferentes niveles. Sin embargo, se sabe poco de la regulación de la expresión de los genes involucrados en la apoptosis durante el estrés en *C. elegans*. Dada la importancia del mantenimiento de la homeostasis de las células germinales durante el estrés esperamos que la maquinaria de apoptosis y/o sus principales reguladores presenten cambios en su expresión que expliquen la inducción de apoptosis bajo estas condiciones de estrés. Además suponemos que durante el ayuno se desencadenan procesos globales de regulación génica tales como la regulación de la tasa de traducción y la formación de gránulos de RNA.

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

El objetivo general de este trabajo es estudiar cómo se regula la apoptosis de las células germinales de *Caenorhabditis elegans* durante el ayuno.

3.2 Objetivos Particulares

1. Estudiar por medio de RNAi un grupo selecto de genes que alteran su expresión en condiciones de ayuno y determinar su participación en la apoptosis de las células germinales.
2. Analizar la participación de las proteínas de estudio en la formación de gránulos de RNA en las células germinales.
3. Determinar los niveles de expresión de los genes que componen la maquinaria central de apoptosis (*ced-9*, *ced-4*, *ced-3*) y algunos de sus reguladores (*lin-35*, *dpl-1*, *efl-1*, *efl-2*) a nivel de RNAm y proteína en condiciones de ayuno.
4. Determinar los niveles de traducción en nematodos sometidos a condiciones de ayuno, así como la tasa traduccional de cada uno de los genes que componen la maquinaria central de apoptosis (*ced-9*, *ced-4*, *ced-3*) y de algunos de sus reguladores (*lin-35*, *dpl-1*, *efl-1*, *efl-2*).
5. Determinar si algunos de los genes reguladores de la maquinaria de apoptosis (*lin-35*, *dpl-1*, *efl-1*, *efl-2*) participan en la inducción de apoptosis por ayuno.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Crecimiento y mantenimiento de cepas.

Todas las cepas utilizadas en este estudio fueron obtenidos del Centro de Genética de *Caenorhabditis* (CGC). La cepa utilizada como silvestre fue la N2 (var. Bristol). Las mutantes utilizadas en este trabajo se describen en la siguiente Tabla 1:

Tabla 1. Cepas utilizadas en este trabajo

Cepa	Genotipo	Temperatura de mantenimiento	Referencia
MT10430	<i>lin-35(n745)</i>	20°C	[95]
MT11147	<i>dpl-1(n3643)</i>	20°C	[96]
MT2547	<i>ced-4(n1162)</i>	20°C	[97]
JJ1549	<i>efl-1(sel)</i>	20°C	[98]
WS2974	<i>gla-3(op312)</i>	20°C	[99]
361	<i>tiar-1(tm361)</i>	20°C	[100]
RB656	<i>glh-1(ok439)</i>	20°C	[101]
SS580	<i>pgl-1(bn102)</i>	20°C	[102]
RB988	<i>cey-2(ok902)</i>	20°C	---

Los animales se crecieron en cajas petri con medio NGM (ANEXO 1) y se alimentaron con la cepa de *Escherichia coli* OP50-1. Para el mantenimiento de las cepas se seleccionaron de cinco a diez animales (dependiendo de la cepa) en estadio L4 y se colocaron en una caja mediana nueva a 20, 24 o 25°C de acuerdo con los requerimientos del experimento y la cepa.

Para el cultivo de *E. coli* se utilizó medio LB líquido. El antibiótico de selección para la cepa OP50-1 fue estreptomycin (50 µg/ml). Los cultivos fueron inoculados con la cepa OP50-1 e incubados toda la noche en agitación constante a 37°C. Al día siguiente se utilizaron unas gotas del cultivo OP50-1 para aplicarlas sobre el medio NGM ya gelificado y utilizarlas como fuente de alimento para *C. elegans*.

4.1.1 Crecimiento de gusanos a gran escala

Para la obtención de muestras para perfiles polisomales se requirió crecer gusanos a gran escala por lo que los animales se crecieron en cajas con huevo [103].

1.- Preparación de cajas. Para preparar ~20 cajas con huevo se prepararon 500 ml de medio NGM modificado (ANEXO 1). Se colocaron ~25 ml del medio en cada caja grande (8.5 cm) y se dejaron tapadas en la campana para que solidificaran.

2.- Preparación de la solución de huevo. Se colocaron 50 ml de H₂O destilada estéril en un vaso de precipitado de 500 ml al cual se le puso un agitador magnético estéril y se calentó. El agua se calentó y justo antes del punto de ebullición se le agregó la yema y clara de un huevo que previamente se limpió con etanol al 70%. La yema del huevo se rompió con ayuda de una pipeta estéril, y la mezcla se colocó en agitación durante 5 minutos sin permitir que llegara a hervir. Luego de los 5 minutos, la mezcla se coló con un colador estéril de metal para eliminar los grumos y se vació en otro vaso de precipitado de 500 ml estéril. La mezcla se agitó por 3-4 minutos con una batidora cuyas aspas también estaban estériles. Después de la agitación, la mezcla se dejó a temperatura ambiente en condiciones de esterilidad por 15 minutos.

3.- Preparación de la mezcla de la solución de huevo y de bacterias. A la mezcla anterior se le agregó una pastilla de bacterias centrifugadas provenientes de un cultivo de 500 ml de la bacteria E. coli NA22 (50 µg/ml de ampicilina) resuspendido en 25 ml de LB. La mezcla se agitó bien y se tomaron ~4 ml para poner en una de las cajas grandes de medio NGM modificado previamente preparadas. Las cajas se dejaron secar a temperatura ambiente por 3 noches.

4.- Inoculación de los animales en las cajas. Se colocaron de 18 a 20 animales adultos de 1 día en cajas grandes de medio normal con OP50-1. Una vez que los animales se terminaron

la comida solo sobrevivieron las larvas L1. En cada caja con huevo se colocaron las larvas L1 provenientes de 2 cajas grandes de medio normal y se espero a que llegaran al estadio adulto.

5.- Colección de los animales. Los animales adultos de 1 día fueron colectados en tubos falcon de 15 ml con H₂O Milli-Q o con M9 1X estéril (ANEXO 1). Se colocaron entre 5 y 6 ml de líquido en cada caja y se agitaron suavemente para desprender la mayor cantidad de animales posibles. Los tubos con los animales se centrifugaron 30 segundos a 4000 rpm y se retiró el sobrenadante. El lavado se repitió 5 veces más. Después del último lavado, los animales se resuspendieron en 12 ml de agua fría (mantenida en hielo) y se dividieron en 6 tubos falcon de 15 ml (2 ml por tubo). A cada tubo se le añadieron 4 ml solución estéril (por filtración) de sacarosa al 50% fría (mantenida en hielo) y se mezcló suavemente. Para separar a los animales de los residuos de huevo/bacteria/agar la mezcla se centrifugó 5 minutos a 50 rpm seguido inmediatamente de 5 minutos más a 1000 rpm. Inmediatamente después de la centrifugación se colectaron los animales de la parte superior con una pipeta estéril de vidrio y se transfirieron a tubos falcon de 15 ml nuevos. Después, los animales se lavaron 5 veces con H₂O Milli-Q estéril centrifugando, cada vez 30 segundos a 4000 rpm.

4.2 Silenciamiento de genes por RNA de interferencia (RNAi)

El mecanismo de RNAi fue descrito por primera vez en *C. elegans* como una respuesta al ingreso de una doble cadena de RNA (dsRNA), lo que resulta en la degradación del RNAm específico para el dsRNA que entró [104]. La inducción de RNAi en *C. elegans* puede hacerse a través de la inyección de unas cuantas moléculas de dsRNA en la gónada o mediante la alimentación [105]. Para inducir RNAi en este trabajo se utilizó el método por alimentación mediante el protocolo propuesto en [106].

Los plásmidos que contienen cada uno de los genes a analizar (*car-1*, *pgl-1*, *cey-2*, *mex-5* y *cgh-1*) se obtuvieron de una biblioteca de RNAi de *C. elegans* (Open Biosystems) y los que no se encontraron en esta biblioteca se clonaron individualmente (*glh-4*, *nos-2*, *gla-3*, *ife-1*, *ced-9*) (Ver apartado de clonación de genes).

1. Preparación de las cajas. Se prepararon cajas con medio NGM (ANEXO1) con 30 g de agar por litro, 50 µg/ml de ampicilina, 12.5 µg/ml de tetraciclina y 1 mM de IPTG.

2. Preparación del cultivo de bacterias. Se creció un cultivo de bacterias con el gen seleccionado toda la noche a 37°C con agitación constante en medio LB con 50 µg/ml de ampicilina y 12.5 µg/ml de tetraciclina.

3. Inducción del dsRNA. El cultivo de bacterias con el gen en estudio se colocó en las cajas previamente preparadas. Para las cajas grandes se utilizó 1 ml de cultivo, para las cajas medianas 800 µl y para las cajas chicas 200 µl. Las cajas se dejaron a temperatura ambiente por 18 horas, tiempo en el cual se induce el dsRNA en las bacterias; después de ésta inducción, las cajas están listas para usarse. Como control del RNAi se usó el plásmido PD129.36 sin ningún gen inserto, plásmido vacío (PV) [107].

4.3 Clonación de genes

Se clonaron los siguientes genes: *ced-9*, *glh-4*, *nos-2*, *gla-3*, *ife-1* para hacer RNA de interferencia. Para esto se diseñaron oligonucleótidos específicos para amplificar un fragmento de cada uno de ellos. Los oligonucleótidos utilizados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para la clonación de genes

Nombre	Gen	Secuencia (5'—3')	Sitios de Restricción	tm °C	Fragmento que amplifican (pb)
CED9FOR CED9REV	<i>ced-9</i>	GGAATTC CCGATATTCGAGAAGAAGCA CG y GGGTACCCCTTACTTCAAGCTGA ACATCATC	EcoR1 Kpn1	65	843
GLA3FOR GLA3REV	<i>gla-3</i>	GGAATTC AACCAATACTTCGGACTG y GGGGTACCCGTAGTTTGGTGTCTTTTC	EcoR1 Kpn1	59.5	708
GLH4FOR GLH4REV	<i>glh-4</i>	GGAATTC TTGCTTTCTTGATACCATTC y GGGGTACCCTAAACAGCACAGTTTG	EcoR1 Kpn1	58	427
NOS2FOR NOS2REV	<i>nos-2</i>	GGAATTC ATGTCTCTGGGTACTCCAAG y GGGGTACCCGTTTTGATGGGTCTAG	EcoR1 Kpn1	60	58
IFE1FOR IFE1REV	<i>ife-1</i>	GGAATTC ATGACTGAAACGGAGCAAA C y GGGGTACCTTAGACGGCGGATTC	EcoR1 Kpn1	62	639

A partir de RNA extraído de gusanos N2 adultos de 1 día en condiciones control se sintetizó cDNA utilizando el protocolo de la retrotranscriptasa ImProm (Promega). Mediante la técnica de PCR se amplificaron los productos correspondientes a cada gen, se purificaron de gel de agarosa y se digirieron con las enzimas EcoR1 y Kpn1, se purificaron nuevamente y se ligaron en el vector PD129.36. Posterior a la ligación de 1 a 5 µl se transformaron en la cepa de E. coli DH5α. Se seleccionaron colonias y se extrajo el plásmido de cada una mediante minipreps (QUIAGEN) para corroborar que tuvieran el fragmento del gen de interés y una vez identificados los plásmidos correctos se transformaron en la cepa HT115. Todos los plásmidos fueron secuenciados.

4.4 Tratamientos de estrés utilizados

Las condiciones de estrés utilizadas en este trabajo fueron choque de calor, estrés osmótico, estrés oxidativo y ayuno las cuales se basan en [44]. Para inducir estrés por ayuno, hermafroditas adultos de 1 día se movieron a una caja sin bacterias por 6 h. Para inducir estrés osmótico, hermafroditas adultos de 1 día se colocaron durante 1h en una solución de NaCl 70 mM disuelto en M9 1X, luego de este tratamiento se colocaron en cajas con comida y se dejaron recuperar 1 h más a 24°C. Para inducir estrés oxidativo,

hermafroditas adultos de 1 día se colocaron durante 1 h en una solución de Paraquat (metil viológeno diclorídrico dihidratado) 10 mM disuelto en M9 1X, luego de este tratamiento se colocaron en cajas con comida y se dejaron recuperar 1 h más a 24°C. Para inducir estrés por choque de calor, hermafroditas adultos de 1 día se colocaron durante 3 h en una incubadora a una temperatura de 31°C, luego de este tratamiento se dejaron recuperar 4.5 h a 24°C.

4.5 Cuantificación de cuerpos apoptóticos

Para visualizar los cuerpos apoptóticos en este trabajo se utilizó microscopía tipo Nomarski y/o de fluorescencia cuando se utilizó la cepa MD701. Esta cepa tiene fusionada la proteína verde fluorescente (GFP) con la proteína CED-1 (*Plim-7ced-1::gfp*). Esta construcción se expresa en la membrana del epitelio que envuelve a las células germinales (vaina), este epitelio es el encargado de fagocitar las células en apoptosis por lo que podemos ver los cuerpos apoptóticos bajo microscopía de fluorescencia [62]. Dado que los cuerpos apoptóticos son refráctiles a la luz, también se utilizó la microscopía de tipo Nomarski para observarlos [19]. Para una mejor visualización de los cuerpos apoptóticos a los animales se les silenció el gen *ced-1* mediante RNAi por alimentación.

Para su análisis en el microscopio, los gusanos fueron montados en un portaobjetos que contenía una cama de agarosa al 2% (disuelta en agua). Para inmovilizar a los nematodos se utilizaron 15 µl de azida de sodio (NaN₃) 40 mM y se montaron de 20-25 animales que fueron cubiertos por un cubreobjetos.

4.6 Extracción de RNA total

Para colectar los animales se utilizó medio M9 1X, para eliminar el exceso de bacterias se hicieron de 4-5 lavados. Cada lavado consistió en poner a los animales colectados en hielo para que se fueran al fondo del tubo, colectar con una pipeta el medio y

cambiarlo por medio nuevo. Después, las muestras se centrifugaron y se retiró la mayor cantidad de líquido dejando solo la pastilla de animales. A los animales se les agregó 1 ml del reactivo TRIZOL (Invitrogen) y se transfirieron a 2 tubos eppendorf de 1.5 ml (500 µl por cada tubo). Los tubos se congelaron en nitrógeno líquido (N₂) y se almacenaron a -70°C para su posterior extracción. Para extraer el RNA, se utilizó un mortero previamente enfriado con N₂. La muestra congelada se molió hasta que la pasta que se formó debido al descenso de la temperatura estuviera en fase líquida. Una vez que la muestra se volvía líquida se le agregó más N₂ líquido para volverla a congelar, esta operación se repitió tres veces. Después, la muestra se repartió en dos tubos eppendorf de 1.5 ml y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. A cada eppendorf se le agregaron 100 µl de cloroformo y se agitó 15 segundos en el vórtex, posteriormente se incubó a temperatura ambiente por 3 minutos.

Después de la incubación, las muestras se centrifugaron a 4°C a 13400 rpm durante 15 minutos. Al término de la centrifugación se observaron 3 fases, se extrajo la fase superior en donde se encuentra el RNA y se pasó a un tubo nuevo. A cada tubo se le agregaron 250 µl de isopropanol, se mezcló con el vórtex y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Las muestras se volvieron a centrifugar a 13400 rpm a 4°C durante 10 minutos, luego de los cuales el sobrenadante se decantó y se añadieron 500 µl de etanol al 75%. Se centrifugó a 7500 rpm durante 5 minutos a 4°C. El etanol se decantó y el excedente se extrajo con ayuda de una micropipeta. Los tubos se dejaron secar a temperatura ambiente abiertos durante 5-10 minutos. A cada tubo se le adicionaron 30 µl de agua tratada con DEPC. Para disolver la pastilla de RNA se mezcló con el vortex e incubó a 60°C durante 10 minutos. Posteriormente se cuantificó la concentración de RNA de cada muestra.

4.7 Northern Blot

Para realizar el Northern blot, 10 µg de RNA total de las muestras en estudio fueron separados en un gel desnaturalizante (ANEXO 1). Se utilizó amortiguador MOPS 1X para correr la electroforesis (ANEXO 1). Una vez solidificado el gel, se vació el amortiguador de MOPS 1X justo al borde superior del gel, los pozos se llenaron con el mismo amortiguador utilizando una pipeta pasteur. A cada muestra se le agregaron 3 µl de MOPS 10X (ANEXO 1), 15 µl de formamida, 5.4 µl de formaldehído al 37%, 3.5 µl de amortiguador de carga para RNA, 2 µl de bromuro de etidio y se llevó a 30 µl con H₂O DEPC. Antes de cargar la muestra, el RNA se desnaturalizó incubando los tubos durante 15 minutos a 68°C y posteriormente se pusieron en hielo por 2 minutos. Debido a que el gel no estaba sumergido en el amortiguador, cuando las muestras migraron alrededor de 2 cm se apagó la fuente de poder y los pozos se llenaron nuevamente con el amortiguador de electroforesis. La electroforesis se realizó a 40 Volts.

Para transferir las muestras del gel a la membrana, se cortaron 8 trozos correspondientes al tamaño del gel y 2 tiras de 50 cm de largo de papel para cromatografía Whatman con el mismo ancho del gel, además de un pedazo de membrana de nylon (Amersham) ligeramente más grande que el área del gel. En un refractario de vidrio se colocó la solución de transferencia SSC 20X (ANEXO 1). Sobre el refractario se montó un vidrio a lo largo del refractario (el vidrio debe de ser más angosto que el ancho del refractario). Las tiras de papel Whatman se sumergieron por completo en la solución de transferencia formando un puente alrededor del vidrio. El gel se puso invertido sobre el papel de tal forma que los pozos estaban hacia abajo. Se colocaron tiras de parafilm del largo del refractario al borde de los cuatro lados de la membrana de nylon que sobresalen del gel sin que éstas se superpongan con el gel. Dos pedazos de papel Whatman se

humedecieron con SSC 20X y se pusieron encima de la membrana de nylon, encima de estos se colocaron los otros 6 pedazos de papel Whatman secos. Posteriormente se colocó encima un paquete de toallas absorbentes, después un vidrio de un área considerable para colocar sobre él un libro. Las toallas absorben la solución de transferencia, lo que permite que el flujo sea unidireccional del refractario de vidrio a las toallas transfiriendo el RNA hacia la membrana. Esta transferencia se dejó a temperatura ambiente toda la noche y al día siguiente el RNA se fijó a la membrana con un entrecruzador (Stratalinker) de luz ultravioleta a 1400 Joules.

Para la elaboración de la sonda radiactiva se extrajo el gen en estudio mediante restricciones del plásmido donde estaba inserto usando los kits Plasmid Midi y Qiaex II Agarose Gel Extraction Protocol (QIAGEN) y se sintetizó usando el kit Random Primers DNA Labeling System (Invitrogen). Se colocaron 5 μ l del DNA de cada gen en un tubo eppendorf y se agregaron 13 μ l de H₂O Milli-Q estéril. En otro tubo se pusieron 100 μ l de DNA de salmón, ambos tubos se hirvieron durante 5 minutos y después se pusieron en hielo por 2 minutos. Al tubo con el insertó se le agregaron 2 μ l de dATP, 2 μ l de dTTP y 2 μ l de dGTP además de 15 μ l de oligonucleótidos al azar (Random Primers). Al final, se adicionaron 5 μ l del nucleótido radiactivo α -dCTP (Amersham, R. U.) y 1 μ l de la enzima DNA polimerasa III (Klenow Fragment). Para que se sintetice la sonda, la reacción se dejó por 1 hora a temperatura ambiente y dentro de un contenedor de plomo especial para radioactividad. Cuando la reacción de la sonda terminó, se agregaron 5 μ l del amortiguador de paro y se eliminaron los nucleótidos de la sonda no incorporados usando las columnas de Sephadex G-50 DNA Grade F (General Electric). La mezcla se colocó al centro de la columna y se centrifugó por 2 minutos a 0.7 rpm dentro de un tubo eppendorf.

La membrana se prehibridó en un tubo con tapa manteniendo la orientación del RNA hacia adentro. Al tubo se le agregaron 10 ml de la solución de hibridación (Anexo 1) previamente precalentada a 60°C y 100 µl de DNA de salmón que se hirvieron. El frasco con la membrana se preincubó a 65°C durante 1 hora en un rotor a 9-11 rpm. La muestra de DNA marcado radioactivamente (sonda) se hirvió durante 5 minutos y después se puso en hielo por 2 minutos más. La sonda se añadió al frasco con la membrana y se incubó toda la noche a 65°C en rotación.

Cuando el período de incubación con la sonda radiactiva finalizó, la membrana se lavó con las siguientes soluciones: 1) 20 ml de SSC 20X, 2 ml de SDS 10X y 178 ml de agua Milli-Q; y 2) 5 ml de SSC 20X, 2 ml de SDS 10X y 193 ml de agua Milli-Q. La sonda radiactiva, el DNA de salmón y la solución de hibridación se recuperaron en un tubo falcon de 50 ml que se guardó en un contenedor para radiactividad a -20°C por si se requería reutilizar de lo contrario se desecho en un contenedor apropiado. La membrana se lavó añadiendo 15 ml de la primera solución de lavado (precalentada a 60°C) girando el frasco, después se desecha la solución. Al final se incorporó el resto de la solución de lavado y se incubó por 30 minutos a 65°C en rotación. La misma operación se realizó con la segunda solución de lavado y se desechó.

La membrana se recuperó y envolvió en plástico autoadherente para evitar que se secase. La membrana se expuso durante un par de horas en la pantalla amplificadora de Amersham Biosciences. Para detectar la marca, la pantalla se escaneó en el lector marca Storm 840 de Molecular Dynamics.

4.8 Cuantificación de la expresión de RNA mensajero mediante PCR semicuantitativo

Se utilizó 1 µg de RNA total para sintetizar cDNA usando el protocolo de la enzima retrotranscriptasa de Promega (ImProm II). El RNA junto con 1 µl de un oligonucleótido dT se llevaron a 5 µl con H₂O milliQ estéril, se incubaron 5 minutos a 70°C y posteriormente se pusieron en hielo por 5 minutos. 15 µl de la mezcla de transcripción reversa (4 µl de ImProm-II 5X amortiguador de reacción, 2.4 µl de MgCl₂ 25 mM, 1 µl de dNTPs 10 mM, 1 µl de la enzima ImProm-II y se llevaron a 15 µl con H₂O milliQ estéril) se agregaron a la muestra de RNA y se incubaron en el termociclador con el programa estándar para la síntesis de cDNA. El cual consiste en incubar la reacción a 25°C por 5 minutos, seguido de una incubación a 42°C por 60 minutos y finalmente una incubación a 70°C por 15 minutos.

A partir de 1 µl de cDNA sintetizado se realizó la amplificación de genes específicos mediante PCR. Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los genes *gla-3*, *glh-4*, *nos-2* e *ife-1* se muestran en la Tabla 1.

4.9 Cuantificación de la expresión de RNA mensajero mediante PCR en tiempo real

A partir de aproximadamente 100 gónadas disecadas de animales hermafroditas adultos de un día se realizó la extracción de RNA utilizando el reactivo TRIzol (Invitrogen) (Descrito en la sección 4.6). 100 ng de RNA fueron tratados con DNasaI (NewEngland BioLabs) (50 µl de volumen RNA, amortiguador de la enzima, enzima y H₂O milliQ) por 1 h a 37°C y purificados mediante fenol/cloroformo. El RNA tratado fue llevado a un volumen de 300 µl con H₂O milliQ y se le agregó Acetato de Amonio (Sigma) para alcanzar una concentración final de 1M. Posteriormente se les agregó un volumen de Fenol/Cloroformo Isoamílico (Invitrogen). Las muestras fueron agitadas vigorosamente durante 15 s luego de los cuales se centrifugaron a 13400 rpm durante 3 minutos a

temperatura ambiente. Se separó la fase superior y se pasó a un tubo nuevo al cual se le agregaron 250 ml de isopropanol, se mezcló con el vortéx y se incubó a -20 °C durante al menos 2 h. Las muestras se volvieron a centrifugar a 13400 rpm a 4°C durante 10 minutos, luego de los cuales el sobrenadante se decantó y se añadieron 500 µl de etanol al 75%. Se centrifugó a 7500 rpm durante 5 minutos a 4°C. El etanol se decantó y el excedente se extrajo con ayuda de una micropipeta. Los tubos se dejaron secar a temperatura ambiente abiertos durante 5-10 minutos. A cada tubo se le adicionaron 10 µl de agua tratada con DEPC. Para disolver la pastilla de RNA se mezcló con el vortex e incubó a 60°C durante 10 minutos. Posteriormente, se cuantificó la concentración de RNA de cada muestra (Nano-Drop BioRad). El RNA purificado se utilizó para sintetizar cDNA utilizando la transcriptasa reversa de Promega Im-Prom II (descrito en la sección 4.6 y 4.8). La amplificación por PCR se realizó utilizando oligonucleótidos específicos diseñados con la ayuda del software Primer Express Version 2.0 (Applied Biosystems). La amplificación fue realizada mediante el uso de Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Cada reacción de 20 µl contenía: 10 µl de Power SYBR Green PCR Master Mix, 3 µl de Oligo Fw (250 nM), 3 µl de Oligo Rv (250 nM), 1 µl de cDNA y 3 µl de H₂O milliQ estéril. Para la detección se utilizó el sistema de detección ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems). γ -tubulina (*tbg-1*) fue utilizado como control de amplificación, es decir los valores de CT de cada uno de los genes amplificados fueron normalizados con los valores obtenidos para *tbg-1*. Los valores de expresión relativa fueron obtenidos utilizando el método $\Delta\Delta$ CT comparativo (Livak y Schmittgen 2001). Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para amplificación de genes por PCR en tiempo real

Nombre	Gen	Secuencia (5'—3')	tm (°C)	Tamaño (pb)	Fragmento que amplifican (pb)
tbg1qPCR Forward tbg1qPCR Reverse	<i>tbg-1</i>	CCTGTTGTCGATCCAAATGA AACCCGAGAAGCAGTTGAAA	60	20 20	108
ced-9 qPCR Forward ced-9 qPCR Reverse	<i>ced-9</i>	AAACGGAATGGAATGGTTTG AATTTCCGCGTGCTTCTT	60	20 19	110
ced-4 qPCR Forward ced-4 qPCR Reverse	<i>ced-4</i>	AATTCCTCGAGCAGCGTCTTC ATGAACGACGGAATTTTTGG	60	20 20	95
ced-3 qPCR Forward ced-3 qPCR Reverse	<i>ced-3</i>	CGGAGTTCCTGCATTTCTTC CGGAGTTCCTGCATTTCTTC	60	20 20	110
lin-35 qPCR Forward lin-35 qPCR Reverse	<i>lin-35</i>	ACTGGAATTCGGTCCACTTG TCCGCTCATCAATACTTCCA	60	20 20	112
dpl-1 qPCR Forward dpl-1 qPCR Reverse	<i>dpl-1</i>	AGCCACATCAAGTGCAACAG ACCACCTGGAGCAACAATTC	60	20 20	110
efl-1 qPCR Forward efl-1 qPCR Reverse	<i>efl-1</i>	GGCAAAGCGACGAATCTAC CCGCCTTCCACTGTATCAT	60	20 20	94
efl-2 qPCR Forward efl-2 qPCR Reverse	<i>efl-2</i>	AGCAATCACTGGGCTCATT ACGCGTCGTTTCGAGATATT	60	20 20	109

4.10 Evaluación de los niveles de traducción mediante perfiles polisomales

Preparación del gradiente de sacarosa

Para hacer el gradiente se prepararon soluciones al 15, 25, 35, 45 y 60% de sacarosa en amortiguador de gradiente (Anexo 1). En un tubo de ultracentrífuga (14x95 mm, Beckman) se colocó al fondo 1 ml de la solución de sacarosa al 60%, a partir de ahí se colocaron 2.2 ml de cada una de las concentraciones de sacarosa de mayor a menor, con mucho cuidado de no mover el tubo se cubrió con parafilm y se dejó en posición vertical a 4°C durante toda la noche.

Preparación de las muestras

Los perfiles polisomales se hicieron de animales hermafroditas de la cepa N2 y *gla-3(op312)* adultos de 1 día. Los animales fueron crecidos a partir de L1 a 20°C en cajas con huevo (8-10 cajas), una vez adultos se separaron en dos poblaciones: control, aquellos que se mantuvieron todo el tiempo con comida y ayuno, animales a los cuales se les quitó la

bacteria por un periodo de 6 h. La colección de nematodos se realizó como se describe en el apartado 4.1 y las pastillas equivalentes a 0.5 g de gusanos fueron congeladas en N₂. Las pastillas congeladas fueron homogeneizadas en un mortero utilizando 800 µl de amortiguador de lisis (Anexo 1). El lisado se centrifugó a 13200 rpm por 15 min y una alícuota de 0.5 ml de sobrenadante se utilizó para cargarlo en la parte superior del gradiente de sacarosa el cual se preparó un día antes.

Colección del gradiente

El gradiente se centrifugó a 38000 rpm en el rotor SW40Ti (Beckman) durante 2 horas a 4°C. Al término de la centrifugación, el contenido total del tubo se extrajo con ayuda de una bomba de colección (ECONOLAB velocidad 2). Durante la colección el gradiente pasó a través de un detector de UV (BioRad) conectado a un registrador. Finalmente la muestra se colectó en tubos eppendorf utilizando un colector de carrusel (tiempo 0.3). Se colectaron 11 fracciones de 1 ml. Las fracciones más pesadas se encuentran abajo, mientras que las más ligeras se encuentran en la parte superior de los tubos.

4.11 Extracción de RNA de los gradientes de sacarosa y RT-PCR

Cada fracción del perfil fue dividida en 2 tubos eppendorf (500 µl cada uno). Para diluir las altas concentraciones de sacarosa se añadieron 100 µl de H₂O DEPC a los tubos 10 y 11. Se tomó un solo tubo (500 µl) para la extracción de RNA (el otro se reserva para extraer proteína o para realizar una nueva extracción de RNA). Para extraer el RNA total, a cada una de las muestras se le agregó 25 µl de SDS 10% y 1 µl de Proteinasa K 10 mg/ml y se incubaron 30 minutos a 37°C.

Después de la incubación, a cada muestra se le agregó 500 µl de fenol-cloroformo y se agitó en el vórtex por 15 segundos. Los tubos se centrifugaron a 12000 rpm durante 5

minutos. Se recuperó la fracción superior en un tubo eppendorf nuevo y se repitió la extracción agregando nuevamente 500 µl de fenol-cloroformo. A las muestras se les agregó 70 µl 10 M de LiCl y 47 µl de isopropanol, se mezcló por inversión y se incubaron 30-60 minutos a -20°C. Los tubos se centrifugaron a 13200 rpm durante 15 minutos; cuidadosamente se eliminó el sobrenadante y la pastilla se lavó con 500 µl de etanol al 70% frío centrifugándolo a 13200 rpm durante 5 minutos. El RNA se dejó secar con los tubos abiertos a temperatura ambiente durante 5 minutos y fue resuspendido en 30 µl de H₂O DEPC. Las muestras se cuantificaron a 260 nm en un nanodrop (eppendorf). 2 µg de RNA de cada muestra fueron tratados con DNAsaI y purificados mediante fenol/cloroformo. Se sintetizó cDNA de cada una de las muestras utilizando la enzima transcriptasa reversa ImPromII (Promega) y oligo dT. Utilizando el cDNA sintetizado los productos de interés fueron amplificados mediante PCR utilizando oligonucleótidos específicos. Los oligonucleótidos utilizados para los RT-PCRs se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados para amplificar genes en fracciones polisomales

Nombre	Gen	Secuencia (5'—3')	tm (°C)	Fragmento que amplifican (pb)
act-5 FOR act-5 REV	<i>act-5</i>	CGCCTCCTCCTCCTCCCTC GGTAGGTGGTCTCGTGGATTCC	60	150
GLH-4 FOR GLH-4 REV	<i>glh-4</i>	GGAATTCTTGCTTTCTTGATACCATTC GGGGTACCCTAAACAGCACAGTTTG	58	427
CED-9 FOR CED-9 REV	<i>ced-9</i>	CGATATTCGAGAAGAAGCACG TACTTCAAGCTGAACATCATCC	50.5	481
CED-4 FOR CED-4 REV	<i>ced-4</i>	GCCGATGCCTGTTGGAGAAAA CCTATTTCAAGAAGACGCTGCTCG	59	543
CED-3 FOR (spli) CED-3 REV (spli)	<i>ced-3</i>	GAGCAAGATCTCGTTCTCGATCG GTCGAAAACACGGCTTATGGTTG	57	247
LIN-35F(EcoR1) LIN-35R(BglII)	<i>lin-35</i>	CGGAATTCGGTGATAATTAACACTCGTACTC GAAGATCTTCTCGTTTTTCTTTTTGTGGAC	61	496
DPL-1 FOR DPL-1 REV	<i>dpl-1</i>	TCTATGAACCTCTCACAAGCCCAA AGACAACCTCTCTGTTGCACTTGATG	55	544
EFL-1 FOR EFL-1 REV	<i>efl-1</i>	GGCACACAAGTTCGGCTCAGTG CATCATCATTGATCGTCCGCCG	60	241
EFL-2 FOR EFL-2 REV	<i>efl-2</i>	GTCAAATCTCACGCGTTGCTCTT GTTTCCAAATCCTCGGTATCAATT	55.5	220

4.12 Detección de proteínas mediante ensayos tipo Western Blot

Para realizar el Western blot, 100 animales adultos de un día de los diferentes fondos genéticos y condiciones utilizadas se colectaron en 10 μ l de PBS 1X, 2.4 μ l de amortiguador de carga para proteínas (ANEXO 1) y 2.4 μ l de DTT 1M. Posteriormente, las muestras se incubaron 5 minutos a 95°C para lisar a los animales y se congelaron a -70°C o se utilizaron inmediatamente. Las muestras se centrifugaron 30 s en la nanofuga y se cargaron en un gel estándar de poliacrilamida al 10% para detectar las proteínas CED-3, CED-4, CED-9 y al 8% para LIN-35. Las muestras se dejaron migrar durante 1 h aproximadamente (se dejó salir el colorante en todos los casos con excepción de cuando se quería detectar a CED-9. En ese caso la electroforesis se detuvo cuando al colorante le faltaba aproximadamente 1 cm para salir). Luego se transfirieron a una membrana de nylon Immobilon-P PVDF (Millipore) mediante procedimientos estándares. La membrana se bloqueó durante 1 h en una solución de leche (Svelty Lactofibras) al 5% en TBS-tween 20 0.1%. Luego se incubó toda la noche con el anticuerpo primario. Después de eso la membrana se lavó 5 veces con TBS 1X-tween 20 0.1% en agitación constante a 4°C y posteriormente se incubó con el anticuerpo secundario durante una hora. Para retirar el exceso de anticuerpo secundario las membranas se lavaron 4 veces con TBS 1X-tween 20 0.1% en agitación constante a 4°C. El primer lavado consistió en agregar el TBS agitar vigorosamente con la mano y desechar el líquido, los lavados posteriores tuvieron agitación constante durante 5 minutos a 4°C. Los anticuerpos secundarios utilizados estaban acoplados a HRP. El kit Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce) se usó para detectar la señal del anticuerpo secundario. Para la cuantificación de las bandas se utilizó el software ImageJ. Los anticuerpos primarios y secundarios utilizados para incubar las membranas se describen en la Tabla 5.

Tabla 5. Anticuerpos y diluciones utilizadas para los ensayos tipo Western blot

Proteína detectada	Anticuerpo primario	Dilución	Anticuerpo secundario	Dilución
α -tubulina	α -tubulina	1:1000	anti-ratón	1:1000
CED-9	CED-9 ce-280: sc-33737 (Santa Cruz Biotechnology)	1:500	anti-conejo	1:1000
CED-4	CED-4 Cn-21: sc-9193 (Santa Cruz Biotechnology)	1:750	anti-cabra (Santa Cruz Biotechnology)	1:10000
CED-3	CED-3 Cc-20:sc-9192 (Santa Cruz Biotechnology)	1:500	anti-cabra (Santa Cruz Biotechnology)	1:10000
LIN-35	LIN-35 cN-18:sc-9273 (Santa Cruz Biotechnology)	1:500	anti-cabra (Santa Cruz Biotechnology)	1:10000

4.13 Detección de la expresión de proteínas en tejidos mediante inmunotinciones

Para determinar si los genes en estudio afectan la formación de gránulos en la gónada de *C. elegans* se disecaron animales adultos RNAi y control (PV) para cada uno de los genes estudiados, tanto en condiciones control como en organismos sometidos a 6 h de ayuno.

Primero, se disecaron los animales sobre un cubreobjetos con 30 μ l de M9 1X para obtener gónadas completas mediante un corte con agujas a nivel de la cabeza, el cubreobjetos se coloca sobre un portaobjetos previamente tratado con Polilisina (15 μ l de polilisina fueron esparcidos sobre el portaobjetos formando una capa delgada, los portaobjetos fueron calentados 20 min en el termoblock (Eppendorf) en el nivel 3) y las muestras se sumergen en nitrógeno líquido para posteriormente realizar la técnica denominada “freeze crack” en la cual se arranca el cubreobjetos el cual lleva parte de la cutícula del animal abriendo así la muestra.

Posteriormente las muestras se deshidrataron sumergiéndolas en metanol a -20°C por un minuto; después, se lavaron con PBT (PBS 1X + 0.5% de tween) dos veces. y se fijaron durante 30 minutos en una solución de PBS 1X, paraformaldehído al 3.7%, EGTA 0.8 mM, MgSO_4 1.6 mM y HEPES 80 mM. Una vez que las gónadas se fijaron las

muestras fueron bloqueadas con una solución compuesta de 2 ml de PBT, 0.9 ml de Suero de cabra (NGS) y 0.12 ml de azida de sodio (0.5%) durante 2 h. Luego de ser bloqueadas las placas se lavaron una vez más con PBT por 10 minutos y se incubaron con el anticuerpo primario CGH-1 (1:25) y DAPI (1 ng μl^{-1}) en una cámara húmeda durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente se lavaron con PBT y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-rata (1:100) (Jackson ImmunoResearch Laboratories) durante 2 h a temperatura ambiente. Las muestras fueron montadas en medio vectashield (Vector Laboratories) para analizarlas. Finalmente se cubrió la muestra con un cubreobjetos y se sellaron los extremos con barniz para uñas, para evitar la deshidratación de la muestra y poder observarla bajo microscopia de fluorescencia.

4.12 Microscopía, procesamiento de imágenes y estadística

Para la microscopia de fluorescencia y Nomarski se utilizó el microscopio Nikon Eclipse E600. Las fotografías fueron tomadas con una cámara AxioCam MRc de ZEISS. Todas las imágenes fueron procesadas de la misma manera para mejorar su brillo y contraste usando el programa ImageJ. Para el análisis estadístico se utilizaron los programas estadísticos R versión 2.4.0 y GraphPad Prism versión 5.01.

V RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO 1: El papel de los genes que codifican para proteínas que se asocian con gránulos de RNA en la apoptosis de las células germinales de *C. elegans*. En este capítulo se describen los niveles de apoptosis obtenidos como resultado del silenciamiento de los genes *cgh-1*, *cey-2*, *glh-4*, *spn-4*, *oma-1*, *nos-2*, *pgl-1*, *car-1*, *mex-5* e *ife-1* en condiciones normales y bajo diferentes tipos de estrés (ayuno, estrés osmótico, estrés oxidativo, choque de calor).

CAPÍTULO 2: El papel de los genes que codifican para proteínas que se asocian con gránulos de RNA en la formación de gránulos. En este capítulo se describe la formación de gránulos de CGH-1 como resultado del silenciamiento de los genes: *cey-2*, *glh-4*, *spn-4*, *oma-1*, *nos-2*, *pgl-1*, *car-1*, *mex-5* e *ife-1* bajo condiciones normales y de ayuno.

CAPÍTULO 3: Mecanismo de inducción de apoptosis durante el ayuno. En este capítulo se describe el mecanismo de inducción de apoptosis por ayuno mediante el análisis de la expresión de los genes que componen la maquinaria de apoptosis así como algunos de sus principales reguladores.

CAPÍTULO 4: Participación de la proteína GLA-3 en el mecanismo de inducción de apoptosis durante el ayuno. En este capítulo se analiza la participación de la proteína GLA-3 en la regulación de la maquinaria de apoptosis durante el ayuno y los niveles de traducción en ausencia de dicha proteína.

CAPÍTULO 1: El papel de los genes que codifican para proteínas que se asocian con gránulos de RNA en la apoptosis de las células germinales de *C. elegans*

5.1.1 Análisis de los genes obtenidos a partir de un microarreglo

Previo al inicio de este trabajo de tesis y con el propósito de encontrar genes reguladores de la apoptosis inducida por ayuno, en el laboratorio se realizó un análisis de microarreglos en el cual se compararon animales silvestres (N2) hermafroditas adultos de 1 día crecidos a 20°C bien alimentados con animales sometidos a 6 h de ayuno (sin bacterias). Para la realización del microarreglo se extrajo RNA total de ambos grupos de animales y dichas muestras fueron enviadas a la Unidad de Microarreglos del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, en donde se llevó a cabo el ensayo de microarreglos. Los microarreglos contenían genes exclusivos o enriquecidos en la línea germinal [108]. En este experimento de microarreglos se encontraron 321 genes cuya expresión se altera cuando los animales son sometidos a 6 h de ayuno, de los cuales 154 aumentan su expresión y 167 la disminuyen [88].

De los genes encontrados se seleccionaron algunos para continuar su estudio por medio de un análisis tomando en cuenta las siguientes características:

- 1) Que tuvieran un valor de Z-score mayor a 2 o menor a (-2). (Bajo este criterio se seleccionaron 98 genes).
- 2) Su posible función y/o los dominios conocidos que presentan sus proteínas.

El análisis de los genes obtenidos en base a la función celular en la que participan y los dominios que presentan sugiere que la mayoría de genes que mostraron una expresión diferencial en condiciones de ayuno participan en el metabolismo de ácidos nucleicos y de manera particular en el metabolismo del RNA. Además encontramos que el porcentaje de

genes que juegan un papel en la apoptosis, previamente descrito, es bajo, lo que sugiere que la apoptosis en la línea germinal puede tener reguladores específicos aun no descritos.

El motivo principal del análisis de los genes obtenidos en el microarreglo era establecer un orden de importancia para iniciar el escrutinio mediante RNAi. Una vez realizado el análisis seleccionamos un grupo de genes para estudiarlos. Los genes seleccionados disminuyen sus niveles de expresión durante el ayuno y codifican para proteínas que se asocian a gránulos de RNA (*cgh-1*, *cey-2*, *glh-4*, *spn-4*, *oma-1*, *nos-2*, *pgl-1*, *car-1*, *mex-5* e *ife-1*). Los gránulos de RNA son estructuras ribonucleoproteicas no membranosas que han sido implicados de manera importante en la regulación postranscripcional. Existen diferentes clases de gránulos de RNA, los cuales comparten componentes y pueden utilizar mecanismos similares para regular a los RNAs que contienen. Entre ellos encontramos a los gránulos germinales, los cuerpos de procesamiento y los gránulos de estrés [65] cuyas características principales han sido descritas en la introducción de este trabajo. Algunas proteínas que son componentes de gránulos de RNA se han visto involucradas en la inducción de apoptosis [99, 109, 110] por lo que estos genes representan un grupo interesante de estudiar. En el ANEXO 2 se presenta una breve descripción de la función de todos los candidatos a estudiar.

Para probar el papel que juegan los genes seleccionados en la apoptosis se realizó un escrutinio por RNAi. Este escrutinio consistió en dos pasos: el primero consistió en contar el número de cuerpos apoptóticos de animales RNAi en condiciones normales de crecimiento con el fin de evaluar efectos en la apoptosis fisiológica. El segundo consistió en someter a los animales RNAi a diferentes condiciones de estrés y posteriormente cuantificar los niveles de apoptosis.

5.1.2 Escrutinio por RNAi.

5.1.2.1 Escrutinio para encontrar genes que participan en la regulación de la apoptosis fisiológica.

Para analizar los niveles de apoptosis se utilizó la cepa reportera CED-1:GFP, la cual nos permite identificar los cuerpos apoptóticos mediante fluorescencia [62]. Los cuerpos apoptóticos de animales adultos de 1 día de la cepa silvestre (control Plásmido vacío; PV) se compararon con los de animales de la misma edad que carecen del gen en estudio (RNAi). Los niveles de inducción de apoptosis fueron calculados dividiendo el promedio de cuerpos apoptóticos en animales RNAi entre el número de cuerpos apoptóticos de animales control (PV).

El grupo de genes que codifican para proteínas que se asocian con gránulos de RNA encontrados en el microarreglo incluye 11 genes. De estos, siete se encontraban clonados en la biblioteca de RNAi de *C. elegans* (Open Biosystems), los 4 genes restantes se clonaron como se describe en la metodología. Cabe mencionar que incluimos al gen *hsp-1*, el homólogo de la proteína de choque de calor Hsp70 en mamíferos, la cual a pesar de no formar parte de estos gránulos se sabe que participa regulando su formación [111].

El silenciamiento de los genes *pgl-1*, *car-1*, *cey-2*, *cgh-1*, *mex-5*, *hsp-1* y *gla-3* incrementó los niveles de apoptosis de dos a cinco veces comparados con el control (Tabla 6, Figura 8A). El mayor incremento en el número de cuerpos apoptóticos fue observado en los animales tratados con RNAi para el gen *gla-3*. En este caso el número de cuerpos apoptóticos se incrementó de un promedio de aproximadamente 6 cuerpos apoptóticos observados en el control hasta un promedio de 29 cuerpos apoptóticos. Como un control del buen funcionamiento de nuestro sistema corroboramos que los animales tratados con RNAi para los genes *car-1*, *cgh-1* y *gla-3* incrementan significativamente los niveles de apoptosis

fisiológica [99, 109, 110]. En este estudio encontramos que el silenciamiento de los genes *cey-2*, *mex-5*, y *pgl-1* provoca un incremento entre dos y cinco veces en el número de cuerpos apoptóticos observados.

Sin embargo el silenciamiento de los genes *oma-1*, *spn-4*, *ife-1*, *glh-4* y *nos-2* mostró un incremento modesto en el número de cuerpos apoptóticos presentando niveles de inducción de 1.4 a 1.6 (Tabla 6, Figura 8B). El hecho de que el tratamiento con RNAi para determinado gen incremente la apoptosis fisiológica sugiere que este gen podría participar de manera directa o indirecta en la apoptosis. Sin embargo, es de llamarse la atención que en ningún caso el silenciamiento de los genes estudiados mostró una disminución en el número de cuerpos apoptóticos con respecto al control.

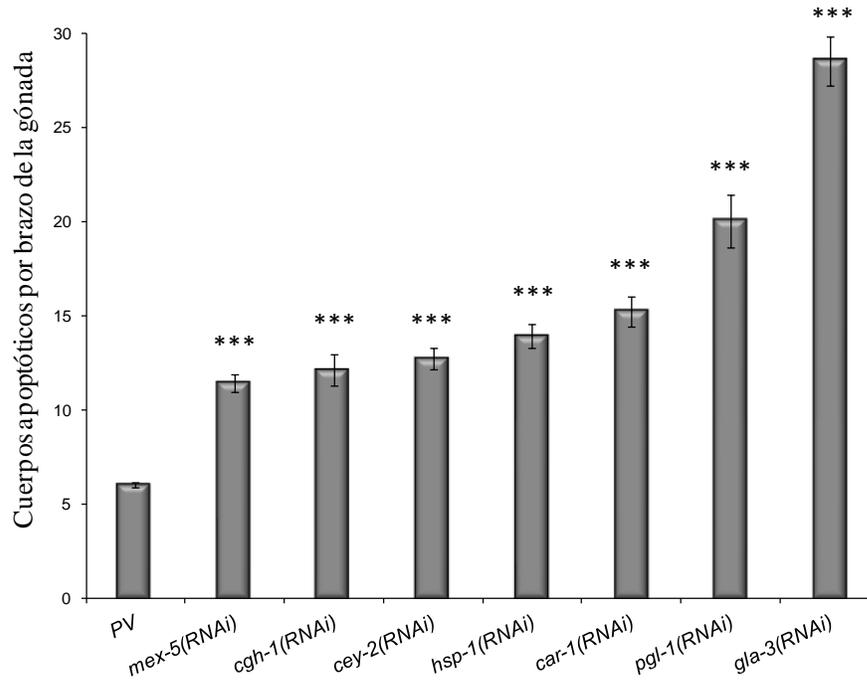
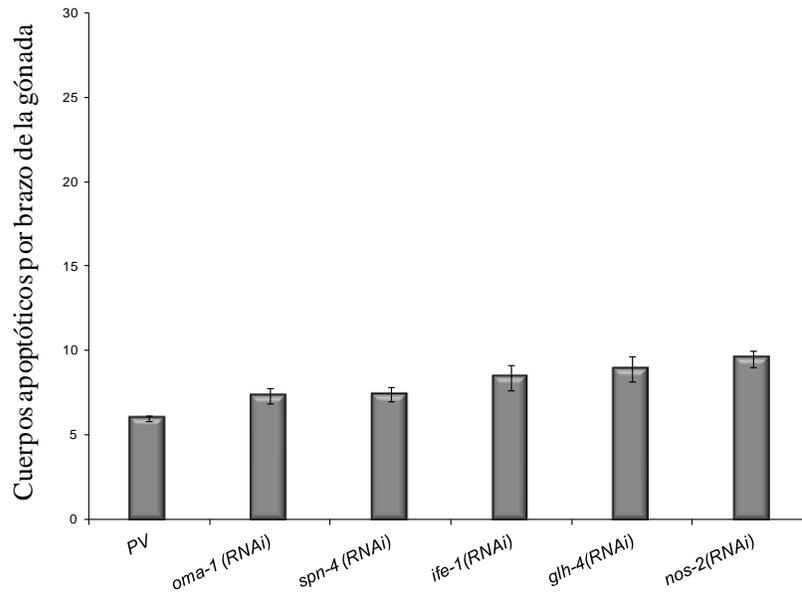
A**B**

Figura 8. El silenciamiento en los genes *pgl-1*, *car-1*, *cey-2*, *cgh-1*, *mex-5*, *hsp-1* y *gla-3* aumenta la apoptosis fisiológica de las células germinales. A y B) Los niveles de apoptosis fisiológica fueron evaluados en animales adultos de un día con la cepa *ced-1::gfp*, crecidos a 24°C mediante microscopia de fluorescencia. Las barras indican el número de cuerpos apoptóticos observados en los diferentes genes estudiados. Los datos son representativos de dos experimentos independientes con una n de por lo menos 20 gónadas para cada uno (Tabla 6). Se muestran las barras de error. Los *** indican significancia estadística $P < 0.0001$. El valor P se obtuvo del análisis con una prueba *t* Mann Whitney. A) El silenciamiento de estos genes eleva la apoptosis fisiológica de 2 a 5 veces comparada con el control. B) El silenciamiento de estos genes no eleva la apoptosis de manera significativa.

Tabla 6 Apoptosis fisiológica obtenida al silenciar los genes de estudio. Cada promedio de cuerpos apoptóticos está acompañado de su desviación estándar y la cifra entre paréntesis indica el número de gónadas analizadas. El nivel de inducción es el resultado de la división de la cantidad de cuerpos apoptóticos observados en el RNAi de cada gen entre el control (PV). El valor P se obtuvo del análisis con una prueba t Mann Whitney. PV= plásmido vacío.

	Gen	Promedio de cuerpos apoptóticos	Nivel de Inducción	Valor P
	PV(RNAi)	6 ± 2.1 (209)	---	---
1	<i>mex-5(RNAi)</i>	11.4± 2.5 (30)	2	< 0.0001
2	<i>cgh-1(RNAi)</i>	12.1± 4.3 (20)	2	< 0.0001
3	<i>cey-2(RNAi)</i>	12.7± 3.5 (39)	2.1	< 0.0001
4	<i>hsp-1(RNAi)</i>	13.9± 3.3 (29)	2.3	< 0.0001
5	<i>car-1(RNAi)</i>	15.2± 4.6 (33)	2.53	< 0.0001
6	<i>pgl-1(RNAi)</i>	20± 7.8 (34)	3.3	< 0.0001
7	<i>gla-3(RNAi)</i>	28.5± 7.5 (35)	4.8	< 0.0001
8	<i>oma-1(RNAi)</i>	7.3± 2.0 (22)	1.2	0.0060
9	<i>spn-4(RNAi)</i>	7.4± 1.8 (20)	1.2	0.0016
10	<i>ife-1(RNAi)</i>	8.4± 3.0 (18)	1.4	0.0004
11	<i>glh-4(RNAi)</i>	8.9± 3.1 (19)	1.5	< 0.0001
12	<i>nos-2(RNAi)</i>	9.5± 2.2 (21)	1.5	0.1840

5.1.2.2 Escrutinio para encontrar genes involucrados en la apoptosis inducida por ayuno

Para analizar si los genes de estudio participan en la apoptosis inducida por ayuno, se hizo una comparación de los cuerpos apoptóticos presentes en individuos RNAi en dos condiciones; animales bien alimentados contra animales sometidos a 6 h de ayuno. El Nivel de Inducción (NI) fue calculado dividiendo el promedio de cuerpos apoptóticos en animales RNAi sometidos a ayuno de 6 h entre el número de cuerpos apoptóticos de animales RNAi alimentados normalmente.

Bajo condiciones normales de alimentación los animales *ced-1::GFP;PV(RNAi)* presentan un promedio de 6 ± 2.1 cuerpos apoptóticos por brazo de la gónada, cuando son sometidos al ayuno de 6 h el número de cuerpos apoptóticos se incrementa a 13.1 ± 4.3 lo que representa un nivel de inducción de apoptosis de 2.2 veces (Tabla 7). En contraste los animales *hsp-1 (RNAi)*, *pgl-1(RNAi)*, *cgh-1(RNAi)* y *gla-3 (RNAi)* no incrementan la apoptosis de células germinales como resultado de la privación de alimento (niveles de inducción 0.9, 0.8, 0.9 y 1.1 respectivamente)

(Figura 9A Tabla 7), lo que sugiere que dichos genes son requeridos para la inducción de este tipo de muerte. Por otro lado observamos que los animales *mex-5(RNAi)*, *car-1(RNAi)*, y *cey-2(RNAi)* mostraron un pequeño incremento en la apoptosis inducida por ayuno, obteniendo niveles de inducción de 1.3, 1.2 y 1.3 respectivamente (Tabla 7, Figura 9A).

Los genes *oma-1*, *glh-4*, *nos-2* e *ife-1* los cuales no participan en la inducción de apoptosis fisiológica (Figura 8B) tampoco participan en la inducción de apoptosis por ayuno. Animales *oma-1(RNAi)*, *glh-4(RNAi)*, *nos-2(RNAi)* e *ife-1(RNAi)* responden al ayuno elevando el número de cuerpos apoptóticos en la gónada alcanzando niveles parecidos a los del control (Tabla 7, Figura 9B).

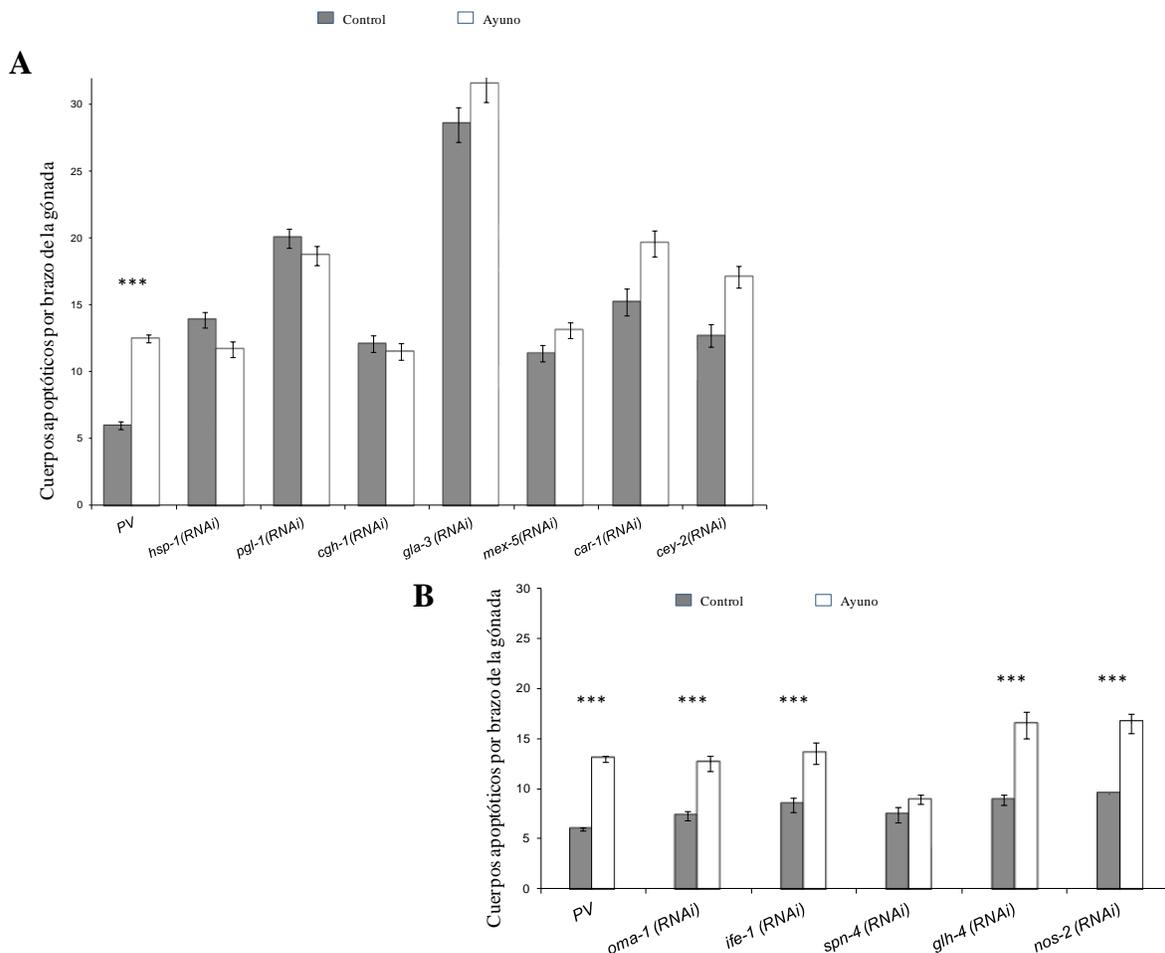


Figura 9. Los genes *pgl-1*, *cgh-1*, *hsp-1*, *gla-3* y *spn-4* se requieren para inducir apoptosis en ayuno. A y B. Los niveles de apoptosis fueron evaluados mediante microscopía de fluorescencia en animales adultos de

un día con la cepa *ced-1::gfp*, crecidos a 24° C. Las gráficas muestran una comparación cuantitativa de la apoptosis de un brazo de la gónada. Los datos son representativos de dos experimentos independientes (Ver Tabla 7). Las barras grises indican el RNAi del gen en animales bien alimentados y las barras blancas indican el RNAi del gen en animales sometidos a 6 h de ayuno. A) Genes que se requieren parcial o totalmente para la inducción de apoptosis por ayuno. B) Genes que no se requieren para la inducción de apoptosis por ayuno. Los *** indican significancia estadística. P< 0.0001. El valor P se obtuvo del análisis con una prueba *t* Mann Whitney.

Tabla 7 Promedio de cuerpos apoptóticos observados mediante RNAi en condiciones de control y ayuno. Como control en cada gen se utilizaron los datos obtenidos de animales (RNAi) alimentados. Cada promedio de cuerpos apoptóticos está acompañado de su desviación estándar y la cifra entre paréntesis indica el número de individuos analizados. El nivel de inducción es el resultado de la división de la cantidad de cuerpos apoptóticos observados en ayuno entre los cuerpos apoptóticos contados en gónadas de animales alimentados. El valor P se obtuvo del análisis con una prueba *t* Mann Whitney. PV= plásmido vacío.

	Gen	Control	Ayuno	Nivel de Inducción	Valor P
	PV(RNAi)	6 ± 2.1 (209)	13.1 ± 4.3 (189)	2.2	< 0.0001
1	<i>hsp-1(RNAi)</i>	13.9± 3.3 (29)	11.7± 3.2 (31)	0.8	0.0098
2	<i>pgl-1(RNAi)</i>	20± 7.8 (34)	18.7± 3.9 (33)	0.9	0.9012
3	<i>cgh-1(RNAi)</i>	12.1± 4.3 (20)	11.5± 2.9 (23)	0.9	0.6694
4	<i>gla-3(RNAi)</i>	28.5± 7.5 (35)	31.5± 5.8 (23)	1.1	0.8870
5	<i>mex-5(RNAi)</i>	11.4± 2.5 (30)	13.1± 3.3 (32)	1.1	0.0203
6	<i>car-1(RNAi)</i>	15.2± 4.6 (33)	19.6± 5.1 (30)	1.3	0.0006
7	<i>cey-2(RNAi)</i>	12.7± 3.5 (39)	16.6± 4.1 (32)	1.3	0.0001
8	<i>oma-1(RNAi)</i>	7.3± 2.0 (22)	12.5± 3.6 (25)	1.7	< 0.0001
9	<i>ife-1(RNAi)</i>	8.4± 3.0 (18)	13.5± 4.5 (23)	1.6	< 0.0001
10	<i>spn-4(RNAi)</i>	7.4± 1.8 (20)	8.9± 2.2 (23)	1.2	0.0393
11	<i>glh-4(RNAi)</i>	8.9± 3.1 (19)	16.3± 5.5 (22)	1.8	< 0.0001
12	<i>nos-2(RNAi)</i>	9.5± 2.2 (21)	16.5± 4.2 (17)	1.7	< 0.0001

5.1.2.3 Escrutinio para encontrar genes que participan en la regulación de la apoptosis por diferentes tipos de estrés

Para analizar si los genes de estudio además de requerirse para inducir apoptosis por ayuno participan en la inducción de apoptosis por otros tipos de estrés se realizaron los siguientes experimentos. Las condiciones de estrés utilizadas fueron estrés osmótico, estrés oxidativo y choque de calor. Los tratamientos de estrés osmótico y oxidativo consistieron en colocar animales adultos de 1 día de la cepa *ced-1::gfp* control (PV) o RNAi en medio M9 1X que contenía 70 mM de NaCl (estrés osmótico) o 10 mM de paraquat (metil viológeno diclorídrico dihidratado -estrés oxidativo-); el choque de calor consistió en exponer a los animales control (PV) o RNAi a una

temperatura de 31°C durante 3 h. Luego de cada tratamiento se realizó el conteo de cuerpos apoptóticos utilizando microscopia de fluorescencia.

En condiciones de estrés osmótico los animales control *ced-1::GFP/PV(RNAi)* muestran un incremento de 1.8 veces el número de cuerpos apoptóticos observados en la gónada del gusano (Tabla 8). Sin embargo los animales RNAi para los genes *car-1*, *cey-2*, *mex-5*, *pgl-1*, *cgh-1*, *nos-2*, *gla-3* e *ife-1* no presentan dicho incremento sugiriendo con ello que son requeridos para la inducción de apoptosis por este tipo de estrés (Figura 10). Inclusive el silenciamiento de los genes *mex-5* e *ife-1* indujo una reducción importante en los niveles de apoptosis cuando los animales fueron sometidos a condiciones de estrés osmótico (Figura 10 y Tabla 8).

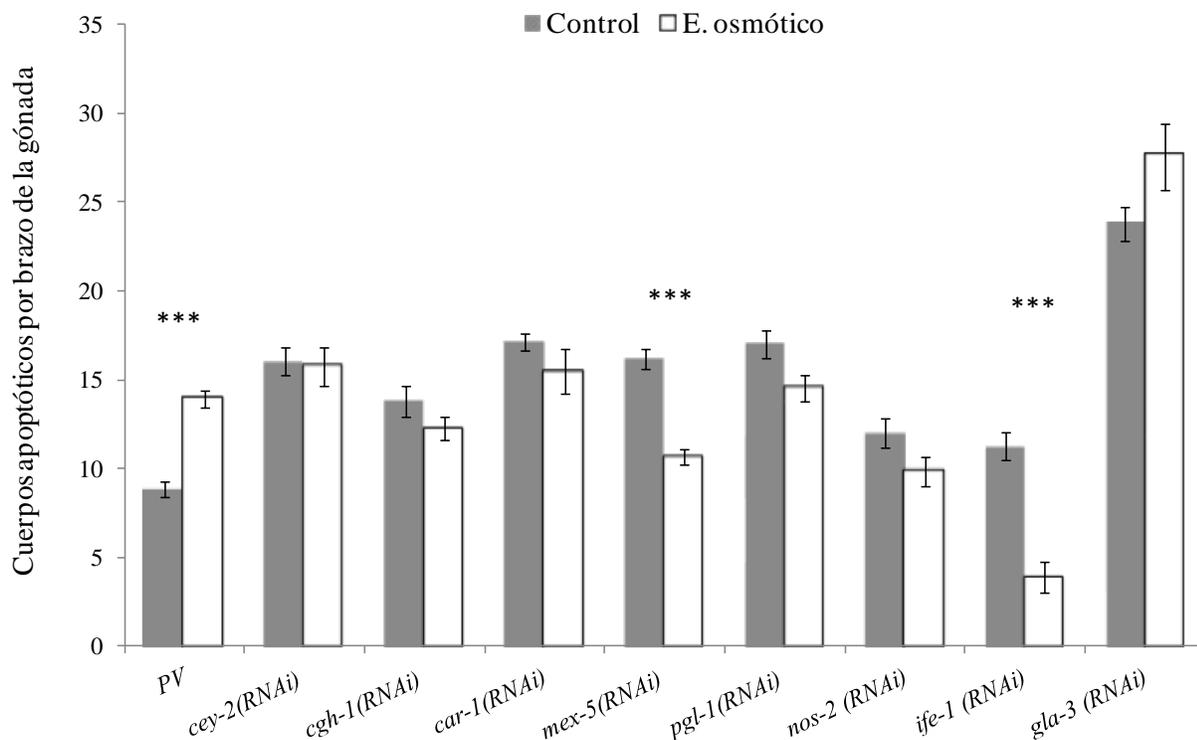


Figura 10. Los genes *cey-2*, *cgh-1*, *car-1*, *mex-5*, *pgl-1*, *nos-2*, *gla-3* e *ife-1* son requeridos para inducir apoptosis de las células germinales en condiciones de estrés osmótico. Para evaluar si los genes estudiados se requieren para inducir apoptosis en condiciones de estrés osmótico se utilizaron animales adultos de 1 día de la cepa *ced-1::gfp* crecidos a 24°C y luego incubados por 1 h en amortiguador M9 sin tratamiento (barras grises) o en amortiguador M9 con 70mM de NaCl (barras blancas). Tras la incubación los animales fueron transferidos a cajas con medio NGM y comida, para permitir que se recuperaran durante 1 h a 24°C, luego fueron montados y observados con microscopia de fluorescencia. Las gráficas muestran una comparación cuantitativa de la apoptosis por brazo de la gónada. Las barras indican el promedio de cuerpos

apoptóticos obtenidos en cada condición. Los resultados provienen de dos experimentos independientes (Veáse Tabla 8). Se indican las barras de error. Los *** indican significancia estadística. $P < 0.0001$. El valor P se obtuvo del análisis con una prueba *t* Mann Whitney.

En condiciones de estrés oxidativo los animales control *ced-1::GFP/PV(RNAi)* muestran un incremento de 1.6 veces el número de cuerpos apoptóticos (Tabla 9). Sin embargo los animales RNAi para los genes *cgh-1*, *cey-2*, *pgl-1*, *mex-5*, *nos-2* e *ife-1* no presentan dicho incremento sugiriendo con ello que son requeridos para la inducción de apoptosis por este tipo de estrés. Un dato interesante es que el gen *car-1* parece ser parcialmente requerido para inducir apoptosis en condiciones de estrés oxidativo (Figura 11). Al igual que en el caso del estrés osmótico, animales *mex-5* e *ife-1(RNAi)* mostraron una reducción en el número de cuerpos apoptóticos cuando fueron sometidos a condiciones de estrés oxidativo.

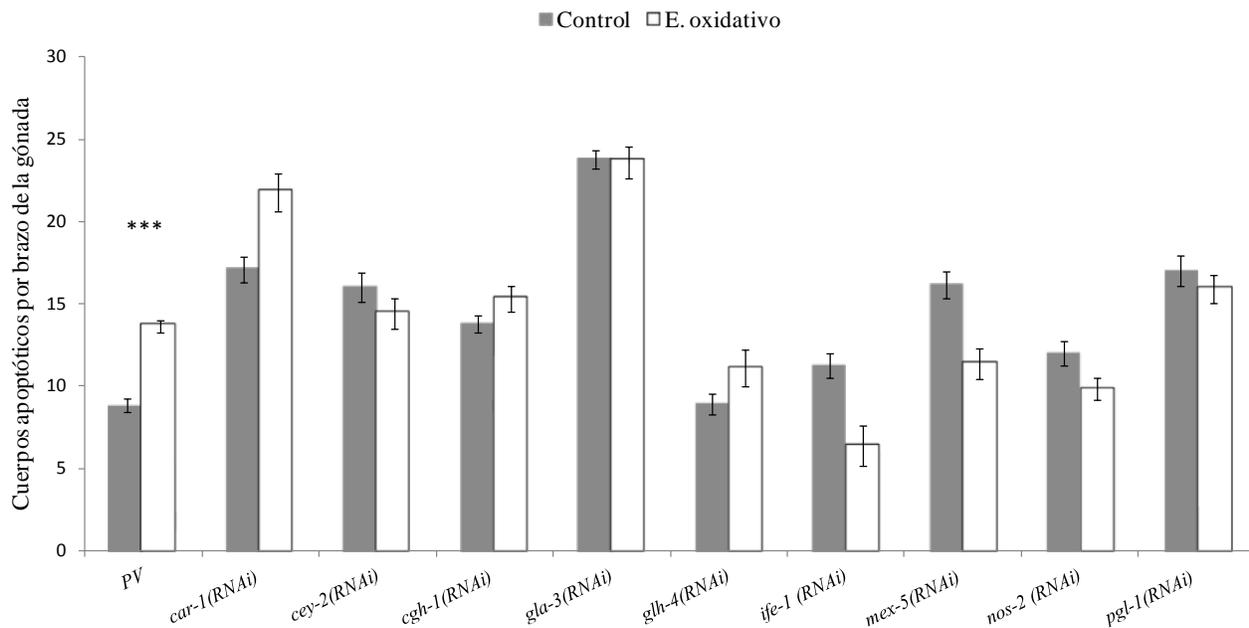


Figura 11. Los genes *cey-2*, *cgh-1*, *gla-3*, *glh-4*, *ife-1*, *mex-5*, *nos-2* y *pgl-1* son requeridos para inducir apoptosis de las células germinales en condiciones de estrés oxidativo. Para evaluar si los genes estudiados se requieren para inducir apoptosis en condiciones de estrés oxidativo se utilizaron animales adultos de 1 día de la cepa *ced-1::gfp* crecidos a 24°C y luego incubados por 1 h en amortiguador M9 sin tratamiento (barras grises) o en amortiguador M9 con 10 mM de Paraquat (barras blancas). Tras la incubación los animales fueron transferidos a cajas con medio NGM y comida, para permitir que se recuperaran durante 1 h a 24°C, luego fueron montados y observados con microscopia de fluorescencia. Las gráficas muestran una comparación cuantitativa de la apoptosis por brazo de la gónada. Las barras indican el

promedio de cuerpos apoptóticos obtenidos en cada condición. Los resultados provienen de dos experimentos independientes (Veáse Tabla 9). Se indican las barras de error. Los *** indican significancia estadística. $P < 0.0001$. El valor P se obtuvo del análisis con una prueba *t* Mann Whitney.

Tabla 8 Promedio de cuerpos apoptóticos observados mediante RNAi en condiciones de estrés osmótico. Cada promedio de cuerpos apoptóticos está acompañado de su desviación estándar y la cifra entre paréntesis indica el número de individuos analizados. El nivel de inducción es el resultado de la división de la cantidad de cuerpos apoptóticos observados en condiciones de estrés osmótico entre los cuerpos apoptóticos contados en gónadas de animales alimentados. El valor P se obtuvo del análisis con una prueba *t* Mann Whitney. PV= plásmido vacío. La descripción de la realización del experimento se indica en la Figura 10.

	Gen	Control	Estrés osmótico	Nivel de Inducción	Valor P
	PV(RNAi)	8.8 ± 4.2 (98)	13.9 ± 4.7 (110)	1.6	< 0.0001
1	<i>cey-2(RNAi)</i>	16 ± 5.3 (38)	15.75 ± 6.1 (33)	1	0.3696
2	<i>cgh-1(RNAi)</i>	13.8 ± 2.3 (23)	12.25 ± 2.8 (20)	0.9	0.0536
3	<i>car-1(RNAi)</i>	17.1 ± 4.7 (37)	15.46 ± 7.1 (32)	0.9	0.0133
4	<i>mex-5(RNAi)</i>	16.18 ± 3.8 (24)	10.66 ± 2.0 (21)	0.7	< 0.0001
5	<i>pgl-1(RNAi)</i>	17 ± 5.7 (39)	14.53 ± 4.9 (42)	0.9	0.0140
6	<i>nos-2(RNAi)</i>	12 ± 3.1 (16)	9.9 ± 3.2 (16)	0.8	0.0627
7	<i>ife-1(RNAi)</i>	11.26 ± 2.9 (15)	3.9 ± 2.8 (10)	0.3	< 0.0001
8	<i>gla-3(RNAi)</i>	23.79 ± 6.3 (34)	27.56 ± 7.5 (16)	1.2	0.0679

Tabla 9 Promedio de cuerpos apoptóticos observados mediante RNAi en condiciones de estrés oxidativo. Cada promedio de cuerpos apoptóticos está acompañado de su desviación estándar y la cifra entre paréntesis indica el número de individuos analizados. El nivel de inducción es el resultado de la división de la cantidad de cuerpos apoptóticos observados en condiciones de estrés oxidativo entre los cuerpos apoptóticos contados en gónadas de animales alimentados. El valor P se obtuvo del análisis con una prueba *t* Mann Whitney. PV= plásmido vacío. La descripción de la realización del experimento se indica en la Figura 11.

	Gen	Control	Estrés oxidativo	Nivel de Inducción	Valor P
	PV(RNAi)	8.8 ± 4.2 (98)	13.6 ± 3.8 (119)	1.6	< 0.0001
1	<i>car-1(RNAi)</i>	17.1 ± 4.7 (37)	21.7 ± 6.2 (29)	1.3	0.0008
2	<i>cey-2(RNAi)</i>	16 ± 5.3 (38)	14.4 ± 5.2 (33)	0.9	0.1825
3	<i>cgh-1(RNAi)</i>	13.8 ± 2.3 (23)	15.31 ± 3.6 (21)	1.1	0.1648
4	<i>gla-3(RNAi)</i>	23.79 ± 6.3 (34)	23.62 ± 5.6 (35)	1	0.8851
5	<i>glh-4(RNAi)</i>	8.9 ± 2.4 (15)	11.14 ± 4.2 (15)	1.3	0.1665
6	<i>ife-1(RNAi)</i>	11.26 ± 2.9 (15)	6.4 ± 3.9 (10)	0.6	0.0031
7	<i>mex-5(RNAi)</i>	16.18 ± 3.8 (24)	11.35 ± 4.1 (22)	0.7	0.0001
8	<i>nos-2(RNAi)</i>	12 ± 3.1 (16)	9.8 ± 2.3 (12)	0.8	0.0551
9	<i>pgl-1(RNAi)</i>	17 ± 5.7 (39)	15.9 ± 5.4 (43)	0.9	0.2567

En condiciones de choque de calor los animales control *ced-1::GFP/PV(RNAi)* muestran un incremento de 1.9 veces el número de cuerpos apoptóticos observados (Tabla 10). Sin embargo los animales RNAi para los genes *cey-2*, *pgl-1*, *car-1*, *gla-3* y *mex-5* no presentan este incremento sugiriendo con ello que son requeridos para la inducción de apoptosis por este tipo de estrés (Figura 12 A, Tabla 10). El silenciamiento de los genes *spn-4*, *ife-1*, *glh-4*, *oma-1* y *nos-2* no tuvo efecto en la respuesta de apoptosis a este tipo de estrés alcanzando niveles normales de inducción en comparación con el control (1.7 a 1.9 veces) (Figura 12B, Tabla 10).

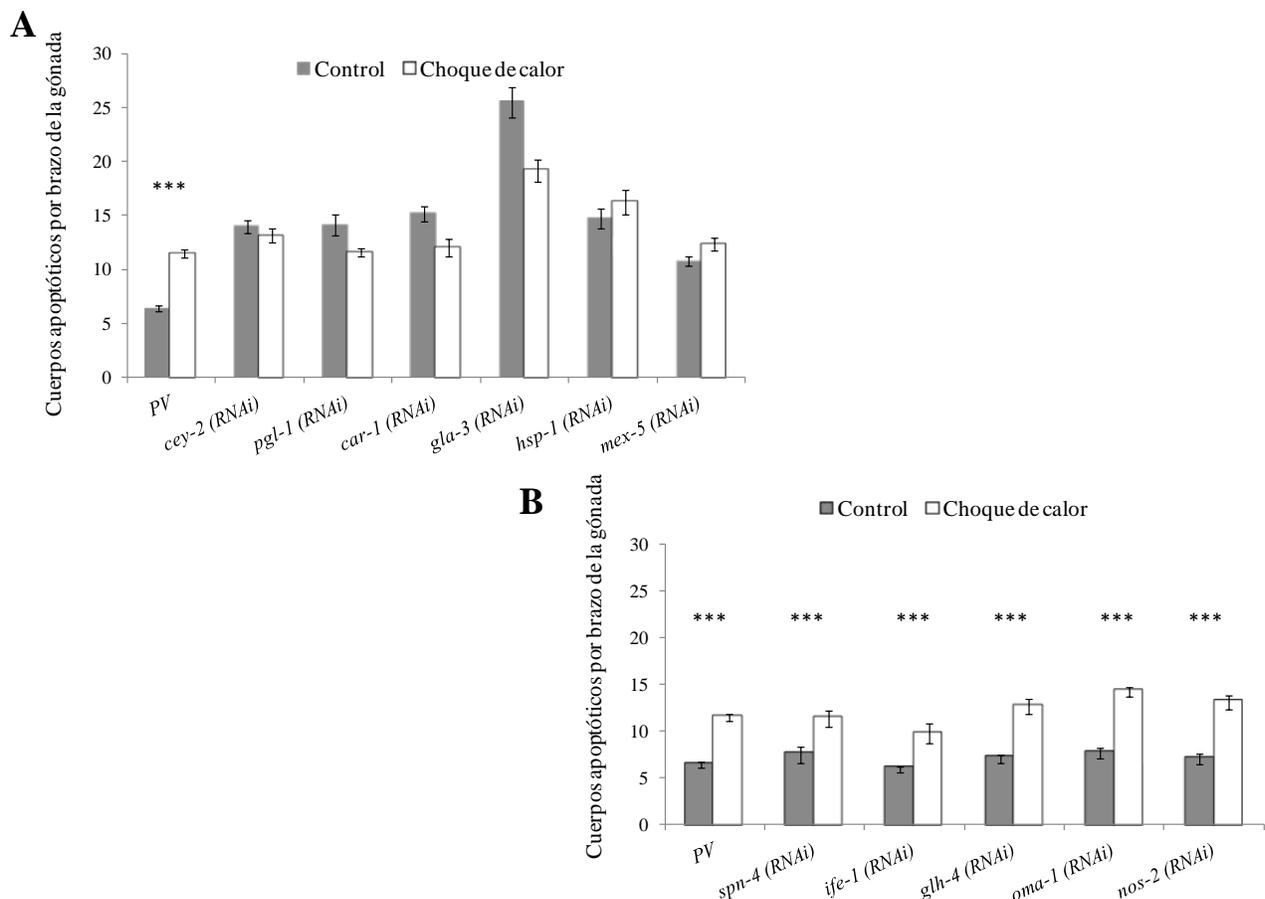


Figura 12. Los genes *cey-2*, *car-1*, *pgl-1*, *gla-3* y *mex-5* se requieren para inducir apoptosis de las células germinales en choque de calor. Se evaluó si los genes estudiados se requieren para inducir apoptosis en condiciones de choque de calor. Se utilizaron animales adultos de 1 día de la cepa *ced-1::gfp* crecidos a 24°C que fueron incubados por 3 h a 31°C en cajas con comida (choque de calor, barras blancas) o a 24°C (control, barras negras). Después de la incubación los animales fueron transferidos por 4:30 h a 24°C para permitir que se recuperaran, luego fueron montados y observados con microscopia de fluorescencia. Las gráficas muestran una comparación cuantitativa de la apoptosis por brazo de la gónada. En A) se muestran

los resultados de los genes cuyo silenciamiento no muestra una respuesta a este tipo de estrés. En B) se muestran los resultados de los genes cuyo silenciamiento no afecta la respuesta por este tipo de estrés. Las barras indican el promedio de cuerpos apoptóticos obtenidos en cada condición. Los resultados provienen de dos experimentos independientes (Véase Tabla 10). Se indican las barras de error. Los *** indican significancia estadística. $P < 0.0001$. El valor P se obtuvo del análisis con una prueba *t* Mann Whitney.

Tabla 10 Promedio de cuerpos apoptóticos observados mediante RNAi en condiciones de choque de calor. Cada promedio de cuerpos apoptóticos está acompañado de su desviación estándar y la cifra entre paréntesis indica el número de individuos analizados. El nivel de inducción es el resultado de la división de la cantidad de cuerpos apoptóticos observados en choque de calor entre los cuerpos apoptóticos contados en gónadas de animales alimentados. El valor P se obtuvo del análisis con una prueba *t* Mann Whitney. PV= plásmido vacío. La descripción de la realización del experimento se indica en la Figura 12.

	Gen	Control	Choque de calor	Nivel de Inducción	Valor P
	PV(RNAi)	6.4 ± 2.5 (70)	11.44 ± 3.2 (81)	1.8	< 0.001
1	<i>cey-2(RNAi)</i>	14 ± 3.71 (40)	13.1 ± 3.9 (38)	0.9	0.1186
2	<i>pgl-1(RNAi)</i>	14.1 ± 5.6 (34)	11.6 ± 2.3 (32)	0.8	0.0375
3	<i>car-1(RNAi)</i>	15.16 ± 3.1 (18)	12 ± 3.22 (15)	0.8	0.0119
4	<i>gla-3(RNAi)</i>	25.8 ± 8.3 (35)	19.2 ± 5.5 (30)	0.7	0.0017
6	<i>hsp-1(RNAi)</i>	14.7 ± 4.2 (20)	16.2 ± 5.1 (20)	1.1	0.3279
7	<i>mex-5(RNAi)</i>	10.8 ± 2.9 (39)	12.35 ± 3.69 (40)	1.1	0.0414
8	<i>spn-4(RNAi)</i>	7.4 ± 3.3 (16)	11.3 ± 3.3 (16)	1.5	< 0.0001
9	<i>ife-1(RNAi)</i>	5.9 ± 1.2 (15)	9.8 ± 3.6 (12)	1.7	< 0.0001
10	<i>glh-4(RNAi)</i>	7.1 ± 2.6 (34)	12.6 ± 4.8 (35)	1.8	< 0.0001
11	<i>oma-1(RNAi)</i>	7.6 ± 1.8 (10)	14.2 ± 1.8 (14)	1.9	< 0.0001
12	<i>nos-2(RNAi)</i>	7 ± 2.2 (15)	13.1 ± 2.6 (12)	1.9	< 0.0001

5.1.3 Niveles de expresión de los genes involucrados en la respuesta al ayuno.

Para evaluar los niveles de expresión de los genes en estudio se realizaron ensayos de Northern blot (*car-1*, *pgl-1*, *mex-5* y *cey-2*) (Figura 13) y RT-PCR (*gla-3*, *glh-4*, *nos-2* e *ife-1*) (Figura 14).

Los experimentos de Northern Blot se realizaron con animales crecidos a 20 y 24°C. La primer temperatura representa las condiciones utilizadas para hacer el microarreglo y la segunda es la temperatura a la cual se crece la cepa reportera *ced-1::gfp* en la cual se realiza el conteo de cuerpos apoptóticos. Además de reproducir las condiciones de obtención de RNA utilizado para el microarreglo (adultos de 1 día sometidos a 6 h de ayuno a 20°C) también se probó RNA obtenido de

animales adultos sometidos sólo a 1 h de ayuno con la finalidad de establecer que tan rápida es la respuesta del animal a estas condiciones.

En condiciones de ayuno los niveles de los RNAm de los genes *mex-5*, *pgl-1*, *car-1* y *cey-2* disminuyen entre un 50 y un 70% (Figura 13). Esta disminución fue mayor (entre 20 y 30%) a 20°C que a 24°C (Figura 13). Así mismo la disminución observada es más evidente a 6 h que a 1 h de ayuno (Figura 13).

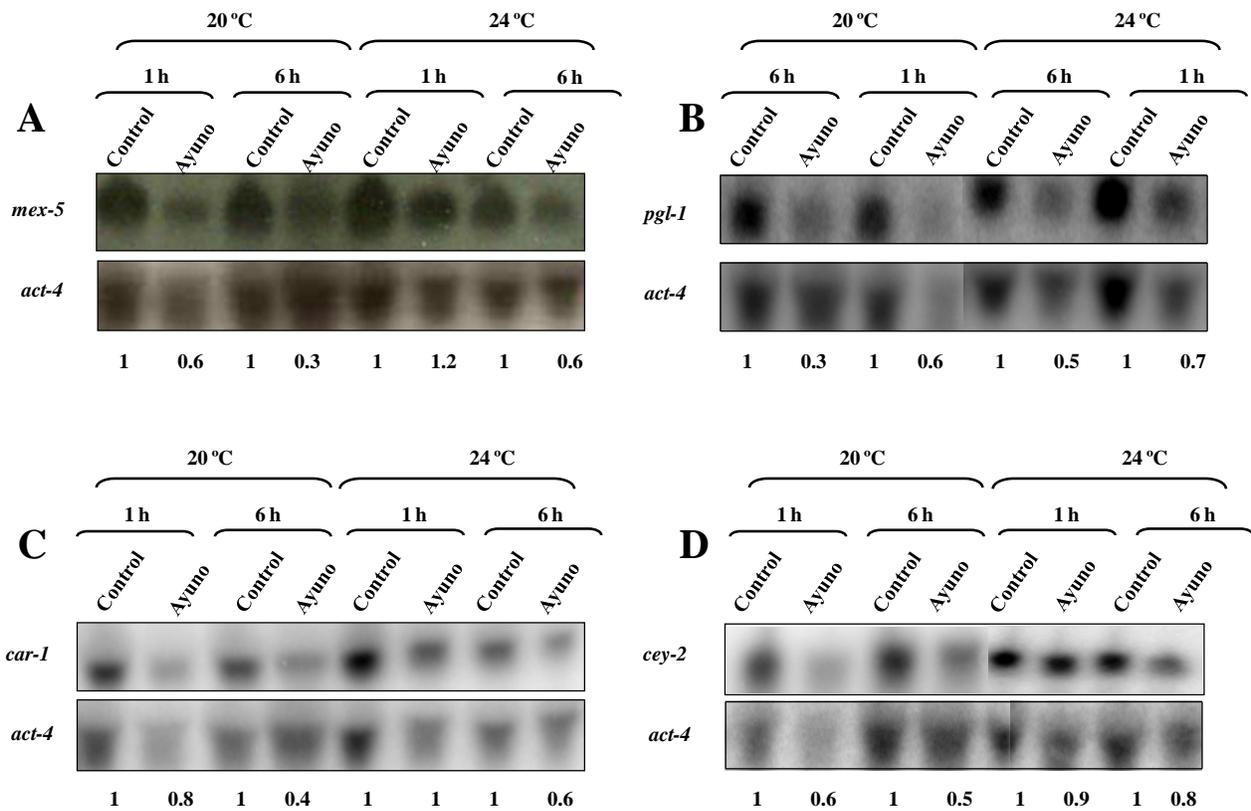


Figura 13. Los genes *mex-5*, *pgl-1*, *car-1* y *cey-2* disminuyen sus niveles de expresión durante el ayuno. Northern Blot para evaluar los niveles de expresión de los genes. A) *mex-5*, B) *pgl-1*, C) *car-1* y D) *cey-2* en condiciones control y de ayuno. El RNA probado se obtuvo de animales adultos crecidos a 20 o 24°C bajo diferentes condiciones de 1 y 6 h de ayuno. 10 µg de RNA fueron cargados por carril. Se utilizó el gen de *actina 4* (*act-4*) como control de carga. Los niveles de RNAm fueron calculados mediante densitometría utilizando el programa ImageQuant 5.2 y corregidos con los valores obtenidos para el gen de *act-4* y se indican debajo de cada panel. Este experimento se realizó por duplicado.

El análisis de los niveles de expresión de los genes *nos-2*, *gla-3*, *glh-4* e *ife-1* fue hecho mediante la técnica de RT-PCR y los resultados se muestran en la figura 14. Se extrajo RNA de

animales N2 adultos de 1 día crecidos a 20°C en condiciones control y de ayuno por 6 h. Se sintetizó cDNA y se compararon los niveles de expresión de RNAm mediante PCR específico para cada gen.

Los genes *nos-2* y *gla-3* disminuyen sus niveles de expresión entre un 40 y un 50% en condiciones de ayuno (Figura 14A y B). El gen *glh-4* también mostró una disminución aunque esta fue considerablemente menor (11%, Figura 14C). Los niveles de expresión del gen *ife-1* no se vieron afectados durante el ayuno (Figura 14D).

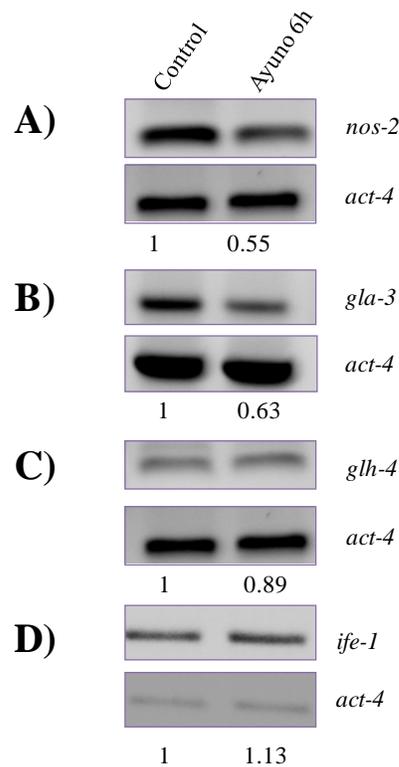


Figura 14. Los RNAm *nos-2* y *gla-3* disminuyen su expresión durante el ayuno. RT-PCR para evaluar los niveles de expresión de los genes indicados. A) *nos-2*, B) *gla-3*, C) *glh-4* y D) *ife-1*. El RNA se obtuvo de animales hermafroditas adultos de un día crecidos a 20°C alimentados normalmente (control) y sometidos a 6 h de ayuno. Como control de carga se utilizó el gen de *actina 4* (*act-4*). El gen amplificado se muestra a la derecha de cada panel. Los niveles de RNAm fueron calculados mediante densitometría utilizando el programa ImageQuant 5.2 y corregidos con los valores obtenidos para el gen de *act-4* y se indican debajo de cada panel. Este experimento se realizó por duplicado.

5.1.4 DISCUSION

La muerte celular por apoptosis es un destino común de las células del nematodo *C. elegans* [16, 19, 48]. Específicamente en la línea germinal la apoptosis constituye un proceso necesario para el mantenimiento de la calidad de los ovocitos y la homeostasis de la gónada [19, 48], por lo que creemos que el estudio de los reguladores de este proceso es relevante. En este trabajo identificamos mediante RNAi a 7 genes cuyo silenciamiento induce un incremento en los niveles de apoptosis fisiológica observados en la gónada (Figura 6). Estos genes provienen del análisis de 12 candidatos seleccionados de un microarreglo para identificar genes involucrados en la inducción de apoptosis como respuesta al ayuno. Como es evidente, el silenciamiento de un gran porcentaje de los genes analizados en nuestro escrutinio aumentó los niveles de apoptosis fisiológica. Es posible que el incremento en la apoptosis fisiológica se deba a que muchos de los genes analizados están involucrados en procesos celulares esenciales (ANEXO 2) y si son eliminados, la célula no puede continuar con su ciclo normal y muere. Sin embargo, puede deberse también a que el RNA de doble cadena incrementa la apoptosis vía p53 [51]. Para descartar esta posibilidad se podría hacer los experimentos de RNAi en un fondo mutante para CEP-1/p53.

El comportamiento de los genes en estudio mostró 2 tendencias en la apoptosis. El silenciamiento de los genes *pgl-1*, *car-1*, *mex-5*, *cey-2*, *gla-3*, *cgh-1* y *hsp-1* incrementó los niveles de apoptosis de manera importante (de 2 a 5 veces) (Figura 9A y Tabla 11). Por otro lado el silenciamiento de los genes *glh-4*, *nos-2*, *ife-1*, *spn-4* y *oma-1* tuvo un mínimo o ningún incremento en la apoptosis fisiológica (Figura 9B y Tabla 11). Como un control de la eficiencia de nuestro sistema algunos de estos resultados corroboran resultados publicados en donde algunas proteínas que son componentes de gránulos de RNA se han visto involucradas en la inducción de apoptosis. CGH-1, una helicasa de RNA, es un ejemplo de ello [110]. Esta proteína se encuentra asociada a

gránulos P y a los cuerpos de procesamiento en el citoplasma. La inhibición de la expresión de *cgh-1* provoca muchos defectos y entre ellos ocasiona que células germinales que formarán ovocitos mueran por apoptosis a través de la vía de apoptosis fisiológica [110]. CAR-1 es otra proteína que se localiza en gránulos P y cuerpos de procesamiento y se asocia con CGH-1 en un complejo ribonucleoproteico de la línea germinal [109]. Animales adultos *car-1(RNAi)* presentan de dos a tres veces más células germinales en apoptosis que el tipo silvestre. Podemos mencionar también al homólogo de TTP en *C. elegans*, GLA-3, una proteína con dos dominios de unión tipo dedo de zinc (CCCH). La pérdida de la función de *gla-3* resulta en un incremento dramático de la apoptosis de la línea germinal, en un proceso independiente de CEP-1 (p53) y que involucra a MPK-1 [99].

El estudio de la participación de éstos genes en la inducción de apoptosis por ayuno reveló que los animales RNAi para los genes que incrementan de manera importante la apoptosis fisiológica (*pgl-1*, *car-1*, *mex-5*, *cey-2*, *gla-3*, *cgh-1* y *hsp-1*) no incrementan sus niveles de apoptosis en respuesta al ayuno, sugiriendo que estos genes son necesarios para la inducción de dicha respuesta (Figura 7A y Tabla 11). Estos datos apoyan que estas proteínas participan en este proceso y no que la apoptosis sea simplemente una inducción por la activación de CEP-1/p53. Por el contrario animales RNAi para los genes que no incrementan la apoptosis fisiológica (*nos-2*, *ife-1*, *oma-1*, y *glh-4*) responden de manera normal al ayuno (Figura 7B y Tabla 11). Estos datos sugieren que estos genes no participan en la inducción de apoptosis por este tipo de estrés.

La participación de los genes en estudio en la inducción de apoptosis plantea dos posibles escenarios. El primero sugiere que la ausencia de estos genes puede ser censada por la gónada desencadenando una respuesta de apoptosis (incremento de apoptosis fisiológica) esto se apoya en el hecho de que la mayoría de los genes estudiados tiene funciones importantes en la línea germinal (ANEXO 2). Cuando los animales son sometidos al ayuno son incapaces de responder a él elevando

aún más sus niveles de apoptosis ya que la respuesta ya ha sido desencadenada. Sin embargo estudios de RNAi realizados en el laboratorio presentan algunos casos particulares en los cuales a pesar de que el silenciamiento de un gen induce elevados niveles de apoptosis fisiológica los animales son capaces de responder al ayuno incrementando aun más sus niveles de apoptosis.

El segundo escenario sugiere que la participación de un gen puede ser opuesta en los procesos de inducción de apoptosis fisiológica y la inducida por ayuno, protegiendo a las células de la muerte en la primera y permitiendo la activación de la apoptosis en la segunda.

Tabla 11 Resumen de la participación de los genes estudiados en la apoptosis fisiológica y la inducida por diferentes tipos de estrés. Tomando en cuenta los resultados mostrados en las tablas 6-10 se indica el comportamiento de los animales(RNAi) en cada uno de los genes estudiados con respecto a su control. La primera fila indica el comportamiento de animales control (PV) sometidos a diferentes condiciones de estrés cuando los animales RNAi tienen un comportamiento distinto a este se indica en negritas. ↑ Indica un aumento en el número de cuerpos apoptóticos de los animales RNAi con respecto a su propio control (PV). = Indica que el número de cuerpos apoptóticos de los animales RNAi fue muy similar a los animales control (PV).

Gen	Apoptosis fisiológica	Ayuno	E. osmótico	E. oxidativo	Choque de calor
PV(RNAi)		↑	↑	↑	↑
<i>car-1(RNAi)</i>	↑	=	=	↑	=
<i>mex-5(RNAi)</i>	↑	=	=	=	=
<i>cey-2(RNAi)</i>	↑	=	=	=	=
<i>pgl-1(RNAi)</i>	↑	=	=	=	=
<i>cgh-1(RNAi)</i>	↑	=	=	=	-----
<i>hsp-1(RNAi)</i>	↑	=	-----	-----	=
<i>gla-3(RNAi)</i>	↑	=	=	=	=
<i>nos-2(RNAi)</i>	=	↑	=	=	↑
<i>glh-4(RNAi)</i>	=	↑	-----	=	↑
<i>spn-4(RNAi)</i>	=	=	-----	-----	↑
<i>oma-1(RNAi)</i>	=	↑	-----	-----	↑
<i>ife-1(RNAi)</i>	=	↑	=	=	↑

Utilizando técnicas como Northern blot (Figura 13) y RT-PCR (Figura 14) observamos que la mayoría de los genes analizados (con excepción del gen *ife-1*) disminuyeron sus niveles de expresión durante el ayuno. Estos datos corroboran los resultados obtenidos en el microarreglo (ANEXO 2). La disminución en los niveles de estos genes plantea tres posibilidades: la primera

sugiere que estos genes pueden verse afectados por un proceso general de disminución de la transcripción como consecuencia de la exposición al estrés. En la segunda estos genes pueden regular procesos específicos que requieren ser detenidos para responder al estrés que enfrenta el organismo. La tercera implica que los niveles de expresión de estos genes son censados de algún modo por la maquinaria celular para desencadenar una respuesta al estrés, esta idea se apoya en el hecho de que la disminución de los niveles de algunos de estos RNA mensajeros genera una consecuencia morfológica (formación de gránulos) en la gónada de *C. elegans* (Capítulo 2).

Diferentes tipos de estrés afectan la gónada de *C. elegans* induciendo respuestas como el aumento de células germinales en apoptosis [44]. A diferencia del ayuno la inducción de apoptosis en el caso del estrés osmótico, oxidativo y choque de calor involucra la vía de las MAPKKs *mek-1* y *sek-1* además de la proteína antagonista de p53 ABL-1.

En este capítulo evaluamos la participación de los genes que codifican para proteínas que se asocian a gránulos de RNA en el estrés osmótico, el oxidativo y el choque de calor (Resultados resumidos en la Tabla 11). Encontramos que los genes *cey-2*, *mex-5*, *cgh-1*, *car-1*, *pgl-1*, *nos-2*, *ife-1* y *gla-3* se requieren para inducir apoptosis en condiciones de estrés osmótico. Curiosamente el silenciamiento de los genes *mex-5* e *ife-1* no sólo evitó la inducción de apoptosis bajo estas condiciones sino que indujo una reducción en el número de cuerpos apoptóticos observados en animales RNAi bajo condiciones control. Al evaluar la participación de estos genes en condiciones de estrés oxidativo encontramos que el silenciamiento de la mayoría de los genes (*cey-2*, *cgh-1*, *gla-3*, *glh-4*, *nos-2* y *pgl-1*) evita la inducción de apoptosis bajo estas condiciones. Los animales *car-1*(RNAi) respondieron a éste tipo de estrés aunque no a los niveles del control (PV) lo que significa que dicho gen se requiere solo parcialmente para la inducción de apoptosis durante el estrés oxidativo. Al igual que en el estrés osmótico el silenciamiento de los genes *mex-5* e *ife-1* disminuyó

los niveles de apoptosis con respecto a los niveles observados en condiciones control cuando los animales fueron sometidos al estrés oxidativo sugiriendo que probablemente estos genes puedan estar involucrados en la regulación de la proliferación celular bajo condiciones de estrés (Tabla 11).

Al evaluar el estrés por choque de calor observamos que los animales RNAi mostraron conductas similares al caso del ayuno. En este caso los resultados fueron divididos en dos grupos (Figura 12 A y B). El primer grupo constituido por animales *cey-2*, *pgl-1*, *car-1*, *gla-3*, *hsp-1* y *mex-5* (RNAi) fueron incapaces de elevar sus niveles de apoptosis en respuesta a éste tipo de estrés. El segundo grupo respondieron de manera normal al choque de calor y estuvo integrado por animales *spn-4*, *ife-1*, *glh-4*, *oma-1* y *nos-2*(RNAi) (Tabla 11).

La participación de los genes en procesos regulados por vías distintas sugiere que dichos genes podrían estar actuando río debajo de manera directa o indirecta de las vías descritas. Dado que todos estos genes tienen dominios de unión a RNA podrían participar en regulación de RNA mensajeros específicos. Por ejemplo podrían participar en el proceso de ejecución de apoptosis regulando directa o indirectamente la maquinaria de apoptosis (*ced-9*, *ced-4* o *ced-3*) o a alguno de los genes que participan en el proceso de degradación y fagocitosis de los cuerpos apoptóticos.

5.1.5 CONCLUSIONES

- El silenciamiento de los genes *car-1*, *mex-5*, *cey-2*, *pgl-1*, *cgh-1*, *hsp-1* y *gla-3* trae como consecuencia un aumento significativo en el número de cuerpos apoptóticos en condiciones normales de alimentación. Además los animales RNAi en estos genes no incrementan la apoptosis como respuesta al ayuno.
- Los genes *oma-1*, *ife-1*, *glh-4* y *nos-2* no participan en la inducción de apoptosis en condiciones control ni de ayuno.
- Los animales RNAi para los genes *car-1*, *mex-5*, *cey-2*, *pgl-1*, *gla-3*, *nos-2*, *glh-4*, e *ife-1* no incrementan sus niveles de apoptosis en respuesta al estrés osmótico y oxidativo.
- Los genes *mex-5*, *cey-2*, *pgl-1*, *cgh-1*, *hsp-1*, y *gla-3* se requieren para el incremento de cuerpos apoptóticos observado en la respuesta al choque de calor.
- Los niveles de RNAm de los genes *car-1*, *mex-5*, *cey-2*, *pgl-1*, *gla-3*, *nos-2* y *glh-4* disminuyen durante el ayuno.

CAPÍTULO 2: El papel de los genes que codifican para proteínas que se asocian con gránulos de RNA en la formación de gránulos

5.2.1 Participación de las proteínas que se asocian con gránulos de RNA en la formación de gránulos de CGH-1.

Debido a la naturaleza de los genes en estudio y a la probable relación que existe entre la formación de gránulos y la apoptosis, decidimos evaluar si el silenciamiento de los genes que codifican para proteínas que se asocian con gránulos de RNA tenía algún efecto en la formación de los mismos. Como se mencionó anteriormente, en *C. elegans* aun no se cuenta con una clasificación precisa de los componentes específicos de cada tipo de gránulo de RNA (gránulos de estrés, cuerpos de procesamiento, gránulos P); sin embargo se conocen algunos componentes que pueden servir como marcador para la formación de gránulos.

Para evaluar la formación de gránulos se utilizó un anticuerpo para la proteína CGH-1, una helicasa de RNA ortóloga de RCK (RNA helicasa con dominio tipo DEAD) en mamíferos que se ha visto asociada a estructuras ribonucleoproteicas [82, 110, 112]. Previo a este estudio se observó la formación de gránulos de CGH-1 en el centro de la gónada cuando animales silvestres hermafroditas adultos de un día se someten a ayuno por 6 h [87, 88]. Para evaluar la participación de las proteínas en estudio en la formación de gránulos, se detectó a CGH-1 por inmunofluorescencia.

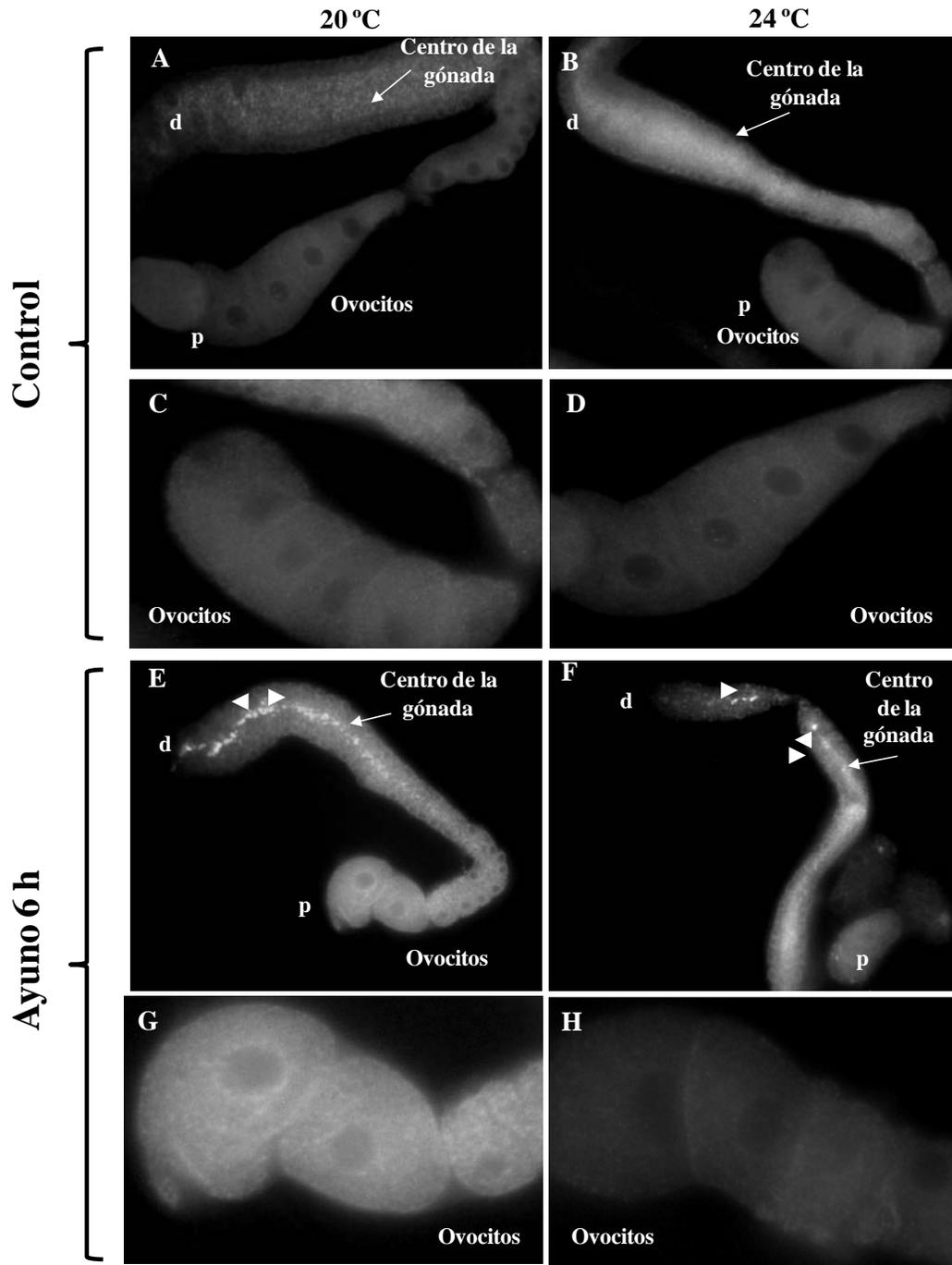
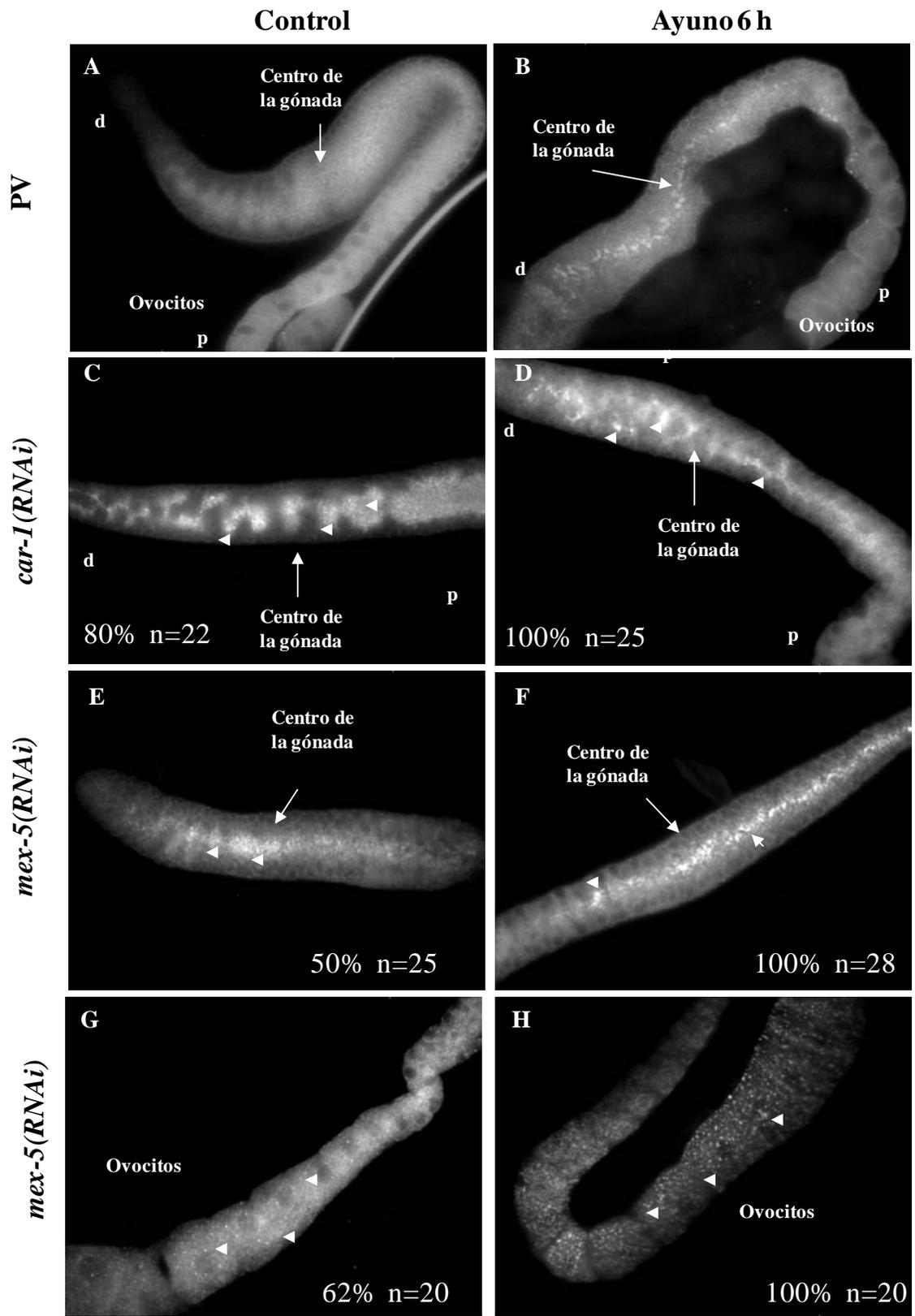


Figura 15. El ayuno por 6 h induce la formación de gránulos de CGH-1 en el centro de la gónada. Animales N2 adultos de 1 día crecidos a 20°C (A,C,E y G) o 24°C (B,D,F y H) fueron sometidos a condiciones control y de ayuno por 6 h. Después de que los animales fueron tratados, sus gónadas fueron disecadas, fijadas e inmunoteñidas con un anticuerpo contra CGH-1. En cada gónada se indica la región distal (d) y proximal (p) así como los ovocitos, la región del centro de la gónada (flechas completas) y en su caso la formación de gránulos (puntas de flecha). En G y H se muestra un acercamiento de los ovocitos.

Como se aprecia en la figura 15 panel F animales crecidos a 24 °C si forman gránulos de CGH-1 en el centro de la gónada como respuesta al ayuno por 6 h aunque su formación es más discreta que a 20 °C (Panel E). En el caso de los ovocitos la distribución de CGH-1 permanece sin alteraciones evidentes cuando los animales son sometidos al ayuno a 20 y a 24°C (Panel C y D comparados con G y H). Una vez corroborada la presencia de gránulos a 24°C, empezamos la evaluación de la formación de gránulos con animales RNAi en los genes que codifican para proteínas que se asocian a gránulos de RNA.

Se hicieron inmunotinciones de gónadas de animales adultos N2 y RNAi en los genes *car-1*, *mex-5*, *pgl-1*, *cey-2*, *nos-2*, *glh-4*, *oma-1*, *ife-1*, *spn-4*, y *gla-3* en condiciones control y sometidos a 6 horas de ayuno a 24°C. Las gónadas de los animales *car-1(RNAi)* presentaron formación de gránulos de CGH-1 aún en condiciones normales de crecimiento lo que sugiere que el silenciamiento de este gen induce la formación de estos gránulos (Figura 16 C). Cuando estos animales fueron sometidos al ayuno, la formación de gránulos persistió e inclusive dichas estructuras se mostraron más compactas y delimitadas (Figura 16 compárese paneles C y D).



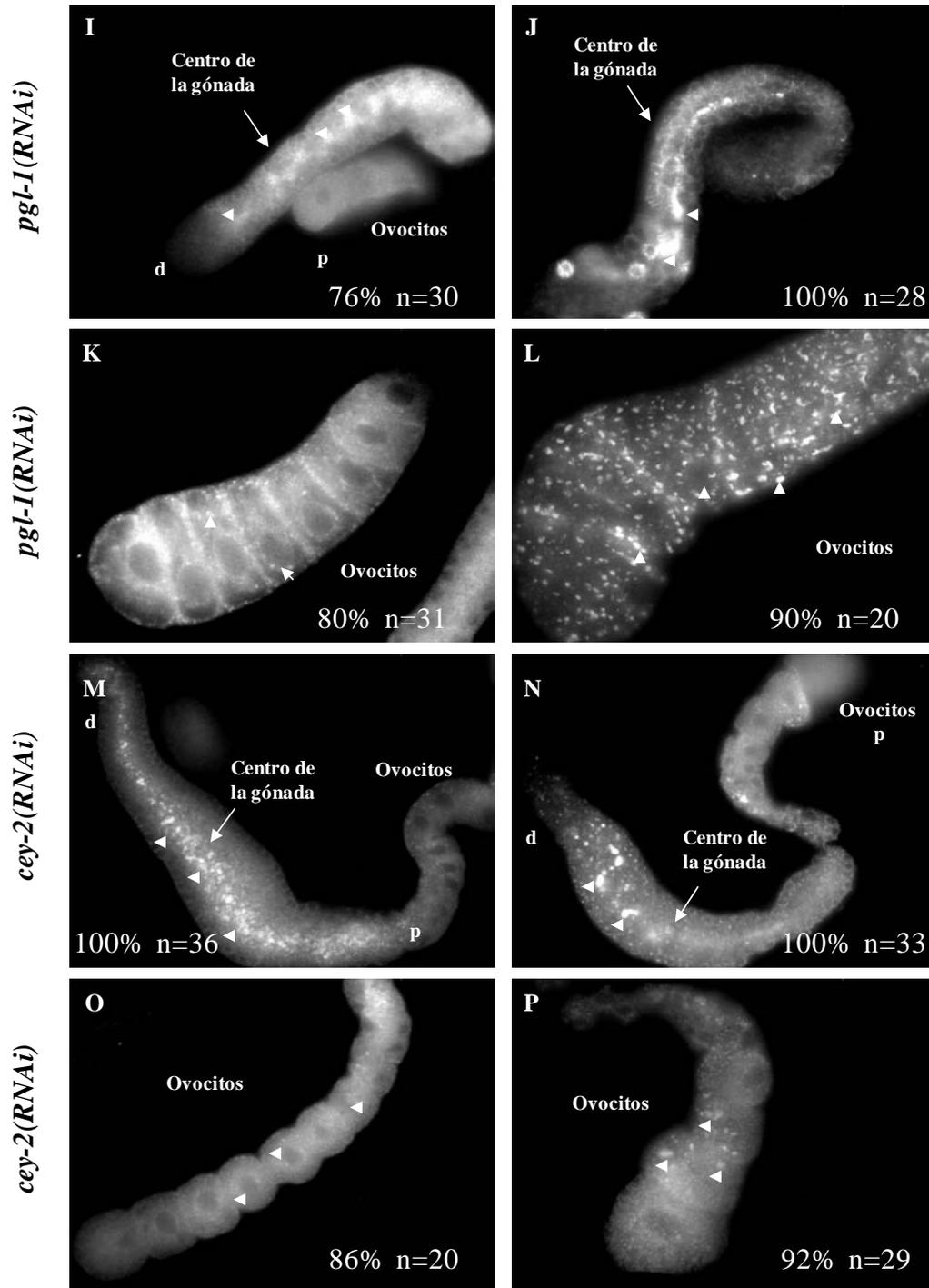


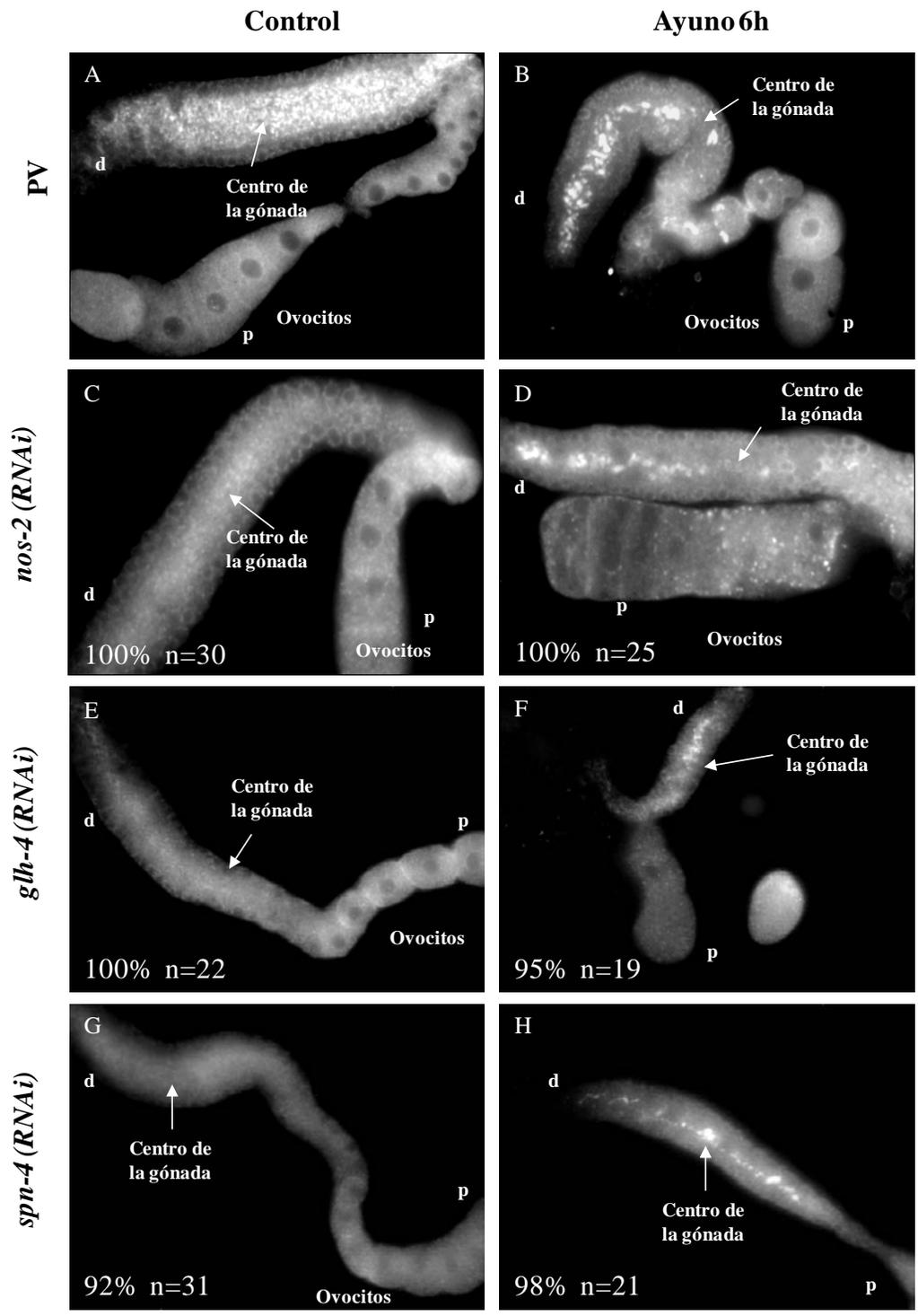
Figura 16. El silenciamiento de los genes *cey-2*, *mex-5*, *pgl-1* y *car-1* induce la formación de gránulos de CGH-1 en el centro de la gónada en condiciones normales y de ayuno. Animales N2 adultos de 1 día control (PV) o RNAi de los genes indicados fueron sometidos a condiciones control (A,C,E,G,I,K,M,O) o de ayuno por 6 h (B,D,F,H,J,L,N,P). Después de que los animales fueron tratados, sus gónadas fueron disecadas, fijadas e inmunoteñidas con un anticuerpo contra CGH-1. En cada gónada se indica la región distal (d) y proximal (p) así como los ovocitos, la región del centro de la gónada (flechas completas) y en su caso la formación de gránulos (puntas de flecha). En cada panel se indica el porcentaje de animales que presentan el fenotipo de la fotografía, así como la n.

Al silenciar los genes *pgl-1* (Figura 16 I,K) y *cey-2* (Figura 16 M,O) la formación de gránulos de CGH-1 observada en animales sin ningún tipo de estrés fue muy evidente tanto en el centro de la gónada como en los ovocitos. Esta formación se incrementa cuando los animales fueron sometidos a 6 h de ayuno sobre todo en la región de los ovocitos (Figura 16 J, L, N, P).

Los animales donde se silenció el gen *mex-5* presentaron formación de gránulos de CGH-1 en el centro de la gónada en condiciones normales de crecimiento. Esta formación de gránulos es más discreta comparada con lo observado en animales *car-1(RNAi)*, *pgl-1(RNAi)* y *cey-2(RNAi)*. Sin embargo, parece incrementarse cuando los animales son sometidos a ayuno por 6 h, estos animales presentan formación de pequeños gránulos en los ovocitos cuya cantidad se incrementa en condiciones de ayuno (Figura 16 G,H). Estos datos sugieren que una desregulación en la dinámica de formación de los gránulos puede tener un papel positivo en la inducción de la apoptosis de la línea germinal.

El silenciamiento de los genes *nos-2*, *glh-4*, *spn-4* y *oma-1* no afecta la distribución del marcador CGH-1 tanto en condiciones normales de alimentación como durante el ayuno (Figura 17). Curiosamente, el silenciamiento de estos genes no incrementa de manera importante la apoptosis fisiológica y a excepción del gen *spn-4* tampoco se requieren para la inducción de apoptosis por ayuno.

En contraste, las inmunotinciones de gónadas de animales tratados con RNAi para el gen *ife-1* muestran que el silenciamiento de este gen induce la formación de pequeños gránulos en el centro de la gónada aún en condiciones normales de alimentación, los cuales se ven notoriamente incrementados cuando los animales son sometidos a condiciones de ayuno (Figura 17 K,L).



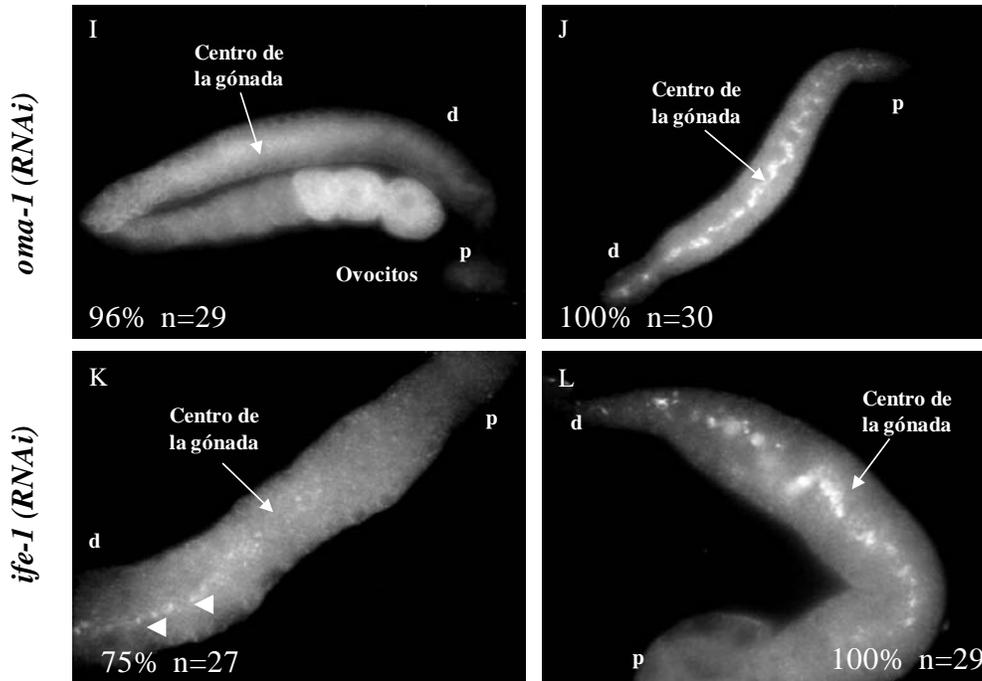


Figura 17. El silenciamiento de los genes *nos-2*, *glh-4*, *oma-1* y *spn-4* no afecta la formación de los gránulos de CGH-1. Animales N2 adultos de 1 día control (PV) o RNAi de los genes indicados fueron sometidos a condiciones control (A,C,E,G,I,K) y de ayuno por 6 h (B,D,F,H,J,L). Después de que los animales fueron tratados, sus gónadas fueron disecadas, fijadas e inmunoteñidas con un anticuerpo contra CGH-1. En cada gónada se indica la región distal (d) y proximal (p) así como los ovocitos, la región del centro de la gónada (flechas completas) y en su caso la formación de gránulos (puntas de flecha). En cada panel se indica el porcentaje de animales que presentan el fenotipo de la fotografía así como la n.

Por último evaluamos la participación del gen *gla-3* en la formación de gránulos durante el ayuno, en la figura 18 D podemos observar que la ausencia del gen *gla-3* impide la formación de gránulos en el centro de la gónada en condiciones de ayuno. En nuestro grupo de trabajo se ha observado que el choque de calor también induce la formación de gránulos en la gónada [87, 88]. Por esta razón decidimos evaluar la participación de GLA-3 en la formación de gránulos en condiciones de choque de calor. Además de los gránulos que se forman en el centro de la gónada el choque de calor induce un engrandecimiento de los gránulos que rodean los núcleos de las células germinales (Figura 18 panel E). Contrario a esto los animales *gla-3(op312)* no forman gránulos de CGH-1 en el centro de la gónada ni en el ayuno ni en el choque de calor. Sin embargo, el

engrandecimiento de los gránulos que rodean los núcleos observado en la cepa silvestre durante el choque de calor continúa observándose en la mutante *gla-3(op312)* (Figura 18 panel F).

GLA-3 es uno de los homólogos en *C. elegans* de la proteína nucleadora de gránulos TTP (Tristetraprolina), lo cual apoya que esta proteína sea necesaria para la formación de gránulos en condiciones de estrés.

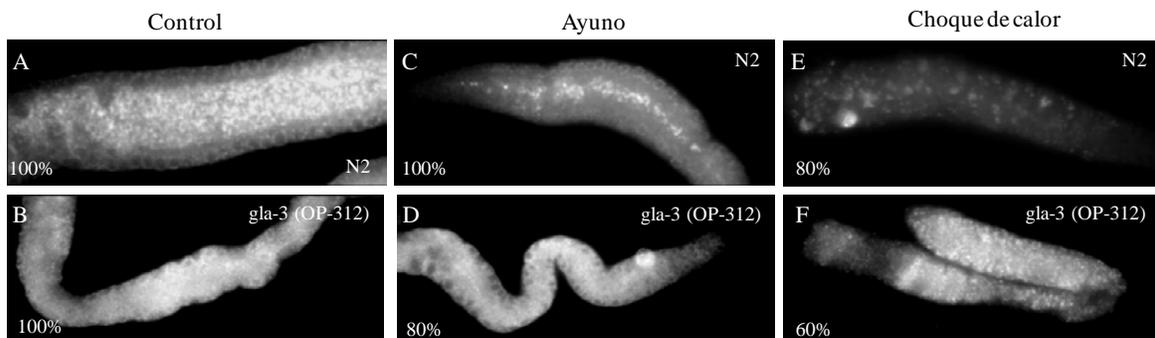


Figura 18. GLA-3, uno de los homólogos de TTP, es indispensable para la formación de gránulos de CGH-1 en condiciones de estrés. Animales adultos de 1 día de los fondos genéticos indicados fueron sometidos a condiciones control (A,C,E) y de ayuno por 6 h (B,D,F). Después de que los animales fueron tratados, sus gónadas fueron disecadas, fijadas e inmunoteñidas con un anticuerpo contra CGH-1. La parte distal del brazo de la gónada se muestra a la izquierda en cada fotografía. En cada panel se indica el porcentaje de animales que presentan el fenotipo de la fotografía.

5.2.2 La formación de gránulos como resultado del silenciamiento del gen *cey-2* requiere de las proteínas TIAR-1, GLA-3 y GLH-1

Para analizar de manera más minuciosa la naturaleza de los gránulos que se forman cuando silenciamos a los genes *car-1*, *cey-2*, *pgl-1* y *mex-5* (Figura 16) investigamos la participación de las proteínas TIAR-1, GLA-3 y GLH-1 en la regulación de la formación de estos gránulos. TIAR-1 es el homólogo de TIA-1 en mamíferos, una proteína de unión a RNA implicada en muchos procesos celulares entre ellos la regulación de la formación de gránulos de estrés [113-115]. En el laboratorio se ha demostrado que similar a lo que ocurre en mamíferos, en *C. elegans* la proteína TIAR-1 se requiere para la formación de gránulos de CGH-1 en el centro de la gónada en condiciones de estrés (ayuno y choque de calor) [88]. GLA-3 es el homólogo de TTP en mamíferos, organismos en los

cuales se requiere para la formación de gránulos de estrés [116]. Como mostramos anteriormente GLA-3 se requiere para la formación de gránulos de CGH-1 al centro de la gónada en condiciones de ayuno y choque de calor (Figura 24). La proteína GLH-1 es una helicasa tipo DEAD que se expresa específicamente en la línea germinal y es uno de los homólogos de la proteína VASA en mamíferos [101]. GLH-1 es un componente constitutivo de los gránulos P y regula su formación afectando negativamente la distribución de uno de los componentes constitutivos claves de los gránulos P la proteína PGL-1 [117]. Seleccionamos para éste análisis a los genes *cey-2* y *pgl-1* cuyo silenciamiento aumenta de manera importante los niveles de apoptosis fisiológica, no responde al ayuno ni a ninguno de los tipos de estrés probados y además ocasiona la formación de gránulos de CGH-1 aun en condiciones control.

Para los experimentos se utilizaron animales adultos de 1 día *tiar-1(tm361);cey-2(RNAi)*, *cey-2(ok902);gla-3(RNAi)* y *glh-1(ok439) ;cey-2(RNAi)*. Los animales *N2;cey-2(RNAi)* muestran formación de gránulos en el centro de la gónada y en los ovocitos aun en ausencia de estrés (Figura 16 M,O y 19 C). En el caso de los animales *tiar-1(tm361);cey-2(RNAi)* encontramos que solo el 50% de las gónadas analizadas formaban gránulos de CGH-1 en condiciones control aunque de una manera menos eficiente que su control (Comparése Figura 19 C y G), lo que sugiere una participación parcial de la proteína TIAR-1 en la formación de estos gránulos. Sin embargo cuando los animales se sometieron a condiciones de ayuno el 90% de las gónadas formó gránulos en el centro de la gónada (Figura 19 H). Además se observó un aumento de tamaño en los gránulos P que rodean a las células germinales. Estos resultados sugieren que durante el ayuno existe una vía distinta para la formación de gránulos, la cual es independiente de TIAR-1.

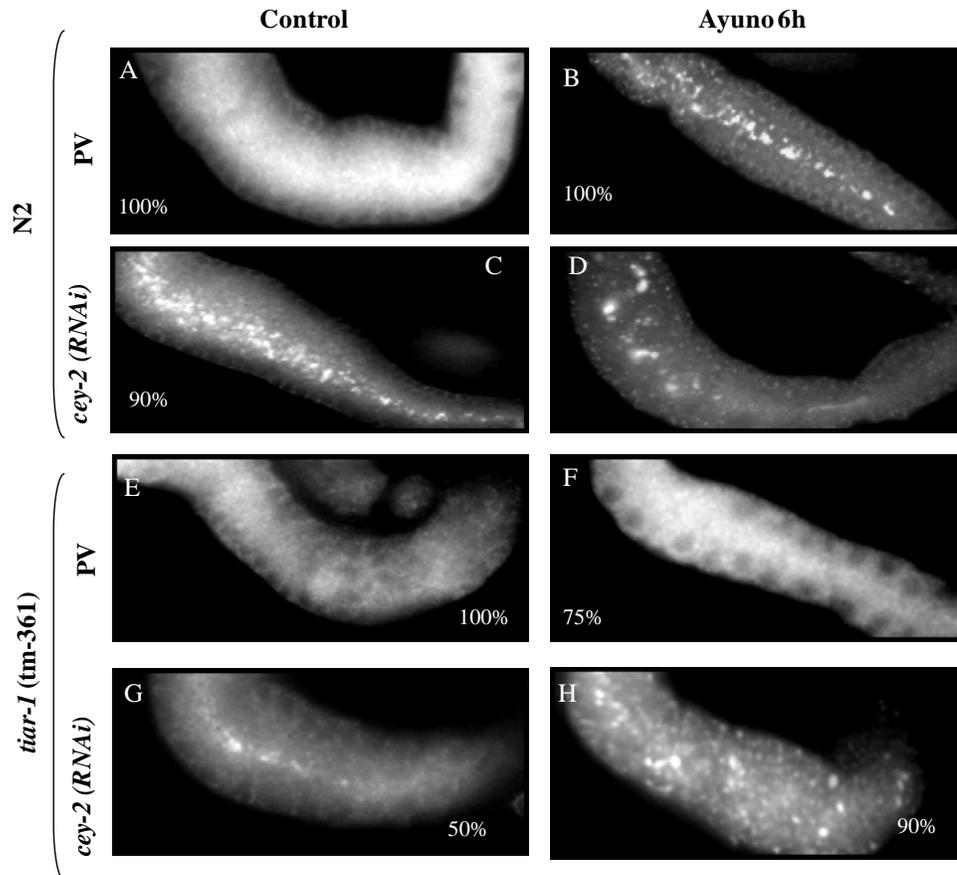


Figura 19. Los gránulos que se forman debido al silenciamiento del gen *cey-2* dependen parcialmente de la proteína TIAR-1. Animales adultos de 1 día de la cepa silvestre (A-D) o de la mutante *tiar-1(tm361)* (E-H) control (PV) o RNAi en *cey-2* fueron sometidos a condiciones control (A,C,E,G) y de ayuno por 6 h (B,D,F,H). Después de que los animales fueron tratados, sus gónadas fueron disecadas, fijadas e inmunoteñidas con un anticuerpo contra CGH-1. La parte distal del brazo de la gónada se muestra a la izquierda en cada fotografía. En cada panel se indica el porcentaje de animales que presentan el fenotipo de la fotografía.

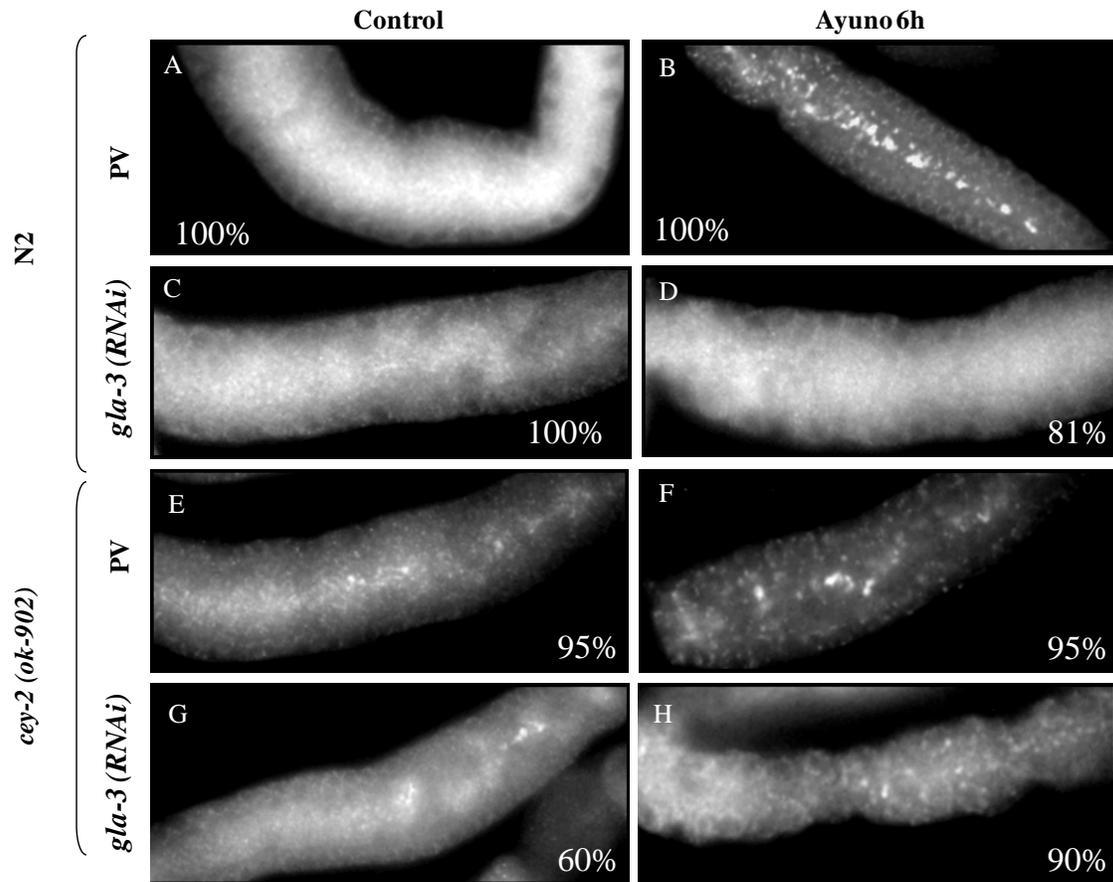


Figura 20. Los gránulos que se forman debido al silenciamiento del gen *cey-2* dependen parcialmente de la proteína GLA-3. Animales adultos de 1 día de la cepa silvestre (A-D) o de la mutante *cey-2(ok902)* (E-H) control (PV) o RNAi en *gla-3* fueron sometidos a condiciones control (A,C,E,G) y de ayuno por 6 h (B,D,F,H). Después de que los animales fueron tratados, sus gónadas fueron disecadas, fijadas e inmunoteñidas con un anticuerpo contra CGH-1. La parte distal del brazo de la gónada se muestra a la izquierda en cada fotografía. En cada panel se indica el porcentaje de animales que presentan el fenotipo de la fotografía.

En el caso de los animales *cey-2(ok902);gla-3(RNAi)*, los resultados fueron similares a los obtenidos en el fondo mutante para TIAR-1. El 95% de animales mutantes *cey-2(ok902)* presentan formación de gránulos en el centro de la gónada en condiciones control (Figura 20E); cabe mencionar que dichos gránulos son más discretos que los observados cuando silenciamos a *cey-2* por medio de RNAi (Figura 16); sin embargo en animales *cey-2(ok902);gla-3(RNAi)* dicha formación se reduce y sólo el 60% de éstos animales forma gránulos (Figura 20 G). Cuando los animales se ayunaron un alto porcentaje de las gónadas (90%) formó gránulos en el centro de la

gónada y alrededor de las células germinales (Figura 20 H). Estos resultados sugieren que la formación de gránulos producto del silenciamiento de *cey-2* requiere parcialmente a las proteínas TIAR-1 y GLA-3.

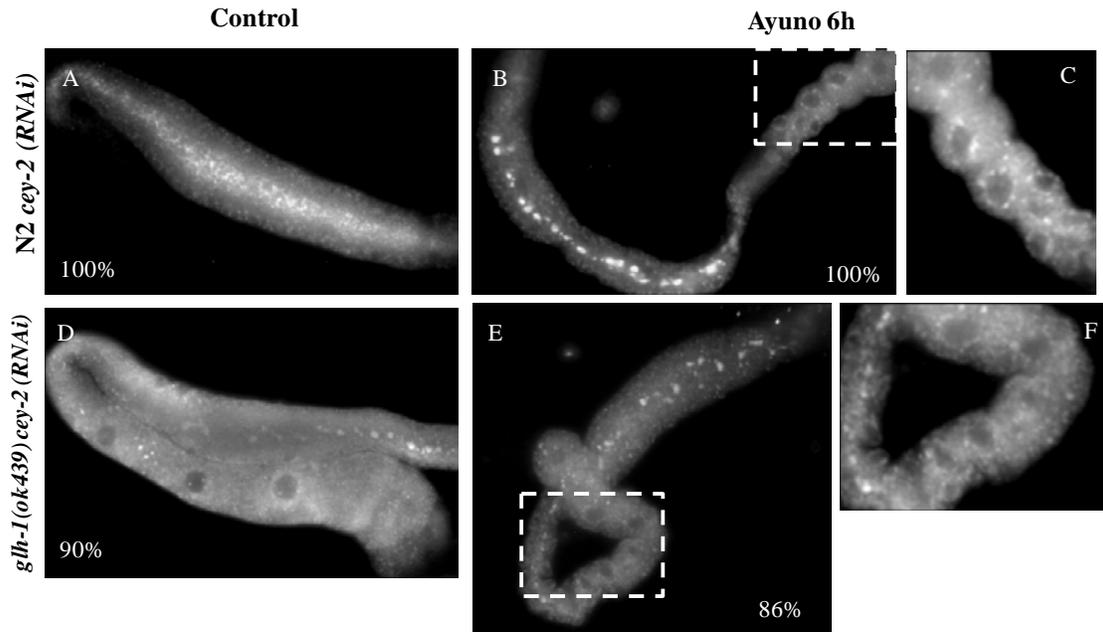


Figura 21. Los gránulos que se forman debido al silenciamiento del gen *cey-2* dependen parcialmente de la proteína GLH-1. Animales adultos de 1 día de la cepa silvestre (A-C) o de la mutante *glh-1(ok439)* (D-F) control (PV) o RNAi en *cey-2* fueron sometidos a condiciones control (A y D) y de ayuno por 6 h (B,C,E,F). Después de que los animales fueron tratados, sus gónadas fueron disecadas, fijadas e inmunoteñidas con un anticuerpo contra CGH-1. En C y F se muestra un acercamiento de los ovocitos. En cada panel se indica el porcentaje de animales que presentan el fenotipo de la fotografía.

En el caso de las gónadas de animales *glh-1(ok439);cey-2(RNAi)* se observó que a diferencia del control (*N2;cey-2(RNAi)*) donde el 100 % de las gónadas formó gránulos en el centro de la gónada y en los ovocitos (Figura 21 A) el 90% de los animales formó muy pocos o ningún gránulo de CGH-1 en condiciones control en ambas regiones de la gónada (Figura 21 D). Cuando los animales fueron sometidos al ayuno por 6 h el 100% de las gónadas de animales *N2;cey-2(RNAi)* formaron gránulos (Figura 21 B,C). El 86% de los animales *glh-1(ok439);cey-2(RNAi)* forman gránulos similares a los de su control en estas condiciones (Figura 21 E,F). Estos resultados sugieren que la formación de gránulos como resultado del silenciamiento de *cey-2* requiere la

correcta formación de los gránulos P en la gónada o que por lo menos algunos de los componentes de gránulos P están involucrados en su proceso de formación.

5.2.3 La formación de gránulos como resultado del silenciamiento del gen *pgl-1* requieren parcialmente de la proteína TIAR-1 y GLA-3.

Como habíamos mostrado antes animales *N2;pgl-1(RNAi)* muestran formación de gránulos en el centro de la gónada y en los ovocitos aun en ausencia de estrés (Figura 16 I, K y 22 C). Para entender un poco acerca de la regulación de estos gránulos se analizaron animales mutantes para el gen *tiar-1* haciendo RNAi en el gen *pgl-1*. Las inmunotinciones de estos animales mostraron que solo el 28.5 % de la gónadas forma gránulos parecidos a los del control (Figura 22 G) mientras que un 71.5% de las gónadas no presentaron gránulos en condiciones control. Durante el ayuno, animales *N2;pgl-1(RNAi)* presentan formación de gránulos en el 100% de las gónadas. Los animales *tiar-1;pgl-1(RNAi)* formaron gránulos bajo estas condiciones; sin embargo éstos gránulos están dispersos en vez de encontrarse agregados en el centro (Figura 22 H).

Inmunotinciones de animales *pgl-1(bn102)/gla-3(RNAi)* mostraron que en condiciones normales de alimentación el 60% de las gónadas no forma gránulos de CGH-1 sugiriendo que la formación de éstos requiere la participación de la proteína GLA-3. Sin embargo, la mayoría de las gónadas sigue formando pequeños gránulos en los ovocitos (Figura 23). La cepa *pgl-1(bn102)* es termosensible, es decir, para que pueda mostrar su fenotipo debe ser mantenida a 25°C. Por razones que no comprendemos cuando sometemos animales crecidos a 25°C al ayuno no es posible observar los gránulos de CGH-1, por lo que no fue posible analizar la formación de gránulos en condiciones de ayuno de animales *pgl-1(bn102)/gla-3(RNAi)*.

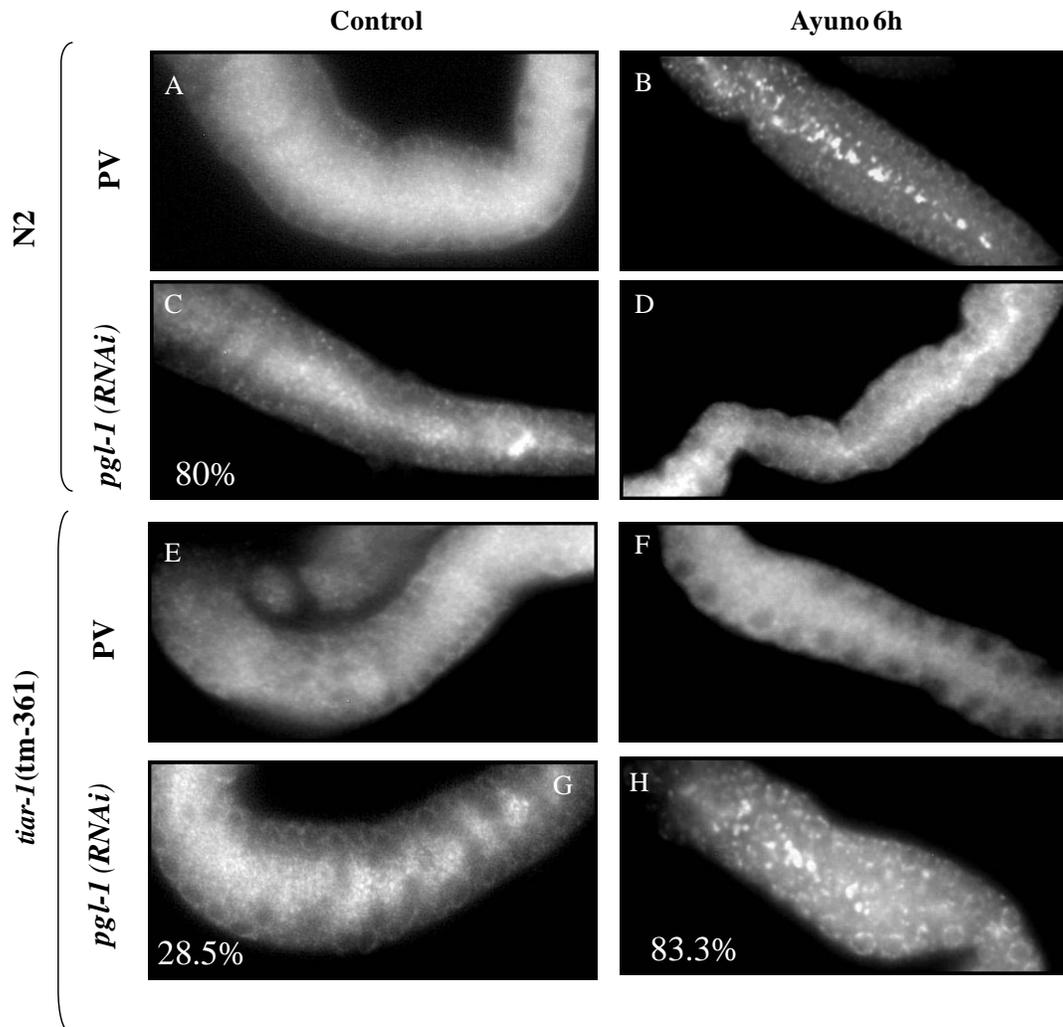


Figura 22. Los gránulos que se forman debido al silenciamiento del gen *pgl-1* dependen parcialmente de la proteína TIAR-1. Animales adultos de 1 día de la cepa silvestre (A-D) o de la mutante *tiar-1(tm361)* (E-H) control (PV) o RNAi en *pgl-1* fueron sometidos a condiciones control (A,C,E,G) y de ayuno por 6 h (B,D,F,H). Después de que los animales fueron tratados, sus gónadas fueron disecadas, fijadas e inmunoteñidas con un anticuerpo contra CGH-1. La parte distal del brazo de la gónada se muestra a la izquierda en cada fotografía. En cada panel se indica el porcentaje de animales que presentan el fenotipo de la fotografía.

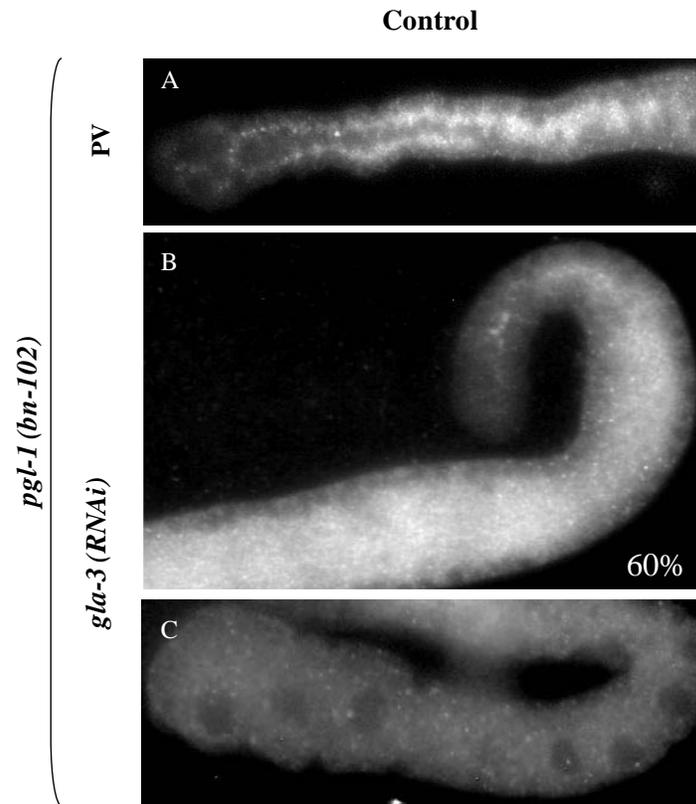


Figura 23. Los gránulos que se forman debido al silenciamiento del gen *pgl-1* dependen parcialmente de la proteína GLA-3. Animales adultos de 1 día de la cepa mutante *pgl-1(bn102)* control (PV) (A) o RNAi en *gla-3* (B, C) fueron disecados. Las gónadas fueron fijadas e inmunoteñidas con un anticuerpo contra CGH-1. (C) Se muestra un acercamiento de los ovocitos. Se indica el porcentaje de animales que presentan el fenotipo de la fotografía.

Los resultados obtenidos hasta el momento sugieren que los gránulos que se forman como resultado del silenciamiento de los genes *cey-2* y *pgl-1* tienen una naturaleza parecida a la de los gránulos de estrés ya que su formación depende parcialmente de proteínas nucleadoras de este tipo de gránulos (TIAR-1 y TTP) (Figura 24); sin embargo debido a que la dependencia de estas proteínas es parcial probablemente existan proteínas alternas que contribuyan a su formación o quizá no se trate de un solo tipo de gránulo.

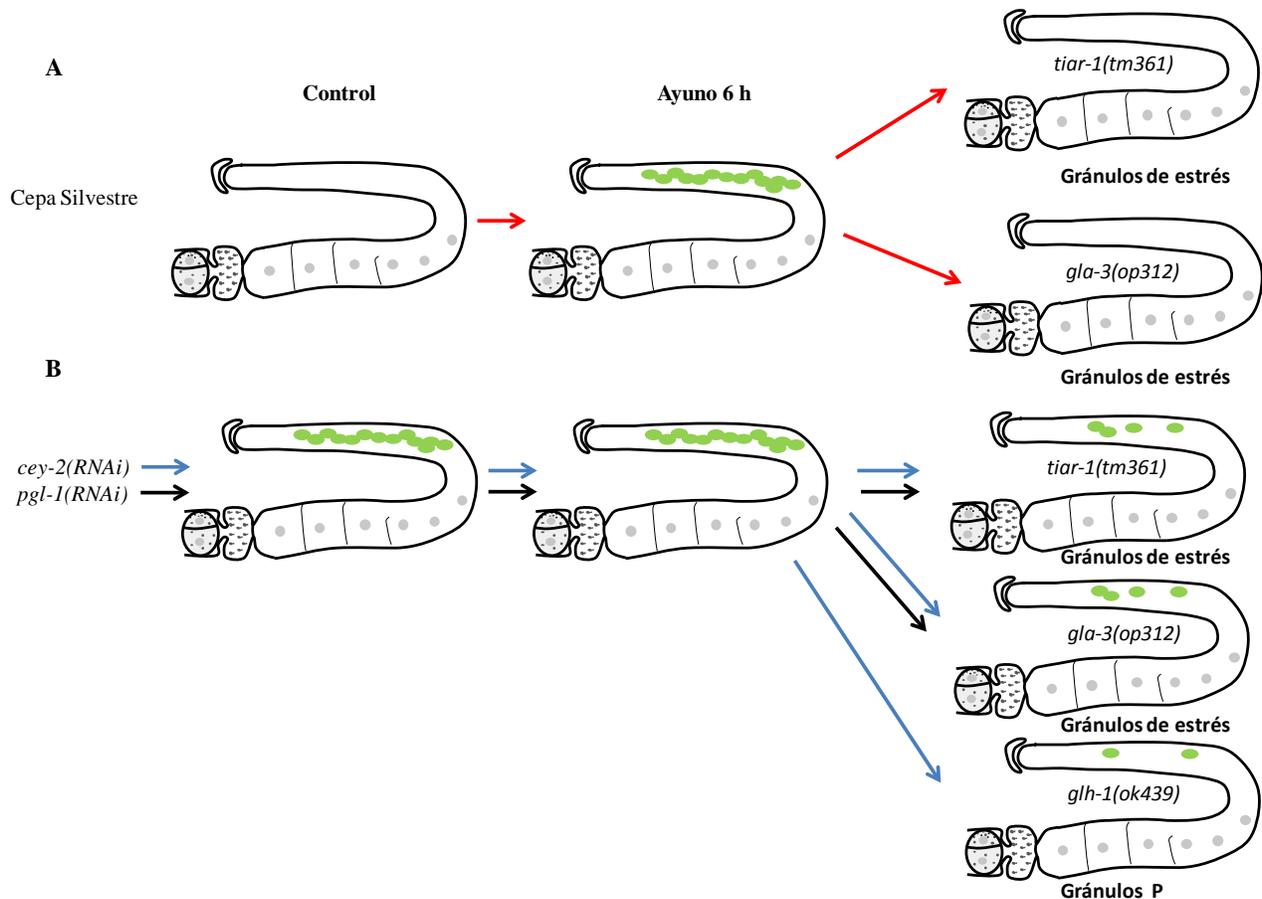


Figura 24. Los gránulos que se forman debido al silenciamiento de los genes *cey-2* y *pgl-1* dependen parcialmente de proteínas nucleadoras de gránulos de estrés como TIA-1 y TTP. Se esquematiza la formación de gránulos de CGH-1 en el centro de la gónada en condiciones control y de ayuno por 6 h en la cepa silvestre (A) y como resultado del silenciamiento de *cey-2* y *pgl-1* (B). En la cepa silvestre se forman gránulos en el centro de la gónada después de un ayuno de 6 h, dichos gránulos son dependientes de las proteínas TIAR-1/TIA-1 y GLA-3/TTP ya que mutantes de dichos genes son incapaces de formarlos. El silenciamiento de los genes *cey-2* y *pgl-1* induce la formación de gránulos de CGH-1 aún en condiciones control. Dichos gránulos permanecen cuando los animales son sometidos al ayuno. La formación de estos gránulos se afecta negativamente cuando se silencian los genes *tiar-1* y *gla-3* (en el caso de *pgl-1(RNAi)*) y además *glh-1* (en el caso de *cey-2(RNAi)*). Flechas rojas: cepa silvestre. Flechas azules: *cey-2(RNAi)*. Flechas negras: *pgl-1(RNAi)*. Se indican las cepas utilizadas así como el tipo de gránulo del cual son consideradas marcadoras estas proteínas o sus homólogos.

5.2.4 DISCUSIÓN

Los genes analizados en este trabajo codifican para proteínas que se asocian con algún tipo de gránulo de RNA en *C. elegans* u otros organismos. Como se ha mencionado antes, los gránulos de RNA han sido implicados de manera importante en la regulación post-transcripcional del RNAm [65]. El desarrollo de los organismos depende de la ejecución coordinada de programas específicos de expresión génica de manera temporal y espacialmente regulada. Estos programas son regulados a nivel transcripcional y postranscripcional. Específicamente la gónada de *C. elegans* requiere de una compleja regulación postranscripcional de la expresión génica. La importancia de este tipo de control se ve reflejado en el elevado número de proteínas de regulación de RNA que juegan papeles importantes en el correcto desarrollo y función de la línea germinal y en la embriogénesis [10].

A los gránulos de estrés se les ha dado un papel importante en la regulación de la traducción de RNAs debido a que muchos de sus componentes son represores traduccionales y su formación correlaciona en muchos casos con un descenso en la tasa global de traducción. En *C. elegans*, en respuesta a diferentes tipos de estrés ambiental, se ha observado la presencia de grandes complejos citoplasmáticos RNPs lo cual puede sugerir una regulación traduccional [84].

Al silenciar los genes *car-1*, *pgl-1*, *mex-5*, *cey-2*, observamos la formación de gránulos de CGH-1 en la gónada de *C. elegans* aun en condiciones control (ausencia de estrés) (Figura 16). Este comportamiento puede estar relacionado con la regulación directa de la proteína CGH-1, es decir, que estos genes puedan ser reguladores de la expresión y/o localización de esta proteína ocasionando con ello que al no estar presentes observemos una deslocalización de la misma. En referencia a esto podemos mencionar evidencias de que la proteína CAR-1 se asocia con CGH-1 en los ovocitos formando un complejo ribonucleoproteico dependiente de RNA [109]. Además ortólogos de las proteínas Y-box CEY-2, CEY-3 y CEY-4 en *Xenopus* y *Drosophila* [118-120] son

proteínas que se ha demostrado se asocian a CGH-1 [109]. En este trabajo no estudiamos si la expresión de CGH-1 se afecta por el silenciamiento de los genes *car-1* o *cey-2* pero este tema sería interesante de abordar en trabajos futuros.

Otra posibilidad que existe es que la alteración en la formación de gránulos sea parte de un proceso general desencadenado por la ausencia de un gen indispensable ya que los genes cuyo silenciamiento origina una alteración en la formación de gránulos codifican para proteínas de unión a RNA importantes en la regulación del desarrollo y correcto funcionamiento de la línea germinal (Anexo 2). Sin embargo, no podemos descartar que este fenómeno se deba a procesos independientes en el caso de cada gen. Esta idea es apoyada por el hecho de que la formación de gránulos varía en tamaño y localización en la gónada (centro y/u ovocitos) dependiendo del gen que esté siendo silenciado (Figura 16).

En este trabajo hemos observado una correlación entre la formación de gránulos (Capítulo 2) en condiciones normales con una elevada apoptosis fisiológica (Capítulo 1). También observamos que hay una correlación entre la formación de gránulos y la baja respuesta a la apoptosis bajo condiciones de estrés. Nuestros resultados nos permiten especular sobre una posible explicación a este fenómeno. Durante el ayuno los genes *mex-5*, *pgl-1*, *cey-2*, *car-1* bajan sus niveles de expresión (Figura 13), lo cual sería equivalente al silenciamiento que generamos mediante la técnica de RNAi. En ambos casos (ayuno y RNAi de estos genes) se induce un aumento en la apoptosis y la formación de gránulos de CGH-1 en el centro de la gónada. Basados en esto podemos sugerir que el incremento en la apoptosis fisiológica observado con el silenciamiento de estos genes es la consecuencia de la formación de estas estructuras en la gónada o el reclutamiento de genes específicos en estos gránulos. Cuando los animales son sometidos al ayuno, la gónada no es capaz

de incrementar el número de cuerpos apoptóticos debido a que la respuesta al estrés ya ha sido desencadenada.

Existen dos casos que merecen ser discutidos fuera de estas afirmaciones. Las inmunotinciones de animales RNAi para el gen *ife-1* muestran que el silenciamiento de este gen induce la formación de gránulos en el centro de la gónada aun en condiciones normales de alimentación. Algunos estudios indican que IFE-1, un factor de traducción específico de la línea germinal en *C. elegans*, es requerido para promover el control traduccional temporal y espacialmente durante pasos críticos en la gametogénesis [121] por lo que su ausencia podría generar una disminución en la traducción. Esto apoya una posible conexión entre la formación de gránulos y la ausencia de esta proteína, ya que el arresto traduccional origina la formación de agregados ribonucleoproteicos.

El siguiente caso es el del gen *gla-3*, un miembro de la familia de proteínas con dedos de zinc del tipo TIS-11 [99]; es el homólogo en mamíferos de la tristetraprolina (TTP), la cual es una proteína de unión a RNA que interactúa con las regiones 3' no traducidas de RNA mensajeros ricos en AU, regulando negativamente su expresión [122-124]. La sobreexpresión de TTP induce la formación de gránulos de estrés aún en condiciones normales, además esta proteína es importante para el reclutamiento de RNA mensajeros y la formación de partículas ribonucleoproteicas[125]. En la figura 18 podemos observar que la ausencia del gen *gla-3* impide la formación de gránulos en el centro de la gónada en condiciones de ayuno y choque de calor. Los animales RNAi en *gla-3* muestran elevados niveles de apoptosis fisiológica (Figura 8,[99]) y no forman gránulos en condiciones control ni en estrés (Figura 18). En el 2006, Kritikou y colaboradores estudiaron la participación de este gen en la apoptosis fisiológica y concluyeron que GLA-3 participa en la cascada de señalización de MAPK y que directamente interactúa con MPK1, un regulador meiótico

esencial [99]. Sin embargo, la participación de *gla-3* en la inducción de apoptosis por ayuno puede estar relacionada con la incapacidad de los animales para formar gránulos en condiciones de estrés.

A diferencia de mamíferos en *C. elegans* no existe una clasificación clara de los gránulos de RNA. Sin embargo los gránulos presentes en la línea germinal de este nematodo comparten algunos componentes [82]. Los resultados obtenidos en este trabajo (Figuras 19,20 y 21) sugieren que los gránulos que se forman como resultado del silenciamiento de *cey-2* y *pgl-1* tienen una naturaleza similar a la de los gránulos de estrés (dada su dependencia parcial de TIAR-1 y GLA-3), pero a su vez requieren también de la correcta formación y mantenimiento de los gránulos P (dependencia de GLH-1) (Figura 24). Análisis posteriores como experimentos utilizando cicloheximida y puromicina, dobles mutantes de estos genes o inmunotinciones con nuevos marcadores de gránulos podría esclarecer mejor la verdadera naturaleza de estos gránulos.

5.2.5 CONCLUSIONES

- El silenciamiento de los genes *car-1*, *mex-5*, *cey-2*, *pgl-1* e *ife-1* trae como consecuencia la formación de de gránulos de CGH-1 aun en ausencia de estrés en la gónada de *C. elegans*.
- GLA-3, uno de los homólogos de TTP en *C. elegans*, se requiere para la formación de gránulos de CGH-1 en el centro de la gónada en condiciones de ayuno y choque de calor.
- Los gránulos que se forman como resultado del silenciamiento de *cey-2* y *pgl-1* dependen parcialmente de proteínas nucleadoras de gránulos de estrés como TIA-1 y TTP, además de proteínas que se requieren para la formación de gránulos P como es el caso de GLH-1.

CAPÍTULO 3: Mecanismo de inducción de apoptosis durante el ayuno

5.3 “LIN-35/Rb causes starvation-induced germ cell apoptosis via ced-9/Bcl-2 downregulation in *C. elegans*”

Hasta el momento hemos identificado un grupo de genes que codifican para proteínas de unión a gránulos de RNA que participan en la inducción de apoptosis (Capítulo 1) y en la formación de gránulos (Capítulo 2). Sin embargo el mecanismo por el cual se induce la apoptosis como consecuencia del ayuno no ha sido esclarecido. Bajo condiciones de estrés la apoptosis de las células germinales puede ser desencadenada por diferentes vías. Cuando los animales son expuestos a condiciones que involucran un daño al DNA se activa la vía de CEP-1/p53 [52]. Por otro lado cuando los animales son expuestos a condiciones que no comprometen la integridad génica como el choque de calor, y el estrés osmótico y oxidativo se ve involucrada la activación de la vía de las MAPKKs así como la participación de los genes *egl-1/BH3* y *abl-1*. Sin embargo la inducción de apoptosis por ayuno no requiere la activación de ninguno de los mecanismos antes mencionados.

Durante el ayuno se observa la formación de gránulos al centro de la gónada, lo cual sugiere la participación de la regulación traduccional en estas condiciones. Utilizando perfiles polisomales encontramos que el ayuno por 6 h reduce la tasa general de traducción, lo cual afecta diferencialmente a los RNAs de la maquinaria de apoptosis y a algunos de sus reguladores. Además observamos que durante el ayuno la expresión de LIN-35/Rb se incrementa generando con ello una regulación negativa sobre *ced-9/Bcl-2* lo cual combinado con una traducción ineficiente genera una reducción importante en los niveles de CED-9/Bcl-2. Aunado a esto, el RNAm *dpl-1/DP* incrementa sus niveles generando con ello una regulación positiva de CED-4/Apaf-1, reforzando así el desencadenamiento de la muerte celular bajo estas condiciones.

Molecular and Cellular Biology

LIN-35/Rb Causes Starvation-Induced Germ Cell Apoptosis via CED-9/Bcl2 Downregulation in *Caenorhabditis elegans*

L. I. Láscarez-Lagunas, C. G. Silva-García, T. D. Dinkova and R. E. Navarro

Mol. Cell. Biol. 2014, 34(13):2499. DOI: 10.1128/MCB.01532-13.

Published Ahead of Print 21 April 2014.

Updated information and services can be found at:
<http://mcb.asm.org/content/34/13/2499>

These include:

REFERENCES

This article cites 68 articles, 24 of which can be accessed free at: <http://mcb.asm.org/content/34/13/2499#ref-list-1>

CONTENT ALERTS

Receive: RSS Feeds, eTOCs, free email alerts (when new articles cite this article), [more»](#)

Information about commercial reprint orders: <http://journals.asm.org/site/misc/reprints.xhtml>
To subscribe to to another ASM Journal go to: <http://journals.asm.org/site/subscriptions/>

Journals.ASM.org

LIN-35/Rb Causes Starvation-Induced Germ Cell Apoptosis via CED-9/Bcl2 Downregulation in *Caenorhabditis elegans*

L. I. Láscarez-Lagunas,^a C. G. Silva-García,^a T. D. Dinkova,^b R. E. Navarro^a

Departamento de Biología Celular y Desarrollo, Instituto de Fisiología Celular,^a and Departamento de Bioquímica, Facultad de Química,^b Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

Apoptosis is an important mechanism for maintaining germ line health. In *Caenorhabditis elegans*, germ cell apoptosis occurs under normal conditions to sustain gonad homeostasis and oocyte quality. Under stress, germ cell apoptosis can be triggered via different pathways, including the following: (i) the CEP-1/p53 pathway, which induces germ cell apoptosis when animals are exposed to DNA damage; (ii) the mitogen-activated protein kinase kinase (MAPKK) pathway, which triggers germ cell apoptosis when animals are exposed to heat shock, oxidative stress, or osmotic stress; and (iii) an unknown mechanism that triggers germ cell apoptosis during starvation. Here, we address how starvation induces germ cell apoptosis. Using polysomal profiling, we found that starvation for 6 h reduces the translationally active ribosomes, which differentially affect the mRNAs of the core apoptotic machinery and some of its regulators. During starvation, *lin-35/Rb* mRNA increases its expression, resulting in the accumulation of this protein. As a consequence, LIN-35 downregulates the expression of the antiapoptotic gene *ced-9/Bcl-2*. We observed that the reduced translation of *ced-9/Bcl-2* mRNA during food deprivation together with its downregulation drastically affects its protein accumulation. We propose that CED-9/Bcl-2 downregulation via LIN-35/Rb triggers germ cell apoptosis in *C. elegans* in response to starvation.

Many germ cells (known in many organisms as nurse cells) are needed to produce a single oocyte. Once they have served their purpose, nurse cells are eliminated by apoptosis. An unsolved question in the germ cell field is how apoptosis is triggered to produce and sometimes protect germ cells. Adult *Caenorhabditis elegans* nematodes that encounter food deprivation enter a diapause stage that allows them to survive for a few months and put off fertility (1, 2). Later, when animals are subjected to better conditions, they exit adult diapause and restore fertility. Germ cell apoptosis is a key element to protect gonads from starvation, as exhibited by mutants of the caspase CED-3 that are unable to restore fertility after adult diapause (1). Previously, we found that starvation triggers germ cell apoptosis (3), and in this study we proposed a model to explain how this response is regulated in *C. elegans*.

In *C. elegans*, apoptosis occurs in somatic tissues during embryonic and postembryonic development (developmental apoptosis) (4, 5) and in the adult hermaphrodite gonad (physiological germ cell apoptosis) (6). In this nematode, apoptosis is executed via a conserved pathway that consists of the proteins CED-3 (a caspase), CED-4 (APAF1-like adaptor protein), and CED-9 (BCL2 ortholog) (reviewed in references 7 and 8). Developmental apoptosis is initiated when the protein EGL-1 (BH3-only) disrupts the CED-9/CED-4 complex, thereby triggering CED-3 activation.

The mechanism that induces physiological germ cell apoptosis is independent of EGL-1 (6) and is partially induced by the ortholog of the human retinoblastoma gene (Rb) *lin-35*, which downregulates *ced-9* (9). In contrast, the *C. elegans* DP ortholog, *dpl-1*, induces physiological germ cell apoptosis via *ced-4* upregulation (9). Genotoxic agents activate germ cell apoptosis via EGL-1, CEP-1 (the p53 ortholog), and CED-13 (a BH3-only protein) (10–12). Furthermore, several conditions, including oxidative, osmotic, heat shock, and starvation stresses, can induce germ cell apoptosis via an EGL-1- and CEP-1-independent mechanism

(3). Oxidative, osmotic, and heat shock stresses induce apoptosis via the mitogen-activated protein kinase kinase (MAPKK) pathway (3). However, starvation induces germ cell apoptosis via a previously unknown mechanism.

Here, we examined how starvation affects the core apoptotic machinery genes and some of their regulators to induce apoptosis in the *C. elegans* germ line. We found that during starvation, *ced-9* expression is considerably downregulated, while *lin-35* and *dpl-1* are upregulated. The translation levels of several mRNAs, including some that encode the core apoptotic machinery, like *ced-9*, as interpreted from their distribution along polyribosomal profiles, are reduced. Unexpectedly, *lin-35* mRNA is translated efficiently upon fasting, resulting in a considerable increase in its protein accumulation.

The results of the current study suggest a model during starvation in which a considerable increase in LIN-35 expression accounts for *ced-9* mRNA downregulation, which, combined with the less efficient translation of its mRNA, dramatically reduced the CED-9 protein levels, subsequently inducing germ cell apoptosis.

(This research was conducted by L. I. Láscarez-Lagunas in partial fulfillment of the requirements for a Ph.D. degree in biochemical science from the Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico.)

Received 21 November 2013 Returned for modification 15 December 2013
Accepted 16 April 2014

Published ahead of print 21 April 2014

Address correspondence to R. E. Navarro, rnavarro@ifc.unam.mx.

Copyright © 2014, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/MCB.01532-13

MATERIALS AND METHODS

General methods and strains. *C. elegans* strains were cultured at 20°C as previously described (13). The wild-type (wt) strain *C. elegans* var. Bristol (N2) was used in this study. The alleles used were as follows: *lin-35*(n745) (14), *dpl-1*(n3643) (15), *ced-4*(n1162) (16), and *efl-1*(se1) (17). All of the strains were obtained from the *Caenorhabditis* Genetics Center (CGC).

Stress conditions and quantification of germ cell apoptosis. For the starvation experiments, 1-day-old animals were transferred onto nematode growth medium (NGM) plates with or without bacteria and incubated for 6 h at 20°C. The animals were anesthetized using 40 mM sodium azide and mounted onto slides using 2% agarose pads; the cell corpses were then visualized using Nomarski [for *ced-1*(RNAi) experiments] or fluorescence microscopy (for *ced-1::gfp* strains).

Statistical analyses were performed using Prism (GraphPad Software). All *t* tests were two-tailed unpaired *t* tests (Mann-Whitney).

RNAi experiments. RNA interference (RNAi) experiments were performed by feeding as previously described (18). Constructs for the *ced-1*, *ced-3*, *lin-35*, *dpl-1*, and *efl-2* genes were obtained from the *C. elegans* RNAi, version 1.1, feeding library (Open Biosystems). The *ced-9* gene was cloned using the oligonucleotides 5'-GGAATTCCTCCGATATTCGAGAAG AAGCAGC-3' and 5'-GGGGTACCCCTTACTTCAAGCTGAACATCA TC-3'. The product was digested with EcoRI and KpnI and cloned into a feeding vector (PD129.36), and the resulting plasmid was transformed into *Escherichia coli* strain HT115 (DE3). RNAi experiments for *ced-1*, *ced-3*, *lin-35*, *dpl-1*, and *efl-2* were performed at 20°C, and RNAi experiments for *ced-9* were performed at 25°C. Empty plasmid was used as a control, as suggested by Conte and Mello (19).

Quantitative expression analyses. Total RNA was isolated from approximately 100 gonads dissected from 1-day-old adult animal hermaphrodites using TRIzol (Invitrogen) and purified via chloroform extraction and isopropanol precipitation. Then, 100 ng of total RNA was treated with DNase I (New England BioLabs) and reverse transcribed into cDNA using Im-Prom II reverse transcriptase (Promega) and oligo(dT) primers. Quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR) was performed with primers designed specifically for each gene using the Primer Express, version 2.0, program (Applied Biosystems). Amplification and detection were performed using an ABI Prism 7000 detection system (Applied Biosystems) with the Power SYBR green PCR master mix (Applied Biosystems). γ -Tubulin (*tbg-1*) was used as an external control. The test gene threshold cycle (C_T) values were normalized to *tbg-1*. The C_T values and relative expression levels were derived using the comparative C_T method (20). The primers used in this study were as follows: for *tbg-1*, 5'-CCTG TTGTCGATCCAAATGA-3' and 5'-AACCCGAGAAGCAGTTGAAA-3'; for *ced-3*, 5'-CGGAGTCTCGATTCTTC-3' and 5'-CGGAGTTC CTGCATTTCTTC-3'; for *ced-4*, 5'-AATTCTCGAGCAGCGTCTTC-3' and 5'-ATGAACGACGGAATTTTTGG-3'; for *ced-9*, 5'-AAACGGAAT GGAATGGTTG-3' and 5'-AATTTCCGCGTGCTTCTT-3'; for *lin-35* 5'-ACTGGAATTCGTCCTCACTTG-3' and 5'-TCCGCTCATCAATACT TCCA-3'; for *dpl-1*, 5'-AGCCACATCAAGTGCAACAG-3' and 5'-ACC ACCTGGAGCAACAATTC-3'; for *efl-1* 5'-GGCAAAAGCGACGAATCT AC-3' and 5'-CCGCTTTCCTACTGTATCAT-3'; and for *efl-2* 5'-AGCA ATCACTTGGGCTCATT-3' and 5'-ACGCGTCTTTCGAGATATT-3'.

Polysomal profiles. Polysomes and polysomal RNA were obtained from N2 1-day-old animals. Control animals or animals starved for 6 h were grown at 20°C on egg plates, collected in M9 medium, and crushed in liquid N₂. Liquid N₂-frozen pellets equivalent to 0.5 g of animals were homogenized in four volumes of lysis buffer (300 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl [pH 8.0], 10 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 200 mg of heparin/ml, 400 U of RNasin/ml, 2.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, and 0.2 mg of cycloheximide/ml). The lysate was centrifuged at 27,000 × *g* at 4°C for 15 min, and 0.5-ml aliquots of the supernatant were loaded onto an 11-ml 15 to 60% sucrose gradient in gradient buffer (140 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl [pH 8.0], 10 mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol [DTT], 0.2 mg/ml cycloheximide) and centrifuged in a Beckman SW41Ti rotor at 38,000 rpm at 4°C for 2 h. The gradients were then fractionated with continuous

monitoring at an absorbance of 260 nm, and 1-ml fractions were collected.

RNA isolation from sucrose gradients and RT-PCR. For RNA isolation from the sucrose gradients, each fraction was treated with 25 μ l of a 10% solution of sodium dodecyl sulfate (SDS) and 1 μ l of 10 mg/ml proteinase K at 37°C for 30 min, followed by phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1) extraction and chloroform-isoamyl alcohol (24:1). The samples were precipitated with an equal volume of isopropanol and LiCl (1.5 M final concentration). For each sample, 2 μ g of RNA was treated with DNase I (New England BioLabs) and then subjected to reverse transcription using oligo(dT) primers and Im-Prom II reverse transcriptase (Promega). Equal amounts of cDNA were used as templates for gene-specific PCR with the appropriate primers. The primers used were the following: for *act-5*, 5'-CGCCTCCTCCTCCTCCCTC-3' and 5'-GGTAG GTGGTCTCGTGATTCC-3'; for *glh-4*, 5'-GGAATCTTGCTTTCTT GATACCATTTC-3' and 5'-GGGGTACCCTAAACAGCACAGTTTG-3'; for *ced-3*, 5'-GAGCAAGATCTCGTTCTCGATCG-3' and 5'-GTCGAAA ACACGGCTTATGGTTG-3'; for *ced-4*, 5'-GCCGATGCCTGTTGGAGA AAAA-3' and 5'-CCTATTTCAAGAAGACGCTGCTCG-3'; for *ced-9*, 5'-GGAATTCCTCGATATTCGAGAAGAAGCAGC-3' and 5'-GGGTACCC TTTACTTCAAGCTGAACATCATC-3'; for *lin-35*, 5'-CGGAATTCCTG TAAATTAACCTCGTACTC-3' and 5'-GAAGATCTTCTCGTTTGTG TGGAC-3'; for *dpl-1*, 5'-TCTATGAACCTTCAACAAGCCAAA-3' and 5'-AGACAACCTCTGTGCACTTGATG-3'; for *efl-1*, 5'-GGCACACA AGTTCGGCTCAGTGA-3' and 5'-CATCATCATTGATCGTCCGCCG-3'; for *efl-2*, 5'-GTCAAATCTCACGCGTTGCTCTT-3' and 5'-GTTTCC AAATCCTCGGTATCAATT-3'.

Relative nonpolysomal (NP) RNA or polysomal (P) RNA content was calculated as NP RNA/(NP RNA + P RNA) or P RNA/(NP RNA + P RNA), respectively, and was determined from three independent biological samples (21).

Western blot analysis. For the Western blot analysis, 100 hermaphrodites from the indicated backgrounds were grown at 20°C or 25°C and collected and washed in phosphate-buffered saline (PBS). For protein extraction, the samples were boiled for 5 min and centrifuged at 13,000 rpm for 1 min, and the resulting supernatant was loaded onto 10% or 8% polyacrylamide gels for CED-3, CED-4, CED-9, or LIN-35 protein detection. The gels were transferred onto an Immobilon-P polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Millipore) according to standard procedures. The blots were initially incubated using commercial antibodies for CED-3 (1:500) (Cc-20, sc-9192; Santa Cruz Biotechnology), CED-4 (1:750) (Cn-21, sc-9193; Santa Cruz Biotechnology), CED-9 (1:500) (ce-280, sc-33737; Santa Cruz Biotechnology), or LIN-35 (1:500) (cN-18, sc-9273; Santa Cruz Biotechnology). The secondary antibody was horseradish peroxidase-conjugated (HRP)-conjugated donkey anti-goat antibody (1:10,000) (Santa Cruz Biotechnology) for CED-3, CED-4, and LIN-35 and HRP-conjugated goat anti-rabbit antibody (1:1,000) (Pierce) for CED-9. Bound antibody was detected using a Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate kit (Pierce). Anti-CED-3 antibody detected several bands in the Western blot analyses. Although all of the bands were reduced after *ced-3* silencing, only one band was absent, which corresponded to the predicted molecular mass of CED-3 (56.6 kDa) (see Fig. 3A). Silencing of *ced-3* was also evaluated by RT-PCR, which showed a 70% decrease in its mRNA (see Fig. 5C). Using anti-CED-4 antibody, only one band was consistent with the predicted molecular mass of CED-4 (62.9 kDa). This band was absent in protein extracts from *ced-4*(n1162) mutant animals (see Fig. 3B). Using anti-CED-9 antibody, we detected several bands that were completely absent in the homogenates obtained from *ced-9*(RNAi) animals (see Fig. 3C). However, only one was consistent with the predicted molecular mass of CED-9 (32 kDa), suggesting that the smaller bands were either modifications of CED-9 or its degradation products. Silencing of *ced-9* was also evaluated by RT-PCR, and we observed an 80% decrease in its mRNA (see Fig. 5C). Anti-LIN-35 antibody detected several bands in our experiments; however, only the 110.9-kDa band was absent in the *lin-35*(n745) mutant protein extracts (see

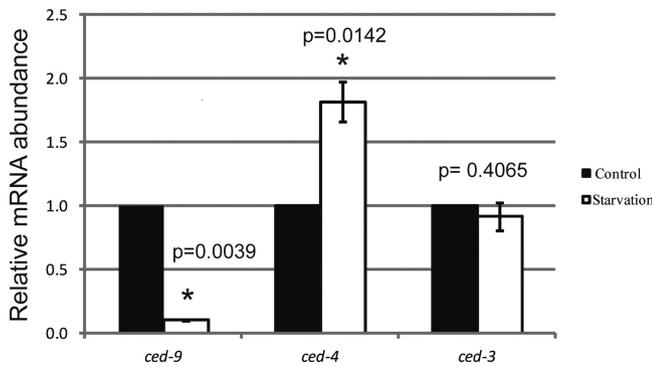


FIG 1 *ced-9* mRNA is downregulated during starvation. qRT-PCR analysis of the indicated genes from the gonads of well-fed (control) or 6-h-starved 1-day-old wild-type animals. The graph shows the average relative abundances of each mRNA from three independent experiments, each performed in triplicate. The error bars represent the standard errors. The *P* values were determined using a paired and nonparametric test (Wilcoxon). Significance is indicated by an asterisk ($P < 0.05$).

Fig. 4C). A monoclonal antibody raised in mouse against α -tubulin (T9026; Sigma) was used as a loading control. The ImageJ software program was used to quantify the bands.

Bioinformatics analysis of differentially translated mRNAs. Sequences of the 3' untranslated region (UTR) were obtained from the UTRome.org database (22). The free folding energy was calculated using DINAMelt (23). The open reading frames (ORFs) and transcript lengths were obtained from WormBase, version WS236.

RESULTS

***ced-9* expression is downregulated during starvation.** The exposure of 1-day-old wild-type (wt) adult animals to 6 h of bacterial deprivation triggers germ cell apoptosis via an unknown mechanism. The gonads of 6-h-starved animals appear healthy despite their increased germ cell apoptosis (3). To investigate the mechanisms that trigger starvation-induced apoptosis in the *C. elegans* gonad, we studied the expression of genes that encode the core apoptotic machinery under starvation conditions. Extracted RNA from the extruded gonads of well-fed or 6-h-starved 1-day-old wt animals was used for quantitative real-time reverse transcription-PCR (qRT-PCR) for *ced-9*, *ced-4*, and *ced-3*. We found that after 6 h of starvation, *ced-9* mRNA expression was considerably reduced (10-fold), *ced-4* mRNA was on average higher (1.8-fold), and *ced-3* mRNA was not affected (Fig. 1). These data show that during starvation, the adjustments in the expression of genes encoding core apoptotic machinery corresponded with the initiation of apoptosis.

Starvation slows translation. The mRNA translation rate is commonly affected during stress (24, 25), but it has not been well studied in *C. elegans*. Thus, we examined the translational status during starvation using polysomal profiling in 0.5 g of well-fed or 6-h-starved 1-day-old wt adult animals (see Materials and Methods). The polysomal profiles were divided into three regions according to the absorbance at 260 nm (mainly ribosomal RNAs 18S and 28S): translationally inactive, which included mostly untranslated mRNAs present in the mRNPs (TI; fractions 1 to 4); monosomes (M, fraction 5); and translationally active (TA; polysomes; fractions 6 to 11) (Fig. 2A and B). TA fractions were further subdivided into light polysomes (LP; fractions 6 to 8) and heavy polysomes (HP; fractions 9 to 11) (Fig. 2A and B). Polysomal profiling

showed that under conditions of starvation, there was an overall reduction in the number of polysomes bound to mRNAs and a slight increase in the monosomal fraction, suggesting that starvation reduces overall translation (Fig. 2A and B).

To determine how translation is affected under starvation, we analyzed nonpolysomal (NP) and polysomal (P) RNA levels as previously reported (21). The nonpolysomal RNA included mRNP complexes of <80S (40S and 60S ribosomal subunits) and 80S monosomes (fractions 1 to 5), and the polysomal RNA included mRNAs with two or more ribosomes (fractions 6 to 11). The relative proportion of RNA in NP and P complexes was determined after the precipitation of RNA from the mentioned fractions. The P RNA content in starved animals (0.26 ± 0.02) was significantly lower ($P < 0.0001$) than that determined for animals grown under control conditions (0.63 ± 0.01). Furthermore, the NP content of starved animals (0.74 ± 0.02) was significantly higher ($P < 0.0001$) than that of control animals (0.37 ± 0.01), which is consistent with reduced translation during starvation (Table 1).

To test whether the reduced translation during starvation affected housekeeping genes, we analyzed the polysomal distribution of *act-5* mRNA, which encodes actin (26). Under control conditions, 16% of the *act-5* mRNA was present in the TI and M fractions (fractions 2 to 5), while 84% was enriched in the polysomal fractions (fractions 6 to 11). During starvation, we detected an enrichment of *act-5* mRNA (32%) in TI and M fractions (fractions 2 to 5), while 60% remained associated with polysomal fractions 6 to 11 (Fig. 2C). Although *act-5* mRNA was more associated with TI fractions during starvation, its presence in the TA fractions persisted, although at a lower level, indicating that the reduced translation induced by starvation affected this housekeeping gene.

Sucrose density gradients of extruded gonad extracts are difficult to use because *C. elegans* are very small (1 mm in length), and a fair number of animals are required for polysomal profiling. To overcome this technical difficulty, we determined whether a decrease in translation could occur in the gonad by examining a germ line-specific mRNA, *glh-4* (27). In well-fed animals, most of the *glh-4* mRNA (73%) was present in the TA fractions (fractions 7 to 11) (Fig. 2D). However, when the animals were starved, only 28% of the *glh-4* mRNA remained associated with these fractions (Fig. 2D). Furthermore, we observed a shift in *glh-4* mRNA to a lighter polysomal fraction (fraction 6; 17%), the M fraction (fraction 5; 15%), and the TI fractions (fractions 2 to 4; 40%) during starvation (Fig. 2D). These results demonstrate that the decrease in the translation during starvation occurs not only in somatic tissues but also in the germ line.

Next, we examined the polysomal distribution of *ced-9*, *ced-4*, and *ced-3* mRNAs. Under control conditions, 74% of the *ced-9* mRNA was present in TA fractions (fractions 7 to 11) (Fig. 2E). *ced-9* mRNA was not abundant during starvation (Fig. 1); however, the small amount that was present was severely affected, and only 5% of this transcript remained associated with fractions 7 to 11. Most of its mRNA was enriched in lighter polysomes (fraction 6; 72%), the M fraction (fraction 5; 7%), and the TI fractions (fraction 2 to 4; 16%) (Fig. 2E). These data show that the observed decrease in *ced-9* mRNA translation was consistent with the reduction in the overall translation during starvation.

Regarding the translation of *ced-4* mRNA, we found that under control conditions, 73% of this mRNA was present in TA fractions

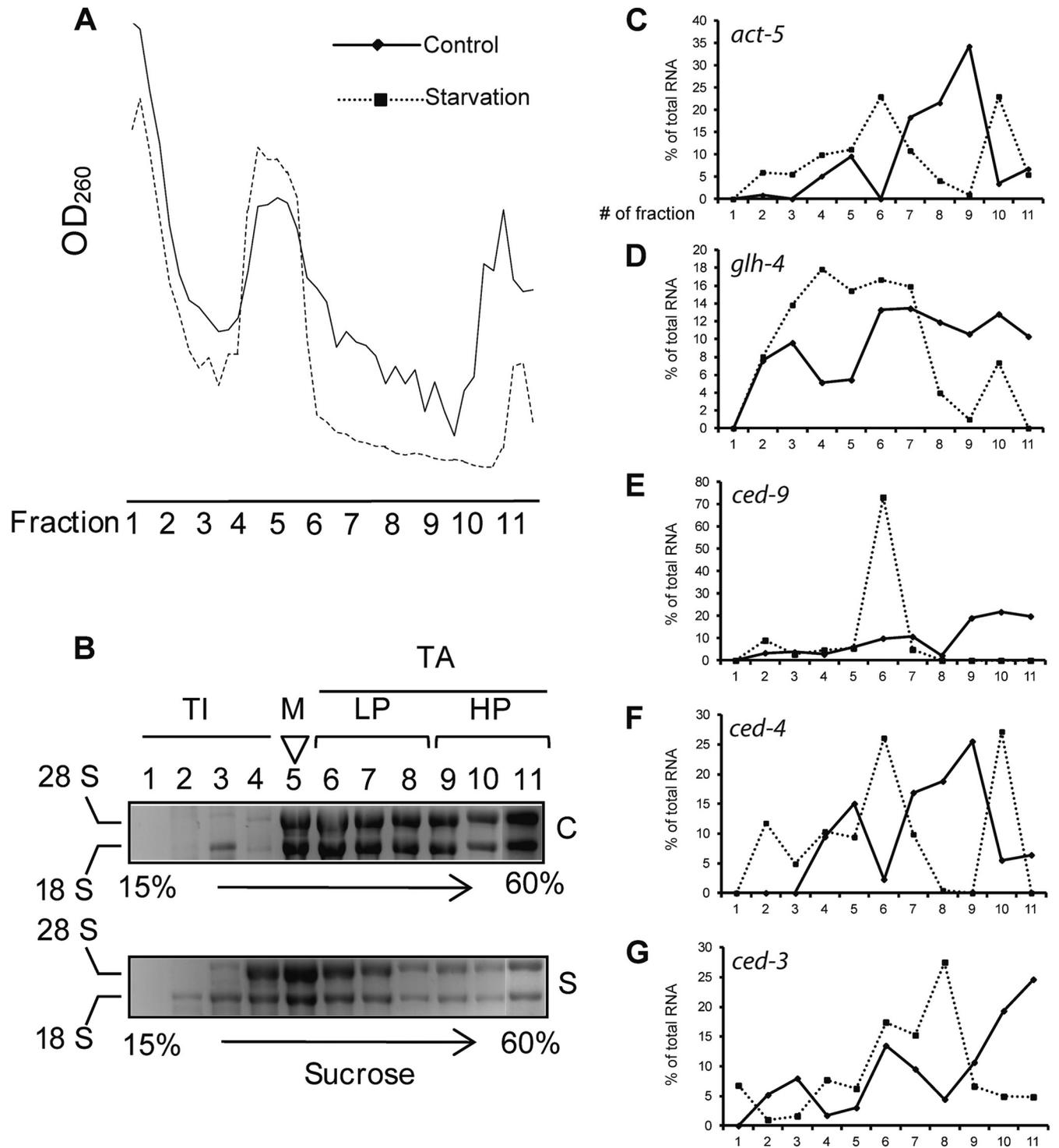


FIG 2 Starvation induces a decrease in translational rate in *C. elegans*. (A) A profile from the polysomal fractionation of 15 to 60% sucrose gradients of the extracts obtained from well-fed (control) or 6-h-starved 1-day-old wild-type animals as recorded at A_{260} . The profiles were divided into three principal regions: fractions 1 to 4, translationally inactive mRNPs (TI); fraction 5, monosomes (M); and fractions 6 to 11, translationally active (TA). Fractions 6 to 11 were in turn divided into fractions 6 to 8, which consisted of light polysomes (LP), and fractions 9 to 11, which consisted of heavy polysomes (HP). (B) rRNA fractionation analyses. RNA from control (C) and starved (S) animals was extracted for each fraction and subjected to electrophoresis on 1% agarose gels. The arrows indicate the sucrose density gradient. Fraction 11 was loaded in a different gel under the same conditions because the lack of space. (C to G) Polysomal distribution of the indicated mRNAs. RNA was extracted from each fraction, and cDNA was synthesized to perform PCR on the indicated gene. The relative mRNA levels were calculated from RT-PCR using densitometry. The graphs show the percentage of mRNA present in each fraction from the total amount of mRNA (sum of all fractions). OD₂₆₀, optical density at 260 nm.

TABLE 1 Relative RNA content in NP and P complexes

Condition	Relative RNA content ^a	
	NP fraction	P fraction
Control	0.37 ± 0.01	0.63 ± 0.01
Starvation	0.74 ± 0.02	0.26 ± 0.02
P value	<0.0001	<0.0001

^a The relative RNA content (total = 1) represents the average ± standard deviation from three independent biological samples. Relative nonpolysomal RNA (NP) or polysomal RNA (P) contents were calculated as NP RNA/(NP RNA + P RNA) and P RNA/(NP RNA + P RNA), respectively. The P value from each column was determined using an unpaired *t* test (Mann-Whitney).

(fractions 7 to 11). In contrast, only 38% of this mRNA remained associated with the same fractions during starvation (Fig. 2F). Furthermore, *ced-4* mRNA was enriched in lighter polysomes (fraction 6; 26%), monosomes (fraction 5; 9%), and TI fractions during starvation (fractions 2 to 4; 27%) (Fig. 2F). We conclude that the *ced-4* mRNA was also affected by the decreased translation rate observed during starvation.

We observed that 55% of *ced-3* mRNA was associated with HP fractions (fractions 9 to 11) under control conditions. In contrast, during starvation it was mostly associated with lighter polysomal fractions (fractions 6 to 8; 60%) (Fig. 2G), indicating that although starvation impaired *ced-3* mRNA translation, this impairment was less extreme than the mRNA shifting observed for *ced-9* and, to a lesser extent, *ced-4*.

Thus far, we have shown that starvation induces a reduction in the translation of *C. elegans*, which includes mRNAs that encode the housekeeping gene *act-5*, the germ line-specific gene *glh-4*, and apoptosis machinery genes *ced-9* and *ced-4*. However, *ced-3* mRNA continues to be translated under starvation.

CED-9 protein is undetectable during starvation. We investigated whether changes that occurred during starvation at the mRNA expression and translational levels reflected the accumulation of CED-3, CED-4, and CED-9 proteins using Western blot analyses. Extracts from 100 well-fed or 6-h-starved hermaphrodites of the indicated genetic backgrounds were used for Western blot analyses. The specificity of each antibody was tested using mutant or RNAi animals (see Materials and Methods).

Under starvation conditions, CED-3 did not show a change in its protein levels based on its procaspase molecular mass (56.6 kDa) (28, 29) (Fig. 3A). This result was consistent with our earlier observations of the presence of *ced-3* mRNA in polysomal fractions and no changes in its mRNA expression (Fig. 1 and 2G). In the case of CED-4, we observed that its protein level did not seem to change during starvation (Fig. 3B). We believe that the reduced *ced-4* mRNA translation efficiency during starvation (Fig. 2F) was most likely compensated for by the higher level of mRNA accumulation or increased mRNA stability (Fig. 1). Another possible explanation is that the CED-4 protein is stable and maintains its levels during starvation.

In contrast, CED-9 protein was dramatically reduced as a consequence of starvation (Fig. 3C). This result was consistent with the decrease in *ced-9* mRNA expression (Fig. 1) and translational rate (Fig. 2E) under starvation. We concluded that although CED-3 and CED-4 proteins do not show significant changes in their expression levels during starvation, the accumulation of the antiapoptotic protein CED-9 dramatically decreases under this

condition. We suggest that the decreased expression of CED-9 under starvation could trigger apoptosis.

LIN-35 promotes starvation-induced apoptosis via negative regulation of *ced-9* expression. We decided to study how previously demonstrated *ced-9* negative regulation in response to starvation is achieved. In *C. elegans*, LIN-35 promotes physiological germ cell apoptosis by repressing *ced-9* expression (9). Thus, we studied *lin-35* expression during starvation in extruded gonads. Using qRT-PCR, we found that *lin-35* mRNA expression was considerably increased (2.6-fold) in the gonads of starved animals (Fig. 4A).

Using polysomal profiles, we observed that under normal conditions, most *lin-35* mRNA was recruited to the TA fractions (fractions 6 to 11; 72%). Compared with other mRNAs (*act-5*, *glh-4*, and *ced-9*) (Fig. 2), it is noticeable that a substantial amount of this mRNA remained associated with polysomes under starvation conditions (fractions 6 to 11; 63%) (Fig. 4B). This indicates that *lin-35* continues to be efficiently translated during starvation despite the overall reduction in translation. In addition, while LIN-35 was not detected by Western blotting in protein extracts from control animals, it was observed under starvation conditions (Fig. 4C). The combination of these results implies that during starvation, increased LIN-35 accumulation is most likely achieved by increased mRNA expression or accumulation (Fig. 4A) and persistent translation (Fig. 4B).

To test whether LIN-35 accumulation was necessary to achieve the reduced expression of *ced-9* during starvation, we analyzed the abundance of *ced-9* mRNA in extruded gonad extracts from control and 6-h-starved *lin-35(n745)* animals using qRT-PCR. *lin-35(n745)* mutant animals carry a nonsense mutation that presumably eliminates LIN-35 activity (14). In the experiment shown in Fig. 1, we demonstrated that *ced-9* expression was 10-fold lower in starved wt animals. However, *ced-9* expression did not decrease

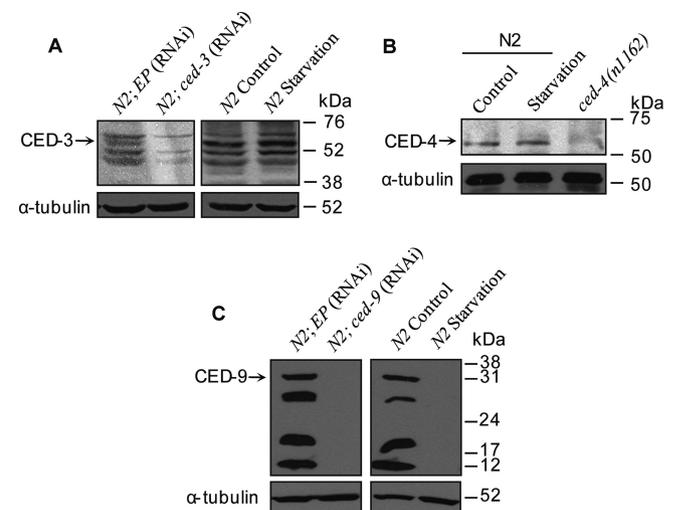


FIG 3 CED-9 protein is dramatically reduced during starvation. Western blot analyses were performed on the whole-animal protein extracts obtained from the indicated genetic backgrounds subjected to control or 6-h starvation conditions. The blots were probed using an anti-CED-3 antibody (A), anti-CED-4 antibody (B), or anti-CED-9 antibody (C). The arrows indicate the CED-3 (56.6 kDa), CED-4 (62.9 kDa), and CED-9 (32 kDa) bands, which correspond to their predicted molecular masses. For each blot, a rabbit antitubulin antibody was used as the loading control. The blots are representative of at least three independent experiments. EP, empty plasmid.

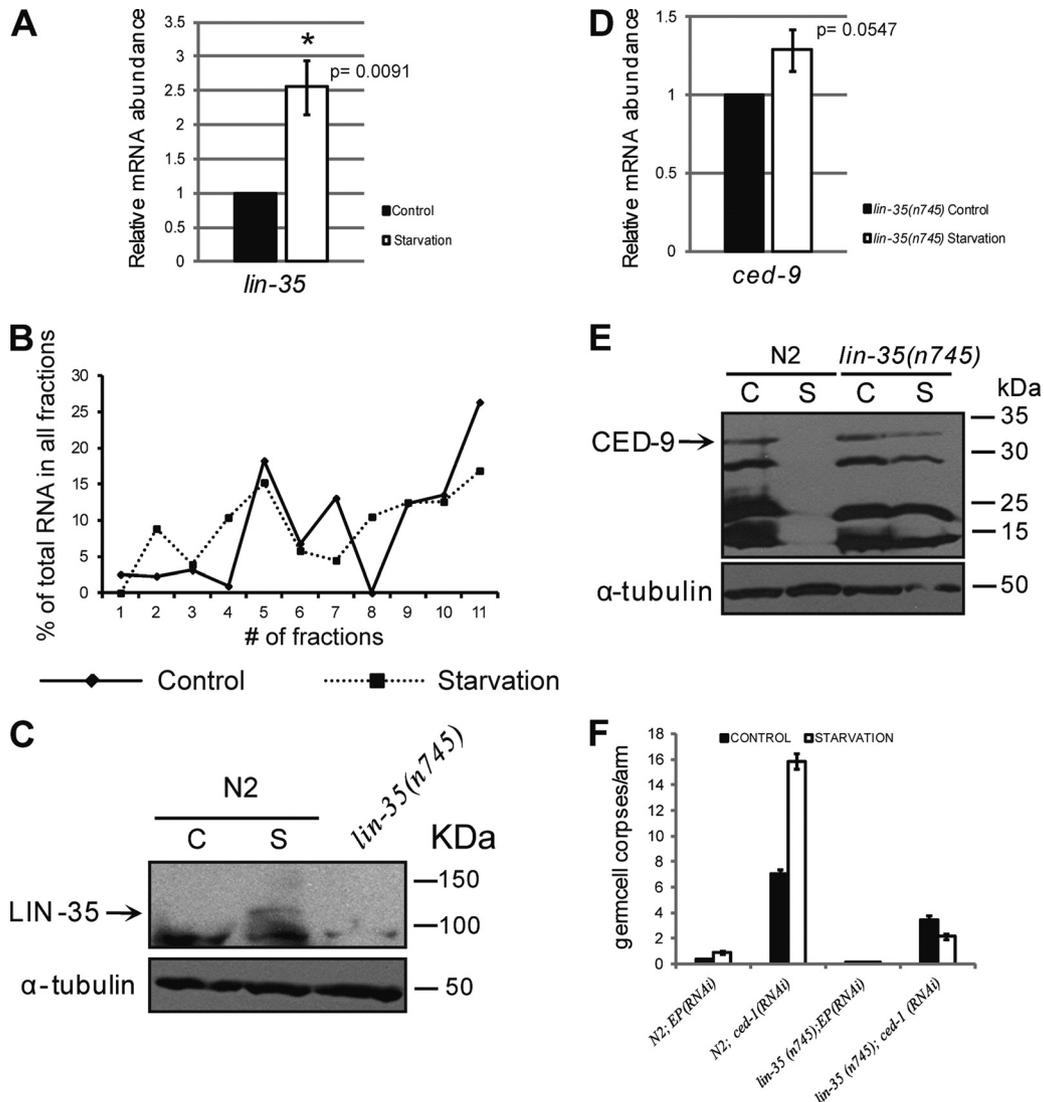


FIG 4 LIN-35 promotes starvation-induced apoptosis by avoiding general translational arrest and downregulating *ced-9* expression. (A) The gonads of 1-day-old well-fed (control) or 6-h-starved wild-type animals were extruded and processed for RNA extraction, followed by cDNA synthesis and qRT-PCR analysis. The graph shows the average relative abundance of *lin-35* mRNA from three independent experiments, each performed in triplicate. The error bars represent standard errors. (B) Polysomal distribution of *lin-35* mRNA using whole-animal extracts from control (C) and 6-h-starved (S) animals, as described in the legend to Fig. 2. (C) Western blot analysis of whole-animal protein extracts from a population of 100 1-day-old wt and *lin-35(n745)* animals under control or 6-h starvation conditions. The blot was probed with an anti-LIN-35 antibody. The arrow indicates the predicted molecular mass of LIN-35 (110.9 kDa). A rabbit antitubulin antibody was used as the loading control. The blot is representative of three experiments. (D) qRT-PCR analysis using the cDNA of isolated gonads from *lin-35(n745)* animals under normal growth and starvation conditions. The graph shows the average relative abundance of *ced-9* mRNA from three independent experiments, each performed in triplicate. The error bars represent the standard errors. The *P* values were determined using a paired and nonparametric test (Wilcoxon). Significance is indicated by an asterisk ($P < 0.05$). (E) Western blotting using whole-protein extracts prepared from a population of 100 *lin-35(n745)* animals subjected to control (C) or starvation (S) conditions. The blot was probed using an antibody generated against full-length *C. elegans* CED-9. A rabbit antitubulin antibody was used as the loading control. The blot is representative of three independent experiments. (F) One-day-old wild-type and *lin-35(n745)* animals treated with either an empty plasmid (EP) or *ced-1*(RNAi) were transferred to NGM plates with or without bacteria and incubated at 20°C for 6 h before being mounted and observed under a microscope to detect cell corpses. The graph represents germ cell corpses per gonad arm as a measurement of apoptosis under control and starvation conditions in the indicated genetic backgrounds. The values represent two independent experiments, and the bars show the standard error.

in starved *lin-35(n745)* mutant animals (1.3-fold) (Fig. 4D). These results suggest that *ced-9* downregulation in fasting animals depends on LIN-35. In agreement with this hypothesis, CED-9 protein was still detected in the whole-protein extracts from *lin-35(n745)* mutant animals under starvation (Fig. 4E) but not in starved wt animals (Fig. 3C and 4E). Therefore, we conclude that LIN-35 accumulation under starvation is required for *ced-9* downregulation.

Next, we tested whether *lin-35* was required to induce germ cell apoptosis upon starvation. To detect cell corpses, we used differential interference contrast optics (DIC) microscopy of *ced-1*(RNAi) animals because germ cells and particularly those produced during starvation-induced apoptosis are not easily spotted in a wild-type background (3). *ced-1* is a gene required for the efficient engulfment of apoptotic germ cells. Therefore, its depletion or deletion results in a dramatic increase in the number of

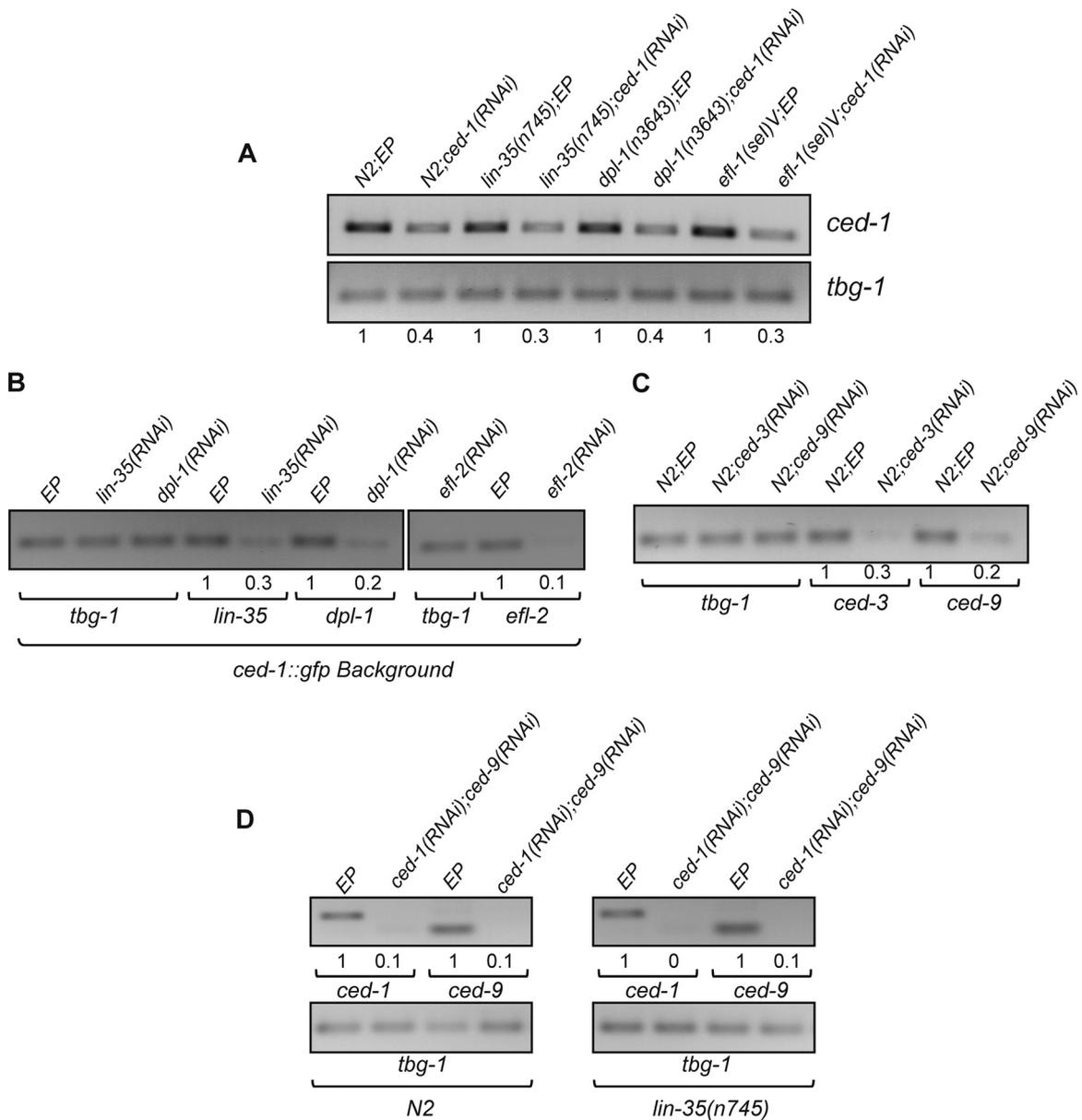


FIG 5 Efficiency of RNAi in the indicated genes and genetic backgrounds. To evaluate gene-silencing efficiency, 1-day-old animals with the indicated genetic backgrounds were subjected to control (EP) or RNAi treatment for the corresponding genes and processed for RNA extraction, followed by cDNA synthesis and PCR analysis. The relative mRNA levels were calculated from RT-PCR using densitometry and are indicated at the bottom of each gel. The gene *tbg-1* was used as a control. (A) The efficiency of *ced-1* silencing was evaluated in N2, *lin-35*(n745), *dpl-1*(n3643), and *efl-1*(*sel1*)V backgrounds. (B) The efficiency of *lin-35*, *dpl-1*, and *efl-2* silencing was evaluated in a *ced-1::gfp* background. (C) The efficiency of *ced-3* and *ced-9* silencing was evaluated in a wild-type background (N2). (D) The efficiency of *ced-1* and *ced-9* silencing was evaluated in N2 and *lin-35*(n745) backgrounds.

apoptotic germ cells that can be easily detected (30). As a control for RNAi, we used an empty plasmid (EP) as previously suggested (19). First, we confirmed that *ced-1* silencing was efficient by RT-PCR in both wt and *lin-35*(n745) backgrounds (Fig. 5A). Germ cell corpse averages in *ced-1*(RNAi) animals under normal growth conditions were similar to those observed in 1-day-old *ced-1*(*e1735*) animals (3) (Fig. 4F and Table 2). N2 animals treated with EP or *ced-1*(RNAi) showed an increase in the average number of corpses under starvation conditions (2.5- and 2.2-fold, respectively) (Fig. 4F and Table 2). However, *lin-35*(n745); EP and *lin-35*(n745); *ced-1*(RNAi) animals did not exhibit increased germ

cell apoptosis under the same conditions (Fig. 4F and Table 2). These results demonstrated that *lin-35* is required to induce apoptosis under starvation.

To confirm our results, we used the MD701 strain, which is commonly used to detect germ cell engulfment because it carries a construct (P_{lim-7} *ced-1::gfp*) that is expressed in the sheath cells (12). RNAi against *lin-35* in MD701 decreased its mRNA level by 70% (Fig. 5B). We quantified the number of corpses in the gonad of 1-day-old *ced-1::gfp* animals treated with EP or *lin-35*(RNAi) in animals that were well fed or starved for 6 h. Unlike *ced-1::gfp* control animals, *ced-1::gfp*; *lin-35*(RNAi) animals did not increase

TABLE 2 Starvation-induced germ cell death in different genetic backgrounds

Experimental group and treatment ^a	Avg no. of corpses/gonad ± SE ^f		P ^g
	Control	Starvation	
<i>lin-35(n745)</i> animals ^b			
N2; EP(RNAi)*	0.36 ± 0.05 (103)	0.90 ± 0.11 (83)	0.0002
N2; <i>ced-1</i> (RNAi)	7.07 ± 0.31 (109)	15.83 ± 0.61 (108)	<0.0001
<i>lin-35(n745)</i> ; EP(RNAi)	0.13 ± 0.06 (38)	0.13 ± 0.05 (45)	0.9876
<i>lin-35(n745)</i> ; <i>ced-1</i> (RNAi)	3.42 ± 0.34 (45)	2.14 ± 0.26 (51)	0.0057
<i>ced-1::GFP</i> ; EP(RNAi)*	6.11 ± 0.21 (135)	13.27 ± 0.36 (133)	<0.0001
<i>ced-1::GFP</i> ; <i>lin-35</i> (RNAi)	3.98 ± 0.20 (41)	3.15 ± 0.17 (40)	0.0002
<i>ced-9</i> (RNAi) animals ^c			
N2; <i>ced-9</i> (RNAi)*	3.1 ± 0.18 (21)	3.9 ± 0.21 (21)	0.2102
N2; EP/ <i>ced-1</i> (RNAi)	5.65 ± 0.23 (40)	12.66 ± 0.34 (34)	<0.0001
N2; <i>ced-1/ced-9</i> (RNAi)	11.05 ± 0.35 (41)	12.74 ± 0.32 (42)	0.0002
<i>lin-35(n745)</i> ; EP/ <i>ced-1</i> (RNAi)	3.15 ± 0.15 (40)	2.19 ± 0.16 (31)	0.0013
<i>lin-35(n745)</i> ; <i>ced-1/ced-9</i> (RNAi)	10.22 ± 0.43 (44)	12 ± 0.48 (44)	0.0048
<i>dpl-1</i> animals ^d			
<i>dpl-1(n3643)</i> ; EP(RNAi)	0.35 ± 0.08 (37)	0.22 ± 0.06 (37)	0.1962
<i>dpl-1(n3643)</i> ; <i>ced-1</i> (RNAi)	3.69 ± 0.27 (42)	3.39 ± 0.21 (49)	0.4304
<i>ced-1::GFP</i> ; <i>dpl-1</i> (RNAi)*	5.76 ± 0.25 (29)	5.33 ± 0.26 (30)	0.2116
<i>efl-1(sel)V</i> and <i>efl-2</i> (RNAi) animals ^e			
<i>efl-1(sel)V</i> ; EP(RNAi)	0.14 ± 0.06 (36)	0.33 ± 0.11 (36)	0.1962
<i>efl-1(sel)V</i> ; <i>ced-1</i> (RNAi)	8.47 ± 0.33 (38)	19.9 ± 0.36 (40)	<0.0001
<i>ced-1::GFP</i> ; <i>efl-2</i> (RNAi)*	4.98 ± 0.24 (63)	11.44 ± 0.43 (63)	<0.0001

^a One-day-old adult animals with different genetic backgrounds were subjected to starvation and observed under Nomarski or fluorescence microscopy to detect corpses (see details in Materials and Methods). EP, empty plasmid. *, controls.

^b *lin-35(n745)* animals did not respond to starvation-induced germ cell apoptosis.

^c *ced-9*(RNAi) animals did not show evidence of starvation-induced germ cell apoptosis.

^d DPL-1 is required to induce apoptosis under starvation.

^e *efl-1(sel)V* and *efl-2*(RNAi) animals did respond to starvation-induced apoptosis.

^f The number of observed gonads (one per animal) is shown in parentheses. These values represent at least two independent experiments.

^g The P values were determined using an unpaired t test (Mann-Whitney); a P value of < 0.0001 was considered significant.

germ cell apoptosis under starvation conditions (Table 2). These data confirm that LIN-35 is required for starvation-induced apoptosis. We should mention that when *lin-35(n745)*; *ced-1*(RNAi) and *ced-1::gfp*; *lin-35*(RNAi) animals were subjected to starvation, we observed a slight decrease in germ cell apoptosis, and we think that this could be due to the *ced-9* upregulation during starvation in a *lin-35(n745)* background (Fig. 4D).

Our data so far show that under starvation, LIN-35 is upregulated, its accumulation downregulates *ced-9* expression, and this effect triggers apoptosis. We have two scenarios to test our hypothesis. In the first scenario, one might think that *ced-9* silencing should have germ cell apoptosis comparable to that of the wild type under starvation. Unfortunately, we did not observe that N2 *ced-9*(RNAi) well-fed animals (3.1) have germ cell corpse numbers similar to those of wt starved worms (0.9). We think this is because starvation-induced germ cell apoptosis is not easily detected in a wt background, but it is easily observed in cell corpse-defective mutants or when a germ cell corpse marker like strain MD731 is used (3). Hence, when we used a *ced-1* background, we observed similar germ cell corpse numbers between starved control animals [N2; EP/*ced-1*(RNAi); 12.66 germ cell corpses] and well-fed N2; *ced-1/ced-9*(RNAi) worms (11.05 germ cell corpses), which supports our hypothesis.

In a second scenario one might think that to restore starvation-induced germ cell apoptosis in an *lin-35(n745)* mutant back-

ground, it would be sufficient to silence *ced-9* expression. However, because *ced-9* is required to protect cells from death (31), its absence or silencing triggers apoptosis under any condition. Indeed, when we silenced *ced-9* in wt or *lin-35(n745)* animals (90% knockdown efficiency) (Fig. 5D), an increase in physiological germ cell apoptosis was observed under normal growth conditions (8.6- and 3.2-fold, respectively) (Table 2). However, germ cell apoptosis did not increase further after the N2; *ced-1/ced-9*(RNAi) animals were exposed to starvation (0.25-fold) (Table 2). In the case of *lin-35(n745)*; *ced-1/ced-9*(RNAi) animals, we observed a slightly and not statistically significant increase in apoptosis (0.17-fold); however, this increase is not comparable to the normal induction of apoptosis under starvation (Table 2). Therefore, *ced-9* silencing triggers germ cell apoptosis independently of the growth conditions or background tested, and under these conditions, starvation-induced apoptosis could not be triggered.

***ced-4* upregulation during starvation is regulated via *dpl-1* and is important for inducing germ cell apoptosis under these conditions.** Earlier, we showed that *ced-4* expression was higher during starvation (Fig. 1). In *C. elegans*, the DP ortholog DPL-1 positively regulates *ced-4*, thereby affecting germ cell apoptosis (9). Thus, we studied *dpl-1* expression during starvation. Using qRT-PCR, we observed that *dpl-1* expression increased considerably (3.6-fold) in the gonads of starved animals (Fig. 6A). Next, we determined the translational level of *dpl-1* mRNA and found that

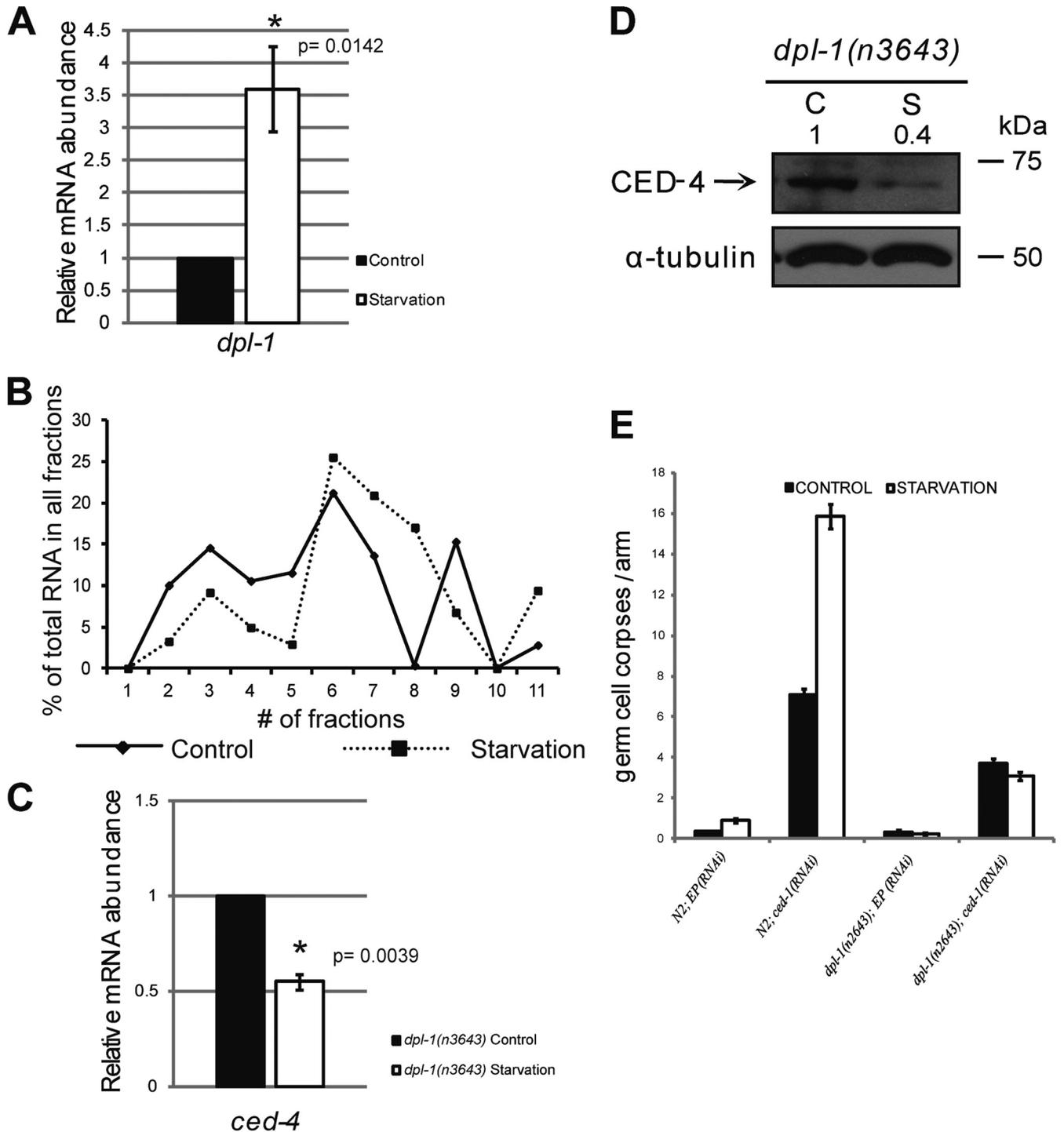


FIG 6 *dpl-1* is required for starvation-induced apoptosis. (A) The gonads of 1-day-old well-fed (control) or 6-h-starved wild-type animals were extruded and processed for RNA extraction, followed by cDNA synthesis and qRT-PCR analysis. The graph shows the average relative abundance of *dpl-1* mRNA from three independent experiments, each performed in triplicate. The error bars represent the standard errors. The *P* values were determined using a paired and nonparametric test (Wilcoxon). Significance is indicated by an asterisk ($P < 0.05$). (B) Polysomal distribution of *dpl-1* mRNA using whole-animal extracts from control (C) or 6-h-starved (S) animals, as described in the legend to Fig. 2. (C) qRT-PCR analysis using cDNA obtained from the isolated gonads of *dpl-1(n3643)* animals under normal growth or starvation conditions. The graph shows the average relative abundance of *ced-4* mRNA from three independent experiments, each performed in triplicate. The error bars represent the standard errors. The *P* values were determined using a paired and nonparametric test (Wilcoxon). Significance is indicated by an asterisk ($P < 0.05$). (D) Western blotting using whole-protein extracts prepared from a population of 100 *dpl-1(n3643)* animals subjected to control (C) or starvation (S) conditions. The blot was probed using an antibody generated against *C. elegans* CED-4 protein. A rabbit antitubulin antibody was used as the loading control. The blot is representative of three independent experiments. (E) One-day-old wild-type and *dpl-1(n3643)* animals treated with an empty plasmid (EP) or *ced-1*(RNAi) were transferred onto NGM plates with or without bacteria and incubated at 20°C for 6 h before being mounted and observed under the microscope to detect cell corpses. The graph represents the germ cell corpses per gonad arm as a measurement of apoptosis under control and starvation conditions in the indicated genetic backgrounds. The values represent two independent experiments, and the bars show the standard error.

under control conditions, 53% of the mRNA was present in TA fractions (fractions 6 to 11), whereas during starvation, 80% of this mRNA was associated with the same fractions (Fig. 6B). We conclude that during starvation, the expression of *dpl-1* is higher, and its mRNA continues to be efficiently translated. Unfortunately, we were unable to measure DPL-1 at the protein level due to the lack of available DPL-1 antibodies.

To determine whether DPL-1 induces *ced-4* expression during starvation, we analyzed *ced-4* mRNA abundance in wt and *dpl-1(n3643)* mutant animals using qRT-PCR. In contrast to the wt animals (Fig. 1), *ced-4* expression did not increase during starvation in the *dpl-1(n3643)* animals (Fig. 6C). In fact, its expression significantly decreased, suggesting that DPL-1 expression is important for *ced-4* upregulation during starvation.

To further confirm those results, we analyzed CED-4 protein in extracts from *dpl-1(n3643)* animals under normal and starvation conditions using Western blot analyses. As previously described, the levels of CED-4 appeared not to be affected under starvation conditions (Fig. 3B), probably due to its higher expression and poorly affected translational efficiency (Fig. 1A and 2F). However, in *dpl-1(n3643)* animals, CED-4 protein accumulation decreased by 60% under starvation conditions (Fig. 6D), indicating that CED-4 accumulation is partially dependent upon DPL-1.

We hypothesized that if DPL-1 expression is necessary to maintain CED-4 protein levels, then *dpl-1* should be required to induce apoptosis under starvation conditions. To address this requirement, we examined starvation-induced apoptosis in wt and *dpl-1(n3643)* animals in a *ced-1(RNAi)* background. *ced-1* RNAi decreased its mRNA level by 60% in wt and *dpl-1(n3643)* animals (Fig. 5A). We found that N2; EP(RNAi) and N2; *ced-1(RNAi)* animals showed starvation-induced apoptosis (Table 2 and Fig. 6E). However, control *dpl-1(n3643)* and *dpl-1(n3643); ced-1(RNAi)* animals did not show apoptosis in response to starvation (Table 2 and Fig. 6E).

To confirm our results, we quantified the number of corpses in 1-day-old *ced-1::gfp* animals treated with EP or *dpl-1(RNAi)* under control and starvation conditions. The *dpl-1(RNAi)* silencing efficiency was ~80% in the MD701 strain (Fig. 5B). Control *ced-1::gfp* animals increased germ cell apoptosis during starvation, in contrast to *ced-1::gfp; dpl-1(RNAi)* animals, which were unable to respond (Table 2). These results show that DPL-1 is necessary to induce starvation-induced apoptosis.

We next examined the expression of the E2F-like proteins EFL-1 and EFL-2 because they have been suggested to be positive regulators of *ced-4* expression during physiological apoptosis (9). *efl-1* is expressed in the soma and germ line, while *efl-2* is expressed only in somatic tissues (32). Using qRT-PCR, we observed a decrease in *efl-1* expression (0.6-fold) in the gonads of starved animals (Fig. 7A), while the *efl-2* expression increased considerably (2-fold) during starvation in whole-animal cDNA samples (Fig. 8A).

By polysomal profiling, we found that under control conditions, 66% of the *efl-1* mRNA was present in TA fractions (fractions 6 to 11) (Fig. 7B), whereas under starvation, only 48% remained associated with these fractions (Fig. 7B). Furthermore, we observed an enrichment of *efl-1* mRNA in the TI fractions (fractions 2 to 4) (25% control versus 45% starvation). Similarly, we observed that 60% of *efl-2* mRNA was associated with the TA fractions (fractions 6 to 11) under control conditions, while 48% remained associated with the same fractions during starvation

(Fig. 8B). Furthermore, we observed a slight enrichment of the *efl-2* mRNA in fractions 2 to 4 (28% control versus 39% starvation). These results suggest that the translation of *efl-1* and *efl-2* mRNAs was diminished during starvation although not as severely as that of the *act-5*, *glh-4*, or *ced-9* mRNA.

To determine whether *efl-1* and *efl-2* played a role in the increased expression of *ced-4* during starvation, we analyzed the *ced-4* mRNA abundance in *efl-1(seI)V* mutant and *efl-2(RNAi)* animals. *efl-2* silencing decreased its mRNA level by ~90% (Fig. 8C). Similar to what was observed in the wt (Fig. 1), *ced-4* expression was increased in the gonads of starved *efl-1(seI)V* animals according to qRT-PCR (1.8-fold versus 1.7-fold) (Fig. 7C). We also observed an increase in *ced-4* mRNA in 6-h-starved N2; EP(RNAi) and *efl-2(RNAi)* animals (1.8-fold) (Fig. 8D). These results show that contrary to the transcriptional regulation model during somatic and physiological apoptosis (9, 33), neither *efl-1* nor *efl-2* mediated *ced-4* upregulation during starvation. Furthermore, similar to the wt, the amounts of CED-4 protein were similar in *efl-1(seI)V* and *efl-2(RNAi)* animals under control and starvation conditions (Fig. 7D and 8E). Finally, we tested whether *efl-1* and *efl-2* were required to induce apoptosis under starvation. To quantify apoptosis, we silenced *ced-1* on an *efl-1(seI)V* background, while for *efl-2* we used the MD701 strain. We found that the *ced-1(RNAi)* on an *efl-1(seI)V* mutant background knocked down *ced-1* as efficiently as in the wt (Fig. 5A). *efl-2* silencing in strain MD701 was also efficient (Fig. 5B). We found that under starvation conditions, *efl-1(seI)V; ced-1(RNAi)* animals showed increased germ cell apoptosis (2.3-fold) (Table 2 and Fig. 7D). However, we did not observe a statistically significant difference between well-fed and starved animals when we used an *efl-1(seI)V; EP(RNAi)* background because, as we said previously, starvation-induced apoptosis is not easily detected if a germ cell apoptosis tool is not used (3). *ced-1::gfp* animals treated with EP or *efl-2(RNAi)* showed similar apoptotic induction levels (2.1- versus 2.3-fold) in germ cell apoptosis when the animals were starved (Table 2 and Fig. 8D). These results demonstrate that EFL-1 and EFL-2 are not required for starvation-induced germ cell apoptosis.

DPL-1, EFL-1, and EFL-2 do not affect CED-9 regulation during starvation. So far, we have observed that *ced-9* and *ced-4* expression levels are regulated during starvation (Fig. 1). According to our results, such regulation is given by *lin-35/Rb* and *dpl-1/DP* (Fig. 4D and E and 6C and D). However, we wanted to determine whether this regulation changed depending on the mutant backgrounds. Therefore, we analyzed the expression of *ced-9* and *ced-4* in all the backgrounds used in this work. Similar to the wt, *ced-9* expression decreased in *dpl-1(n3643)*, *efl-1(seI)V*, and *efl-2(RNAi)* animals during starvation (Fig. 9A). Furthermore, Western blot analyses revealed that the CED-9 protein decreased dramatically in these backgrounds (Fig. 9D). These results preclude the participation of any of these proteins in *ced-9* downregulation during starvation.

We analyzed the *ced-4* mRNA abundance in *lin-35(n745)* mutants and found that, similarly to control animals, during starvation *ced-4* expression was increased in the gonads of *lin-35(n745)* animals (Fig. 9B). Supporting our findings, the amount of CED-4 was similar in *lin-35(n745)* mutant animals under starvation (Fig. 9E). We concluded that the *ced-4* expression levels are not affected by *lin-35/Rb* during starvation.

The expression levels of *ced-3* were not affected by starvation in wt (Fig. 1 and 3A) or *efl-1(seI)V* and *efl-2(RNAi)* animals

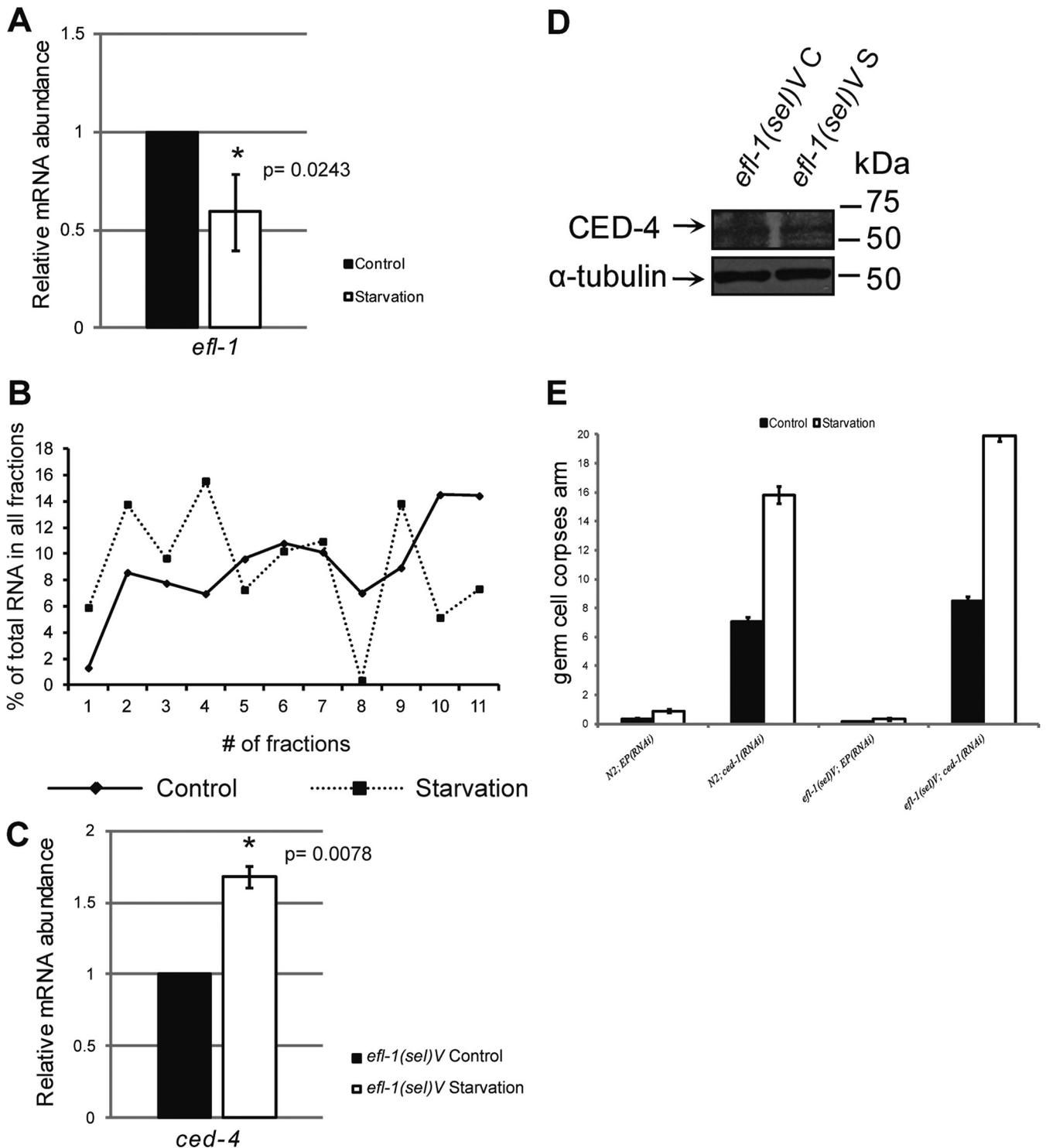


FIG 7 *efl-1* is not required for starvation-induced apoptosis. (A) The gonads of 1-day-old well-fed (control) or 6-h-starved wild-type animals were extruded and processed for RNA extraction, followed by cDNA synthesis and qRT-PCR analysis. The graph shows the average relative abundances of *efl-1* mRNA from three independent experiments, each performed in triplicate. The error bars represent the standard errors. The *P* values were determined using a paired and nonparametric test (Wilcoxon). Significance is indicated by an asterisk ($P < 0.05$). (B) Polysomal distribution of *efl-1* mRNA using extracts from whole control (C) and 6-h-starved (S) animals, as described in the legend to Fig. 2. (C) qRT-PCR analysis using the cDNA of isolated gonads from *efl-1(seI)V* animals under normal growth and starvation conditions. The graph shows the average relative abundance of *ced-4* mRNA from three independent experiments, each performed in triplicate. The error bars represent the standard errors. The *P* values were determined using a paired and nonparametric test (Wilcoxon). Significance is indicated by an asterisk ($P < 0.05$). (D) Western blotting using whole-protein extracts prepared from a population of 100 *efl-1(seI)V* animals subjected to control (C) or starvation (S) conditions. The blot was probed using an antibody generated against *C. elegans* CED-4 protein. A rabbit antitubulin antibody was used as the loading control. The blot is representative of three independent experiments. (E) One-day-old wild-type and *efl-1(seI)V* animals treated with an empty plasmid (EP) or *ced-1*(RNAi) were transferred onto NGM plates with or without bacteria and incubated at 20°C for 6 h before being mounted and observed under the microscope to detect cell corpses. The graph represents germ cell corpses per gonad arm as a measurement of apoptosis under control and starvation conditions in the indicated genetic backgrounds. The values represent two independent experiments, and the bars show the standard error.

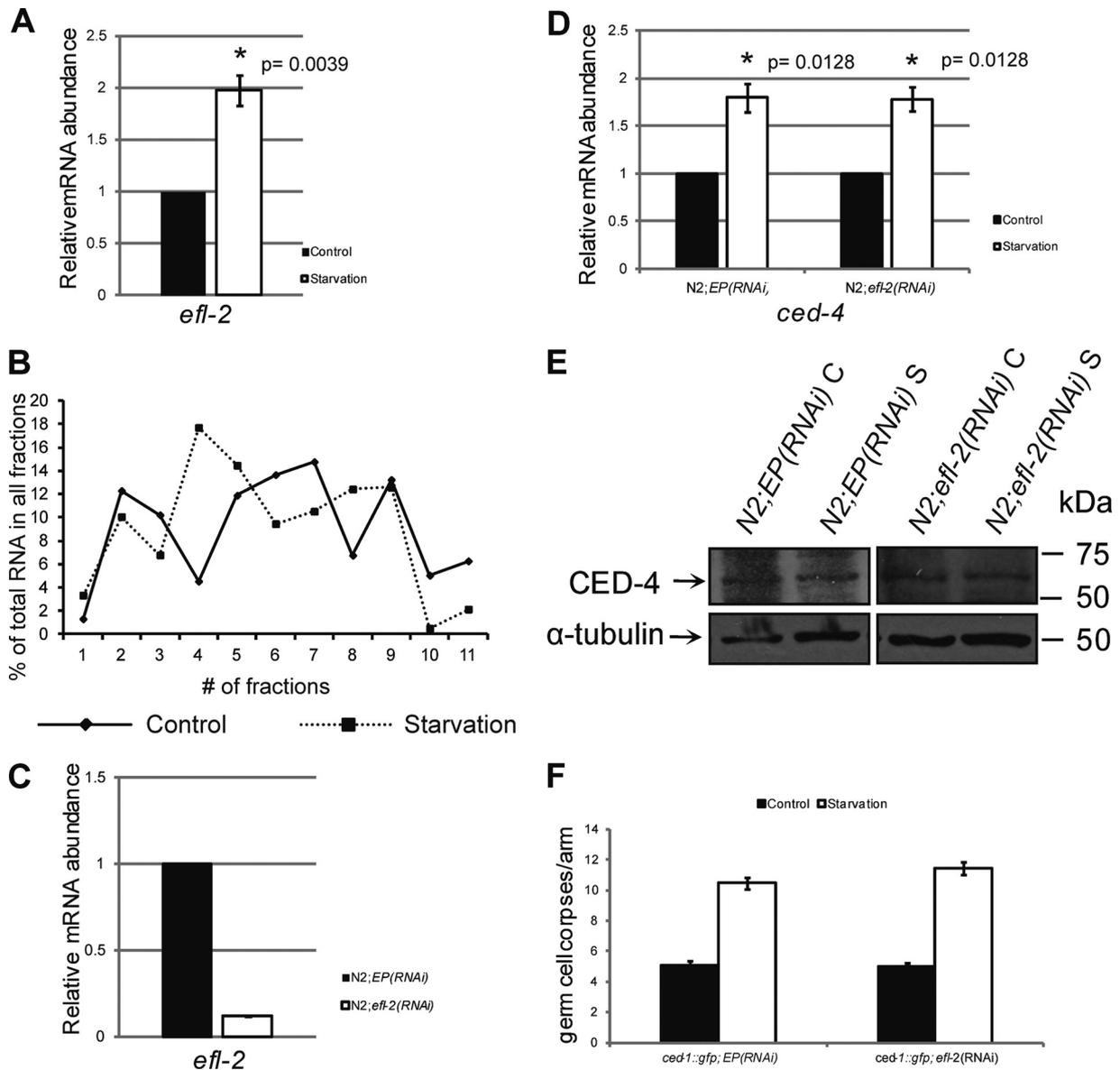


FIG 8 *efl-2* is not required for starvation-induced apoptosis. (A) One-day-old well-fed (control) or 6-h-starved wild-type animals were processed for RNA extraction, followed by cDNA synthesis and qRT-PCR analysis. The graph shows the average relative abundance of *efl-2* mRNA from three independent experiments, each performed in triplicate. The error bars represent the standard errors. The *P* values were determined using a paired and nonparametric test (Wilcoxon). Significance is indicated by an asterisk ($P < 0.05$). (B) Polysomal distribution of *efl-2* mRNA using extracts from whole control (C) and 6-h-starved (S) animals, as described in the legend of Fig. 2. (C) Efficiency of *efl-2* silencing by RNAi. RNAi was performed by feeding in wild-type animals using an empty plasmid (EP) as the control. We extracted total RNA, synthesized cDNA, and performed qRT-PCR for *efl-2* mRNA. The graph shows the average relative abundance of *efl-2* mRNA. (D) qRT-PCR analysis using cDNA obtained from isolated gonads of animals treated with an empty plasmid (EP) or *efl-2*(RNAi) under normal growth and starvation conditions. The graph shows the average relative abundance of *ced-4* mRNA from three independent experiments, each performed in triplicate. The error bars represent the standard errors. (E) Western blotting using whole-protein extracts prepared from a population of 100 EP(RNAi) or *efl-2*(RNAi) animals subjected to control (C) or starvation (S) conditions. The blot was probed using an antibody generated against *C. elegans* CED-4 protein. A rabbit antitubulin antibody was used as the loading control. The blot is representative of three independent experiments. (F) One-day-old *ced-1::gfp* animals treated with EP(RNAi) or *efl-2*(RNAi) were transferred onto NGM plates with or without bacteria and incubated at 20°C for 6 h before being mounted and observed under the microscope to detect cell corpses. The graph represents the germ cell corpses per gonad arm as a measurement of apoptosis under control and starvation conditions in the indicated genetic backgrounds. The values represent two independent experiments, and the bars show the standard error.

(Fig. 9C). However, in *lin-35(n745)* starved animals, *ced-3* mRNA levels were increased (1.64-fold) (Fig. 9C), whereas in *dpl-1(n3643)* animals *ced-3* mRNA decreased its expression (0.55-fold) during starvation (Fig. 9C). These changes in *ced-3* expression were not observed in CED-3 protein accumulation as analyzed by Western blotting (Fig. 9F). Our results suggest that

the control of *ced-3* expression does not appear to be a determinant of starvation-induced apoptosis.

DISCUSSION

In mammals, serum deprivation induces the activation of p38 and Jun N-terminal protein kinase (JNK) mitogen-activated protein

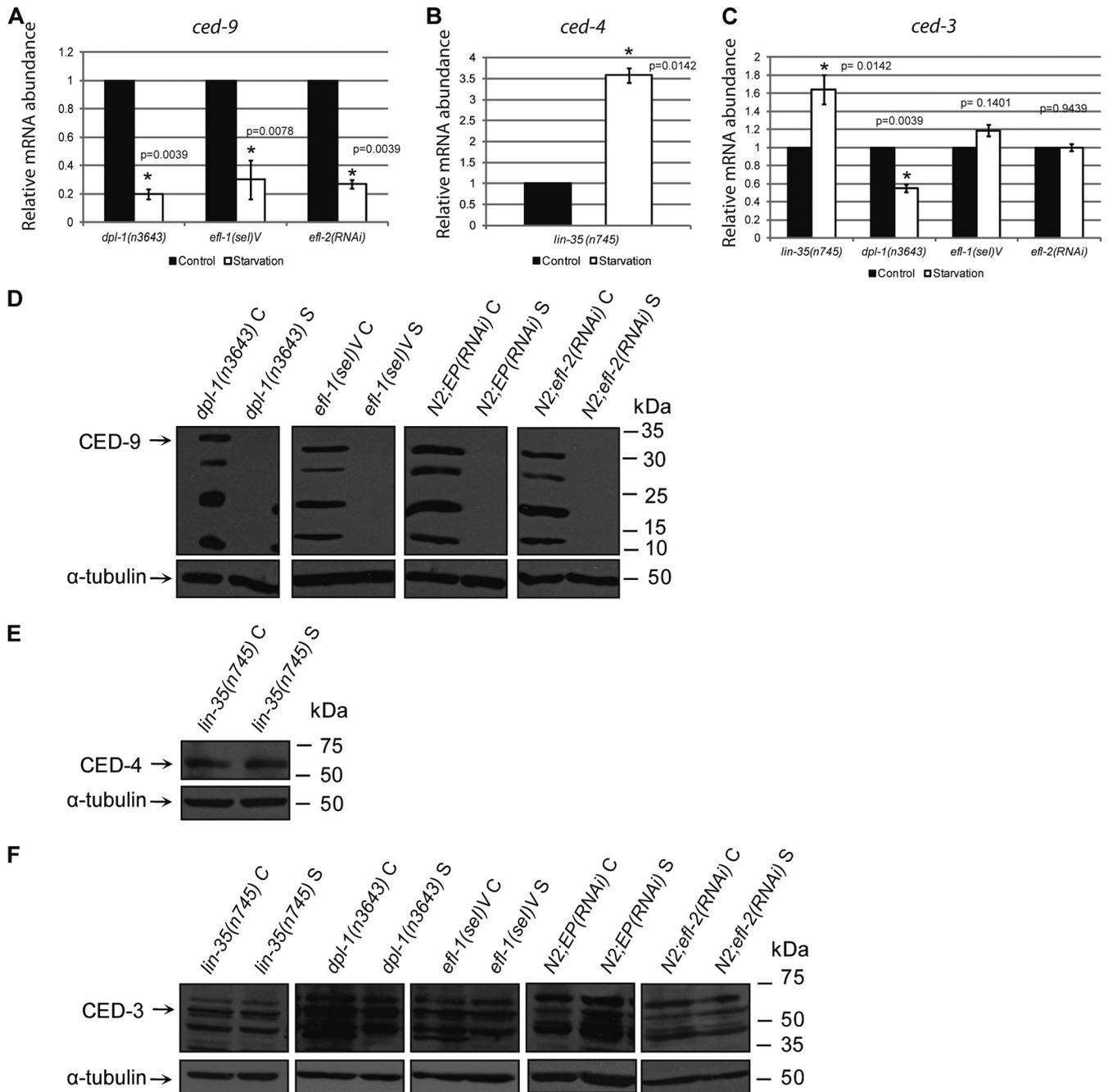


FIG 9 (A to C) qRT-PCR analysis of the indicated genes from the gonads of well-fed (control) or 6-h-starved 1-day-old animals of the indicated backgrounds. The graph shows the average relative abundances of each mRNA from three independent experiments, each performed in triplicate. The error bars represent the standard errors. The values were determined using a paired and nonparametric test (Wilcoxon). Significance is indicated by an asterisk ($P < 0.05$). (D to F) Western blot analyses were performed on the whole-animal protein extracts obtained from the indicated genetic backgrounds under control or 6-h starvation conditions. The blots were probed using an anti-CED-9 antibody (D), anti-CED-4 antibody (E), or anti-CED-3 antibody (F). The arrows indicate the CED-9 (32 kDa), CED-4 (62.9 kDa), and CED-3 (56.6 kDa) bands, which correspond to their predicted molecular masses. For each blot, a rabbit antitubulin antibody was used as the loading control. The blots represent at least two independent experiments. EP, empty plasmid.

kinases to promote cell apoptosis (34, 35). However, starvation-induced germ cell apoptosis does not require the activation of any of these pathways in *C. elegans* (3). In this study, we addressed how starvation triggers germ cell apoptosis. We found that exposing the animals to starvation induced the expression of genes such as *ced-4*, *lin-35*, and *dpl-1*, while *ced-9* expression was downregu-

lated. Upon starvation, we observed a decrease in overall translation that severely affected the translation of *ced-9* and, to a lesser extent, *ced-4*. Under the same conditions, the association of some mRNAs with polysomes, including *lin-35*, *dpl-1*, and *ced-3*, indicated that these transcripts remain efficiently translated in spite of the overall translation reduction. Collectively, these events re-

sulted in the accumulation of LIN-35 after starvation and, consequently, the repression in *ced-9* expression. Thus, we propose that a precisely regulated reduction of CED-9 triggered germ cell apoptosis under starvation conditions.

***dpl-1* upregulation during starvation prevents CED-4 depletion during starvation.** Here, we showed that *ced-4* mRNA was upregulated as a consequence of starvation (Fig. 1). In contrast, the *ced-4* mRNA translation efficiency was diminished under the same conditions (Fig. 2D). As a result of these different responses, the overall accumulation of CED-4 appeared unaffected under starvation (Fig. 3B), which is consistent with the fact that CED-4 is required to induce apoptosis in the nematode (36).

We observed that *dpl-1* expression was increased and that its mRNA continued to be efficiently translated during starvation (Fig. 6A and B). Furthermore, under starvation conditions, *ced-4* expression was decreased in *dpl-1(n3643)* animals, which were unable to induce apoptosis (Fig. 6D and E). DPL-1 activates *ced-4* expression under normal growth conditions (9); thus, we propose that DPL-1 is required for starvation-induced apoptosis due to its role in *ced-4* expression upregulation under these conditions. However, the mechanisms by which the expression of *dpl-1* is regulated in the *C. elegans* gonad during starvation remain to be determined.

In mammals, DP associates with an “activating” member of the E2F family consisting of sequence-specific DNA-binding proteins (E2F1, E2F2, and E2F3) (37, 38). E2F1 regulates the transcription of APAF-1 and other proapoptotic genes (39, 40). In *C. elegans*, *dpl-1* can interact with *efl-1* to regulate some cellular processes, such as vulval development (15), the cell cycle (41), and somatic cell death (33). However, in this study, we found that although *efl-1* and *efl-2* suffer transcriptional and translational changes under starvation, they do not participate with DPL-1 in the enhancement of *ced-4* expression and initiation of germ cell apoptosis under starvation (Fig. 7 and 8).

ced-4 expression levels are slightly reduced in the mutant *lin-35(n745)* under control conditions (9). However, we found that the change observed in the *ced-4* expression levels during starvation in wt animals (Fig. 1 and 3) was not affected in *lin-35(n745)* mutant animals (Fig. 9B and E). These results suggest that *ced-4* expression levels are not regulated for *lin-35* during starvation.

The regulation of CED-3 expression does not seem to contribute to triggering apoptosis during starvation. We observed *ced-3* upregulation in *lin-35(n745)* animals and *ced-3* downregulation in *dpl-1(n3643)* animals during starvation; however, the amount of CED-3 protein did not change in either background.

Accumulation of LIN-35 during starvation affects *ced-9* expression and induces germ cell apoptosis. The expression of the antiapoptotic gene *ced-9* was significantly decreased at the mRNA and translational levels during starvation (Fig. 1 and 2E). Both events caused a significant decrease in the accumulation of CED-9 protein (Fig. 3C). Under different stress conditions, such as treatment with sodium arsenite or etoposide, Bcl-2 mRNA translation persists due to an internal ribosome entry site (IRES) element (42). Although the polysomal distribution of Bcl-2 mRNA has not been studied in mammals during starvation, prolonged serum deprivation significantly decreases the amount of its protein in cultured cells (43, 44).

Transcriptional initiation of the human Bcl-2 gene occurs via two promoters (P1 and P2) (45). The regulation of these two promoters is complex and dependent upon both the tissue type

and the developmental stage (46, 47). Although little is known regarding the regulation of *ced-9* expression in *C. elegans*, microarray-based expression analyses have revealed that this gene is subject to transcriptional repression by LIN-35 (an *Rb* homolog, also known as *Rb1*) (48). Indeed, the downregulation of *ced-9* expression by LIN-35 partially regulates physiological germ cell apoptosis in *C. elegans* (9). Here, we showed that during starvation, *lin-35* expression is upregulated, and its mRNA is refractory to the observed translational inhibition, resulting in the accumulation of its protein (Fig. 4A to C). Furthermore, we demonstrated that LIN-35 accumulation during starvation was necessary for both CED-9 downregulation and germ cell apoptosis induction (Fig. 4D to F). Additionally, CED-9 downregulation during starvation did not require the DPL-1, EFL-1, and EFL-2 proteins that regulate *ced-4* under control conditions (Fig. 9A and D).

How *lin-35* expression is upregulated during starvation and how its mRNA evades the decrease in translation under starvation remains to be elucidated. It is worth highlighting that for *lin-35* mRNA, there is a correlation between the mRNA increase and the protein increase, which should be mediated by an efficient translation. The same is not observed for *ced-4*, in which the mRNA increase is not reflected by a change in protein level, probably due to its impaired translation under starvation. On the other hand, another possibility is that *lin-35* mRNA itself is a target of direct regulation, which will be discussed below.

The contribution of *lin-35/Rb* in starvation-induced apoptosis seems to be exclusively directed for *ced-9* regulation because the expression of CED-4 and CED-3 proteins were not affected in the mutant background *lin-35(n745)* during starvation (Fig. 9E and F).

During starvation, the translational efficiency of some mRNAs is reduced. Translational regulation allows organisms to have an immediate and rapid response to changes under physiological conditions. In this study, we showed that starvation decreased translation in *C. elegans* (Fig. 2). In other organisms, such as *Saccharomyces cerevisiae* and *Drosophila melanogaster*, there is an overall reduction in translation initiation due to glucose depletion and the availability of yeast extract in the medium, respectively (49, 50). A reduction of translation initiation decreases the number of ribosomes reinitiating translation on the same mRNA molecule, resulting in a reduced efficiency of translation. In a polysomal profile, such behavior could be observed by shifting of the mRNA from heavy polysomes to lighter polysomes and monosomes (51).

In mammals, different types of stresses trigger a sudden translational arrest, resulting in rapid polysome disassembly (52, 53). One of the most effective translation-inhibitory pathways during stress is mediated by the phosphorylation of eukaryotic initiation factor 2a (eIF2a) (24). The phosphorylation of eIF2a converts the eIF2-GTP-tRNA^{Met} ternary complex into a competitive inhibitor of the GDP/GTP exchange factor eIF2B (54). Although orthologs of eIF2a kinases exist in *C. elegans*, a similar mechanism used to inhibit general translation has not yet been described.

The mechanism that reduces the translation rate in *C. elegans* as a consequence of starvation remains to be elucidated. However, it is likely that the regulation of key translation initiation factor levels serves as a mechanism to modulate the rate of protein synthesis in response to environmental cues. In accordance with this hypothesis, previous studies have shown that IFG-1 (eIF4G) is downregulated during the stress-resistant/growth-arrested dauer state (55) and after exposing the adult animals to starvation for 2

TABLE 3 Characteristics of mRNAs that show differential translation upon starvation

mRNA group and type	3' UTR length (nt) ^a	3' UTR fractional GC content	3' UTR ΔG (kcal/mol)	ORF length (nt)	Transcript length (unspliced + UTR [nt])
Not translationally repressed					
<i>lin-35</i>	309	0.26	-41.8	1,512	7,929
<i>dpl-1</i>	352	0.30	-49	2,886	2,654
<i>ced-3</i>	945	0.34	-165.3	1,797	5,797
Avg \pm SEM	535.33 \pm 205.21	0.30 \pm 0.02	-85.36 \pm 40.02	2,065 \pm 418.66	5,460 \pm 1,532
Translationally repressed					
<i>act-5</i>	296	0.29	-62.4	1,128	1,728
<i>glh-4</i>	297	0.27	-47.5	3,471	5,214
<i>ced-9</i>	459	0.38	-84	843	2,358
<i>ced-4</i>	252	0.27	-17.8	1,873	2,856
<i>efl-1</i>	362	0.28	-41.2	1,029	7,092
<i>efl-2</i>	404	0.44	-134.7	1,239	5,121
Avg \pm SEM	345 \pm 38.80	0.32 \pm 0.03	-64.6 \pm 20.42	1,597.16 \pm 491.28	4,061.5 \pm 1,035.25

^a nt, nucleotide.

days (56). Furthermore, it appears that IFG-1 plays a decisive role in coordinating apoptotic events because it is a substrate for the caspase CED-3 and might promote a switch from cap-dependent to cap-independent translation (57). Coupled to this role, the translational control of gene expression by specific translation initiation factors, such as eIF4E family members, may provide an important mode of mRNA regulation in *C. elegans* (26, 58). In addition, the loss of IFE-2 (an eIF4E family member) enhances the protection against oxidative stress and extends the life span of *C. elegans* (59). Despite the generally decreased translation under stress conditions or apoptosis, it is common to detect mRNAs that are refractory to translation inhibition or even ones that exhibit stimulated translation (21, 24, 57, 60).

In eukaryotes, both untranslated regions (UTRs) and open reading frames (ORFs) possess valuable information that affects the capacity of mRNA to serve as a protein synthesis template. Regulatory features of the 5' UTR that can have positive effects on protein production include the IRES elements (61). Although a number of cases highlighting the importance of IRES-mediated translation during stress have been previously described in yeast, *Drosophila*, and mammals (62–64), there has been only one example of a functional IRES element in *C. elegans*: *hsp-3* mRNA (65). Alternative initiation complexes may provide the means to control mRNA translation mechanisms to change cell fate in *C. elegans* (60). For example, an isoform shift between the eIF4G isoforms, IFG-1 (cap dependent), and IFG-2 (cap independent) may alter the balance of translation initiation mechanisms to favor the synthesis of proapoptotic factors in which no IRES element has been observed (60).

Although one-third of the mRNAs in *C. elegans* are not *trans* spliced (66), *trans* splicing is a prevalent mechanism (67) and generates stereotypic 5' end sequences that replace the entire gene-encoded 5' UTR in the most extreme cases (68). This mechanism almost always excludes the gene-specific 5' UTR translational control sequences and may potentially explain why the 3' UTR-mediated translational control mechanisms are more prevalent in *C. elegans* (69). When translation is inhibited, for example, during the depletion of eIF4G, genes with longer ORFs or mRNA lengths are more efficiently translated (56). However, how the ORF lengths mediate translation under stress conditions remains unclear.

We analyzed the mRNA lengths of the genes examined in this study to determine whether they showed any differences. According to their distribution in the polysomal profiles, we classified the genes into two groups: translationally repressed (*act-5*, *glh-4*, *ced-9*, *ced-4*, *efl-1*, and *efl-2*) and translationally active (*lin-35*, *dpl-1*, and *ced-3*). After examination of their 3' UTRs, we found that the average 3' UTR length for translationally active mRNAs was 1.6-fold higher than that of genes that were translationally repressed (Table 3). An examination of their ORFs also revealed a tendency for longer ORF lengths for genes that did not exhibit repressed mRNA translation during starvation (Table 3). An analysis of the GC content showed no significant differences between the two groups; however, the folding energy was increased in the translationally repressed mRNAs (Table 3). Unfortunately, we could not compare the 5' UTR sequences because among the group of translationally repressed mRNAs, only one mRNA demonstrated a non-splice-leader 5' UTR. Thus, we concluded that the intrinsic properties of mRNAs, such as their 3' UTR and ORF lengths, might contribute to their translational control during starvation.

Mechanistic model of starvation-induced apoptosis. Physiological germ line apoptosis occurs during oogenesis and in the absence of stress. It is accomplished by the core apoptotic machinery and is induced via an unknown pathway that is independent of EGL-1 and CEP-1 (Fig. 10A). The *C. elegans* ortholog of the retinoblastoma susceptibility protein Rb (LIN-35) partially induces physiological germ cell apoptosis by downregulating *ced-9* expression (Fig. 10A) (9). In addition, subunits of the E2F transcription factor (DPL-1, EFL-1, and EFL-2) seem to promote physiological germ cell apoptosis by increasing the expression of *ced-4* (9) (Fig. 10A). Heat shock, osmotic, and oxidative stresses require the participation of the MAPKK pathway to trigger apoptosis (3). How the MAPKK pathway induces the apoptosis machinery is unknown (Fig. 10B). DNA damage induces germ cell apoptosis through CEP-1 and EGL-1 (Fig. 10C) (10–12). Furthermore, LIN-35, DPL-1, and EFL-2 regulate DNA damage-induced apoptosis through the control of the expression of unknown target genes that are downstream of *ced-9* and *ced-4* (Fig. 10C) (9). The transcriptional regulation of *ced-9*, *ced-4*, and *ced-3* does not appear to determine DNA damage-induced apoptosis (9) (Fig. 10C).

Here, we show that starvation decreases translation, differen-

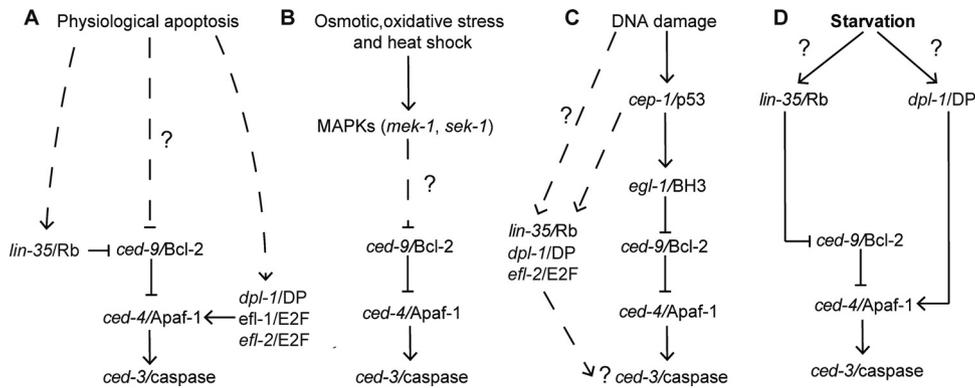


FIG 10 Proposed model for starvation-induced apoptosis. The core apoptosis machinery consists of the antiapoptotic protein CED-9, which inhibits the caspase activator CED-4 and the caspase CED-3. (A) Physiological apoptosis is triggered by an unknown pathway that partially requires *lin-35/Rb*. (B) Apoptosis induced by heat shock and osmotic and oxidative stress is activated by the MAPK pathway. (C) The genetic pathway for DNA damage-induced germ cell apoptosis requires *cep-1/p53* and *egl-1/BH3*. *lin-35*, *dpl-1*, and *efl-2* function downstream of or in parallel to *cep-1* to cause DNA damage-induced germ cell apoptosis by controlling the expression of unknown target genes. (D) The genetic pathway for starvation-induced germ cell apoptosis involves the genes *lin-35* and *dpl-1*, which block the function of the antiapoptotic gene *ced-9* and enhance the function of the proapoptotic gene *ced-4*, respectively. Please refer to the text for further details. Solid lines represent confirmed genetic interactions. Dashed lines indicated no confirmed genetic interactions. The mammalian homolog for each protein is indicated after the slash. Question marks indicate paths which remain to be elucidated.

tially affecting the core apoptotic machinery genes and some of their regulators. We propose a model in which, LIN-35 is upregulated under starvation conditions to affect the expression of *ced-9* (Fig. 10D). *ced-9* mRNA downregulation, together with the decrease in translation, results in the depletion of CED-9 protein, thereby freeing CED-4 to interact with caspase CED-3 to induce apoptosis. Starvation also induces *dpl-1* upregulation, which in turn promotes *ced-4* accumulation (Fig. 10D). Thus, the balance between the upregulation and translational repression of *ced-4* mRNA results in constant protein levels during starvation, which activates CED-3 to induce apoptosis. During starvation, the transcription of *ced-3* does not change, and its translation is only slightly affected, resulting in the maintenance of the CED-3 protein level, which is required for the induction of apoptosis. Finally, we propose that the combination of LIN-35 and DPL-1 functions to ensure the appropriate expression levels of CED-9 and CED-4 during starvation, which is necessary to initiate starvation-induced apoptosis (Fig. 10D).

Starvation-induced apoptosis shares some regulators with physiological and DNA damage-induced apoptosis. However, there are important differences that suggest that these regulators do not act in the same way. A similarity between physiological and starvation-induced apoptosis is that DPL-1 is important for *ced-4*/Apaf-1 expression. There are two main differences between these pathways: (i) *lin-35/Rb* is completely required to induce apoptosis under starvation while its role in physiological apoptosis is only partial, which might be due to LIN-35 upregulation during starvation; (ii) EFL-1 and EFL-2 do not play a role in *ced-4* expression during starvation-induced apoptosis in contrast to physiological apoptosis.

lin-35/Rb and *dpl-1/DP* are required for DNA damage- and starvation-induced apoptosis while *efl-2/E2F* is required only in DNA damage-induced apoptosis. An important difference between starvation-induced and DNA damage-induced apoptosis is that in the latter *lin-35/Rb* and *dpl-1/DP* targets are still unknown and act downstream of *ced-9* and *ced-4*. Intriguing questions that remain to be solved are how starvation slows translation, how *lin-35* and *dpl-1* mRNAs are upregulated during fasting, and how

some mRNAs, particularly *lin-35* and *dpl-1* mRNAs, continue their translation during starvation.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from PAPIIT-UNAM (IN225509 and IN207412) and CONACYT-MEXICO (50896-Q and 103856-Q). L.L.L.-L. received a Ph.D. fellowship from CONACYT-México and PAPIIT-UNAM (IN207412). All strains were provided by the CGC, which is funded by the NIH Office of Research Infrastructure Programs (P40 OD010440).

We thank L. Silvia Salinas, Ana Valeria Martínez Silva, and Carlos Alberto Contreras Paredes for technical assistance. We are grateful to Jorge Ramírez, Lorena Chávez-González, Simón Guzmán-León, and José Luis Santillán-Torres at the Unidad de Microarreglos, Universidad Nacional Autónoma de México, for technical support.

REFERENCES

- Angelo G, Van Gilst MR. 2009. Starvation protects germline stem cells and extends reproductive longevity in *C. elegans*. *Science* 326:954–958. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1178343>.
- Seidel HS, Kimble J. 2011. The oogenic germline starvation response in *C. elegans*. *PLoS One* 6:e28074. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0028074>.
- Salinas LS, Maldonado E, Navarro RE. 2006. Stress-induced germ cell apoptosis by a p53 independent pathway in *Caenorhabditis elegans*. *Cell Death Differ.* 13:2129–2139. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.cdd.4401976>.
- Sulston JE, Horvitz HR. 1977. Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* 56:110–156. [http://dx.doi.org/10.1016/0012-1606\(77\)90158-0](http://dx.doi.org/10.1016/0012-1606(77)90158-0).
- Sulston JE, Schierenberg E, White G, Thomson JN. 1983. The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* 100:64–119. [http://dx.doi.org/10.1016/0012-1606\(83\)90201-4](http://dx.doi.org/10.1016/0012-1606(83)90201-4).
- Gumienny TL, Lambie E, Hartwig E, Horvitz HR, Hengartner MO. 1999. Genetic control of programmed cell death in the *Caenorhabditis elegans* hermaphrodite germline. *Development* 126:1011–1022.
- Horvitz HR. 2003. Worms, life, and death (Nobel lecture). *ChemBioChem* 4:697–711. <http://dx.doi.org/10.1002/cbic.200300614>.
- Lettre G, Hengartner MO. 2006. Developmental apoptosis in *C. elegans*: a complex CEDnario. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7:97–108. <http://dx.doi.org/10.1038/nrm1836>.
- Schertel C, Conradt B. 2007. *C. elegans* orthologs of components of the RB tumor suppressor complex have distinct pro-apoptotic functions. *Development* 134:3691–3701. <http://dx.doi.org/10.1242/dev.004606>.

10. Derry WB, Putzke AP, Rothman JH. 2001. *Caenorhabditis elegans* p53: role in apoptosis, meiosis, and stress resistance. *Science* 294:591–595. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1065486>.
11. 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. [http://dx.doi.org/10.1016/S0960-9822\(01\)00534-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0960-9822(01)00534-6).
12. Schumacher B, Schertel C, Wittenburg N, Tuck S, Mitani S, Gartner A, Conradt B, Shaham S. 2005. *C. elegans ced-13* can promote apoptosis and is induced in response to DNA damage. *Cell Death Differ.* 12:153–161. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.cdd.4401539>.
13. Brenner S. 1974. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77:71–94.
14. Lu X, Horvitz HR. 1998. *lin-35* and *lin-53*, Two genes that antagonize a *C. elegans* Ras pathway, encode proteins similar to Rb and its binding protein RbAp48. *Cell* 95:981–991. [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81722-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81722-5).
15. Ceol CJ, Horvitz RH. 2001. *dpl-1* DP and *efl-1* E2F act with *lin-35* Rb to antagonize Ras signaling in *C. elegans* vulval development. *Mol. Cell* 7:461–473. [http://dx.doi.org/10.1016/S1097-2765\(01\)00194-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1097-2765(01)00194-0).
16. Yuan J, Shaham S, Ledoux S, Ellis HM, Horvitz HR. 1993. The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 β -converting enzyme. *Cell* 75:641–652. [http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90485-9](http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(93)90485-9).
17. Petrella LN, Wang W, Spike CA, Rechtsteiner A, Reinke V, Strome S. 2011. synMuv B proteins antagonize germline fate in the intestine and ensure *C. elegans* survival. *Development* 138:1069–1079. <http://dx.doi.org/10.1242/dev.059501>.
18. Timmons L, Court DL, Fire A. 2001. Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Gene* 263:103–112. [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1119\(00\)00579-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1119(00)00579-5).
19. Conte D, Mello CC. 2003. RNA interference in *Caenorhabditis Elegans*. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* Chapter 26:Unit 26.3. <http://dx.doi.org/10.1002/0471142727.mb2603s62>.
20. Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expr. data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 25:402–408. <http://dx.doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
21. Kawaguchi R, Girke T, Bray EA, Bailey-Serres J. 2004. Differential mRNA translation contributes to gene regulation under non-stress and dehydration stress conditions in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 38:823–839. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02090.x>.
22. Mangone M, MacMenamin P, Zegar C, Piano F, Gunsalus KC. 2008. UTRome.org: a platform for 3' UTR biology in *C. elegans*. *Nucleic Acids Res.* 36:D57–D62. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkm946>.
23. Markham NR, Zuker M. 2005. DINAMelt web server for nucleic acid melting prediction. *Nucleic Acids Res.* 33:W577–W581. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gki591>.
24. Holcik M, Sonenberg N. 2005. Translational control in stress and apoptosis. *Nat. Rev.* 6:318–327. <http://dx.doi.org/10.1038/nrml1618>.
25. Kaerberlein M, Kennedy BK. 2008. Protein translation. *Aging Cell* 7:777–782. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1474-9726.2008.00439.x>.
26. Dinkova TD, Keiper BD, Korneeva NL, Aamodt EJ, Rhoads RE. 2005. Translation of a small subset of *Caenorhabditis elegans* mRNAs is dependent on a specific eukaryotic translation initiation factor 4E isoform. *Mol. Cell. Biol.* 25:100–113. <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.25.1.100-113.2005>.
27. Kuznicki KA, Smith PA, Leung-Chiu WMA, Estevez AO, Scott HC, Bennett KL. 2000. Combinatorial RNA interference indicates GLH-4 can compensate for GLH-1; these two P granule components are critical for fertility in *C. elegans*. *Development* 127:2907–2916.
28. Xue D, Shaham S, Horvitz HR. 1996. The *Caenorhabditis elegans* cell-death protein CED-3 is a cysteine protease with substrate specificities similar to those of the human CPP32 protease. *Genes Dev.* 10:1073–1083. <http://dx.doi.org/10.1101/gad.10.9.1073>.
29. Yuan J, Shaham S, Ledoux S, Ellis HM, Horvitz HR. 1993. The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 β -converting enzyme. *Cell* 75:641–652. [http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90485-9](http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(93)90485-9).
30. Zhou Z, Hartwig E, Horvitz HR. 2001. CED-1 is a transmembrane receptor that mediates cell corpse engulfment in *C. elegans*. *Cell* 104:43–56. [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00190-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00190-8).
31. Hengartner MO, Ellis RE, Horvitz HR. 1992. *Caenorhabditis elegans* gene *ced-9* protects cells from programmed cell death. *Nature* 356:494–499. <http://dx.doi.org/10.1038/356494a0>.
32. Reece-Hoyes JS, Shingles J, Dupuy D, Grove CA, Walhout AJ, Vidal M, Hope IA. 2007. Insight into transcription factor gene duplication from *Caenorhabditis elegans* promoterome-driven expression patterns. *BMC Genomics* 8:27. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-8-27>.
33. Reddien PW, Andersen EC, Huang MC, Horvitz HR. 2007. DPL-1 DP, LIN-35 Rb and EFL-1 E2F act with the MCD-1 zinc-finger protein to promote programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 175:1719–1733. <http://dx.doi.org/10.1534/genetics.106.068148>.
34. Harris C, Maroney AC, Johnson EMJ. 2002. Identification of JNK-dependent and -independent components of cerebellar granule neuron apoptosis. *J. Neurochem.* 83:992–1001. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1471-4159.2002.01219.x>.
35. Lu C, Shi Y, Wang Z, Song Z, Zhu M, Cai Q, Chen T. 2008. Serum starvation induces H2AX phosphorylation to regulate apoptosis via p38 MAPK pathway. *FEBS Lett.* 582:2703–2708. <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2008.06.051>.
36. Ellis HM, Horvitz HR. 1986. Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell* 44:817–829. [http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674\(86\)90004-8](http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(86)90004-8).
37. Girling R, Partridge JF, Bandara LR, Burden N, Totty NF, Hsuan JJ, La Thangue NB. 1993. A new component of the transcription factor DRTF1/E2F. *Nature* 362:83–87. <http://dx.doi.org/10.1038/362083a0>.
38. Helin K, Wu C-L, Fattaey AR, Lees JA, Dynlacht BD, Ngwu C, Harlow E. 1993. Heterodimerization of the transcription factors E2F-1 and DP-1 leads to cooperative trans-activation. *Genes Dev.* 7:1850–1861. <http://dx.doi.org/10.1101/gad.7.10.1850>.
39. Attwooll C, Denchi EL, Helin K. 2004. The E2F family: specific functions and overlapping interests. *EMBO J.* 23:4709–4716. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.emboj.7600481>.
40. Dimova DK, Dyson NJ. 2005. The E2F transcriptional network: old acquaintances with new faces. *Oncogene* 24:2810–2826. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1208612>.
41. Boxem M, van den Heuvel S. 2002. *C. elegans* class B synthetic multivulva genes act in G₁ regulation. *Curr. Biol.* 12:906–911. [http://dx.doi.org/10.1016/S0960-9822\(02\)00844-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0960-9822(02)00844-8).
42. Sherrill KW, Byrd MP, Van Eden ME, Lloyd RE. 2004. BCL-2 translation is mediated via internal ribosome entry during cell stress. *J. Biol. Chem.* 279:29066–29074. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M402727200>.
43. Bursch W, Karwana A, Mayer M, Dornetshuber J, Fröhweina U, Schulte-Hermann R, Fazi B, Di Sanob F, Pireddab L, Piacentini M, Petrowski G, Fésüs L, Gerner C. 2008. Cell death and autophagy: cytokines, drugs, and nutritional factors. *Toxicology* 254:147–157. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2008.07.048>.
44. Liu S-Y, Chen C-L, Yang T-T, Huang W-C, Hsieh C-Y, Shen W-J, Tsai T-T, Shieh C-C, Lin C-F. 2012. Albumin prevents reactive oxygen species-induced mitochondrial damage, autophagy, and apoptosis during serum starvation. *Apoptosis* 17:1156–1169. <http://dx.doi.org/10.1007/s10495-012-0758-6>.
45. Seto M, Jaeger U, Hockett RD, Graninger W, Bennett S, Goldman P, Korsmeyer SJ. 1988. Alternative promoters and exons, somatic mutation and deregulation of the Bcl-2-Ig fusion gene in lymphoma. *EMBO J.* 7:123–131.
46. Smith MD, Ensor EA, Coffin RS, Boxer LM, Latchman DS. 1998. Bcl-2 transcription from the proximal P2 promoter is activated in neuronal cells by the Brn-3a POU family transcription factor. *J. Biol. Chem.* 273:16715–16722. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.273.27.16715>.
47. Young RL, Korsmeyer SJ. 1993. A negative regulatory element in the bcl-2 5'-untranslated region inhibits expression from an upstream promoter. *Mol. Cell. Biol.* 13:3686–3697.
48. Chi W, Reinke V. 2006. Promotion of oogenesis and embryogenesis in the *C. elegans* gonad by EFL-1/DPL-1 (E2F) does not require LIN-35 (pRB). *Development* 133:3147–3157. <http://dx.doi.org/10.1242/dev.02490>.
49. Ashe MP, De Long SK, Sachs AB. 2000. Glucose depletion rapidly inhibits translation initiation in yeast. *Mol. Biol. Cell* 11:833–848. <http://dx.doi.org/10.1091/mbc.11.3.833>.
50. Zid BM, Rogers AN, Katewa SD, Vargas MA, Kolipinski MC, Lu TA, Benzer S, Kapahi P. 2009. 4E-BP extends lifespan upon dietary restriction by enhancing mitochondrial activity in *Drosophila*. *Cell* 139:149–160. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2009.07.034>.
51. Davies E, Stankovic B, Vianc A, Wood A. 2012. Where has all the

- message gone? *Plant Sci.* 185:23–32. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2011.08.001>.
52. Anderson P, Kedersha N. 2002. Stressful initiations. *J. Cell Sci.* 115:3227–3234.
 53. Spriggs KA, Bushell M, Willis AE. 2010. Translational regulation of gene expression during conditions of cell stress. *Mol. Cell* 40:228–237. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2010.09.028>.
 54. Krishnamoorthy T, Pavitt GD, Zhang F, Dever TE, Hinnebusch AG. 2001. Tight binding of the phosphorylated a subunit of initiation factor 2 (eIF2a) to the regulatory subunits of guanine nucleotide exchange factor eIF2B is required for inhibition of translation initiation. *Mol. Cell. Biol.* 21:5018–5030. <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.21.15.5018-5030.2001>.
 55. Pan KZ, Palter JE, Rogers AN, Olsen A, Chen D, Lithgow GJ, Kapahi P. 2007. Inhibition of mRNA translation extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell* 6:111–119. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1474-9726.2006.00266.x>.
 56. Rogers AN, Chen D, McColl G, Czerwiec G, Felkey K, Gibson BW, Hubbard A, Melov S, Lithgow GJ, Kapahi P. 2011. Life span extension via eIF4G inhibition is mediated by posttranscriptional remodeling of stress response gene expression in *C. elegans*. *Cell Metab.* 14:55–66. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2011.05.010>.
 57. Contreras V, Friday AJ, Morrison JK, Hao E, Keiper BD. 2011. Cap-independent translation promotes *C. elegans* germ cell apoptosis through Apaf-1/CED-4 in a caspase-dependent mechanism. *PLoS One* 6:e24444. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0024444>.
 58. Song A, Labella S, Korneeva NL, Keiper BD, Aamodt EJ, Zetka M, Rhoads RE. 2010. A *C. elegans* eIF4E-family member upregulates translation at elevated temperatures of mRNAs encoding MSH-5 and other meiotic crossover proteins. *J. Cell Sci.* 123:2228–2237. <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.063107>.
 59. Syntichaki P, Troulinaki K, Tavernarakis N. 2007. eIF4E function in somatic cells modulates ageing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 445:922–926. <http://dx.doi.org/10.1038/nature05603>.
 60. Contreras V, Richardson M, Hao E, Keiper B. 2008. Depletion of the cap-associated isoform of translation factor eIF4G induces germline apoptosis in *C. elegans*. *Cell Death Differ.* 15:1232–1242. <http://dx.doi.org/10.1038/cdd.2008.46>.
 61. Jackson R. 2005. Alternative mechanisms of initiating translation of mammalian mRNAs. *Biochem. Soc. Trans.* 33:1231–1241. <http://dx.doi.org/10.1042/BST20051231>.
 62. Hellen CUT, Sarnow P. 2001. Internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNA molecules. *Genes Dev.* 15:1593–1612. <http://dx.doi.org/10.1101/gad.891101>.
 63. Spriggs KA, Stoneley M, Bushell M, Willis AE. 2008. Reprogramming of translation following cell stress allows IRES mediated translation to predominate. *Biol. Cell* 100:27–38. <http://dx.doi.org/10.1042/BC20070098>.
 64. Stoneley M, Willis AE. 2004. Cellular internal ribosome entry segments: structures, trans-acting factors and regulation of gene expression. *Oncogene* 23:3200–3207. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1207551>.
 65. Li D, Wang M. 2012. Construction of a bicistronic vector for the co-expression of two genes in *Caenorhabditis elegans* using a newly identified IRES. *Biotechniques* 52:173–176. <http://dx.doi.org/10.2144/000113821>.
 66. Blumenthal T, Steward K. 1997. RNA processing and gene structure, p 117–145. *In* Riddle DL, Blumenthal T, Meyer BJ, Priess JR (ed), *C. elegans* II. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
 67. Bektesh SL, Hirsh DI. 1988. *C. elegans* mRNAs acquire a spliced leader through a trans-splicing mechanism. *Nucleic Acids Res.* 16:5692. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/16.12.5692>.
 68. Eckmann CR, Kraemer B, Wickens M, Kimble J. 2002. GLD-3, a bicucal-C homolog that inhibits FBF to control germline sex determination in *C. elegans*. *Dev. Cell* 3:697–710. [http://dx.doi.org/10.1016/S1534-5807\(02\)00322-2](http://dx.doi.org/10.1016/S1534-5807(02)00322-2).
 69. Merritt C, Rasoloson D, Ko D, Seydoux G. 2008. 3' UTRs are the primary regulators of gene expression in the *C. elegans* germline. *Curr. Biol.* 18:1476–1482. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2008.08.013>.

CAPÍTULO 4: Participación de la proteína GLA-3 en el mecanismo de inducción de apoptosis durante el ayuno

5.4.1 Expresión de la maquinaria de apoptosis durante el ayuno en la cepa mutante *gla-3(op-312)*

Como se mostró en el capítulo 1 el silenciamiento de *gla-3* induce un incremento importante en la apoptosis fisiológica, además los animales *gla-3(RNAi)* no incrementan los niveles de apoptosis como resultado de la exposición al ayuno, el estrés osmótico, oxidativo y el choque de calor. Para entender como GLA-3/TTP participa en la apoptosis durante el ayuno analizamos mediante RT-PCR los niveles de expresión de los genes que componen la maquinaria de apoptosis en la cepa *gla-3(op312)* en condiciones de control y de ayuno.

Como vimos anteriormente, en la cepa silvestre durante el ayuno CED-9 disminuye drásticamente sus niveles de expresión a nivel de RNAm y proteína en un proceso dependiente de LIN-35/Rb. Por otro lado, vimos que CED-4 incrementa sus niveles de RNAm y mantiene constantes sus niveles de proteína en un proceso regulado por DPL-1 [55]. En la figura 25 podemos observar que al igual que en la cepa control, los niveles de RNAm de *ced-9* en la cepa mutante *gla-3(op312)* disminuyen cuando los animales son sometidos a 6 h de ayuno. Posteriormente analizamos a CED-9 a nivel de proteína utilizando un ensayo tipo Western blot. Encontramos que en condiciones control los animales silvestres y los mutantes *gla-3(op312)* tienen niveles parecidos de CED-9 (Figura 26, carriles 1 y 3). Cuando sometemos a los animales al ayuno por 6 h ambos grupos de animales disminuyen drásticamente los niveles de la proteína de CED-9 (Figura 26, carriles 2 y 4).

Los niveles de *ced-4* y *ced-3* fueron analizados únicamente a nivel de RNAm mediante RT-PCR. En animales silvestres sometidos a condiciones de ayuno observamos

que los niveles de *ced-4* aumentan (1.5) mientras que los niveles de *ced-3* se mantienen constantes (Figura 25). Similar a lo que sucede en animales silvestres, en animales mutantes *gla-3(op312)* observamos que los niveles de *ced-3* se mantienen constantes. Sin embargo, a diferencia de los animales silvestres los niveles de *ced-4* no incrementan en condiciones de ayuno (Figura 25). De acuerdo al mecanismo propuesto para la inducción de apoptosis durante el ayuno [55] el aumento de los niveles de *ced-4* es necesario para la inducción de apoptosis en esta condición de estrés. Por lo tanto una posible explicación a que los animales *gla-3(op312)* no puedan inducir apoptosis durante el ayuno podría ser que no pueden incrementar los niveles de *ced-4* en estas condiciones.

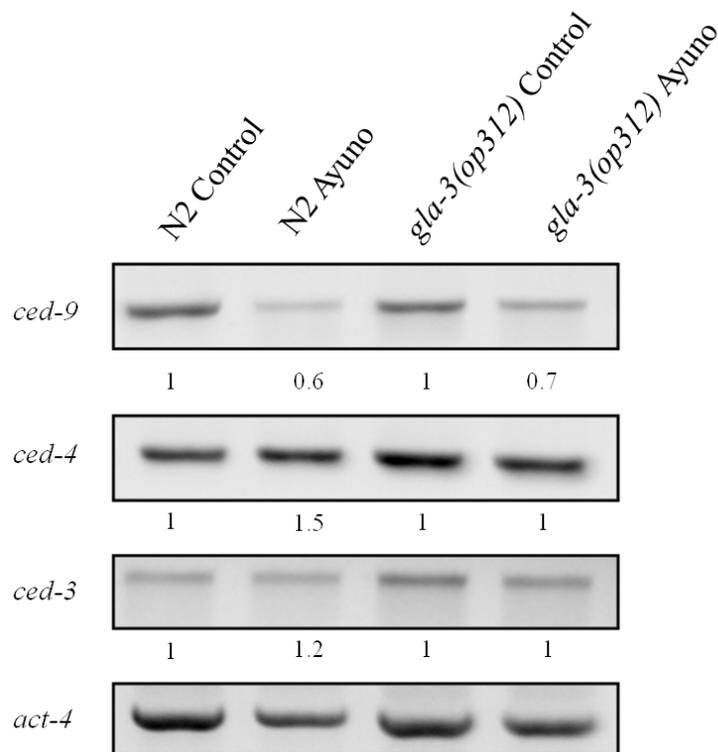


Figura 25. El RNA mensajero de *ced-4* no aumenta en ayuno en la cepa *gla-3(op312)*. RT-PCR para evaluar los niveles de expresión de los genes de la maquinaria de apoptosis. El RNA se obtuvo de animales adultos crecidos a 20°C alimentados normalmente (control) y sometidos a 6 h de ayuno. Como control de carga se utilizó el gen de actina 4 (*act-4*). Arriba de los paneles se indica la cepa y la condición evaluada. Los resultados de la densitometría se indican debajo de cada panel. En el caso de la cepa *gla-3(op312)* se indican los resultados de la densitometría comparando con su propio control.

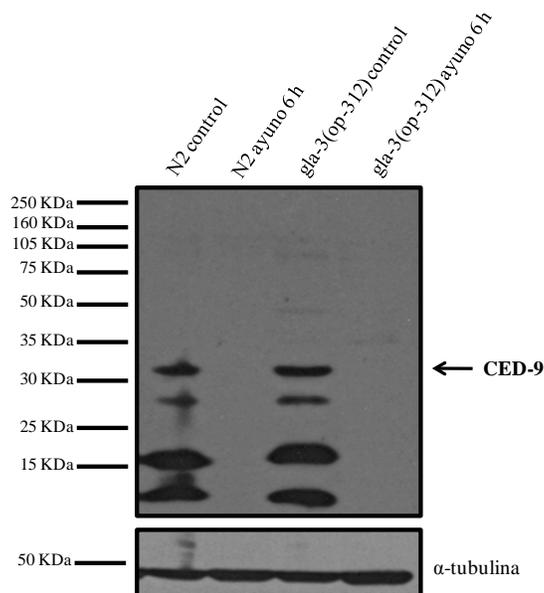


Figura 26. Los niveles de expresión de la proteína anti-apoptótica CED-9 se reducen drásticamente en condiciones de ayuno en animales silvestres y mutantes *gla-3(op312)*. Western blot para evaluar la expresión de CED-9 en condiciones control y de ayuno por 6 h en los fondos genéticos N2 y *gla-3(op312)*. El lisado de 100 animales se cargó en cada carril. En la cepa silvestre control (carril 3) el anticuerpo reconoce cuatro bandas de las cuales la de mayor peso corresponde a la proteína CED-9 (32 kDa). En condiciones de ayuno las bandas detectadas por el anticuerpo desaparecen por completo tanto en la cepa silvestre (carril 2) como en la cepa mutante para el gen *gla-3*(carril 4).

5.4.2 Perfil polisomal de la mutante *gla-3(op312)* en condiciones control y de ayuno

Como mostramos anteriormente, durante el ayuno hay una baja considerable en los niveles de traducción [55]. El silenciamiento de *gla-3* evita la formación de gránulos en respuesta al ayuno (Figura 18), por lo que decidimos evaluar los niveles de traducción de la cepa *gla-3(op312)* en condiciones control y de ayuno. Para evaluar los niveles de traducción utilizamos perfiles polisomales.

El perfil polisomal se realizó utilizando extractos de animales silvestres y mutantes *gla-3(op312)* adultos de 1 día alimentados normalmente y ayunados por 6 h (para detalles veáse Materiales y Métodos). Cuando comparamos el perfil polisomal de animales

silvestres con el de animales *gla-3(op312)* en condiciones control no observamos diferencias en cuanto a los niveles de traducción (Figura 27 A). Sin embargo cuando comparamos los perfiles de animales sometidos al ayuno observamos que hay una disminución dramática en la cantidad de RNA presente en la región polisomal de animales *gla-3(op312)* comparada con animales N2 (Figura 27 B Fracción 5 a 11), lo que puede sugerir una inhibición de la traducción. También existe la posibilidad de que haya una degradación importante de RNAs en la mutante *gla-3(op312)* bajo condiciones de ayuno (Figura 27). Anteriormente habíamos observado una disminución en la traducción global en condiciones de ayuno en la cepa control N2 [55]; sin embargo la disminución observada en la cepa mutante *gla-3(op312)* es mucho más evidente.

El análisis de la traducción de los RNAs de la maquinaria de apoptosis en la mutante *gla-3(op312)* no se pudo concluir pero dadas las características del perfil polisomal obtenido en esta cepa es probable que muchos RNA mensajeros incluyendo la maquinaria de apoptosis se vean afectados.

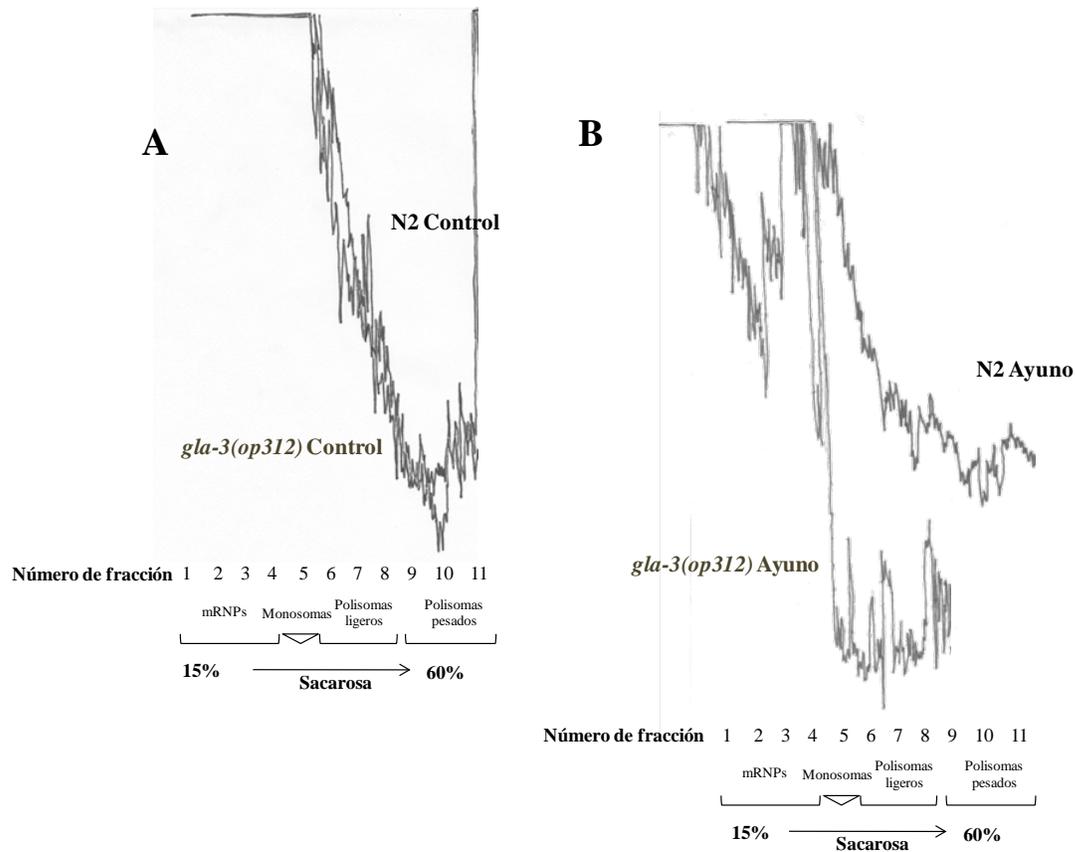


Figura 27. En condiciones de ayuno hay menos acumulación de RNA en las fracciones polisomales en la mutante *gla-3(op312)* comparada con animales silvestres. A y B) Animales silvestres o mutantes *gla-3(op312)* fueron sometidos a condiciones control y de ayuno por 6 h. Después de lo cual un extracto equivalente a 0.5 g de gusanos de cada cepa y condición fueron separados en un gradiente de 15-60% de sacarosa. Los gradientes fueron colectados con monitoreo constante de absorbancia generando los perfiles observados. Los perfiles se dividieron en tres regiones principales: mRNPs inactivos traduccionalmente (Fracciones 1-4), Monosomas (Fracción 5), y polisomas traduccionalmente activos (fracciones 6-11). Esta última a su vez se dividió en dos: polisomas ligeros (fracciones 6-8) y polisomas pesados (fracciones 9-11). A) Se compara el perfil de gusanos silvestres con el de gusanos *gla-3(op312)* en condiciones control. B) Se compara el perfil de gusanos silvestres con el de gusanos *gla-3(op312)* en condiciones de ayuno.

5.4.3 DISCUSION

El silenciamiento de *gla-3* incrementa los niveles de apoptosis fisiológica en la línea germinal (Figura 8 A, [99]). Además observamos que este gen disminuye sus niveles de expresión durante el ayuno (Figura 14) y se requiere para inducir apoptosis por ayuno y por otros tipos de estrés (Figura 13, 18, 19 y 20). Aunado a esto encontramos que *gla-3* se requiere para la formación de gránulos de CGH-1 en el centro de la gónada bajo condiciones de ayuno y de choque de calor (Figura 18).

El papel de GLA-3 en la inducción de apoptosis

La proteína anti-apoptótica CED-9/Bcl-2 disminuye en condiciones de ayuno en la cepa mutante *gla-3(op312)* tal como sucede en la cepa control (Figura 26); sin embargo GLA-3 se requiere para la inducción de apoptosis en esta condición de estrés. Este resultado nos sugiere que el posible papel que pueda tener GLA-3 en la inducción de apoptosis durante el ayuno está debajo de la regulación de CED-9. Apoyando esta idea, en la mutante *gla-3(op312)* los niveles del mensajero de *ced-4* no incrementan en condiciones de ayuno tal como sucede en la cepa silvestre sugiriendo una posible conexión entre GLA-3 y la inducción de la expresión de *ced-4* (Figura 25). La regulación de los niveles de RNAm de *ced-3* parece no ser necesaria para la regulación de la apoptosis inducida por ayuno, ya que mutaciones que disminuyen o aumentan estos niveles no tienen efecto en la respuesta de apoptosis por este tipo de estrés [55].

El papel de GLA-3 en la formación de gránulos

El homólogo de GLA-3 en mamíferos TTP es importante para el reclutamiento de RNA mensajeros y la formación de partículas ribonucleoproteicas, en este trabajo mostramos que GLA-3 se requiere para la formación de gránulos en el centro de la gónada en condiciones de ayuno y choque de calor (Figura 18). En trabajos no publicados de

nuestro laboratorio se ha visto que estos RNPs son parecidos a los gránulos de estrés en mamíferos [88], por lo cual su formación sugiere alteraciones en el estado traduccional del organismo.

Comparando el perfil polisomal de animales silvestres con el de mutantes *gla-3(op312)* en condiciones control observamos que no hay diferencias en cuanto a los niveles de traducción en estas cepas (Figura 27 A). Sin embargo si comparamos los perfiles de animales sometidos a 6 h de ayuno, encontramos que en la mutante *gla-3(op312)* hay una disminución dramática de la cantidad de RNA presente en las fracciones traduccionalmente activas (Figura 27 B). Estos resultados sugieren que durante el ayuno hay una represión drástica en la traducción global, lo cual a primera vista resultaría contradictorio, ya que los animales mutantes en *gla-3* no pueden formar “gránulos de estrés” y la formación de estos constituye la consecuencia morfológica de una disminución global de la traducción [66]. Sin embargo existen evidencias que indican que puede haber disminución en la traducción global aun en ausencia de la formación de gránulos de estrés [126-128].

El hecho de que los RNA mensajeros se agreguen en gránulos bajo condiciones de estrés disminuye su concentración en el citosol lo cual puede tener dos efectos. Primero la disminución en la concentración de ciertas moléculas puede alterar la tasa de interacciones y reacciones bioquímicas. Por ejemplo, el secuestro de la proteína RACK en gránulos de estrés impide la activación de la cinasa MTK1, afectando con ello que las células entren en apoptosis [129]. Además la agregación de RNAm o de componentes de partículas ribonucleoproteicas pueden limitar la interacción de algunos RNA mensajeros con enzimas de degradación o con los polisomas. Una segunda consecuencia es que la formación de gránulos de estrés puede promover el ensamblaje de complejos de inicio de la traducción, incrementando las concentraciones locales de RNAm y factores de traducción. El

ensamblaje de complejos de iniciación puede ser de suma importancia durante el estrés, cuando ciertos factores de traducción son limitantes, por lo cual la no formación de gránulos puede tener efectos en la disminución de la traducción. Además, la concentración de reguladores de partículas ribonucleoproteicas puede ser importante para promover la traducción de RNA mensajeros específicos que se traducen preferencialmente durante el estrés. Consistente con este modelo, los gránulos de estrés contienen varios factores que promueven la traducción de manera estrés-específica (ej. HuR, Lin-28, DDX3/Ded, Pbp1).

Aunado a esto cabe mencionar que *gla-3* podría participar de manera directa o indirecta en la degradación de RNA mensajeros durante el ayuno. Dadas sus características GLA-3/TTP probablemente se asocie a ciertos RNA mensajeros con la finalidad de protegerlos en condiciones de estrés, por lo cual en su ausencia dichas moléculas se degradarían. Sin embargo este efecto puede ser una consecuencia indirecta de que no se formen gránulos. Los gránulos de estrés se encargan entre otras cosas de la protección de RNA mensajeros para que al restablecerse las condiciones óptimas estén listos para traducirse, cuando estos gránulos no están, no existe un sitio donde puedan almacenarse y protegerse.

5.4.4 CONCLUSIONES

- La proteína GLA-3 actúa por debajo de CED-9 en la inducción de apoptosis durante el ayuno.
- La proteína GLA-3 no actúa regulando a *ced-3* en la inducción de apoptosis durante el ayuno.
- La proteína GLA-3 participa en la regulación de los niveles de RNAm de *ced-4* durante el ayuno.
- La ausencia del gen *gla-3* reduce drásticamente la cantidad de RNA mensajeros asociados a polisomas durante el ayuno.

5.5 DISCUSIÓN GENERAL

La capacidad de responder rápidamente a los cambios ambientales es esencial para la sobrevivencia de los organismos; sin embargo bajo ciertas condiciones cuando el estrés se prolonga se desencadena la muerte celular. El ayuno es una condición que los organismos enfrentan comúnmente. En mamíferos, la falta de nutrientes induce la activación de las MAPKs p38 y JNK para promover la apoptosis [130, 131]. Sin embargo, en *C. elegans* la apoptosis de las células germinales inducida por ayuno no requiere de la activación de ninguna de estas vías [44].

En esta tesis investigamos los mecanismos que regulan la inducción de apoptosis por ayuno en la gónada de *C. elegans*. Mediante un escrutinio utilizando RNAi identificamos un grupo de genes que participan en la inducción de apoptosis bajo condiciones normales de crecimiento y durante el ayuno. El silenciamiento de los genes *pgl-1*, *cey-2*, *cgh-1*, *car-1*, *mex-5*, *hsp-1* y *gla-3* incrementa el número de cuerpos apoptóticos en la gónada del gusano (Figura 8), lo que sugiere que estos genes se requieren para proteger a las células de la apoptosis bajo condiciones normales de crecimiento. Estos genes presentan dominios de unión a RNA y regulan procesos esenciales dentro de la gónada (ANEXO 2), por lo que una posibilidad es que su participación en la inducción de apoptosis esté relacionada con la interrupción de procesos esenciales para el correcto funcionamiento de la gónada y por lo tanto su ausencia sea censada como un daño desencadenando la muerte celular. Aunado a esto animales *pgl-1(RNAi)*, *cey-2(RNAi)*, *cgh-1(RNAi)*, *car-1(RNAi)*, *mex-5(RNAi)*, *hsp-1(RNAi)* y *gla-3(RNAi)* no pueden responder al ayuno incrementando sus niveles de apoptosis (Figura 9). Durante el estrés la regulación de la expresión génica es esencial para la sobrevivencia y las proteínas de unión a RNA son importantes para regular estos procesos. Uno de los principales sitios de regulación del

RNA durante el estrés son los gránulos de RNA [65, 66]. Los genes identificados en este trabajo codifican para proteínas que forman parte de gránulos de RNA y pueden estar implicados en la regulación de RNA mensajeros específicos o en la formación de dichas estructuras. En condiciones de ayuno hay formación de gránulos al centro de la gónada [87, 88]. Cuando silenciamos a los genes *pgl-1*, *cey-2*, *hsp-1*, *car-1*, y *mex-5* observamos la presencia de estos gránulos aun en ausencia de estrés (Figura 16), lo que sugiere que estos genes participan en la formación de estas estructuras.

Los gránulos de RNA son estructuras ribonucleoproteicas implicadas en la regulación postranscripcional [65, 66]. En mamíferos los gránulos que se forman durante el estrés son la consecuencia morfológica de una disminución en la traducción [65, 66]; esto aunado a que la regulación de genes a nivel traduccional permite una respuesta rápida a los cambios en las condiciones fisiológicas, sugería que la traducción podría estar afectada en el ayuno. En este trabajo encontramos que el ayuno induce una disminución en la traducción de RNAs incluyendo a los de la gónada [55]. Esta disminución es consistente con lo observado durante la falta de nutrientes en organismos como *S. cerevisiae* and *D. melanogaster* [132, 133].

En mamíferos, diferentes tipos de estrés desencadenan un arresto traduccional que resulta en un rápido desensamblaje de los polisomas [78, 134]. Una de las formas más efectivas para inhibir la traducción es a través de la fosforilación del factor de inicio de la traducción eIF2a [135]. La fosforilación de eIF2a convierte el complejo ternario eIF2-GTP-tRNAMet en un inhibidor competitivo del factor eIF2B [136]. En *C. elegans* existe un ortólogo del factor eIF2a y de algunas de las cinasas que se encargan de fosforilarlo durante el estrés por lo que cabe la posibilidad de que un mecanismo similar participe en la inhibición de la traducción durante el ayuno en el nematodo. También es posible que la

inhibición de la traducción en *C. elegans* esté relacionada con la disminución de factores de inicio de la traducción. A este respecto existe evidencia de que durante el ayuno por dos días hay una disminución en los niveles de IFG-1(eIF4G) [137].

A pesar de la reducción en la traducción observada bajo condiciones de estrés o apoptosis, es común detectar RNA mensajeros que escapan a esta disminución y que inclusive son estimulados a traducirse [135, 138-140]. En este trabajo encontramos que los RNA mensajeros de *lin-35/Rb* y *dpl-1/DP* escapan a la disminución de la traducción general y se mantienen traduciendo durante el ayuno. El mecanismo que estos RNA mensajeros utilizan para continuar su traducción es desconocido, pero de acuerdo a los análisis realizados en este trabajo podría involucrar características como la longitud de los ORFs y los 3'UTRs [55]. En mamíferos algunas de las principales secuencias regulatorias se encuentran en la región 5'UTR de los RNAs, sin embargo en *C.elegans* dos terceras partes de los RNAs sufren transplicing [141]; lo que genera extremos 5' atípicos que sustituyen casi por completo a la región 5'UTR [142]. El fenómeno de transplicing explicaría en parte porque se favorecen los mecanismos que implican regulación del extremo 3'UTR [143].

lin-35/Rb y *dpl-1/DP* han sido descritos como reguladores transcripcionales de *ced-9/Bcl-2* y *ced-4/Apaf-1* respectivamente [47]. En este trabajo encontramos que durante el ayuno los niveles de *ced-9/Bcl-2* disminuyen drásticamente en un proceso dependiente de *lin-35/Rb* [55]. Dicha disminución es necesaria para que se induzca apoptosis en la gónada del nematodo [55]. La disminución de *ced-9/Bcl-2* no está dada solo a nivel de mensajero sino además hay una disminución drástica a nivel traduccional [55] lo cual es consistente con la disminución de la traducción general y se ve reflejado en la disminución drástica de su proteína. A diferencia de lo observado en nuestro trabajo, en otras condiciones de estrés

que también inducen una disminución en la traducción como el tratamiento con arsenito de sodio y etopóxido, la traducción de Bcl-2 persiste gracias a un IRES [144]. A pesar de que no se sabe si Bcl-2 se regula de manera parecida durante el ayuno, en cultivos celulares la privación prolongada de suero reduce significativamente la cantidad de BCL-2 [145, 146].

Por otro lado observamos que durante el ayuno hay un incremento en los niveles de mensajero de *ced-4*/Apaf-1 [55]. Dicho incremento se encuentra regulado por DPL-1 el cual se sobre-expresa en esta condición de estrés [55]. La sobre-expresión de *ced-4*/APAF-1 es necesaria para la inducción de apoptosis por ayuno, ya que cuando no se presenta los animales ayunados son incapaces de incrementar el número de cuerpos apoptóticos. En el nematodo DPL-1/DP actúa en conjunto con un miembro de la familia de factores de inicio de la transcripción tipo E2F (EFL-1, EFL-2) para regular algunos procesos celulares [96, 147, 148]; sin embargo nuestros datos sugieren que en el caso de la apoptosis inducida por ayuno DPL-1/DP no requiere a las proteínas EFL-1 o EFL-2 para realizar su función [55].

En conjunto los resultados de este trabajo indican que el ayuno induce una respuesta en el nematodo que involucra la regulación de genes a diferentes niveles. Particularmente los genes componentes de la maquinaria de apoptosis *ced-9*/Bcl-2 y *ced-4*/Apaf-1 se regulan a nivel de expresión a través de *lin-35*/Rb y *dpl-1*/DP, a nivel de traducción por la disminución global de la traducción y a nivel de proteína por el balance entre éstas dos o la estabilidad de las proteínas. Los genes estudiados en la primera parte de este trabajo (*pgl-1*, *cey-2*, *hsp-1*, *car-1*, y *mex-5*), participan en la formación de gránulos, por lo que sería interesante ver su traducción durante el ayuno. La formación de gránulos como resultado de silenciar dichos genes podría desencadenar procesos de regulación génica similares a los observados durante el ayuno (regulación de la maquinaria de apoptosis). Esta podría ser una explicación al aumento de la apoptosis observada al silenciar dichos genes en condiciones

normales de alimentación. Para analizar esta posibilidad es necesario el análisis del estado traduccional, así como la regulación de la maquinaria de apoptosis en animales RNAi para estos genes.

VI REFERENCIAS

1. Blumenthal, T. and K. Steward, *RNA processing and Gene Structure*, in *C. ELEGANS II*, D.L. Riddle, et al., Editors. 1997, Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, New York. p. 117-145.
2. Altun ZF and H. DH, *Handbook of C. elegans hermaphrodite anatomy*. Worm Atlas., 2005.
3. Fortunato, A. and A.G. Fraser, *Uncover Genetic Interactions in Caenorhabditis elegans by RNA Interference*. Bioscience Reports 2005. 25: p. 299-307.
4. Kim, S.K., *HTTP://C.elegans: mining the functional genomic landscape*. Nat Rev Genet., 2001. 2: p. 681-689.
5. Wixon, J., et al., *Featured organism: Caenorhabditis elegans*. Yeast, 2000. 17(1): p. 37-42.
6. Gartner, A., P.R. Boag, and T.K. Blackwell, *Germline survival and apoptosis*. WormBook, 2008: p. 1-20.
7. Hubbard, E.J.A. and D. Greenstein, *The Caenorhabditis elegans gonad: a test tube for cell and developmental biology*. Developmental Dynamics, 2000. 218: p. 2-22.
8. Seydoux, G. and T. Schedl, *The germline in C. elegans: origins, proliferation, and silencing*. . Int. Rev. Cytol. , 2001. 203: p. 139-185.
9. Pazdernik, N. and T. Schedl, *Introduction to Germ Cell Development in Caenorhabditis elegans*, in *Germ Cell Development in C. elegans*, T. Schedl, Editor. 2013, Springer: New York. p. 1-16.
10. Schedl, T., ed. *Germ Cell Development in C. elegans*. Advances in Experimental Medicine and Biology Vol. 757. 2013, Springer: New York. 433.
11. Kourtis, N. and N. Tavernarakis, *Non-developmentally programmed cell death in Caenorhabditis elegans*. Semin Cancer Biol, 2007. 17(122-133).
12. Kroemer, G., et al., *Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death*. Cell Death Differ., 2005. 12(1463-1467).
13. Samara, C. and N. Tavernarakis, *Autophagy and cell death in Caenorhabditis elegans*. Current Pharmaceutical Design 2008. 14: p. 1-19.
14. Kroemer, G. and M. Jaattela, *Lysosomes and autophagy in cell death control*. Nat. Rev. Cancer. , 2005. 5: p. 886-897.
15. Darland-Ransom, M., Y.-C. Wu, and D. Xue, *Programmed cell death in C. elegans.*, in *Essentials of Apoptosis*. , X.-M. Yin and Z. Dong, Editors. 2009, Humana Press.: New York, NY. p. 355-373.
16. Lettre, G. and M.O. Hengartner, *Developmental apoptosis in C. elegans: a complex CEDnario*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2006. 7(2): p. 97-108.
17. Sulston, J.E. and H.R. Horvitz, *Post-embryonic Cell Lineages of the Nematode, Caenorhabditis elegans*. Developmental Biology, 1977. 56: p. 110-156.
18. Sulston, J.E., et al., *The Embryonic Cell Lineage of the Nematode Caenorhabditis elegans*. Developmental Biology, 1983. 100: p. 64-119.
19. Gumienny, T.L., et al., *Genetic control of programmed cell death in the Caenorhabditis elegans hermaphrodite germline*. Development, 1999. 126: p. 1011-1022.
20. Hengartner, M.O., R.E. Ellis, and H.R. Horvitz, *Caenorhabditis elegans gene ced-9 protects cells from programmed cell death*. Nature, 1992. 356: p. 494-499.

21. Ellis, H.M. and H.R. Horvitz, *Genetic Control of Programmed Cell Death in the Nematode C. elegans*. Cell, 1986. 44: p. 817-829.
22. Yuan, J. and H. Horvitz, *The Caenorhabditis elegans genes ced-3 and ced-4 act cell autonomously to cause programmed cell death*. . Developmental Biology, 1990. 138: p. 33-41.
23. Xue, D., S. Shaham, and H.R. Horvitz, *The Caenorhabditis elegans cell-death protein CED-3 is a cysteine protease with substrate specificities similar to those of the human CPP32 protease*. Genes & Development, 1996. 10: p. 1073-1083.
24. Conradt, B. and H. Horvitz, *The C. elegans protein EGL-1 is required for programmed cell death and interacts with the Bcl-2-like protein CED-9*. Cell, 1998. 93: p. 519-529.
25. del Peso, L., et al., *Disruption of the CED-9/CED-4 complex by EGL-1 is a critical step for programmed cell death in Caenorhabditis elegans*. . J Biol Chem, 2000. 275: p. 27205-27211.
26. Yan, N., et al., *Structure of the CED-4-CED-9 complex provides insights into programmed cell death in Caenorhabditis elegans*. . Nature, 2005. 437: p. 831-837.
27. Jiang, X. and X. Wang, *Cytochrome C mediated apoptosis*. Annual Reviews Biochemistry., 2004. 73: p. 87-106.
28. Wang, C. and R.J. Youle, *The role of mitochondria in apoptosis*. Annu. Rev. Genet., 2009. 43: p. 95-118.
29. Chung, S., et al., *A common set of engulfment genes mediates removal of both apoptotic and necrotic cell corpses in C. elegans*. . Nat Cell Biol, 2000. 2: p. 931-937.
30. Ellis, R.E., D.M. Jacobson, and H.R. Horvitz, *Genes required for the engulfment of cell corpses during programmed cell death in Caenorhabditis elegans*. Genetics, 1991. 129: p. 79-94.
31. Gumienny, T.L., et al., *CED-12/ELMO, a novel member of the CrkII/Dock180/Rac pathway, is required for phagocytosis and cell migration*. Cell, 2001. 107: p. 27-41.
32. Wang, X., et al., *Cell corpse engulfment mediated by C. elegans phosphatidyserine receptor through CED-5 and CED-12*. . Science, 2003. 302: p. 1563-1566.
33. Wu, Y.C., et al., *C. elegans CED-12 acts in the conserved crkII/DOCK180/Rac pathway to control cell migration and cell corpse engulfment*. Dev. Cell, 2001. 1: p. 491-502.
34. Zhou, Z., E. Hartwig, and H.R. Horvitz, *CED-1 Is a Transmembrane Receptor that Mediates Cell Corpse Engulfment in C. elegans*. Cell, 2001. 104: p. 43-56.
35. Kinchen, J., et al., *Two pathways converge at CED-10 to mediate actin rearrangement and corpse removal in C. elegans*. Nature, 2005. 434(7029): p. 93-99.
36. Breckenridge, D.G., et al., *Caenorhabditis elegans drp-1 and fis-2 regulate distinct cell-death execution pathways downstream of ced-3 and independent of ced-9*. Mol Cell, 2008. 31: p. 586-597.
37. Parrish, J., et al., *Mitochondrial endonuclease G is important for apoptosis in C. elegans*. Nature, 2001. 412: p. 90-94.
38. Parrish, J.Z. and D. Xue, *Functional Genomic Analysis of Apoptotic DNA Degradation in C. elegans*. Molecular Cell, 2003. 11: p. 987-996.

39. Parrish, J.Z., et al., *CRN-1, a Caenorhabditis elegans FEN-1 homologue, cooperates with CPS-6/EndoG to promote apoptotic DNA degradation*. EMBO J., 2003. 22: p. 3451-3460.
40. Wang, X., et al., *Mechanisms of AIF-mediated apoptotic DNA degradation in Caenorhabditis elegans*. . Science, 2002. 298: p. 1587-1592.
41. Wu, Y.C., G.M. Stanfield, and H.R. Horvitz, *NUC-1, a Caenorhabditis elegans DNase II homolog, functions in an intermediate step of DNA degradation during apoptosis*. Genes & Development, 2000. 14: p. 536-548.
42. Tilly, J.L., *Commuting the death sentence: how oocytes strive to survive*. Nat Rev Moll Cell., 2001. 2(838-848).
43. Drummond-Barbosa, D. and A.C. Spradling, *Stem cells and their progeny respond to nutritional changes during Drosophila oogenesis*. Dev Biol., 2001. 231: p. 265-278.
44. Salinas, L.S., E. Maldonado, and R.E. Navarro, *Stress-induced germ cell apoptosis by a p53 independent pathway in Caenorhabditis elegans*. Cell Death and Differentiation, 2006. 13(12): p. 2129-2139.
45. Stergiou, L. and M.O. Hengartner, *Death and more: DNA damage response pathways in the nematode C. elegans*. . Cell Death and Differentiation. , 2004. 11: p. 21-28.
46. Bhalla, N. and A.F. Dernburg, *A conserved checkpoint monitors meiotic chromosome synapsis in Caenorhabditis elegans*. . Science, 2005. 310: p. 1683-1686.
47. Schertel, C. and B. Conradt, *C. elegans orthologs of components of the RB tumor suppressor complex have distinct pro-apoptotic functions*. Development, 2007. 134(20): p. 3691-3701.
48. Andux, S. and R.E. Ellis, *Apoptosis Maintains Oocyte Quality in Aging Caenorhabditis elegans Females*. PLoS GENETICS, 2008. 4(12): p. 1-13.
49. Aballay, A. and F.M. Ausubel, *Programmed cell death mediated by ced-3 and ced-4 protects Caenorhabditis elegans from Salmonella typhimurium-mediated killing*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2001. 98(5): p. 2735-2739.
50. Aballay, A., et al., *Caenorhabditis elegans innate immune response triggered by Salmonella enterica requires intact LPS and is mediated by a MAPK signaling pathway*. Current Biology, 2003. 13: p. 47-52.
51. Adamo, A., et al., *Transgene-mediated cosuppression and RNA interference enhance germ-line apoptosis in Caenorhabditis elegans*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2012. 109: p. 3440-3445.
52. Gartner, A., et al., *A Conserved Checkpoint Pathway Mediates DNA Damage-Induced Apoptosis and Cell Cycle Arrest in C. elegans*. Molecular Cell, 2000. 5: p. 435-443.
53. Wang, S., et al., *Cadmium-Induced Germline Apoptosis in Caenorhabditis elegans: The Roles of HUS1, p53, and MAPK Signaling Pathways*. Toxicological Sciences, 2008. 102(2): p. 345-351.
54. Wang, S., et al., *Copper-induced germline apoptosis in Caenorhabditis elegans: The independent roles of DNA damage response signaling and the dependent roles of MAPK cascades*. Chemico-Biological Interactions, 2009. 180: p. 151-157.

55. Lascarez-Lagunas, L., et al., *LIN-35/Rb Causes Starvation-Induced Germ Cell Apoptosis via CED-9/Bcl2 Downregulation in Caenorhabditis elegans*. Mol. Cell Biol., 2014. 34(13).
56. Dernburg, A.F., et al., *Transgene-mediated cosuppression in the C. elegans germ line*. Genes & Development, 2000. 14: p. 1578-1583.
57. Dengg, M., et al., *Abrogation of the CLK-2 checkpoint leads to tolerance to base-excision repair intermediates*. . EMBO Rep., 2006. 7: p. 1046-1051.
58. Derry, W.B., A.P. Putzke, and J.H. Rothman, *Caenorhabditis elegans p53: Role in Apoptosis, Meiosis, and Stress Resistance*. Science, 2001. 294(5542): p. 591-595.
59. Holway, A.H., et al., *Checkpoint silencing during the DNA damage response in Caenorhabditis elegans embryos*. . J. Cell Biol, 2006. 172: p. 999-1008.
60. Stergiou, L., et al., *The nucleotide excision repair pathway is required for UV-C-induced apoptosis in Caenorhabditis elegans*. . Cell Death and Differentiation, 2007. 14: p. 1129-1138.
61. Schumacher, B., et al., *The C. elegans homolog of the p53 tumor suppressor is required for DNA damage-induced apoptosis*. Current Biology, 2001. 11: p. 1722–1727.
62. Schumacher, B., et al., *C. elegans ced-13 can promote apoptosis and is induced in response to DNA damage*. Cell Death and Differentiation, 2005. 12(2): p. 153-161.
63. Greiss, S., et al., *C. elegans SIR-2.1 translocation is linked to a proapoptotic pathway parallel to cep-1/p53 during DNA damage-induced apoptosis*. Genes & Development, 2008. 22: p. 2831-2842.
64. Yang, M., et al., *Caenorhabditis elegans protein arginine methyltransferase PMRT-5 negatively regulates DNA damage-induced apoptosis*. PLoS GENETICS, 2009. 5: p. 1-14.
65. Anderson, P. and N. Kedersha, *RNA granules*. The Journal of Cell Biology, 2006. 172(6): p. 803-808.
66. Anderson, P. and N. Kedersha, *Stress granules: the Tao of RNA triage*. Trends in Biochemical Sciences, 2007. 33(3): p. 141-150.
67. Arkov, A. and A. Ramos, *Building RNA-protein granules: insight from the germline*. . Trends Cell Biol 2010. 20: p. 482-490.
68. Sengupta, M. and P. Boag, *Germ granules and the control of mRNA translation*. IUBMB Life, 2012. 64: p. 586-594.
69. Voronina, E., et al., *RNA Granules in Germ Cells*. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2011. 3(12): p. a002774-a002774.
70. Strome, S. and W. Wood, *Immunofluorescence visualization of germ-line-specific cytoplasmic granules in embryos, larvae, and adults of Caenorhabditis elegans*. PNAS, 1982. 79: p. 1558-1562.
71. Schisa, J., *New Insights into the Regulation of RNP Granule Assembly in Oocytes*. 2012. 295: p. 233-289.
72. Updike, D.L. and S. Strome, *P granule assembly and function in C. elegans germ cells*. J. Androl, 2009.
73. Updike, D. and S. Strome, *P granule assembly and function in Caenorhabditis elegans germ cells*. . J Androl 2010. 31: p. 53-60.
74. Jain, S. and R. Parker, *The discovery and analysis of P Bodies.*, in *Advances in Experimental Medicine and Biology. Ten Years of Progress in GW/P Body Research.*, E. Chan and M. Fritzler, Editors. 2013: New York. p. 23-43.

75. Olszewska, M., J. Bujarski, and M. Kurpisz, *P-bodies and their functions during mRNA cell cycle: mini-review*. . Cell Biochem Funct 2012. 30: p. 177-182.
76. Bhattacharyya, S., et al., *Relief of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress*. Cell, 2006. 125: p. 1111-1124.
77. Brengues, M., D. Teixeira, and R. Parker, *Movement of eukaryotic mRNAs between polysomes and cytoplasmic processing bodies*. . Science, 2005. 310: p. 486-489.
78. Anderson, P. and N. Kedersha, *Stressful initiations*. Journal of Cell Science, 2002. 115(16): p. 3227-3234.
79. Stoecklin, G. and N. Kedersha, *Relationship of GW/P-bodies with stress granules.*, in *Ten Years of Progress in GW/P Body Research. Advances in Experimental Medicine and Biology*. , E. Chan and M. Fritzler, Editors. 2013: New York. p. 197-211.
80. Ohn, T., et al., *A functional RNAi screen links O-GlcNAc modification of ribosomal proteins to stress granule and processing body assembly*. Nat Cell Biol 2008. 10: p. 1224-1231.
81. Rajyaguru, P. and R. Parker, *CGH-1 and the control of maternal mRNAs*. Trends in Cell Biology, 2008. 19(1): p. 24-28.
82. Boag, P.R., et al., *Protection of specific maternal messenger RNAs by the P body protein CGH-1 (Dhh1/RCK) during Caenorhabditis elegans oogenesis*. The Journal of Cell Biology, 2008. 182(3): p. 543-557.
83. Gallo, C.M., et al., *Processing bodies and germ granules are distinct RNA granules that interact in C. elegans embryos*. Developmental Biology, 2008. 323(1): p. 76-87.
84. Jud, M.C., et al., *Large P body-like RNPs form in C. elegans oocytes in response to arrested ovulation, heat shock, osmotic stress, and anoxia and are regulated by the major sperm protein pathway*. Developmental Biology, 2008. 318(1): p. 38-51.
85. Noble, S.L., et al., *Maternal mRNAs are regulated by diverse P body-related mRNP granules during early Caenorhabditis elegans development*. The Journal of Cell Biology, 2008. 182(3): p. 559-572.
86. Schisa, J.A., J.N. Pitt, and J.R. Priess, *Analysis of RNA associated with P granules in germ cells of C. elegans adults*. Development, 2001. 128: p. 1287-1298.
87. Paz-Gómez, D., E. Villanueva-Chimal, and R. Navarro, *The DEAD Box RNA helicase VBH-1 is a new player in the stress response in C. elegans*. PLoS One, 2014. 20(9).
88. Silva García, C., *La proteína de unión a RNA TIAR-1 regula la respuesta al estrés de las células germinales del nematodo Caenorhabditis elegans*, 2013, UNAM: México, D.F. p. 157.
89. Johnson, T., et al., *Arresting development arrests aging in the nematode Caenorhabditis elegans*. . Mechanisms of Ageing and Development, 1984. 28: p. 23-40.
90. Baugh, L., J. Demodena, and P. Sternberg, *RNA Pol II accumulates at promoters of growth genes during developmental arrest*. Science, 2009. 324(5923): p. 92-94.
91. Riddle DL, et al., *C. elegans II*. 2nd. ed. 1997, Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press

92. Narbonne, P. and R. Roy, *Inhibition of germline proliferation during C. elegans dauer development requires PTEN, LKB1 and AMPK signalling.* . Development, 2006. 133(4): p. 611-619.
93. Angelo, G. and M.R. Van Gilst, *Starvation Protects Germline Stem Cells and Extends Reproductive Longevity in C. elegans.* Science, 2009. 326(5955): p. 954-958.
94. Seidel, H.S. and J. Kimble, *The Oogenic Germline Starvation Response in C. elegans.* PLoS One, 2011. 6(12): p. e28074.
95. Lu, X. and H.R. Horvitz, *lin-35 and lin-53, Two Genes that Antagonize a C. elegans Ras Pathway, Encode Proteins Similar to Rb and Its Binding Protein RbAp48.* Cell, 1998. 95: p. 981-991.
96. Ceol, C.J. and R.H. Horvitz, *dpl-1 DP and efl-1 E2F Act with lin-35 Rb to Antagonize Ras Signaling in C. elegans Vulval Development.* Molecular Cell, 2001. 17: p. 461-473.
97. Yuan, J., et al., *The C. elegans Cell Death Gene ced-3 Encodes a Protein Similar to Mammalian Interleukin-1 β -Converting Enzyme.* Cell, 1993. 75: p. 641-652.
98. Petrella, L.N., et al., *synMuv B proteins antagonize germline fate in the intestine and ensure C. elegans survival.* Development, 2011. 138(6): p. 1069-1079.
99. Kritikou, E.A., et al., *C. elegans GLA-3 is a novel component of the MAP kinase MPK-1 signaling pathway required for germ cell survival.* . Genes & Development, 2006. 20: p. 2279-2292.
100. Silva-García, C. and R. Navarro, *The C. elegans TIA-1/TIAR homolog TIAR-1 is required to induce germ cell apoptosis.* Genesis, 2013. 51(10): p. 690-707.
101. Gruidl, M.E., et al., *Multiple potential germ-line helicases are components of the germ-line-specific P granules of Caenorhabditis elegans.* . Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996. 93: p. 13837-42.
102. Kawasaki, I., et al., *PGL-1, a Predicted RNA-Binding Component of Germ Granules, Is Essential for Fertility in C. elegans.* Cell, 1998. 94: p. 635-645.
103. Strange, K., *C. elegans. Methods and Applications.* Methods in Molecular Biology, ed. K. Strange. Vol. 351. 2006, USA: Humana Press.
104. Fire, A., et al., *Potentet and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans.* Nature, 1998. 391: p. 806-811.
105. Fire, A. and L. Timmons, *Specific interference by ingested dsRNA.* . Nature, 1998. 395: p. 854.
106. Fraser, A., et al., *Functional genomic analysis of C. elegans chromosome I by systematic RNA interference.* . Nature, 2000. 408: p. 325-330.
107. Conte, D. and C.C. Mello, *RNA Interference in Caenorhabditis Elegans*, in *Current Protocols in Molecular Biology.* 2003. p. 26.3.1-26.3.20.
108. Reinke, V., et al., *A Global Profile of Germline Gene Expression in C. elegans.* Molecular and Cell, 2000. 6: p. 605–616.
109. Boag, P.R., A. Nakamura, and K. Blackwell, *A conserved RNA-protein complex component involve in physiological germline apoptosis regulation in C. elegans.* Development, 2005. 132: p. 4975-4986.
110. Navarro, R.E., et al., *cgh-1, a conserved predicted RNA helicase required for gametogenesis and protection from physiological germline apoptosis in C. elegans.* Development, 2001. 128: p. 3221-3232.

111. Gilks, N., et al., *Stress Granule Assembly Is Mediated by Prion-like Aggregation of TIA-1*. *Molecular Biology of the Cell*, 2004. 15(12): p. 5383-5398.
112. Audhya, A., et al., *A complex containing the Sm protein CAR-1 and the RNA helicase CGH-1 is required for embryonic cytokinesis in Caenorhabditis elegans*. *J Cell Biol*, 2005. 171: p. 267-279.
113. Anderson, P. and N. Kedersha, *Visibly stressed: the role of eIF2, TIA-1, and stress granules in protein translation*. *Cell Stress & Chaperones*, 2002. 7(2): p. 213-221.
114. Beck, A.R.P., et al., *RNA-binding protein TIAR is essential for primordial germ cell development*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998. 95: p. 2331-2336.
115. Del Gatto-Konczak, F., et al., *The RNA-Binding Protein TIA-1 Is a Novel Mammalian Splicing Regulator Acting through Intron Sequences Adjacent to a 5' Splice Site*. *Molecular and Cellular Biology*, 2000. 20(17): p. 6287-6299.
116. Stoecklin, G.e.a., *MK2-induced tristetraprolin: 14-3-3 complexes prevent stress granule association and ARE-mRNA decay*. *EMBO J.*, 2004. 23: p. 1313-1324.
117. Spike, C., et al., *Genetic Analysis of the Caenorhabditis elegans GLH Family of P-Granule Proteins*. *Genetics*, 2008. 178: p. 1973-1987.
118. Mansfield, J.H., J.E. Wilhelm, and T. Hazelrigg, *Ypsilon Schachtel, a Drosophila Y-box protein, acts antagonistically to Orb in the oskar mRNA localization and translation pathway*. *Development*, 2002. 129: p. 197-209.
119. Richter, J.D. and L.D. Smith, *Reversible inhibition of translation by Xenopus oocyte-specific proteins*. *Nature*, 1984. 309: p. 378-380.
120. Sommerville, J., *Activities of cold-shock domain proteins in translation control*. *BioEssays*, 1999. 21: p. 319-325.
121. Henderson, M.A., et al., *A germline specific isoform of eIF4E (IFE-1) is required for efficient translation of stored RNAs and maturation of both oocytes and sperm*. *Journal of Cell Science*, 2009. 122(10): p. 1529-1539.
122. Cao, H., F. Dzineku, and P.J. Blackshear, *Expression and purification of recombinant tristetraprolin that can bind to tumor necrosis factor α RNA and serve as a substrate for mitogen-activated protein kinases*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2003. 412: p. 106-120.
123. Carballo, E., W.S. Lai, and P.J. Blackshear, *Evidence that tristetraprolin is a physiological regulator of granulocytemacrophage colony-stimulating factor messenger RNA deadenylation and stability*. *Blood*, 2000. 95: p. 1891-1899.
124. Lai, W.S., et al., *Evidence that tristetraprolin binds to AU-rich elements and promotes the deadenylation and destabilization of tumor necrosis factor α RNA*. *Mol. Cell. Biol.*, 1999. 19: p. 4311-4323.
125. Kedersha, N., et al., *RNA-binding Proteins TIA-1 and TIAR Link the Phosphorylation of eIF-2 α to the Assembly of Mammalian Stress Granules*. *The Journal of Cell Biology*, 1999. 147(7): p. 1431-1441.
126. Buchan, J.R., D. Muhlrad, and R. Parker, *P-bodies promote stress granule assembly in S. cerevisiae*. *J. Cell Biol*, 2008. 183: p. 441-455.
127. Loschi, M., et al., *Dynein and kinesin regulate stress granule and P-body dynamics*. *J. Cell Sci*, 2009. 122: p. 3973-3982.
128. Mokas, S., et al., *Uncoupling stress granule assembly and translation initiation inhibition*. *Mol. Biol. Cell* 2009. 20: p. 2637-2683.
129. Arimoto, K., et al., *Formation of stress granules inhibits apoptosis by suppressing stress-responsive MAPK pathways*. *Nat Cell Biol*, 2008. 10(11): p. 1324-1332.

130. Harris, C., A.C. Maroney, and E.M.J. Johnson, *Identification of JNK-dependent and -independent components of cerebellar granule neuron apoptosis*. *Journal of Neurochemistry*, 2002. 83: p. 992-1001.
131. Lu, C., et al., *Serum starvation induces H2AX phosphorylation to regulate apoptosis via p38 MAPK pathway*. *FEBS Letters*, 2008. 582: p. 2703-2708.
132. Ashe, M.P., S.K. De Long, and A.B. Sachs, *Glucose Depletion Rapidly Inhibits Translation Initiation in Yeast*. *Molecular Biology of the Cell*, 2000. 11: p. 833-848.
133. Zid, B.M., et al., *4E-BP Extends Lifespan upon Dietary Restriction by Enhancing Mitochondrial Activity in Drosophila*. *CELL*, 2009. 139: p. 149-160.
134. Spriggs, K.A., M. Bushell, and A.E. Willis, *Translational Regulation of Gene Expression during Conditions of Cell Stress*. *Molecular Cell*, 2010. 40: p. 228-237.
135. Holcik, M. and N. Sonenberg, *TRANSLATIONAL CONTROL IN STRESS AND APOPTOSIS*. *Nature REVIEWS* 2005. 6: p. 318-327.
136. Krishnamoorthy, T., et al., *Tight Binding of the Phosphorylated α Subunit of Initiation Factor 2 (eIF2 α) to the Regulatory Subunits of Guanine Nucleotide Exchange Factor eIF2B Is Required for Inhibition of Translation Initiation*. *Molecular and Cell Biology*, 2001. 18(15): p. 5018-5030.
137. Rogers, A.N., et al., *Life Span Extension via eIF4G Inhibition Is Mediated by Posttranscriptional Remodeling of Stress Response Gene Expression in C. elegans*. *Cell Metabolism*, 2011. 14: p. 55-66.
138. Contreras, V., et al., *Cap-Independent Translation Promotes C. elegans Germ Cell Apoptosis through Apaf-1/CED-4 in a Caspase-Dependent Mechanism*. *PloS One*, 2011. 6(9): p. 1-15.
139. Contreras, V., et al., *Depletion of the cap-associated isoform of translation factor eIF4G induces germline apoptosis in C. elegans*. *Cell Death and Differentiation*, 2008. 15: p. 1232-1242.
140. Kawaguchi, R., et al., *Differential mRNA translation contributes to gene regulation under non-stress and dehydration stress conditions in Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 2004. 38: p. 823-839.
141. Bektesh, S.L. and D.I. Hirsh, *C.elegans mRNAs acquire a spliced leader through a trans-splicing mechanism*. *Nucleic Acids Research*, 1988. 16(12): p. 5692.
142. Eckmann, C.R., et al., *GLD-3, a Bicaudal-C Homolog that Inhibits FBF to Control Germline Sex Determination in C. elegans*. *Developmental Cell*, 2002. 3: p. 697-710.
143. Merritt, C., et al., *3' UTRs Are the Primary Regulators of Gene Expression in the C. elegans Germline*. *Current Biology*, 2008. 18: p. 1476-1482.
144. Sherrill, K.W., et al., *BCL-2 Translation Is Mediated via Internal Ribosome Entry during Cell Stress*. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 2004. 279(28): p. 29066-29074.
145. Bursch, W., et al., *Cell death and autophagy: Cytokines, drugs, and nutritional factors*. *Toxicology*, 2008. 254: p. 147-157.
146. Liu, S.-Y., et al., *Albumin prevents reactive oxygen species-induced mitochondrial damage, autophagy, and apoptosis during serum starvation*. *Apoptosis*, 2012. 17: p. 1156-1169.
147. Boxem, M. and S. van den Heuvel, *C. elegans Class B Synthetic Multivulva Genes Act in G1 Regulation*. *Current Biology*, 2002. 12: p. 906-911.

148. Reddien, P.W., et al., *DPL-1 DP, LIN-35 Rb and EFL-1 E2F Act With the MCD-1 Zinc-Finger Protein to Promote Programmed Cell Death in Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 2007. 175: p. 1719-1733.

VII ANEXOS

ANEXO 1

MEDIOS:

NGM

Un litro contiene:

Reactivo	Cantidad
Cloruro de Sodio (NaCl)	2 g
Bactotripton	4 g
Fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4)	3 g
Fosfato de potasio dibásico (K_2HPO_4)	0.5 g
Colesterol ($\text{C}_{27}\text{H}_{46}\text{O}$)	0.008 g
Agar	20 g

El medio se esteriliza en autoclave durante 20 minutos, a 120°C y 15 libras de presión.

LB

Un litro contiene:

Reactivo	Cantidad
Cloruro de Sodio (NaCl)	5 g
Bactotripton	10 g
Extracto de levadura	5 g

NGM (modificado para cajas con huevo)

Un litro contiene:

Reactivo	Cantidad
Cloruro de Sodio (NaCl)	3 g
Bactotripton	3 g
Agar	17 g

El medio se esteriliza en autoclave durante 20 minutos, a 120°C y 15 libras de presión.

Una vez estéril se le agregaron 12.5 ml de KPO_4 1 M, 0.5 ml de CaCl_2 1 M, 0.5 ml de MgSO_4 1 M y 0.25 ml colesterol 5 mg/ml.

SOLUCIONES:

M9 1X

1 litro contiene:

Reactivo	Cantidad
Fosfato de Sodio (NaHPO ₄)	6 g
Fosfato de Potasio monobásico (KH ₂ PO ₄)	3 g
Cloruro de Sodio (NaCl)	5 g
Sulfato de Magnesio (MgSO ₄)	0.25 ml

La solución se esterilizó en autoclave durante 20 minutos, a 120°C y 15 libras de presión

Gel desnaturalizante (Northern blot)

50 ml de gel contienen:

Reactivo	Cantidad
Agarosa	0.5 g
MOPS 10X	5 ml
Formaldehído al 37%	8.9 ml
H ₂ O tratada con DEPC	36.1 ml

Se añadió al agua la agarosa y se fundió en el microondas. Cuando la temperatura descendió se incorporó el formaldehído y MOPS en la campana de extracción

MOPS 10X (Northern blot)

Un litro contiene:

Reactivo	Cantidad
Acetato de Sodio	3.3 ml
EDTA 0.5 M pH 8	10 ml
MOPS	20.93 g

Se afora a 500 ml con H₂O DEPC y se ajusta el pH a 7 con NaOH 5N

Solución de transferencia SSC 20X (Northern blot)

Un litro contiene:

Reactivo	Cantidad
Cloruro de Sodio (NaCl)	175.3 g
Citrato de Sodio	88.2 g

Solución de hibridación (Northern blot)

Reactivo	Cantidad
Solución Denhardt's	15 ml
SSC 20X	75 ml
Solución de fosfatos 0.1 M pH 6.5	150 ml
SDS 10%	6 ml

La solución Denhardt's está compuesta de 2 g de ficoll, 2 g de PVP y 2 g de BSA, se aforó a 100 ml y se esterilizó por filtración. **La solución de fosfatos** 0.1 M pH 6.5 se elaboró con 25.5 ml de Na₂HPO₄ 1 M y 74.5 ml de NaH₂PO₄ 1 M, estos 100 ml se llevaron a 1000 ml (0.1 M) y se esterilizó por filtración. Por último, **la solución SDS** se elaboró con 5 g de SDS aforando a 50 ml con agua tratada con DEPC y esterilizando por filtración.

Amortiguador de lisis (Perfiles polisomales)

El amortiguador de lisis contiene 300 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl [pH 8.0], 10 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 200 mg/ml de heparina, 400 U/ml de RNasin, 2.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), y 0.2 mg/ml de cicloheximida.

Amortiguador de gradiente (Perfiles polisomales)

El amortiguador de gradiente contiene 25 mM de Tris-HCl pH 8.0, 140 mM de NaCl, 10 mM de Mg Cl₂, 1 mM de DTT y 0.2 mg/ml de cicloheximida.

Amortiguador de electroforesis (Western blot)

Un litro contiene:

Reactivo	Cantidad
Tris-Base	3 g
Glicina	14.4 g
SDS	1 g

Aforar a 1 litro con H₂O milliQ

Amortiguador de transferencia (Western blot)

Un litro contiene:

Reactivo	Cantidad
Tris-Base	3.028 g
Glicina	14.41 g
Metanol	200 ml

Ajustar pH a 8.3 y aforar a 1 litro con H₂O milliQ.

Amortiguador de carga para proteínas 5X (Western blot)

10 ml contienen:

Reactivo	Cantidad
Tris-HCl (pH 6.8) 1 M	0.6 ml
Glicerol 50%	5 ml
SDS 10%	2 ml
Azul de bromofenol 1%	1 ml
H ₂ O milliQ	1.4 ml

TBS 1X (Western blot)

Un litro contiene:

Reactivo	Cantidad
Cloruro de Sodio (NaCl)	8 g
Cloruro de Potasio (KCl)	0.2 g
Tris-Base	3 g

Ajustar pH a 7.4 con HCl y aforar a 1 litro con H₂O milliQ. Esterilizar por autoclave

ANEXO 2

Descripción de las funciones conocidas o predichas de los genes estudiados en este trabajo.

Gen	Función	Valor obtenido en el microarreglo (Z-score)
<i>pgl-1</i>	<p>El gen <i>pgl-1</i> codifica para una proteína de unión a RNA que contiene motivos RGG en el extremo carboxilo; la actividad de PGL-1 se requiere a altas temperaturas para el desarrollo de la línea germinal y la fertilidad, además PGL-1 es necesaria para la formación de gránulos específicos de la línea germinal (gránulos P), es decir, es un componente constitutivo de los gránulos P. El mensajero de <i>pgl-1</i> es expresado exclusivamente en la línea germinal y se detecta en todos los niveles de desarrollo, con altos niveles en adultos. La localización de <i>pgl-1</i> en los gránulos P requiere la actividad de la helicasa de la línea germinal GLH-1.</p>	-2.1
<i>car-1</i>	<p>El gen <i>car-1</i> codifica para una proteína de unión a RNA, es ortólogo de la proteína de <i>S. cerevisiae</i> Scd6p, y de <i>S. pombe</i> Sum2p, TRAIL de <i>Drosophila</i> y LSM14A y LSM14B en humano; CAR-1 inhibe la apoptosis fisiológica en ovocitos. El silenciamiento de este gen induce un incremento significativo en la apoptosis de la línea germinal. Independientemente de la apoptosis CAR-1 se requiere para la ovogénesis normal, la citocinesis en el embrión temprano y la organización normal del RE. CAR-1 tiene un dominio N-terminal relacionado con el dominio Sm el cual no se requiere para su localización sub-celular, pero se une directamente a RNA y es muy importante para su función, CAR-1 se expresa en la línea germinal. Se asocia con CGH-1, DCAP1 y CEY-2/3/4 en los gránulos P y en otras partículas en el embrión temprano. Mutantes en este gen presentan una citocinesis anormal. El RNAi en este gen reduce la fertilidad.</p>	-2.59
<i>cey-2</i>	<p>El gen <i>cey-2</i> codifica para una proteína con un dominio “cold-shock/Y-box”, por homología se predice que puede tener función como proteína de unión a RNA involucrada en regulación de traducción o procesamiento de RNA. El mensajero de <i>cey-2</i> es expresado en el embrión temprano con un patrón característico de los RNA mensajeros maternos tipo II. CEY-2 se asocia con CGH-1 y CEY-3,4 en partículas citoplasmáticas, la pérdida de <i>cey-2</i> no tiene anormalidades obvias. La función específica de este gen aun no se</p>	-2.54

	conoce.	
<i>cgh-1</i>	El gen <i>cgh-1</i> codifica para una helicasa de RNA altamente conservada. Es miembro de la familia de las helicasas tipo DEAD box. Esta proteína se encuentra asociada a gránulos P y a los cuerpos de procesamiento en el citoplasma. La inhibición de la expresión de <i>cgh-1</i> ocasiona que células germinales que formarán ovocitos mueran por apoptosis a través de la vía de apoptosis fisiológica. Tiene un papel importante en la regulación del destino de RNA mensajeros ya que se une a ellos para actuar en su represión traduccional o en el incremento o prevención de su degradación.	-2.16
<i>mex-5</i>	El gen <i>mex-5</i> codifica para una proteína que contiene dos motivos de dedo de zinc tipo CCCH, funciona en redundancia parcial con MEX-6, es esencial para el establecimiento de la asimetría soma/línea germinal en el embrión temprano. MEX-5 interactúa y activa a la proteína ZIF1 que funciona como parte del complejo E3 ubiquitin ligasa, la cual degrada proteínas de línea germinal en los blastómeros somáticos. La distribución de MEX-5 depende de la actividad de las proteínas PAR-1 y OMA-1.	-3.18
<i>ife-1</i>	El gen <i>ife-1</i> codifica para una de las cinco isoformas del factor de inicio de la traducción eIF4E en <i>C. elegans</i> . Algunos estudios indican IFE-1 es específico de la línea germinal y es requerido para promover el control traduccional temporal y espacialmente durante pasos críticos en la gametogénesis	-2.93
<i>nos-2</i>	El gen <i>nos-2</i> codifica para uno de los tres genes en <i>C. elegans</i> que contienen un dominio putativo de unión a zinc similar al descrito en la proteína de <i>Drosophila</i> nanos; <i>nos-2</i> afecta la incorporación de células germinales primordiales a la gónada somática, actúa de manera redundante con <i>nos-1</i> y <i>nos-3</i> para prevenir que las células primordiales de la gónada se dividan en condiciones de ayuno y mantener con esto su viabilidad durante el desarrollo de la larva, también funciona en el cambio de espermatogénesis a ovogénesis. Se asocia a gránulos P.	-2.06
<i>glh-4</i>	El gen <i>glh-4</i> codifica para una helicasa de RNA putativa. Su ausencia afecta la proliferación de la gónada, la ovogénesis y la espermatogénesis. Es componente de gránulos P.	-1.8
<i>oma-1</i>	El gen <i>oma-1</i> codifica para una proteína de unión a RNA con un dominio tipo TIS11. Esta proteína es requerida para la maduración de los ovocitos.	2.52
<i>spn-4</i>	El gen <i>spn-4</i> codifica para una proteína con un dominio de unión a RNA tipo RNP, es requerido para la rotación, pero no la polarización del uso mitótico en el blastómero P1 en el embrión de dos células. También se requiere para la formación de mesoectodermo y mesoendodermo. Se une al 3'UTR del mensajero de <i>glp-1</i> para regular su traducción en los blastómeros anteriores, se une también a <i>pal-1</i> regulando negativamente su traducción en el	-2.49

mismo sitio. Es un componente de gránulos P.

gla-3 El gen *gla-3* es miembro de la familia de proteínas con dedos de zinc del tipo TIS-11. En mamíferos la proteína con dedos de zinc tipo TIS-11 es la tristetraprolina (TTP), la cual es una proteína de unión a RNA que interactúa con las regiones 3' no traducidas de RNA mensajeros ricos en AU regulando negativamente su expresión. La sobreexpresión de TTP induce la formación de gránulos de estrés aun en ausencia de estrés, además esta proteína es importante para el reclutamiento de RNA mensajeros y la formación de partículas ribonucleoproteicas. -1.75

La elevada apoptosis observada como resultado de su silenciamiento se debe a que los ovocitos de los animales RNAi no pueden salir de paquíteno de la meiosis I, además ensayos bioquímicos y pruebas de epistasis genética demostraron que GLA-3 participa en la cascada de señalización de MAPK y que directamente interactúa con MPK1 un regulador meiótico esencial
