



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Regulación transcripcional del gen *lin-35/Rb* en la gónada del *C. elegans* durante ayuno

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Alan Anuart González Rangel

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Rosa Estela Navarro González
Instituto de Fisiología Celular, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Felix Recillas Targa
Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dra. Hilda Lomelí Buyoli
Instituto de Biotecnología, UNAM

Ciudad de México. Junio, 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Agradecimientos

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

Este trabajo fue posible gracias a los apoyos de los proyectos de Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT-SEP) 103856-Q y 220987 y del Programa de Apoyo a la Innovación e Investigación Tecnológica (PAPIIT-UNAM) IN207412 e IN207415.

El alumno Alan Anuart Gonzalez Rangel recibió una beca durante la realización de sus estudios de posgrado Maestría por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, México) con número de registro 575040 y fue beneficiado por el Programa de Apoyo a Estudios de Posgrado para la presentación de trabajos en congresos.

Se agradece al Comité Tutorial que estuvo conformado por:

Dra. Rosa Estela Navarro González (IFC, UNAM)

Dr. Felix Recillas Targa (IFC, UNAM)

Dra. Hilda Lomeli Buyoli (IBT, UNAM)

Se agradece al jurado que fue conformado por :

Presidente Dr. Fernando López Casillas (IFC, UNAM)

Vocal Dra. Susana Castro Obregón (IFC, UNAM)

Vocal Dra. Mayra Furlán Magaril (IFC, UNAM)

Vocal Dr. Juan Miranda Ríos (IIB, UNAM)

Secretario Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova (Facultad de Química, UNAM)

Se agradece a la M. en C. Silvia Salinas Velázquez por su valiosa asistencia técnica durante la realización de este trabajo.

También se agradece al personal de las siguientes unidades del IFC por su valiosa asistencia técnica:

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.

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.

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.

Al personal del taller Ing. Aurey Galván Lobato e Ing. Manuel Ortínez Benavides.

Índice general.

Agradecimientos	2
Índice general.....	4
Índice de Figuras.....	6
Índice de tablas	7
Lista de abreviaturas	8
Resumen	10
1.-Introducción.....	11
1.1. Generalidades y ciclo de vida del nematodo.	11
1.2. La morfología de la gónada de <i>C. elegans</i>	12
1.3. La maquinaria central de apoptosis en <i>C. elegans</i>	14
1.4. La apoptosis fisiológica en la gónada de <i>C. elegans</i>	16
1.5. Apoptosis inducida por diferentes tipos de estrés en la gónada de <i>C. elegans</i>	19
1.6. Apoptosis inducida por daño al DNA	19
1.7. Apoptosis inducida por estrés osmótico, oxidativo y térmico.....	20
1.8. Apoptosis inducida por ayuno	21
1.9. La proteína de Retinoblastoma (Rb)	22
1.10. Regulación transcripcional en el nematodo <i>C. elegans</i>	24
1.11 El estado de la cromatina y sus efectos en la transcripción	27
1.12. La respuesta al estrés por ayuno modifica la transcripción de <i>C. elegans</i>	28
1.13 La familia de factores transcripcionales CREB/ ATF.	29
1.14 La familia de factores transcripcionales FOX	30
1.15 El factor SPTF-3/Sp1 en <i>C. elegans</i>	35
2.-Planteamiento del problema.	37
3.-Hipótesis.....	38
4.-Objetivos.....	39
4.1. Objetivos particulares.	39
5.-Materiales y métodos.....	40
5.1. Mantenimiento de las cepas.....	40

5.2. Sincronización de nematodos.....	40
5.3.- Silenciamiento de los genes por medio de la técnica de RNA de interferencia (RNAi).....	41
5.4.- Cuantificación de cuerpos apoptoticos utilizando la cepa transgénica MD701.....	42
5.5- Condiciones control.....	43
5.6- Condiciones de ayuno.....	43
5.7.- Extracción de RNA.....	43
5.8.- Síntesis de cDNA.....	44
5.9.-Cuantificación de la expresión de RNA mediante qRT-PCR (PCR en tiempo real).....	45
5.10. Evaluación de los RNAi por fenotipos.....	46
6.-Resultados.	49
6.1.- Determinación de la región promotora del gen <i>lin-35</i>	49
6.2. Búsqueda de posibles factores transcripcionales encargados de regular al gen <i>lin-35</i> durante ayuno por medios bioinformáticos.....	52
6.3.-Participación de los posibles reguladores de <i>lin-35</i> en la inducción de apoptosis inducida por ayuno.....	57
6.4. Los genes <i>atf-2</i> , <i>pha-4</i> y <i>daf-16</i> presentan apoptosis fisiológica elevada independiente de la vía de inducción de apoptosis por silenciamiento.	65
6.5. La expresión de <i>lin-35/Rb</i> disminuye en el fondo mutante <i>daf-16(mgDf50)</i> ...	67
7.-Discusión.....	69
7.1.La región promotora de <i>lin-35</i> mide 1200 pb aproximadamente	69
7.2. Los factores ATF-2, PHA-4 y DAF-16 aumentan la apoptosis fisiológica...	69
7.3.Los factores ATF-2, NHR-28, SPTF-3, PHA-4 y DAF-16 son necesarios para inducir apoptosis en el ayuno.....	70
7.4. DAF-16 induce la expresión de <i>lin-35</i> y se requiere para inducir apoptosis por ayuno.....	72
8.-Conclusiones.....	75
9.-Perspectivas.....	76
10.-Referencias.....	77

Índice de figuras

Figura 1. Ciclo de vida del nematodo <i>C. elegans</i>	12.
Figura 2. Esquema de la gónada de <i>C. elegans</i>	13
Figura 3. Modelo del mecanismo de formación del apoptosoma en células somáticas de <i>C.elegans</i>	15
Figura 4. Tipos de inducción de la apoptosis en la gónada de <i>C. elegans</i>	18
Figura 5. Elementos regulatorios de un promotor clásico de metazoario.....	26
Figura 6. Señalización de insulina en condiciones fisiológicas.....	34
Figura 7. Evaluación de RNA de interferencia por fenotipos.	48
Figura 8. Mapa genómico del locus <i>lin-35</i>	49
Figura 9. Análisis bioinformático de la región promotora de <i>lin-35</i>	51
Figura 10. Esquema del promotor de RB en mamíferos.....	53
Figura 11. Los factores transcripcionales DAF-16/FOXO, PHA-4/FOXA, SKN-1/Nrf-2 y NRH-28 se encuentran enriquecidos en la región río arriba del gen <i>lin-35</i>	56
Figura 12. Esquema del promotor de <i>lin-35</i>	57
Figura 13. Los factores transcripcionales SKN-1 y ATF-7 no son necesarios para inducir apoptosis durante el ayuno.....	60
Figura 14. Los factores transcripcionales SPTF-3 y NHR-28 son requeridos para inducir apoptosis durante el ayuno.....	62
Figura 15. Los factores transcripcionales ATF-2, PHA-4 y DAF-16 son requeridos para inducir apoptosis durante el ayuno.....	64.
Figura 16. Los genes <i>atf-2</i> , <i>pha-4</i> y <i>daf-16</i> presentan apoptosis elevada independiente del gen <i>cep-1</i>	66
Figura 17. La expresión de <i>lin-35</i> disminuye en un fondo mutante <i>daf-16 (mgDf50)</i> durante el ayuno.	68.
Figura 18.- Esquema del modelo propuesto sobre la apoptosis en ayuno.....	74

Índice de tablas

Tabla 1.- Cepas empleadas en este trabajo.....	40
Tabla 2.- Oligonucleótidos empleados para qPCR.	45
Tabla 3 . Factores transcripcionales candidatos para regular a <i>lin-35</i> en el ayuno obtenida bibliográficamente	54

Lista de abreviaturas.

ATF	Familia de factores transcripcionales de activación
cAMP	Adenosín Monofosfato cíclico
AMPK	Proteína Cinasas Activadas por AMP
bZIP	Cremallera básico de leucina
CREB	Proteínas que se unen a “elementos de unión a AMP”
CDP	Célula de la punta distal
ChIP	Co-inmunoprecipitación de cromatina
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	Acido Desoxiribonucleico
cDNA	Acido Desoxiribonucleico complementario
EDTA	Acido etilendiaminotetraacético
FOX	Familia de factores transcripcionales Forkhead
GFP	Proteína Verde Fluorescente
GO	Ontología Genética
GR	Receptor a glucocorticoide
IR	Radiación Ionizante
LB	Medio Luria Bertani
L1	Etapas Larvarias 1
L4	Etapas Larvarias 4
MAPK	Proteínas Cinasas activadas por mitógenos
M9	Solución fisiológica para gusanos
NGM-lite	Medio de crecimiento de nematodos
RB	Retinoblastoma
RNA pol II	Polimerasa de RNA
mRNA	Acido Ribonucleico mensajero
RNAi	Acido Ribonucleico de interferencia
RNA dc	Acido Ribonucleico de doble cadena
RT	Retro transcriptasa
qRT-PCR	PCR en tiempo real o PCR cuantitativo
pb	Pares de bases

PCR	En español Reacción en cadena de la polimerasa
PV	Plásmido Vacío
UV	Ultra violeta
TBP	TATA Binding protein o Proteína de unión a TATA

Resumen

Las células germinales están encargadas de mantener la continuidad de las especies, al ser las únicas que se encargan de la reproducción de los animales estas células son de vital importancia en el organismo y su homeostasis debe ser regulada por diversos mecanismos. La apoptosis de las células germinales se ha conservado en la evolución y parece ser un proceso importante en la homeostasis de las mismas. Diversas señales pueden desencadenar apoptosis en la línea germinal como diferentes tipos de estrés, tal es el caso del choque térmico, el daño al DNA o el ayuno. Cada vía es controlada de manera independiente, por ejemplo las MAPK controlan la muerte de las células germinales ante estrés osmótico, choque de calor así como estrés oxidativo, la vía del daño al DNA se controla por la proteína CEP-1 que es homóloga a p53. Finalmente la apoptosis inducida por ayuno es controlada por LIN-35, la cual es la única proteína homóloga a Retinoblastoma en el nematodo. Poco se ha estudiado de la regulación de *lin-35* a nivel transcripcional en el nematodo durante el ayuno. Por medio de análisis de conteo de cuerpos apoptóticos con el transgénico CED-1 y empleando RNA de interferencia evaluamos si la ausencia de estos factores transcripcionales afectaba la apoptosis en el ayuno. Fueron identificados algunos factores transcripcionales que controlar la apoptosis inducida por el ayuno y que podrían regular a *lin-35*. Tomando los genes homólogos a SP1 y ATF, que son reguladores de RB en mamíferos, observamos que tanto SPTF-3 como ATF-2 son requeridos para la apoptosis inducida por ayuno, sin embargo aun falta por determinar si estos factores regulan directamente a *lin-35*. Además empleando datos del modEncode incluimos algunos factores transcripcionales como *pha-4*, *daf-16* y *skn-1* que son reguladores durante la condición de ayuno. Observamos que *skn-1* no tiene participación en la apoptosis inducida por ayuno mientras que tanto *pha-4* como *daf-16* son necesarios para poder responder ante este estrés. Finalmente determinamos que el factor transcripcional DAF-16 es necesario para la activación transcripcional de *lin-35*, ya que en un fondo mutante *daf-16*, la expresión de *lin-35* disminuye considerablemente, así como es incapaz de disparar apoptosis durante ayuno.

1.- Introducción

1.1.- Generalidades y ciclo de vida del nemátodo.

Caenorhabditis elegans es un nemátodo de vida libre que mide aproximadamente 1 mm de longitud, el cual ha sido considerado como un buen modelo de estudio porque cuenta con un ciclo de vida corto, alrededor de 3 días, es transparente, tiene una anatomía muy sencilla, su genoma está completamente secuenciado y anotado facilitando la investigación genética, su genoma se compone por aproximadamente 20,000 genes de los cuales el 40% están conservados en otros organismos metazoarios (Kim, 2001).

El ciclo de vida de *C. elegans* dura 3 días (hasta llegar a la etapa adulta y reproducirse) consiste de una etapa embrionaria de 14 horas, seguida por 4 estadios larvarios (L1, L2, L3 y L4) y una etapa adulta (Fig. 1). Cada estadio larvario esta marcado por la muda de la cutícula en donde una nueva cutícula se sintetiza y reemplaza a la anterior. La mayoría de los animales de la población son hermafroditas, sin embargo alrededor del 1% son machos (Wood,1998). Como animales adultos pueden llegar a vivir hasta 20 días.

Específicamente dos características hacen al *C. elegans* un excelente modelo de estudio para entender la regulación transcripcional. Primero, *C. elegans* es completamente transparente a través de su ciclo de vida, haciéndolo un excelente sistema para usar reporteros fluorescentes y monitorear la expresión génica en animales vivos. Segundo, el tamaño del genoma del nematodo facilita la identificación de secuencias regulatorias (Reinke, 2013).

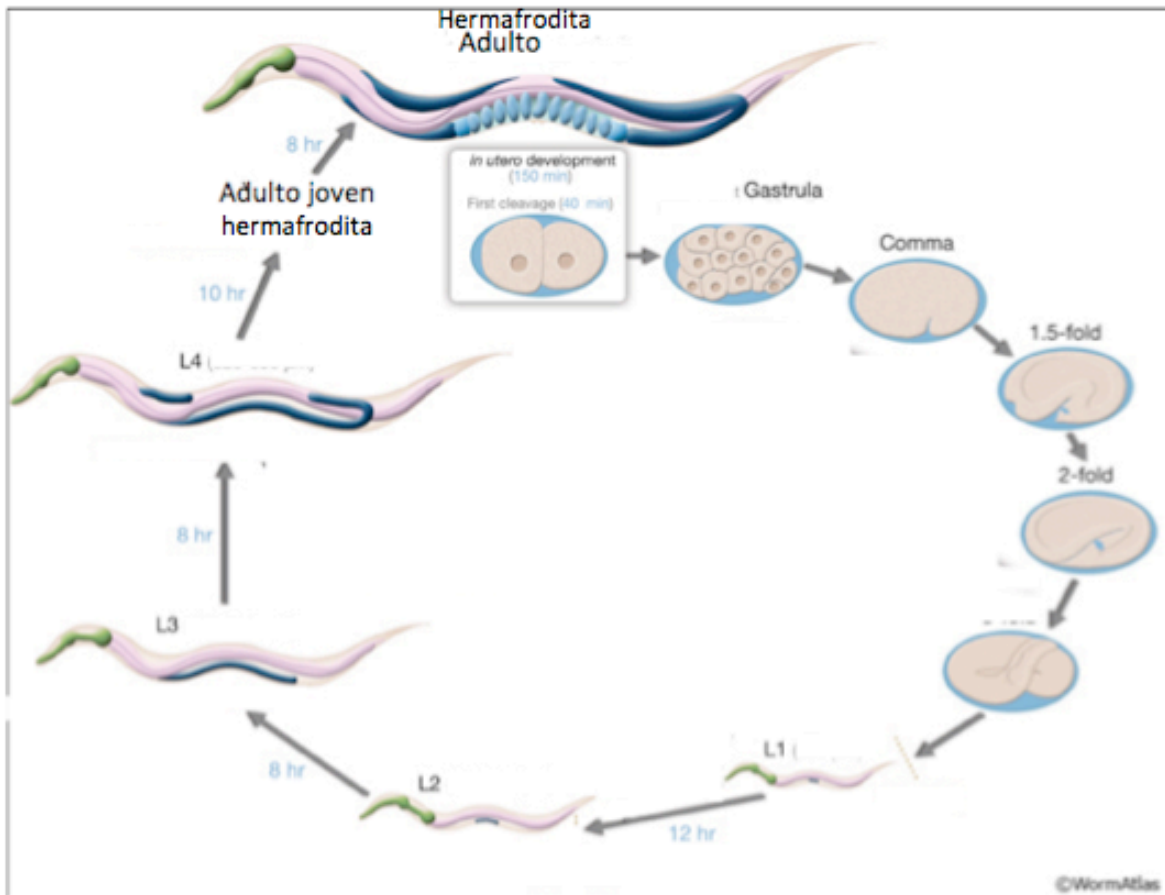


Figura 1. Ciclo de vida del nematodo *C. elegans*. En el esquema se muestra el ciclo de vida de un gusano hermafrodita el cual comienza con el desarrollo embrionario, seguido de las 4 etapas larvianas del nematodo hasta que finalmente el organismo adulto alcanza la madurez sexual completando el ciclo de vida. Modificado de Altun y Hall (2005).

1.2. La morfología de la gónada de *C. elegans*

La gónada de los adultos hermafroditas de *C. elegans* es un sincicio, es decir; que los núcleos comparten un citoplasma común. La gónada está compuesta por dos brazos idénticos en forma de U que se encuentran unidos por el útero (Fig. 2). 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, el cual promueve la proliferación mitótica de las células germinales adyacentes formando un nicho de células troncales germinales (Fig. 2) (Hubbard & Grenstein, 2000).

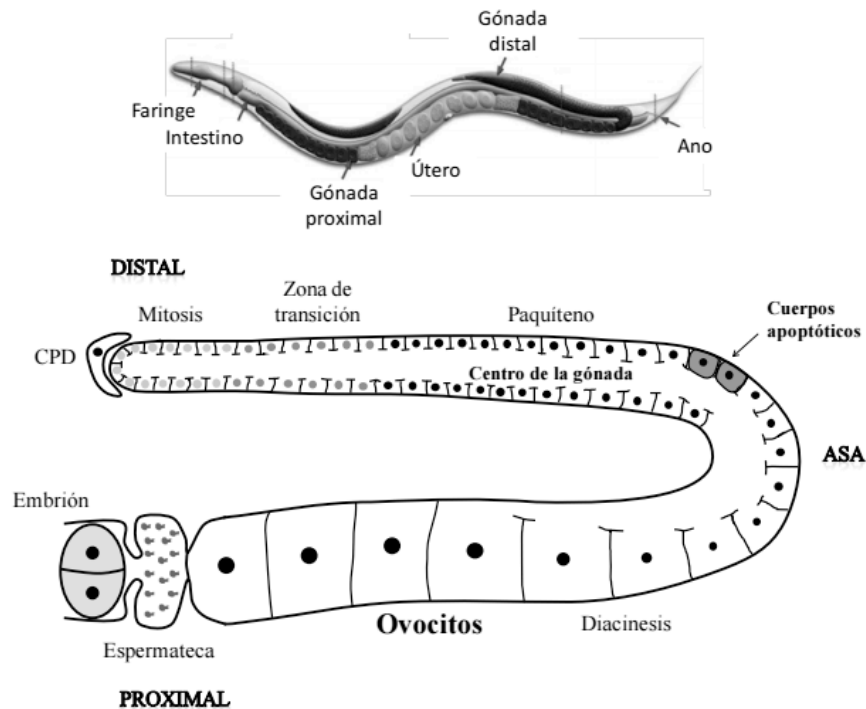


Figura 2. Esquema de la gónada de *C. elegans*. Arriba Representación esquemática de la anatomía general de un adulto hermafrodita, los dos brazos de la gónada están conectados por el útero central. Abajo Se muestra uno de los brazos de la gónada. Las células germinales están envueltas por membranas parciales forman 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 donde las células germinales salen de paquiteno para continuar el desarrollo de los ovocitos. (Tomado y modificado de Altum *et al.*, 2005).

Conforme las células germinales se alejan de la célula distal, la señal de proliferación 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 espermátidas en la etapa L4 u ovocitos maduros en la zona proximal en el animal adulto (Fig. 2). Las primeras 40 células germinales de cada brazo de la gónada forman 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 que continua durante el resto del periodo reproductivo del animal. En la región del asa, pasando el paquiteno las células son susceptibles a sufrir apoptosis. Durante la ovulación, el ovocito pasa a la espermateca donde es fertilizado y el embrión es depositado en el útero (Pazdernik & Schedl, 2013).

1.3. La maquinaria central de apoptosis en *C. elegans*

La apoptosis o muerte celular programada, es un fenómeno conservado en la evolución, se caracteriza por la condensación de la cromatina, la reducción en el volumen celular, la fragmentación del ADN y la pérdida del potencial de membrana mitocondrial (Lettre, 2004).

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 (Kroemer *et al.*, 2009). 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 (Darland, 2009; Murphy *et al.*, 2003).

Durante el ciclo de vida de *C. elegans* la apoptosis puede ocurrir durante tres diferentes etapas del desarrollo. 1) La apoptosis somática, como su nombre lo indica, ocurre en los tejidos somáticos durante el desarrollo embrionario (a los 250-450 min. post-fertilización) 2) en el desarrollo post-embrionario (estadio L2) (Sulston & Horvitz 1977; Sulston *et al.*, 1983) 3) La tercera etapa es la apoptosis fisiológica, ocurre bajo condiciones normales durante la ovogénesis y se describirá mas adelante (Gumienny *et al.*, 1999).

En *C. elegans*, la apoptosis se encuentra bajo control genético, que incluyen 4 diferentes pasos en el proceso. El primer paso es la decisión, el segundo consiste en ejecución de la muerte, luego de esto la célula es fagocitada por las células vecinas y finalmente ésta célula es degradada (Lettre, 2004). La ejecución de la apoptosis esta regulada por una serie de interacciones proteína- proteína entre los 3 componentes principales (CED-9, CED4, CED-3).

La causa de muerte celular inmediata en *C. elegans* es la escisión proteolítica de CED-3, de proCED-3 a una enzima activa. Para que la activación ocurra varias moléculas proCED-3 deben ser asociadas con un tetrámero de CED-4 para formar un gran complejo oligomérico denominado como apoptosoma (Fig.

3). Sin embargo, en ausencia de estímulos apoptóticos la proteína CED-4 no forma tetrámeros, sino dímeros, los cuales están secuestrados en la membrana externa de la mitocondria a través de interacciones proteína- proteína con CED-9 (Lettre, 2004) (Fig. 3). El gen *egl-1* codifica para una proteína pro-apoptótica (EGL-1) que funge como un cuarto elemento, que regula la apoptosis somática. En las células somáticas destinadas a morir se expresa la proteína EGL-1 (un miembro de la familia Bcl-2) (Fig. 3). Ésta cuenta con un dominio único de BH3 e interfiere con el complejo de CED-9 y CED-4 liberando a CED-4, lo que conduce a la formación del apoptosoma (Gumieny *et al*, 1999) (Fig. 3). En el adulto, EGL-1 también controla la apoptosis en respuesta al daño al DNA así como en las infecciones por patógenos.

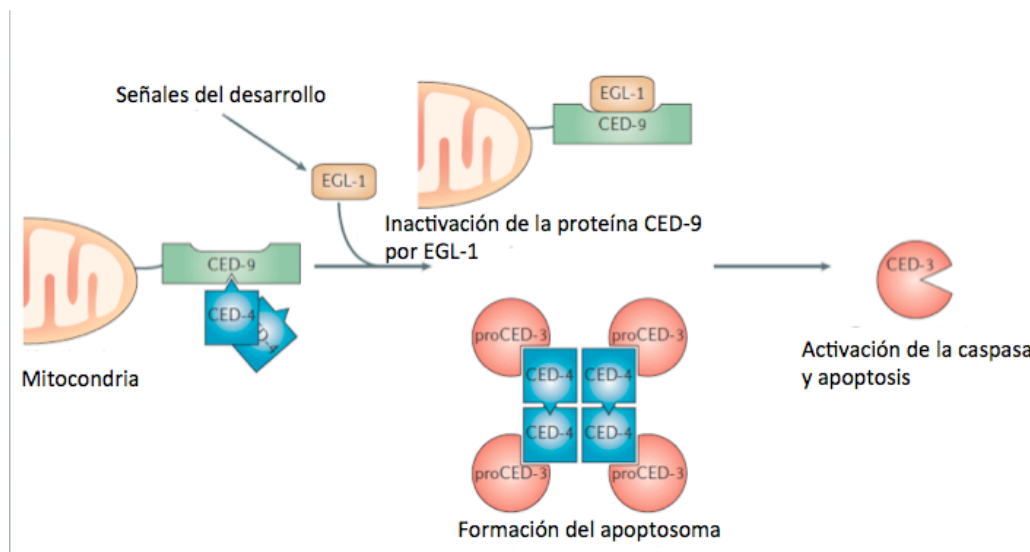


Figura 3. Modelo del mecanismo de formación del apoptosoma en células somáticas de *C.elegans*. En las células destinadas a morir por apoptosis, el complejo de CED-9- CED-4 es disociado por la interacción de la proteína pro-apoptótica EGL-1, la cual al unirse a CED-9 libera a CED-4. Posteriormente, dos dímeros de CED-4 se unen formando un tetrámero de CED-4 que se unen a las moléculas pro-CED-3, lo que tiene como consecuencia una escisión proteolítica de CED-3, lo que activa a la caspasa efectora y provoca la apoptosis. Tomado y modificado de Lettre, 2004.

1.4. La apoptosis fisiológica en la gónada de *C. elegans*

En el adulto hermafrodita durante la ovogénesis ocurre apoptosis en las células germinales de manera fisiológica (Gumienny et al 1999) (Fig. 2). Este tipo de apoptosis ocurre en la región del asa de la gónada, en la que las células germinales salen del paquiteno de la profase I de la meiosis para continuar con diploteno y entrar a diacinesis. Al igual que la apoptosis anteriormente descrita, la apoptosis fisiológica (que solo se da en la gónada del adulto) es ejecutada por la maquinaria central de apoptosis, sin embargo a diferencia de la apoptosis que ocurre en las células somáticas, la proteína EGL-1 no participa (Gumienny et al., 1999).

La apoptosis en la ovogénesis es algo común que se observa desde invertebrados hasta mamíferos e inclusive en humanos (Baum et al 2005; Tilly, et al., 2001). Ha sido propuesto que esta apoptosis regula la producción y la calidad de los ovocitos, además de ser un mecanismo para contener contra los cambios los cambios medioambientales (Tilly, et al 2001; Andux y Elis, 2008; Angelo & Van Gilst, 2009). Existen tres hipótesis para explicar este fenómeno (Tilly et al., 2001).

La primera sugiere que las células germinales compiten por los nutrientes que permiten su sobrevivencia; por lo que si estos son escasos o no están accesibles, la célula germinal muere. Este tipo de muerte se observa en la mosca *Drosophila melanogaster* en donde una dieta baja en proteínas induce un aumento en la apoptosis de las células germinales (Drummond-Barbosa & Spradling, 2001). También en *C. elegans*, se ha observado que el ayuno incrementa la apoptosis de las células germinales (Salinas et al , 2006).

En la segunda hipótesis se propone que la apoptosis es el resultado de daños al DNA, se sabe que como respuesta al estrés genotóxico, el organismo activa vías de señalización que monitorean si hay daño, esto tiene como resultado que el ciclo celular se a detenido, para permitir la reparación del daño, y/o inducir apoptosis.

La tercer hipótesis propone que las células destinadas a morir sirven como células nodrizas para el transporte de orgánulos, mRNA 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* (Tilly *et al.*, 2001; Gumienny *et al.*, 1999). Aunque la función y regulación de la apoptosis de las células germinales no se ha entendido completamente, se cree que es un proceso importante para la fertilidad del animal.

Actualmente no se sabe como la maquinaria central de apoptosis es disparada en condiciones fisiológicas en las células germinales, pero se han identificado algunos genes que afectan la frecuencia de este proceso. Un ejemplo de esto es la proteína Ras/ MAPK, un regulador clave de la apoptosis fisiológica (Gumienny *et al.*, 1999; Park *et al.*, 2006). La apoptosis es prevenida si la señalización MAPK es bloqueada y se dispara cuando la señal esta activada continuamente (revisado en Gartner *et al.*, 2005). Se ha visto un incremento en la apoptosis fisiológica cuando la MAPK no es inhibida por cualquiera de sus fosfatasas predichas como LIP-1 o la proteína de unión a RNA, GLA-3 que influye en varios eventos somáticos dependientes de Ras/MAPK (Kritikou *et al.*, 2006; Lettre *et al.*, 2004). La proteína Ras/MAPK es requerida en muchos pasos de la meiosis, incluyendo la salida del paquiteno (Church *et al.*, 1995; Leacock and Reinke, 2006), actualmente no se sabe si Ras/MAPK proporciona un señal de inicio para la apoptosis fisiológica o dirige a las células a una etapa donde son mas susceptibles a señales pro-apoptóticas (Gumienny *et al.*, 1999).

Entre las proteínas que regulan la maquinaria de apoptosis fisiológica (Fig. 4a) están los factores transcripcionales EGL-38, PAX-2, el represor LIN-35, y activadores de la familia E2F/DP (DPL-1, EFL-1, EFL-2) (Park *et al.*, 2006; Schertel & Conradt, 2007). EGL-38 y PAX-2 son miembros de la familia de factores de transcripción PAX2/5/8, los cuales activan la transcripción de *ced-9* para proteger a las células germinales de la muerte. Mutantes dobles en estos genes presentan una disminución importante del transcrito de *ced-9*, mientras que si se induce la expresión de EGL-38 o PAX-2 el RNAm de *ced-9* aumenta (Gartner, 2008).

Por otro lado LIN-35 (homólogo a Rb), actúa como un posible represor transcripcional de *ced-9*. Mutantes en el gen *lin-35* presentan niveles de apoptosis fisiológica disminuidos debido al incremento en la expresión de *ced-9*. Se tiene evidencia genética de que el gen *lin-35*, regula parcialmente la inducción de la apoptosis fisiológica inhibiendo la expresión del gen *ced-9* (Schertel, y Conradt, 2007).

Además las proteínas de unión a DNA que componen el heterodímero tipo E2F (DPL-1, EFL-1 y EFL-2) promueven la apoptosis de las células germinales a través de la activación de la transcripción de los genes *ced-4* y *ced-3* (Schertel & Conradt, 2007). Tomando en cuenta lo anterior, es evidente que la regulación de la maquinaria apoptótica a un nivel transcripcional es de gran importancia para modular la apoptosis de las células germinales.

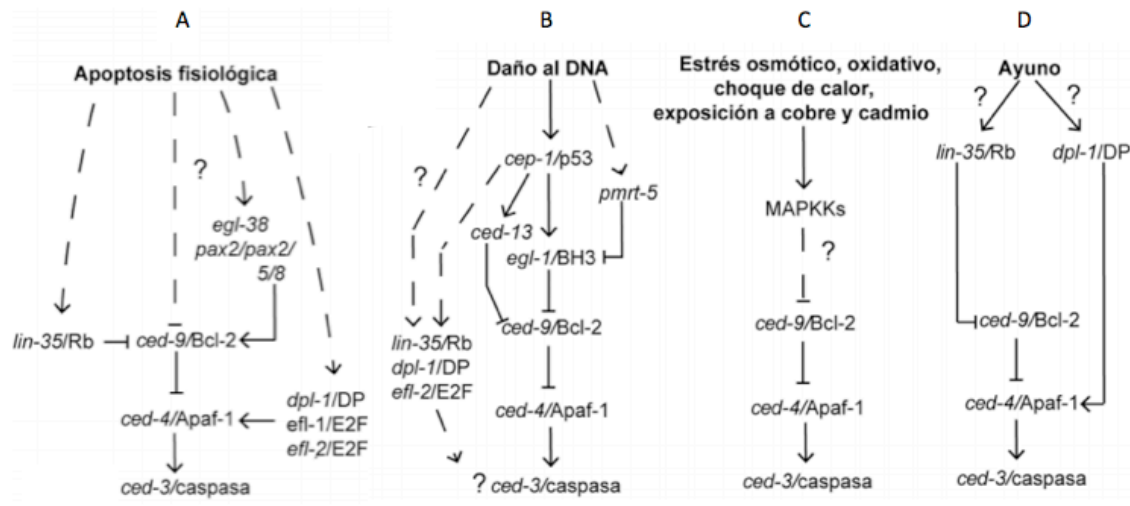


Figura 4. Tipos de inducción de la apoptosis en la gónada de *C. elegans*. A-D) Vías de inducción de apoptosis que convergen en la maquinaria central de apoptosis (*ced-9*, *ced-4* y *ced-3*). En el esquema se indican los genes que participan en cada vía. A) La apoptosis fisiológica es desencadenada 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-3* y *ced-4* mientras que LIN-35 la reprime. DPL-1, EFL-1 y EFL-2 son reguladores transcripcionales de *ced-3* y *ced-4* B) 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. C) El estrés osmótico, oxidativo, el choque de calor requieren de la vía de la MAPKKs y son independientes de CEP-1 y EGL-1. D) La inducción de apoptosis por ayuno requiere de los genes *lin-35/Rb* y *dpl-1/DP*, los cuales 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 completamente descrita. Tomado de Lascarez-Lagunas 2014.

1.5. Apoptosis inducida por diferentes tipos de estrés en la gónada de *C. elegans*

Además de la apoptosis fisiológica (Fig. 4a), diferentes tipos de estrés tales como, el estrés osmótico, el oxidativo, el térmico, el ayuno así como por la exposición a agentes genotóxicos pueden inducir apoptosis en la gónada (Salinas *et al.*, 2006). Estos inducen apoptosis a través de vías independientes (Fig. 4). Durante el estrés genotóxico inducido por rayos UV o radiación ionizante (IR) se causa un daño al DNA, esto induce la activación de *egl-1* a través de la CEP-1/p53 (Fig.4b) (Gartner, *et al* 2000) . Además diferentes tipos de estrés osmótico, oxidativo y térmico pueden inducir apoptosis (Fig. 4c), está es controladoa por la vía de las MAPK (Salinas et al 2006), finalmente el tercer tipo de inducción de apoptosis responde al estrés nutricional (Fig. 4d) el cual es regulado por LIN-35 (Salinas et al, 2006; Lascarez-Lagunas et al 2014).

1-6. Apoptosis inducida por daño al DNA.

Se ha estudiado ampliamente la apoptosis inducida por daño a DNA en el nemátodo, sin embargo ya que este trabajo no se centra en dicha respuesta solo se describirá brevemente; para mayor información se pueden consultar revisiones (Stergiou y Hengartner, 2004; Gartner et al 2008 ; Ermolaeva et al 2015) los cuales presentan un mayor detalle de la respuesta en este tipo de estrés.

En *C. elegans* el daño al DNA no induce apoptosis de las células somáticas pero sí en las germinales (Gartner *et al*, 2000). Se ha observado que cuando los nemátodos son sometidos a diferentes tipos de estrés genotóxico como son: la radiación ionizante (IR), la radiación por UV y los agentes alquilantes se induce un incremento en la apoptosis de células germinales (Gartner *et al* ,2000).

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 la proteína CEP-1, el homólogo de p53 en mamíferos (Schumacher, 2001). 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. 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 (Fig. 4b) (Schumacher et al, 2005).

CEP-1/ p53 también regula la apoptosis de las células germinales cuando se silencian genes por medio de la cosupresión o RNAi en *C. elegans*, este fenómeno requiere de las proteínas CEP-1/p53 y SIR 2.1. (Adamo et al 2012). La apoptosis inducida por cosupresión responde a la introducción de múltiples copias de un gen específico en la línea germinal lo que también provoca el silenciamiento del gen endógeno correspondiente. El RNAi y la cosupresión de genes han sido propuestos como mecanismos de defensa en contra de la invasión por secuencias repetidas, transposones, virus y transgenes exógenos (Dernburg et al 2000).

1.7. Apoptosis inducida por estrés osmótico, oxidativo y térmico.

Otra de las vías de inducción de apoptosis en las células germinales es la que se desencadena por factores que no alteran la integridad genética, pero que posiblemente afectan vías de señalización.

Salinas y colaboradores observaron que la exposición al estrés osmótico, oxidativo y choque de calor induce un incremento en la apoptosis de las células germinales (Salinas, et al 2006). Esta vía de apoptosis es independiente tanto de la proteína CEP-1/p53 como de EGL-1 (Fig. 4c). Este tipo de apoptosis es inducida por la vía de las Map cinasas (MAPKKs) que regulan a las cinasas tipo Jun y Fos (JNK y p38). Además observaron que 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 (Salinas, et al 2006).

1.8. Apoptosis inducida por ayuno

Salinas y colaboradores demostraron que el estrés sometido por ayuno induce apoptosis. En ese trabajo se demostró que la respuesta apoptótica durante el ayuno no es controlada por la vía de las MAPK y no depende de *cep-1/p53* y *egl-1* dejando abierta la pregunta de cual era el mecanismo de regulación de la apoptosis en dicha condición.

Mas adelante Láscarez-Lagunas y colaboradores, demostraron que al someter a los gusanos a un ayuno por 6 horas, el mRNA de *ced-9* se reduce considerablemente (10 veces comparado al control), el mRNA de *ced-4* aumenta (1.8 veces), al igual que el mRNA de *lin-35* y *dpl-1* aumentaban considerablemente mientras que el mRNA de *ced-3* no mostraba cambio en esta condición. Estos datos muestran que durante la condición de ayuno existen ajustes en la expresión de los genes que codifican para la maquinaria central de apoptosis (Lascarez-Lagunas et al 2014).

En ese mismo trabajo Láscarez-Lagunas analizó el estado traduccional en el ayuno empleando perfiles polisomales, mostró que durante el ayuno hay una reducción global en la traducción. Al analizar diferentes mRNA como el de *act-5* o el de *glh-4* se mostró que la reducción en la traducción se daba tanto en tejido somático como en la línea germinal. Al examinar la traducción de los genes de la maquinaria central de apoptosis se demostró que los mRNA *ced-9* y *ced-4* tienen una disminución en la traducción, sin embargo *ced-3* no muestra alteración, de igual manera el mRNA de *lin-35* escapa la reducción de la traducción durante el ayuno (Lascarez-Lagunas et al 2014).

Para corroborar si la disminución en la traducción de los mensajeros de *ced-9* y *ced-4* tenían efecto en la cantidad de proteína en esta condición se realizaron análisis de tipo Western blot. En estos se corroboró que el nivel de proteína de CED-9 durante el ayuno no es detectable, mientras que CED-4 no muestra cambios.

Finalmente se demostró que la disminución observada en el mRNA de *ced-9* depende de *lin-35*, ya que en un fondo mutante para *lin-35* no se observa

disminución en el mRNA. Mientras que la proteína fue detectable durante el ayuno en este fondo mutante, en condiciones normales no se observa. Por otro lado el factor DPL-1 activa la transcripción del gen *ced-4* y en un fondo mutante para *dpl-1* la cantidad de proteína CED-4 disminuye comparada con el control (Lascarez-Lagunas et al 2014).

Con todos estos datos se propuso un modelo para entender como se regula la apoptosis en el ayuno (Fig. 4d) este modelo consiste en que el mRNA de *lin-35* se acumula durante el ayuno, lo que conlleva a un aumento en el nivel de su proteína, y que tiene como consecuencia la disminución del RNAm de *ced-9* provocando un aumento apoptosis en esta condición. Además, el control de la transcripción del gen *ced-4* por el factor DPL-1 potencia la señal de la apoptosis y *efl-1* y *efl-2* no participan en esta respuesta (Lascarez-Lagunas, 2014).

El trabajo de Lascarez-Lagunas y colaboradores abrió la incógnita de cómo se regula el aumento del mensajero de *lin-35/Rb* durante la condición de ayuno, por lo que en este trabajo nos enfocamos en estudiar como es que *lin-35/Rb* aumenta su expresión durante el ayuno.

1.9. La proteína de retinoblastoma (Rb)

La proteína Rb es una fosfoproteína que regula la progresión de la fase G1 a S del ciclo celular controlando un punto clave del ciclo celular. Dependiendo la fase del ciclo celular se mantiene hipofosforilada (activa) o hiperfosforilada (inactiva), de esta manera es regulada su actividad biológica (Chen et al 1989).

En mamíferos el gen *Rb1* codifica para la proteína RB y fue originalmente descubierto porque mutaciones en este gen, confieren una susceptibilidad a desarrollar tumores en la retina, motivo por el cual se denomina Retinoblastoma. Sin embargo, este gen no solo participa en este tipo de cáncer sino también en el desarrollo de osteosarcomas, cáncer mamario y cáncer de próstata, entre otros (Harbour & Dean, 2000).

La proteína RB pertenece a la familia de proteínas con dominio “pocket” que comprenden a pRB, p107 y p130, estas dos últimas al igual que RB parecen

controlar el ciclo celular (Sherr et al., 1996). El dominio “pocket”, que esta compuesto por los dominios, A y B que están conservados a través de especies y entre proteínas relacionadas. Estos dominios están separados por una región espaciadora que varia en tamaño y no esta conservada, pero es importante para la función de la proteína (Chow and Dean, 1996; Quin *et al* 1992). El dominio pocket fue denominado inicialmente como la región mínima de RB para interaccionar con las oncoproteínas de virus tumorales tales como adenovirus E1a, virus de simio SV40 y el virus del papiloma humano E7. La unión a estas proteínas oncogénicas afecta la interacción de RB con los factores transcripcionales de la familia E2F evitando así que su función, controlando que el ciclo celular sea llevada acabo normalmente (Harbour and Dean, 2000).

Se ha encontrado que Retinoblastoma (RB) esta asociado con reguladores clave requeridos para la especificación de órganos. Esto confirma que RB está regulando diversos procesos celulares diferentes al papel clásico que se le había atribuido, regulando genes del ciclo celular. Esto fue apoyado además por diversos trabajos bioquímicos y genéticos que sugerían que RB no solo secuestra a factores transcripcionales de la familia E2F en la fase G1 del ciclo celular, sino también forma un complejo represor con E2F-DP (su compañero de unión al ADN), que reprime la expresión genética de varios genes. Existe evidencia de la interacción directa de RB con la proteína Suv39h, una metil transferasa de histona especifica para la lisina 9 de la histona 3. Esta metil transferasa crea un sitio de unión para la proteína de heterocromatina 1 (HP1), que promueve la formación de heterocromatina (revisado en Talluri & Dick, 2012).

En *C. elegans* el gen *lin-35* codifica para la única proteína homóloga a Retinoblastoma (no se encuentran las otras proteínas pocket lo cual facilita el entendimiento de esta proteína) y se sabe que *lin-35* actúa de manera redundante con algunos genes en varios contextos del desarrollo del nemátodo. El gen *lin-35* fue identificado por Ferguson y Horvitz como una mutante del fenotipo “Synthetic Multivulval” (SynMuv), los cuales son genes que inhiben la expresión del destino celular de la vulva. Posteriormente Boxem y Huevuel (2001) demostraron que *lin-*

35 es un importante regulador negativo del ciclo celular y que la función de RB en mamíferos, de controlar el ciclo celular estaba conservada (Boxem & Huevel, 2001).

Además se ha demostrado que LIN-35 está involucrado con diferentes procesos tales como: la morfogénesis de la vulva y la faringe (Fays; *et al* 2004), divisiones celulares asimétricas (Cui *et al*, 2004), el destino celular en la gónada somática (Bender *et al* 2004), el desarrollo y crecimiento larvario (Chesney *et al*, 2006), la promoción de la muerte celular (Reddien *et al*; 2007), además de actuar en el intestino para regular la expresión de genes requeridos para la utilización de nutrientes (Kerhienko *et al*, 2008), en el control de la represión de la línea germinal (Wang, *et al*, 2005), modulando la sensibilidad al RNAi (Lehner *et al*, 2006), así como en la apoptosis en la línea germinal en condiciones fisiológicas y durante el ayuno (Schertel, *et al* 2007; Salinas *et al*, 2006; Lascares-Lagunas *et al* 2014). Sin embargo, hasta el momento no se ha estudiado en el nemátodo como es regulado el gen de *lin-35* a un nivel transcripcional.

1.10. Regulación transcripcional en el nematodo *C. elegans*

Las secuencias de genes codificantes son convertidas a mRNA por el proceso altamente regulado, conocido como transcripción. La precisión espacio-temporal de los transcritos de genes tanto codificantes como regulatorios es una parte esencial para el desarrollo en los metazoos.

Entender los mecanismos moleculares que subyacen el control de la expresión génica es esencial para comprender los procesos de determinación celular durante la embriogénesis, los eventos post- embrionarios así como las interacciones ambientales y procesos relacionados a las enfermedades.

En los organismos multicelulares cada célula cumple una función específica que está determinada por la combinación de los productos génicos expresados en esa célula en un momento determinado. Los mecanismos de regulación en la expresión de esos genes son diversos y se pueden afectar en diferentes niveles tales como; la regulación de la síntesis del mRNA, su procesamiento, su estabilidad y en el caso de genes codificantes para proteínas, su traducción. En

esta sección nos enfocaremos en la regulación a nivel transcripcional en *C. elegans*.

La transcripción es el primer paso necesario en la expresión génica, el cual juega un papel central en el desarrollo del organismo y la evolución (Levine and Tjian, 2003; Chen and Rajewsky 2007). Además se sabe que el número de proteínas específicas involucradas en el proceso de transcripción y su regulación aumenta con la complejidad del organismo (Vogel and Chothia, 2006).

La regulación de la transcripción es mediada por la RNA polimerasa II la cual transcribe a la mayoría de los genes. La RNA pol II actúa con la proteína de unión a TATA (TBP) y los factores asociados a TBP en el “centro o núcleo” del promotor de genes codificantes para proteínas. (Walker et al., 2004) Como en otros organismos eucariontes la subunidad grande de la polimerasa, codificada por el gene *ama-1*, tiene un dominio carboxilo terminal (CTD) que sirve como un sitio de unión para complejos involucrados en los procesos de co-transcripción del *RNAm* y la modificación de histonas (Bird and Riddle 1989). La RNA pol II activa es fosforilada en el dominio carboxilo terminal (CTD) en la serina 2 y 5 (Ser2P y Ser5) del heptapeptido YSTPSPS, el cual está conservado en otros eucariontes (Pathani y Greenleaf, 2006).

La regulación transcripcional resulta de una organización compleja entre las secuencias regulatorias, que actúan en el sitio, denominadas como elementos en *Cis*, los cuales sirven como sitios de unión para los factores transcripcionales (denominados elementos *trans*). Juntos determinan, si un gen será activado o silenciado en respuesta al estado metabólico y las condiciones ambientales. En eucariontes superiores, estas secuencias regulatorias se encuentran agrupadas dentro de módulos funcionales; como se observa en la figura 5 existen diversos elementos regulatorios estos incluyen al “núcleo” del promotor, así como otros elementos regulatorios que pueden controlar a un gen específico o un conjunto de genes, y que pueden estar localizadas tanto río arriba como río abajo de la región controlada, estos elementos pueden ser promotores, potenciadores positivos o negativos y secuencias “insulators” (Levine and Tjian, 2003).

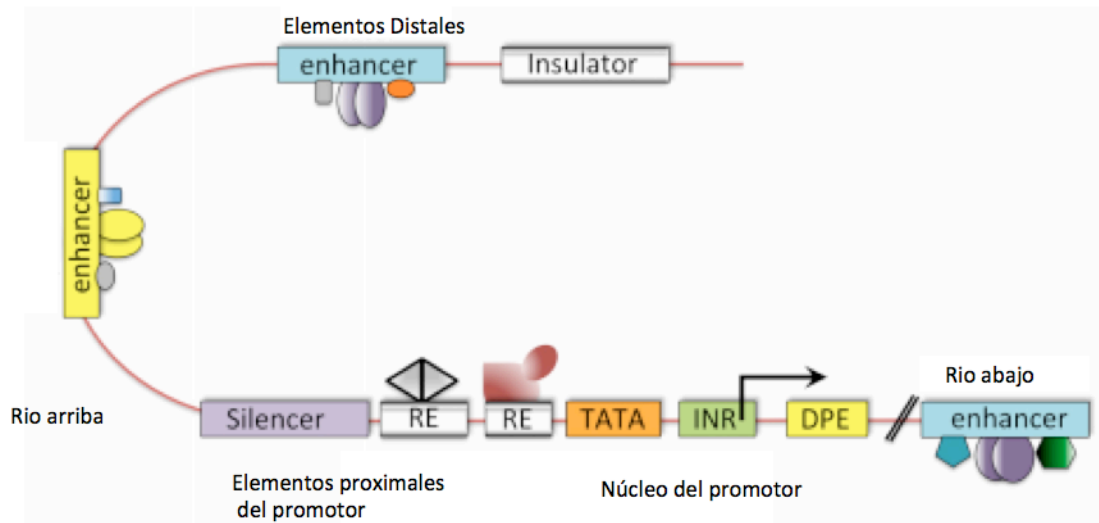


Figura 5. Elementos regulatorios de un promotor clásico de metazoario. En la figura se muestran los principales elementos regulatorios del “centro” del promotor; además de regiones distales tales como potenciadores o “enhancer” o insulators. Tomado y modificado de Levine and Tjian, 2003.

La mayoría de genes codificantes para proteínas en *C. elegans* están en zonas relativamente densas del genoma; es decir que hay una gran cantidad de genes en una región relativamente pequeña del genoma. Por consecuencia las regiones regulatorias están usualmente cercanas a la región codificante, aunque se han descrito ejemplos de diferentes enhancers que se encuentran en regiones distales (Vilimas, *et al*; 2006). En la mayoría de los casos en *C. elegans* el conjunto mínimo de secuencias para regular de manera apropiada un gen, se encuentra dentro de los 2 kb rio arriba del codón de inicio de la traducción (Renkie, 2013).

Un estudio reciente de las secuencias promotoras definió que hay 5 elementos comúnmente observados en la denominada secuencia “núcleo o centro” del promotor en *C. elegans*. Las cuales son: un sitio Sp1 (CNCCGCC), una zona de T que correlaciona con la zona de desalojo o “eviction” de los nucleosomas y la expresión génica (TTTT[N/T]), una secuencia TATA (GTATA[TA][TA]AG), un sitio de trans-splicing (TTnCAG), y una región kozak que incluye el codón de inicio de la traducción ([CA]AA[CA]ATG) (Grishkevich et al., 2011).

En *C. elegans* se han descrito dos tipos de promotores, simples y complejos. Un promotor simple es definido como una secuencia (cis) que tienen todos los elementos de control necesarios para la correcta expresión génica en una región pequeña, (de 350- 600 pb aproximadamente). Análisis de varios genes expresados solo en la células en proliferación y reguladores de G1 (por ejemplo ciclina D) han revelado que la secuencia regulatoria está confinada a una región de 67 pb en el promotor (Brodigan et al., 2003).

Por el contrario a los promotores simples, los promotores complejos contienen elementos regulatorios dispersos en el genoma, cada uno influye o contribuye en el patrón de expresión, pueden ser diversos elementos tanto potenciadores como silenciadores que en conjunto integran la respuesta de activación o represión de un gen, (generalmente genes que regulan procesos claves en el desarrollo) moldeando de esta forma la expresión espacio-temporal necesaria para cada gen (Reinke, et al. 2013).

1.11. El estado de la cromatina y sus efectos en la transcripción

La cadena del DNA está enrollada en una estructura denominada nucleosoma, la cual está compuesta por un octámero de histonas (dos cada una de H2A, H2B, H3, y H4), estas histonas pueden presentar una gran cantidad de cambios post-traduccionales afectando así el estado de compactación y la expresión génica. Típicamente, los residuos de aminoácidos en las colas amino terminal de las histonas son modificados por fosforilación, metilación, acetilación y ubiquitinación. Estas marcas afectan la configuración local de la cromatina y en todo el cromosoma, que en consecuencia puede modificar la iniciación, elongación y terminación de la transcripción (Berger, 2010).

Los tipos de modificaciones y la ubicación del nucleosoma con respecto al cuerpo del gen pueden tener efectos sobre la transcripción, alterando así los eventos transcripcionales. Estos efectos incluyen la alteración en la densidad del nucleosoma, cambiando el nivel de compactación de la cromatina a un estado relajado o condensado de una región, lo que facilita o impide la asociación de

diferentes complejos de regulación transcripcional. Además, las modificaciones de las histonas pueden proporcionar sitios de reclutamiento específicos para diferentes complejos de regulación. Por otro lado el número de grupos metilo de un residuo particular puede tener efectos distintos sobre la expresión génica. Como ejemplo, la mono metilación de la lisina 20 de la histona H4 afecta a la transcripción, por otro lado la di metilación está asociada con la reparación del ADN, mientras que la trimetilación facilita la formación de heterocromatina (Balakrishnan y Milavetz, 2010).

Finalmente, variantes de proteínas de las histonas, como H2A.Z o CENPA, se pueden incorporar en el octámero de histonas, con efectos diferenciales sobre la configuración y función de la cromatina, (Stimpson y Sullivan, 2010).

1.12 La respuesta al estrés por ayuno modifica la transcripción de *C. elegans*

Los organismos se enfrentan a diversas condiciones ambientales, en las que la expresión génica cambia para adaptarse a los requerimientos metabólicos y de crecimiento de dichas condiciones. Un claro ejemplo de esto es la respuesta al ayuno ya que en el ayuno algunos factores transcripcionales se internalizan al núcleo para poder activar genes diana que ayudan al nemátodo a resistir este tipo de estrés.

En este trabajo se estudió como se regula la apoptosis durante el ayuno por medio de la expresión de *lin-35*. Por lo que en la siguientes secciones se describen algunas familias de factores transcripcionales que fueron estudiados en este trabajo por ser reguladores globales durante el estrés del ayuno.

1.13. La familia de factores transcripcionales CREB/ ATF.

En mamíferos los factores transcripcionales ATF2/7 pertenecen a la familia de reguladores CREB/ATF, los cuales se unen al ADN a través de un motivo básico de cremallera de leucina. Estos factores transcripcionales presentan una gran diversidad fisiológica y comparten la habilidad de responder a señales ambientales para mantener una homeostasis celular (Persengiev & Green, 2002).

Los factores ATF-2, ATF-3 y ATF6 de mamíferos juegan un papel importante en la respuesta celular a diferentes tipos de estrés, controlando de esta manera los genes de respuesta a estrés general así como algunos genes de estrés del retículo endoplasmático (revisado en Hai 2006). El factor ATF-2 además de mostrar actividad como factor transcripcional, tiene actividad de acetilasa de histona, lo que sugiere su implicación en procesos de remodelación local de cromatina (Kawasaki et al 2000). Por otro lado ATF-1 y CREB están involucrados en modular la transcripción en respuesta a las tasas intracelulares de AMPc (Persengiev & Green, 2002).

Estos factores pueden formar homodimeros y/o heterodimeros con miembros de la familia; e incluso pueden llegar a formar heterodimeros con factores de otras familias, como los factores de la familia Jun. Además, dependiendo el contexto, celular pueden funcionar como activadores o represores (Hai & Curran 1991; Matsuda et al.1991).

En cuanto a su regulación, se sabe que la proteína cinasa A (PKA); fosforila a estos factores en la Serina 133 (S133), permitiéndoles que entren al núcleo y cumplan con su función biológica; De manera contraria los receptores TGF- β los regulan negativamente, reduciendo los niveles de proteína (CREB) y estimulando su desfosforilación (Persengiev & Green, 2002).

En *C. elegans* los genes *atf-2* y *atf-7* codifican para factores transcripcionales de la familia de bZIP, los cuales funcionan dependiendo de concentración de cAMP (Wang *et al.*, 2006; Shivers et al, 2010)

El factor transcripcional ATF-2 es homólogo al factor CES-2 quien regula la apoptosis. La actividad de ATF-2 es requerida para el desarrollo del ducto excretor y es esencial para el desarrollo embrionario. CES-2 y ATF-2 controlan la expresión de *lin-48*, en el embrión, donde *lin-48* se requiere para el desarrollo del ducto excretor, sin embargo los factores no están regulando al mismo gen durante el estadio larvario (Wang *et al.*, 2006).

Mientras que el gen *atf-7* codifica para el factor homólogo a ATF-2/5/7 que regula la defensa del gusano ante patógenos, este factor participa en la respuesta inmune regulando la expresión de genes río debajo de la MAPK PMK-1/p38. Probablemente el factor ATF-7 sea convertido de un represor transcripcional a un activador en respuesta a la fosforilación mediada por PMK-1 (Shivers *et al.*, 2010).

1.14. La familia de factores transcripcionales FOX

La familia de factores transcripcionales Forkhead (FOX) fue nombrado después de encontrar en *Drosophila* al gen forkhead (Kaufman y Knochel, 1996).

Los miembros de esta familia comparten un dominio altamente conservado de unión a DNA denominado dominio FOX, el cual se compone de 100 aminoácidos que dan estructura hélice- giro- hélice (Clark *et al.*, 1993). Basado en la homología dentro de esta región los genes forkhead son agrupados en 19 clases de FOXA hasta FOXS (Fu y Tindal., 2008).

La subfamilia de los factores FOXA, es la mas relacionada a la proteína fork head encontrada en *Drosophila*. En mamíferos esta comprende a los factores transcripcionales FOXA1, FOXA2 y FOXA3, críticos en una gran variedad de procesos, tanto en el desarrollo embrionario como en la vida post- natal. (Friedman y Kaestner 2006).

En estudios in vitro se ha mostrado que los factores de esta familia son capaces de abrir cromatina altamente compactada sin requerir al complejo SWI/SNF de remodelación de cromatina, por consiguiente se ha propuesto que estos factores funcionan como pioneros, desplazando histonas de cromatina compacta y facilitando la unión de otros factores transcripcionales. (Cirillo *et al.*,

2002; Holmqvist *et al.*, 2005). Un ejemplo de esto último es el receptor a glucocorticoide (GR) el cual se une a sus genes blancos durante ayuno, es dependiente en parte de FOXA2 (Zhang *et al.*, 2005). Aunque no ha sido determinado si esto es mediado por alteraciones en la cromatina o por otros mecanismos.

El gen *Foxa2* es activo a través de todo el endodermo y en estructuras derivadas del mismo como pulmón, hígado, páncreas, donde su expresión persiste a través de todo el desarrollo y en la vida adulta (revisado de Friedman y Kaestner 2006). Además estos factores son importantes para la homeostasis de la glucosa. De hecho una función conservada evolutivamente parece la protección de hipoglucemia en los organismos. (Shen *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2005; Lantz *et al.*, 2004). Ratones mutantes del gen *Foxa1* $-/+$ presentan una hiperglucemia muy fuerte, lo cual en parte se cree que es por la expresión disminuida del pro-Glucagon. Además ratones mutantes *Foxa2/Foxa3* son medianamente hipoglucémicos y mueren en la primer semana de vida (Lee *et al.*, 2005). Este fenotipo refleja la importancia para *Foxa2* tanto en hígado como páncreas, los dos órganos esenciales para la homeostasis de la glucosa.

En el hígado algunos de los primeros genes identificados como genes diana de los genes FOXA están involucrados en la homeostasis de glucosa, particularmente en respuesta al ayuno. Ejemplos incluyen enzimas gluconeogénicas, como fosfoenol piruvato carboxilasa (Pck), glucosa 6 fosfato (G6pc) y tirosina aminotransferasa (Tat) (Friedman y Kaestner 2006). Así esta familia de reguladores son importantes en regular el programa gluconeogénico en el hígado.

Stoffel y colaboradores, propusieron que en células en cultivo la actividad transcripcional de *Foxa2* esta bloqueada por el tratamiento con insulina, y que esta regulación requiere de un sitio de fosforilación intacto para cinasa AKT2/PKB en el residuo T156 de *Foxa2* en el ratón. Esta fosforilación resulta en la exclusión del factor *Foxa2* del núcleo, Proporcionando con ello un modelo molecular atractivo en el que la actividad gluconeogénica de *Foxa2* se bloquea a través de la

secreción de insulina inducida por la alimentación(Wolfrum *et al.*, 2004; Wolfrum *et al.*,2003).

Los factores transcripcionales FOXO (Forhead boxO) son reguladores que funcionan bajo el control de la vía de la insulina. Estos factores han sido identificados en varios organismos desde el nematodo *C. elegans*, *D. melanogaster*, así como en vertebrados como el pez zebra, ratones, ratas y humanos y han sido asociados a una gran cantidad de procesos biológicos tales como el ciclo celular, la muerte celular, la supervivencia, reparación del DNA, el metabolismo así como en la protección al daño por estrés oxidativo (Van der heiden & smidt, 2004). Además estudios desde *C. elegans* hasta ratón sugieren que los factores FoxO están involucrados en integración de las pistas ambientales para la adaptación optima de cambios medioambientales (Van der Heiden & Smidt, 2004).

En mamíferos se han descrito 4 genes FOXO. Tres de ellos (FOXO1, FOXO3 y FOXO4) son expresados ampliamente, mientras que el cuarto (FOXO6) se expresa únicamente durante el desarrollo embrionario y en el cerebro adulto (Fu y Tindal; 2008). Se ha visto que estos reguladores transcripcionales pueden activar o reprimir la expresión génica dependiendo el contexto celular (Ramaswamy *et al.*, 2002).

Ha sido descrito que presentan una secuencia de internalización nuclear y que en el extremo amino se encuentra el dominio FOX, mientras que en el carboxilo esta el dominio de trans-activación (Biggs *et al.*, 1999; Ramaswamy *et al.*, 2002). La regulación de la localización sub-celular y actividad transcripcional de los factores es logrado principalmente por modificaciones post-traduccionales, tales como fosforilación y acetilación. Dos clases principales de estímulos disparan la fosforilación con efectos opuestos en la localización. En respuesta a señales de supervivencia y crecimiento tal como la vía de la insulina, los factores FOXO son fosforilados y localizados en el citoplasma, de manera contraria en respuesta a estrés de tipo oxidativo los factores FOXO pueden ser

fosforilados por JUN, provocando la internalización del factor incluso en presencia de factores de crecimiento (Fu y Tindal; 2008).

Por otro lado, los factores FOXO son acetilados en varios residuos conservados de lisina, muchos de los cuales están en el dominio de unión a DNA, por p300 y proteínas de unión a CREB, que poseen actividad de acetil transferasa, (Fukuoka *et al.*, 2003; van der Horst *et al.*, 2004). La acetilación de los factores FOXO parece ejercer un efecto inhibitorio en su actividad posiblemente a través de disminuir la unión a DNA. De forma opuesta la desacetilación de los factores FOXO por SIRT1 promueve la transcripción de genes involucrados durante el estrés (Daitoku *et al.*, 2011).

En mamíferos los factores FOXO están involucrados en la promoción de apoptosis tanto extrínseca como intrínseca; se ha visto que FOXO dispara la apoptosis extrínseca inducida por el ligando Fas (Brunet *et al.*, 2004), así como proteínas de la familia de Bcl-2, a través de la expresión de Bim en células hematopoyéticas que son deprivadas de factores de crecimiento (Dijkers *et al.*, 2000).

En *C. elegans* *pha-4* codifica para el homólogo de FOXA. PHA-4 se requiere durante el desarrollo embrionario para el desarrollo de la faringe (Mango *et al.*, 1994) orquestando el desarrollo de la faringe durante el estadio larvario L1 (Gaudet, J. & Mango, 2002). Esta proteína se expresa temprano en la embriogénesis particularmente en la faringe, en el intestino y en la gónada somática en los estadios larvarios L3/L4 (Azzaria *et al.*, 1996) Sin embargo en el adulto participa durante la respuesta a ayuno (Zhong *et al.*, 2010). Además PHA-4 participa durante el restricción calórica donde aumenta la longevidad en una vía independiente del factor DAF-16 (Panowski *et al.*, 2007).

En un análisis de coimmunoprecipitación de cromatina (ChIP-seq) se observó que cuando larvas son sometidas a ayuno durante el estadio L1, el factor transcripcional PHA-4 se une a 1675 genes distintos a los que se une durante la embriogénesis. Se ha determinado por términos de ontología genética

(GO) que estos genes están relacionados con metabolismo, regulación de la transcripción y respuesta al estrés (Zhong *et al.*, 2010).

En *C. elegans* el gen *daf-16* codifica para el único factor de tipo FOXO en el nematodo. DAF-16/FoxO puede considerarse un regulador maestro, ya que controla un gran número de genes involucrados en resistencia a diferentes tipos de estrés, así como la formación de la larva *dauer* y la longevidad (Tullet, 2015).

En presencia de comida y condiciones óptimas de crecimiento hay altos niveles de señalización de insulina (Fig. 6), la cual es una hormona péptidica que se une a un receptor tirosina-cinasa, codificado por el gen *daf-2*, esta señal activa a la cinasa PI3K, (*age-1* en el nemátodo) que aumenta la producción de fosfoinosítidos como PIP₃ y PIP₂ que a su vez activan a la cinasa AKT, la cual fosforila al factor DAF-16/FOXO, causando un secuestro en el citoplasma de DAF-16/FoxO por FTT-2, una proteína de la familia 14-3-3 (Li *et al.*, 2006).

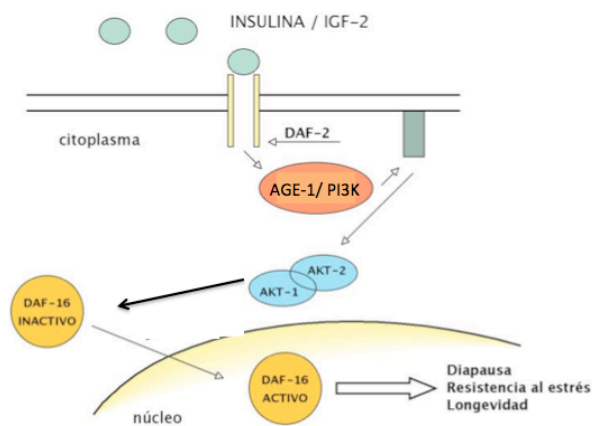


Figura 6. Señalización de insulina en condiciones fisiológicas. En *C. elegans*, esta vía de señalización se inicia con la síntesis del producto del gen *daf-2* que es un receptor para la insulina/IGF-1. En respuesta a la activación del receptor se activa una proteína intracelular llamada AGE-1 que activa un sistema de segundos mensajeros (las quinasas AKT-1 y AKT-2). Estas quinasas permiten el paso del DAF-16 del citoplasma (estado inactivo) al núcleo (estado activo), incrementando, entre otras actividades, la resistencia al estrés y la longevidad. Tomado y modificado de Wolpert, 1998.

De manera contraria, bajo condiciones de privación de nutrientes DAF-16/FoxO se internaliza al núcleo donde regula la transcripción de sus genes blancos. Por otro lado en mutantes del gen que codifica para el receptor de

insulina (*daf-2*), se observa un aumento en la esperanza de vida del nematodo, provocado por activación de DAF-16/FoxO que activa genes de respuesta a estrés como SOD-3 (Zhou *et al.*, 2011).

DAF-16/FoxO juega un papel importante en estrés oxidativo, choque de calor y ayuno (Henderson y Johnson, 2001). Diferentes tipos de estrés conducen a la inducción de cinasas específicas que activan al factor transcripcional FOXO por fosforilación, tales como, la proteína cinasa JUN (JNK), que es parte de la respuesta al estrés oxidativo; MST que esta involucrada en el control del crecimiento; la proteína cinasa activada por AMP, AAK-2 en *C. elegans* (AMPK en mamíferos) que responde a la proporción de AMP/ATP así como la ruta de la MAPK p38 que influye en la respuesta inmune en el nematodo (Hesp *et al.*, 2015).

1.15. El factor SPTF-3/Sp1 en *C. elegans*

En mamíferos el factor Sp1 pertenece a la familia de factores transcripcionales con dedos de zinc del tipo C2H2, los cuales están codificados por 9 genes correspondientes a 3 familias génicas (Sp1-Sp4, Sp5 y Sp6-Sp9) (Schaeper *et al.*, 2010). Las proteínas de la familia SP muestran diversas funciones regulatorias, pueden actuar como activadores o represores dependiendo el gene al que estén regulando así como la isoforma presente y el contexto celular. Estos factores reguladores activan tanto genes específicos del desarrollo como genes constitutivos y genes del ciclo celular.

En *C. elegans* al menos 4 genes se han identificado como genes tentativos para codificar factores de la familia SP (*t1p-1*, *sptf-1*, *sptf-2* y *sptf-3*) (Zhao *et al.*, 2002), aunque solo *sptf-2* y *sptf-3* codifican para proteínas con el dominio de dedos de zinc C2H2, el cual es canónico en los miembros de los factores SP.

La proteína SPTF-3 incluye un amino terminal que esta altamente enriquecido de glutamina, una secuencia característica especialmente asociada con los factores de la familia Sp1-Sp4 (Schaeper *et al.*, 2010). Estas características

identifican al gen *sptf-3* como homólogo a SP-1. Estudios sobre este factor han demostrado que SPTF-3 activa directamente la transcripción del gene *egl-1*, el cual codifica para una proteína con dominio BH3. De esta manera promueve la apoptosis a través de la activación de la maquinaria central de apoptosis durante la apoptosis somática. Por otro lado SPTF-3 activa la transcripción de *pig-1*, un gene relacionado a la cinasa de la familia AMPK, el cual codifica una proteína cinasa y funciona durante la apoptosis de las neuronas hermanas M4 así como de las AQR en una ruta independiente que activa CED-3 (Hirose & Horvitz, 2013) durante el estadio larvario L1. Recientemente se ha encontrado que *sptf-3* es necesario para la expresión normal de genes del linaje endodermal (Sullivan-Brown *et al.*,2015).

2- Planteamiento del problema:

Al someter a los gusanos a 6 horas de ayuno la expresión de LIN-35/Rb aumenta debido a la acumulación de su *RNAm* y su persistente traducción. Datos genéticos sugieren que LIN-35/Rb disminuye la expresión de *ced-9/Bcl-2* lo que conduce a la apoptosis de las células germinales (Lascares-Lagunas *et al.*,2014). Sin embargo hasta el momento no se ha estudiado el mecanismo por el cual el *RNAm* de *lin-35* aumenta durante el ayuno. En el presente trabajo pretendemos determinar como es que ocurre dicho proceso.

3.- Hipótesis:

Si los factores transcripcionales de este estudio controlan la expresión de *lin-35* y este a su vez regula la inducción de apoptosis por ayuno, entonces en un fondo mutante de estos factores la apoptosis inducida por ayuno no aumentara, ya que la expresión de CED-9 no se verá afectada directamente por LIN-35.

4.- Objetivos:

Objetivo General:

Estudiar la regulación de la expresión de *lin-35* en el ayuno en el nemátodo *C. elegans*

4.1. Objetivos particulares

- * Determinar la región promotora del gen *lin-35*.
- * Identificar los factores transcripcionales que posiblemente regulan la expresión del gen *lin-35/Rb* durante el ayuno.
- * Determinar si dichos factores transcripcionales regulan la apoptosis inducida por ayuno.

5.- Metodología.

5.1. Mantenimiento de las cepas

Las cepas empleadas en este trabajo se enlistan en la tabla 1.

Cepa	Genotipo de la cepa
N2	Silvestre
MT19372	<i>sptf-3</i> (n 4850) I; <i>nls283X</i>
GR1307	<i>daf-16</i> (mgDf50) I.
MD701	bcIs39 V

Tabla 1.- Cepas empleadas en este trabajo

Las diferentes cepas fueron incubadas para su mantenimiento a 24° C en cajas con medio NGM-Lite sólido, que contiene: 2 g de NaCl, 4 g de bacto triptona, 3 g de fosfato de sodio monobásico, 0.5 g de fosfato de sodio dibásico y 0.008 g de colesterol; al medio se le agregó 20 g de agar para las cajas de mantenimiento y 30 g para las cajas empleadas en los experimentos de RNAi, estas concentraciones fueron empleadas para hacer 1 litro de medio. Posteriormente el medio fue esterilizado por autoclave, se vertió en cajas petri estériles que se dejaron secar durante una noche. Al día siguiente se agregaron 250 µl de un cultivo fresco de *E. coli* OP50. Las cajas se incubaron una noche a temperatura ambiente y fueron guardadas al día siguiente a 4° C hasta su utilización.

Para crecer el cultivo de la cepa de *E. coli* OP50 se inocularon 50 ml de medio Luria Bertani (LB) con streptomycin a una concentración final de 50 µg/ µg. El cultivo se incubó a 37° C durante 12 horas en una agitación constante (250 r.p.m)

5.2. Sincronización de nemátodos

Para obtener gusanos L1 sincronizados, se colectaron hermafroditas adultos grávidos de una caja mediana (con 500 nematodos aproximadamente) en 5 ml de

M9 en un tubo falcon de 15ml estéril. A continuación se agregaron 650 µl de hidróxido de sodio 5N (NaOH) y 1300 µl de cloro comercial, inmediatamente después se agito durante 6 minutos en un vortex. Después de 6 minutos se centrifugó por 30 segundos a 11000 rpm, en una centrifuga clinica y se decantó el sobrenadante. Para disminuir el exceso de hidróxido de sodio y cloro se realizaron cuatro lavados con 10 ml de M9 cada uno. Al terminar los lavados se recuperó la pastilla de embriones en 10 ml de M9 y se transfirió a un tubo falcon de 15 ml nuevo estéril. Los embriones se dejaron a 24°C en agitación toda la noche. Al día siguiente se centrifugan los tubos (a 11000 rpm), se desecha el sobrenadante procurando que quede 1ml de M9. Se resuspendieron los nemátodos y se cuantificó en 10µl de esta mezcla. Se sembraron 500 gusanos en cajas con OP50-1, o con bacteria HT115 con plásmidos L4440 para los experimentos de RNAi.

5.3.- Silenciamiento de los genes por medio de la técnica de RNA de interferencia (RNAi).

Para hacer los experimentos de RNAi, se prepararon placas de NGM-lite como se describió arriba con la diferencia de emplear 30 g de agar. Una vez esterilizado el medio se agrego tetraciclina a un concentracion final de 12.5 µg/ml; Ampicilina 50mg/ml, e IPTG al 1mM. Posteriormente se dejó secar las cajas durante la noche. Paralelamente se inocularon 10 ml de medio LB + tetraciclina y ampicilina (misma concentracion) con bacterias HT115, que contenian los plásmidos para hacer RNAi de los genes *skn-1*, *atf-7*, *atf-2*, *sptf-3*, *nhr-28*, *daf-16* y *pha-4*. Estos plásmidos son parte de la colección para hacer RNAi por alimentación de Open Biosystems. Finalmente se mandaron a secuenciar para confirmar que estos eran los genes de interes.

Para la inducción de los RNA dc, el cultivo de bacterias (con el gen de estudio) se colocó en cajas previamente preparadas. Se usaron 800 µl de cultivo. Los cultivos se dejaron por 18 horas a temperatura ambiente, tiempo en el cual se induce el RNA de doble cadena en las bacterias. Como control de los

experimentos se empleo el plásmido PD129.36 sin ningún gen inserto, considerado a partir de aquí como PV (Plásmido vacío).

Para silenciar los genes *skn-1*, *atf-7*, *atf-2*, *sptf-3*, *nhr-28*, *daf-16*, 500 gusanos L1 sincronizados fueron colocados por caja NGM-lite con bacterias *E. coli* HT115 que contenían el plásmido para el gen de interés o PV como control. Para cada gene se colocaron 2 cajas de 500 gusanos, la primer caja fue empleada como control y los gusanos de la segunda caja fueron sometidos a un ayuno de 6 hrs (ver sección 5.5). Los gusanos se incubaron 48 horas a 24 °C hasta ser adultos de 1 día. Posteriormente se extrajo el RNA (ver sección 5.6). Para silenciar al gen *pha-4* se colocaron 500 gusanos L4 jóvenes y se dejaron 24 horas a 24°C, los gusanos adultos de 1 día fueron colectados y el RNA fue extraído. Para el gen *pha-4* los gusanos fueron alimentados con la bacteria conteniendo el plásmido de RNAi a partir de la etapa embrionaria L4, ya que la ausencia de PHA-4 durante las etapas larvarias anteriores exhibe una gónada muy afectada.

5.4.- Cuantificación de cuerpos apoptóticos utilizando la cepa transgénica MD701

La cuantificación de los cuerpos apoptóticos se llevo a acabo en la cepa transgenica MD701, la cual expresa una fusión traduccional de la proteína CED-1 etiquetada en el extremo carboxilo con la proteína verde fluorescente (CED-1::GFP) (Zhou *et al.*, 2001). De esta manera es posible ver por medio de microscopía de fluorescencia los cuerpos apoptóticos que se producen en la gónada de los nemátodos de este transgen por que CED-1 resalta los cuerpos apoptoticos (Zhou *et al.*, 2001).

Los gusanos transgénicos sincronizados se alimentaron con bacteria *E. coli* que contenía el RNA de doble cadena. Para los genes *skn-1*, *atf-7*, *atf-2*, *sptf-3*, *nhr-28*, *daf-16* los nematodos fueron alimentados con bacteria con RNA de doble cadena desde la etapa larvaria L1.

Para visualizar los cuerpos apoptóticos de los gusanos adultos de 1 día en condiciones control o ayuno, los gusanos se montaron en colchones de agarosa al 2% y fueron anestesiados con 30 μ l de tetramizol en M9 para su posterior visualización en el microscopio de fluorescencia.

5.5- Condiciones control.

Los gusanos tratados como control fueron gusanos alimentados en todo momento con ya sea PV o con el dsRNA para los genes de interés, adultos de 1 día fueron montados en placas de agarosa al 2% en 30 μ L de M9 y 30ml de tetramizol para anestésarlos, posteriormente se observaron en el microscopio de fluorescencia, cuantificando los cuerpos apoptóticos.

Se observó simultáneamente control y experimental. Estos experimentos se realizaron en por lo menos 25 gónadas.

5.6- Condiciones de ayuno.

Los gusanos adultos de 1 día sometidos a ayuno fueron colocados en cajas con NGM-lite durante 6 horas (ayuno), el cual consistió en colocar a 40 gusanos en placas NGM-lite sin bacteria durante las 6 horas. Posterior al ayuno los gusanos fueron montados en placas de agarosa al 2% en 30 μ L de M9 y 30ml de tetramizol para anestésarlos, posteriormente se observaron en el microscopio de fluorescencia, cuantificando los cuerpos apoptóticos.

5.7.- Extracción de RNA

Se colectaron 500 nemátodos adultos de 1 día por cada condición, se utilizó medio M9 1X, para eliminar el exceso de bacterias se hicieron de 4 a 5 lavados, en un volumen de 15ml de M9. Cada lavado consistió en poner a los animales colectados en hielo para que se sedimentaran, luego se sacó con una pipeta el sobrenadante y se cambió por medio M9 1X nuevo, esto se repitió 4 o 5 veces. 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 500 ml de

TRIZOL, el tubo se congeló en nitrógeno líquido (N₂) y se almacenó a -70°C para su posterior extracción. Para lisar a los gusanos, se utilizaron perlas de vidrio previamente lavadas con 1 ml de agua con DEPC y estériles. Posteriormente se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. A cada tubo eppendorf se le agregó 200 µl de cloroformo y se agitó 15 segundos en el vórtex, luego de esto 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 500 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, se decantó el sobrenadante y se añadió 500 µl de etanol al 70% en agua DEPC. Se centrifugó a 8400 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 6 minutos. A cada tubo se le adicionaron 20 µl de agua tratada con DEPC. Para disolver la pastilla de RNA se mezcló por vortex e incubó a 60°C durante 10 minutos. Posteriormente se cuantificó la concentración de RNA de cada muestra en el espectrofotómetro de micromuestra nanodrop modelo 2000. El RNA obtenido de la extracción fue analizado por gel para ver su integridad y cuantificado en el espectrofotómetro nanodrop 2000. Finalmente fue guardado a -70°C hasta su utilización.

5.8.- Síntesis de cDNA.

El RNA extraído se cuantificó y ajustó a 1 µg en un volumen final de 10 µl en Buffer 1X de DNAsa I y se añadió 0.2 unidades de DNAsa I Invitrogen durante 15 minutos a 37° C, seguido de esto se añadió 1 µl de EDTA en H₂O DEPC en una concentración final de 0.5 mM y se incubó 10 minutos a 60° C para inactivar la enzima DNAsa I. Después de la purificación del RNA por el paso de DNAsa I se cuantificó en el espectrofotómetro nanodrop 2000 y se ajustó a 200 ng en un volumen final de 20 µl con los que se sintetizó el cDNA a partir de la reacción llevada a cabo por la Retro Transcriptasa (RT).

Para comprobar que el cDNA funcionara se amplificó 1 µl de cDNA con los oligos para amplificar *act-4* como control positivo en condiciones control. Las secuencias de los oligonucleótidos son *act-4* Forward (CCCTCGAGAAGTCCTACGAA) y (TCCATACCCAAGAAGGATGG) *act-4* Reverse. Se empleo un control negativo de -RT, que consiste en tratar la muestra como el positivo con la única diferencia de que no se adiciona la enzima RT.

5.9.- Cuantificación de la expresion de RNA mediante qRT-PCR (PCR en tiempo real)

La amplificación por PCR se realizo utilizando oligonucleótidos específicos para los genes de interés (tabla 2) . La amplificación fue realizada empleando Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Cada reacción de 20 µl contenia 10 µl de SYBR Green Master Mix, 3 µl de Oligo Fw (250nM), 3 µl de Oligo Rv (250nM), 1 µl de cDNA y 3 µl de H₂O milliQ estéril. Se realizo el qPCR en reacciones de 20 µl por triplicado. Para la detección se utilizo el sistema ABI PRISM 7000. *18s* fue empleado como control de amplificación es decir que los valores CT de cada uno de los genes amplificados fueron normalizados con los valores obtenidos para *18s*. Los valores de expresión relativa fueron obtenidos utilizando el método comparativo $\Delta\Delta\text{ct}$ (Livak y Schmittgen, 2001). Los oligonucleótidos empleados para la amplificación fueron obtenidos de trabajos previos en el laboratorio y se muestran en la tabla 2.

<u>Nombre del oligonucleótido</u>	<u>Secuencia del oligonucleótido</u>	<u>Tamaño del amplificado</u>
18s Fw qPCR	GTACAAAGGGCAGGGACGTA	
18s Rv qPCR	TTCTTCCATGTCCGGGATAG	106 pb
<i>lin-35</i> Fw qPCR	ACTGGAATTCCCGTCCACTTG	
<i>lin-35</i> Rv qPCR	TCCGCTCATCAATACTTCCA	112 pb

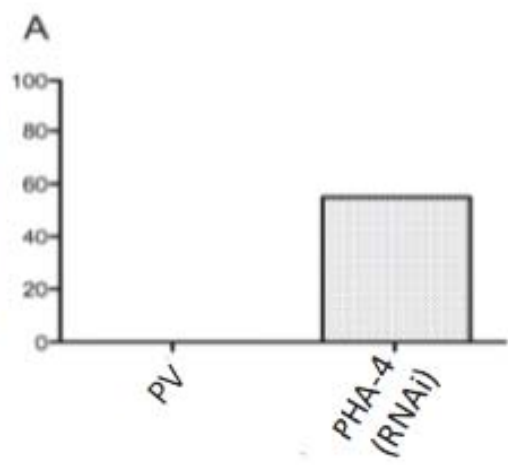
Tabla 2.- Oligonucleótidos empleados para q PCR.

5.10. Evaluación de los RNAi por fenotipos.

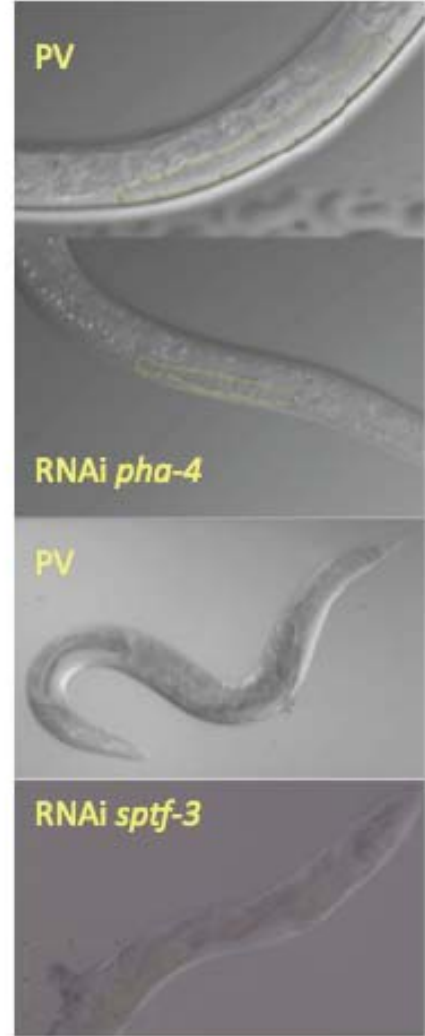
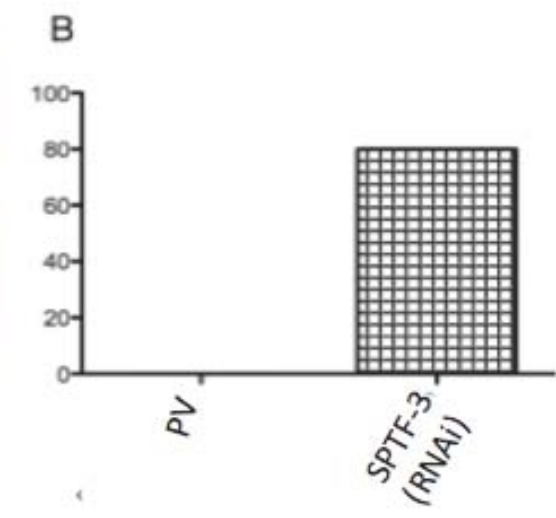
Para poder confirmar que los RNAi de los genes de interés funcionaron se evaluaron los fenotipos de los animales RNAi de cada uno de los fondos empleados. Utilizando los fenotipos reportados se realizaron diversos experimentos para poder corroborar que los RNAi de cada fondo tuvieran el fenotipo esperado. La ausencia del gen *pha-4* genera un retraso en el desarrollo larvario (Fig. 7 panel A) el 55% de los animales observados tenían un retraso en el desarrollo. Las fotos de lado derecho del panel A delimitan con una línea amarilla la gónada de animales PV y animales con RNAi para *pha-4*, donde se observa como el tamaño de la gónada en animales RNAi es menor. Por otro lado los gusanos sometidos a RNAi para el gen *sptf-3* mostraban defectos en la vulva en un 80% (Fig. 7 panel B); las fotos a la derecha del panel B muestran animales sometidos a PV o RNAi de *sptf-3*, arriba se observa un fenotipo silvestre, mientras que en la foto correspondiente a los gusanos sometidos a RNAi *sptf-3* se observó una masa a la altura de la vulva.

Los animales sometidos a RNAi para los genes *skn-1* y *atf-2* mostraron un fenotipo de letalidad embrionaria en 100% y 20% respectivamente comparado con el control (PV) (Fig. 7 panel C). Para los gusanos sometidos al RNAi para *daf-16* se observó que los animales RNAi formaron *dauer* solo en un 16% mientras que los animales PV fueron capaces de formar *dauer* en 80% (Fig. 7 panel D). Finalmente los animales tratados con RNAi para el gen *nhr-28* mostraron un aumento en el almacenamiento de lípidos, esto fue analizado por la tinción con rojo de nilo y cuantificación relativa de fluorescencia (Fig. 7 panel E). Las fotos de lado derecho del panel E representan animales L4 ya sea PV o *nhr-28* que fueron teñidos con rojo de nilo para observar la acumulación de lípidos.

% de animales retrasados en el desarrollo



% de animales con defectos en la vulva



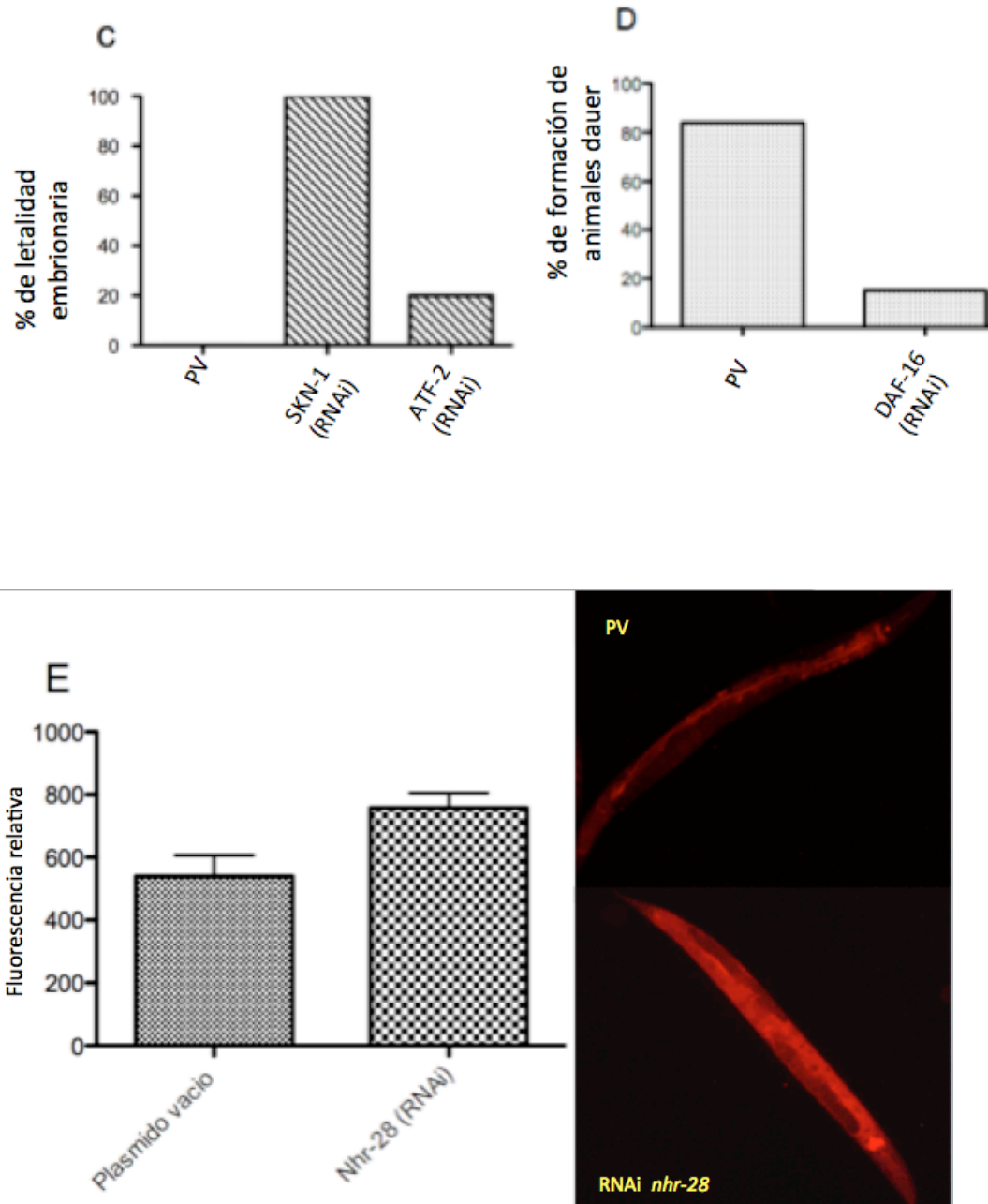


Figura 7. Evaluación de RNA de interferencia por fenotipos. El panel A muestra el fenotipo encontrado en animales control (PV) y RNAi *pha-4*. Las fotos a la derecha del panel A muestran la comparación del fenotipo encontrado en los animales ya sea PV o RNAi *pha-4*, las líneas amarillas en estas fotos delimitan la gónada que es claramente más pequeña en los animales con RNAi de *pha-4*. El panel B muestra el porcentaje de animales con fenotipo con defectos en la vulva en animales control y RNAi para *sptf-3*. Las fotos a la derecha del panel B muestran la comparación del fenotipo encontrado en los animales ya sea PV o RNAi *sptf-3*. El panel C muestra el porcentaje de letalidad embrionaria en animales control (PV) y RNAi para *skn-1* y *atf-2*. En el panel D se muestra el porcentaje de animales que entraron a dauer en animales control y RNAi *daf-16*. En el panel E se muestra el fenotipo de incremento en la fluorescencia de lípidos en animales (PV) y RNAi de *nhr-28*. Las fotos a la derecha del panel E muestran la comparación del fenotipo encontrado en los animales ya sea PV o RNAi de *nhr-28*.

6.- Resultados

6.1.- Determinación de la región promotora del gen *lin-35*

a) Estructura génica del locus *lin-35/Rb* y sus regiones aledañas

El gen de *lin-35* se encuentra en el cromosoma I, aledaño al gen *vps-51* que codifica para la proteína VPS-51, subunidad del complejo retrógrado del aparato de golgi y homólogo del complejo retrogrado en levadura (Luo *et al.*, 2011). Entre *vps-51* y *lin-35* hay una región intergénica de aproximadamente 490 pb (Wormbase release WS257).

El gen *lin-35* codifica para una proteína de 961 residuos de aminoácidos, la cual es homóloga a la proteína Retinoblastoma de humano y no tiene empalmes alternativos reportados (Fig. 8). El gen de *lin-35* contiene 10 exones, en el segundo intrón se encuentra el marco de lectura abierta C32F10.4, el cual es un gen que codifica en dirección antisentido para una proteína no anotada (Wormbase release WS257). Por estudios masivos se sabe que C32F10.4 es un regulador del desarrollo embrionario y controla negativamente el desarrollo de la vulva (Ceron *et al.*, 2007).

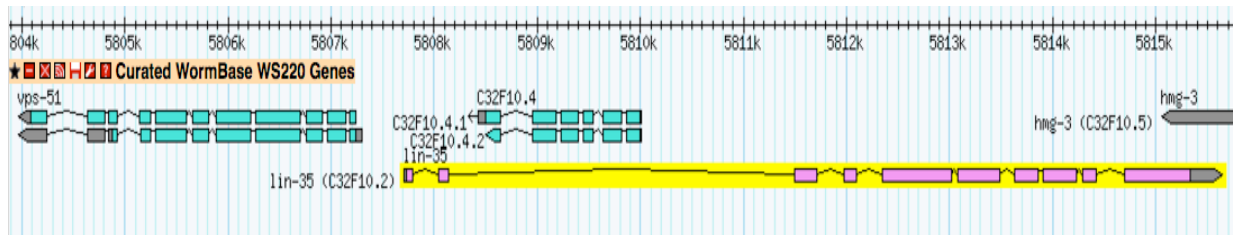


Figura 8.- Mapa genómico del locus *lin-35*. La imagen muestra un acercamiento al locus del gen correspondiente a *lin-35* (coloreado en amarillo). En el segundo intrón del gen *lin-35*, se observa el ORF C32F10.4 en una dirección antisentido. El gen *lin-35* no muestra empalme alternativo y tiene una región intergénica de 490 pb con el gen *vps-51*. Figura tomada wormbase (Wormbase release WS257). Los números en la barra superior indican la posición genética, que van desde 5804mil a 5815 mil, del cromosoma I.

b) Delimitación por análisis bioinformáticos de la región promotora de *lin-35*

Para delimitar la región promotora, se realizó un análisis *in silico* de la región río arriba del gen *lin-35*. Este análisis fue llevado a cabo con la información contenida en la base de datos ModEncode (<http://www.modencode.org/>), en donde se ha depositado la información sobre la regulación del genoma del nemátodo, tal como los experimentos de Co-Imunoprecipitación de la cromatina (ChIP-seq) para determinar la unión de factores transcripcionales así como modificaciones de histonas. Estos datos fueron depositados por el grupo de Snyder en 2004 a través de análisis globales de ChIP, los cuales consistieron en identificar 300 factores transcripcionales cada uno unido a la proteína GFP en su extremo carboxilo, posteriormente se realizó una ChIP y la posterior secuenciación por Solexa GA2 (http://gbrowse.modencode.org/fgb2/gbrowse/worm/?display_citation=Snyder_AN_TIGFP_WIG_AMA1_COMB).

En el análisis se obtuvo el mapa genómico de la región correspondiente al gen de *lin-35*, para visualizar las modificaciones postranscripcionales de algunas histonas. Específicamente se buscó la trimetilación de las lisina 4 en la histona 3 (H3K4me3) ya que esta modificación parece estar conservada en diversos eucariontes y se ha asociado a eucromatina (Heintzman & Ren, 2007). También se buscaron las variantes de histonas H2A.Z y H3.3 que se han asociado como marcas de promotores activos (Whittle *et al.*, 2008). Por último para delimitar al promotor se buscó la presencia de la subunidad mayor de la polimerasa II, la cuál está codificada por el gen *ama-1* (Bird & Riddle, 1989).

En la Figura 9 se observa que la región río arriba del promotor *lin-35* muestra un enriquecimiento de la marca H3K4me3 en las regiones flanqueantes a la región intergenica (se muestran los datos del estadio L3 por ser los disponibles en la base de datos), así como enriquecimiento de las variantes de histonas H3.3 y H2A.Z (codificada por *htz-1*) en el mismo estadio larvario.

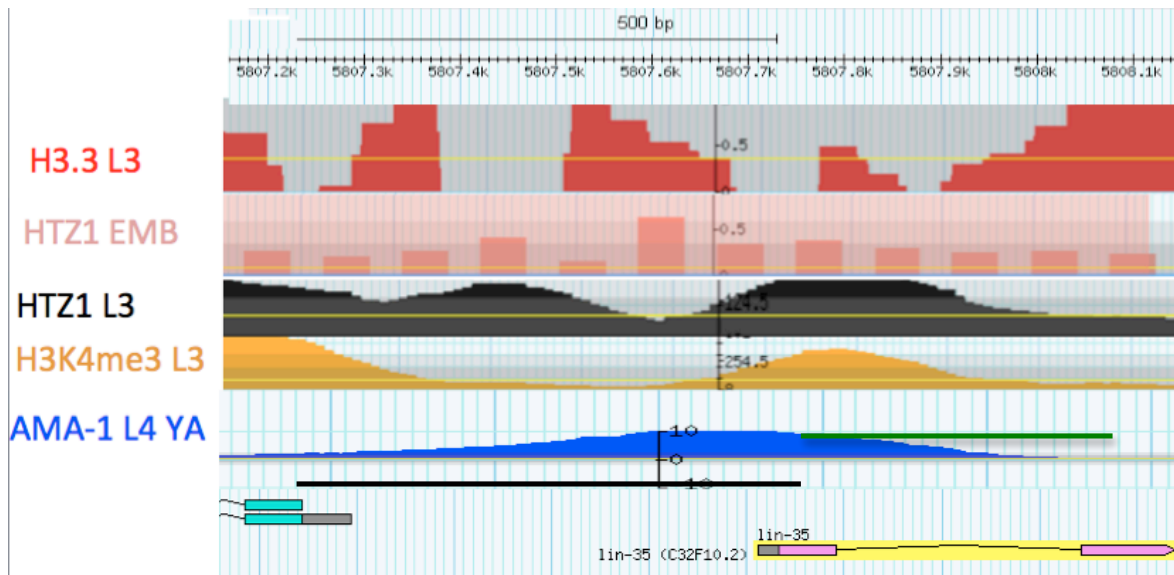


Figura 9. Análisis bioinformático de la región promotora de *lin-35*. Por medio de un análisis bioinformático se determinó que la región de 700 pb río arriba del gene *lin-35* (línea negra) así como la región de 500 pb del primer intrón (línea verde) muestra un enriquecimiento significativo en la presencia de la marca H3K4me3, (amarillo) la cual está asociada a promotores activos, además experimentos de Chip-Chip de variantes de histonas H3.3 (en rojo) y H2AZ o HTZ1 (en negro para embriones y color salmón para gusanos L3). En azul se muestra también la presencia de la sub unidad grande de la polimerasa II, que en *C. elegans* es codificada por el gen *ama-1*. EMB: Embriones, L3 y L4 se refiere a los estadios larvarios 3 y 4 respectivamente, y YA son adultos jóvenes. Figura tomada del ModEncode

Con base en el análisis de la información obtenida en el ModEncode es posible concluir que la región de 1200 pb comprendida por 700 pb río arriba del gen *lin-35* y 500 pb del gen que comprenden el primer exón e intrón de *lin-35/Rb* muestra las características propias de una región promotora (Fig. 9). Esto sugiere que sea altamente probable que en esta región esté contenido el núcleo del promotor, debido a la presencia de la subunidad grande de la polimerasa II codificada por *ama-1*, así como la presencia de la H3K4me3, lo cual correlaciona con la ausencia de la H3K4me2, marca característica de regiones potenciadoras. Es importante resaltar que en la región intergénica entre *vps-51* y *lin-35* se logra observar una disminución de la marca de histonas (H3K4me3) (Fig. 9), lo que podría comprender la región libre de nucleosomas, característica de regiones promotoras donde 1 o 2 nucleosomas son desplazados permitiendo que la

maquinaria transcripcional interaccione con las regiones reguladoras (Heintzman & Ren, 2007).

Por otro lado, en el primer intrón se encuentra un enriquecimiento de la misma marca, se ha visto que el primer intrón puede contener elementos regulatorios importantes para la regulación de diversos genes (Bornstein *et al* ; 1987, Bass *et al*; 2014). El tamaño definido para el promotor de *lin-35* es consistente con la literatura, ya que se ha observado que la región promotora en promedio de los genes de *C. elegans* tiene un tamaño aproximado de 1.5 kb (Reinke *et al.*, 2013).

6.2. Búsqueda de posibles factores transcripcionales encargados de regular al gen *lin-35* durante ayuno por medios bioinformáticos.

a) Factores que regulan al gen *rb1* en mamíferos y que pueden estar conservados en *C. elegans*.

Debido a que el genoma del nematodo comparte un 40% de genes homólogos con organismos superiores y que el gen de *lin-35* es el homólogo al gen de retinoblastoma (*rb1*) se decidió buscar factores transcripcionales que son reguladores de Rb en mamíferos (Montgomery, 1994) y que pudieran tener sitios de unión en el promotor de *lin-35*.

Algunos de los factores que regulan al gen Rb en mamíferos son el factor SP1, así como algunos factores de la familia CREB (ATF-2, ATF-7), estos factores cuentan con un homólogo en el nematodo codificados por los genes *sptf-3*, (Hirose & Horvitz; 2013) así como *atf-2* y *atf7* respectivamente. Además los factores ATF-2/ATF-7 pertenecen a la familia de factores sensibles a los cambios ATP/AMP por lo que podrían funcionar como activadores de genes durante el ayuno (Persengiev y Green; 2002).

En la figura 10 se muestra el promotor del gen Rb de mamíferos y los sitios para sus reguladores principales. En el nematodo *C. elegans* se encontraron homólogos de los reguladores ATF y SP1, además de que existen

en la región promotora del *gen lin-35* sitios de probables de unión a estos factores (ver Fig. 12).

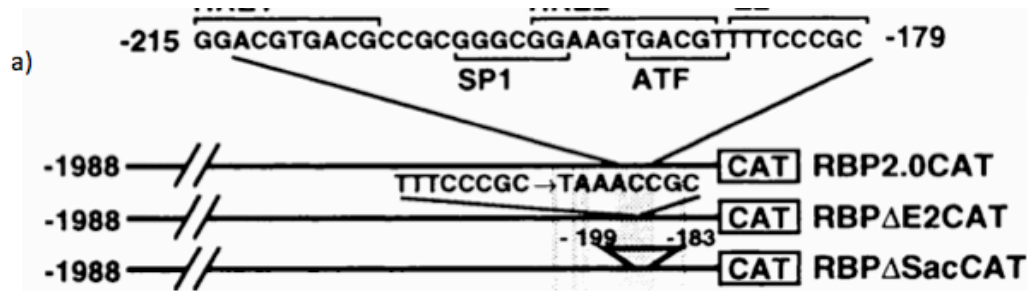


Figura 10. Esquema del promotor de RB en mamíferos. El gen RB codifica para la proteína de retinoblastoma. En el esquema se muestra la región promotora, comprendida en -215 a -179, la cual presenta sitios de unión para los factores transcripcionales SP1 (GGGCGG), para reguladores de la familia ATF (TGACGT). Las leyendas RBP2.0 CAT, RBPΔE2CAT y RBPΔSacCAT corresponden a las cepas empleadas en el trabajo de Montgomery donde se indican mutaciones o deleciones de las secuencias en 2 kilobases del promotor de RB. Figura tomada y modificada de Montgomery 1994.

b) Búsqueda de posibles factores transcripcionales que regulan al *gen lin-35* en *C. elegans*

El segundo enfoque empleado para encontrar factores transcripcionales que pudieran estar regulando al *gen lin-35* fue utilizar los datos depositados en el ModEncode de experimentos masivos de ChIP-seq que se han hecho en el nemátodo. Debido a que no todos los datos de ChIP-seq se han realizado en gusanos adultos, se tomaron los datos disponibles de los diferentes estadios larvarios en los que se han realizado estos ensayos como una aproximación (Araya *et al.*, 2014).

Como un primer método para discernir entre factores se tomaron en cuenta aquellos reguladores que mostraran tener interacción física con la región promotora del *gen lin-35*. Es decir se buscaron factores que mostraran un enriquecimiento significativo comparado con otras regiones del genoma y que hubiesen sido probadas por análisis de ChIP-seq. El segundo criterio fue seleccionar factores transcripcionales que estuvieran involucrados en vías de señalización de estrés y disponibilidad de nutrientes. Por último se revisó que

estos factores transcripcionales regulen genes en la gónada, a través de la revisión bibliográfica de su expresión o su papel en procesos en la línea germinal.

Utilizando estos criterios se tomaron en cuenta los factores transcripcionales que regulan procesos de estrés durante el ayuno tales como los factores PHA-4, que es un regulador clave durante la restricción calórica y en el ayuno (Panowski *et al.*, 2007); DAF-16 es el regulador de la vía de la insulina (Lin *et al.*, 2001), su función es crucial para responder en el estrés oxidativo así como el ayuno (Henderson y Johnson, 2001); SKN-1, homólogo al gen Nrf-2 en mamíferos, este factor es importante durante el estrés oxidativo (Inoue *et al.*, 2005), por último el factor NHR-28 perteneciente a la familia de los receptores nucleares de hormonas involucrado en el almacenamiento de lípidos (Arda HE, *et al.*, 2010). En la tabla 3 se resumen algunas funciones de los factores transcripcionales empleados en este trabajo.

Gen en <i>C. elegans</i>	Homólogo	Función
ATF-2	CREB/ATF	El gen <i>atf-2</i> codifica para un factor transcripcional dependiente de cAMP, parálogo a CES-2, que pertenece a la familia de cremallera de leucina (bZip) que participa en la regulación de la apoptosis. La actividad de <i>atf-2</i> es requerida para el correcto desarrollo del ducto excretorio y es esencial para el desarrollo embrionario. ATF-2 controla la expresión del gen <i>lin-48</i> . Además <i>atf-2</i> es expresado en embriones y se puede observar en larvas y adultos.
ATF-7	ATF	El gen <i>atf-7</i> codifica para el ortólogo tentativo del factor ATF-2 en mamíferos, el cual pertenece a la familia de cremalleras de leucina (bZIP), ATF-7 actúa como un regulador transcripcional de la respuesta inmune innata en el nematodo mediada por PMK-1 (Shivers <i>et al.</i> , 2010)
DAF-16	FOXO	El gen <i>daf-16</i> codifica para el único factor homólogo a (FOXO) de <i>C. elegans</i> ; DAF-16 funciona como un factor transcripcional que actúa mediando la señalización del receptor de insulina (IIS) que regula la formación de <i>dauer</i> , longevidad, respuesta a estrés metabolismo de lípidos y sistema inmune. DAF-16 es ampliamente

		expresado en el organismo, pero muestra enriquecimiento en isoformas de manera tejida específica. Se localiza tanto en citoplasma como en núcleo siendo su localización importante para la regulación de su función.
PHA-4	FOXA	El gen <i>pha-4</i> codifica para el gen homólogo al factor FOXA, este factor funciona como un factor de identidad de la faringe durante la embriogénesis. PHA-4 es esencial para la recuperación de <i>dauer</i> y el desarrollo de la gónada y la vulva. La transcripción de <i>pha-4</i> es elevada durante el ayuno.
NHR-28	HNF-4	NHR-28 pertenece a la familia de receptores nucleares de hormonas; en <i>C. elegans</i> está involucrado en el almacenamiento de lípidos (Arda HE <i>et al.</i> , 2010).
SPTF-3	SP1	Factor transcripcional que controla la expresión del gen <i>egl-1</i> (Hirose y Horvitz, 2013). En el nematodo se ha reportado que el factor SPTF-3 es importante para la producción normal de ovocitos y en el desarrollo embrionario.
SKN-1	Nrf-2	Durante los estadios tempranos del desarrollo de <i>C. elegans</i> el factor transcripcional SKN-1 inicia el desarrollo del sistema digestivo y otros tejidos del mesodermo. Después del desarrollo SKN-1 participa en la fase II de desintoxicación a través de mecanismos de activación de genes inducibles en el intestino (An y Blackwell, 2003) El factor SKN-1 actúa durante la longevidad, y podría ser de importancia en el envejecimiento. (Blackwell, 2015). También regula diversos genes involucrados en el metabolismo de los lípidos y reduce el almacenamiento de las grasas, causada por la ausencia de la línea germinal.

Tabla 3 . Factores transcripcionales candidatos para regular a *lin-35* en el ayuno. Información obtenida bibliográficamente.

En la figura 11 se muestra el resultado del análisis *in silico* de los reguladores mencionados anteriormente, donde es posible observar el pico de enriquecimiento para cada factor en la región intergénica del gen *lin-35* y *vps-51*.

En conclusión los factores transcripcionales DAF-16, PHA-4, SKN-1 y NHR-28 muestran un enriquecimiento por experimentos de ChIP en la región intergénica de *lin-35* y *vsp-51*.

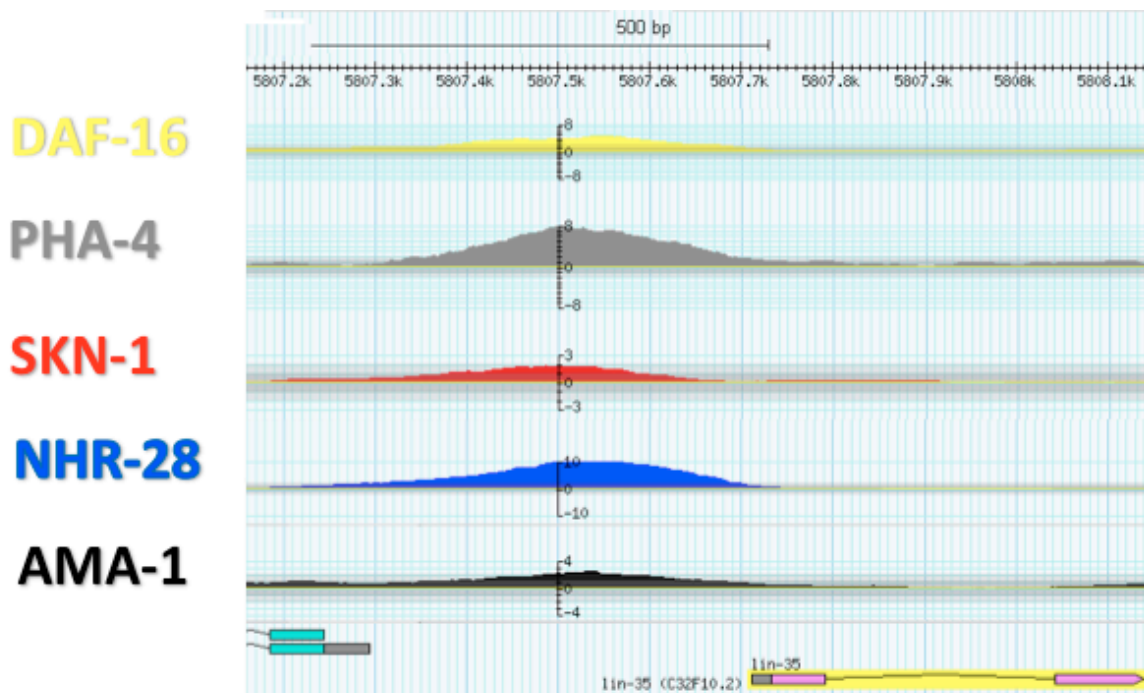


Figura 11. Los factores transcripcionales DAF-16/FOXO, PHA-4/FOXA, SKN-1/Nrf-2 y NRH-28 se encuentran enriquecidos en la región río arriba del gen *lin-35*. Por medio de un análisis de la secuencia promotora de *lin-35* se observa que los factores transcripcionales DAF-16 (amarillo), PHA-4 (gris), SKN-1 (rojo) y NHR-28 (azul) tienen una región de enriquecimiento en la región promotora de *lin-35* (datos de ModEncode de experimentos de ChIPsec). L3 y L4 se refiere a los estadios larvarios 3 y 4 respectivamente, y YA son adultos jóvenes. Figura tomada del ModEncode.

A manera de resumen se muestra en la figura 12 un esquema de cómo estaría organizada la región del gen *lin-35* definida como promotora en este trabajo. En la figura se observa una ampliación de la región intergénica entre el gen *lin-35* y *vsp-1* donde se muestran enriquecidos los factores transcripcionales anteriormente descritos, así como los posibles sitios de unión para estos factores.

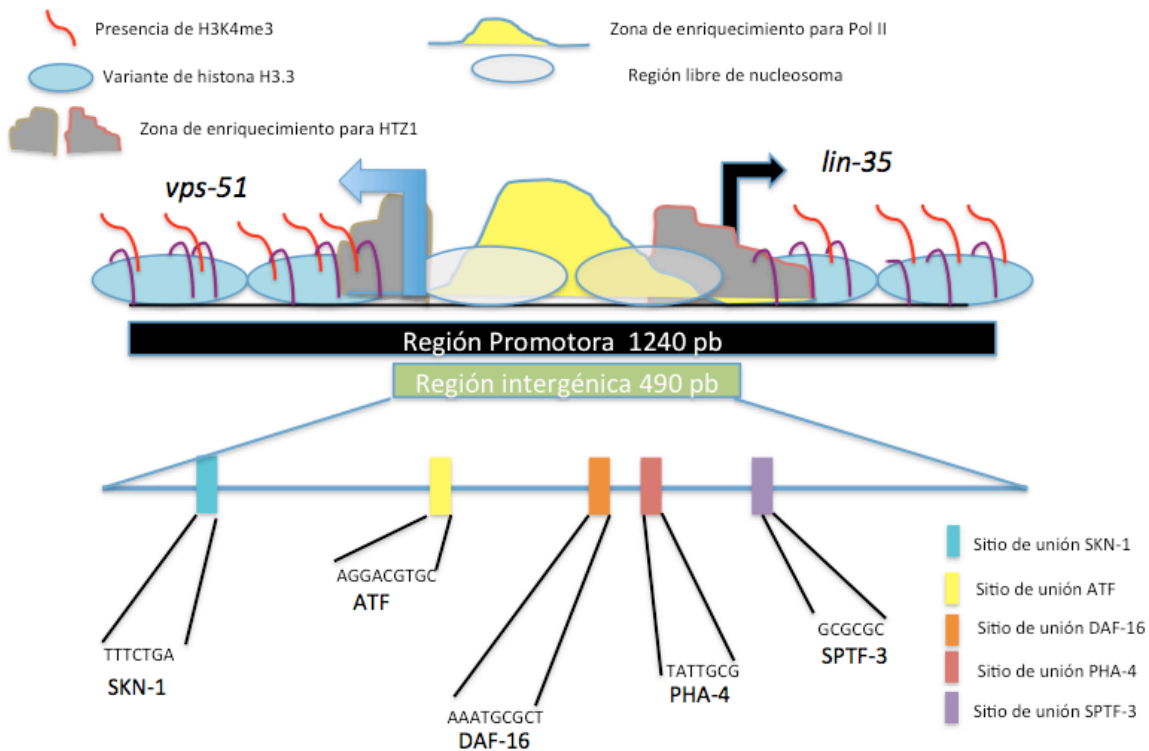


Figura 12. Esquema del promotor de *lin-35*. Promotor del gen *lin-35* en el nematodo, se muestra en base a los datos obtenidos del ModEncode la estructura del promotor, así como los posibles sitios de unión para los factores transcripcionales SPTF-3 (GCGCGC) y ATF-2/7 (AGGACGTGC), así como para reguladores de estrés como SKN-1, DAF-16 y PHA-4.

6.3.- Participación de los posibles reguladores de *lin-35* en la inducción de apoptosis inducida por ayuno.

Salinas y colaboradores reportaron una inducción de apoptosis al someter a los gusanos a un ayuno de 6 horas en la cepa silvestre (Salinas *et al.*, 2006).

Se realizó un escrutinio a través de la cuantificación de cuerpos apoptóticos por medio de fluorescencia en fondos RNAi de los factores transcripcionales anteriormente descritos para saber si estos factores influían en la apoptosis inducida por ayuno, y si esta inducción era a través de la expresión de *lin-35*.

Para este análisis se realizó un escrutinio por medio del silenciamiento por *RNAi* algunos posibles reguladores de *lin-35*.

Tomando ventaja del transgénico MD701, se realizaron los conteos de cuerpos apoptóticos. Esta cepa contiene una fusión traduccional de la proteína de membrana CED-1 que media la fagocitosis de las células que son eliminadas por apoptosis con la proteína verde fluorescente (GFP), lo cual facilita la observación de los cuerpos apoptóticos por medio microscopia de fluorescencia. Se tomaron 7 activadores tentativos y se realizaron experimentos de *RNAi*, para cuantificar el número de cuerpos apoptóticos en condiciones control y ayuno.

a) SKN-1/Nrf-2 y ATF-7/ATF no son requeridos para la inducción de apoptosis durante el ayuno.

El experimento consistió en interferir los genes de interés en una población de gusanos sincronizados en estadio L1, que estuvieron en contacto con la bacteria con el RNA de doble cadena para el gen de interés hasta ser adultos de 1 día. Los gusanos control fueron alimentados con bacteria que expresa un plásmido vacío (PV), sin ningún gen blanco en *C. elegans* para *RNAi*, por otro lado los gusanos experimentales fueron alimentados con bacterias con el RNA dc para silenciar los genes *skn-1* y *atf-7* respectivamente, y al llegar al estadio adulto fueron ayunados por 6 horas. En el grupo control los animales siempre tuvieron alimento, mientras que el grupo experimental fue conformado por gusanos adultos de 1 día ayunados por 6 horas.

La figura 13 muestra el conteo de los cuerpos apoptóticos por brazo de la gónada de adultos de 1 día control y ayuno en los gusanos CED-1:GFP donde fueron silenciados los genes *skn-1* y *atf-7*. La barra referente al control muestra la apoptosis fisiológica, mientras que la barra de ayuno se refiere a la apoptosis que es inducida por el ayuno de 6 horas (Fig.13). Como se ha reportado anteriormente los gusanos control (PV) muestran una apoptosis fisiológica basal y durante el ayuno el número de cuerpos apoptóticos aumenta casi al doble, los

resultados obtenidos en este trabajo muestran una inducción de 1.98 veces con respecto a su control (PV). Al cuantificar los cuerpos apoptóticos en los gusanos con el fondo RNAi para *skn-1* podemos observar que en condiciones control el número de cuerpos apoptóticos aumenta parcialmente (1.45 veces de inducción) con respecto a lo observado en gusanos control (PV) y durante el ayuno el número de cuerpos aumenta de manera significativa (1.7 veces de inducción) de manera similar a lo observado en los gusanos PV (Fig.13).

Al cuantificar los gusanos silenciados para el gen *atf-7* muestran una inducción parcial en la apoptosis fisiológica (1.5 veces de inducción), sin embargo en la condición de ayuno se observa una inducción similar a la condición control (1.8 veces). Por esta razón podemos concluir que el silenciamiento de estos factores transcripcionales aumentan parcialmente apoptosis, aunque los cambios en la apoptosis que se muestran son sutiles, son significativos con respecto al control de plásmido vacío. Con respecto a la apoptosis inducida por ayuno se puede observar que este par de factores no son necesarios para inducir apoptosis en dicha condición. La activación del gen *lin-35* durante el ayuno no parece estar dependiendo de estos reguladores, ya que el número de cuerpos apoptóticos no cambió con respecto al control, sin embargo, esto no ha sido probado experimentalmente.

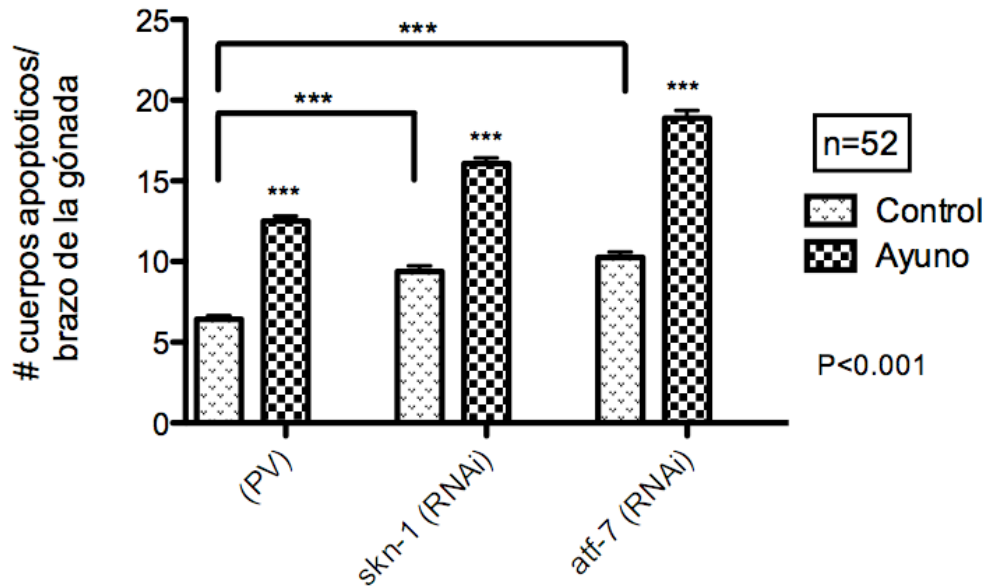


Figura 13. Los factores transcripcionales SKN-1 y ATF-7 no son necesarios para inducir apoptosis durante el ayuno. Animales de la cepa CED-1::GFP sincronizados en estadio L1 fueron crecidos a 24° C en presencia de bacterias con RNA dc para control (PV), *skn-1* o *atf-7*. Cuando los animales llegaron a ser adultos de 1 día fueron colectados y separados en 2 grupos; el grupo control fue colocado en placas con bacterias, el segundo grupo fue colocado en placas sin bacterias y sometidos a ayuno durante 6 horas. Los animales fueron montados en parches de agarosa al 2% y visualizados en el microscopio de fluorescencia para contar el número de cuerpos apoptóticos/ por brazo de la gónada en condiciones control y ayuno. N= 52. Esta gráfica representa el promedio ± SEM de 3 experimentos independientes y se comparo por medio de una Anova de una vía complementado por una prueba de bonferoni con una confiabilidad de 99.9% Los símbolos ***($P < 0.001$) y n.s. (no significativo) colocados arriba de las barras son comparaciones entre los grupos control y ayuno de un mismo fondo genético, mientras que los símbolos colocados arriba de los corchetes son comparaciones entre fondos genéticos de la misma condición.

b) SPTF-3 y NHR-28 son necesarios para inducir apoptosis por ayuno.

Para evaluar si SPTF-3 y NHR-28 son necesarios para la apoptosis inducida durante ayuno. Se realizaron conteos de cuerpos apoptóticos en gusanos adultos de 1 día en condiciones control y ayuno en animales RNAi para los genes *sptf-3* y *nhr-28*.

La figura 14 muestra la cuantificación de cuerpos apoptóticos de los gusanos en los fondo CED-1::GFP (PV) como control o CED-1::GFP RNAi *sptf-3* o CED-1::GFP RNAi *nhr-28*, en el grupo control (PV) se observa una inducción de 1.98 veces de cuerpos apoptóticos con respecto a la condición control. Para el fondo CED-1::GFP RNAi *sptf-3* el número de cuerpos apoptóticos en condiciones fisiológicas son similares a los de la cepa control, sin embargo en condiciones de ayuno el numero de cuerpos apoptóticos en dicho fondo, no muestra una inducción significativa con respecto a su control. El mismo efecto se puede observar en la cepa con fondo CED-1::GFP RNAi *nhr-28* (Fig.14) Estos resultados sugieren que los factores transcripcionales SPTF-3 y NHR-28 son necesarios para inducir la apoptosis durante el ayuno.

Para corroborar los datos obtenidos por RNAi, se cuantificaron los cuerpos apoptóticos en las cepas *ced-1::GFP* y *ced-1::GFP, sptf-3(n4850)* (Fig. 14). Se ha reportado que el alelo *sptf-3(n4850)* es una mutación del sitio de empalme evitando que el dominio de unión a ADN sea funcional (Hirose & Horvitz, 2014). Esta mutación es viable posiblemente por que solo es una mutación puntual, sin embargo se ha reportado que una delección de *sptf-3* es letal (Sun et al., 2007); otros alelos de *sptf-3* como *stpf-3(gu85)* se han descrito ser viables. Se observó que la cepa control (*ced-1::GFP*) muestra una apoptosis fisiológica basal, después de un ayuno de 6 horas la apoptosis es incrementada de manera significativa, mientras que en la cepa *ced-1::GFP, sptf-3(n4850)* se puede observar que, tanto la apoptosis fisiológica como la apoptosis inducida por ayuno, no presenta cambios significativos con respecto a su control. Estos resultados apoyan que *sptf-3* es necesario para inducir apoptosis en la condición ayuno.

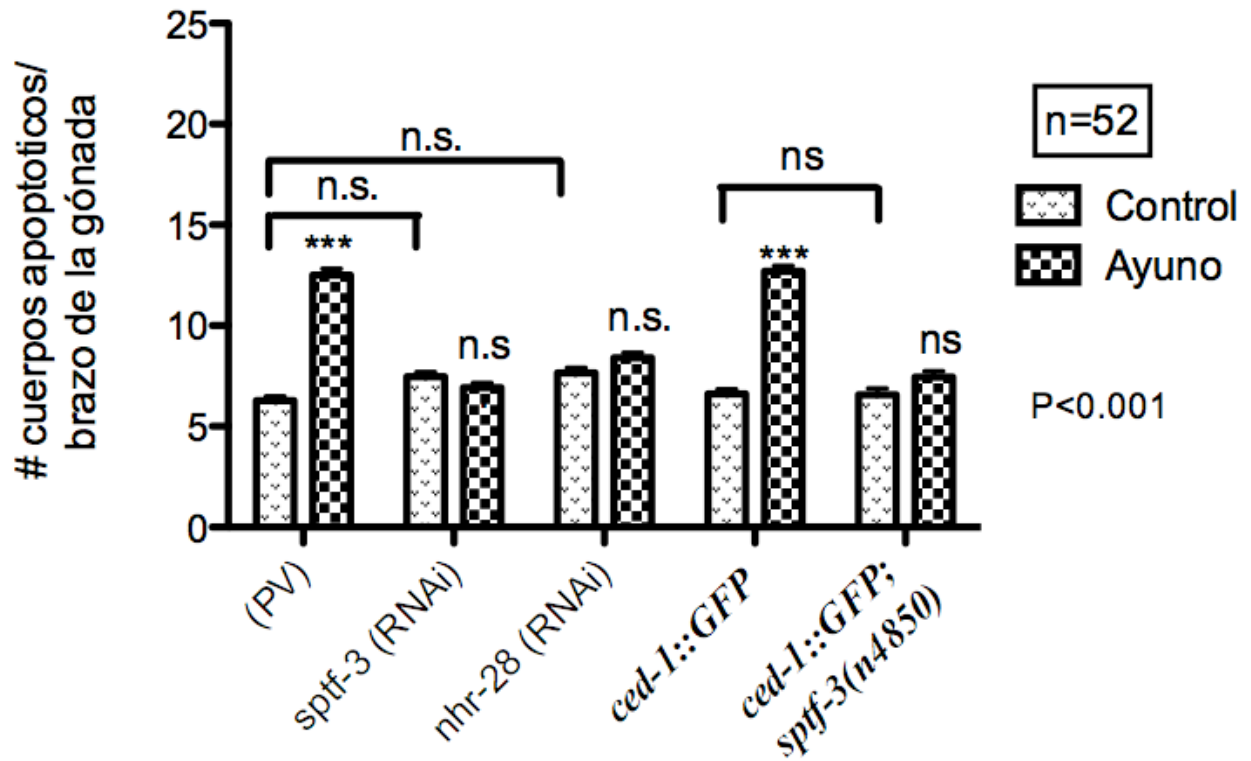


Figura 14. Los factores transcripcionales SPTF-3 y NHR-28 son requeridos para inducir apoptosis durante el ayuno. Animales de la cepa *ced-1::GFP* sincronizados en estadio L1 fueron crecidos a 24° C en presencia de bacterias con RNA de para control (PV), *sptf-3*, *nhr-28*, o con las cepas *ced-1::GFP* y la cepa mutante *ced-1::GFP; sptf-3 (n4850)* la cual tiene una mutación en un sitio de empalme que evita la unión a ADN. Cuando los animales llegaron a ser adultos de 1 día fueron colectados y separados en 2 grupos; el grupo control fue colocado en placas con bacterias, el segundo grupo fue colocado en placas sin bacterias y fue sometido a ayuno durante 6 horas. Los animales fueron montados en parches de agarosa al 2% y visualizados en el microscopio de fluorescencia para contar el número de cuerpos apoptóticos/ por brazo de la gónada en condiciones control y ayuno N= 52 animales. Esta gráfica representa el promedio ± SEM de 3 experimentos independientes y se comparó por medio de una Anova de una vía complementado por una prueba de Bonferroni con una confiabilidad de 99.9. Los símbolos *** (P< 0.001) y n.s. (no significativo) colocados arriba de las barras son comparaciones entre los grupos control y ayuno de un mismo fondo genético, mientras que los símbolos colocados arriba de los corchetes son comparaciones entre fondos genéticos de la misma condición.

c) ATF-2, PHA-4 y DAF-16 son necesarios para inducir apoptosis por ayuno y su silenciamiento dispara la apoptosis fisiológica.

Para evaluar si los factores transcripcionales ATF-2/ATF PHA-4/FOXA y DAF-16/FOXO juegan un papel durante la apoptosis en el ayuno, se cuantificaron los cuerpos apoptóticos en gusanos de la cepa CED-1::GFP con fondos RNAi para los genes correspondientes.

Los experimentos fueron realizados como se describe en las secciones anteriores. Sin embargo debido a que el gen *pha-4* es vital en la diferenciación durante los estadios larvarios L1 y L2, los gusanos fueron colocados en las placas con la bacteria que contenían el RNA de doble cadena para *pha-4* hasta el estadio L4 para que los animales pudieran llegar a adultos.

Los gusanos control (PV) muestran la inducción de apoptosis en el ayuno esperada (Fig. 15). Para los grupos experimentales la ausencia de estos reguladores muestran una apoptosis fisiológica elevada. Este aumento en la apoptosis fisiológica podría ser debido a un fenómeno de apoptosis inducido por silenciamiento en la gónada, en el cual es necesario el gen *cep-1*, homólogo a p53 (Adamo *et al.*, 2012); los gusanos RNAi para el gen *atf-2* muestran 1.4 veces de inducción con respecto al control, mientras que *pha-4* y *daf-16* muestran niveles de inducción de 1.7 y 1.6 respectivamente. Por otro lado, durante el ayuno no se observan aumentos significativos con respecto al mismo fondo RNAi en condiciones control, por lo que se puede concluir que estos genes son requeridos para inducir apoptosis durante el ayuno (Fig. 15).

La mutante *daf-16 (mgOD50)* se puede considerar una pérdida de función debido a que la mutación comprende la mayor parte del ORF (Ogg *et al.*, 1997). Para corroborar los datos obtenidos por RNAi, se cuantificaron los cuerpos apoptóticos en las cepas *ced-1::GFP* empleada como control y la *ced-1::GFP, daf-16(mgOD50)* (Fig.15).

Los resultados de este experimento muestran que la ausencia del gen *daf-16* aumenta la apoptosis fisiológica de manera sutil, sin embargo durante el ayuno no se observa una inducción (Fig 15). Estos experimentos apoyan los datos obtenidos por RNA de interferencia.

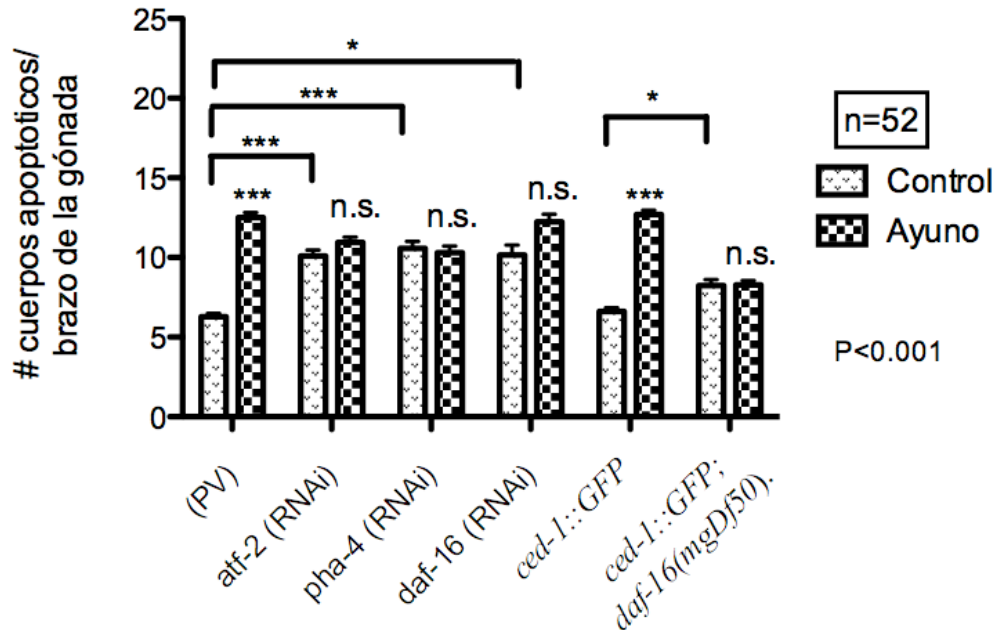


Figura 15. Los factores transcripcionales ATF-2, PHA-4 y DAF-16 son requeridos para inducir apoptosis durante el ayuno. Animales de la cepa *CED-1::GFP* sincronizados en estadio L1 fueron crecidos a 24° C en presencia de bacterias con RNA dc para control (PV), *atf-2 daf-16* o las cepas *ced-1::GFP* y *ced-1GFP; daf-16 (mgDF50)*. Cuando los animales llegaron a ser adultos de 1 día fueron colectados y separados 2 grupos; el grupo control fue colocado en placas con bacterias, el segundo grupo fue colocado en placas sin bacterias y fue sometido a ayuno durante 6 horas. Los animales donde fue silenciado el gen *pha-4* fueron sincronizados y crecidos a 24°C hasta ser L4 en bacteria OP50, en este estadio fueron colocados en placas en presencia de bacterias con RNA dc para *pha-4* durante 24 horas. Los adultos de 1 día fueron colectados y separados 2 grupos; el grupo control fue colocado en placas con bacterias, el segundo grupo fue colocado en placas sin bacterias y fue sometido a ayuno durante 6 horas. Posteriormente todos los animales fueron montados en parches de agarosa al 2% y visualizados en el microscopio de fluorescencia para contar el número de cuerpos apoptóticos/ brazo de la gónada en condiciones control y ayuno. N= 52 animales. Esta gráfica representa el promedio \pm SEM de 3 experimentos independientes y se comparó por medio de una Anova de una vía complementado por una prueba de bonferoni con una confiabilidad de 99.9. Los símbolos *** (P < 0.001) y n.s. (no significativo) colocados arriba de las barras son comparaciones entre los grupos control y ayuno de un mismo fondo genético, mientras que los símbolos colocados arriba de los corchetes son comparaciones entre fondos genéticos de la misma condición. * (P < 0.01)

6.4. Los genes *atf-2*, *pha-4* y *daf-16* presentan apoptosis fisiológica elevada independiente de la vía de inducción de apoptosis por silenciamiento.

Cuando un RNA de doble cadena es introducido en la gónada se puede disparar un fenómeno de apoptosis inducido por silenciamiento de genes en la gónada, en el cual es necesario el gen *cep-1*, homólogo a p53 (Adamo *et al.*, 2012). Para corroborar si el incremento observado en la apoptosis fisiológica en los gusanos RNAi para los genes *skn-1*, *atf-7*, *atf-2*, *pha-4* y *daf-16* era debido a este fenómeno se cuantificaron los cuerpos apoptóticos en las cepas CED-1::GFP (control) y en la cepa *ced-1::GFP, cep-1(gk138)*.

La figura 16 muestra la cuantificación de los cuerpos apoptóticos en la cepa *ced-1::GFP* (control) y en la cepa *ced-1::GFP, cep-1(gk138)* en condiciones control. Como se ha observado en experimentos anteriores, la cepa control muestra una apoptosis fisiológica basal, sin embargo en ausencia de los genes *atf-2*, *pha4* y *daf-16* aumenta considerablemente con respecto al control. Sin embargo en la cepa *ced-1::GFP, cep-1(gk138)* se observa una disminución en *skn-1*, *atf-7*, lo que sugiere que el incremento es dependiente de *cep-1* (Fig. 16).

Los gusanos RNAi para los genes *daf-16* y *atf-2* no muestran cambios en la cepa *ced-1::GFP, cep-1(gk138)* (Fig. 16). Por otro lado aun cuando la apoptosis disminuye en los gusanos *ced-1::GFP, cep-1(gk138); pha-4(RNAi)* no llega a ser igual a la cepa control CED-1::GFP (PV) sugiriendo que la ausencia de estos genes aumenta la apoptosis fisiológica por un mecanismo independiente de *cep-1*

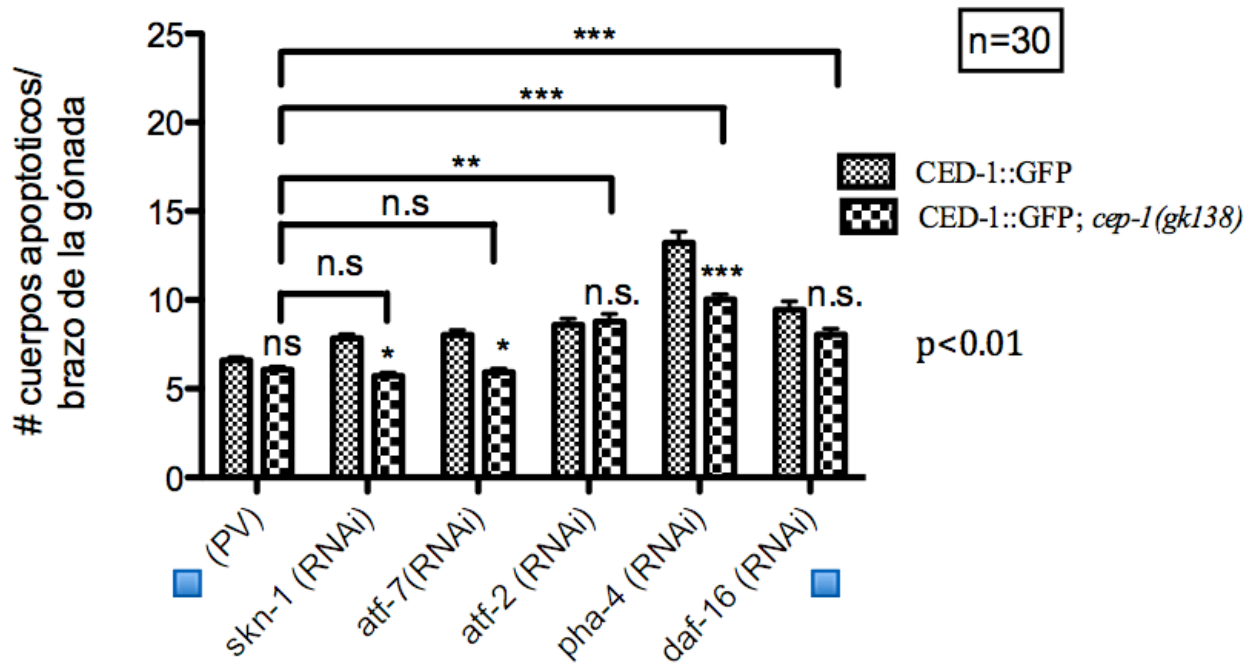


Figura 16. Los genes *atf-2*, *pha-4* y *daf-16* presentan apoptosis elevada independiente del gen *cep-1*. Animales de la cepa CED-1::GFP, CED-1::GFP; *cep-1* fueron sincronizados y crecidos a 24° C en presencia de bacterias con RNA de doble cadena para los fondos respectivos, cuando los animales llegaron a ser adultos de 1 día fueron colectados y se cuantificaron los cuerpos apoptóticos. Los animales fueron montados en parches de agarosa al 2% y visualizados en el microscopio de fluorescencia para contar el numero de cuerpos apoptóticos/ brazo de la gónada en condiciones control y ayuno. N= 30 animales. Esta gráfica representa el promedio \pm SEM de 3 experimentos independientes y se comparo por medio de una Anova de una vía complementado por una prueba de bonferoni con una confiabilidad de 99.9%. Los símbolos ***($P < 0.001$) y n.s. (no significativo) colocados arriba de las barras son comparaciones entre los grupos control y ayuno de un mismo fondo genético, mientras que los símbolos colocados arriba de los corchetes son comparaciones entre fondos genéticos de la misma condición. ** ($P < 0.01$)

6.5. La expresión de *lin-35/Rb* disminuye en el fondo mutante *daf-16(mgDf50)*.

Los datos obtenidos en los experimentos de cuantificación de cuerpos apoptóticos en la mutante *daf-16(mgDf50)* mostraron que, este factor transcripcional es necesario para inducir apoptosis durante el ayuno. Debido a esto se realizaron estudios de qRT-PCR en condiciones control y ayuno para mostrar si este factor regulaba el nivel de expresión de *lin-35/Rb* en la mutante *daf-16 (mgDf50)*.

El experimento consistió en crecer gusanos N2 y gusanos con el fondo genético *daf-16 (mgOD50)* en condiciones control y ayuno, y se extrajo el RNA total de gusanos adultos de 1 día para control o ayuno (6 horas sin bacteria). Posteriormente se sintetizó cDNA a partir del RNA obtenido y se observó que el RNA estuviera en buenas condiciones. Finalmente se corrió el qRT-PCR con oligos para *18s* (empleado como control) y para *lin-35* y se realizó un $2\Delta\Delta^{ct}$ para normalizar los resultados.

La figura 17 muestra que la expresión de *lin-35* en la cepa N2 en condición de ayuno incrementa su expresión al doble, mientras que en el fondo mutante *daf-16 (mgOD50)* la expresión de *lin-35* se ve disminuida significativamente comparada con el control. Los resultados mostrados en esta sección permiten concluir que el factor transcripcional *daf-16* es un regulador importante de la expresión de *lin-35* en el ayuno. Como conclusión de este experimento podemos decir que *daf-16* controla la expresión del gen *lin-35*.

Sabemos que otros factores transcripcionales descritos en el trabajo, son necesarios para disparar la inducción de apoptosis durante el ayuno, sin embargo decidimos tomar a *daf-16* como un buen candidato para regular la expresión de *lin-35* por la importancia del mismo factor durante el ayuno, cabe mencionar que aunque *daf-16* controla la expresión de *lin-35* aun nos interesa saber si esta regulación es directa, es decir, que *daf-16* se encuentre en el promotor de *lin-35* en esta condición, o indirecta es decir, que la regulación sea a través de

otro factor transcripcional. Finalmente es importante decir que los experimentos con los demás factores se realizaran mas adelante.

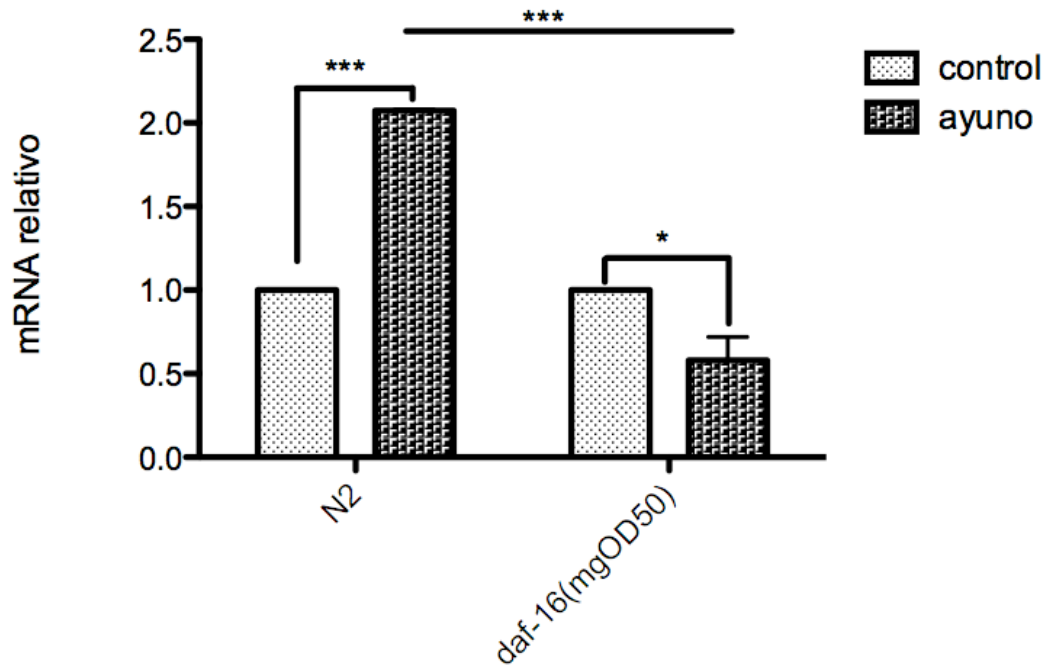


Figura 17. La expresión de *lin-35* disminuye en un fondo mutante *daf-16 (mgDf50)* durante el ayuno. Animales adultos de 1 día de la cepa N2 y *daf-16 (mgOD50)* fueron separados en 2 grupos, el grupo control siempre estuvo con alimento mientras que el grupo experimental fue sometido a ayuno durante 6 horas. El RNA fue extraído y procesado para obtener cDNA, posteriormente se realizó el qRT-PCR con oligonucleótidos para *lin-35* y 18s con el cual fue normalizado. N=2. Esta grafica representa el promedio \pm SD de dos experimentos independientes y se comparo por medio de una Anova de una vía complementado por una prueba de bonferoni con una confiabilidad de 99.9%. Los símbolos significan ***($P < 0.01$); *($P < 0.05$)

7.- Discusión general

7.1. La región promotora de *lin-35* mide 1200 pb aproximadamente

En este trabajo, por medio de herramientas bioinformáticas se analizó la región río arriba del gen *lin-35* con la ayuda de la base de datos del ModEncode. Se delimitó la región promotora del gen *lin-35*, la cual está contenida en 1200 pb, de los cuales 700 pb pertenecen a la región río arriba del ATG y 500 pb que comprenden al primer exón e intrón; que en algunos genes se ha visto que puede ser importante en la regulación (Bornstein *et al.*, 1987; Bass *et al.*, 2014). (Fig. 12)

La región promotora fue delimitada en base a las características estructurales de la región. Esta muestra un enriquecimiento de la marca de histonas, H3K4me3, lo que sugiere que esta región está activa transcripcionalmente; posiblemente corresponda a un promotor, además el hecho que se encuentre flanqueando a una región intergénica de 490pb en la cual la marca disminuye, podría sugerir que la H3k4me3 delimita la zona libre de nucleosomas como ocurre en otros eucariontes. Adicionalmente la presencia de las variantes de histona H3.3 así como H2AZ en la región intergénica de *vps-1* y *lin-35*, sugieren que esta región se mantiene transcripcionalmente activa. Estos datos se apoyan por el enriquecimiento de la subunidad de la RNA polimerasa II. Finalmente en esta región intergénica de 490 pb se encuentran enriquecidos los factores DAF-16, PHA-4, SKN-1 y NHR-28 (ver figura 12).

7.2. Los factores ATF-2, PHA-4 y DAF-16 aumentan la apoptosis fisiológica.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que el aumento en la apoptosis fisiológica en animales RNAi para *skn-1* y *atf-7* es debido a una vía de inducción de apoptosis que requiere al gen *cep-1* (Fig. 16). Debido a que la introducción de RNA de doble cadena puede aumentar la apoptosis fisiológica como respuesta al silenciamiento de genes de la gónada (Adamo *et al.*, 2012) en una vía dependiente de *cep-1*, se realizaron los experimentos para ver si esto

estaba pasando (Fig 16). Además los datos obtenidos en este estudio muestran que el silenciamiento de los factores *sptf-3* y *nhr-28* en condiciones fisiológicas no tiene ningún efecto en la apoptosis fisiológica (Fig. 14). Además este estudio mostró que al silenciar los genes *atf-2*, *pha-4* y *daf-16* la apoptosis en condiciones control aumenta (Fig. 16). Este incremento es independiente de la vía controlada por *cep-1/p53*. Sugiriendo que estos genes probablemente participen de manera directa o indirecta en la regulación de la apoptosis fisiológica.

Existen varias posibilidades para explicar el hecho que la ausencia de estos genes aumenten la apoptosis en condiciones fisiológicas. La primera es que no regulen a *lin-35* en esta condición. Schertel & Conradt, 2007 describieron que *lin-35* actúa como un gen pro-apoptótico al reprimir a *ced-9*, por esta razón se esperaría que al quitar a su activador la apoptosis disminuyera (Schertel y Conradt, 2007). La segunda posibilidad es que estos factores regulen de manera ya sea directa o indirecta algún regulador de la maquinaria central de apoptosis y al no estar se dispare la apoptosis. Finalmente podría ser que la ausencia de estos genes induzcan por si mismo un tipo de estrés, ya que si estos factores controlan genes de procesos esenciales su ausencia pueda ser traducida como una señal de apoptosis.

7.3.Los factores ATF-2, NHR-28, SPTF-3, PHA-4 y DAF-16 son necesarios para inducir apoptosis en el ayuno.

En este trabajo se demostró que en condiciones de ayuno la ausencia de NHR-28 afecta el número de cuerpos apoptóticos indicando que este factor es necesario para inducir apoptosis en las células germinales durante esta condición. Experimentos de CHIP-seq disponibles en el ModEncode (realease) muestran que NHR-28 se une al promotor de *lin-35* en la etapa de L4 indicando que NHR-28 puede ser importante durante los estadios larvarios; y se ha visto que esta involucrado en el almacenamiento de lípidos (Arda HE *et al.*, 2010), por lo que podría estar regulando a los genes importantes en la condición de ayuno, ayudando a un balance metabólico.

Nuestros datos demuestran que el factor SPTF-3 regula la apoptosis inducida por ayuno. Aunque no existe evidencia en el ModEncode de que este factor este unido al promotor de *lin-35*, SPTF-3 es un buen candidato para regular la expresión en condiciones de ayuno. En mamíferos el factor Sp1 controla de manera crítica la regulación de *rb1*, ya que al quitar del promotor el elemento de unión descrita para Sp1 (GCGGG) la transcripción disminuye de manera evidente (Montgomery *et al.*, 1994). En el promotor de *lin-35* se encuentra una secuencia (GCGCGC) la cual puede ser el sitio de unión al factor homólogo en el nemátodo, ya que se ha visto los factores Sp1-Sp4 se pueden unir a secuencias ligeramente variables, dependiendo el contexto genético y el estado de la cromatina (Zhao *et al.*, 2002).

Hirose & Horvitz (2013) describieron en *C.elegans* que SPTF-3 funciona en la apoptosis de las neuronas hermanas M4 (donde se describió el alelo mutante de *sptf-3* (n4850), que tiene una mutación única, en el sitio de empalme del último exón). El fenotipo de esta mutante es la disminución de apoptosis en las neuronas M4 en animales deficientes para SPTF-3, debido a la activación de *egl-1* que conduce a una vía de activación de apoptosis en células somáticas (Hirose & Horvitz, 2014). En la gónada *egl-1* no participa en la apoptosis fisiológica, sin embargo SPTF-3 es necesario para la inducción de apoptosis por ayuno en la línea germinal (este trabajo).

En nuestro trabajo se ha mostrado que la ausencia de ATF-2 evita la inducción de apoptosis durante el ayuno en gusanos RNAi para ATF-2. Esto sugiere que el factor se requiere para inducir apoptosis durante el ayuno. En mamíferos algunos de los miembros de la familia ATF regulan genes apoptóticos, así como diferentes tipos de estrés (Persengiev y Green, 2002). Reportes previos han descrito que ATF-2 puede regular al gen Bcl-2, en cultivos celulares de condrocitos y esta interacción al promotor es guiada por CREB. Sin embargo se ha visto que ATF-2 tiene una mayor importancia en la expresión del gen Bcl-2 en

estas células ya que su ausencia puede disminuir la cantidad de Bcl-2 e inducir apoptosis por esta vía (Ma *et al.*, 2007).

Nuestros datos en condición de ayuno muestran que PHA-4 es requerido para inducir la apoptosis durante esta condición, lo que concuerda con que PHA-4 es importante para proteger al nemátodo durante el ayuno y restricción calórica (Panowski *et al.*, 2007). PHA-4 es considerado un factor de identidad para el desarrollo de la faringe en *C. elegans* (Horner *et al.*; Mango *et al.* 1998) que modula la expresión de genes de diferenciación en diferentes estados del desarrollo en respuesta a las pistas medioambientales en las que se encuentra el nemátodo. (Ao W *et al.*; Gaudet *et al.*, 2004). Sin embargo, también cumple con funciones importantes en procesos post-embrionarios por ejemplo; se ha visto que es esencial en la recuperación *dauer*, así como en el desarrollo de la gónada y en la vulva (Chen & Riddle, 2008).

El gen *pha-4* muestra una expresión aumentada durante el ayuno en gusanos L1 y adultos, así como durante la restricción calórica, donde este factor transcripcional aumenta de la esperanza de vida (Panowski *et al.*, 2007). Esto lo hace un buen candidato para regular a *lin-35* durante el ayuno.

7.4. DAF-16 induce la expresión de *lin-35* y se requiere para inducir apoptosis por ayuno.

Los resultados de este trabajo muestran que durante el ayuno DAF-16 es necesario para la inducción de apoptosis (Fig. 15). Previamente se describió que los factores transcripcionales FOXO cumplen papeles importantes en las rutas asociadas a estrés y el envejecimiento, lo que es claramente ilustrado por el hecho que la actividad de estos factores es regulada por diversos tipos de estrés especialmente el estrés oxidativo controlado por la MAPK p38 (Troemel *et al.*, 2006). Además, son fosforilados por las cinasas de la familia AMPK que censan los niveles de ATP/AMP, y al parecer esta regulación está conservada en *C. elegans*, por el gen *aak-2* homólogo a AMPK (Apfeld *et al.*, 2004; Greer *et al.*,

2007). El gen *daf-16* codifica para el único factor FOXO presente en el nemátodo (Tatar *et al.*, 2003) y regula la vía de la insulina en el nemátodo (Lin *et al.*, 2001). Cuando DAF-16/FOXO está activo se relocaliza al núcleo y de esta manera activa los genes involucrados en la respuesta a estrés, supervivencia y reprime genes del desarrollo. Por otro lado, el hecho de que DAF-16/FOXO sea requerido para la inducción de apoptosis apoya que DAF-16 es necesario para mantener un equilibrio entre los genes de proliferación y los genes de supervivencia (Murphy *et al.*, 2003). Finalmente, DAF-16 participa en la apoptosis por daño a DNA en donde es regulado por AKT-2, teniendo un papel anti apoptótico en esta condición (Perrin *et al.*, 2013).

Los experimentos de qPCR muestran que en una mutante *daf-16* en la condición de ayuno el mensajero de *lin-35* disminuye (Fig.17), lo cual concuerda con los datos obtenidos en los conteos de cuerpos apoptóticos que muestran que en la mutante de *daf-16* no se puede inducir apoptosis en la condición de ayuno (Fig. 15). Sin embargo el mRNA de *lin-35* no se abate por completo sugiriendo que otros factores transcripcionales regulan su transcripción, posiblemente algunos de los propuestos en este trabajo.

A manera de resumen se presenta un modelo de los datos de este trabajo en la figura 18, que intenta explicar cómo puede ser la regulación de la apoptosis inducida por ayuno. En la cepa silvestre en condiciones de ayuno el factor transcripcional DAF-16 se encuentra en el núcleo, posiblemente en el promotor de *lin-35*. Esto tiene como resultado que LIN-35 se exprese y pueda reprimir al gen *ced-9*, aumentando así la apoptosis en ayuno. Por otro lado en un fondo mutante cuando el factor DAF-16 no está presente, la expresión de *lin-35* disminuye. Posiblemente esto conduce a la disminución en el nivel de proteína de LIN-35 y de esta manera el gen *ced-9* no sea completamente reprimido evitando así la inducción de apoptosis en el ayuno. Debido a que no se realizaron los experimentos de los demás factores transcripcionales aun no sabemos si, estos factores estén regulando la expresión de *lin-35*, o si regulan la apoptosis

inducida por ayuno a otro nivel. Sin embargo, es posible que estos factores estén regulando a *lin-35* a nivel transcripcional, ya que en un fondo mutante *daf-16* no se abate por completo la expresión de *lin-35*, de esta manera sabemos que la expresión en el ayuno de *lin-35* depende de más de un factor transcripcional.

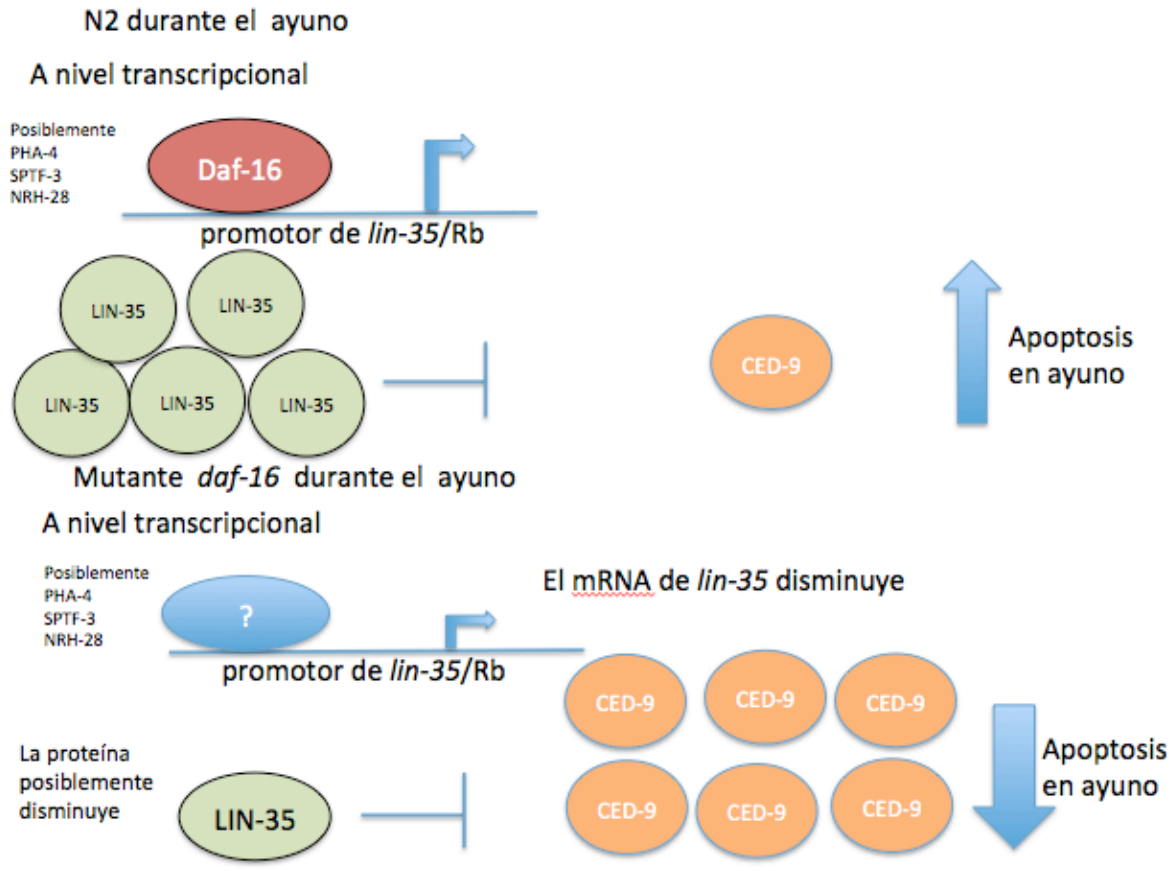


Figura 18.- Esquema del modelo propuesto sobre la apoptosis en ayuno. En una cepa N2 (silvestre) durante el ayuno, DAF-16 se internaliza al núcleo y activa la expresión de *lin-35*, (esta regulación se propone que es directa). Esto tiene como consecuencia que el mRNA de *lin-35* se acumule en el ayuno y esto conlleva a una traducción de la proteína LIN-35 que inhibe a *ced-9* y da como resultado un aumento en la apoptosis en esta condición. En una mutante *daf-16/FOXO*, el transcrito de *lin-35* no aumenta sus niveles, lo que puede tener como consecuencia la disminución de la proteína y por tanto una disminución en la apoptosis inducida por ayuno.

Aunque en este trabajo sólo se analizó la expresión de *lin-35* en el fondo mutante *daf-16*, aún falta realizar experimentos para poder entender si el silenciamiento de los factores transcripcionales SPTF-3, NHR-28, ATF-2 y PHA-4 activan o reprimen la expresión de *lin-35*.

8.- Conclusiones:

Los factor transcripcionales SKN-1/Nrf-2 y ATF-7 no participan en la apoptosis inducida por ayuno.

Los factores transcripcionales NHR-28, SPTF-3, DAF-16, PHA-4 y ATF-2 son necesarios para inducir apoptosis durante el ayuno.

La expresión de *lin-35* disminuye en una mutante *daf-16* en condiciones de ayuno.

Los factores transcripcionales ATF-2, PHA-4 y DAF-16 regulan la apoptosis fisiológica.

La apoptosis fisiológica elevada en los animales RNAi para *pha-4* es parcialmente regulada por *cep-1*.

9.-Perspectivas

Como perspectivas de este trabajo se propone estudiar la expresión de *lin-35* en los fondos silenciados o cuando sea posible en fondos mutantes *pha-4*, *sptf-3*, *atf-2* y *nhr-28*, los cuales son candidatos importantes para regular al gen *lin-35*.

Realizar una construcción reportera, para comprobar si la región promotora que se sugiere en este trabajo controla la expresión de *lin-35* en el ayuno .

Mutar los sitios de unión de los factores transcripcionales que disminuyan la expresión de *lin-35* y observar si la apoptosis inducida por ayuno en estas mutantes son similares al los fondos RNAi.

Estudiar cómo la ausencia de ATF-2, PHA-4 y DAF-16 regula la apoptosis fisiológica.

10.- Referencias:

Adamo, A., Woglar A. , Silva N., A. Penkner, V. Jantsch, and A. La Volpe. 2012. Transgene-mediated cosuppression and RNA interference enhance germ-line apoptosis in *Caenorhabditis elegans*. P.N.A.S. 19: 3440–3445

Altun, Z. F. And Hall, D. H. 2005. Handbook of *C. elegans* hermaphrodite anatomy. In Worm Atlas.

An J.H. And K. Blackwell, 2003. SKN-1 links *C. elegans* mesendodermal specification to a conserved oxidative stress response. GENES & DEVELOPMENT 17:1882–1893

Andux, S., R. E. Ellis, 2008. Apoptosis Maintains Oocyte Quality in Aging *Caenorhabditis elegans* Females. PLoS Genetics 4:12: e1000295

Angelo, G., and Van Gilst, M. R. 2009. Starvation Protects Germline Stem Cells and Extends Reproductive Longevity in *C. elegans*. *Science*. 326: 954-958

Araya C. L., T. Kawli, A. Kundaje, L. Jiang, B. Wu, D. Vafeados, R. Terrell, P. Weissdepp, L. Gevirtzman³, D. Mace, W. Niu, A. P. Boyle, D. Xie¹, L. Ma, J. I. Murray, V. Reinke, R. H. Waterston³ and M. Snyder. 2014. Regulatory analysis of the *C. elegans* genome with spatiotemporal resolution N A T U R E . 512.

Arda H E., S. Taubert, L. T MacNeil, C.C. Conine, B. Tsuda¹, M. Van Gilst, R. Sequerra, L. Doucette-Stamm, K. R Yamamoto and A. JM Walhout,. 2010. Functional modularity of nuclear hormone receptors in a *Caenorhabditis elegans* metabolic gene regulatory network. Molecular Systems Biology 6:367

Ao W., J. Gaudet, W. J. Kent, S. Muttumu, S. E. Mango. 2004. Environmentally Induced Foregut Remodeling by PHA-4/FoxA and DAF-12/NHR. *Science*. 305, Issue 5691, pp. 1743-1746.

Apfeld J., G. O'Connor, T. McDonagh, P. S. DiStefano, and R. Curtis. 2004. The AMP-activated protein kinase AAK-2 links energy levels and insulin-like signals to lifespan in *C. elegans*. GENES & DEVELOPMENT. 18:3004–3009

Azzaria M., B. Goszczynski, M. A. Chung, J. M. Kalb, and J. D. McGhee 1996. A fork head/HNF-3 Homolog Expressed in the Pharynx and Intestine of the *Caenorhabditis elegans* Embryo. DEVELOPMENTAL BIOLOGY 178, 289–303

Balakrishnan, L., and Milavetz, B. 2010. Decoding the histone H4 lysine 20 methylation mark. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 45, 440-452.

Bass J. I., A. M. Tamburino, A. Mori, N. Beittel, M. T. Weirauch, J. S. Reece-Hoyes and J. M. Walhout 2014. Transcription factor binding to *Caenorhabditis elegans* first introns reveals lack of redundancy with gene promoters. Nucleic Acids Research, 2014, Vol. 42, No. 1 153–162.

Baum J.S ., Goerge J.P St. And McCall, K. 2005. Programmed death cell in the germline. Seminar in Cell & Developmental Biology. 16:245-259.

Bender AM, Wells O, Fay DS. 2004. *lin-35/Rb* and *xnp-1/ATR-X* function redundantly to control somatic gonad development in *C. elegans*. Dev Biol 273: 335–349.

Berger S.L. 2010. Cell signaling and transcriptional regulation via histone phosphorylation. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 75, 23-26

Biggs WH, III, Meisenhelder J, Hunter T, Cavenee WK, Arden KC. Protein kinase B/Akt-mediated phosphorylation promotes nuclear exclusion of the winged helix transcription factor FKHR1. *Proc Natl Acad Sci.* 1999; 96: 7421–7426.

Bird D. M. and D. L. Riddle. 1989. Molecular Cloning and Sequencing of *ama-I*, the Gene Encoding the Largest Subunit of *Caenorhabditis elegans* RNA Polymerase II. *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY*, Oct. 1989, p. 4119-4130

Bornstein P., J. McKay, J. K. Morishima, S. Devarayalu, and R. E. Gelinas. 1987. Regulatory elements in the first intron contribute to transcriptional control of the human *α1(I)* collagen gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. Vol. 84*, pp. 8869-8873.

Boxem M., and S. V. Huevel, 2001. *lin-35* Rb and *cki-1* Cip/Kip cooperate in developmental regulation of G1 progression in *C. elegans*. *Development* 128, 4349-4359.

Brodigan, T.M., Liu, J., Park, M., Kipreos, E.T., and Krause, M. 2003. Cyclin E expression during development in *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* 254, 102-115.

Brunet A, Sweeney LB, Sturgill JF, Chua KF, Greer PL, Lin Y. 2004c. Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science.*; 303:2011–2015.

Ceron J., Jean-François R, A. Chandra, D. Dupuy, M. Vidal and S. van den Heuvel 2007. Large-scale RNAi screens identify novel genes that interact with the *C. elegans* retinoblastoma pathway as well as splicing-related components with synMuv B activity. *BMC Developmental Biology* 2007, 7:30

Chen, K., and Rajewsky, N. 2007. The evolution of gene regulation by transcription factors and microRNAs. *Nat. Rev. Genet.* 8, 93-103.

Chen, P.L., Scully, P., Shew, J.Y., Wang, J.Y., and Lee, W.H. 1989. Phosphorylation of the retinoblastoma gene product is modulated during the cell cycle and cellular differentiation. *Cell* 58: 1193–1198.

Chen D., and D.L. Riddle, 2008. Function of the PHA-4/FOXA transcription factor during *C. elegans* post-embryonic development. *BMC Developmental Biology* 2008, 8:26

Chesney MA, Kidd AR, and Kimble J. 2006. *gon-14* functions with class B and class C synthetic multivulva genes to control larval growth in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics.* 2006;172:915–928.

Chow K. N. B. and D. C. Dean. 1996. Domains A and B in the Rb Pocket Interact To Form a Transcriptional Repressor Motif. *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY*, Sept. 1996, p. 4862–4868

Cirillo L, Lin FR, Cuesta I, Jarnik M, Friedman D, Zaret K 2002. Opening of compacted chromatin by early developmental transcription factors HNF3 (FOXA) and GATA-4. *Mol Cell* 9: 279–289

Church DL, Guan KL, Lambie EJ. 1995 Three genes of the MAP kinase cascade, *mek-2*, *mpk-1*/*sur-1* and *let-60* *ras*, are required for meiotic cell cycle progression in *Caenorhabditis elegans*. *Development.* 1995 Aug;121(8):2525-35.

Clark KL, Halay ED, Lai E, Burley SK 1993. Co-crystal structure of the HNF3/*fork head* DNA recognition motif resembles histone H5. *Nature* 364: 412–420

Cui, M., D.S Fay, and M. Han. 2004. *lin-35/Rb* Cooperates With the SWI/SNF Complex to Control *Caenorhabditis elegans* Larval Development. *Genetics* 167: 1177–1185.

Darland-Ransom, M., Wu, Y.-C., and Xue, D. 2009. Programmed cell death in *C. elegans*. in *Essentials of Apoptosis*. (Yin, X.-M., and Dong, Z. eds.), 2nd. Ed., Humana Press., New York, NY. pp 355-373.

Daitoku, H., J. Sakamaki, and A. Fukamizu. 2011. Regulation of FoxO transcription factors by acetylation and protein–protein interactions. *Biochimica et Biophysica Acta* 1813. 1954–1960.

Dernburg A.F. J. Zalevsky, M. P. Colaiácovo, and A.M. Villeneuve 2000. Transgene-mediated cosuppression in the *C. elegans* germ line. *GENES & DEVELOPMENT* 14:1578–1583

Dijkers PF, Medema RH, Lammers JW, Koenderman L, Coffey PJ. Expression of the pro-apoptotic Bcl-2 family member Bim is regulated by the forkhead transcription factor FKHR-L1. *Curr Biol.* 2000 Oct 5;10(19):1201-4.

Drummond-Barbosa D. and A. C. Spradling, 2001. Stem Cells and Their Progeny Respond to Nutritional Changes during *Drosophila* Oogenesis. *Developmental Biology* 231, 265–278

Ermolaeva M.A, Dakhovnik A, and B. Schumacher. 2015. Quality control mechanisms in cellular and systemic DNA damage responses *Ageing Res. Rev.* 23: 3-11.

Fay DS, Qiu X, Large E, Smith CP, Mango S, Johanson BL.2004 The coordinate regulation of pharyngeal development in *C. elegans* by *lin-35/Rb pha-1* and *unc-18*. *Dev Biol.* 2004;271:11–25.

Fu Z., and DJ Tindal., 2008. FOXOs, cancer and regulation of apoptosis. *Oncogene* 27, 2312–2319

Fukuoka M, Daitoku H, Hatta M, Matsuzaki H, Umemura S, Fukamizu A. 2003. Negative regulation of forkhead transcription factor AFX (Foxo4) by CBP-induced acetylation. *Int J Mol Med.* ;12:503–508.

Friedman J.R., and K.H. Kaestner 2006. The Foxa family of transcription factors in development and metabolism. *Cell. Mol. Life Sci.* 63. 2317–2328.

Gartner A., S. Milstein, S. Ahmed, J. Hodgkin, and M. O. Hengartner. 2000. A Conserved Checkpoint Pathway Mediates DNA Damage–Induced Apoptosis and Cell Cycle Arrest in *C. elegans*. *Molecular Cell*, Vol. 5, 435–443

Gartner, 2008

Gaudet, J., and Mango, S.E. 2002. Regulation of organogenesis by the *Caenorhabditis elegans* FoxA protein PHA-4. *Science* 295, 821-825.

Greer, E.L., Mures, T.J., Hauswirth, A.G., Green, E.M., Leeman, D.S., Maro, G.S., Han, S., Banko, M.R., Gozani, O., and Brunet, A. 2010. Members of the H3K4 trimethylation complex regulate lifespan in a germline-dependent manner in *C. elegans*. *Nature* 466, 383-387.

Grishkevich, V., Hashimshony, T., and Yanai, I. 2011. Core promoter T-blocks correlate with gene expression levels in *C. elegans*. *Genome Res.* 21, 707-717.

Gumienny, T. L., Lambie, E., Hartweg, E., *et al.* 1999. Genetic control of programmed cell death in the *Caenorhabditis elegans* hermaphrodite germline. *Development* 126, 1011-1022.

Hai T. 2006. The ATF transcription factors in cellular adaptive responses. In: Ma J, editor. Gene Expression and Regulation. Higher Education Press; Beijing,China: Springer; New York, USA: pp. 322–333.

Hai T. and Curran T. 1991. Cross-family dimerization of transcription factors Fos/Jun and ATF/CREB alters DNA binding specificity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 88, pp. 3720-3724.

Harbour J.W. and D.C Dean, 2000. The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. GENES & DEVELOPMENT 14:2393–2409

Harbour J.W. and D.C Dean, 2000 Rb function in cell-cycle regulation and apoptosis. NATURE CELL BIOLOGY VOL 2

Heintzman N.D. & Ren, B. 2007 The gateway to transcription: identifying, characterizing and understanding promoters in the eukaryotic genome. Cell. Mol. Life Sci. 64: 386. doi:10.1007/s00018-006-6295-0

Henderson S.T., and T. E. Johnson, 2001 daf-16 integrates developmental and environmental inputs to mediate aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*. Current Biology 2001, 11:1975–1980

Hesp K, G. Smant, J. E. Kammenga. 2015. *Caenorhabditis elegans* DAF-16/FOXO transcription factor and its mammalian homologs associate with age-related disease. Experimental Gerontology 72:1–7.

Hirose T, and H. R. Horvitz, 2013. An Sp1 transcription factor coordinates caspase-dependent and -independent apoptotic pathways. Nature . 500 (7462): 354–358

Holmqvist P-H, Belikov S, Zaret KS, Wrangé Ö. 2005. FoxA1 binding to the MMTV LTR modulates chromatin structure and transcription. Exp Cell Res 304: 593–603

Horner M. A. Horner, S. Quintin, M. E. Domeier, J. Kimble, M. Labouesse, and S. E. Mango. 1998. pha-4, an HNF-3 homolog, specifies pharyngeal organ identity in *Caenorhabditis elegans*. GENES & DEVELOPMENT 12:1947–1952

Hubbard, E. J. A. and D. Greenstein. 2000 The *Caenorhabditis elegans* gonad: a test tube for cell and developmental biology. Developmental Dynamics. 218:p.2-22.

Kaufmann, E. and Knöchel, W. 1996. Five years on the wings of fork head. Mech. Dev. 57, 3-20.

H. Kawasaki, L. Schiltz, R. Chiu, K. Itakura k, K. Taira ., Y. Nakatani and K. K. Yokoyama.2000. ATF-2 has intrinsic histone acetyltransferase activity which is modulated by phosphorylation. NATURE . VOL 405 11:195-199.

Kerhienko N.V., J. D. K. McEnerney, and D. S. Fay, 2008. Coordinated Regulation of Intestinal Functions in *C. elegans* by LIN-35/Rb and SLR-2 PLoS Genetics Vol. 4 e1000059

Kim, S.K., 2001. [HTTP://C.elegans:miningthefunctional](http://C.elegans:miningthefunctional) genomic landscape. Nat Rev Genet .2:p.681-689.

Kritikou A. S. Milstein, PO Vidalain, G. Lettre, E. Bogan, K. Doukometzidis, P. Gray, T. G. Chappell, M. Vidal, and M. O. Hengartner, 2006 *C. elegans* GLA-3 is a novel component of the MAP kinase MPK-1 signaling pathway required for germ cell survival. Genes Dev. 2006 Aug 15; 20(16): 2279–2292.

- Kaestner KH, Katz J, Liu Y, Drucker DJ, Schutz G. 1999. Inactivation of the winged helix transcription factor HNF3 α affects glucose homeostasis and islet glucagon gene expression in vivo. *Genes Dev* 13: 495–504.
- Lantz KA, Vatamaniuk MZ, Brestelli JE, Friedman JR, Matschinsky FM, Kaestner KH. 2004. Foxa2 regulates multiple pathways of insulin secretion. *J Clin Invest* 114: 512–520.
- Lascarez-Lagunas, LI, Silva-García, CG., Dinkova, T. D., and Navarro, R. E. 2014. LIN-35/Rb Causes Starvation-Induced Germ Cell Apoptosis via CED-9/Bcl2 Downregulation in *Caenorhabditis elegans* *Mol. Cell. Biol.* 34, 2499-2516.
- Leacock SW, Reinke V. 2006. Expression Profiling of MAP Kinase–Mediated Meiotic Progression in *Caenorhabditis elegans*. *PLOS Genetics* 2(11): e174
- Lee CS, Friedman JR, Fulmer JT, Kaestner KH. The initiation of liver development is dependent on Foxa transcription factors. *Nature* 435: 944–947, 2005
- Lehner B., A. Calixto, C. Crombie, J. Tischler, A. Fortunato, M. Chalfie and A G Fraser, 2006. Loss of LIN-35, the *Caenorhabditis elegans* ortholog of the tumor suppressor p105Rb, results in enhanced RNA interference. *Genome Biology* 2006, 7:R4
- Lettre, G. and M. O. Hengartner. 2006. Developmental apoptosis in *C. elegans*: a complex CEDnario. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* .7(2):p.97-108.
- Levine, M., and Tjian, R. 2003. Transcription regulation and animal diversity. *Nature* 424, 147-151.
- Li J., M. Tewari, M. Vidal, and S. S. Lee 2006. The 14-3-3 protein FTT-2 regulates DAF-16 in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol.* 2007 January 1; 301(1): 82–91.
- Lin K, Hsin H, Libina N, Kenyon C. 2001. Regulation of the *Caenorhabditis elegans* longevity protein DAF-16 by insulin/IGF-1 and germline signaling. *Nat. Genet.* 28, 139–145.
- Livak K.J., and T.D. Schmittgen, 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2⁻DDCT Method. *METHODS* 25, 402–408
- Luo L. M. Hannemann, S. Koenig, J. Hegermann, M. Ailion, M.K. Cho, N. Sasidharan, M. Zweckstetter, S. A. Rensing, and S. Eimer 2011 . The *Caenorhabditis elegans* GARP complex contains the conserved Vps51 subunit and is required to maintain lysosomal morphology. *Molecular Biology of the Cell* 22: 2465-2578.
- Ma Q, X. Li, D. Vale-Cruz, M. L. B. Beier, P LuValle. 2007. Activating transcription factor 2 controls Bcl-2 promoter activity in growth plate chondrocytes. *J Cell Biochem* 101 (2), 477-487.
- Mango S.E., E. J. Lambie and J. Kimble, 1994. The pha-4 gene is required to generate the pharyngeal primordium of *Caenorhabditis elegans*. *Development* 120, 3019-3031
- Matsuda, S., Maekawa, T., and Ishii, S. 1991. Identification of the functional domains of the transcriptional regulator CRE-BP1. *J. Biol. Chem.* 266, 18188-18193.
- Montgomery, G., P. A. Hamel, Z. Jiang, E. Zacksenhaus, B. Gallie, and R. A. Phillips 1994. Characterization of the Human RB1 Promoter and of Elements Involved in Transcriptional regulation. *Cell Growth and Differentiation*. Vol 5. 467-470.
- Murphy CT, McCarroll A, Bargmann I, Fraser A, Kamath R, Ahringer J, Kenyon HL, yon C. 2003. Genes that act downstream of DAF-16 to influence the life span of *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 424: 277-283

Ogg S, Paradis S, Gottlieb S, Patterson GI, Lee L, Tissenbaum HA, Ruvkun G 1997. The Fork head transcription factor DAF-16 transduces insulin-like metabolic and longevity signals in *C. elegans*. *Nature* 389: 994-999

Panowski Siler H. S. Wolff, H. Aguilaniu, J. Durieux and A. Dillin. 2007. PHA-4/Foxa mediates diet-restriction-induced longevity of *C. elegans*. *Vol 447* : 550-555

Phatnani H.P., A.L. Greenleaf. 2006 Phosphorylation and functions of the RNA polymerase II CTD, *Genes Dev.* 20. 2922–2936

Park D.H., H. Jia, V. Rajakumar and H. M. Chamberlin., 2006. Pax2/5/8 proteins promote cell survival in *C. elegans*. *Development* 133, 4193-4202 doi:10.1242/dev.02614

Pazdernik N., Schedl T., 2013 Introduction to germ cell development in *Caenorhabditis elegans*. *Adv. Exp. Med. Biol.* 757: 1–16.

Perrin AJ, M Gunda, B Yu1, K Yen, S Ito, S Forster HA Tissenbaum and WB Derry,; 2013. Noncanonical control of *C. elegans* germline apoptosis by the insulin/IGF-1 and Ras/MAPK signaling pathways. *Cell Death and Differentiation.* 20, 97–107

Persengiev S. P. and M. R. Green. 2002. The role of ATF/CREB family members in cell growth, survival and apoptosis. *Apoptosis* . Vol 8 . No 3. 225–228

Qin, X.Q., Chittenden, T., Livingston, D.M., and Kaelin, Jr., W.G. 1992. Identification of a growth suppression domain within the retinoblastoma gene product. *Genes & Dev.* 6: 953–964.

Ramaswamy S, Nakamura N, Sansal I, Bergeron L, Sellers WR. A novel mechanism of gene regulation and tumor suppression by the transcription factor FKHR. *Cancer Cell.* 2002;2:81–91.

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.

Reinke, V., M. Krause, and P. Okkema. 2013 Transcriptional Regulation of Gene Expression in *C. elegans*. *WormBook*. ; : 1–34. doi:10.1895/wormbook.1.45.2

Salinas, L. S., E. Maldonado, and R.E. Navarro. 2006. Stress induced germ cell apoptosis by a p53 independent pathway in *Caenorhabditis elegans*. *Cell Death and Differentiation.* 13 (12) :p.2129-2139.

Schertel C. and B. Conradt, 2007. *C. elegans* orthologs of components of the RB tumor suppressor complex have distinct pro-apoptotic functions. *Development* 134, 3691-3701

Schumacher, B. K. Hofmann, S. Boulton and A. Gartner 2001. The *C. elegans* homolog of the p53 tumor suppressor is required for DNA damage-induced apoptosis. *Current Biology* 2001, 11:1722–1727.

Schumacher, B., Schertel, C., Wittenburg, N., *et al.* 2005. *C. elegans* ced-13 can promote apoptosis and is induced in response to DNA damage. *Cell Death and Differentiation* 12, 153-161.

Sherr, C.J. 1996. Cancer cell cycles. *Science* 274: 1672–1677.

Shivers R. P., D. J. Pagano., T. Kooistra, C. E. Richardson, K. C. Reddy, J. K. Whitney, O. Kamanzi, K. Matsumoto, N. Hisamoto, D. H. Kim, 2010. Phosphorylation of the Conserved Transcription Factor ATF-7 by PMK-1 p38 MAPK Regulates Innate Immunity in *Caenorhabditis*

elegans. PLoS Genetics Volume 6 Issue 4. e1000892

Stergiou L and MO Hengartner, 2004; Death and more: DNA damage response pathways in the nematode *C. elegans*. *Cell Death and Differentiation* 11, 21–28

Sulston J. E and R.H. Horvitz. 1977. Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology* 56, 110-156.

Schaeper N.D., N.-M. Prpic, E.A. Wimmer. 2010. A clustered set of three Sp-family genes is ancestral in the Metazoa: evidence from sequence analysis, protein domain structure, developmental expression patterns and chromosomal location *BMC Evolutionary Biology*, 10, p. 88

Sullivan-Brown J. L, P. Tandon, K E. Bird, D. J. Dickinson, S. C. Tintori, J K. Heppert, J. H. Meserve, K. P. Trogden, Sara K. Orlowski, F. L. Conlon, and Bob Goldstein. 2015 Identifying Regulators of Morphogenesis Common to Vertebrate Neural Tube Closure and *Caenorhabditis elegans* Gastrulation. *Genetics*. 2016 Jan; 202(1): 123–139.

Stimpson, K.M., and Sullivan, B.A. 2010. Epigenomics of centromere assembly and function. *Curr. Opin. Cell Biol.* 22, 772-280.

Shen W, Searce LM, Brestelli JE, Sund NJ, Kaestner KH. Foxa3 (hepatocyte nuclear factor 3gamma) is required for the regulation of hepatic GLUT2 expression and the maintenance of glucose homeostasis during a prolonged fast. *J Biol Chem* 276: 42812–42817, 2001.

Sulston, J. E., Schierenberg, E., White, G., and Thomson, J. N. 1983. The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans* *Developmental Biology* 100, 64-119.

Talluri S. and F.A. Dick 2012. Regulation of transcription and chromatin structure by pRB: Here, there and everywhere. *Cell Cycle* 11:17, 3189-3198

Tatar M., Bartke, A., and Antebi, A. 2003. The endocrine regulation of aging by insulin-like signals. *Science* 299: 1346–1351

Troemel ER, Chu SW, Reinke V, Lee SS, Ausubel FM, et al. 2006. p38 MAPK Regulates Expression of Immune Response Genes and Contributes to Longevity in *C. elegans*. *PLOS Genetics* 2(11): e183.

Tilly, J. L. 2001. Commuting the death sentence: how oocyte strive to survive. *Nature Reviews, Molecular Cell Biology*. 2: 838:848

Tullet J. M. A., 2015DAF-16 target identification in *C. elegans*: past, present and future. *Biogerontology* 16:221–234

Van der heiden L. P., M. F. M. Hoekman and M. P. Smidt, 2004. The ins and outs of FoxO shuttling: mechanisms of FoxO translocation and transcriptional regulation. *Biochem. J.* 380, 297–309.

Van der Horst A, Tertoolen LG, de Vries-Smits LM, Frye RA, Medema RH, Burgering BM. 2004 FOXO4 is acetylated upon peroxide stress and deacetylated by the longevity protein hSir2 (SIRT1) *J Biol Chem*. 279:28873–2887

Vilimas, T, A. Abraham, and P. G. Okkema. 2004. An early pharyngeal muscle enhancer from the *Caenorhabditis elegans* *ceh-22* gene is targeted by the Forkhead factor PHA-4. *Developmental Biology* 266 (2004) 388– 398.

Vogel, C., and Chothia, C. 2006. Protein family expansions and biological complexity. *PLoS Comput. Biol.* 2, e48.

Walker, A.K., Shi, Y., and Blackwell, T.K. 2004. An extensive requirement for transcription factor IID-specific TAF-1 in *Caenorhabditis elegans* embryonic transcription. *J. Biol. Chem.* 279, 15339-15347

Wang D., S. Kennedy, Conte Jr D., J.K. Kim, H. W. Gabel, R. S. Kamath, C. Mello and Gary Ruvkun, 2005. Somatic misexpression of germline P granules and enhanced RNA interference in retinoblastoma pathway mutants. *Nature*. Vol 436 28. 593-597.

Wang X., H. Jia and H. M. Chamberlin. 2006. The bZip proteins CES-2 and ATF-2 alter the timing of transcription for a cell-specific target gene in *C. elegans* *Developmental Biology* 289 (2006) 456 – 465.

Whittle, C. M., K. N. McClinic, S. Ercan, X. Zhang, R. D. Green, W.G. Kelly, J. D. Lieb 2008. The Genomic Distribution and Function of Histone Variant HTZ-1 during *C. elegans* Embryogenesis. *PLoS Genetics* Vol. 4 (9) e1000187

Wolfum C., Asilmaz E, Luca E, Friedman JM, Stoffel M. 2004. Foxa2 regulates lipid metabolism and ketogenesis in the liver during fasting and in diabetes *Nature*. 23;432(7020):1027-32.

Wolfum C., D. Q. Shih, S. Kuwajima, A. W. Norris, C. Ronald Kahn, and M. Stoffel. 2003 Role of Foxa-2 in adipocyte metabolism and differentiation. *The Journal of Clinical Investigation*. Volume 112. 3 345-356.

Wood, W.B. 1998. The nematode *Caenorhabditis elegans*. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory. Pp. 667.

Zhang L. N. E. Rubins, R. S. Ahima, L. E. Greenbaum, and K. H. Kaestner. 2005. Foxa2 integrates the transcriptional response of the hepatocyte to fasting. *CELL METABOLISM : VOL. 2* 141-148 pp

Zhao, J., Cao, Y., Zhao, C., Postlethwait, J. & Meng, A. 2002. An SP1-like transcription factor Spr2 acts downstream of Fgf signaling to mediate mesoderm induction. *EMBO J.* 22, 6078–6088.

Zhong, M., Niu, W., Lu, Z.J., Sarov, M., Murray, J.L., Janette, J., Raha, D., Sheaffer, K.L., Lam, H.Y., Preston, E., et al. 2010. Genome-wide identification of binding sites defines distinct functions for *Caenorhabditis elegans* PHA-4/FOXA in development and environmental response. *PLoS Genet.* 6, e1000848.

Zhou Z., E. Hartwig, and H. R. Horvitz, 2001. CED-1 Is a Transmembrane Receptor that Mediates Cell Corpse Engulfment in *C. elegans*. *Cell*, Vol. 104, 43–56, January 12.

Zhou, K.I., Z. Pincus, and F. J. Slack. 2011. Longevity and stress in *Caenorhabditis elegans*. *AGING*, Vol. 3. No 8