



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**La proteína de unión a RNA GLA-3 participa en la respuesta
al estrés en la gónada del *Caenorhabditis elegans***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

Ángel Armando Dámazo Hernández

DIRECTOR DE TESIS:

Dra. Rosa E. Navarro González

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

HOJA DE DATOS DE JURADO

1. Datos del alumno.
Dámazo
Hernández
Ángel Armando
0445548928653
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
308076422
2. Datos del tutor.
Doctora
Rosa Estela
Navarro
González
3. Datos del sinodal 1
Doctor
Carlos Leonardo
Peraza
Reyes
4. Datos sinodal 2
Doctor
Luis Felipe
Jiménez
García
5. Datos sinodal 3
Doctora
Laura
Kawasaki
Watanabe
6. Datos sinodal 4
Biólogo
Hugo
Rivas
Martínez
7. Datos del trabajo escrito
La proteína de unión a RNA GLA-3 participa en la respuesta al estrés en la gónada del *Caenorhabditis elegans*.
61 p
2017

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 Ángel Armando Dámazo Hernández recibió una beca de la Fundación Miguel Alemán/UNAM para la realización de este trabajo. También recibió una beca para conclusión de estudios del Programa de Apoyo a la Innovación e Investigación Tecnológica (PAPIIT-UNAM) IN207415.

Agradecimientos académicos.

Se agradece a los miembros del jurado Dr. Leonardo Peraza Reyes, Dra. Rosa E. Navarro González, Dr. Luis Felipe Jiménez García, Dra. Laura Kawasaki Watanabe y al Biól. Hugo Rivas Martínez por la revisión del trabajo escrito.

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 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.

Al personal de la Biblioteca "Armando Gómez Puyou" Javier Gallegos Infante y Sandra Moncada Hernández.

Agradecimientos personales.

A mis padres Reynaldo y Nicefora por su apoyo incondicional y su cariño. Estando lejos pero siempre conmigo.

A mis hermanos Gabriel, Reynaldo y Mirta gracias por estar siempre allí cuando los necesito, son unos hermanos ejemplares.

A mi abuela Regina por haber sido un ejemplo de fuerza impresionante.

A la Dra. Rosa por dejarme ser parte de su grupo de trabajo, por su dirección, los consejos, el apoyo que me mostró durante la realización del proyecto, el tiempo que me dedico y la paciencia que me tuvo.

A Sil por haberme enseñado a trabajar en el laboratorio, por enseñarme que con organización todo se puede y por contagiarme de su entusiasmo por la ciencia. También por su cariño, amistad, por los excelentes consejos y estar siempre allí para ayudarme.

A mis amigos de la carrera Elidet, Karen, Laura, Isaac, Gaby, Marisol, Melania y Sahid gracias por su apoyo y por todos esos momentos que hicieron de la carrera algo inolvidable.

A mis compañeros del laboratorio Gaby, Paulette por ayudarme a dar mis primeros pasos en el laboratorio y por hacer de cada protocolo algo divertido y enriquecedor. A Alan por escucharme y darme ánimos cada vez que me sentía perdido, gracias amigo!!!. A Emilio, Daniel y Gisselle por hacer del laboratorio un lugar cálido para trabajar.

ÍNDICE

Nomenclatura y simbología en <i>Caenorhabditis elegans</i>	5
Resumen	7
Introducción	8
El nemátodo <i>Caenorhabditis elegans</i> como modelo de estudio	8
El ciclo de vida de <i>Caenorhabditis elegans</i>	10
La gónada del hermafrodita adulto de <i>Caenorhabditis elegans</i>	11
La maquinaria de apoptosis en <i>Caenorhabditis elegans</i>	14
La muerte de las células germinales.....	16
Los gránulos de RNA o ribonucleoproteínas (RNPs).....	20
Gránulos germinales.....	20
Gránulos de estrés.....	21
Cuerpos de procesamiento.....	22
Tristetraprolina (TTP).....	23
La proteína de unión a RNA GLA-3.....	25
Planteamiento del problema.....	26
Hipótesis.....	25
Objetivo.....	27
Objetivos particulares.....	27
Materiales y métodos	28
Mantenimiento de los animales	28
El amortiguador M9.....	29
Montaje de gusanos para su visualización en el microscopio óptico.....	29
Sincronización de los animales	30
Cruza de la cepa MD701(ced-1::gfp) y WS2974(gla-3(op312))	30

Cuantificación de cuerpos apoptoticos en la gónada.....	33
Detección de gránulos de RNA en la gónada de <i>Caenorhabditis elegans</i>	34
Letalidad embrionaria en condiciones de estrés.....	35
Resultados.....	37
Descripción de los alelos mutantes usados para el estudio de <i>gla-3</i>	37
GLA-3 se requiere para inducir apoptosis en la gónada en condiciones de ayuno y choque de calor.....	39
GLA-3 es indispensable para la formación de gránulos de RNA en la gónada durante el ayuno y el choque de calor.....	42
GLA-3 protege a las células germinales femeninas del choque de calor.....	46
Discusión	50
El papel de GLA-3 en la apoptosis	49
GLA-3 se requiere para formar gránulos de estrés.....	50
GLA-3 protege a las células germinales del estrés.....	51
Conclusiones	52
Perspectivas	54
Bibliografía	55

NOMENCLATURA Y SIMBOLOGÍA EN *C. elegans*

Nombre/Símbolo	Significado
GLA-3	Representación de la proteína.
<i>gla-3</i>	Representación del gen.
<i>gla-3(op216)</i>	Representación del genotipo. Este genotipo tiene el alelo <i>gla-3</i> mutado, fue hecho en el laboratorio “ <i>op</i> ” (de Michael O.Hengartner) y es la mutación 216.
<i>ced-1::gfp</i>	Representación de la fusión transcripcional de la proteína CED-1 con <i>gfp</i> .
RN078	Representación del nombre de la cepa con genotipo <i>gla-3(op312) I;bcls39 V (ced-1::gfp)</i> . RN indica el jefe de grupo (en este caso Rosa Navarro)

RESUMEN

Las células germinales son las precursoras de todas las subsecuentes generaciones en las especies con reproducción sexual, por lo que su formación y desarrollo es altamente monitoreado para asegurar que el material genético y los componentes citoplásmicos se transfieran correctamente de una generación a otra. La gónada de *Caenorhabditis elegans* tiene mecanismos que se encargan de proteger a las células germinales y mantener la fertilidad ante condiciones adversas. Entre las respuestas que se activan para contender con el estrés están un aumento en la apoptosis y la formación de gránulos ribonucleoproteicos. En *C. elegans* GLA-3 es una proteína de unión a RNA que en su ausencia afecta la apoptosis fisiológica. Su homólogo en mamíferos TTP regula negativamente a varios componentes de la respuesta inmune promoviendo el decaimiento de los mRNA y forma parte de componentes ribonucleoproteicos en el citoplasma de las células. Es por eso que en este trabajo indagamos la participación de GLA-3 en la respuesta de la gónada a condiciones de ayuno y choque de calor en el hermafrodita adulto. Encontramos que en animales mutantes con pérdida de función en el gen *gla-3* no aumentan la apoptosis que se induce en condiciones de ayuno y choque de calor que se observa en la cepa silvestre. Además la formación de gránulos de RNA que se da en el centro de la gónada en estas condiciones de estrés no se logra inducir en ausencia de esta proteína. Por último también vimos que después de un choque de calor la fertilidad de los animales mutantes en *gla-3* se ve afectada severamente y no es capaz de recuperarse después de 40 horas como lo hace la cepa silvestre, sugiriendo así un papel protector de GLA-3 en las células germinales femeninas ante el choque de calor.

INTRODUCCIÓN

El *Caenorhabditis elegans* como modelo de estudio.

Caenorhabditis elegans es un organismo de vida libre que habita en el suelo y se distribuye por todo el planeta. Pertenece al *Phylum nematoda* (gusanos redondos) y fue propuesto como modelo experimental por Sydney Brenner en los años sesentas para estudios de desarrollo y sistema nervioso, sin embargo, actualmente muchas disciplinas han adoptado el modelo con éxito [1].

C. elegans posee características que lo hacen un excelente organismo modelo como son: su pequeño tamaño de aproximadamente 1.5 mm de largo en estado adulto que permiten un fácil manejo y mantenimiento en el laboratorio, utilizando la microscopía de Nomarski (contraste de interferencia diferencial o DIC por sus siglas en inglés) su transparencia permite observar las estructuras internas con gran detalle, su rápido ciclo de vida (3 días a 25°C); la constancia en el número de sus células somáticas (eutelia) y la constancia en la posición fija de sus células son de gran utilidad para la identificación de fenotipos mutantes que alteran los linajes celulares durante el desarrollo, ya que se tiene identificado el destino de las células desde la fertilización del ovocito hasta el organismo adulto [1].

C. elegans presenta dimorfismo sexual. El nemátodo consta de una forma masculina (macho) con cromosomas sexuales XO y una forma hermafrodita con cromosomas sexuales XX (Figura 1). El hermafrodita tiene la capacidad de autofecundarse o puede ser fecundado por el macho. Esta capacidad confiere ventajas, antes solo ofrecidas por plantas y levaduras como la obtención de progenie idéntica en los embriones producidos por autofertilización, así como también eliminar, aislar y mantener mutaciones en el genoma y obtener nuevas cepas con características diferentes. La población está compuesta principalmente de hermafroditas, aparecen machos con una frecuencia aproximada de 0.2%

El ciclo de vida de *C. elegans*

El ciclo de vida del nemátodo consta del desarrollo embrionario, cuatro estadios larvarios (L1, L2, L3 y L4) y un estado adulto (Figura 2). La embriogénesis dura aproximadamente 16 horas a 20°C. La embriogénesis puede ocurrir dentro del útero del hermafrodita o fuera de él, ya que el embrión se encuentra cubierto por un cascaron impermeable hecho de quitina que se forma inmediatamente después de la fertilización del ovocito. Los embriones normalmente son retenidos en el útero del hermafrodita hasta que se encuentran en un estado aproximado de 30 células y posteriormente son expulsados. El desarrollo embrionario se divide en dos etapas: la etapa de proliferación y la de organogénesis o también llamada etapa de morfogénesis. La primera incluye la formación del cigoto, las posteriores divisiones celulares llevadas a cabo durante la segmentación y termina con la gastrulación y la formación de las tres capas germinales: el endodermo, mesodermo y ectodermo. En la segunda etapa llamada organogénesis ocurren muy pocas divisiones celulares adicionales, las células terminan de especializarse, el embrión triplica su tamaño y se forma un animal con tejidos y órganos completamente diferenciados [1] [2].

El desarrollo post embrionario de las larvas inicia tres horas después de la eclosión del embrión en presencia de comida. La transición de un estadio larvario a otro se caracteriza por un corto periodo de letargo en el cual el gusano se inmoviliza y tiene un cambio de cutícula (muda) [2].

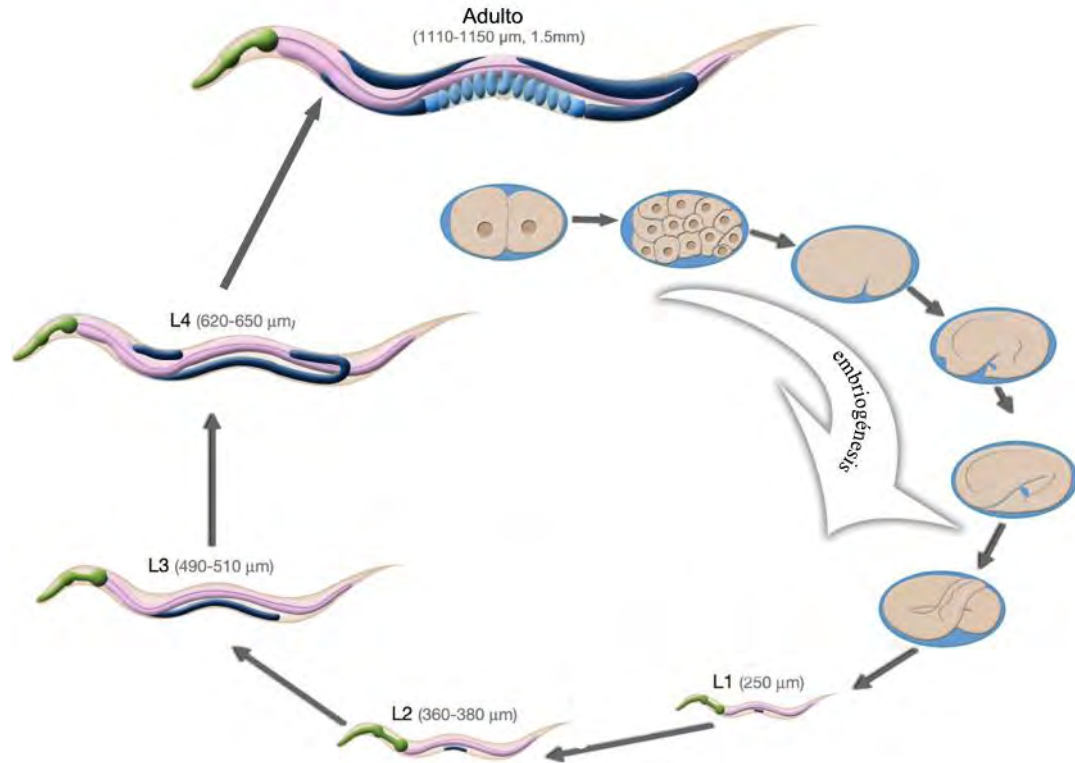


Figura 2. Ciclo de vida de *C. elegans*. El ciclo de vida consta del desarrollo embrionario que aproximadamente dura 14 horas a 20°C seguido por cuatro estadios larvares: larvas L1, L2, L3 y L4, aproximadamente tardan 4 días para llegar a la etapa adulta. El cambio de un estadio larvario a otro está marcado por una muda de cutícula. Entre paréntesis se indica el tamaño aproximado del animal en cada etapa del ciclo. Tomado y modificado de [2].

La gónada del hermafrodita adulto de *C. elegans*

La gónada del hermafrodita está compuesta por dos brazos idénticos en forma de U y está conformada principalmente por las células de la línea germinal y por componentes de origen somático. La célula de la punta distal (DTC por sus siglas en inglés, Distal Tip Cell), el epitelio que recubre a la gónada conocida como la vaina, la espermateca, el útero y la vulva constituyen la gónada somática. Las células germinales envueltas por la vaina se encuentran en cada uno de los brazos de la gónada. Los núcleos que van a originar a los gametos comparten un citoplasma común formando un sincicio. Por convención a la parte más alejada del

útero de cada brazo se le conoce como distal mientras que a la más cercana se le llama proximal (Figura 3) [4].

La reducción en el contenido del material genético en los gametos necesario en las especies de reproducción sexual se lleva a cabo mediante una división celular especializada llamada meiosis que forma parte del proceso de gametogénesis. Esta reducción cromosómica se logra mediante una ronda de replicación del DNA seguida por dos rondas de segregación cromosómica y dos divisiones celulares consecutivas. En el hermafrodita de *C. elegans* los espermatozoides son producidos en el estadio larvario L4 y son almacenados en la espermateca hasta el adulto, etapa en la cual comienza el desarrollo de los ovocitos. La organización espacial de los núcleos para la formación de los ovocitos en la gónada del hermafrodita adulto permite el reconocimiento de los distintos estadios secuenciales de la meiosis. En la parte distal la zona de mitosis o también llamada zona de proliferación, se encuentran los núcleos dividiéndose mitóticamente y constituyen a las células troncales germinales. Conforme estos núcleos se alejan de la DTC comienzan las primeras etapas de la profase I de la meiosis (leptoteno y zigoteno) que caracterizan a la zona de transición donde cada par de cromosomas inicia la recombinación y comienzan la sinapsis. La sinapsis y los eventos de recombinación son completados en la etapa de paquiteno cuando los cromosomas se distribuyen en la periferia nuclear. El proceso de desensamble del complejo sinaptonémico comienza a finales del paquiteno y continúa durante la etapa de diploteno. Por último en diacinesis los seis pares de cromosomas homólogos se encuentran unidos por los quiasmas. Al llegar a esta etapa de la meiosis los ovocitos se encuentran completamente celularizados (completamente rodeados por membrana) en la parte proximal de la gónada. Los ovocitos maduros pasan a la espermateca y son fertilizados por los espermatozoides. Una vez fertilizados son depositados en el útero y comienza el desarrollo embrionario [4] [5][6].

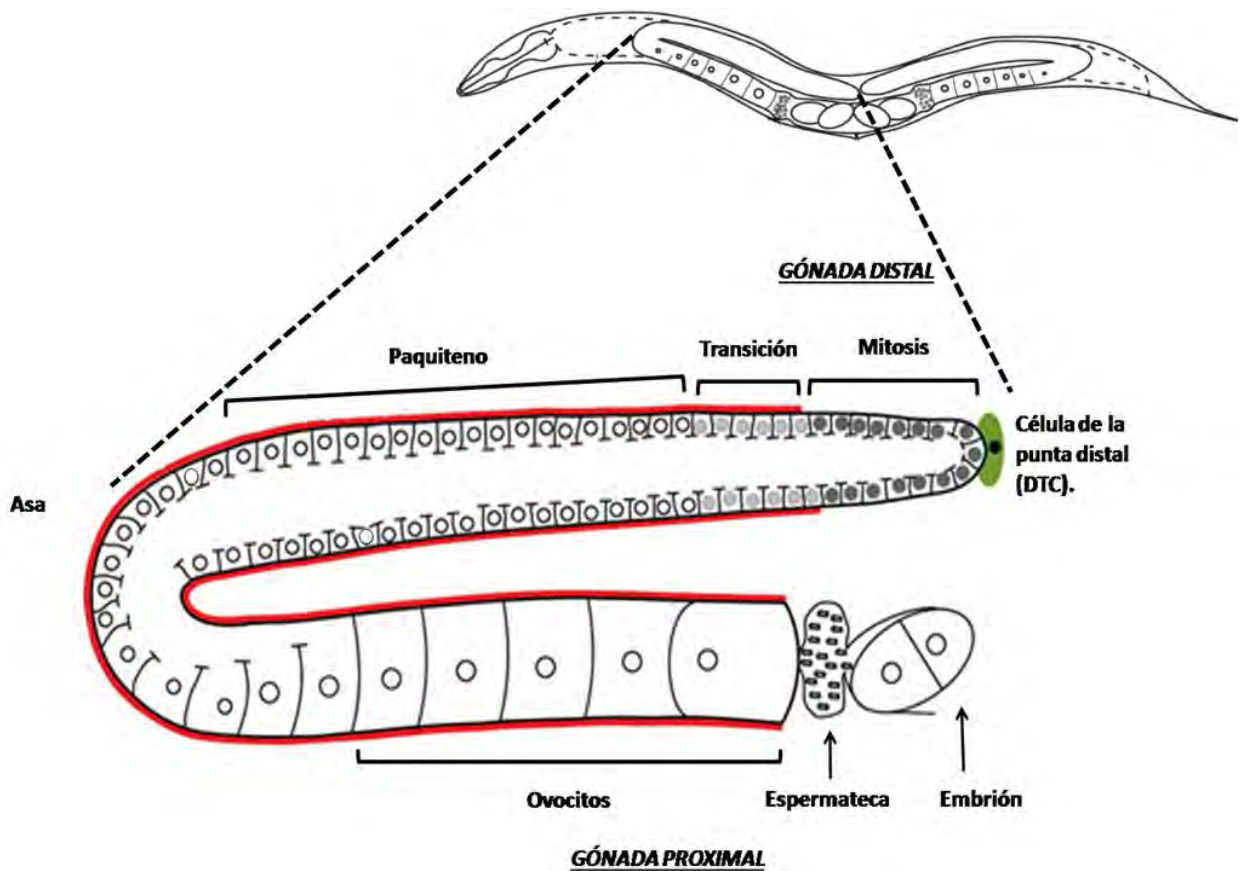


Figura 3. La gónada de *C. elegans*. La gónada consiste en dos brazos en forma de U que convergen en un útero común. Cada brazo de la gónada tiene un extremo distal (más lejano al útero) y uno proximal (más cercano al útero). En el extremo distal se encuentra una célula llamada célula de la punta distal (DTC) que se encarga de mantener el nicho de células germinales troncales. Las células germinales comparten un citoplasma formando un sincicio (por consenso a los núcleos con membranas parciales que van a dar origen a los gametos se les llama células germinales). La vaina es el epitelio que recubre a la gónada y la espermateca el sitio donde se almacenan los espermatozoides producidos en la etapa L4. A lo largo de cada brazo se lleva a cabo el desarrollo y maduración de las células germinales. Una vez terminada la maduración de los ovocitos pasan a la espermateca para ser fertilizados y formar embriones. Tomado y modificado de [10].

La maquinaria de apoptosis en *C. elegans*.

La muerte celular programada de tipo apoptosis está conservada por la evolución en la mayoría de organismos multicelulares. Durante el ciclo de vida del *C. elegans* la apoptosis ocurre dos veces para eliminar células en tejidos somáticos: la primera en el desarrollo embrionario, donde aproximadamente un quinto de las células generadas se eliminan y la segunda en el estadio larvario L2. La tercera vez que se activa este proceso ocurre en las células germinales en la gónada del hermafrodita adulto (Figura 4) [7].

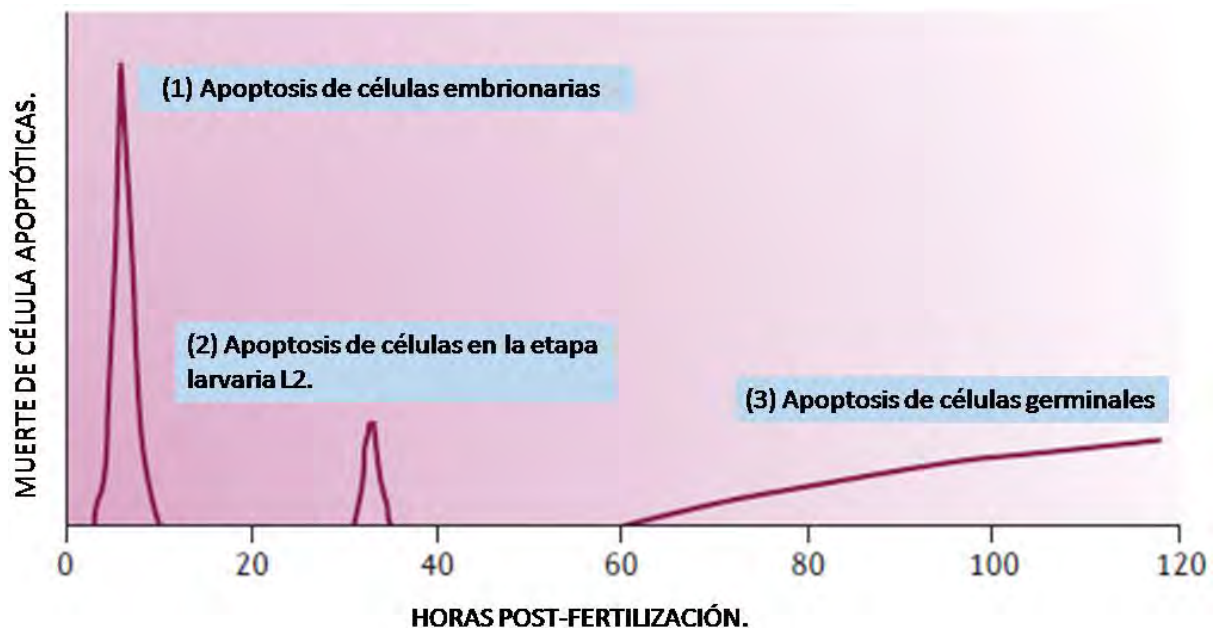


Figura 4. Apoptosis durante el ciclo de vida de *C. elegans*. La primera vez que ocurre la apoptosis en el ciclo de vida del *C. elegans* es durante el desarrollo embrionario aproximadamente de 250 a 450 minutos después de la fertilización donde se eliminan 113 células. La segunda vez ocurre durante el estadio larvario L2 en el cual alrededor de 18 células somáticas caen en apoptosis y por último ocurre en la gónada del hermafrodita adulto donde la apoptosis forma parte del programa de ovogénesis y se estima que aproximadamente mueren el 50% de las células. Tomado y modificado de [7].

La apoptosis en *C. elegans* se lleva a cabo en cuatro pasos que ocurren de manera consecutiva. El primer paso es la decisión de muerte de la célula, el segundo es la activación de la maquinaria de muerte celular en células que están

comprometidas a morir, el tercero es la ejecución del proceso de muerte que también incluye la fragmentación del DNA cromosomal y la fagocitosis de la célula por células vecinas y por último el cuarto paso que consiste en la degradación de la célula fagocitada [7] [8].

La apoptosis en *C. elegans* está regulada por una interacción directa entre los componentes de la maquinaria central: CED-9, CED-4 y CED-3. En la vía apoptótica CED-9 tiene una función antiapoptótica a diferencia de CED-4 y CED-3 que son componentes proapoptóticos [7]. CED-9 es una proteína homóloga a las proteínas de la familia Bcl-2 en mamíferos (linfoma de células B tipo 2), CED-4 es una proteína adaptadora similar a APAF-1 (Factor-1 de Activación de proteasa Apoptótica) y CED-3 es homólogo a proteasas de la familia de las caspasas [10].

En ausencia de algún estímulo que induzca la apoptosis, CED-9, que se encuentra en la superficie externa de la membrana mitocondrial, está unido a dímeros de CED-4 evitando que se libere al citosol y active así a CED-3. En el desarrollo embrionario ante un estímulo se expresa EGL-1, que también es una proteína homóloga a miembros de la familia Bcl-2 que tiene función proapoptótica. EGL-1, interrumpe la interacción entre CED-9 y CED-4 lo que provoca que este último se libere al citosol. En el citosol los dímeros de CED-4 se asocian y forman un tetrámero, el cual recluta a la procaspasa CED-3 para formar el apoptosoma y activar a CED-3 y de esta manera la apoptosis es ejecutada (Figura 5) [7] [8] [9].

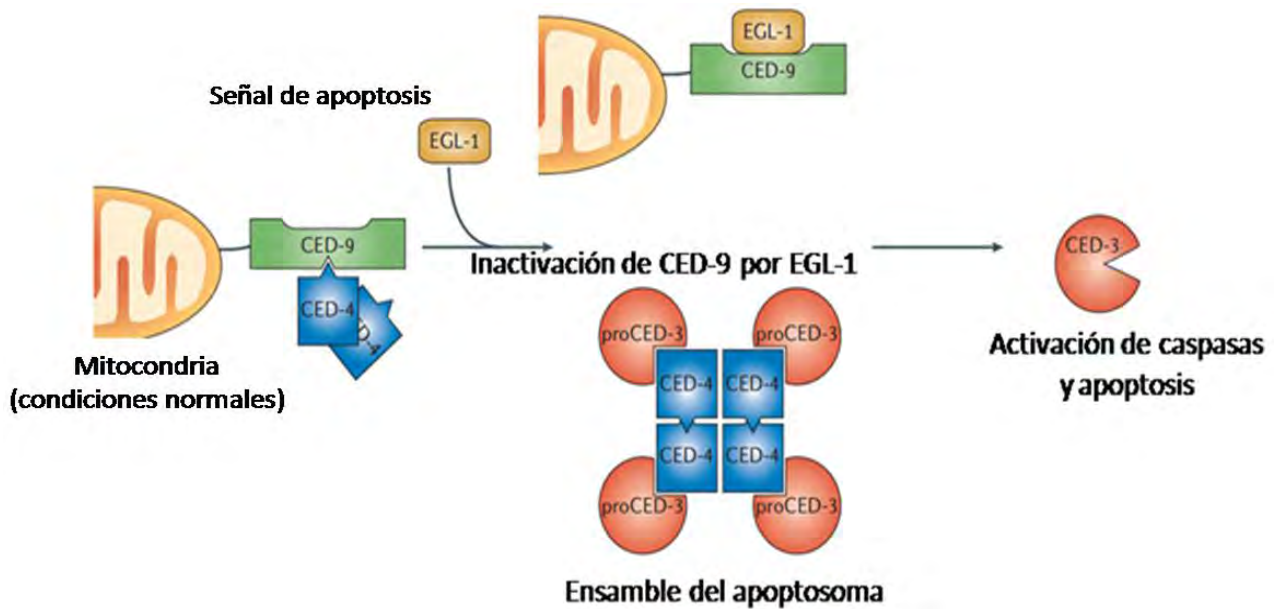


Figura 5. La apoptosis en *C. elegans*. Modelo que muestra el mecanismo de la apoptosis somática en *C. elegans*. En la membrana externa mitocondrial se encuentra la proteína transmembranal CED-9/BCL-2 que mantiene reclutado a CED-4/APAF-1 en forma de dímeros en condiciones normales. Una vez que la célula recibe la señal de muerte, la proteína EGL-1 se une a CED-9 provocándole un cambio conformacional que induce la liberación de CED-4 al citoplasma. Una vez en el citoplasma dos dímeros de CED-4 interaccionan con pro-CED-3/pro-CASPASA y se ensambla el apoptosoma, que por medio de proteólisis activa a CED-3/CASPASA y la apoptosis es iniciada. Tomado y modificado de [7].

La muerte de las células germinales.

La muerte celular programada de tipo apoptosis es un evento común durante el desarrollo de la línea germinal femenina de muchas especies de organismos incluyendo nemátodos, insectos y mamíferos. En los mamíferos este proceso elimina el 99% de los ovocitos en desarrollo [11]. En *C. elegans* la apoptosis en este tejido elimina en un 50% el número de células durante la ovogénesis [5] [8].

La línea germinal de este nemátodo es el único tejido que en la etapa adulta tiene proliferación y es capaz de inducir apoptosis [7] [8]. Esta apoptosis es

conocida como fisiológica y ocurre en condiciones normales como parte del proceso de ovogénesis en el hermafrodita adulto, por lo que solo participa en el desarrollo de los gametos femeninos [12]. Comienza en los adultos jóvenes en cuanto inician la ovogénesis y se incrementa con el tiempo, este proceso está altamente restringido a la región del asa de la gónada donde las células germinales en desarrollo salen del estado de paquíteno de la profase I de la meiosis [12] [13]. Uno de los requerimientos para que las células germinales puedan activar el proceso de muerte es terminar el estado paquíteno, lo cual requiere de la activación de la vía de las MAP kinasas por medio de MPK-1 [11].

Existen distintas hipótesis que explican la manera en que se seleccionan las células que se eliminan en este tejido [13] [11]. La primera es la de los ovocitos defectuosos, en la que se propone que se identifican a los ovocitos que tienen algún defecto como anomalías genéticas, principalmente cromosomas que no lograron hacer sinapsis, y son eliminados por apoptosis permitiendo que los ovocitos saludables completen su maduración correctamente. La segunda hipótesis menciona que los nutrientes y otros factores necesarios para el correcto desarrollo de la línea germinal son escasos, por lo que es necesario que algunas de ellas mueran para que otras cuenten con los recursos para madurar adecuadamente [13] [11].

También se sabe que las células germinales al salir del estado de paquíteno de la profase I de la meiosis en la región del asa de la gónada es donde adquieren sus componentes como proteínas y mRNA esenciales para el crecimiento, desarrollo y maduración de los ovocitos, así como para la embriogénesis temprana. Finalmente otra hipótesis para explicar la apoptosis fisiológica es la de las células nodrizas. Esta sugiere que algunas de las células germinales donan sus componentes para que otras puedan madurar y desarrollarse y una vez concluida su función estas células son eliminadas [10] [13].

Apoptosis de las células germinales en condiciones de estrés

Además de la apoptosis que se da de manera fisiológica en la línea germinal distintas condiciones a la que se exponen los animales inducen apoptosis en este tejido. Se conocen distintas vías que desencadenan la apoptosis activadas por condiciones de estrés específicos, entre ellas están el choque de calor, oxidante y osmótico, que al parecer están regulados por una sola vía, el daño al DNA y la privación de alimento [14][15].

La apoptosis que se induce en condiciones de choque de calor, estrés oxidante y osmótico involucra las proteínas MEK-1 y SEK-1 de la vía de las MAP kinasas (MAPKK, protein kinasas activadas por mitogenos) así como también la proteína ABL-1, la cual en estas condiciones de estrés funciona como factor proapoptótico promoviendo la muerte en la vía de las MAP kinasas. Aunque tiene una función conocida como factor antiapoptótico y regulador negativo de CEP-1/p53 en la vía de daño al DNA esta vía se activa de manera independiente de las proteínas CEP-1/p53 y EGL-1 (Figura 6 B) [15].

La apoptosis inducida por daño al DNA, se da cuando los animales son expuestos a agentes genotóxicos, como lo son la radiación ionizante, radiación UV, agentes alquilantes y también la incorporación errónea de uracilo al DNA [10] [16]. Este tipo de muerte involucra a la maquinaria central de la apoptosis y se activa por CEP-1 (homologo a p53 en mamíferos), que actúan induciendo la transcripción de *egl-1* y *ced-13*. EGL-1 y CED-13 son los ortólogos a las proteínas con dominios BH3 Puma y Noxa en humanos [17] [18]. La activación de *egl-1* y *ced-13* resulta en la apoptosis de las células germinales y no de células somáticas. De manera similar que EGL-1, CED-13 pueden unirse a CED-9 interrumpiendo la interacción que existe entre CED-9 y CED-4 desencadenando así la apoptosis por daño a DNA (Figura 6 C) [17][18].

Por otro lado se ha observado que la privación de alimento también induce apoptosis en las células germinales mediado por un mecanismo diferente que no involucra a CEP-1/p53, MEK-1 y SEK-1 [15]. En esta vía los niveles de expresión de LIN-35/Rb (ortólogo a la proteína de susceptibilidad al retinoblastoma) aumentan provocando que la expresión de *ced-9* disminuya, esta regulación negativa y la disminución en la traducción del mensajero provocan un decaimiento importante en la proteína, lo que implica que CED-4 quede libre de interactuar con CED-3 y desencadenar la apoptosis [19]. En estas condiciones también se expresa de *ced-4* por medio de *dpl-1/DP* que aumenta su expresión en ayuno, ambos hechos promueven la activación de la muerte celular (Figura 6 D) [19].

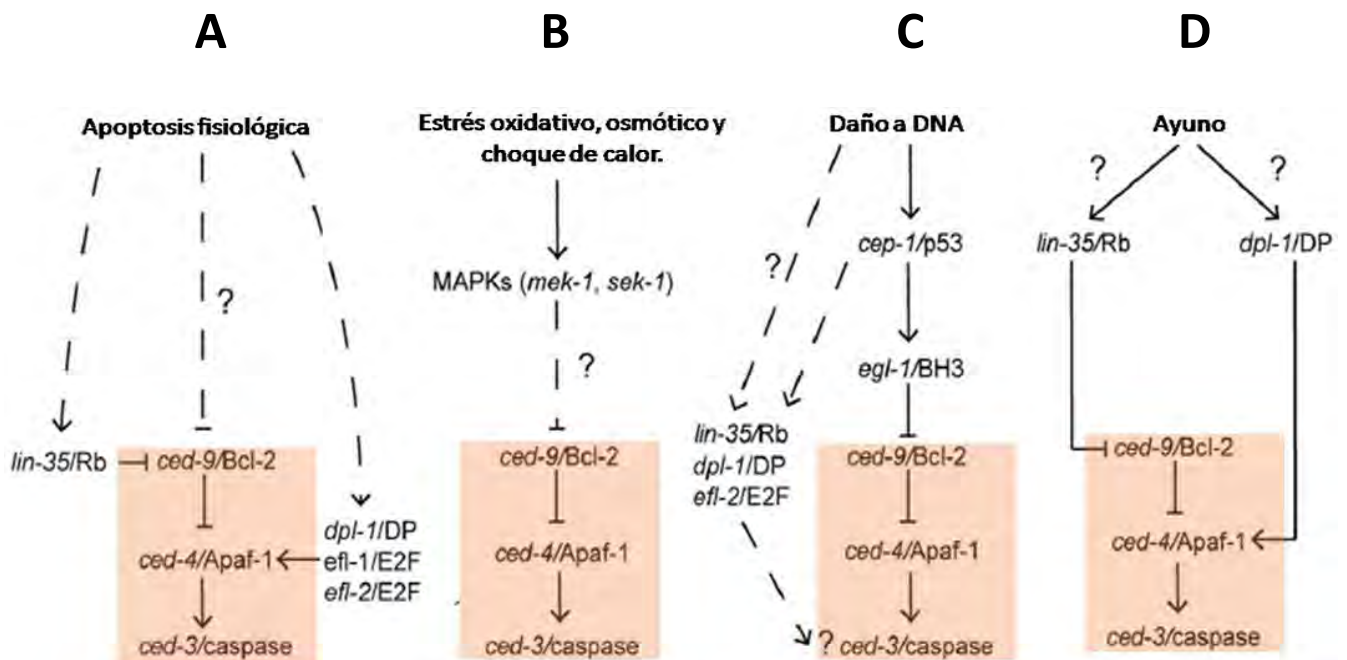


Figura 6. Distintos factores pueden inducir apoptosis en la gónada de *C. elegans*. Además de la apoptosis fisiológica (A), la gónada de *C. elegans* puede activar la apoptosis por distintas vías en respuesta a diferentes condiciones de estrés. Todas las vías convergen en la maquinaria central de la apoptosis (recuadro sombreado). (B) La apoptosis que se da por estrés oxidante, osmótico y choque de calor está regulada por la vía de las MAP kinasas. (C) La que es causada por daño al DNA es dependiente de *cep-1/p53* y *egl-1*, y también intervienen *dpl-1*, *efl-2* y *lin-35* regulando la expresión de blancos desconocidos debajo o en paralelo de *cep-1*. (D) En la apoptosis que se induce por ayuno el gen antiapoptótico *ced-9* está regulado negativamente por *lin-35* potenciando así la función de *ced-4/Apaf-1* y promoviendo así la apoptosis. Tomado y modificado de [19].

Los gránulos de RNA o ribonucleoproteínas (RNPs)

Los gránulos de RNA o gránulos de ribonucleoproteínas (RNPs) son organelos sin membrana electrodenso que se encuentran en el citoplasma celular. Están integrados principalmente por mRNA y proteínas y se pueden compartir componentes entre distintos tipos de gránulos [20]. De manera general entre los componentes proteicos se encuentran: factores de traducción, enzimas de degradación del CAP de los mRNA, helicasas y proteínas de unión a RNA [21]. También se pueden presentar subunidades ribosomales, RNAs pequeños y RNAs no codificantes. Sin embargo, los componentes varían dependiendo del tipo de gránulo. Además funcionalmente los gránulos de RNPs poseen un papel en la regulación postranscripcional de la expresión génica, regulando a distintos RNA mensajeros ya sea almacenándolos y manteniendo su estabilidad para su expresión en el momento idóneo o promoviendo su degradación. Existen distintos tipos de gránulos de RNA los cuales pueden regular de manera similar o distinta a los mensajeros, entre ellos están los gránulos germinales, cuerpos de procesamiento o cuerpos P, gránulos de estrés y los gránulos neuronales de los cuales no vamos a hablar en este trabajo debido a nuestro enfoque en la línea germinal [20] [21] [22].

Los gránulos germinales.

Los gránulos germinales se encuentran en el citoplasma de las células de la línea germinal. Estas estructuras durante la embriogénesis se conocen con nombres diferentes en distintos organismos: en *Drosophila melanogaster* se conocen como gránulos polares o también con el término nuage, en *C. elegans* como gránulos P, en *Xenopus laevis* como gránulos germinales y en los mamíferos como cuerpos cromatoides [20]. Contienen proteínas y mRNAs maternos requeridos para el desarrollo de las células germinales en la embriogénesis temprana y el establecimiento de la línea germinal en la siguiente generación [20].

Existen diferentes elementos de esta naturaleza en el citoplasma de las células germinales, y dependiendo del tipo de célula germinal en el que se encuentren, se han identificado con nombres distintos: entre ellos se encuentran los gránulos perinucleares que están presentes durante la mayor parte del desarrollo de estas células y se forman como agregados fibrilares alrededor del núcleo, los cuerpos de Balbiani son estructuras transitorias que se establecen en los ovocitos previtelogénicos y que contienen mitocondrias, retículo endoplásmico, aparato de Golgi y RNA. Otros más son los cuerpos esponjosos, estructuras que poseen cúmulos de retículo endoplásmico dispersos por el citoplasma, están presentes tanto en los ovocitos como en las células nodrizas durante la ovogénesis de *Drosophila melanogaster* [20]. Los cuerpos cromatoides presentes en los espermatocitos surgen a partir de fibras intermitocondriales que se dispersan durante las divisiones meióticas pero se consolidan en un solo cúmulo al terminar la meiosis. Los gránulos germinales en algunas ocasiones se encuentran asociados a poros nucleares [20] [21].

Los gránulos de estrés

Los gránulos de estrés no se han observado en células que crecen en condiciones óptimas, sin embargo, su formación se induce rápidamente en respuesta a estrés ambiental (Figura 7) [21]. Los componentes que forman parte de estos gránulos son proteínas asociadas al RNA y a la traducción. Las subunidades pequeñas ribosomales así como los factores de inicio de la traducción eIF2, eIF3, eIF4E y eIF4G constituyen el núcleo central de los gránulos de estrés. También contienen a las proteínas PABP1, la helicasa p54/Rck, la exonucleasa XRN1 (corta de 5' a 3') y muchas proteínas de unión a RNA que regulan la estructura y función de los mRNAs incluyendo HuR, Staufen, Smaug, TTP, G3BP, CPEB, SMN, TIA-1 y TIAR [23] [24].

En respuesta a condiciones de estrés las células eucariontes cuentan con una serie de mecanismos que les permiten asegurar su supervivencia, algunas de estas respuestas son la reprogramación de su expresión génica que involucra un arresto en la traducción [23]. La fosforilación del eIF2 α es esencial para el ensamble de los gránulos de estrés. El factor de inicio de la traducción eIF2 α es fosforilado por una familia de kinasas activadas por estrés, en estas condiciones se reduce la disponibilidad de eIF2 α para formar el complejo ternario: eIF2–GTP–tRNA, por lo que se bloquea el inicio de la traducción [24] [25].

Otras observación que sugieren la necesidad de la forma fosforilada de eIF2 α es: cuando se expresa una forma fosfomimética de eIF2 α (simula la fosforilación de eIF2 α) es suficiente para inducir el ensamble de los gránulos de estrés [26]. Por el contrario, cuando se expresa una proteína mutada no fosforilable de eIF2 α la formación de los gránulos de estrés no se induce. También se ha visto que algunas drogas que inhiben la traducción pueden afectar el ensamble de los gránulos. La cicloheximida que detiene la síntesis de proteínas a nivel de elongación no deja que se forme el complejo de inicio por lo tanto el ensamble de los gránulos de estrés no se induce [25] [26].

Cuerpos de procesamiento

Los cuerpos de procesamiento (P-bodies en inglés) son otro tipo de gránulos citoplasmicos de RNPs [21]. Son partículas esferoides uniformes presentes en las células en condiciones normales y aumentan en tamaño y número en condiciones de estrés [21]. A diferencia de los gránulos de estrés, los cuerpos de procesamiento no requieren la fosforilación del factor eIF2 α para su ensamble [26].

Estas estructuras ribonucleoproteicas contienen componentes que promueven el decaimiento de los mRNAs. Entre los elementos de los cuerpos de procesamiento están: la enzima CCR4 que es una desadenilasa, DCP1 y DCP2,

Hedls, hEdc3y p54/RCK que están involucradas en retirar la caperuza 5' de los mRNA, y la exonucleasa XRN1 [21] [27]. También contienen un heptámero de Lms1, el cual se encarga de regular el ensamble de RNP [28]. En los mamíferos estas estructuras contienen a los complejos involucrados en el silenciamiento inducido por RNA como Argonauta, GW182 y miRNAs (microRNAs) [27] [39]. Otros componentes importantes en estructuras de esta naturaleza son las proteínas de unión a RNA, en este caso se encuentran las proteínas TTP, BRF1, CPEB, 4-ET y Smaug asociadas a la traducción y el decaimiento de los RNA mensajeros. Algunos de los componentes proteicos presentes en los cuerpos de procesamiento están presentes en los gránulos de estrés, entre ellos están: XRN1, eIF4E, TTP y la kinasaserin-treonin activado por Fas. Mientras que las proteínas DCP-1, DCP-2 y GW182 se han encontrado solamente en los cuerpos de procesamiento [28] [29].

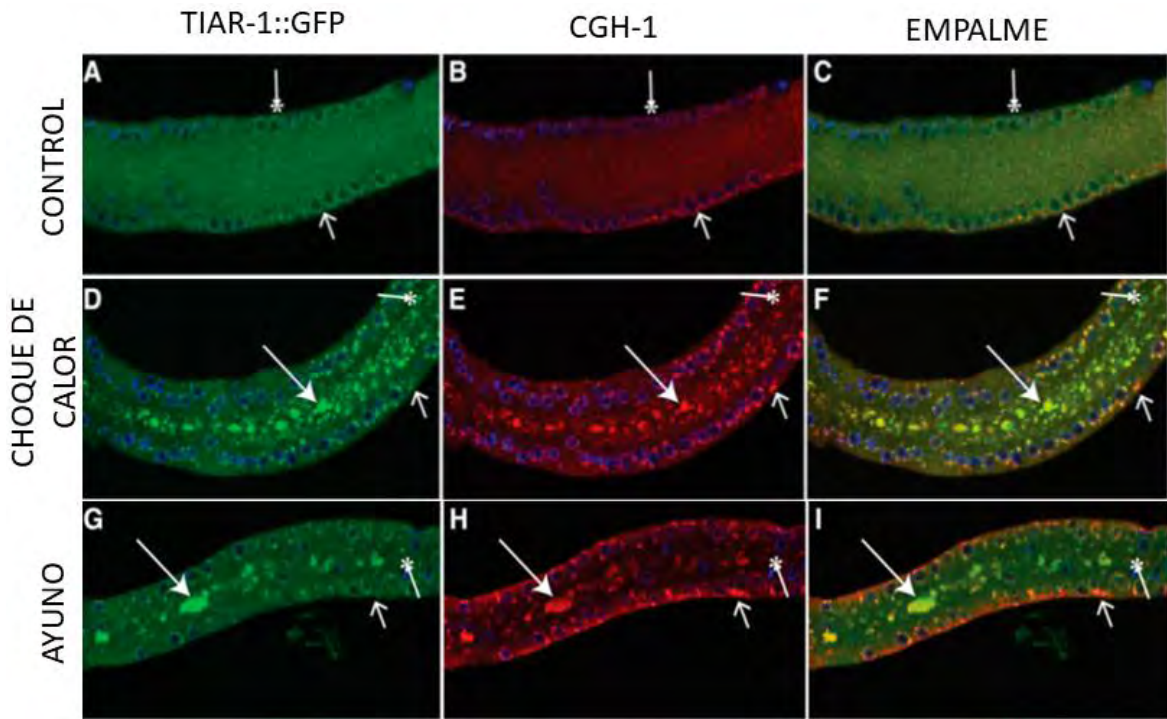


Figura 7. Formación de gránulos de RNA en el centro de la gónada de *C. elegans*. En una cepa con un fondo transgénico TIAR-1::GFP se realizó la inmunolocalización de GFP y CGH-1 en condiciones control (A, B y C), Choque de calor (D, E y F) y en ayuno (G, H e I). Se observó que los gránulos que se forman con la proteína TIAR-1 colocalizan con los que se forman con la proteína CGH-1 (marcador de gránulos de RNA en *C. elegans*) en condiciones de estrés. Tomado y modificado de [23].

Tristetraprolina (TTP)

La Tristetraprolina, también conocida como Nup475, G0S24 y TIS11, es el miembro fundador de una familia de proteínas que contienen dedos de zinc de tipo CCCH en serie, cuya secuencia consenso corresponde a **C-X₈₋₁₀-C-X₅-C-X₃-H** (donde X se refiere a cualquier aminoácido) [30]. Los miembros de esta familia de proteínas han sido descritos en diversos organismos: En insectos y en la mayoría de las levaduras solo un miembro es expresado con excepción de *Saccharomyces cerevisiae* que expresa dos miembros. En *C. elegans* cinco genes que codifican proteínas con dominios de dedos de zinc similares de este tipo han sido implicados en el desarrollo de la línea germinal y en el desarrollo embrionario temprano. En anfibios están presentes tres miembros, sin embargo, *Xenopus laevis* y *Silurana tropicalis* expresan un cuarto miembro que contiene un segundo dominio de dedo de zinc degenerado. En casi todos los mamíferos existen principalmente tres miembros, con excepción del ratón que cuenta con un cuarto representante [31] [32].

TTP es una proteína de unión a RNA que regula negativamente la estabilidad de los mRNA y promueve su degradación [31][33][34]. El mecanismo por el cual esta proteína logra unirse a los mRNA es por medio del reconocimiento y unión de los sitios ricos en adenina y uridina (regiones AREs), localizados en el extremo 3'UTR de sus mRNA diana [31] [34]. Los dominios que le permiten unirse a estos mensajeros son los dedos de zinc, ya que una sola mutación en cualquiera de las cisteínas o histidinas que forman parte de estos dominios es suficiente para anular completamente su unión a ellos [34].

Cuando el gen que codifica TTP en los mamíferos se encuentra mutado, los animales desarrollan síndromes severos de artritis, autoinmunidad, hiperplasia mieloide y dermatitis [34]. Esto se debe a que la mayoría de los mRNA dianas de TTP son citosinas proinflamatorias y TTP actúa desestabilizando a los mRNA que los codifican, lo que sugiere que TTP es un importante regulador endógeno de la

inflamación. También se ha visto que el incremento de los niveles sistémicos de TTP puede prevenir o disminuir la severidad de varias enfermedades inflamatorias [34].

Estudios en líneas celulares de mamíferos sugieren que TTP es un elemento de los gránulos de estrés, ya que tras un tratamiento con FCCP, un inhibidor de la actividad mitocondrial y potente inductor de estos componentes ribonucleoproteicos, TTP colocaliza con TIA-1 un robusto marcador de gránulos de estrés y otros marcadores también usados para localizar estos gránulos, como HuR y eIF3 [35]. También se ha observado que un aumento en la expresión de TTP promueve el ensamble de los gránulos en ausencia de estrés. En condiciones normales se ha observado que TTP está presente en los gránulos P (cuerpos P) y promueve la interacción entre los gránulos de estrés y los cuerpos de procesamiento [35].

La proteína de unión a RNA GLA-3

Varios genes que codifican proteínas con dominios de dedos de zinc similares a TTP han sido descritos en *C. elegans*, entre ellos están: *pie-1*, *mex-1*, *pos-1*, *mex-5* y *mex-6*, todos ellos están involucrados en el destino celular durante el desarrollo temprano de los blastómeros y el desarrollo de la línea germinal [36] [37] [38]. Otras proteínas similares a TTP que son requeridas para la progresión de la profase meiótica durante la maduración de los ovocitos son las proteínas OMA-1, OMA-2 y OMA-3 [39] [40]. El gen *gla-3* codifica para otro homólogo de TTP, en esta proteína los dominios de dedos de zinc de tipo CCCH se encuentran en los extremos de la proteína [30].

GLA-3 se expresa en el embrión temprano, en la gónada de la larva L4 y del adulto [30]. Estudios en mutantes con pérdida de función en GLA-3 muestran un fenotipo con apoptosis fisiológica elevada, sin embargo, no se afecta la

apoptosis de las células somáticas, por lo que se piensa que GLA-3 no es un regulador general de muerte celular [30]. En estudios genéticos usando dobles mutantes de *gla-3(op212)* y *ced-4 (n1162)*, y *gla-3(op212)* y *ced-3 (n717)*. Se observó que la muerte celular fue anulada, lo cual indicó que la muerte es de tipo apoptosis. También se concluyó que *gla-3* está arriba de ambos componentes de la maquinaria central de la apoptosis de este proceso [30].

Estudios bioquímicos y genéticos indican que GLA-3 interactúa físicamente con MPK-1, que es un componente de la cascada de señalización de las MAPK. Esta proteína es necesaria para la progresión del paquiteno de la meiosis durante la ovogénesis. En otros estudios con dobles mutantes en *gla-3 (op212)* y *mpk-1(ga117)* se ha visto que la muerte por la pérdida de función en *gla-3(lf)* es completamente anulada, lo que sugiere que es necesaria la activación de *mpk-1* para la inducción de la muerte en *gla-3(lf)* [30].

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Cuando los hermafroditas de *C. elegans* son sometidos a condiciones de ayuno y/o choque de calor, las células germinales responden incrementando sus niveles de apoptosis y formando gránulos de RNA en el citoplasma [15] [19] [23]. GLA-3 es una proteína de unión a RNA que se expresa en la gónada de *C. elegans* [30]. El fenotipo observado de los animales mutantes en *gla-3* es una extensión de la zona de paquíteno y una apoptosis fisiológica elevada [30]. Debido a que los homólogos de GLA-3 en mamíferos participan en la formación de gránulos de estrés [31] [41] y en *C. elegans* esta proteína aumenta la apoptosis fisiológica en la gónada en condiciones normales, nos propusimos estudiar si GLA-3 participa en la regulación de la apoptosis inducida por estrés, en la formación de gránulos de RNA y en la protección de estrés de *C. elegans*.

HIPÓTESIS

GLA-3 protege a las células germinales del nemátodo del estrés desencadenando entre otras respuestas apoptosis y formación de gránulos de RNA en la gónada. En su ausencia, las células germinales del nemátodo no son protegidas del estrés y esto afecta su calidad y como consecuencia el desarrollo embrionario.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar el papel de la proteína GLA-3 en la respuesta al estrés de la gónada del nemátodo *C. elegans*.

OBJETIVOS PARTICULARES:

1. Estudiar la participación de GLA-3 en la apoptosis de las células germinales en condiciones de choque de calor y ayuno.
2. Determinar el papel de GLA-3 en la formación de gránulos en la gónada en condiciones de choque de calor y ayuno.
3. Determinar si GLA-3 protege a las células germinales del choque de calor.

MATERIALES Y MÉTODOS

CEPA	GENOTIPO
N2	<i>silvestre</i>
WS2972	<i>gla-3(op216) I</i>
WS2974	<i>gla-3(op312) I</i>
WS2973	<i>gla-3(op212) I</i>
MD701	<i>bcls39 V (CED-1::GFP)</i>
RN078	<i>gla-3(op312) I; bcls39 V (CED-1::GFP)</i>

Tabla 1. Cepas utilizadas en este trabajo. Todas las cepas se crecieron a una temperatura de 20°C. Las cepas fueron proporcionadas por el centro de genética de *Caenorhabditis* (CGC) con excepción de la RN078 que se generó en este laboratorio.

MANTENIMIENTO DE LOS ANIMALES

Se usó la cepa de *Escherichia coli* OP50-1 como alimento para los animales. Las bacterias se crecieron en medio LB (Luria Bertani), el cual por cada litro de solución contiene: 10g de triptona, 5g de extracto de levadura y 5g de NaCl. También se le agregó el antibiótico estreptomycin a una concentración final de 50µl/ml y se dejó crecer durante toda la noche a una temperatura de 37°C, en agitación constante a 250 revoluciones por minuto (rpm).

Todas las cepas de nemátodos utilizadas se crecieron en placas de medio NGM-LITE. El medio NGM-LITE contiene por cada litro: 2g de NaCl, 4g de bacto triptona, 3g de fosfato monobásico de potasio (KH₂PO₄), 0.5g de fosfato dibásico de potasio (K₂HPO₄), 0.008g de colesterol y 20g de agar. Una vez preparado el medio se esterilizó por autoclave a una temperatura de 121°C por 20 min. Se utilizaron cajas de Petri desechables estériles para verter el medio NGM y se dejaron secar durante toda la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente se colocaron en el centro de la placa de agar, 500 µl de un cultivo de bacteria OP50-1 en cada caja

mediana y se dejan secar toda la noche a temperatura ambiente. Una vez que la capa de bacterias se secó, las cajas NGM fueron utilizadas para sembrar nemátodos o fueron almacenadas a 4°C hasta por dos semanas.

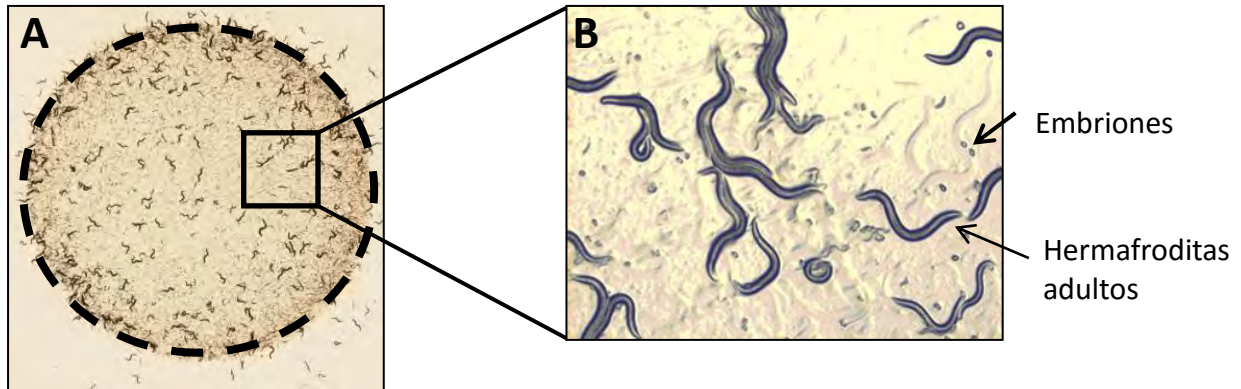


Figura 8. Crecimiento de *C. elegans* en el laboratorio. A) Se muestra el interior de una placa de agar con un tapete de bacterias *E. coli* OP50-1 (delineado con la línea punteada) y varios nemátodos creciendo. B) Es un aumento de una región de la figura A en la que se aprecia a varios hermafroditas adultos, larvas en distintos estadios de crecimiento y a algunos embriones.

EI AMORTIGUADOR M9

El amortiguador M9 es utilizado para las manipulaciones de *C. elegans*. Para preparar 1 litro de la solución amortiguadora se pesaron: 6g de Na_2HPO_4 , 3g de KH_2PO_4 , 5g de NaCl y 0.25g de MgSO_4 . Todos los reactivos fueron disueltos por agitación en 500 ml de agua mili Q y posteriormente se aforó a un volumen de 1000 ml. La solución se esterilizó por autoclave (a 121°C por 20 minutos) y se almacenó a temperatura ambiente.

MONTAJE DE GUSANOS PARA SU VISUALIZACIÓN EN EL MICROSCOPÍO ÓPTICO.

Para visualizar a los animales bajo el microscopio óptico, se elaboraron colchones de agarosa como a continuación se describe. Para hacer el colchón se utilizó una

solución de agarosa al 2% en agua mili Q. Se colocan tres portaobjetos alineados (uno central y dos laterales) (Figura 9 A), los portaobjetos laterales poseen una capa de cinta adhesiva (masking tape). Se colocó una gota de agarosa fundida en el portaobjetos del centro y sobre ella se colocó un portaobjetos de manera perpendicular. Se presionó ligeramente de manera que el grosor de la gota quede aproximadamente del grosor de la capa de cinta adhesiva de los portaobjetos laterales. Se dejó polimerizar y posteriormente se retiró el portaobjetos superior y se colocaron 30 μ l de tetramizol al 10 mM el cual sirve como anestesia para inmovilizar a los animales. Se puso un cobre objetos y los animales fueron vistos bajo el microscopio óptico (Nikon Eclipse E600).

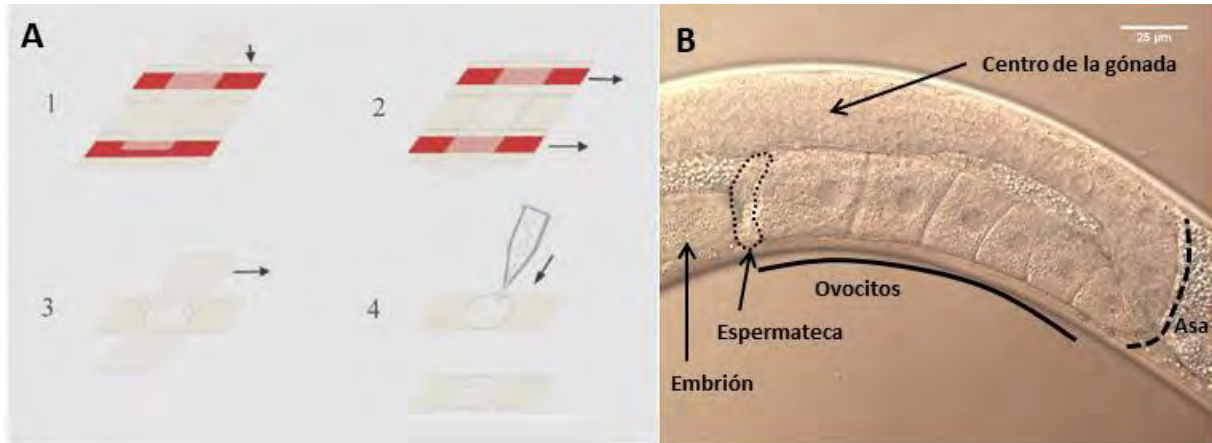


Figura 9. Montaje de animales. A) Se ilustra la metodología para preparar colchones de agarosa (descrito en el texto). Tomado de [2]. B) Imagen de un brazo de la gónada observado con microscopía Nomarski (40X).

SINCRONIZACIÓN DE ANIMALES

Para obtener animales en el mismo estadio del ciclo de vida se sincroniza su crecimiento. Para ello se colectaron de dos cajas medianas animales hermafroditas adultos grávidos (llenos de embriones en el útero) en 5 ml de amortiguador M9 y se colocaron en un tubo de 15 ml estéril. Posteriormente se le agregaron 650 μ l de hidróxido de sodio 5N (NaOH) y 1300 μ l de hipoclorito de sodio, se agitó vigorosamente durante 5 minutos (Vortex). Al terminar este tiempo

se centrifugó por 30 segundos a 11000 rpm, se decantó el sobrenadante y se hicieron tres lavados con el amortiguador M9 para retirar el exceso de hidróxido de sodio y cloro. En cada lavado se agregó 10 ml de M9, se agitó por inversión, se centrifugó (a 11000 rpm) y se decantó para eliminar el sobrenadante. Al término del último lavado se recuperó la pastilla y se colocó recuperado en un tubo de 15 ml nuevo y estéril. Finalmente los embriones obtenidos se incubaron a 20 °C en agitación constante toda la noche para que eclosionaran adecuadamente. Al día siguiente se centrifugó los tubos (a 11000 rpm), se desechó el sobrenadante procurando dejar 1ml de M9 para resuspender la pastilla. Una vez resuspendida, se cuantificó la cantidad de larvas L1 vivas que se encuentran en un volumen de 5µl de M9 y se sembró la cantidad necesaria de gusanos que se necesitaron en cajas con bacterias OP50-1.

CRUZA DE LA CEPA *MD701(ced-1::gfp)* y *WS2974(gla-3(op312))*

Para obtener animales que expresen la proteína CED-1 fusionada a la proteína verde fluorescente (GFP por sus siglas en inglés, Green Fluorescent Protein) y que a su vez también lleven la mutación en el gen *gla-3*(alelo *op312*) se cruzaron machos de la cepa *MD70(ced-1::gfp)* con hermafroditas de la cepa mutante *WS2974(gla-3(op312))*. La progenie resultante de esta cruce es heterociga para ambos caracteres, es decir llevan una copia del alelo silvestre del gen *ced-1* y una copia del alelo transgénico *ced-1::gfp* al igual que para *gla-3*, posee un alelo silvestre y uno mutante. Para obtener animales homocigotos de ambos genes esperamos a que los animales hermafroditas heterocigotos tuvieran su progenie. Se separaron sus hijos en cajas individuales. Como mínimo se tomaron 16 gusanos (hijos de los hermafroditas heterocigotos) ya que el genotipo esperado aparece en una proporción de 1/16 y se buscaron los animales que fueron fluorescentes en la gónada. Una vez corroborada la fluorescencia en el microscopio se confirmó por PCR que los animales llevaran la mutación en el gen *gla-3*. Los animales que son homocigotos a la mutación amplifican una banda de 846pb y los que tienen el gen silvestre una banda de 1111pb, en caso de que alguno de los

animales fuera homocigoto se observarían ambas bandas en la reacción de PCR (Figura 10).

Los oligonucleótidos usados para verificar la mutación se muestran en la tabla 2, El programa de PCR usado se muestra en la tabla 3. Como templado se usó DNA genómico obtenido a partir de animales silvestres y de animales fluorescentes que probablemente llevaban la mutación. Los productos del PCR se corrieron en un gel de agarosa al 1% disuelto en TAE 1X y se utilizó como buffer de corrida TAE 1X.

Se obtuvieron seis líneas provenientes de la cruce que posiblemente eran homocigotas para ambos caracteres (Figura 9). De las cuales tres resultaron homocigotas. Se tomó la línea 6 para trabajar con ella y se nombró *RN78gla-3(op312);ced-1::gfp* o simplemente *gla-3(op312);ced-1::gfp* (Figura 10)

NOMBRE	SECUENCIA	TM	TAMAÑO (PB)	TAMAÑO DEL AMPLIFICADO EN EL SILVESTRE	TAMAÑO DEL AMPLIFICADO EN EL MUTANTE
<i>gla-3(op312)</i> FOR	CTCTCACCACCGGAGATCTC	63.9	20	1111pb	846pb
<i>gla-3(op312)</i> REV	AGCTAGTGTCAAGAGCGGC	62.4	19		

Tabla 2. Oligonucleótidos que flanquean al sitio mutado en el alelo *gla-3(op312)*.

PROGRAMA PARA AMPLIFICAR EL ALELO MUTANTE EN <i>gla-3(op312)</i>	
1.- 95°C	1 minuto
2.- 95°C	0:30 segundos
3.- 62°C	0:30 segundos
4.- 72°C	1:30 minutos
5.- ir al paso 2	4 veces
6.- 95°C	0:30 segundos
7.- 58°C	0:30 segundos
8.- 72°C	1:30 minutos
9.- ir al paso 6	29 veces
10.- 72°C	3:00 minutos
11.- 20°C	30 minutos

Tabla 3. Condiciones de PCR usadas para identificar la mutación en el alelo *gla-3(op312)*.

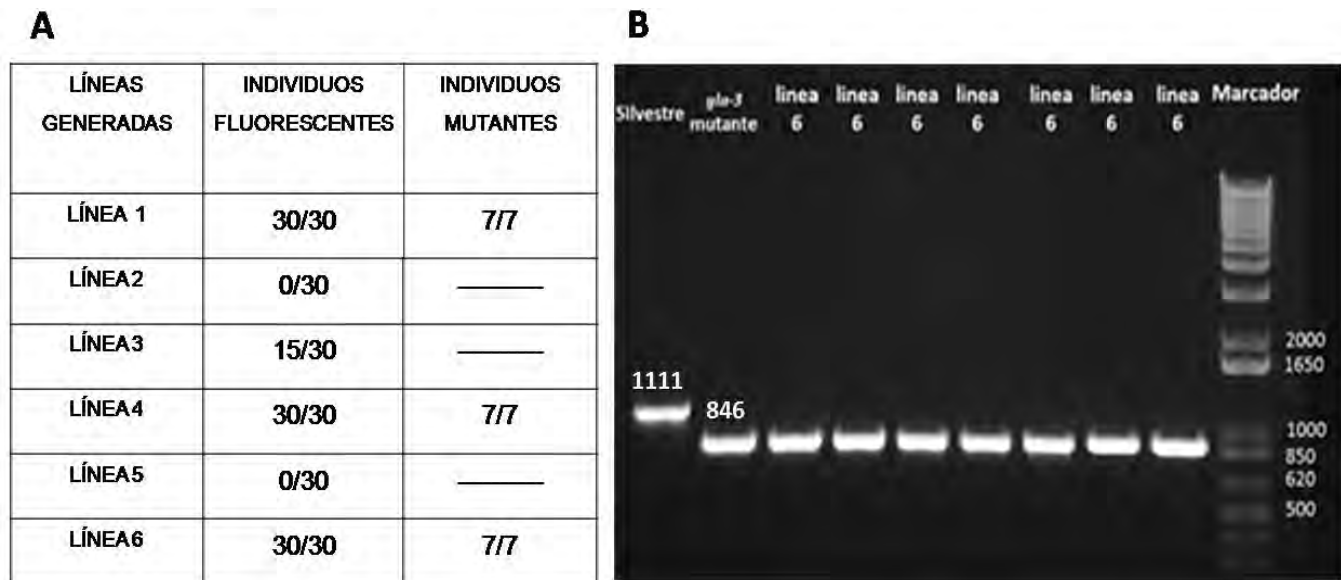


Figura 10. Análisis de la crua. Se generaron seis líneas provenientes de una crua que posiblemente eran homocigotas para ambos caracteres. Se tomó una muestra de 30 individuos para revisar la fluorescencia y 7 para verificar por PCR el alelo de *gla-3(op312)* de cada línea (A). Como resultado se generaron tres líneas homocigotas para *ced-1::gfp* y para el alelo mutante *gla-3(op312)* (líneas 1,4 y 6). En el panel B se muestra el PCR de la línea 6. En el primer carril se cargó DNA genómico de la cepa silvestre (N2) que amplifica una banda de 1111pb, en el segundo se colocó DNA de la cepa mutante a *gla-3 (op312)* que amplifica una banda de 846pb y en los siguientes carriles las siete muestras de los individuos provenientes de la línea 6 seguidas por el marcador de peso molecular.

CUANTIFICACIÓN DE LOS CUERPOS APOPTÓTICOS EN LA GÓNADA

El conteo de cuerpos apoptóticos se realizó con la cepa transgénica *MD701(ced-1::gfp)*, la cual tiene fusionada la proteína verde fluorescente GFP con la proteína CED-1 bajo el promotor de *lim-7* (que se expresa en células somáticas de la vaina las cuales forman parte de la gónada de *C. elegans*). Para determinar la apoptosis debido a la ausencia de *gla-3* se utilizó la cepa *RN78* que expresa el transgénico *ced-1::gfp* y lleva la mutación en el alelo *op312* de *gla-3(gla-3(op312);ced-1::gfp)*.

El transgénico *ced-1::gfp* permite el conteo de cuerpos apoptóticos gracias a que la proteína verde fluorescente se expresa en el tejido encargado de fagocitar a las células germinales que iniciaron el programa de muerte y se hacen visibles cuando se irradian con luz UV en un microscopio de epifluorescencia (Nikon Eclipse E600).

El conteo de cuerpos apoptóticos se realizó en condiciones de choque de calor y ayuno. Para el choque de calor se colocaron gusanos adultos de un día (24 horas después de ser L4) de ambas cepas en cajas de petri con bacterias (OP50-1) y selladas con plástico en un baño María a una temperatura de 31°C por 3 horas. Al término del choque de calor los animales se recuperaron por 4.5 horas a una temperatura de 20°C. Una vez transcurrido este tiempo se montaron los animales, se observaron al microscopio, se identificaron los cuerpos apoptóticos y se cuantificaron. Los animales que se utilizaron como control permanecieron a una temperatura de 20°C.

Para inducir el ayuno se tomaron 100 animales adultos, se colocaron en una caja de petri sin bacterias y se dejaron por un minuto en la caja, permitiendo así que los animales se limpiaran las bacterias que tenían adheridas al cuerpo. Posteriormente se pasaron a otra caja nueva sin bacterias a una temperatura de 20°C por 6 horas. Una vez transcurrido el tiempo se montaron los animales en

colchones de agarosa y se observaron al microscopio para cuantificar los cuerpos apoptóticos. Los animales control permanecieron en presencia de alimento a 20°C.

DETECCIÓN DE GRÁNULOS DE RNA EN LA GÓNADA DE *C. elegans*

Para los ensayos de formación de gránulos de RNA en la gónada de *C. elegans* se realizó una inmunolocalización de CGH-1 (un marcador de gránulos de RNA) en condiciones de ayuno y choque de calor. Para inducir el ayuno, los animales adultos de un día se colocaron por 6 horas en cajas de petri a una temperatura de 20°C sin bacteria y para el choque de calor los gusanos fueron incubados a una temperatura de 31°C por 3 horas. Una vez terminado el tiempo de estrés se colocaron aproximadamente 30 animales en 30µl de M9 sobre un cubreobjetos y disectaron las gónadas. Después se colocó el cubreobjetos con los gusanos disectados sobre un portaobjetos con polilisina. Posteriormente fueron sumergidos en nitrógeno líquido. Ya congeladas las muestras en nitrógeno líquido se sacaron, se retiró el cubreobjetos y se sumergieron en metanol (el metanol debe estar a una temperatura aproximada de -20°C) durante 1 minuto. Las placas se fijaron durante 30 minutos en una solución que contiene PBS 1X, HEPES 0.08M (pH 6.9), MgSO₄, EGTA 0.8 Mm y 3.7% de paraformaldehído. Una vez transcurrido el tiempo de fijado las muestras se colocaron en PBT (PBS 1X-Tween 0.5%) por 10 minutos. Posteriormente las placas se colocaron en una cámara húmeda perfectamente nivelada y se bloqueó con 30µl de una solución de suero de cabra (suero de cabra al 30% diluida en PBT con azida de sodio al 2%) por 1 hora y 30 minutos. Posteriormente se lavaron las placas en PBT por 5 minutos y se colocaron en una cámara húmeda nivelada para incubar con el anticuerpo primario que reconoce a un epitope de la proteína CGH-1 (hecho en rata, diluido 1:25 y disuelto en una solución de suero de cabra al 30% diluida en PBT y con azida de sodio al 2%), a una temperatura de 4°C toda la noche. Al día siguiente se colocaron las placas en PBT por 10 minutos para retirar el exceso de anticuerpo primario, y se preparó una mezcla que contiene el anticuerpo secundario (anti-IgG

de rata conjugado con Cy3 hecho en burro) y DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride) a una concentración de 1 ng/μg ambos diluidos 1:100 y disueltos en una solución de suero de cabra (suero de cabra al 30% diluido en PBT con azida de sodio al 2%), se incuban a temperatura ambiente por 1 hora en una cámara húmeda nivelada. Al término del tiempo de incubación se lavaron las placas en PBT por 10 minutos y después se agregaron 10μl de solución de montaje Vectashield (Vector laboratories) sobre cada muestra. Se cubrió con un cubreobjetos, se selló con barniz y se observó al microscopio de epifluorescencia (Nikon Eclipse E600).

Las poblaciones de gusanos control para el ayuno y el choque de calor permanecieron en cajas petri con medio NGM-LITE con OP50-1 incubadas a una temperatura de 20°C todo el tiempo antes de las disecciones.

Los porcentajes de los gusanos que formaron gránulos en choque de calor y ayuno se obtuvieron mediante la cuantificación observando las gónadas bajo el microscopio. Se observaron las laminillas inmunoteñidas en el microscopio de epifluorescencia y se cuantificaron las gónadas que formaron gránulos en el centro de la gónada y las que no formaron gránulos, tanto en los gusanos control y en los sometidos a condiciones de estrés en la cepa silvestre (N2) así como en la mutante a de *gla-3*, los resultados fueron expresados en porcentajes.

LETALIDAD EMBRIONARIA EN CONDICIONES DE ESTRÉS.

Para probar si *gla-3* participa en la protección de las células germinales a condiciones de estrés se evaluó la fertilidad de la cepa silvestre (N2) y la mutante *en gla-3* después de la inducción del estrés. Se seleccionaron hermafroditas en estadio L4 de ambas cepas. Al día siguiente los adultos jóvenes fueron sometidos a choque de calor a 31°C por 3 horas. Una vez transcurrido el tiempo del estrés los animales se montaron en colchones de agarosa (aproximadamente 10 gusanos de cada cepa) y se observaron al microscopio (por microscopía de

Nomarski), se contó el número de ovocitos más proximales ya celularizados y que en poco tiempo pasaron a formar un embrión y los embriones ya formados. Se recuperaron los gusanos (con ayuda de una pipeta capilar y M9) de manera individual en cajas chicas con bacterias y se incubaron a 20°C. Los animales control fueron tratados de la misma manera con excepción de la condición de estrés (choque de calor) y permanecieron incubados a 20°C.

Los ovocitos y embriones de cada gusano son sumados, se calculó un promedio de las cantidades obtenidas y se esperó a que los animales depositaran aproximadamente ese número de embriones en la caja donde se recuperaron después del estrés. A ese conjunto de ovocitos y embriones se clasifica como grupo I. Una vez que la cantidad de embriones fue colocada los animales fueron transferidos a una caja nueva con bacteria en la que permanecieron 12 horas y los embriones depositados durante este tiempo constituyen el grupo II. Ya transcurrido el tiempo se cambian los gusanos a otra caja nueva con bacterias y en esta última se dejan por 24 horas y los embriones puestos en este periodo de tiempo forman al grupo III. Inmediatamente después de las 24 horas los gusanos son retirados de las cajas.

Para obtener la letalidad embrionaria se cuantificaron los embriones que no eclosionaron después de 24 horas de ser expulsados del útero y los embriones que si lograron completar la embriogénesis y llegaron a formar larvas L1. Con estos datos se calculó el porcentaje de los embriones que no eclosionaron del total de embriones puestos por el hermafrodita de cada grupo (grupo I, II y III).

RESULTADOS

DESCRIPCIÓN DE LOS ALELOS MUTANTES USADOS PARA EL ESTUDIO DE *gla-3*.

Para estudiar la función de *gla-3* en la gónada de *C. elegans* se utilizaron tres alelos distintos que se encuentran disponibles en el centro de genética de *Caenorhabditis* (CGC por sus siglas en inglés, *Caenorhabditis* Genetic Center). Los alelos *op216* y *op212* fueron aislados en un escrutinio para encontrar mutantes con apoptosis elevada en la gónada [30]. El alelo *op312* fue aislado en otro escrutinio realizado para identificar mutantes involucradas en la apoptosis de las células germinales independientes de *cep-1*. El gen *gla-3* (T02E1.3) tiene tres formas alternativas de empalme de exones: T02E1.3a, la T02E1.3b y la T02E1.3c. Las isoformas T02E1.3a y T02E1.3c son muy similares en la posición y tamaño de los exones a excepción del tercero, la isoforma T02E1.3b, sin embargo, difiere en los dos primeros exones en comparación con las otras dos isoformas [30] (Figura 11). El alelo *op216* tiene una mutación puntual que consiste en una transición de G por A en el sitio del aceptor del empalme de exones del primer intrón. El alelo *op212* también es una transición pero el cambio se da de C por T y ocasiona un codón de paro en el cuarto codón del transcrito. Por último el *op312* consta de una delección de 265pb que afecta a los dos exones más cercanos al 3'UTR (Figura 11). Las mutaciones afectan las formas alternativas de splicing T02E1.3a y T02E1.3b [30]. Sin embargo, por las similitudes en la posición y tamaño de los exones podemos inferir que las mutaciones también afectan a la isoforma T02E1.3c (Figura 11).

Para realizar los experimentos de apoptosis se usó el alelo *op312* que se cruzó con la cepa *ced-1::gfp* que permite el conteo de cuerpos apoptóticos. Gracias a que la mutación del alelo *op312* consiste en una delección fue posible corroborar la cruce por medio de PCR. Para hacer los ensayos de formación de gránulos se usaron los tres alelos: *op312*, *op216* y *op212*. Y para el experimento de letalidad embrionaria en condiciones de estrés se optó por usar al alelo *op312*. Los

animales de la cepa *op212* los cuales poseen el fenotipo más fuerte no nos permitieron proseguir con el experimento debido a que no depositaban los embriones.

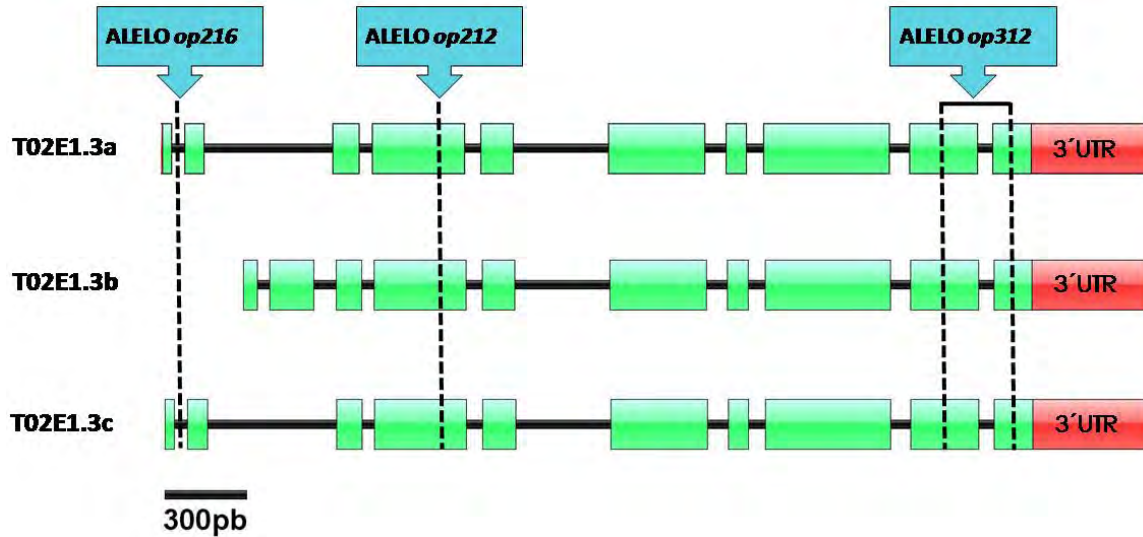


Figura 11. Representación esquemática de las mutaciones en alelos mutantes en *gla-3*. El gen *gla-3* (T02E1.3) tiene tres formas alternativas de splicing (T02E1.3a, T02E1.3b y T02E1.3c). El locus tiene diez exones (verde) espaciados por intrones (líneas negras continuas). Las isoformas T02E1.3a y T02E1.3c son muy similares en la posición de los exones en comparación con la isoforma T02E1.3b que difiere en los dos primeros exones. Las tres mutaciones caen en distintas regiones: El alelo *op216* afecta al aceptor de splicing del primer intrón de las isoformas T02E1.3a y T02E1.3c dejando intacta a la isoforma T02E1.3b. El alelo *op212* afecta a las tres isoformas provocando un codón de paro a la altura del cuarto exón y el *op312* consiste en una deleción de 265 pares de bases que deja incompletos a los dos exones más cercanos al 3'UTR y desplaza el marco de lectura.

GLA-3 SE REQUIERE PARA INDUCIR APOPTOSIS EN LA GÓNADA EN CONDICIONES DE AYUNO Y CHOQUE DE CALOR.

En 2006, Kritikou y colaboradores mostraron que la pérdida de función en el gen *gla-3* aumenta los niveles de apoptosis fisiológica durante el desarrollo de los gametos en el hermafrodita adulto de *C. elegans*. Además mostraron que la apoptosis inducida por la ausencia de *gla-3* es independiente de los mecanismos de respuesta a daño a DNA mediados por *cep-1*, el homólogo a p53, y de proteínas de los puntos de control como HUS-1 y CLK-2 [30]

Distintos tipos de estrés incluyendo: el osmótico, oxidante, choque de calor y ayuno inducen la apoptosis en la gónada de *C. elegans* [15]. Por lo que se decidió probar si *gla-3* participa en la apoptosis inducida por estrés. Para evaluar la participación de *gla-3* en la apoptosis de la gónada en condiciones de estrés se utilizaron las cepas: *ced-1::gfp* como cepa control y la cepa *gla-3(op312);ced-1::gfp*. El marcador *ced-1::gfp* consiste en la fusión de la proteína verde fluorescente (GFP) con la proteína CED-1 ($P_{lim-7}ced-1::gfp$), construcción que se expresa en el epitelio encargado de fagocitar a las células apoptóticas en la línea germinal [18]. Para inducir el ayuno los animales hermafroditas adultos de un día de ambas cepas se dejaron sin bacterias durante 6 horas a 20°C. Para el choque de calor, los animales se colocaron a 31°C por 3 horas seguido de 4.5 horas de recuperación. Por otro lado los animales control permanecieron todo el tiempo a 20°C con bacterias. Una vez terminado el tiempo de estrés se cuantificaron los cuerpos apoptóticos por medio de fluorescencia (figura 12).

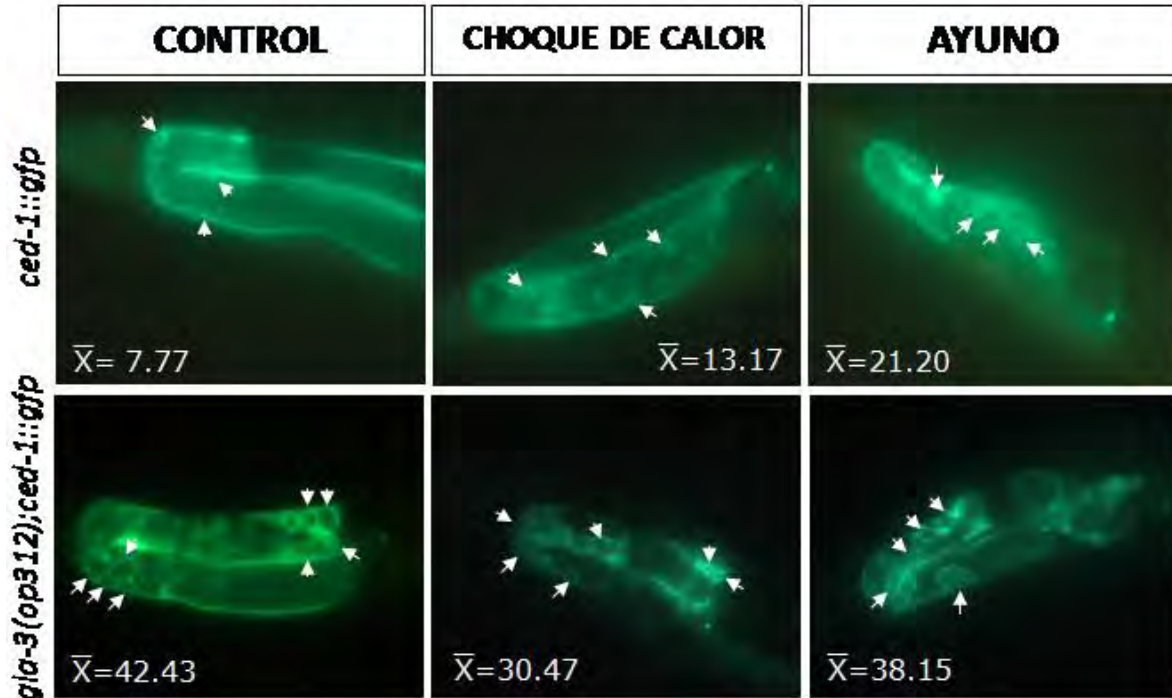


Figura 12. GLA-3 se requiere para la inducción de apoptosis en las células germinales. Animales hermafroditas adultos de un día de la cepa *ced-1::gfp* y *gla-3(op312);ced-1::gfp* fueron sometidos a choque de calor (31°C por 3h más 4.5 h de recuperación a 20°C) y ayuno (6 h sin alimento). Una vez terminado el tiempo de estrés los animales se montaron en el microscopio y se cuantificaron los cuerpos apoptóticos. Como control para ambos tipos de estrés se usaron animales que permanecieron a 20°C y en presencia de comida. Las flechas señalan a algunos cuerpos apoptóticos y el símbolo \bar{X} indica el promedio de cuerpos apoptóticos por animal (por cada brazo de la gónada).

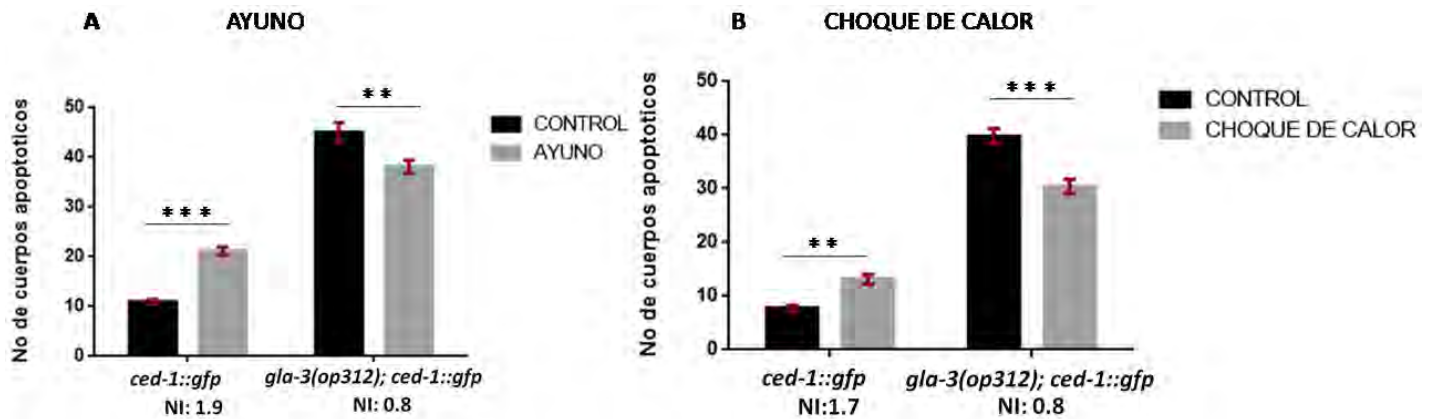


Figura 13. *gla-3* se requiere para la respuesta de apoptosis en choque de calor y ayuno en la gónada. Animales adultos de un día de la cepa control *ced-1::gfp* y *gla-3(op312);ced-1::gfp* fueron sometidos a choque de calor y ayuno. La gráfica A muestra el número de cuerpos apoptóticos en animales sometidos a ayuno (6 h sin alimento) y la B los sometidos a choque de calor (3 h a 31°C). Los animales control permanecieron todo el tiempo a 20°C con alimento. Las gráficas representan el promedio del número de cuerpos apoptóticos y las barras el error estándar. La estadística usada fue una prueba de comparaciones múltiples de bonferroni. Los asteriscos representan significancia estadística con un valor $P < 0.001$.

En la figura 13 y el panel A se observa que bajo condiciones normales de alimentación los animales *ced-1::gfp* presentan un promedio aproximado de 10 células en apoptosis por cada brazo de la gónada, a este tipo de muerte se le conoce como apoptosis fisiológica [12]. Cuando los animales control se sometieron a condiciones de ayuno el promedio de la apoptosis aumenta a casi el doble dando como resultado un nivel de inducción de 1.9 (figura 13 A). Este aumento en la apoptosis es la respuesta de la gónada a condiciones de ayuno que se da en la cepa control y que se ha observado anteriormente en el laboratorio [15] [19]. En la cepa *gla-3(op312);ced-1::gfp* observamos que la sola ausencia de *gla-3* en condiciones normales aumenta considerablemente la apoptosis como ya se había reportado [30]. En condiciones de ayuno, la apoptosis se redujo de un promedio de 45 cuerpos apoptóticos, que se tiene en condiciones control, a 38 cuerpos apoptóticos obteniendo un nivel de inducción de 0.8 (Figura 13 A). Este resultado nos muestra una menor inducción y que además podemos ver una disminución en el número de cuerpos apoptóticos en estas condiciones. Ante un choque de calor la cepa control tiene un aumento en el promedio de cuerpos

apoptóticos, logrando un nivel de inducción de 1.7 (Figura 13 B), respuesta que se ha observado en esta condición de estrés [15]. En la cepa que acarrea la mutación en *gla-3* podemos ver que disminuye su promedio de alrededor de 40 cuerpos apoptóticos en condiciones control a uno de 30 cuerpos apoptóticos frente al choque de calor, obteniendo un nivel de inducción de 0.8 (Figura 13 B). De manera similar al ayuno hay una menor inducción en condiciones de choque de calor y también se puede apreciar una disminución en el número de cuerpos apoptóticos. Nuestros resultados indican que *gla-3* se requiere para inducir la apoptosis en ayuno y choque de calor, ya que el aumento en el número de cuerpos apoptóticos que se observa en condiciones de estrés en la cepa silvestre no se observa en la ausencia de *gla-3*.

GLA-3 ES INDISPENSABLE PARA LA FORMACIÓN DE GRÁNULOS DE RNA EN LA GÓNADA DURANTE EL AYUNO Y EL CHOQUE DE CALOR.

Otra respuesta a condiciones de estrés que se ha observado es la formación de gránulos de RNA en la gónada de *C. elegans* [23]. CGH-1 es una helicasa de RNA que se utiliza como marcador para el estudio e identificación de los gránulos de RNA [42] [42]. Para probar si *gla-3* tiene un papel en la formación de gránulos se realizó una inmunolocalización de CGH-1 en animales silvestres y mutantes en *gla-3* sometidos a choque de calor y ayuno. Por observaciones previas en nuestro grupo sugieren que *gla-3* está participando en esta respuesta (Dra. Laura Ivón Láscarez Lagunas, tesis de doctorado)

Animales hermafroditas adultos de un día de la cepa silvestre (N2) y *gla-3(op312)* fueron sometidos a choque de calor (a 31°C por 3 horas) y ayuno (por 6 horas en ausencia de comida). En condiciones control los animales permanecieron todo el tiempo a 20°C en presencia de comida. Una vez terminado el tiempo de estrés se disectaron las gónadas, se fijaron y se realizó una inmunolocalización contra CGH-1. Como era de esperarse en las condiciones control la mayoría de los animales

no formaron gránulos de RNA en la gónada 85% (Figura 14, A). Mientras que en condiciones de choque de calor un porcentaje considerable (69%) de los animales tendió a formar gránulos y una fracción menor no (31%) (Figura 14, B). En condiciones de ayuno un 80% de los animales mostró este fenotipo y un 20% no formó gránulos (Figura 14, F). En una cepa mutante en *gla-3(op312)* observamos que en condiciones control la mayor parte de los animales no formó gránulos (94 y 100%) (Figura 14, C y G). Cuando los animales mutantes en *gla-3(op312)* fueron sometidos a condiciones de estrés la mayoría no logró formar gránulos obteniendo un porcentaje de 76% en choque de calor y un 88% en condiciones de ayuno (Figura 14, D y H respectivamente). Estos resultados sugieren que la proteína GLA-3 es indispensable para la formación de gránulos en condiciones de choque de calor y ayuno.

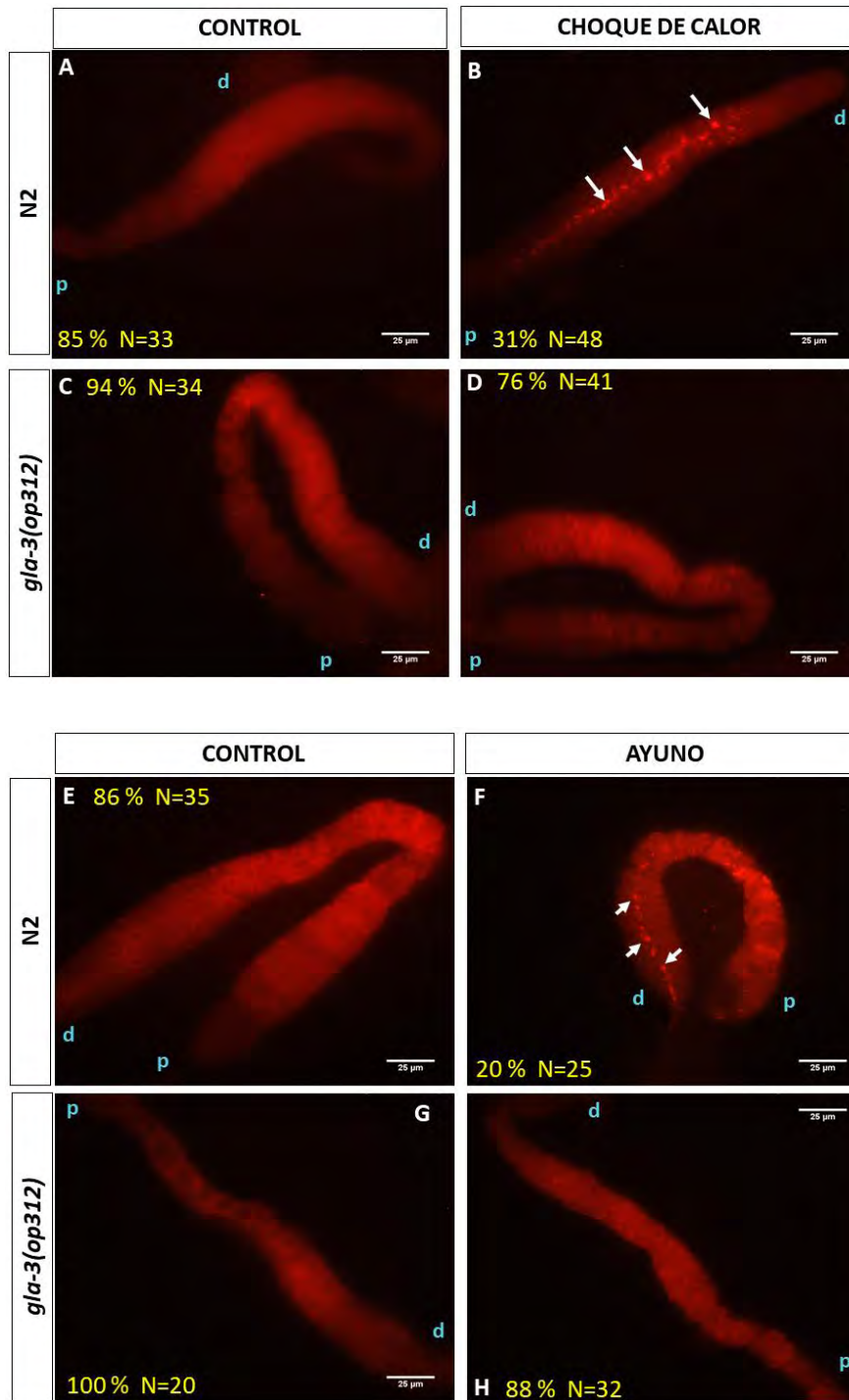


Figura 14. *gla-3* se requiere para la formación de gránulos de RNA en el centro de la gónada. Animales adultos de un día de la cepa silvestre (N2) y la mutante en *gla-3(op312)* fueron sometidos a choque de calor a 31°C por 3 horas y ayuno por 6 horas y posteriormente fueron fijados y teñidos con un anticuerpo que reconoce a la proteína CGH-1. Como control para ambas condiciones se usaron animales que permanecieron a 20°C en presencia de comida. Los porcentajes indican la cantidad de animales que no formaron gránulos, las flechas muestran los gránulos que se forman en condiciones de estrés en la cepa silvestre (B y F). Las letras d y p indican el extremo distal y proximal respectivamente de cada gónada.

Para corroborar nuestros resultados se probaron otros alelos de la mutación en *gla-3* (*op216* y *op212*). En condiciones de choque de calor ninguno logró formar gránulos en el centro de la gónada (Tabla 4). Mientras que en condiciones de ayuno un 84% de los animales *gla-3(op216)* y el 92% de los animales *gla-3(op212)* logró formarlos (Tabla 4). En los tres alelos analizados, el porcentaje de los animales que formó gránulos en condiciones de estrés varía. Sin embargo, el resultado es el mismo; los animales que poseen una pérdida en la función de *gla-3* tienen defectos en la formación de gránulos en el centro de la gónada.

Alelo	Animales que <u>no</u> formaron gránulos (%)		Animales que <u>no</u> formaron gránulos (%)	
	Condiciones control	Choque de calor	Condiciones control	Ayuno
N2	85% (N=33)	31% (N=48)	86% (N=35)	20% (N=25)
<i>gla-3(op312)</i>	94% (N=34)	76% (N=41)	100% (N=20)	88% (N=32)
<i>gla-3(op216)</i>	100% (N=44)	100% (N=32)	100% (N=65)	84% (N=45)
<i>gla-3(op212)</i>	100% (N=28)	100% (N=31)	100% (N=26)	92% (N=24)

Tabla 4. La formación de los gránulos de RNA se ve afectada en distintos alelos mutantes en *gla-3*. Los alelos *gla-3(op216)* y *gla-3(op212)* también muestran defectos en la formación de gránulos en condiciones de estrés. Ambos alelos no logran formar gránulos en condiciones de choque de calor y ayuno, el 84% de los animales no forma gránulos en el alelo *gla-3(op216)* y un 92% en el *gla-3(op212)*.

GLA-3 PROTEGE A LAS CÉLULAS GERMINALES FEMENINAS DEL CHOQUE DE CALOR

Para probar si *gla-3* protege a las células germinales femeninas del choque de calor se realizó un análisis para medir indirectamente la calidad de los ovocitos. Asumiendo que un ovocito de buena calidad es capaz de llevar a cabo exitosamente el desarrollo embrionario y dar lugar a un nuevo organismo. Para esto se contó el porcentaje de embriones que eclosionaron después de dar un choque de calor. Los resultados fueron expresados en porcentajes de letalidad embrionaria.

Ya que la gametogénesis en la gónada de *C. elegans* se lleva a cabo de forma ordenada comenzando en el extremo distal con las células germinales troncales, luego células en meiosis y terminan en la parte proximal, podemos distinguir células germinales en distintas etapas de diferenciación que fueron expuestas al choque de calor. Para esto nos basamos en el experimento publicado por nuestro grupo [23] (figura 15 A) y colocamos animales adultos jóvenes de un día, que ya habían comenzado la gametogénesis. En condiciones de choque de calor (3 horas a 31°C) y en condiciones control. Una vez terminado el tiempo de estrés se separó la progenie de los animales expuestos en tres grupos para distinguir en qué etapa de la meiosis de la profase I se encontraban las células germinales que fueron expuestas al choque de calor. El grupo I el cual consta de los embriones que estaban en el útero y de los ovocitos más proximales al momento del choque de calor, el grupo II que consta de las células germinales en paquíteno tardío consecutivas al primer grupo las cuales fueron fertilizadas en un periodo de 12 a 24 horas después del estrés (Figura 15 A). Por último el grupo III que está compuesto de las células que se encontraban más cercanas a la parte distal de la gónada y que pasaron a ser embriones en un periodo de 24 a 48 horas aproximadamente después del estrés y que posiblemente se encontraban iniciando paquíteno o en paquíteno intermedio (Figura 15 A).

El choque de calor en la cepa silvestre (N2) provocó una letalidad embrionaria de aproximadamente 70% en el grupo I (Figura 15 B). Sin embargo, en la misma

cepa silvestre, letalidad embrionaria disminuyó considerablemente casi a niveles control en los grupos II y III (Figura 15 B). En la cepa mutante en *gla-3(op32)* observamos que en condiciones control la letalidad embrionaria fue similar a la del silvestre. Sin embargo, observamos un aumento en la letalidad embrionaria en condiciones de choque de calor llegando a un porcentaje de alrededor del 80% en el grupo I (Figura 15 B). En los grupos II y III, a diferencia de lo que se observa en la cepa silvestre, la letalidad embrionaria continúa siendo alta. Estos datos sugieren que GLA-3 protege a las células germinales del estrés (Figura 15 B).

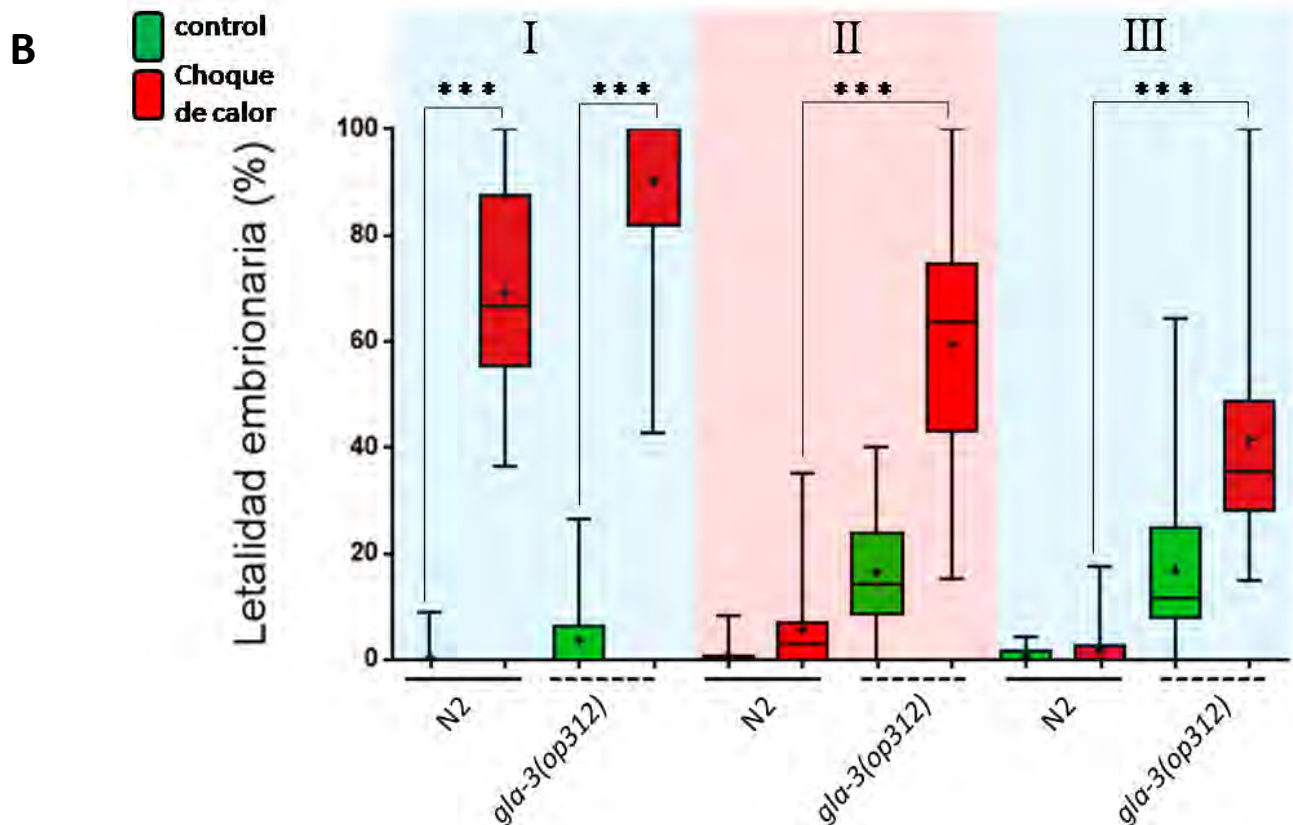
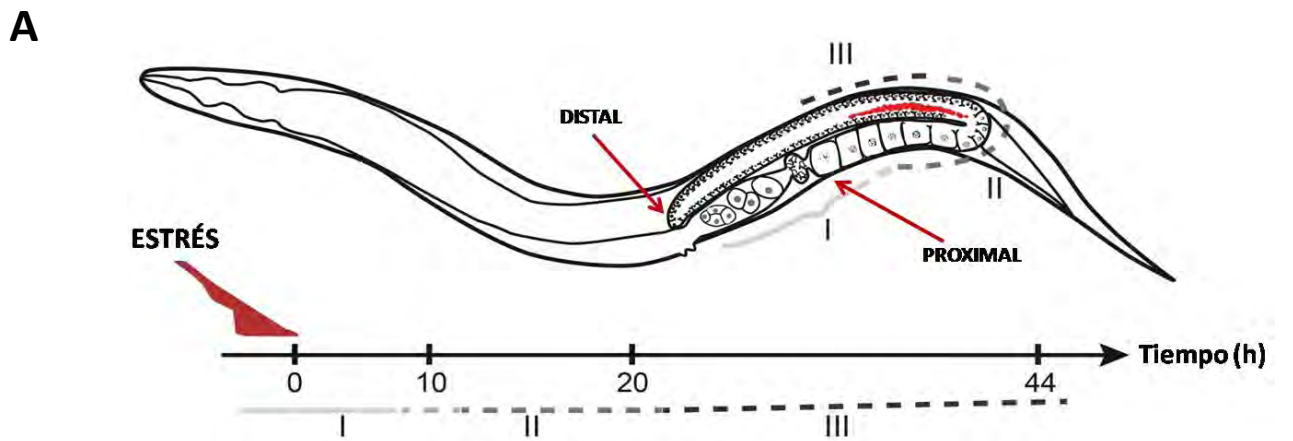


Figura 15. *gla-3* protege a las células germinales del choque de calor. A) Esquema de un brazo de la gónada y la organización de las células germinales en tres grupos con respecto al pulso de estrés. Tomado y modificado de Huelgas-Morales G *et al*, 2016. B) Animales adultos jóvenes silvestres y mutantes en *gla-3(op312)* fueron expuestos a choque de calor (31°C por 3h), una vez terminado el tiempo de estrés los animales se colocaron a 20°C en cajas con comida. La progenie de los animales se separó en tres grupos: I) los embriones que estaban en el útero y los ovocitos más proximales al momento del estrés que fueron depositados alrededor de 10 horas aproximadamente, II) los embriones que fueron producidos de 12 a 24 horas después del estrés y III) los embriones que fueron producidos de 24 a 48 horas después del estrés. Los embriones que no eclosionaron durante 24 horas se consideraron como muertos. Las gráficas muestran los promedios de letalidad embrionaria, las cajas representan el rango intercuartil de 25% al 75%, los puntos el valor de la media, las barras se extienden del valor mínimo al máximo y los tres asteriscos muestran una significancia con un valor $P < 0.001$. Los datos mostrados son el resultado de dos experimentos independientes. El modelo estadístico usado fue ANOVA de una vía con la prueba de múltiples comparaciones de Dunn.

DISCUSIÓN

Las proteínas de la familia TIS11 como TTP promueven el decaimiento de los mRNA inhibiendo así la expresión de ciertos genes [31] [33]. En mamíferos se ha visto que cuando el gen que codifica para TTP es eliminado, los principales fenotipos que expresan los animales son un desarrollo severo de los síndromes de artritis, autoinmunidad, hiperplasia mieloide y dermatitis [33]. Estudios en GLA-3, el homólogo de TTP, en *C. elegans* demuestran que este tiene un papel en la apoptosis fisiológica de las células germinales ya que en su ausencia se da un aumento considerable de este tipo de apoptosis [30].

En este estudio se encontró que los animales mutantes en *gla-3* son sensibles a condiciones de estrés. Observamos que al exponer los animales a condiciones de ayuno y choque de calor no pueden inducir apoptosis de las células germinales como lo hace la cepa silvestre. En la gónada del *C. elegans*, distintas condiciones de estrés causan la formación de gránulos de RNA que protegen a las células germinales. Los animales mutantes en *gla-3* no son capaces de promover la formación de estos gránulos. Por último se observó que tras un choque de calor, la letalidad embrionaria de animales mutantes en *gla-3* aumenta lo que sugiere un papel protector de esta proteína ante condiciones de estrés.

El papel de GLA-3 en la apoptosis

En condiciones regulares de crecimiento en el nemátodo *C. elegans* más de la mitad de las células germinales mueren durante la ovogénesis en un proceso llamado apoptosis fisiológica [12]. Los animales mutantes en *gla-3* tienen afectada esta vía ya que presentan un fenotipo marcado de apoptosis fisiológica elevada.

Se ha observado que existe una relación entre la progresión de la meiosis y la muerte de las células germinales [12]. Uno de los requerimientos para que las

células puedan activar el programa de muerte es salir de la etapa de paquíteno, para que este evento se lleve a cabo es necesaria la fosforilación de la MAP kinasa ERK (MPK-1) [12]. También se sabe que GLA-3 interactúa directamente con MPK-1 y que en ausencia de esta proteína se da una elevada apoptosis probablemente desencadenada por defectos en la meiosis o sobreactuación de la vía ERK.

En condiciones de estrés la gónada de *C. elegans* aumenta la apoptosis de las células germinales por distintas vías [15]. En choque de calor participan proteínas de la vía de las Map kinasas MEK-1 Y SEK-1 [15]. En condiciones de ayuno, LIN-35/Rb tiene un papel importante regulando de manera negativa a CED-9 favoreciendo así la liberación de CED-4 para que forme el apoptosoma con CED-3 desencadenando la muerte [19]. Nuestros resultados muestran que al someter a los animales mutantes en *gla-3* a condiciones de choque de calor y ayuno no son capaces de aumentar el número de cuerpos apoptóticos como lo hace la cepa silvestre en respuesta a condiciones de estrés. De manera contraria a lo que se observa normalmente el número de cuerpos apoptóticos disminuye en estas condiciones. Existe la posibilidad de que GLA-3 sea un regulador general de la apoptosis durante el estrés. GLA-3 podría estar regulando a un blanco común que se requiere para la respuesta de ayuno y choque de calor.

GLA-3 se requiere para formar gránulos de estrés en la gónada del nemátodo

En células de mamífero en condiciones regulares de crecimiento TTP se encuentra como componente de los cuerpos de procesamiento y en condiciones de estrés se asocia con los gránulos de estrés. En *C. elegans* se observan principalmente dos tipos de gránulos de RNA en la gónada; los que se forman en el centro, donde las células forman un sincicio y comparten el citoplasma, y los que se forman en citoplasma de los ovocitos en la parte proximal.

En estudios previos del laboratorio se observó que la proteína TIAR-1, que es una proteína que posee sitios de unión a RNA, se asocia a ambos tipos de

gránulos; sin embargo, al eliminar el gen *tiar-1* se ve afectada únicamente la formación de gránulos en el centro de la gónada [23]. En el caso de GLA-3 se analizaron únicamente los gránulos que se forman en el centro de la gónada, los cuales no logran formarse en ausencia de esta proteína. En mamíferos las proteínas con dominios de unión a RNA entre ellas TTP son requeridas para nuclear el ensamble de los gránulos de estrés ya que tienen propiedades de agregación [44]. En *C. elegans* se sabe que GLA-3 posee dominios de unión a RNA, por lo que la formación de gránulos podría inhibirse en su ausencia ya que GLA-3 es necesaria para que se inicie la agregación de los distintos componentes de los gránulos en condiciones de estrés. Si la hipótesis anterior es cierta indicaría que GLA-3 y TTP tienen funciones conservadas, ya que en mamíferos TTP forma parte de los gránulos y en *C. elegans* GLA-3 se requiere para su formación. En mamíferos se ha observado la relevancia que tienen algunos de los dominios de TTP en el ensamble e interacción con otros componentes ribonucleoproteicos [34]. Sin embargo, no se han eliminado completamente la proteína para ver el efecto que causa. Por otro lado en *C. elegans* aún falta probar si GLA-3 es un componente de los gránulos e identificar el mecanismo por el cual está afectando la formación de estas estructuras.

GLA-3 protege a las células germinales del estrés

En los experimentos que realizamos para evaluar la protección de GLA-3 al estrés, encontramos que en condiciones normales la falta de GLA-3 provoca letalidad embrionaria de alrededor de un 20% y cuando los animales son sometidos a condiciones de choque de calor la letalidad embrionaria aumenta incluso hasta un 80%. En los animales silvestres se observa que la letalidad embrionaria disminuye con respecto al tiempo en el que se dio el pulso de estrés llegando a recuperarse a niveles normales, sin embargo en la cepa mutante esta capacidad de recuperarse no se observa. Esto sugiere que GLA-3 es necesario para que ocurra un correcto desarrollo de los ovocitos después del choque de calor promoviendo así la fertilidad después del estrés. En estudios que se

realizaron con ovocitos de mamíferos se observó que TTP co-localiza con los cromosomas meioticos desde la metafase I hasta la metafase II [45]. En los ovocitos en los cuales se eliminó la expresión de TTP se observó que la falta de esta proteína causa problemas en la expulsión el cuerpo polar, defectos en la organización del huso meiotico, y el alineamiento de los cromosomas, promoviendo la formación de óvulos con aneuploidias y afectando así la calidad de los gametos femeninos [45].

Los bajos niveles de letalidad embrionaria que se observan en condiciones regulares de crecimiento en los animales mutantes en *gla-3* puede deberse a la producción de gametos que acarrean defectos cromosómicos. En condiciones de estrés puede ocurrir que los animales mutantes en *gla-3* no son capaces de prender vías que les ayuden a contender el estrés por choque de calor, lo que se ve reflejado en el aumento de los niveles de letalidad embrionaria.

CONCLUSIONES

- *GLA-3* se requiere para inducir apoptosis en la gónada en condiciones de ayuno y choque de calor
- *GLA-3* es indispensable para la formación de gránulos en la gónada durante el ayuno y el choque de calor.
- *GLA-3* protege a las células germinales femeninas del choque de calor

PERSPECTIVAS

- Identificar los RNA mensajeros a los que se une *GLA-3* en condiciones regulares y de estrés.
- Identificar las proteínas a las que se asocia *GLA-3* en condiciones regulares y de estrés.
- Realizar una fusión de *GLA-3* con el reportero GFP para ubicar la localización de la proteína y determinar si forma parte de los gránulos de RNA en condiciones de estrés.
- Mutar los dominios de dedos de zinc que posee *GLA-3* y determinar como se afecta la formación de gránulos.
- Observar si se afecta el uso meiótico durante la progresión de la meiosis en cepas mutantes en *gla-3* ya que en mamíferos TTP se asocia con los microtúbulos durante la meiosis.
- Debido a la participación que tiene *GLA-3* en la ruta de las Map kinasas ver si en un fondo mutante en *gla-3* las distintas proteínas de esta vía: JNK, p38 y MPK-1 se ven afectadas observando su abundancia por medio de Western blot en condiciones normales y de estrés.

BIBLIOGRAFÍA

1. Donald L. Riddle, Thomas Blumenthal, Barbara J. Meyer , James R. Priess Eds. (1997). Capítulo 1: El modelo biológico. En *C. elegans* II. Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
2. Corsi A.K., Wightman B., and Chalfie M. A Transparent window in to biology: A primer on *Caenorhabditiselegans* (June 18, 2015), *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook,
3. Donald L. Riddle, Thomas Blumenthal, Barbara J. Meyer , James R. Priess Eds. (1997). Capítulo 2: El genome. En *C. elegans* II. Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
4. Donald L. Riddle, Thomas Blumenthal, Barbara J. Meyer, James R. Priess Eds. (1997). Capítulo 3: Developmental Genetics of the Germ Line. En *C. elegans* II. Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
5. Pazdernik, N. & Schedl, T. (2013). Introduction to GermCellDevelopment in *Caenorhabditis elegans*. En *Germ Cell Development in C. elegans* (1st ed., pp. 1-16). New York: Tim Schedl.
6. Lui, D. and Colaiácovo, M. (2012). Meiotic Development in *Caenorhabditis elegans*. *Germ Cell Development in C. elegans*, pp.133-170.
7. Lettre, G. & Hengartner, M. (2006). Developmental apoptosis in *C. elegans*: a complex CEDnario. *Nature Reviews Molecular CellBiology*, 7(2), 97-108. doi:10.1038/nrm1836.
8. Ransom, M., ChunWu, Y., & Xue, D. (2009). Programmed Cell Death in *C. elegans*. In *Essentials of apoptosis* (2nd ed., pp. 355-373). New York: Xiao- Ming Yin, Zheng Dong.
9. Yan, N., Chai, J., Lee, E., Gu, L., Liu, Q., He, J., Wu, J., Kokel, D., Li, H., Hao, Q., Xue, D. and Shi, Y. (2005). Structure of the CED-4–CED-9 complex provides insights in to programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 437(7060), pp.831-837.

10. Gartner et al. Germline Survival and Apoptosis (September 4, 2008), WormBook, ed. The C. elegans Research Community, WormBook,doi/10.1895/wormbook.1.145.1, <http://www.wormbook.org>.
11. Tilly, J.L., Commuting the death sentence: how oocytes strive to survive. Nat Rev Moll Cell., 2001. 2(838-848).
12. Gumieny TL, Lambie E, Hartweg E, Horvitz HR, Hengartner MO (1999) Genetic control of programmed cell death in the Caenorhabditis elegans Hermaphrodite germline. Development 126: 1011–1022.
13. Andux, S. and Ellis, R. (2008). Apoptosis Maintains Oocyte Quality in Aging Caenorhabditis elegans Females. PLoS Genetics, 4(12), p.e1000295.
14. Bailly, A. & Gartner, A. (2013). Germ Cell Apoptosis and DNA Damage Responses. En Germ Cell Development in C. elegans (1st ed., pp. 249-276). New York: Tim Schedl..
15. Salinas LS, Maldonado E, Navarro RE. (2006). Stress induced germ cell apoptosis by a p53 independent pathway in Caenorhabditis elegans. Cell Death Differ. 13:2129–2139.
16. Derry, W. (2001). Caenorhabditis elegans p53: Role in Apoptosis, Meiosis, and Stress Resistance. Science, 294(5542), pp.591-595.
17. Hofmann, E., Milstein, S., Boulton, S., Ye, M., Hofmann, J., Stergiou, L., Gartner, A., Vidal, M. and Hengartner, M. (2002). Caenorhabditis elegans HUS-1 Is a DNA Damage Checkpoint Protein Required for Genome Stability and EGL-1-Mediated Apoptosis. Current Biology, 12(22), pp.1908-1918.
18. Schumacher, B., Schertel, C., Wittenburg, N., Tuck, S., Mitani, S., Gartner, A., Conradt, B. and Shaham, S. (2005). C. elegans ced-13 can promote apoptosis and is induced in response to DNA damage. Cell Death and Differentiation, 12(5), pp.532-532.
19. Lascarez-Lagunas, L., et al., LIN-35/Rb Causes Starvation Induced Germ Cell Apoptosis via CED-9/Bcl2 Downregulation in Caenorhabditis elegans. Mol. Cell. Biol., 2014. 34(13).

20. Voronina, E., Seydoux, G., Sassone-Corsi, P., & Nagamori, I. (2011). RNA Granules in Germ Cells. *Cold Spring Harbor Perspectives In Biology*, 3(12), a002774-a002774. doi:10.1101/cshperspect.a002774
21. Anderson, P. & Kedersha, N. (2006). RNA granules. *J Cell Biol*, 172(6), 803-808. doi:10.1083/jcb.200512082
22. Krichevsky, A. and Kosik, K. (2001). Neuronal RNA Granules. *Neuron*, 32(4), pp.683-696.
23. Huelgas-Morales, G., Silva-Garcia, C., Salinas, L., Greenstein, D., & Navarro, R. (2016). The Stress Granule RNA-Binding Protein TIAR-1 Protects Female Germ Cells from Heat Shock in *Caenorhabditis elegans*. *G3 & Genes/Genomes/Genetics*, 6(4), 1031-1047. doi:10.1534/g3.115.026815
24. Kedersha, N., Cho, M. R., Li, W., Yacono, P. W., Chen, S., Gilks, N., Anderson, P. (2000). Dynamic Shuttling of Tia-1 Accompanies the Recruitment of mRNA to Mammalian Stress Granules. *J Cell Biol The Journal of Cell Biology*, 151(6), 1257-1268. doi:10.1083/jcb.151.6.1257.
25. Panas, M. D., N. Kedersha, and G. McInerney, (2015). Methods for the characterization of stress granules in virus infected cells. *Methods*.
26. Kedersha, N., Stoecklin, G., Ayodele, M., Yacono, P., Lykke-Andersen, J., Fritzler, M., Scheuner, D., Kaufman, R., Golan, D. and Anderson, P. (2005). Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. *The Journal of Cell Biology*, 169(6), pp.871-884.
27. Arribere, J. A., J. A. Doudna, and W. V. Gilbert, (2011). Reconsidering movement of eukaryotic mRNAs between polysome and P bodies. *Mol. Cell* 44: 745–758.
28. Sheth, U., and R. Parker, 2003. Decapping and Decay of Messenger RNA occur in the cytoplasmic processing bodies. *Science* 300: 805-8.
29. Olszewska, M., Bujarski, J., & Kurpisz, M. (2012). P-bodies and their functions during mRNA cell cycle: Mini-review. *Cell Biochemistry And Function*, 30(3), 177-182. doi:10.1002/cbf.2804

30. Kritikou, E.A., et al., *C. elegans* GLA-3 is a novel component of the MAP kinase MPK-1 signaling pathway required for germcell survival. *Genes &Development*, 2006. 20: p. 2279-2292.
31. Brooks, S. &Blackshear, P. (2013). Tristetraprolin (TTP): Interactions with mRNA and proteins, and current thoughts on mechanisms of action. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1829(6-7), 666-679.
32. De, J., Lai, W., Thorn, J., Goldsworthy, S., Liu, X., Blackwell, T., & Blackshear, P. (1999). Identification of four CCCH zinc finger proteins in *Xenopus*, including a novel vertebrate protein with four zinc fingers and severely restricted expression. *Gene*, 228(1-2), 133-145.
[http://dx.doi.org/10.1016/s0378-1119\(98\)00617-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0378-1119(98)00617-9)
33. Dean, J., Sully, G., Clark, A., &Saklatvala, J. (2004). The involvement of AU-richelement-binding proteins in p38 mitogen-activated protein kinase pathway-mediated mRNAs tabilisation. *Cellular Signalling*, 16(10), 1113-1121. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellsig.2004.04.006>
34. Patial, S. &Blackshear, P. (2016). Tristetraprolin as a Therapeutic Target in Inflammatory Disease. *Trends In Pharmacological Sciences*, 37(10), 811-821. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tips.2016.07.002>Ttp anfi
35. Stoecklin, G., Stubbs, T., Kedersha, N., Wax, S., Rigby, W., Blackwell, T. and Anderson, P. (2004). MK2-induced tristetraprolin: 14-3-3 complexes prevent stress granule association and ARE-mRNA decay. *The EMBO Journal*, 23(6), pp.1313-1324.
36. Mello, C., Schubert, C., Draper, B., Zhang, W., Lobel, R., &Priess, J. (1996). The PIE-1 protein and germ line specification in *C. elegans* embryos. *Nature*, 382(6593), 710-712. <http://dx.doi.org/10.1038/382710a0>
37. Guedes, S. and Priess, J.R. 1997. The *C. elegans* MEX-1 protein is present in germline blastomeres and is a P granule component. *Development* 124: 731–739.
38. Schubert, C., Lin, R., de Vries, C., Plasterk, R., &Priess, J. (2000). MEX-5 and MEX-6 Function to Establish Soma/ Germline Asymmetry in Early *C.*

- C. elegans* Embryos. *Molecular Cell*, 5(4), 671-682.
[http://dx.doi.org/10.1016/s1097-2765\(00\)80246-4](http://dx.doi.org/10.1016/s1097-2765(00)80246-4)
39. Detwiler, M., Reuben, M., Li, X., Rogers, E., & Lin, R. (2001). Two Zinc Finger Proteins, OMA-1 and OMA-2, Are Redundantly Required for Oocyte Maturation in *C. elegans*. *Developmental Cell*, 1(2), 187-199.
[http://dx.doi.org/10.1016/s1534-5807\(01\)00026-0](http://dx.doi.org/10.1016/s1534-5807(01)00026-0)
40. Shimada, M., Kawahara, H., and Doi, H. 2002. Novel family of CCCH-type zinc-finger proteins, MOE-1, -2 and -3, participates in *C. elegans* oocyte maturation. *Genes Cells* 7: 933–947
41. Sandler, H. and Stoecklin, G. (2008). Control of mRNA decay by phosphorylation of tristetraprolin. *Biochemical Society Transactions*, 36(3), pp.491-496.
42. Navarro, R. E., Shim, E. Y., Kohara, Y., Singson, A., & Blackwell, T. K. (2001). *cgh-1*, a conserved predicted RNA helicase required for gametogenesis and protection from physiological germline apoptosis in *C. elegans*; *Development*, 128(17), 3221 LP-3232. Retrieved from
<http://dev.biologists.org/content/128/17/3221.abstract>
43. Paz-Gómez, D., Villanueva-Chimal, E. and Navarro, R. (2014). The DEAD Box RNA Helicase VBH-1 Is a New Player in the Stress Response in *C. elegans*. *PLoS ONE*, 9(5), p.e97924.
44. Anderson, P. and Kedersha, N. (2008). Stress granules: the Tao of RNA triage. *Trends in Biochemical Sciences*, 33(3), pp.141-150.
45. Liu, X., Li, X., Ma, R., Xiong, B., Sun, S., Liu, H. and Gu, L. (2016). Tristetraprolin functions in cytoskeletal organization during mouse oocyte maturation. *Oncotarget*.