



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

Análisis de la estructura y función de la proteína de unión a RNA,
*GLA-3, en *Caenorhabditis elegans*.*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Licenciada en Investigación Biomédica Básica

P R E S E N T A:

Arianne Melisa Cristino Miranda

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. Rosa Estela Navarro González

CIUDAD UNIVERSITARIA CD. MX., 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo se realizó bajo la dirección de la Dra. Rosa Estela Navarro González en el Departamento de Biología Celular y 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) 101731, del Programa de Apoyo a la Innovación e Investigación Tecnológica (PAPIIT-UNAM) IN210821 y del Instituto de Fisiología Celular.

Agradecimientos al jurado:

Dr. Roberto Coria

Dr. Luis Daniel Ríos Barrera

Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco

Dr. Víctor Julián Valdés Rodríguez

Se agradece a la M. en C. Silvia Salinas Velázquez por su valiosa asistencia técnica durante la realización de este trabajo, y al M en C. Alan Anuart González Rangel por la ayuda en algunas de las técnicas presentadas en este trabajo.

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

Al personal de la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular: Dra. Laura Ongay Larios, Guadalupe Códiz Huerta y Minerva Mora Cabrera.

Al personal de la Unidad de Bioinformática del Instituto de Fisiología Celular: Dr. César Augusto Poot Hernández y Dr. Marcelino Arciniega Castro.

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.

Y de la coordinación de la licenciatura se le agradece a la Lic. Cynthia Lima Cruz, por su apoyo a lo largo de la carrera y con los trámites administrativos.

RESUMEN

En *Homo sapiens*, la familia de proteínas TTP o Tristetraprolina está compuesta por TTP, TIS11d y TIS11b. TTP se une al 3'UTR de los mRNAs ricos en adenina y uracilo (AREs) para promover su degradación mediante la desdenilación reclutando con un dominio al complejo CCR4-NOT. Los residuos requeridos para la unión entre las proteínas TTP y sitios AREs son aminoácidos que forman puentes de hidrógeno y aminoácidos aromáticos que dan soporte estructural a la unión. En *Caenorhabditis elegans*, GLA-3 es una de las proteínas homólogas a TTP debido a que ambas presentan un par de dedos de zinc tipo C₃H₁; su ausencia provoca un aumento en la apoptosis en la gónada. Más allá de que tanto TTP como GLA-3 tienen dedos de zinc, no se han estudiado otras similitudes o diferencias entre ellas. Para entender la función de GLA-3, en este trabajo realizamos una comparación de la composición y estructura de aminoácidos de los dedos de zinc de GLA-3 y algunas proteínas de la familia TTP. Encontramos que los dedos de zinc de GLA-3 no tienen conservados los aminoácidos necesarios para formar puentes de hidrógeno con los sitios ARE, tampoco los aminoácidos aromáticos o el dominio de unión a CCR4-NOT. No obstante, si tiene conservadas las cisteínas e histidinas, así como la estructura tridimensional que hacen a sus dominios dedos de zinc C₃H₁, por lo que sugerimos que GLA-3 conserva su función de unión a RNA pero no lo hace mediante el reconocimiento de sitios AREs. También decidimos determinar si la regulación de algunos transcritos blancos de TTP se conservaba en *C. elegans* por la regulación mediante GLA-3 y usando una base de datos en la que se describen varios mRNAs a los que se une TTP, en *C. elegans* buscamos homólogos de dichos transcritos los cuales posiblemente fueran regulados por GLA-3. Para determinar experimentalmente si eran regulados por GLA-3, conforme a las funciones de las proteínas codificadas por los posibles blancos, seleccionamos 9 transcritos para evaluar su expresión ante la pérdida *gla-3* y de los mRNAs probados encontramos que solo el de *lin-9* disminuía

significativamente en ausencia de *gla-3*, sugiriendo que GLA-3 lo regula positivamente, aunque sin determinar si lo hace directa o indirectamente. Decidimos buscar si LIN-9 tenía alguna función en la apoptosis y encontramos que el silenciamiento de *lin-9* por sí solo no afecta la apoptosis de las células germinales, sin embargo, el silenciamiento simultáneo de *lin-9* y *gla-3* provoca que las células germinales no incrementen sus niveles de apoptosis, permitiéndonos sugerir que LIN-9 es epistática a GLA-3.

ÍNDICE

RESUMEN.....	4
INTRODUCCIÓN	9
<i>Caenorhabditis elegans</i> como organismo modelo.....	9
Embriogénesis y desarrollo larvario	9
La gónada y línea germinal del hermafrodita adulto	11
La apoptosis en <i>C. elegans</i>	14
La apoptosis fisiológica de las células germinales	15
La proteína de unión a RNA Tristetraprolina (TTP) de mamíferos	17
La proteína de unión a RNA GLA-3 en <i>C. elegans</i> es homóloga de TTP	22
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	23
HIPÓTESIS.....	23
OBJETIVO GENERAL.....	23
OBJETIVOS PARTICULARES.....	23
MATERIALES Y MÉTODOS	24
Análisis en PONDR.....	24
Alineamientos con t-COFFEE.....	25
Predicciones con AlphaFold2	25
Alineamientos estructurales con PyMOL.....	25
Análisis en nBLAST	26
Análisis en HomoloGene	26
Análisis en AREsite2	27
Mantenimiento de cepas.....	27
Sincronización de nematodos	28
Silenciamiento mediante RNA de doble cadena (RNA de interferencia o RNAi)	28
Silenciamiento doble mediante RNA de doble cadena (Doble RNAi).....	29
Condiciones para inducir estrés por choque de calor	29
Condiciones para inducir ayuno.....	30
Montaje de animales para su visualización en el microscopio óptico	30
Lisis de muestra para extracción de RNA.....	30

Extracción de RNA total	31
Tratamiento con DNAsa I	31
Síntesis de cDNA (RT-PCR)	32
PCR en tiempo real (qPCR)	33
Conteos de progenie y letalidad embrionaria	34
Análisis estadístico de RT-qPCR	34
Análisis estadístico	34
RESULTADOS	36
Los dedos de zinc de GLA-3 no se encuentran en tándem y presentan una baja similitud con los dominios de su homólogo en humanos	36
La estructura de las proteínas GLA-3 y hTTP es principalmente desordenada	38
GLA-3 no tiene la mayoría de los residuos necesarios para formar puentes de hidrógeno con los sitios ARE, pero sí las cisteínas e histidinas para unirse a RNA	40
GLA-3 no tiene el dominio que recluta al complejo CCR4-NOT, el cuál promueve la degradación de los transcritos	41
La estructura tridimensional de los dedos de zinc C ₃ H ₁ de GLA-3 si está conservada	44
En <i>C. elegans</i> otras proteínas con dedos de zinc C ₃ H ₁ no se unen a sitios AREs	45
GLA-3 posiblemente se une y regula a 27 mRNAs	47
Los mRNAs que posiblemente son regulados por GLA-3 se clasifican en 4 grupos principales de acuerdo a su función: apoptosis, meiosis, citoesqueleto y ubiquitinación	51
mRNAs que participan en la apoptosis	54
mRNAs que participan en la meiosis	54
mRNAs que participan en funciones relacionadas al citoesqueleto	55
mRNAs que participan en el proceso de ubiquitinación	55
Otros mRNAs	56
La mayoría de los mRNAs que son posibles blancos de GLA-3 no presentan enriquecimiento de sitios AREs en su 3'UTR	56
El mRNA de <i>lin-9</i> es regulado positivamente por GLA-3	59
El silenciamiento de <i>lin-9</i> rescata la elevada apoptosis de las células germinales sin <i>gla-3</i> ...	61
<i>lin-9</i> no regula la apoptosis en el estrés por ayuno o choque de calor en las células germinales	65
DISCUSIÓN	67

El dominio de unión a CCR4-NOT no es el único que puede reclutar proteínas que promueven la desdenilación	70
La disminución en la transcripción de <i>lin-9</i> ayuda a explicar otros fenotipos mostrados en gusanos con pérdida de función de GLA-3	70
LIN-9 y su papel en las condiciones de estrés	71
CONCLUSIONES	72
PERSPECTIVAS	73
BIBLIOGRAFÍA	74
APÉNDICE 1	81
Eficiencia del RNA de interferencia.....	81

INTRODUCCIÓN

Caenorhabditis elegans como organismo modelo

Caenorhabditis elegans (*C. elegans*) es un organismo de vida libre que habita en el suelo y en la materia en descomposición en climas templados y cálidos de todo el mundo. Se alimenta principalmente de bacterias, organismos unicelulares eucariontes y levaduras (Iqbal *et al.*, 2017). Con el objetivo de estudiar la biología del desarrollo y la neurobiología, *C. elegans* fue propuesto como organismo modelo en 1963 por Sydney Brenner. (Brenner, 1974). *C. elegans* es un buen organismo modelo dado su corto ciclo de vida (3 días a 25°C), su transparencia, su fácil mantenimiento y propagación, así como su genoma completamente secuenciado y anotado (Iqbal *et al.*, 2017; Corsi *et al.*, 2018).

La población de *C. elegans* está compuesta principalmente por hermafroditas, aunque también hay machos que se presentan con una frecuencia del 0.1-0.2%. En estos organismos, el sexo está determinado por la proporción de cromosomas sexuales con respecto a la de autosomas. Los hermafroditas tienen 5 pares de autosomas y dos cromosomas sexuales XX. Los machos tienen el mismo número de autosomas pero sólo un cromosoma sexual X (Zarkower *et al.*, 2006). Hacer genética de estos organismos en el laboratorio es posible gracias a la fertilización cruzada (un macho con un hermafrodita). Los hermafroditas tienen la capacidad de auto-fertilizarse, esto permite que a partir de un solo animal se pueda generar una población completa, cuya progenie sea idéntica, y que se puedan mantener mutaciones con homocigosis (Corsi *et al.*, 2018).

Embriogénesis y desarrollo larvario

La fertilización ocurre en la espermateca, en donde los ovocitos pueden ser fertilizados por un espermatozoide del propio hermafrodita o por uno de un macho

(Figura 1). Treinta minutos posteriores a la fertilización, el cigoto desarrolla una membrana vitelina, dos de quitina y una de colágena que lo hacen impermeable y le permitirán su desarrollo fuera del útero (Altun & Hall, 2009). La embriogénesis de este organismo se divide principalmente en dos etapas: proliferación y organogénesis/morfogénesis. La etapa de proliferación (0-330 min post-fertilización a 22°C) abarca desde la primera división mitótica hasta que el embrión está formado por aproximadamente 558 células (Altun & Hall, 2009). Al final de la etapa de proliferación, el embrión cuenta con las tres capas germinales. Durante la etapa de organogénesis/morfogénesis (5.5-6 a 12-14 horas) las células se diferencian sin divisiones adicionales. En esta etapa el embrión se elonga y sus tejidos y órganos se forman (Altun & Hall, 2009).

Además de la embriogénesis el ciclo de vida de *C. elegans* cuenta con cuatro estadios larvarios y la adultez. Cuando el embrión presenta 558 núcleos, éste eclosiona y comienzan sus estadios larvarios. (Altun & Hall, 2009). Estos inician con la etapa L1 que tiene una duración de 16 horas aproximadamente, durante este periodo comienza el desarrollo de los sistemas reproductivo y nervioso (Kimble & Hirsh, 1979). La etapa larvaria L2 tiene una duración aproximada de 12 horas, aquí el sistema nervioso y reproductivo continúan su desarrollo, además en esta etapa las células somáticas y germinales se organizan adoptando la futura estructura de la gónada. (Altun & Hall, 2009; Kimble & Hirsh, 1979). Durante la etapa L3 y la primera parte de L4, se forman los precursores de gónada somática que van a dar origen a la gónada anterior y posterior, las espermatecas y el útero. Además, los brazos de las gónadas comienzan a reorientarse y los precursores de la vulva comienzan a generar células terminales vulvales a principios del estadio L4 (Kimble & Hirsh, 1979). Al término del estadio L3 se comienzan a formar las espermatidas y durante el estadio L4 inicia la espermatogénesis (Hirsh *et al.*, 1976). Una vez que termina el estadio L4, los nematodos adultos comienzan

con su periodo fértil, el cual dura de 3 a 4 días y durante este tiempo los nematodos hermafroditas pueden poner aproximadamente 300 embriones (Altun & Hall, 2009).

La gónada y línea germinal del hermafrodita adulto

Los nematodos hermafroditas presentan una gónada en forma tubular, conformada por dos brazos idénticos en forma de U que están recubiertos por células epiteliales conocidas como células de la vaina. Estas células recubren a las células germinales y cuando una de ellas sufre apoptosis, el cuerpo apoptótico producido es fagocitado por una célula de la vaina vecina (Gumienny *et al.*, 1999). Debido a esta propiedad, se utiliza el método de marcaje mediante proteínas fluorescentes expresadas en células de la vaina, tal es el caso de CED-1, para visualizar cuerpos apoptóticos (Schumacher *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2001).

Las células germinales se encuentran parcialmente rodeadas por las membranas plasmáticas y su citoplasma está conectado mediante un canal citoplasmático central conocido como raquis, es decir, es un sincicio. Las células germinales permanecen en sincicio hasta que los ovocitos comienzan a madurar y se separan de él (Hirsh *et al.*, 1976; Riddle *et al.*, 1997). Cada brazo de la gónada está compuesto tanto por células pertenecientes al linaje germinal, como somático. Asimismo, se le conoce como punta proximal a la parte más cercana al útero, vulva y espermateca, y como punta distal a la región más alejada del útero y que está más cercana a la célula de la punta distal (DTC), la cual permite el mantenimiento de la línea germinal (Wong *et al.*, 2012).

Posterior a la fertilización, el plasma germinal enriquecido de proteínas y RNAs mensajeros (mRNA), propios de este linaje, se polariza en la región posterior del embrión de una célula, lo cual permite que en las divisiones asimétricas posteriores el plasma

germinal se segregue al blastómero P1 y al blastómero P2. En el estadio previo a las 28 células, ocurre la última división asimétrica a partir de la cual se genera el blastómero somático y la célula germinal primordial denominada P4. Durante la gastrulación (100 células), la división simétrica de P4 da origen a las células Z2 y Z3, las cuales no se vuelven a dividir en el desarrollo embrionario (Sulston *et al.*, 1983). En este estadio, la célula primordial somática también se divide y forma a las células Z1 y Z4 quienes en estadios posteriores darán origen a la DTC y a los precursores somáticos de la línea germinal (Kimble & Hirsh, 1979). Después de la eclosión del embrión durante la mitad del estadio L1, las células germinales comienzan a dividirse y al finalizar el estadio L2, las células somáticas rodean a las células germinales y las células de la punta distal se posicionan. Esta interacción promueve el destino proliferativo de las células germinales y controla el crecimiento morfogénico de la gónada. Durante el estadio L3 continúa la proliferación celular y se forma el asa de la gónada, la cual termina de formarse en el estadio L4. En L4 se termina la espermatogénesis y las células germinales que se encuentran en la región proximal comienzan a diferenciarse a ovocitos (Kimble & White, 1981; Pazdernik *et al.*, 2013).

La pérdida de la interacción de las células germinales con la DTC permite que inicie la meiosis, la cual ocurre en la zona de transición. En la zona del asa, los núcleos entran en diploteno en donde el DNA comienza a compactarse y en la región más proximal se lleva a cabo la diacinesis, en esta etapa la meiosis se detiene en la profase I y se reanuda hasta que el ovocito más proximal entra en contacto con la proteína principal espermiática, que es secretada por espermatozoides (Huelgas-Morales & Greenstein, 2018). Finalmente, la fertilización ocurre cuando los ovocitos maduros pasan a través de la espermateca, y una vez fertilizados son depositados en el útero (Kimble & Hirsh, 1979; Pazdernik *et al.*, 2013).

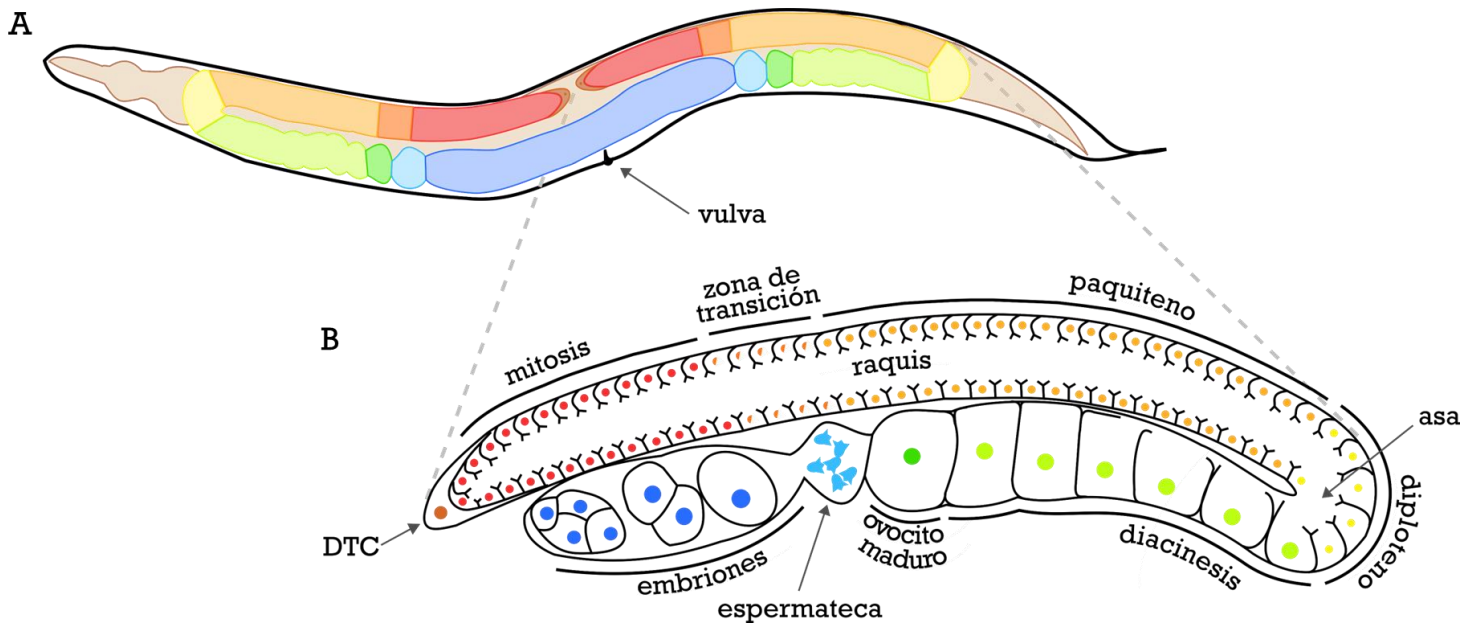


Figura 1: La gónada del gusano hermafrodita adulto de *C. elegans*. A) Representación de la anatomía general de un gusano adulto hermafrodita. La gónada del gusano adulto cuenta con dos brazos idénticos en forma de U, conectados por el útero (azul oscuro), donde se depositan los embriones, en el centro del útero se puede encontrar la vulva, por la cual los embriones son expulsados al medio. B) Se muestra el esquema de uno de los brazos de la gónada. Las células germinales se encuentran envueltas por membranas parciales, formando un sincicio que comparte un citoplasma central común, llamado raquis. En la zona mitótica distal (la zona más alejada del útero), las células se mantienen en proliferación debido a la señalización dada por la célula de la punta distal o DTC (café), estas progresan hacia la zona de transición (naranja) donde pierden el contacto con la DTC y entran a meiosis. La etapa de paquíteno (amarillo) se extiende a lo largo de la gónada hasta la región del asa, en donde las células entran en diploteno (amarillo claro). Los ovocitos entran en diacinesis (verde claro) y se arrestan en la profase I de la meiosis en la parte proximal de la gónada, luego el ovocito más proximal (verde oscuro) experimenta la maduración meiótica (salida de la profase I) en respuesta a una señal producida por la principal proteína espermática (MSP), la cual es secretada por los espermatozoides, que se encuentran contenidos en la espermateca (azul claro). En café claro se representa la faringe e intestino.

La apoptosis en *C. elegans*

La apoptosis es un fenómeno que se caracteriza por la condensación de la cromatina, reducción en el volumen celular, fragmentación del ADN y la pérdida del potencial de membrana mitocondrial (Lettre *et al.*, 2004). Las células apoptóticas forman pequeños cuerpos redondos, resultado de la condensación celular progresiva, que generalmente son fagocitados por células vecinas (Kroemer *et al.*, 2009). En diversos sistemas la apoptosis es requerida para el desarrollo y homeostasis de tejidos. No obstante, también puede ser inducida en patologías y condiciones de estrés (Darland-Ransom *et al.*, 2009; Murphy *et al.*, 2003). Durante la vida del nematodo, la apoptosis ocurre durante tres diferentes etapas: 1) La apoptosis somática, como su nombre lo indica, ocurre en los tejidos somáticos durante el desarrollo embrionario; 2) la apoptosis post-embrionaria, la cual ocurre en el estadio L2 y (Sulston *et al.*, 1983) 3) la apoptosis fisiológica, la cual ocurre en la línea germinal de animales hermafroditas durante la ovogénesis (Gumienny *et al.*, 1999). La apoptosis a su vez tiene tres fases distintas: inducción, ejecución y eliminación. La fase de inducción en el nematodo es llevada a cabo por la maquinaria central apoptótica, CED-9, CED-4 y CED-3 (la única caspasa efectora), así como por diversas proteínas inductoras que varían conforme al estímulo que desencadena la apoptosis (Conradt *et al.*, 2016). Durante la fase de ejecución, la mayoría de las células apoptóticas experimentan condensación de cromatina y reorganizan su citoesqueleto. Generalmente toman una forma redonda y pierden adhesión a los tejidos circundantes a medida que desarrollan una red de actino-miosina cortical contráctil (Povea-Cabello *et al.*, 2017).

Como se mencionó anteriormente, la maquinaria central de la apoptosis consiste en 3 proteínas principales, siendo la primera la proteína anti-apoptótica CED-9 que se encuentra en la membrana externa mitocondrial (homóloga a BCL2) y a su vez está unida a un dímero de CED-4 (homólogo de APAF1), evitando así su liberación y la

subsecuente activación de la caspasa CED-3 (Huang *et al.*, 2013). Para que se pueda llevar a cabo la apoptosis es necesario que la proteína CED-9 sea desactivada. El mecanismo por el cual ocurre esta desactivación varía, sin embargo, el más estudiado es por medio de la proteína pro-apoptótica EGL-1 (una proteína con un solo dominio BH3). Esta proteína interactúa con CED-9 por medio de su dominio BH3, provocando un cambio conformacional que libera a CED-4. Posteriormente CED-4 puede formar el apoptosoma, que está conformado por un tetrámero de CED-4 y proCED-3. Finalmente, CED-3 es liberado y activado por una ruptura proteolítica, llevando a cabo la apoptosis (**Figura 2**) (Darland-Ransom *et al.*, 2009; Lettre *et al.*, 2006).

La apoptosis fisiológica de las células germinales

En condiciones normales durante la ovogénesis en la gónada de *C. elegans* se pueden encontrar una gran cantidad de células germinales en apoptosis, a esta muerte se le ha llamado "apoptosis fisiológica". Este fenómeno está presente en diversos organismos, durante el desarrollo de la línea germinal femenina, como mamíferos, insectos y nematodos. (Tiwari *et al.*, 2015; Nezis *et al.*, 2000; Gartner *et al.*, 2018). En el caso particular de *C. elegans*, la apoptosis fisiológica ocurre en el asa de la gónada, cuando las células germinales salen de paquiteno; para que ocurra la apoptosis en esta zona, es necesaria la activación de la vía de las MAP kinasas por medio de MPK-1 (Rutkowski *et al.*, 2011). La apoptosis fisiológica en *C. elegans* se encarga de eliminar cerca de la mitad de las células germinales durante la ovogénesis, regulando la calidad de los futuros ovocitos (Andux & Ellis, 2008; Pazdernik *et al.*, 2013). Actualmente existen dos hipótesis que intentan explicar la muerte de estas células: la primera menciona que aquellas células que tienen defectos, en especial los cromosómicos, son identificadas y eliminadas para que solo las células "sanas" puedan completar la ovogénesis (Andux & Ellis, 2008). La segunda propone que todas aquellas células que sufren apoptosis tienen

función de célula nodriza, es decir, donan componentes como proteínas y mRNA para que otras puedan madurar y desarrollarse (Andux & Ellis, 2008; Wolke et al., 2007).

La apoptosis en la gónada del hermafrodita también es ejecutada por la maquinaria central de apoptosis, sin embargo a diferencia de la apoptosis que ocurre en las células somáticas, la proteína EGL-1 no siempre participa en la inactivación de CED-9 (Gumienny *et al.*, 1999). La subfamilia SynMuvB (por el inglés de *synthetic multi-vulva*) contiene proteínas que regulan el desarrollo vulvar en *C. elegans* (Fay *et al.*, 2007). Se sabe que la apoptosis fisiológica es activada parcialmente por la proteína LIN-35 (proteína perteneciente a la subfamilia SynMuvB), la cual reprime la expresión del gen *ced-9*. Las mutantes en *lin-35* presentan un incremento en la expresión de *ced-9* lo cual

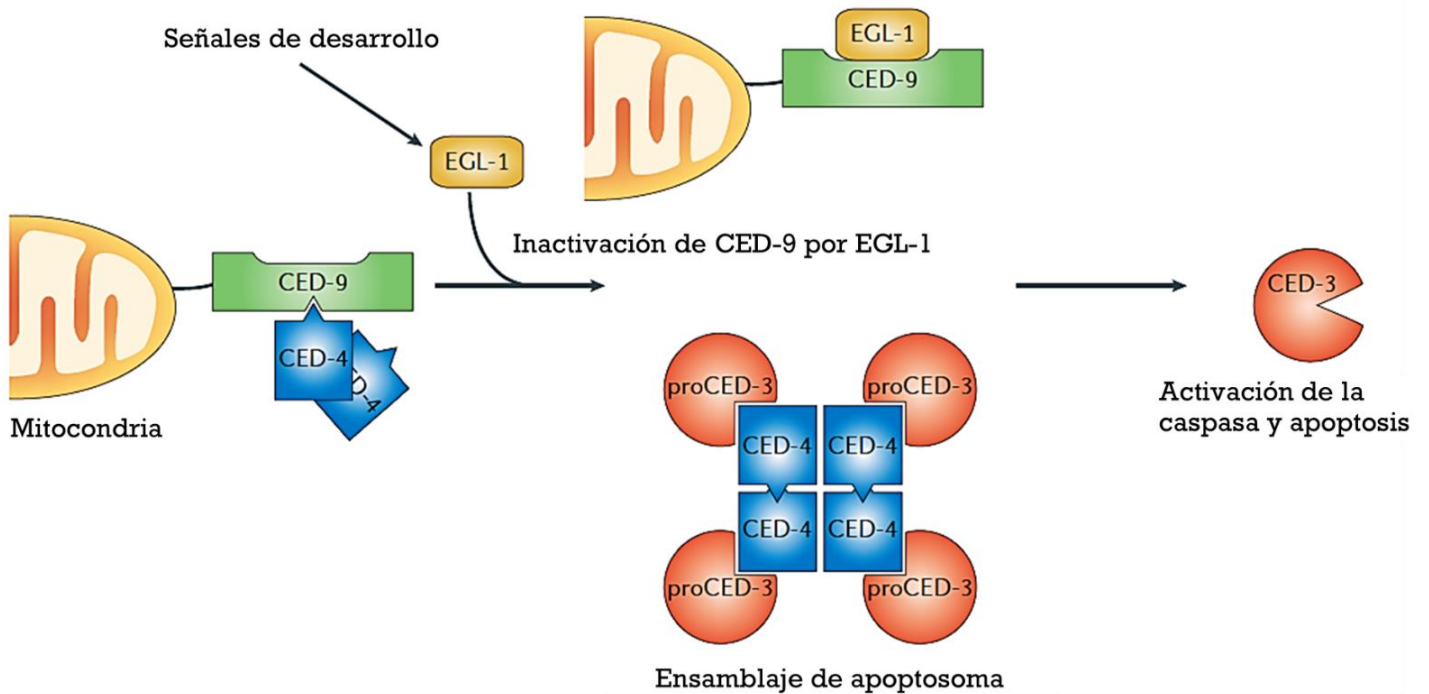


Figura 2. Modelo del mecanismo de la formación del apoptosoma en células somáticas de *C. elegans*. En las células que están destinadas a morir por apoptosis, el complejo conformado por las proteínas CED-9-CED-4 es disociado por la interacción de la proteína pro-apoptótica EGL-1, la cual al unirse a CED-9 libera a CED-4. Posteriormente, dos dímeros de CED-4 se unen formando un tetrámero de CED-4 que se unen a las moléculas pro-CED-3, lo que lleva a una escisión proteolítica de CED-3 y provoca la activación de la caspasa efectora, lo que provoca apoptosis. Modificado de Lettre *et al.*, 2006.

promueve que la apoptosis fisiológica se vea disminuida (Schertel & Conradt, 2007). Varios estímulos externos también pueden activar la apoptosis en la línea germinal tales como el daño al ADN, la infección por patógenos, así como diversos tipos de estrés (Ermalaeva *et al.*, 2013). En el caso de daño a DNA la apoptosis es activada por medio del homólogo de p53, CEP-1, quien a su vez activa transcripcionalmente a EGL-1 (Schumacher *et al.*, 2005). Por otro lado, la apoptosis inducida por choque de calor y estrés oxidante no es regulada por EGL-1, y desconocemos la vía que inactiva a CED-9, sin embargo, este tipo de muerte es activada por vía de las MAP cinasas MEK-1 Y SEK-1 (Salinas *et al.*, 2006). La proteína EGL-1 tampoco participa en la apoptosis causada por ayuno, en este caso se ha demostrado que la expresión de LIN-35 aumenta y ésta a su vez reprime la expresión de *ced-9* (Lascarez-Lagunas *et al.*, 2014).

La proteína de unión a RNA Tristetraprolina (TTP) de mamíferos

La proteína Tristetraprolina, también conocida como TTP, ZFP36, Nup475, GOS24 o TIS11, es el miembro fundador de la familia de proteínas TTP (Kontoyiannis *et al.*, 2018; Kritikou *et al.*, 2006; Baou *et al.*, 2009). Los miembros de esta familia de proteínas han sido descritos en mamíferos (Stoecklin *et al.*; 2008), nematodos (Kritikou *et al.*; 2006), levaduras (Ma *et al.*; 1995), insectos (Choi *et al.*; 2014), anfibios (Lai *et al.*; 2000) e incluso plantas (Pomeranz *et al.*; 2010). Esta familia se caracteriza por la presencia de uno o más dominios de dedos de zinc (ZF) de tipo C₃H₁, es decir, contienen tres residuos de cisteína (C) y uno de histidina (H) y presentan una secuencia consenso que corresponde a C-X₈-₁₀-C-X₅-C-X₃-H, donde X se refiere a cualquier aminoácido (Varnum *et al.*, 1989). TTP se une a los 3'UTR de mRNAs que contienen secuencias ricas en adenina y uracilo, conocidas como sitios AREs y mediante esta unión pueden regular negativamente la

estabilidad de sus mRNAs blanco y promover su degradación al reclutar a otras proteínas (Saini *et al.*, 2020).

En humanos hay tres miembros que forman esta familia: 1) la proteína de dedo de zinc 36 (ZFP36) que es la propia TTP; 2) la proteína 1 de tipo dedo de zinc 36, conocida como ZFP36L1 o TIS11b y 3) la proteína 2 de tipo dedo de zinc 36, conocida como ZFP36L2 o TIS11d (Saini *et al.*, 2020). Hay un cuarto miembro, la proteína 3 de tipo dedo de zinc 36, conocida como ZFP36L3 que está restringida a roedores (Gingerich *et al.*, 2016). TTP se encuentra compuesta de tres dominios, los dos dedos de zinc antes mencionados y un dominio C-terminal de unión a NOT-1 (CNB) (Blackshear *et al.*, 2002; Lai *et al.*, 2019), este último, como su nombre lo menciona, tiene la función de reclutar al complejo CCR4-NOT1, el cual lleva a cabo la desdenilación y subsecuente degradación de los mRNA que se encuentren unidos a TTP (Sandler *et al.*, 2011).

Además de los 3 dominios que conforman a TTP, esta familia de proteínas en su mayoría está compuesta por regiones intrínsecamente desordenadas, también conocidas como IDRs (Ngoc *et al.*, 2014; Dyson *et al.*, 2012), las cuales son regiones de las cadenas de polipéptidos que no adoptan una estructura plegada única sino que se interconvierten entre muchas conformaciones no globulares (Mittag *et al.*, 2018). Las IDRs se han visto implicadas en la formación de gránulos ribonucleoprotéicos (gránulos RNP) debido a que muchas de las proteínas que forman a estos gránulos son proteínas de unión a RNA (Mittag *et al.*, 2018). Tal es el caso de TTP en mamíferos (humanos y ratones) que forma parte de dos tipos de gránulos RNP, los gránulos de estrés y los cuerpos de procesamiento (Chang & Tan, 2009). Se ha determinado que las IDRs contribuyen a la formación de gránulos RNP de dos formas principales 1) las IDRs pueden interactuar con IDRs de proteínas del mismo tipo, con IDRs de otras proteínas o incluso con dominios bien plegados (Brady *et al.*, 2017; Burke *et al.*, 2015; Vernon *et al.*,

2018) y 2) dentro de las IDRs pueden encontrarse tramos cortos que formen estructuras secundarias locales que permitan la interacción entre proteínas del mismo tipo (Conicella *et al.*, 2016).

Por otro lado, actualmente se conocen 137 mRNAs que se unen y son degradados por mTTP, todos muestran enriquecimiento de sitios AREs en el 3'UTR. El 44% de estos mRNAs presentan nonámeros (9 nt) de AREs, que son considerados como los sitios canónicos de unión a TTP, y el 96% presenta al menos un péntamero (5 nt) de AREs, estos pueden encontrarse juntos en el 3'UTR y asemejarse a los nonámeros (Stoecklin *et al.*, 2008). Los transcritos blancos de TTP codifican un amplio espectro de proteínas involucradas en una variedad de procesos (según resultados de *Gene Ontology*), dentro de los cuales se encuentran relacionados con desarrollo, unión a actina, progresión del ciclo celular, actividad de factor de crecimiento, pero particularmente transcritos con función inmunoreguladora, tales como TNF- α , IFN- γ , GM-CSF, IL-2, IL-6, IL-12, entre otros (Stoecklin *et al.*, 2008; Sanduja *et al.*, 2012).

Los dominios de dedos de zinc le permiten a TTP unirse a la distinta variedad de sitios AREs en el 3'UTR de los transcritos (Schoenberg *et al.*, 2012). Se ha demostrado por medio de resonancia magnética nuclear que diversos puentes de hidrógeno entre los dedos de zinc y los AREs son necesarios para la unión de los mRNA a TIS11d de humano. Los 15 puentes de hidrógeno, descritos a continuación, parecen ser los encargados del reconocimiento entre AREs y TIS11d. El puente de hidrógeno en los uracilos en posición 6 y 2 con el ácido glutámico 157, glutamina 175, ácido glutámico 195 e histidina 213; entre las adeninas en posición 7 y 3 con el ácido glutámico 157, arginina 160 y arginina 198; entre los uracilos en la posición 8 y 4 con la cisteína 174, glutamina 175, cisteína 212 e histidina 213 y en los uracilos en la posición 9 y 5 con la lisina 169 y prolina 207 (Hudson *et al.*, 2004). La formación de estos puentes de hidrógeno es la razón

por la cual la secuencia ARE óptima para la unión de los miembros de la familia TTP es UAUUUAUU/UUAUUUAU es decir, nonámeros (9 nt) de AREs (Stoecklin *et al.*, 2008).

De manera estructural, las tres cisteínas, la histidina y los dos aminoácidos aromáticos en los dedos de zinc (generalmente fenilalanina y tirosina) parecen jugar un papel importante en el reconocimiento del sitio ARE, pues una sola mutación que sustituya alguno de los aminoácidos aromáticos por otro no aromático o la mutación de alguna cisteína/histidina de cualquiera de los dos dedos de zinc, inhibe el reconocimiento de sitios AREs y su unión a mRNAs blancos (Lai *et al.*, 2018; Lai *et al.*, 2014, Lai *et al.*, 2002 y Lai *et al.*, 1999).

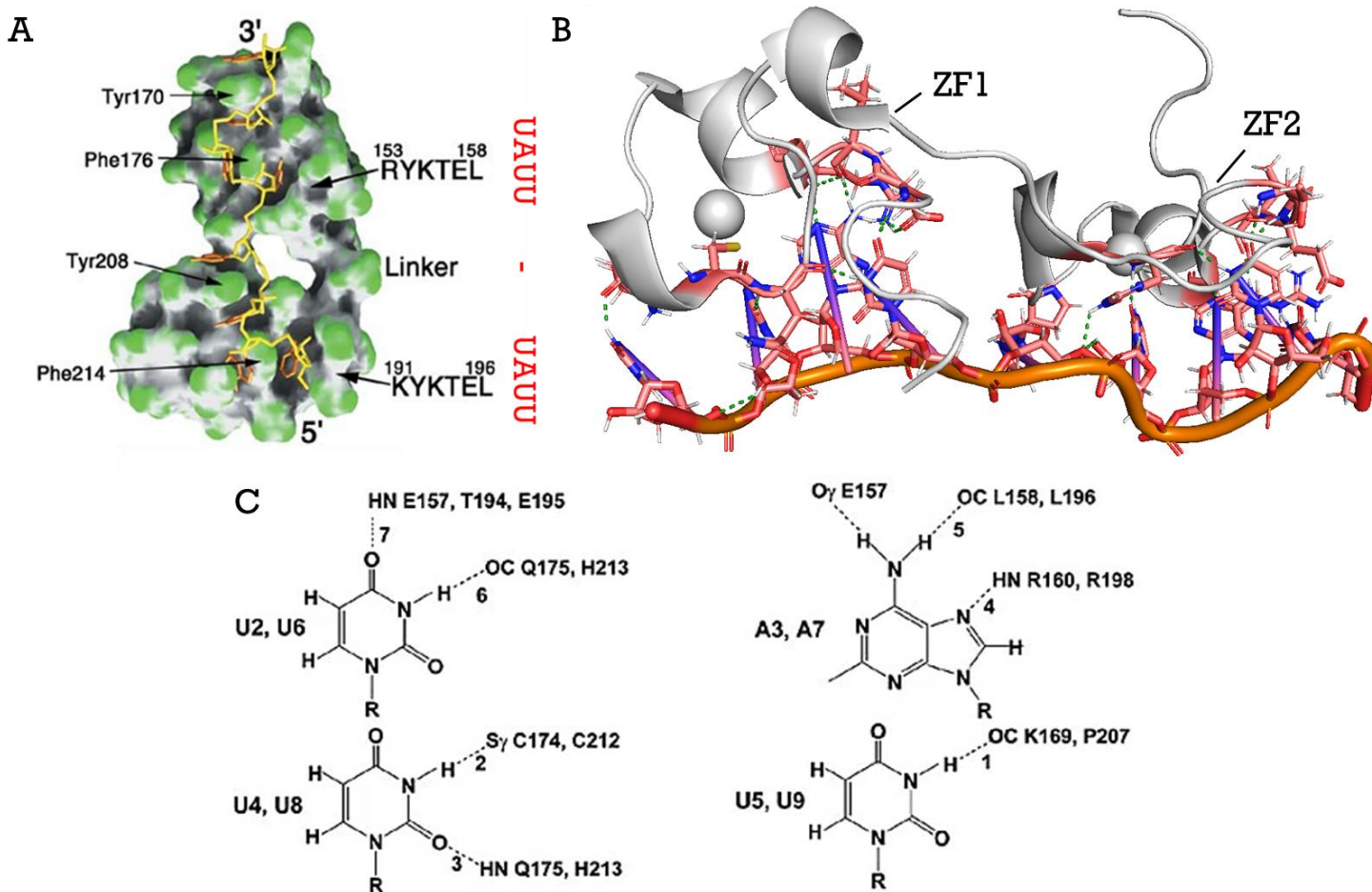


Figura 3: Modelo del reconocimiento molecular de los sitios AREs por hTIS11d. A) Se muestra en color verde y blanco la superficie de contacto molecular de hTIS11d, en amarillo se observa el esqueleto de aminoácidos perteneciente a los dedos de zinc. Se resaltan los aminoácidos aromáticos que se ha descrito, tiene un papel estructural en el reconocimiento de los sitios AREs. También en color rojo se representan los nucleótidos del sitio ARE reconocidos por los dedos de zinc. Los sitios preferentes para la unión de hTIS11d, UUAUU/UAUUU y UUAUUUAUU/UAUUUAUUU (nonámeros y pentámeros). Modificado de Hudson *et al.*, 2004. B) Representación de la interacción molecular entre los dedos de zinc y los nucleótidos, en verde se observan los 15 puentes de hidrógeno, en rojo las moléculas de oxígeno, en blanco los hidrógenos, en azul los nitrógenos y en color salmón el esqueleto de carbono. C) Esquema representativo de los 15 puentes de hidrógeno formados entre el sitio ARE y los dedos de zinc de hTIS11d. Se muestra con detalle los átomos implicados en la formación de los puentes de hidrógeno. Modificado de Hudson *et al.*, 2004.

La proteína de unión a RNA GLA-3 en *C. elegans* es homóloga de TTP

El *C. elegans* cuenta con al menos tres proteínas similares a TTP, incluidas POS-1 y MEX-5, que están involucradas en la determinación del destino celular durante el desarrollo embrionario temprano (Schneider *et al.*, 2003); también se conoce a OMA-1, que tiene un papel importante en la maduración de los ovocitos (Detwiler *et al.*, 2001). En este trabajo, nos enfocaremos al estudio de GLA-3 de *C. elegans*, homólogo de TTP determinado por el motivo consenso C-X₈₋₁₀-C-X₅-C-X₃-H presente en sus dedos de zinc. GLA-3 presenta tres isoformas que son expresadas en el embrión temprano, en la gónada de la larva L4 y el adulto (desde la región distal hasta el asa de la gónada) (Kritikou *et al.*, 2006). En ensayos donde los gusanos presentan pérdida de función de GLA-3, se observa un incremento en la apoptosis de las células germinales y un retraso en el paquiteno durante la meiosis, así como defectos graves en la diferenciación de los ovocitos, lo que lleva a una reducción del número de crías por gusano. Sin embargo, este aumento en la apoptosis no se observa en células somáticas (Kritikou *et al.*, 2006; Morales-Oliva, 2020). Por otro lado, también se ha demostrado que GLA-3 actúa como un regulador negativo e interactúa físicamente con MPK-1, un componente de la cascada de señalización de las MAPK, siendo esta vía de señalización esencial para la progresión del paquiteno y la entrada posterior en diploteno, durante la ovogénesis (Kritikou *et al.*, 2006). Además, de manera parecida a TTP, se ha demostrado que GLA-3 forma parte y es necesaria para la formación de gránulos de estrés en *C. elegans* (Silva-García *et al.*, 2013), sin embargo, aún no ha sido estudiado si es una proteína rica en regiones intrínsecamente desordenadas.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Aunque se conoce de la existencia de GLA-3 desde 2006, no se sabe más allá del hecho de que TTP y GLA-3 tienen dominios de dedos de zinc tipo C_3H_1 . A pesar de que es fundamental saber la composición de aminoácidos de dichos dominios para conocer si pueden o no unirse a sitios AREs, no se han realizado estudios que determinen las diferencias y similitudes entre los dominios de estas proteínas. También se desconoce si GLA-3 puede unirse a sitios AREs como TTP o si tiene otro motivo de unión, e incluso no se han buscado los posibles blancos de GLA-3. Por lo tanto, para entender la función de GLA-3 en *C. elegans* nos propusimos estudiar *in silico* la estructura de GLA-3, de sus dedos de zinc y comparar con lo reportado de TTP, así como encontrar posibles mRNAs blancos de GLA-3 y estudiar su función.

HIPÓTESIS

Los dominios de dedos de zinc de GLA-3 tienen conservados los aminoácidos y estructura tridimensional con respecto a TTP de humano, por lo que GLA-3 podría unirse a sitios AREs y regular transcritos homólogos a los blancos de TTP.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar la estructura de GLA-3 y de sus dedos de zinc, así como identificar mRNAs que sean regulados por esta proteína, por métodos *in silico* y su validación experimental.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Estudiar *in silico* las características estructurales de GLA-3, y compararlas con las de TTP.

2. Comparar los dominios de dedos de zinc de GLA-3 y TTP para determinar su similitud.
3. Identificar mediante análisis *in silico* a los mRNAs de *C. elegans* a los que posiblemente se une GLA-3.
4. Mediante un análisis en la literatura explorar si los mRNAs encontrados podrían tener alguna función en la gónada de *C. elegans*.
5. Estudiar la expresión de los mRNAs seleccionados en animales silvestres y mutantes en *gla-3*.
6. Si la expresión de alguno de los transcritos del objetivo 5 cambia de manera significativa, se estudiará su función.

MATERIALES Y MÉTODOS

Análisis en PONDR

PONDR es un predictor de regiones desordenadas que cuenta con distintos algoritmos para su elección. Utilizamos los algoritmos VSL2 y VL3 debido a que han sido entrenados con regiones desordenadas tanto largas como cortas (Molecular Kinetics Inc, 2007). Se ha descrito que estos son dos de los algoritmos con más precisión en la predicción de regiones desordenadas cortas y largas (Uversky & Dunker, 2010). PONDR se puede utilizar desde el siguiente enlace: <http://www.pondr.com/>

Alineamientos con t-COFFEE

Este recurso permite hacer alineamientos entre proteínas, DNA o RNA. Utilizamos la función para proteínas, permite utilizar diferentes herramientas de alineación. Empleamos m-COFFEE, que combina varios alineadores y muestra resultados de alineamiento con respecto a la secuencia de aminoácidos. También utilizamos EXPRESSO, que permite hacer alineamientos con base en la estructura tridimensional de la secuencia dada. T-COFFEE se puede encontrar en el siguiente enlace: <https://tcoffee.crg.eu/>

Predicciones con AlphaFold2

AlphaFold2, es un programa que predice la estructura tridimensional de las proteínas con un intervalo de confianza del hasta 95% (Jumper *et al.*, 2021). Tiene una base de datos, donde se pueden encontrar diversas predicciones de proteínas; también se puede descargar el código para hacer predicciones de proteínas no encontradas en la base de datos o dominios específicos. Utilizamos el código para correr las predicciones de dominio perteneciente a las proteínas de nuestro interés. El código se puede utilizar desde el siguiente enlace:

<https://colab.research.google.com/github/sokrypton/ColabFold/blob/main/AlphaFold2.ipynb#scrollTo=sztQyz29DIC>

Alineamientos estructurales con PyMOL

Para comparar la estructura tridimensional de los dominios de dedos de zinc de hTIS11d, hTTP y GLA-3, y así poder observar las similitudes y diferencias, utilizamos a PyMOL. Para los alineamientos, seleccionamos las secuencias de

aminoácidos de nuestro interés, luego nos dirigimos al menú “Action” para posteriormente ir a “Align”, luego seleccionamos la opción de “Align to selection”. Finalmente obtuvimos un alineamiento tridimensional entre los dominios/proteínas que deseábamos.

Análisis en nBLAST

Herramienta básica de búsqueda de alineación local de nucleótidos o por sus siglas en inglés nBLAST, es un programa desarrollado por el Instituto Nacional de Salud (NIH). Actualmente es de libre acceso y se puede entrar por medio de la siguiente liga (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). nBLAST permite hacer la búsqueda de secuencias de nucleótidos homólogas a la secuencia que se le proporciona el programa.

La búsqueda de mRNAs homólogos se realizó utilizando el identificador (ID) de los mRNAs de unión a TTP reportado en Stoecklin *et al.*, 2008. Se corrió el análisis en la base de secuencias estándar de *C. elegans*, en la modalidad “somewhat similar sequences”, debido a la distancia entre *C. elegans* y *Mus musculus*, de donde surgen nuestras secuencias de búsqueda (query). Posteriormente, se eligieron aquellas secuencias que tuvieran valor-e mayor o igual a 1×10^{-10} y un porcentaje de identidad de al menos 60%; si la secuencia no cumplía con estas características, no se consideró como homóloga.

Análisis en HomoloGene

Es una herramienta del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) de acceso gratuito (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/homologene>), actualmente es utilizada para encontrar automáticamente homólogos proteicos. Esta herramienta fue utilizada para corroborar los resultados obtenidos por nBLAST. Se corrió la búsqueda de los

homólogos utilizando el ID de los mRNAs de unión a TTP reportado en Stoecklin *et al.*, 2008, donde surgen los homólogos proteicos identificados y ordenados del más al menos parecido.

Análisis en AREsite2

AREsite2 es un recurso en línea que permite visualizar los sitios AREs en los transcritos de humano, ratón, pez cebra, mosca de la fruta y *C. elegans* (Fallmann et al, 2016). Para realizar nuestro análisis, buscamos todos los motivos ARE en la región 3'UTR de cada transcrito a analizar (**Figura 2**). El recurso en línea se puede encontrar en el siguiente enlace: <http://rna.tbi.univie.ac.at/AREsite2/welcome>

Mantenimiento de cepas

Los nematodos se mantuvieron en cajas Petri con medio NGM-Lite sólido (NaCl 34 mM, NaH₂PO₄ 25 mM, Na₂HPO₄ 3.5mM, agar 59 mM, colesterol 0.02 mM y bactotripton 4%), el cual fue esterilizado y posteriormente vaciado en cajas Petri. Una vez que el medio se encontraba gelificado, se le agregó 250 µl de un cultivo de *E. coli* OP50-1, el cual se preparó previamente mediante la inoculación de las bacterias en medio Luria Bertani (LB) con estreptomycin (50 µl/ µg) durante 12 horas a 37°C en agitación (250 r.p.m). Las cepas utilizadas se encuentran enlistadas en la Tabla 2, las cuales se mantuvieron a 20°C.

Cepa	Genotipo
N2	Silvestre
WS2974	<i>gla-3</i> (ep312)
CB3203	<i>ced-1</i> (e1735)
MT112	<i>lin-9</i> (n112)
DG4230	<i>gla-3a</i> (<i>tn1734</i> [<i>gfp::3xflag::gla-3a</i>])

Sincronización de nematodos

Para todos los experimentos, se utilizaron nematodos adultos de un día los cuales se obtuvieron mediante sincronización. Se utilizaron cajas Petri con nematodos grávidos (aproximadamente 500 nematodos), los cuales fueron colectados con buffer M9 y transferidos a un tubo Eppendorf. Se agregaron 200 μL de NaOH (5N) y 400 μL de cloro comercial, los nematodos junto con esta mezcla se agitaron durante 5 min en un vortex con el objetivo de romperlos y colectar los embriones. Posterior a la agitación, se realizaron 5 lavados con el amortiguador M9, centrifugando por 1 minuto en una nanocentrífuga y resuspendiendo con 1 ml de M9. Al término de los lavados, el botón con los embriones se pasó a un tubo estéril y añadiendo 1 mL de M9 y se mantuvieron a 20°C toda la noche.

Silenciamiento mediante RNA de doble cadena (RNA de interferencia o RNAi)

Los experimentos de silenciamiento se realizaron mediante la alimentación de los nematodos con RNA de doble cadena (dsRNA) (Kamath *et al.*, 2001) para lo cual se utilizaron las clonas de la biblioteca Open Biosystems (Alabama, EU). Esta biblioteca contiene bacterias de la cepa HT115, la cual carece de RNAasa III, que contienen un plásmido con la secuencia del gen de interés a silenciar. Como control se utilizó el plásmido vacío. A partir de la biblioteca, se tomó con un palillo una pequeña cantidad de bacterias y se estrió para obtener una colonia aislada. Una vez que se incubaron las bacterias toda la noche a 37° C, se tomó una colonia y se colocó durante 18 horas a 37°C en agitación en medio LB con tetraciclina (12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y ampicilina (50mg/ml). 200 ml de bacterias se deja caer sobre cajas Petri con medio NGM que contiene tetraciclina 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, ampicilina 50mg/ml e IPTG 1mM y se incuban a temperatura ambiente por 18

h cubiertas de la luz para inducir la transcripción del gen y producir RNA de doble cadena. Posterior a la inducción, las cajas se utilizaron para realizar los experimentos, en donde se sembraron las larvas L1 sincronizadas. Las cajas también pueden almacenarse a 4°C cubiertas de la luz, por máximo 1 semana.

Silenciamiento doble mediante RNA de doble cadena (Doble RNAi)

Para silenciar dos genes al mismo tiempo mediante RNAi, primero se concentró la bacteria a 10X. Posteriormente, se leyó la absorbancia para cada uno de los cultivos de bacterias y se llevaron a densidades iguales dentro de un mismo tubo eppendorf. Es decir, si el primer cultivo tuvo una lectura de 0.70 Abs en 20 µl y el segundo registró 0.50 Abs en 20 µl, se añaden 28 µl del segundo cultivo por cada 20 µl del primer cultivo (en nuestro caso, teníamos los cultivos para silenciar a *gla-3* y *lin-9*). Esto se realizó con el objetivo de silenciar ambos genes en proporciones iguales. Para el resto de condiciones comparadas contra el doble RNAi, los cultivos de bacterias concentrados se diluyeron a un 50% con medio LB con ampicilina (50mg/ml), tetraciclina (12.5µg/ml) e IPTG (0.4 mM), para emular la dilución realizada para el doble silenciamiento.

Condiciones para inducir estrés por choque de calor

Los nematodos hermafroditas adultos sincronizados se sembraron en dos cajas con medio NGM con alimento, una caja se utilizó como control, la cual se mantuvo durante todo el experimento a 20°C, mientras que para la condición de choque de calor esta se selló con Parafilm y se colocó en un baño de agua con temperatura controlada a 31°C durante 3 horas y se dejaron en recuperación del choque de calor a 20°C por 4 horas y 30 minutos, posterior a este tiempo, se colectaron para ser observados al microscopio.

Condiciones para inducir ayuno

Para inducir la condición de ayuno, los gusanos adultos se pasaron de manera individual a cajas con medio NGM que no contenían alimento (ya sea bacterias OP50 o HT115) y se mantuvieron a 20°C durante 6 horas en ausencia de bacterias, mientras que los nematodos control, se mantuvieron en cajas con alimento a 20°C durante el transcurso del experimento.

Montaje de animales para su visualización en el microscopio óptico

Para visualizar a los animales bajo el microscopio óptico, se elaboraron colchones de agarosa. Para hacer el colchón se utilizó una solución de agarosa al 2% disuelta en agua grado Milli-Q. Se colocaron tres portaobjetos alineados (uno central y dos laterales), los portaobjetos laterales poseen dos capas de cinta adhesiva que permiten dejar un espacio en el portaobjetos central que da el volumen de la agarosa. Se colocó una gota de agarosa fundida con una pipeta Pasteur en el porta objetos del centro y sobre esta se colocó un portaobjetos de manera perpendicular. Se presionó ligeramente y se dejó polimerizar. Posteriormente se retiró el portaobjetos superior y se colocaron 30 μ l de tetramizol disuelto en M9 (10 mM) el cual sirve para inmovilizar a los animales. La muestra se cubrió con un cubreobjetos y los animales se visualizaron bajo microscopia tipo Nomarski en un microscopio Nikon Eclipse E600 equipado con una cámara digital AxioCam Zeiss.

Lisis de muestra para extracción de RNA

Se utilizó un mortero enfriado con nitrógeno líquido, en el cual se molieron los gusanos. Antes de colocar las muestras preservadas en trizol, se enfriaron los morteros

con nitrógeno líquido. Se realizaron 3 rondas de molienda de aproximadamente 5 minutos cada una, cuidando siempre en mantener una baja temperatura en el mortero, añadiendo nitrógeno líquido cuando la muestra de trizol se volvía más líquida. En un tubo Eppendorf se recolectó el trizol que contenía a los gusanos molidos y se prosiguió con la extracción de RNA.

Extracción de RNA total

La extracción de RNA total se realizó utilizando trizol. Se añadieron 100 μ l de cloroformo por cada 500 μ l de muestra preservada en trizol, se centrifugaron a 4°C a 13.4 r.p.m. durante 15 minutos. Posteriormente la fase acuosa se aisló y se precipitó el RNA con isopropanol; se añadieron 250 μ l de isopropanol por cada 500 μ l de trizol, luego se dejó incubando por 10 minutos a temperatura ambiente y la muestra se centrifugó a 4°C a 13400 r.p.m. durante 10 minutos. Se lavó con etanol al 75% y se resuspendió en H₂O MQ tratada con DEPC tibia. La concentración, pureza y calidad del material se determinó por espectrofotometría, en el NanoDrop 2000 de ThermoScientific (Massachusetts, EUA). Una vez purificado el RNA, se siguió con su procesamiento o se almacenó a -70°C hasta su uso.

Tratamiento con DNAsa I

Para eliminar el DNA dentro de la muestra, se realizó un tratamiento con DNAsa I libre de RNAsas (2000 u/ μ l). Para las muestras que tienen una concentración de 500-1000 ng/ μ l, que es la concentración casi siempre obtenida por lisis realizada en mortero, se añadieron 15 μ l De H₂O MQ, 2 μ l de buffer de reacción 10X, 1 μ l de DNAsa I y 2 μ l de RNA. El volumen final (20 μ l) se colocó en un termoblock a 37°C durante 10 minutos.

Síntesis de cDNA (RT-PCR)

Para la síntesis de cDNA primero se preparó el Mix de RNA (**Tabla 2**), el cual está compuesto por 1 μ l de oligo dT, H₂O MQ tratada con DEPC y RNA, el volumen de estos dos últimos componentes varía conforme a la concentración del RNA, pero se deben colocar aproximadamente 20 ng de RNA y llevar a un volumen final de 10 μ l con el agua. También se preparó el Master Mix para síntesis de cDNA (**Tabla 3**), el cual contiene 3.5 μ l de H₂O MQ estéril, 2 μ l de Buffer de reacción 5X, 1.5 μ l de MgCl₂ 50 mM, 1 μ l de dNTPs 10 mM, 1 μ l de Inhibidor de ribonucleasas y 1 μ l de enzima transcriptasa inversa (RT-ImpromII) o en lugar de la enzima se añade H₂O MQ estéril al correr la PCR control negativo, -RT.

El Mix de RNA se colocó en un termociclador T100 de BioRad (California, EUA) y se corrió el programa, el cual consiste en: 1) 70°C por 5 minutos; 2) 25°C por 5 minutos; 3) 42°C por 60 minutos y 4) 70°C por 15 min. Entre el paso 1 y 2 se añadió el Master Mix para síntesis de cDNA, esto debido a que la RT es termosensible. Para comprobar que el cDNA funciona, se realizó una PCR punto final con 2 μ l de cDNA con los oligos para *act-4* como control positivo, también se empleó el control negativo -RT.

Tabla 2: Mix de RNA para Master Mix	
Componente	Volumen
RNA tratado con DNAsa I	Volumen variable, se añaden ~ 20 ng
Oligo dT	1 μ l
H ₂ O MQ tratada con DEPC	Se afora a 10 μ l en función de los otros volúmenes
Volumen final: 10 μ l	

Componente	Volumen
H ₂ O MQ estéril	3.5 µl
Buffer de reacción 5X	2 µl
MgCl ₂ 50 mM	1.5 µl
dNTPs 10mM	1 µl
Inhibidor de ribonucleasas	1 µl
RT-ImpromII o H ₂ O MQ estéril	1 µl (agua para el control -RT)
Volumen final: 10 µl	

PCR en tiempo real (qPCR)

La amplificación por PCR se realizó utilizando oligonucleótidos específicos para los genes de interés (**Tabla 5**). La amplificación fue realizada empleando PowerUp[™] SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, número de catálogo: A25777). Cada reacción 1X contenía 10 µl de SYBR Green Master Mix, 3 µl de Oligo Fw (2.5 µM), 3 µl de Oligo Rv (2.5 µM), 1 µl de cDNA y 3 µl de H₂O MQ estéril. Se realizó el qPCR en reacciones de 20 µl por triplicado. Para la detección se utilizó el sistema ABI PRISM 7000. *18s* fue empleado como control de amplificación es decir que los valores CT de cada uno de los genes amplificados fueron normalizados con los valores obtenidos para *18s*. Los valores de expresión relativa fueron obtenidos utilizando el método comparativo $\Delta\Delta\text{Ct}$ (Livak y Schmittgen, 2001).

Componente	Volumen
Primer forward (2.5 µM)	3 µl
Primer reverse (2.5 µM)	3 µl
H ₂ O MQ estéril	3 µl
cDNA	1 µl
SybrGreen Master Mix	10 µl
Volumen final : 20 µl	

Conteos de progenie y letalidad embrionaria

Los conteos se realizaron colocando una larva L4 en una caja pequeña que se movió diariamente a una caja nueva durante 3 días. En el tercer día de haber movido al gusano, se contaron los embriones que no eclosionaron (letalidad embrionaria) y al cuarto día todas las larvas en cada caja, esto para facilitar la visualización de las larvas en el microscopio.

Análisis estadístico de RT-qPCR

Los resultados se representaron usando la media \pm SD de 4 muestras biológicas independientes, realizadas cada una al menos por duplicados cada una. Los experimentos fueron analizados mediante la prueba t de Student, para muestras independientes. Se tomaron como diferencias significativas los valores de $p \leq 0.05$. El análisis estadístico se realizó con el programa GraphPad Prism V.6.

Análisis estadístico

Los experimentos de conteos de cuerpos apoptóticos, así como la eficiencia de los silenciamientos fueron analizados mediante ANOVA de dos vías, seguida de la prueba post hoc de Bonferroni. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa GraphPad Prism V.6.

Tabla 5: Primers utilizados en este trabajo		
<i>act-4</i>	Forward	CCCTCGAGAAGTCCTACGAA
	Reverse	TCCATACCCAAGAAGGATGG
<i>18S</i>	Forward	GTACAAAGGGCAGGGACGTA
	Reverse	TTCTTCCATGTCCGGGATAG
<i>akt-1</i>	Forward	TGAGCGAACATTCTATGCGG
	Reverse	TTGGCTGCTGATTGGTTTCC
<i>cul-5</i>	Forward	AAATGGCGGCAGATTCGATC
	Reverse	CGATTCAGTTCAGCATCCGG
<i>dlk-1</i>	Forward	ACCACCTACAGTAACCCGTG
	Reverse	CAACATCAGCATCGTCGGAG
<i>lin-9</i>	Forward	GGTCATGTGCGAGTTCTTC
	Reverse	CTTTCGAGCATCTACGTGGC
<i>mlc-4</i>	Forward	TGGGCGAGAGATATTCGGAG
	Reverse	CTTGGTTCCGTGTTTGAGCA
<i>pde-6</i>	Forward	TAGAAGAGGCGCACAGAGAG
	Reverse	TAGCAGAGGTGTTGGTGGAG
<i>rbx-1</i>	Forward	GCCGCAATCACATCATGGAT
	Reverse	CTGTCGTGTCTTCAGCCAAC
<i>ubl-5</i>	Forward	CTGCACAAACTGGAACACGA
	Reverse	TGAATCCCTCGTGAATCTCGT
<i>ubc-16</i>	Forward	CGACTGATGAAAGAGCTGGC
	Reverse	CATACAATGTTCCCTCGGCG

RESULTADOS

Los dedos de zinc de GLA-3 no se encuentran en tándem y presentan una baja similitud con los dominios de su homólogo en humanos

Para comparar la estructura general de TTP de humano (hTTP), ratón (mTTP) y GLA-3 realizamos esquemas lineales donde pudiéramos identificar visualmente la localización de los dominios de dedos de zinc, ya conocidos, a lo largo de estas proteínas. Decidimos incluir a la proteína TIS11d de humano (hTIS11d) ya que en ella se ha estudiado el mecanismo de unión a sitios AREs en la familia de proteínas TTP (Hudson *et al.*, 2004). Como se ha reportado anteriormente (Blackshear, 2002), también observamos que mTTP y hTTP tienen los dos dedos de zinc (ZF) muy cercanos, con tan solo unos cuantos aminoácidos (aa) de separación, lo cual les da su nombre de “dedos de zinc en tándem”. En el caso de hTIS11d, hTTP y mTTP a cada dedo de zinc lo separan 9 aa, pero en GLA-3 los dedos de zinc están separados por 554 aa, incluso el segundo dedo de zinc se encuentra en el extremo C- terminal, por lo que no se encuentran en tándem. Incluso se ha determinado que GLA-3 y TTP tan solo tienen un 34.88% de identidad. (**Figura 4A**). Es posible que la región de 554 aa en GLA-3, al ser tan extensa pueda tener un papel en la interacción con otras proteínas.

Con el objetivo de determinar la similitud que hay entre los dedos de zinc (ZF) de hTIS11d, hTTP, mTTP y GLA-3, se realizó un alineamiento entre los pares de dedos de zinc pertenecientes a estas proteínas. Al realizar esta comparación, observamos que los ZF de hTIS11d, hTTP y mTTP son muy parecidos. El ZF1 de hTIS11d y hTTP tiene un 76% de identidad, mientras que el ZF2 tiene un 71%. El ZF1 de hTTP y mTTP tiene un 97% de identidad, mientras los ZF2 son idénticos. Por otro lado, al hacer la comparación entre hTIS11d y mTTP encontramos que el ZF1 tiene un 72% y el ZF2 un 71% de identidad. Sin embargo, al hacer la comparación entre las tres proteínas anteriores y GLA-3, vemos

que los ZF no son tan parecidos. Encontramos que el ZF1 de hTIS11d y GLA-3 tenían un 41% de identidad y el ZF2 36%. Entre hTTP y GLA-3 los ZF1 tenían en coincidencia 41% y los ZF2 un 32%. Y al realizar una comparación de los ZF de mTTP y GLA-3 observamos que también tiene un 41% de coincidencia en los ZF1 y los ZF2 un 32% (Figura 4B).

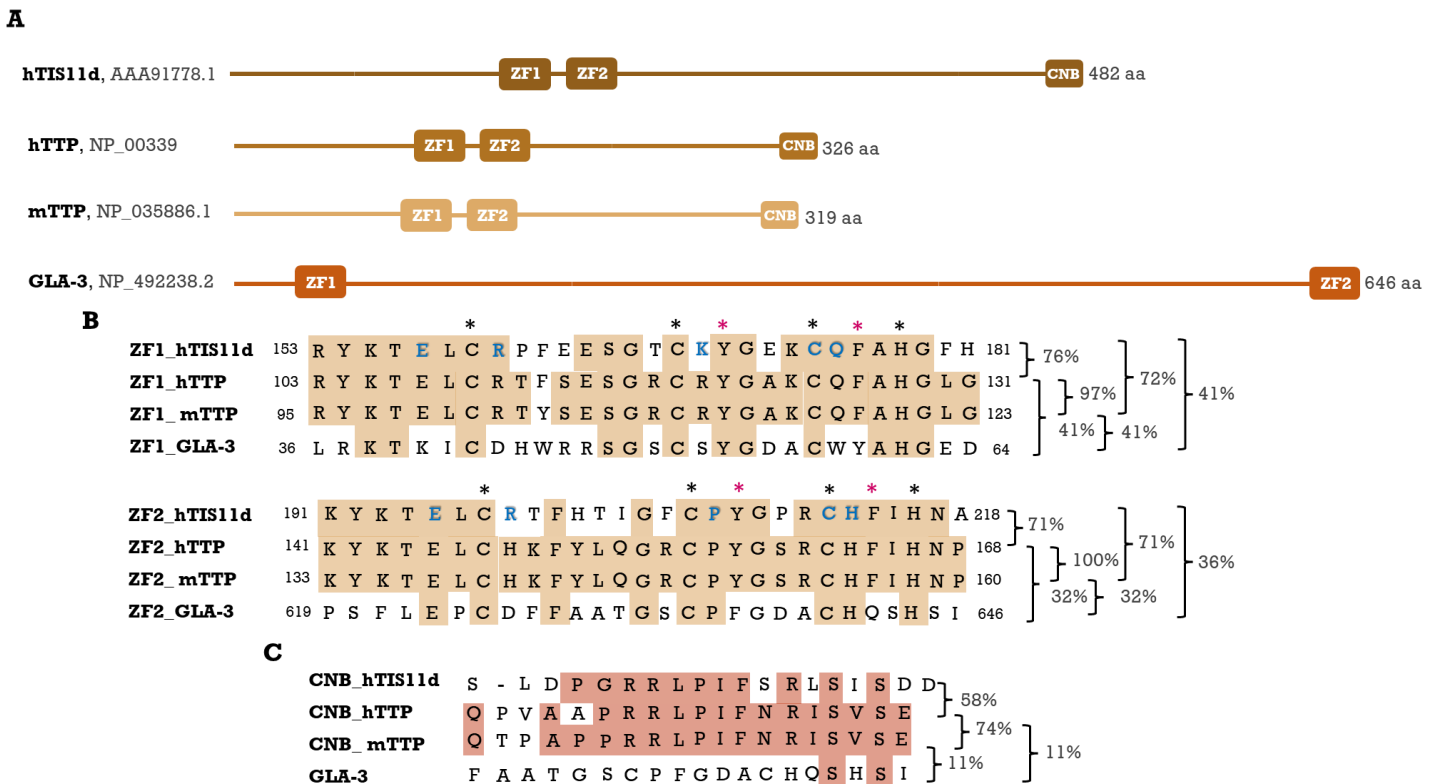


Figura 4: La proteína GLA-3 es más larga que sus homólogos de mamíferos, y no conserva la mayoría de los aminoácidos que reconocen los sitios AREs. Alineamientos estructurales de proteína completa y alineamientos de los dominios de dedos de zinc y del dominio de unión al complejo CCR4-NOT (CNB) pertenecientes a hTIS11d, hTTP, mTTP y GLA-3. A) Alineamientos de proteína completa, se indica el número de GeneBank para cada una de las secuencias utilizadas. Se observa que GLA-3 es una proteína más grande, comparada con las proteínas pertenecientes a la familia de las TTP en mamíferos. B) Alineamiento de la secuencia de los dedos de zinc. En asteriscos negros se señalan los aminoácidos C y H característicos de estos dominios; en asteriscos rosas se muestran los aminoácidos aromáticos que están conservados y en letras azules se representan aquellos aminoácidos que forman puentes de hidrógeno con los sitios AREs. A un costado se muestra el porcentaje de similitud entre dominios. C) Alineamiento de los dominios CNB, solamente encontrado en mamíferos.

La estructura de las proteínas GLA-3 y hTTP es principalmente desordenada

Reportes previos muestran que hTTP y mTTP (Ngoc *et al.*, 2014), así como hTIS11d (Dyson *et al.*, 2012) son proteínas mayormente desordenadas por lo que decidimos estudiar *in silico* la estructura de GLA-3. Realizamos un análisis con el servidor PONDR, el cual contiene varios algoritmos predictores de regiones desordenadas. Escogimos los algoritmos VSL2 y VL3 debido a que han sido entrenados con regiones desordenadas largas y cortas (Molecular Kinetics Inc, 2007), además de que se ha reportado que ambos algoritmos son los que cuentan con mayor precisión en la predicción dentro del servidor PONDR (Uversky & Dunker, 2010).

Encontramos que GLA-3 al igual que hTTP, mTTP y hTIS11d, es una proteína con regiones desordenadas extensas (**Figura 5**). En ambos algoritmos observamos que las cuatro proteínas tienen picos de estructura ordenada que coinciden con la zona donde se encuentran los dedos de zinc (recuadros color durazno en **Figura 5**). Además, encontramos que hTIS11d tiene otros 2 picos de estructura ordenada y GLA-3 tiene un pico más (**Figura 5C y D**). Anteriormente hemos mencionado que las regiones desordenadas en las proteínas de unión a RNA tienen un papel importante en la formación de gránulos ribonucleoprotéicos, también se ha reportado que GLA-3 es necesaria para la formación de gránulos de estrés. Es posible que la región de 554 aa al ser en su mayoría desordenada, contribuya de manera importante a la formación de gránulos de estrés permitiendo su interacción con otros componentes de estos gránulos. También sería interesante estudiar si el tercer pico de estructura ordenada en GLA-3 (localizado en el residuo ~350 en **Figura 5D**), está relacionado con la formación de alguna estructura secundaria local que le permita interaccionar con otras moléculas de GLA-3, tal y como se ha demostrado en una proteína de unión a RNA llamada TDP-43 (Conicella

et al., 2016). No obstante, hace falta un estudio detallado para determinar la función que podría tener la región mayormente desordenada de GLA-3.

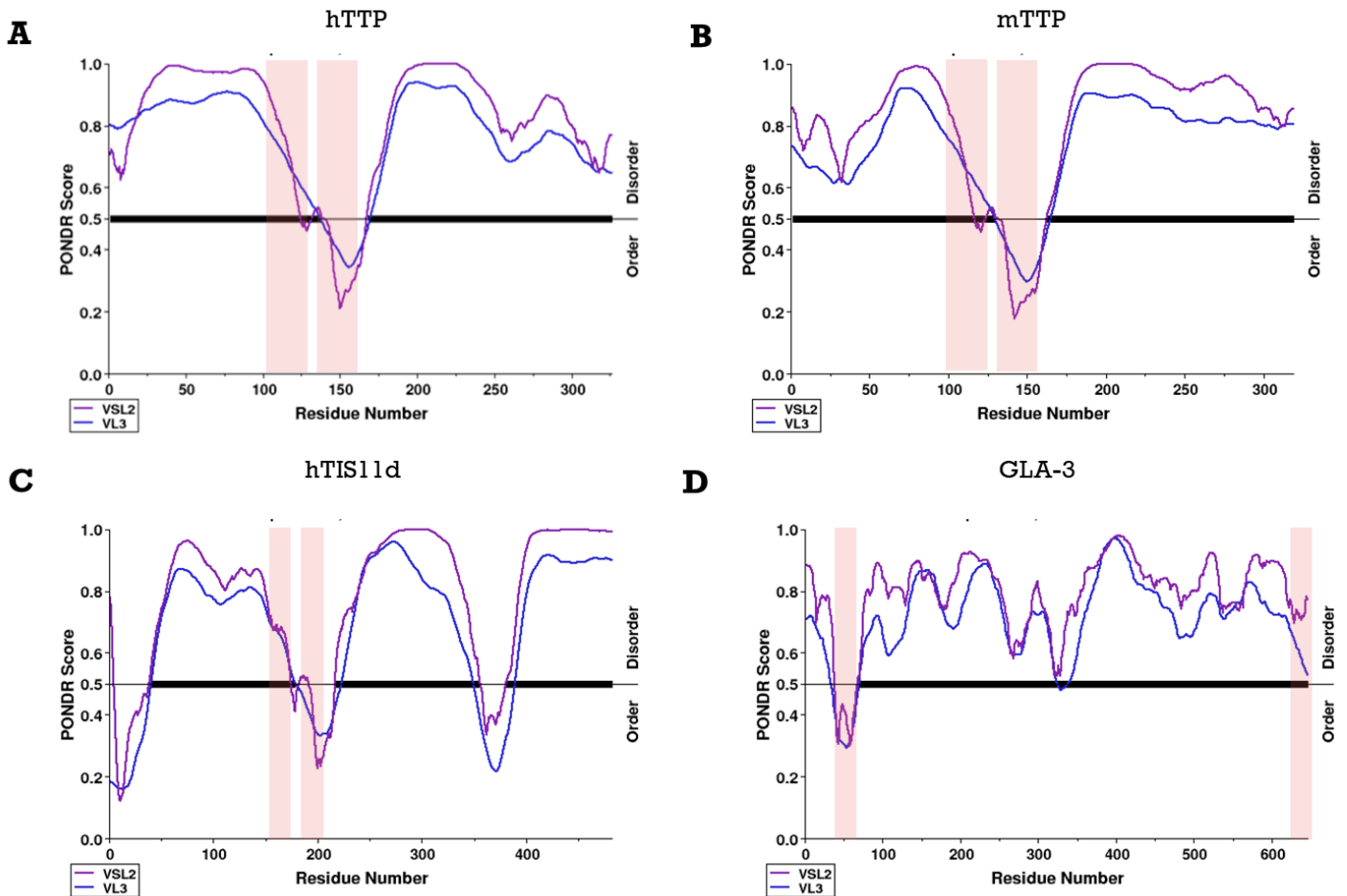


Figura 5: Las proteínas hTTP, mTTP, hTIS11d y GLA-3 son mayormente desordenadas. En la figura se muestran las predicciones de las regiones desordenadas para cada una de las proteínas mencionadas. Este análisis se realizó con el predictor POND R utilizando los algoritmos VSL2 (líneas moradas) y VL3 (líneas azules). En color durazno se observa la localización de los pares de dedos de zinc de cada proteína evaluada. A y B) TTP de humanos (hTTP) y ratón (mTTP) son en su mayoría desordenada, pero también se pueden encontrar regiones ordenadas que corresponden a los dedos de zinc. C) TIS11d de humanos (hTIS11d) tiene 3 regiones ordenadas, la segunda coincide con la ubicación de sus dedos de zinc. D) GLA-3 presenta 3 regiones ordenadas, la primera región ordenada se encuentra cercana al extremo N-terminal, esta corresponde al primer dedo de zinc; hay una segunda región desordenada en el medio de la proteína y una tercera que está ubicada en el extremo C-terminal, en donde se encuentra el segundo dedo de zinc.

GLA-3 no tiene la mayoría de los residuos necesarios para formar puentes de hidrógeno con los sitios ARE, pero sí las cisteínas e histidinas para unirse a RNA

En 2004, Hudson y colaboradores determinaron la estructura de los dedos de zinc de la proteína hTIS11d, homólogo de TTP en humanos. Demostraron que ciertos residuos de los ZF de esta proteína forman puentes de hidrógeno con nucleótidos de los sitios AREs, lo que hace que esta unión sea específica. Los glutamatos 157 y 195, la glutamina 175, la histidina 213, las argininas 160 y 198, las cisteínas 174 y 212, la lisina 169 y la prolina 207 (aminoácidos azules de ZF1 y ZF2 de hTIS11d en **Figura 4B**), son los aminoácidos que forman los puentes de hidrógeno con los sitios AREs (Hudson *et al.*, 2004). Para explorar el grado de conservación de los residuos importantes para el reconocimiento de los sitios AREs se hizo una comparación de las secuencias de los dedos de zinc utilizando el alineador M-COFFEE. Encontramos que hTTP y mTTP conservan 8 de 10 aa, excepto la lisina 169 y arginina 198 que corresponden a hTIS11d (aminoácidos azules de ZF1 y ZF2 de hTIS11d en **Figura 4B**). Sin embargo, GLA-3 solo conserva 5 de 10 aa, los faltantes corresponden al glutamato 157, lisina 169, glutamina 175 y argininas 160 y 198 de hTIS11d (aminoácidos azules de ZF1 y ZF2 de hTIS11d en **Figura 4B**); particularmente notamos que el ZF1 de GLA-3 conserva un solo aminoácido formador de puentes de hidrógeno con respecto a hTIS11d (aminoácidos azules de ZF1 en **Figura 4B**) y el ZF2 conserva cuatro aminoácidos (aminoácidos azules de ZF2 en **Figura 4B**).

También se ha demostrado que tanto las cisteínas e histidinas, así como los dos aminoácidos aromáticos, generalmente fenilalanina y tirosina, que contiene cada uno de los dedos de zinc de hTTP, tienen un papel importante en el reconocimiento de los AREs, pues una sola mutación de cualquiera de estos aminoácidos inhibe el reconocimiento (Lai *et al.*, 2018; Lai *et al.*, 2014; Lai *et al.*, 2002 y Lai *et al.*, 1999). Por lo tanto, comparamos

la presencia de estos aminoácidos en mTTP, hTIS11d y GLA-3. Observamos que las 3 cisteínas y la histidina características de los dedos de zinc si se encuentran presentes en ambos ZF de todas estas proteínas (asteriscos negros en **Figura 4B**). Por otro lado, hTIS11d y mTTP tienen todos los aminoácidos aromáticos, pero GLA-3 no (asteriscos rosas en **Figura 4B**). En el caso del ZF1 de GLA-3 la fenilalanina no se encuentra presente, en su lugar hay una tirosina. En el ZF2 no están conservados ninguno de los dos aminoácidos aromáticos, en el primer aa en lugar de una tirosina hay una fenilalanina; en el segundo, en vez de una fenilalanina hay una glutamina (**Figura 4B**). Debido a los resultados anteriores, ahora sabemos que GLA-3 no tiene varios aminoácidos que le podrían dar la capacidad de reconocer y unirse a sitios AREs en el 3'UTR de los mRNAs. No obstante, al conservar los residuos cisteína e histidina característicos de los dedos de zinc tipo C₃H₁ (asteriscos negros en **Figura 4B**), GLA-3 debe tener la capacidad de unirse a los mRNAs, pero no mediante la interacción con sitios AREs.

GLA-3 no tiene el dominio que recluta al complejo CCR4-NOT, el cuál promueve la degradación de los transcritos

Otro dominio que fue identificado en hTTP es el dominio C-terminal de unión a NOT (CNB, por sus siglas en inglés *C-terminal NOT binding domain*), el cual es necesario para reclutar el complejo CCR4-NOT (Sandler *et al*; 2011) que media la desdenilación de la cola poli-A de los transcritos (Raisch *et al*; 2019). Mediante un alineamiento decidimos buscar si hTIS11d, mTTP y GLA-3 también tenían conservado el dominio CNB en su extremo C-terminal. Encontramos que tanto hTIS11d como mTTP tienen el dominio CNB, cada uno con un porcentaje de similitud con respecto al CNB de hTTP de 58% y 74%, respectivamente (**Figura 4C**). Ya que el extremo C-terminal de GLA-3 forma parte de su segundo dedo de zinc, como se esperaba, no se pudo identificar una secuencia parecida a un dominio CNB (**Figura 4C**). Por lo tanto, realizamos un alineamiento de la proteína

completa para identificar si pudiese tener el dominio CNB en otra región de su secuencia. Decidimos llevar a cabo tanto un alineamiento de secuencia con el programa M-COFFEE (**Figura 6A**), como uno estructural con EXPRESSO (**Figura 6B**) en caso de que los aa exactos no estuviesen conservados, pero la estructura sí. Para ambos alineamientos de GLA-3 no encontramos ningún segmento que pudiera ser parecido al CNB de hTTP (**Figura 6A y B**). Para ejemplificar como se vería un alineamiento positivo al dominio CNB, decidimos realizar un alineamiento de la proteína mTTP y el CNB, y de manera contraria a lo que sucede con GLA-3, se puede observar la coincidencia tanto en secuencia como en estructura (recuadros amarillos en **Figura 6C y D**). Debido a estos resultados determinamos que GLA-3 no tiene un dominio CNB.



Figura 6: GLA-3 no presenta el dominio CNB. Alineamientos realizados en el servidor t-COFFEE para buscar el dominio CNB en GLA-3, utilizamos la secuencia descrita para el CNB de hTTP y ejemplificamos la presencia del dominio CNB realizando un alineamiento con mTTP. Se utilizaron los alineadores M-COFFEE y EXPRESSO, que son un alineador de secuencia y un alineador estructural, respectivamente. A) Alineamiento del CNB y GLA-3 realizado con M-COFFEE. B) Alineamiento del CNB y GLA-3 realizado con EXPRESSO. En ninguno de los alineamientos anteriores se pudo identificar alguna secuencia o estructura parecida al CNB de hTTP. C) Alineamiento del CNB y mTTP realizado con M-COFFEE. D) Alineamiento del CNB y mTTP realizado con EXPRESSO. En los dos anteriores alineamientos se destaca en un recuadro amarillo la región de mTTP que coincide con el CNB de hTTP tanto secuencial como estructuralmente.

La estructura tridimensional de los dedos de zinc C_3H_1 de GLA-3 si está conservada

Realizamos un alineamiento estructural tridimensional de los ZF de hTIS11d, hTTP y GLA-3 para determinar qué tan conservados está los dedos de ZF entre estas proteínas. Utilizamos PyMOL para realizar el alineamiento de las predicciones de ZF de hTTP y GLA-3 con la estructura de los ZF de hTIS11d. A pesar de que GLA-3 no presenta tanta similitud con hTTP y hTIS11d, en cuanto a la composición de sus aminoácidos en los dominios ZF, pudimos observar que la estructura de los ZF de esta familia de proteínas está muy conservada (Figura 7E y F). Una gran diferencia que se puede observar en las

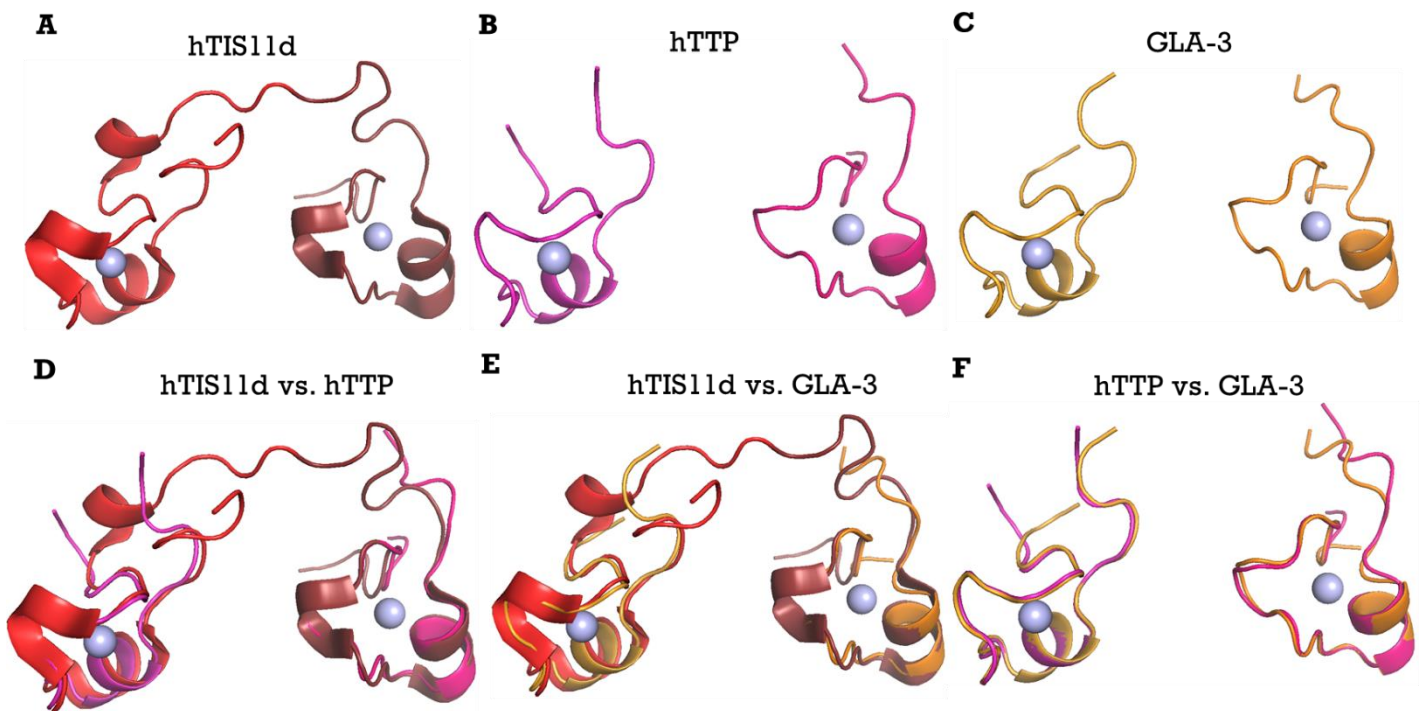


Figura 7: Estructuralmente, los dedos de zinc de GLA-3 son similares a los de hTTP. Alineamientos estructurales de los dominios de dedos de zinc de hTTP, hTIS11d y GLA-3 realizados con PyMOL. A) se muestra la estructura tridimensional de los dedos de zinc perteneciente a hTIS11d, obtenidos por NMR (Hudson et al, 2004), en rojo se observa el ZF1 y en guinda el ZF2. B) Predicción de los dominios de dedos de zinc pertenecientes a hTTP realizada a partir de la secuencia NP_00339, en magenta el ZF1 y en rosa el ZF2. C) Predicción de los dominios de dedos de zinc pertenecientes a GLA-3 realizada a partir de la secuencia NP_492238.2, en amarillo el ZF1 y en naranja el ZF2. Alineamientos estructurales entre los dominios de dedo de zinc de D) hTIS11d y hTTP; E) hTIS11d y GLA-3; F) hTTP y GLA-3.

predicciones es que GLA-3 y hTTP solo tienen una hélice alfa en sus dedos de zinc, comparado con hTIS11d que tiene dos (**Figura 7A, D y E**). Por lo tanto, podemos decir que la estructura tridimensional de los dedos de zinc de hTTP y GLA-3 son parecidas a pesar de no compartir los aminoácidos requeridos para unirse a sitios AREs, estos resultados concuerdan con el hecho de que GLA-3 también tenga conservadas las cisteínas e histidinas que la hacen una proteína de unión a RNA. Por otro lado, aún no podemos saber que implica que hTIS11d tenga dos alfa hélices en lugar de una como hTTP y GLA-3, pues su importancia no ha sido caracterizada en los dedos de zinc C_3H_1 .

En *C. elegans* otras proteínas con dedos de zinc C_3H_1 no se unen a sitios AREs

Previos reportes demuestran que otras proteínas en *C. elegans* con dedos de zinc tipo C_3H_1 expresadas en la línea germinal, tales como OMA-1, MEX-5 y POS-1, no se unen a sitios AREs (Pagano *et al.*, 2007; Farley & Ryder, 2012 y Kaymak & Ryder, 2013). Debido a esto, decidimos realizar esquemas para identificar visualmente las diferencias y similitudes en la localización de los dominios de dedos de zinc ya conocidos de estas proteínas, así como alineamientos de la secuencia de aminoácidos que conforman estos dominios. Observamos que estas proteínas tenían dedos de zinc en tándem, al igual que hTTP y hTIS11d (**Figura 8A**). En el caso de OMA-1, MEX-5 y POS-1, cada dedo de zinc está separado por 14 aa, una gran diferencia con respecto a GLA-3 que tiene sus dedos de zinc separados por 554 aa (**Figura 8A**). Reportes previos muestran que OMA-1, MEX-5 y POS-1 si se unen al 3'UTR de los mRNAs, pero tiene motivos de unión distintos a los motivos AREs, los cuales son UAA/UAU, UUUUUUUU, AUUGUAAG/UAUUCUA, respectivamente (**Figura 8B**) (Pagano *et al.*, 2007; Farley & Ryder, 2012; Kaymak & Ryder, 2013). Si bien, estos no entran dentro de los motivos descritos como AREs, si son motivos ricos en adenina y uracilo.

El alineamiento nos mostró que OMA-1, MEX-5 y POS-1 tienen porcentajes de similitud más altos a los mostrados por los ZF de GLA-3 con respecto a hTTP. Los ZF1 de estas proteínas van del 38% al 45%, mientras el porcentaje presentado por GLA-3 para el ZF1 es de 41%, los ZF2 van desde el 57% al 61% de similitud con respecto a hTTP, que son mejores porcentajes que el ZF2 de GLA-3 de 32% (Figura 8C y 4B). También notamos que estas proteínas tienen conservados casi todos los aminoácidos aromáticos, a

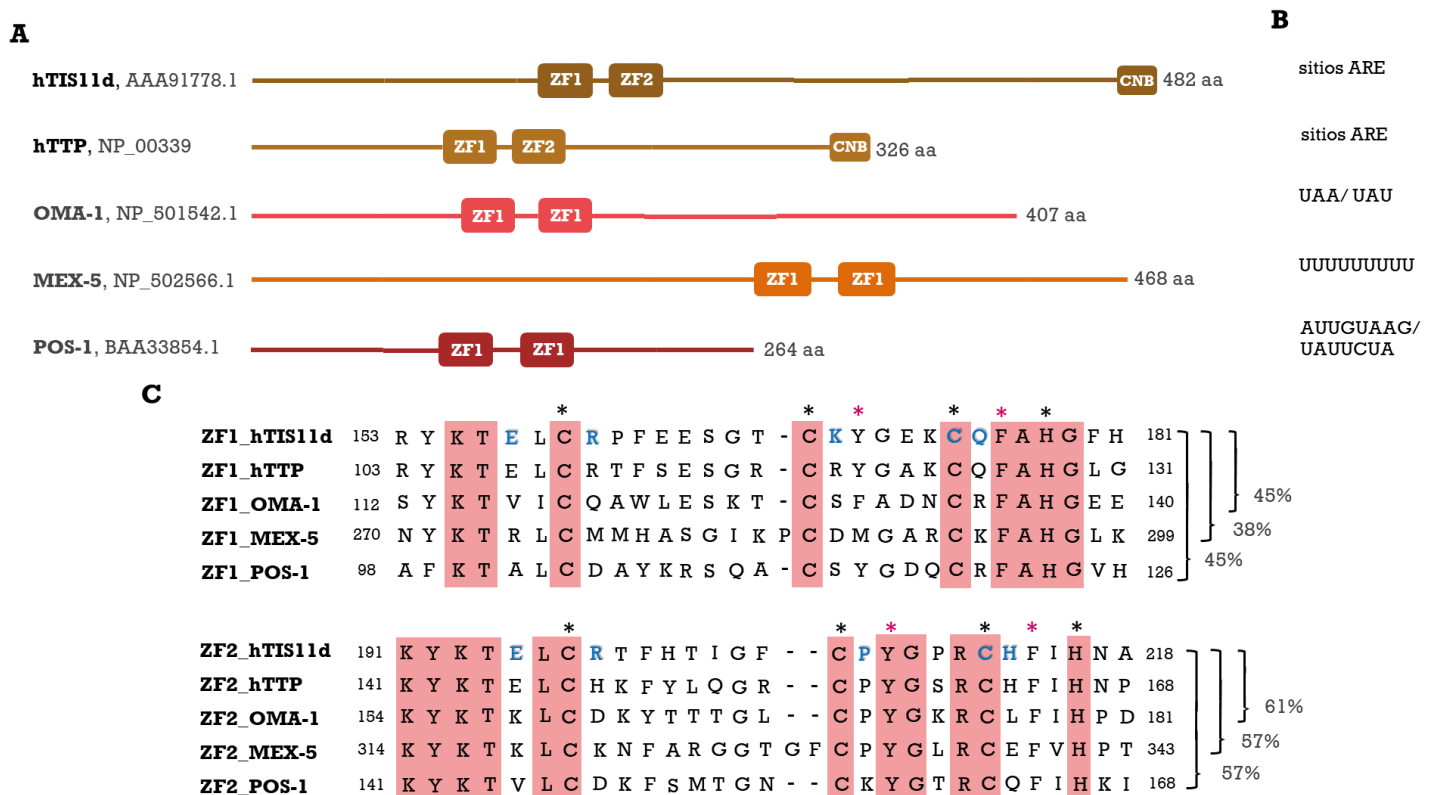


Figura 7: OMA-1, MEX-5 y POS-1 no presentan la mayoría de los aminoácidos necesarios para unirse a sitios AREs y tienen motivos de unión distintos. Alineamientos estructurales de proteína completa y alineamientos de los dominios de dedos de zinc pertenecientes a htTIS11d, htTTP, OMA-1, MEX-5 y POS-1. A) Alineamientos de proteína completa, se indica el número de GeneBank para cada una de las secuencias utilizadas. Se muestra que OMA-1, MEX-5 y POS-1 tienen sus dedos de zinc en tándem al igual que htTTP. B) Motivos de unión descritos para cada una de las proteínas a las cuales se les realizó el alineamiento de proteína completa. C) Alineamiento de los aminoácidos que componen los dominios de dedos de zinc de cada proteína. En asteriscos negros se señalan los aminoácidos C y H característicos de estos dominios; en asteriscos rosas se muestran los aminoácidos aromáticos que están conservados y en letras azules se representan aquellos aminoácidos que forman puentes de hidrógeno con los sitios AREs. A un costado se muestra el porcentaje de similitud entre dominios.

excepción de la tirosina 170 (primer asterisco rosa en ZF1 en Figura 9C) que varía en OMA-1 y MEX-5. Sin embargo, al igual que GLA-3, no tienen muchos de los aa necesarios para formar puentes de hidrogeno con los sitios AREs (aminoácidos azules de ZF1 y ZF2 de hTIS11d en **Figura 8C**). OMA-1 y MEX-5 no tienen conservados 7 de 10 de estos aa y POS-1 no tiene 8 de 10 aa. Estas diferencias hacen evidente la razón por la cual OMA-1, MEX-5 y POS-1 tienen motivos de unión distintos a los AREs. Además, estos resultados nos sugieren que GLA-3, al igual que OMA-1, MEX-5 y POS-1, puede unirse a mRNAs, pero es posible que lo haga a través de otro motivo de unión distinto a los sitios AREs pero rico en adenina y uracilo.

GLA-3 posiblemente se une y regula a 27 mRNAs

Los mRNAs blanco de TTP han sido determinados por RIP-Chip, esta técnica fue realizada inmunoprecipitando a mTTP, luego los mRNAs asociados a esta proteína fueron sometidos a una PCR de transcripción reversa y se sintetizaron cDNAs biotinilados que fueron colocados en un microarreglo para hibridarse y determinar los genes a los que corresponden los transcritos asociados a TTP. Se encontraron 137 mRNAs que pueden unirse a TTP en células de ratón RAW264.7 (Stoecklin *et al.*, 2008). Como otro de nuestros objetivos era encontrar mRNAs candidatos que posiblemente fueran regulados por GLA-3 y como no se ha demostrado experimentalmente cual es el motivo de unión a GLA-3, partimos de la hipótesis de que GLA-3 y TTP podrían conservar algunos genes blancos en común, aunque es probable que no estén enriquecidos en sitios AREs. Por lo tanto, realizamos un análisis bioinformático a partir de esta lista de 137 mRNAs, buscando mRNAs homólogos en *C. elegans* que podrían ser regulados por GLA-3.

Primero realizamos un análisis en nBLAST, donde se realizó una búsqueda de aquellas secuencias de nucleótidos que fueran parecidas a los mRNA de unión a TTP y

se determinaron como secuencias homólogas a aquellas que tuvieran un e-valor menor o igual a 1×10^{-10} y al menos un 60% de similitud entre *M. musculus* y *C. elegans*. Por otro lado, también se realizó un análisis por HomoloGene, la cual nos permitió corroborar algunos de los datos obtenidos por nBLAST y también nos otorgó un nivel distinto de análisis, pues a veces los transcritos que codifican para ciertas proteínas pueden no ser tan parecidos debido a la presencia de intrones u otros elementos reguladores, pero a nivel proteico pueden ser semejantes sus secuencias de aminoácidos y desempeñar funciones similares por sus dominios.

Posterior al análisis de los mRNAs de unión a TTP por nBLAST y HomoloGene, determinamos que 102 de 137 mRNAs no tienen un mRNA homólogo en *C. elegans*, solo conservamos un grupo pequeño de 35 posibles mRNAs, en la **Tabla 6** se pueden encontrar los nombres e IDs de dichos mRNAs. Finalmente, se realizó una búsqueda de estos 35 posibles mRNAs homólogos en la bibliografía, en la cual fuera mencionado textualmente que son homólogos. En la literatura solo encontramos 26 de los 35 transcritos confirmados como homólogos en *C. elegans* y, por lo tanto, a estos 26 mRNAs los consideramos como posibles homólogos (**Tabla 7**). Cabe mencionar que para el mRNA de *entpd7* hay dos mRNAs homólogos, *mig-23* y *ntp-1*, por lo que la lista final incluye 27 mRNAs de unión a GLA-3. Encontramos transcritos que se pudieron identificar como homólogos por HomoloGene, nBLAST y por bibliografía (12/27), y otros cuantos sólo pudieron ser confirmados por bibliografía y HomoloGene o nBLAST (14/27). Sin embargo, esta segunda característica no se puede relacionar con que un mRNA no pueda ser considerado homólogo, pues como fue mencionado anteriormente, las herramientas nBLAST y HomoloGene aportan información distinta al análisis bioinformático.

Tabla 6: 35 posibles mRNAs homólogos de unión a GLA-3

ID de mRNA en <i>M.musculus</i>	Nombre	ID de mRNA en <i>C. elegans</i>	Nombre	Encontrado en:
NM_177561	Peptidasa 46 específica de ubiquitina (<i>Usp 46</i>)	NM_066761.7	Hidrolasa carboxilo terminal 46 de ubiquitina (<i>usp-46</i>)	HomoloGene, nBLAST y bibliografía
NM_025401	Ubiquitina 5	NM_059239.6	Proteína 5 similar a la ubiquitina (<i>ubl-5</i>)	HomoloGene, nBLAST y bibliografía
NM_011484	Molécula adaptadora de transducción de señales (dominio SH3 y motivo ITAM)	NM_059309.9	Molécula 1 del adaptador de transducción de señales (<i>stam-1</i>)	HomoloGene, nBLAST y bibliografía
NM_026068	Mediador de la transcripción de la ARN polimerasa II, homólogo de subunidad 31 (<i>Med31</i>)	NM_001264018.4	Mediador de la subunidad 31 de transcripción de la ARN polimerasa II (<i>mdt-31</i>)	HomoloGene, nBLAST y bibliografía
NM_053103	Ectonucleósido trifosfato difosfohidrolasa 7 (<i>Entpd7</i>)	NM_076593.8 NM_001307238.2	Nucleósido-difosfatasa mig-23 (<i>mig-23</i>) Nucleósido-trifosfatasa ntp-1 (<i>ntp-1</i>)	HomoloGene y bibliografía
BC026127	Caseína quinasa 1, épsilon	NM_182447.10	Caseína quinasa I isoforma delta (<i>kin-20</i>)	nBLAST
NM_172601	RAB2B, miembro de la familia de oncogenes RAS (<i>Rab2b</i>)	NM_001393282.1	Proteína no caracterizada (<i>unc-108</i>)	nBLAST
AK144151	Polirribonucleótido nucleotidiltransferasa 1 (<i>Pnpt1</i>)	NM_064923.6	Polirribonucleótido nucleotidiltransferasa (<i>BE0003N10.1</i>)	HomoloGene y bibliografía
BC030380	Cullin-5	NM_073215.8	Cullin-5 (<i>cul-5</i>)	HomoloGene y bibliografía
AK165240	Familia de transportadores de solutos 16 (transportadores de ácido monocarboxílico), miembro 10	NM_071254.2 NM_071280.2 NM_077907.9	Proteína que contiene el dominio MFS (<i>mct-1/2/3</i>)	HomoloGene
BC058971	Proteína de tráfico, unión a kinesina 1	AY305838.1	Factor 6 de iniciación de la traducción eucariota (<i>eif-6</i>)	nBLAST
NM_026064	Cadena ligera de miosina, regulador tipo B	NM_065299.7	Cadena ligera reguladora de miosina (<i>mhc-4</i>)	HomoloGene, nBLAST y bibliografía
NM_172715.3	Proteína hipotética LOC231510, fosfolípidos y glicerol aciltransferasa	NM_075979.8	Proteína que contiene el dominio PlsC (<i>acl-4</i>)	nBLAST
NM_025564	Homólogo de mago-nashi	NM_060624.9	Homólogo de proteína mago nashi (<i>mag-1</i>)	HomoloGene, nBLAST y bibliografía
NM_033562	Familia de dominio similar a Der1, miembro 2 (<i>Der12</i>)	NM_001392140.1	Derlin-2 (<i>der-2</i>)	HomoloGene, nBLAST y bibliografía

NM_011699	Homólogo lin-7	NM_001129192.6	Homólogo de proteína lin-7 (<i>lin-7</i>)	HomoloGene, nBLAST y bibliografía
NM_008803	Fosfodiesterasa 8A (Pde8a)	NM_001383315.1	3', 5'-fosfodiesterasa cíclica putativa pde-6 (<i>pde-6</i>)	HomoloGene y bibliografía
NM_028097	Proteína transmembranal 68 (Tmem68)	NM_001356896.3	Proteína que contiene el dominio PlsC (<i>Y38C1AA.1</i>)	HomoloGene y bibliografía
NM_009295	Proteína de unión a sintaxina 1 (Stxbp1)	NM_001029435.6	Regulador putativo de acetilcolina unc-18 (<i>unc-18</i>)	HomoloGene, nBLAST y bibliografía
NM_011785	Protooncogén viral de timoma 3 (Akt3)	NM_001028475.5	Serina / treonina-proteína quinasa akt-1 (<i>akt-1</i>)	nBLAST y bibliografía
AK135296	Proteína hipotética, grupo de alta movilidad box 2	NM_001392120.1	Proteína del grupo de alta movilidad 1.2 (<i>hmg-1.2</i>)	HomoloGene
NM_025432	Proteína de tráfico de partículas complejo 2 (Trappc2)	NM_075871.7	subunidad 2 del complejo proteico de tráfico de partículas putativo (<i>sedl-1</i>)	HomoloGene y bibliografía
NM_013509	Enolasa 2, gamma, neuronal (Eno2)	NM_063499.8	Enolasa (<i>enol-1</i>)	nBLAST y bibliografía
NM_130450	Miembro 6 de la familia ELOVL, alargamiento de ácidos grasos de cadena larga (Elov16)	NM_001380316.2	Proteína putativa de elongación de ácidos grasos 3 (<i>elo-3</i>)	HomoloGene y bibliografía
NM_008825	6-fosfofructo-2-quinasa / fructosa-2,6-bifosfatasa 2 (Pfkfb2)	NM_001392269.1	6-fosfofructo-2-quinasa (<i>pfkb-1.1</i>)	nBLAST
NM_175489	Proteína de unión a oxisterol 8 (Osbp18)	NM_001392877.1	Proteína que contiene el dominio PH (<i>obr-3</i>)	HomoloGene y nBLAST
NM_013787	Proteína quinasa 2 asociada a fase S (Skp2)	NM_171865.7	Proteína que contiene dominio de caja F (<i>skpt-1</i>)	HomoloGene y bibliografía
AK077997	Ubiquitina hipotética de conjugación enzimática E2W (Ube2w)	NM_061186.5	Enzima conjugadora de ubiquitina E2 W (<i>ubc-16</i>)	HomoloGene y bibliografía
NM_011081	Fosfatidilinositol glicano, clase A (Piga)	NM_063439.7	Proteína que contiene el dominio PIGA (<i>piga-1</i>)	HomoloGene, nBLAST y bibliografía
NM_028731	Proteína hipotética KIAA1228	NM_001379752.3	Proteína contenedora dominio (<i>esyt-2</i>)	HomoloGene
BC069181	Homólogo lin-9 (Lin9)	NM_001027845.6	Proteína lin-9 (<i>lin-9</i>)	HomoloGene y bibliografía
NM_009582	Proteína quinasa quinasa quinasa 12 activada por mitógenos (Map3k12)	NM_001026272.5	Proteína quinasa quinasa quinasa dlk-1 activada por mitógenos (<i>dlk-1</i>)	nBLAST y bibliografía
BC021504	UDP-N-acetil-apha-D-galactosamina polipéptido N-acetilgalactosaminiltransferasa 11	NM_001027777.5	Polipéptido putativo N-acetilgalactosaminiltransferasa 11 (<i>gly-11</i>)	HomoloGene, nBLAST y bibliografía
NM_026417	Familia de dominio Yip1, miembro 4 (Yipf4)	NM_001383502.2	Proteína YIPF (<i>Y60A3A.19</i>)	HomoloGene, nBLAST y bibliografía
BC027396	Ring-box 1 (Rbx1)	NM_073095.8	Proteína RING-box 1 (<i>rbx-1</i>)	nBLAST y bibliografía

Los mRNAs que posiblemente son regulados por GLA-3 se clasifican en 4 grupos principales de acuerdo a su función: apoptosis, meiosis, citoesqueleto y ubiquitinación

Para entender mejor el papel de los mRNAs que podrían unirse a GLA-3, buscamos agrupar a los 27 mRNAs de acuerdo con las funciones descritas para las proteínas que son codificadas por ellos (Tabla 7). Encontramos que para 9 proteínas aún no se conoce su función. Debido a lo anterior, de ahora en adelante nos centraremos en las 18 proteínas para las cuales ha sido descrita su función mediante métodos experimentales. Pudimos clasificar las funciones de las proteínas codificadas por estos transcritos en cuatro categorías: apoptosis, meiosis, citoesqueleto y ubiquitinación (Figura 9).

Tabla 7: 27 mRNAs de unión a GLA-3

ID de mRNA en <i>C. elegans</i>	Nombre	Función	Referencia
NM_066761.7	Hidrolasa carboxilo terminal 46 de ubiquitina (<i>usp-46</i>)	Contribuye a la regulación de la polaridad embrionaria.	PMID: 23209443
		Regula la abundancia del receptor de glutamato <i>glr-1</i> en el cordón nervioso ventral promoviendo su desubiquitinación y previniendo su degradación en el lisosoma	PMID: 21273419
NM_059239.6	Proteína 5 similar a la ubiquitina (<i>ubl-5</i>)	Involucrada en la respuesta de la proteína mitocondrial desplegada (mtUPR)	PMID: 17925224
NM_059309.9	Molécula 1 del adaptador de transducción de señales (<i>stam-1</i>)	Funciona en la línea germinal junto con la vía de señalización del receptor de efrina (<i>vab-1</i>) para regular negativamente la activación de MAPK	PMID: 16824915
		Forma parte del complejo ESCRT 0	PMID: 21193406
		Recluta y se une al complejo de policistina (<i>lov-1</i> y <i>pkd-2</i>) para la degradación lisosomal, actuando sobre los endosomas tempranos ubicados en la base ciliar	PMID: 17581863
NM_001264018.4	Mediador de la subunidad 31 de transcripción de la ARN polimerasa II (<i>mdt-31</i>)	Podría formar parte del complejo Mediator, un coactivador involucrado en la transcripción regulada de casi todos los genes dependientes de la ARN polimerasa II.	Por similitud a su homólogo humano
NM_076593.8	Nucleósido-difosfatasa <i>mig-23</i> (<i>mig-23</i>)	Hidroliza ADP, UDP y GDP. Es necesaria para la migración de las células de la punta distal (DCT)	PMID: 14688791
NM_001307238.2	Nucleósido-trifosfatasa <i>ntp-1</i> (<i>ntp-1</i>)	Hidroliza ATP, UTP y CTP	PMID: 15102851

NM_064923.6	Polirribonucleótido nucleotidiltransferasa (<i>BE0003N10.1</i>)	Podría permitir la actividad de unión al ARN y la actividad polirribonucleótido nucleotidiltransferasa	Por similaridad a su homólogo humano
NM_073215.8	Cullin-5 (<i>cul-5</i>)	Componente central de los complejos de ubiquitina-proteína ligasa E3 de tipo SCF Requerido para la fosforilación de la MAP quinasa MPK-1 en la línea germinal. En asociación con <i>rbx-2</i> parece estar involucrado en la progresión del ciclo celular meiótico en la línea germinal	PMID: 27030794 PMID: 17184777
NM_065299.7	Cadena ligera reguladora de miosina (<i>mlc-4</i>)	Regula la actividad y organización de la miosina II durante la elongación del embrión. Requerido por vía materna para la citocinesis durante la meiosis y la mitosis en el embrión temprano y para el establecimiento de la polaridad embrionaria anteroposterior	PMID:19675126 PMID: 10427096
NM_060624.9	Homólogo de proteína mago nashi (<i>mag-1</i>)	Involucrada en la determinación del sexo de la línea germinal hermafrodita, pues permite la ovogénesis al inhibir la función de uno o más de los genes masculinizantes (<i>fog</i> , <i>fem</i> y <i>gld</i>) que actúan durante L4 para promover la producción transitoria de espermatozoides en la línea germinal hermafrodita. Participa en la retención nuclear de pre-mRNA sin empalmar	PMID:14706697 PMID: 23149939
NM_001392140.1	Derlin-2 (<i>der-2</i>)	Promueve la vía de señalización de Notch en la línea germinal, la cual es la principal encargada en promover la proliferación celular	WBPaper00052163 (abstract de congreso y datos no publicados)
NM_001129192.6	Homólogo de proteína lin-7 (<i>lin-7</i>)	Regula positivamente el desarrollo vulvar Establece y mantiene la distribución asimétrica de canales y receptores en la membrana plasmática de células polarizadas	PMID: 33526581 PMID:16688213
NM_001383315.1	3', 5'-fosfodiesterasa cíclica putativa <i>pde-6</i> (<i>pde-6</i>)	Regula la contractilidad de la espermateca Regula negativamente la progresión meiótica durante la maduración de los ovocitos	PMID:32776941 PMID:22887816
NM_001356896.3	Proteína que contiene el dominio PlsC (<i>Y38C1AA.1</i>)	Puede tener actividad transferasa, transfiriendo grupos acilo	Por similaridad a su homólogo humano
NM_001029435.6	Regulador putativo de acetilcolina <i>unc-18</i> (<i>unc-18</i>)	Participa en la transmisión sináptica colinérgica y regulación positiva de la secreción de neurotransmisores	PMID: 1347782
NM_001028475.5	Serina / treonina-proteína quinasa <i>akt-1</i> (<i>akt-1</i>)	Actúa aguas abajo de <i>age-1</i> y <i>pdk-1</i> en la vía de transducción <i>daf-2</i> Fosforila a <i>daf-16</i> y <i>skn-1</i> , que promueven la longevidad, esto inhibe inhiben su entrada en el núcleo y antagonizan sus funciones	PMID: 15068796 PMID: 9716402 PMID:18358814

		Tiene un papel esencial en la regulación de la detención del desarrollo en la etapa de dauer	PMID:10364160
		Aguas abajo de age-1 y junto con akt-2 y sgk-1, promueve la supervivencia celular e inhibe la apoptosis durante el desarrollo embrionario	PMID:25383666
		Regula negativamente la apoptosis inducida por daño al DNA en la línea germinal	PMID: 17276923
NM_075871.7	subunidad 2 del complejo proteico de tráfico de partículas putativo (<i>sedl-1</i>)	Aún no ha sido estudiada su función, solamente su expresión en tejidos	
NM_063499.8	Enolasa (<i>enol-1</i>)	Puede tener actividad de unión a iones magnesio y la actividad fosfopiruvato hidratasa	Por similitud a su homólogo humano
NM_001380316.2	Proteína putativa de elongación de ácidos grasos 3 (<i>elo-3</i>)	Podría estar implicado en la síntesis de ácidos grasos de cadena muy larga y que tiene actividad transferasa, transfiriendo grupos acilo	Por similitud a su homólogo humano
NM_171865.7	Proteína que contiene dominio de caja F (<i>skpt-1</i>)	Parece tener un papel importante en el desarrollo de la gónada	PMID: 17145765
NM_061186.5	Enzima conjugadora de ubiquitina E2 W (<i>ubc-16</i>)	Junto con ubc-18, es necesaria para la ubiquitinación de orgánulos membranosos y la eliminación de mitocondrias paternas de embriones tempranos	PMID: 31153831
NM_063439.7	Proteína que contiene el dominio PIGA (<i>piga-1</i>)	Se encuentra implicada en la progresión de mitosis durante la ovulación, también parece estar implicada en el desarrollo de la gónada	PMID: 22298425
NM_001027845.6	Proteína lin-9 (<i>lin-9</i>)	Requerido para el desarrollo de las células de la vaina en la gónada hermafrodita y para el desarrollo de la espícula masculina, los radios y la gónada	PMID:10974557
		Se requiere para reprimir la inducción del desarrollo vulvar mediante la señalización de Ras	PMID: 17075059
		Junto con ztf-11, regula negativamente la expresión de genes no neuronales durante la neurogénesis	PMID: 31386623
		Regula positivamente la apoptosis en células somáticas de larvas L1	PMID:27650246
NM_001026272.5	Proteína quinasa quinasa quinasa dlk-1 activada por mitógenos (<i>dlk-1</i>)	Componente de una vía MAP quinasa con un papel importante en la diferenciación presináptica durante el desarrollo embrionario	PMID: 15707898
		Tiene un papel en la regeneración axonal después de una lesión	PMID:19737525
		Promueve modificaciones postraduccionales de la tubulina que permite que el citoesqueleto de microtúbulos pueda crecer, esto en un contexto de regeneración axonal	PMID:23000142

		Desempeña un papel en la regulación de la longitud y transporte intraflagelar en los cilios	PMID:26657059
		Desempeña un papel en la formación de conexiones musculares, también llamadas extensiones del brazo muscular, entre la pared del cuerpo y los axones motores en el cordón dorsal y ventral	PMID: 27123983
NM_001027777.5	Polipéptido putativo N-acetilgalactosaminiltransferasa 11 (<i>gly-11</i>)	Posiblemente tenga una función en la transferencia de un residuo de N-acetil-D-galactosamina a un residuo de serina o treonina en el receptor de alguna proteína	Por similitud a su homólogo humano
NM_001383502.2	Proteína YIPF (<i>Y60A3A.19</i>)	Aún no ha sido estudiada su función, solamente su expresión en tejidos	
NM_073095.8	Proteína RING-box 1 (<i>rbx-1</i>)	Componente del complejo de ligasa de ubiquitina E3 de SCF (SKP1-CUL1-F-box protein), que media la ubiquitinación y la posterior degradación proteasomal de las proteínas diana	PMID:21115485
		Esencial para la regulación positiva de la transición metafase / anafase del ciclo celular meiótico	PMID: 21624359
		Necesaria para la condensación cromosómica mitótica y la citocinesis	PMID: 14622138

mRNAs que participan en la apoptosis

MPK-1 es una proteína que forma parte de la vía de señalización de MAPK, es esencial para la progresión del paquiteno. Cuando las células germinales salen del paquiteno son susceptibles a sufrir apoptosis. Otras tres proteínas que encontramos y se encuentran relacionadas con el control de la apoptosis son CUL-5, RBX-1 y AKT-1. Se ha descrito que CUL-5 y RBX-1 fosforilan a MPK-1 (Sasagawa *et al.*, 2007), fosforilación necesaria para su activación. Por otro lado, AKT-1 regula negativamente la apoptosis en la línea germinal que es inducida por daño al DNA (Quevedo *et al.*, 2007).

mRNAs que participan en la meiosis

También encontramos tres proteínas que se encuentran implicadas en la regulación positiva de la meiosis; CUL-5, MLC-4 Y RBX-1. Se ha descrito que CUL-5 es necesaria para la fosforilación y subsecuente activación de MPK-1 (Sasagawa *et al.*,

2007); MLC-4, es una miosina y es necesaria para que se lleve a cabo la citocinesis en la embriogénesis de *C. elegans* (Shelton *et al.*, 1999); y RBX-1 es necesaria para la progresión metafase/anafase durante la etapa de meiosis en la ovogénesis (Yin *et al.*, 2011). También se encontró a la proteína PDE-6, la cual regula negativamente la meiosis y aunque no se sabe a detalle como ocurre la regulación, se propone que puede ser mediante la vía de señalización Gas–adenilato ciclasa–PKA en las células de la vaina (Kim *et al.*, 2012).

mRNAs que participan en funciones relacionadas al citoesqueleto

Identificamos a DLK-1 la cual promueve la regeneración axonal después de un corte (axotomía) (Ghosh-Roy *et al.*, 2012). Además, también identificamos a MLC-4, la cual se ha demostrado que es fundamental para el ensamblaje de filamentos de miosina II durante la elongación embrionaria (Gally *et al.*, 2009)

mRNAs que participan en el proceso de ubiquitinación

Encontramos varias proteínas que se encuentran asociadas a la vía de ubiquitinación, CUL-5, RBX-1 y UBC-16 tiene actividad de ubiquitin-ligasa y CUL-5, DLK-1 y UBC-16 se pueden unir a ubiquitin-ligasas (Okumura *et al.*, 2016; Jia *et al.*, 2011; Molina



Figura 9: Clasificación de los 27 posibles mRNAs de unión a GLA-3. Del análisis de homología se obtuvieron cuatro clasificaciones. Se puede notar que varias proteínas pertenecientes a la clasificación de apoptosis se comparten con la clasificación de meiosis y ubiquitinación. En el quinto grupo llamado “otros” se muestran todos los transcritos que no pudieron ser clasificados.

et al., 2019). Otra proteína relacionada con la ubiquitinación en el nematodo es STAM-1. Se ha descrito que STAM-1 pertenece al complejo ESCTR 0 y que dicha proteína es necesaria para clasificar la carga en endosomas tempranos, de manera dependiente de ubiquitina (Mayers *et al.*, 2011). Y UBL-5, es una proteína que induce la expresión de los genes *hsp-6* y *hsp-60*, ambas chaperonas necesarias para el buen plegamiento de proteínas mitocondriales (Benedetti *et al.*, 2006).

Otros mRNAs

El resto de mRNAs de los cuales no pudimos clasificar su función dentro de las cuatro categorías antes mencionadas o de los cuales no se sabe su función en *C. elegans*, están en esta categoría llamada como "Otros mRNAs" y engloba a 18 transcritos. Debido a que no son de nuestro interés por ahora, no los retomaremos en la parte experimental.

La mayoría de los mRNAs que son posibles blancos de GLA-3 no presentan enriquecimiento de sitios AREs en su 3'UTR

Decidimos buscar si estos mRNAs de *C. elegans* presentaban un enriquecimiento de sitios AREs en el 3'UTR, como sucede en humanos y ratones. Utilizamos la herramienta AREsite2 (Fallmann *et al.*, 2016) que permite identificar los distintos motivos AREs que se pueden encontrar en un mRNA (**Figura 10**). Esta herramienta ofrece la posibilidad de seleccionar la región a analizar (3'UTR, 5'UTR, secuencia codificante, exones o intrones), así como buscar en distintos organismos (Fallmann *et al.*, 2016). En este análisis nos enfocamos en los pentámeros y nonámeros encontrados en los 3'UTR de los 27 posibles mRNAs de unión a GLA-3, pues se ha descrito que entre más AREs y de estos, más nonámeros y pentámeros, tenga un mRNA es más posible la unión de TTP (Spasic *et al.*,

2012). Además, complementamos este análisis incluyendo a mRNAs de genes *housekeeping* en *C. elegans* que se han reportado previamente (Zhang *et al.*, 2012) y que funcionan en este caso como controles para la cantidad de sitios AREs que puede tener un mRNA, pues al ser genes *housekeeping* sus mRNAs no deben tener enriquecimiento de sitios AREs.

Para facilitar la visualización del análisis, realizamos un gráfico de puntos en función de la cantidad de AREs totales y a la cantidad de nonámeros y pentámeros en el 3'UTR de cada transcrito (**Figura 11**). En azul se muestran los transcritos que pertenecen a alguna de las 4 clasificaciones que hicimos (apoptosis, meiosis, citoesqueleto o ubiquitinación), en color negro los transcritos de nuestro análisis que no pudieron ser clasificados y en color rosa los transcritos pertenecientes a genes *housekeeping* (**Figura 11**). Observamos

	Pentámeros					Nonámeros			
	ATTTA	GTTTG	WTTTW	AWTAAA	TTTGTT	WWTTTWW	WWWTTTWWW	WWWWTTTWWWW	WWWWWTTTWWWWW
Hidrolasa carboxilo terminal 46 de ubiquitina (usp-46)									
Proteína 5 similar a la ubiquitina (ubl-5)									
Molécula 1 del adaptador de transducción de señales (stam-1)									
Mediador de la subunidad 31 de transcripción de la ARN polimerasa II (mdt-31)									
Nucleósido-difosfatasa mig-23 (mig-23)									
Nucleósido-trifosfatasa ntp-1 (ntp-1)									
Polirribonucleótido nucleotidiltransferasa (BE0003N10.1)									
Cullin-5 (cul-5)									
Cadena ligera reguladora de miosina (mlc-4)									
Homólogo de proteína mago nashi (mag-1)									
Derlin-2 (der-2)									
Homólogo de proteína lin-7 (lin-7)									
3',5'-fosfodiesterasa ciclica putativa pde-6 (pde-6)									
Proteína que contiene el dominio PIsC (Y38C1AA.1)									
Regulador putativo de acetilcolina unc-18 (unc-18)									
Serina / treonina-proteína quinasa akt-1 (akt-1)									
subunidad 2 del complejo proteico de tráfico de partículas putativo (sedl-1)									
Enolasa (enol-1)									
Proteína putativa de elongación de ácidos grasos 3 (elo-3)									
Proteína que contiene dominio de caja F (skpt-1)									
Enzima conjugadora de ubiquitina E2 W (ubc-16)									
Proteína que contiene el dominio PIGA (piga-1)									
Proteína lin-9 (lin-9)									
Proteína quinasa quinasa quinasa dlk-1 activada por mitógenos (dlk-1)									
Polipéptido putativo N-acetilgalactosaminiltransferasa 11 (gly-11)									
Proteína YIPF (Y60A3A.19)									
Proteína RING-box 1 (rbx-1)									

Figura 10: motivos AREs presentados en el 3'UTR de los 27 mRNAs que posiblemente se unen a GLA-3. En amarillo se resaltan aquellos mRNAs que entraron en nuestras 4 categorías (apoptosis, meiosis, citoesqueleto, ubiquitinación). En la parte superior se muestra cada uno de los motivos de AREs que fueron buscados en cada uno de los mRNAs, se resaltan aquellos motivos que pertenecen a los pentámeros y los nonámeros. En los recuadros, en durazno están representados aquellos motivos que sí están presentes en los 3'UTR y en rojo los que no. Cabe destacar que cada motivo marcado como presente en el 3'UTR de estos mRNAs (recuadros durazno) pueden estar 1 o más veces. En la nomenclatura de motivos, W se refiere a bases débiles (*weak*) tales como timina o adenina.

que los transcritos de *pde-6*, *akt-1*, *unc-18* y *y38claa.1* parecen tener más AREs. Sin embargo, observamos que la mayoría de los mRNAs de nuestro análisis (rosas y negros en **Figura 11**) no tienen un enriquecimiento de sitios AREs, pues varios de los mRNAs de nuestro análisis tienen una cantidad similar de AREs presentes en genes *housekeeping* (estrellas rosas en **Figura 11**). Estos resultados son coincidentes con que GLA-3 no tenga conservados los aminoácidos para reconocer los sitios AREs en los transcritos.

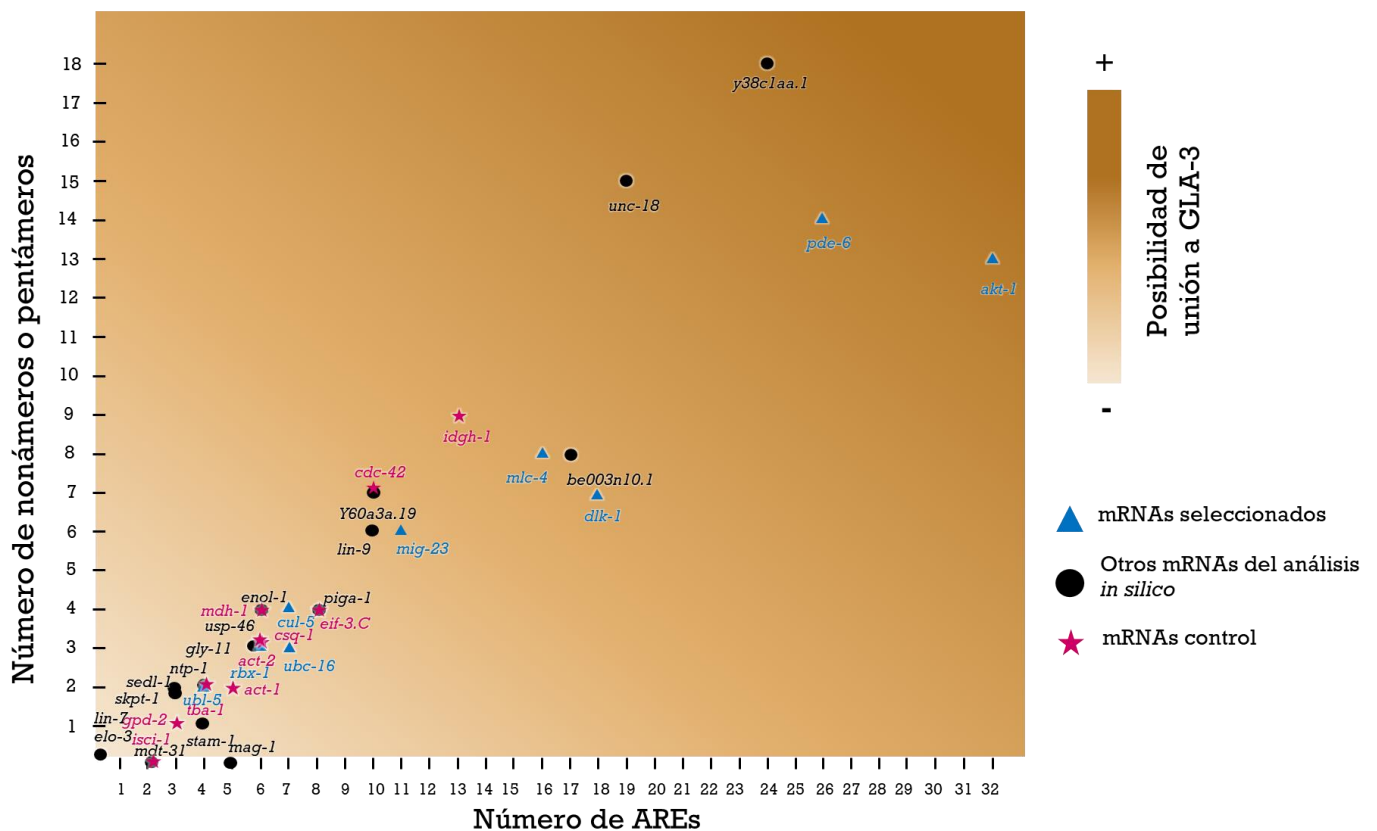


Figura 11. La mayoría de los mRNAs que posiblemente se unen a GLA-3, no presentan enriquecimiento de sitios ARE en el 3'UTR. En azul podemos observar aquellos transcritos que se encuentran en las clasificaciones de apoptosis, meiosis, citoesqueleto y ubiquitinación. En negro los transcritos que no pudimos clasificar y rosa aquellos transcritos pertenecientes a genes *housekeeping*, los cuales fueron utilizados como controles. El gradiente de tonalidades azules representa la posibilidad que un transcrito podría tener para unirse a GLA-3, esto bajo el principio de que GLA-3 se une a sitios AREs y mientras más AREs, una mayor posibilidad. La búsqueda de estos sitios se realizó con la herramienta AREsite2 ya que es una herramienta que permite identificar los AREs de los transcritos en diversos organismos, como *C. elegans*.

El mRNA de *lin-9* es regulado positivamente por GLA-3

Para determinar experimentalmente si la regulación algunos blancos de TTP se conserva en *C. elegans* por la regulación mediante GLA-3, decidimos explorar si la expresión de los mRNAs que encontramos por métodos bioinformáticos es afectada cuando *gla-3* está ausente, para esto se realizaron PCR cuantitativas. Diseñamos pares de oligonucleótidos dirigidos hacia los transcritos que pertenecen a las funciones biológicas de apoptosis (*cul-5*, *rbx-1*, *akt-1* y *lin-9*), meiosis (*cul-5*, *rbx-1* y *pde-6*), citoesqueleto (*dlk-1* y *mlc-4*) y ubiquitinación (*cul-5*, *rbx-1*, *ubc-16*, *dlk-1* y *ubl-5*). (**Figura 9**). Para realizar los experimentos de PCR cuantitativo, se extrajo RNA y luego se sintetizó cDNA a partir de animales adultos de 1 día de la cepa silvestre N2 y la mutante con pérdida de función en *gla-3* alelo ep312. Los resultados de PCR de tiempo real fueron obtenidos a partir de cuatro muestras biológicas independientes, las cuales fueron tratadas con DNasa I para descartar la presencia de DNA y evitar una amplificación inespecífica. Para normalizar los valores de CT de cada amplificación se usó el gen ribosomal *18s* (Thermo Fisher., 2020).

A pesar de que se observa que varios transcritos están a la baja cuando *gla-3* está ausente, el único resultado significativo fue *lin-9*, el cual parece tener una expresión mayor en la cepa silvestre N2 comparado con la cepa mutante de *gla-3* (ep312) (p-valor ≤ 0.05) (**Figura 12**). Debido a que no obtuvimos amplificación por parte del par de oligonucleótidos dirigidos a *pde-6* y *ubc-16*, no se pueden ver representados en la **Figura 12**. Por lo tanto, ya que la expresión del mRNA de *lin-9* baja cuando GLA-3 no está, pensamos que este gen puede ser regulado por esta proteína de unión a RNA, aunque por el momento no podemos concluir si esta regulación es directa o indirecta.

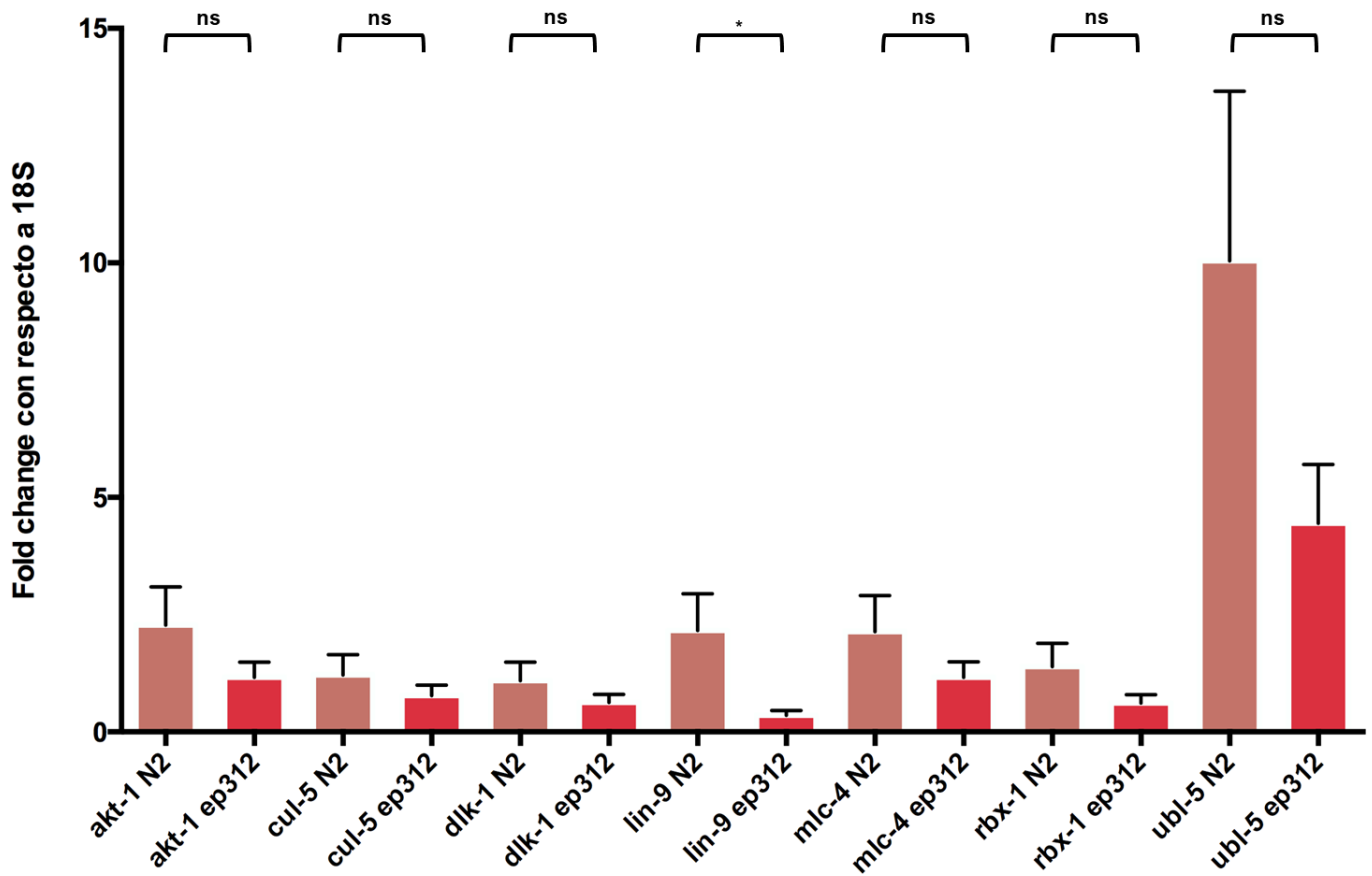


Figura 12: GLA-3 regula positivamente el mRNA de *lin-9*. RT-qPCRs de los mRNAs identificados en nuestro análisis bioinformático. Esta gráfica es el resultado de 4 muestras biológicas. Se observa que solamente el mRNA correspondiente a *lin-9* cuenta con una diferencia estadísticamente significativa, por lo que sugerimos que es regulado por GLA-3, pues ante su pérdida de función, la expresión de este se ve disminuida. El p-valor indicado es ≤ 0.05 .

El silenciamiento de *lin-9* rescata la elevada apoptosis de las células germinales sin *gla-3*

Como demostramos anteriormente, encontramos que el transcrito de *lin-9* es regulado por *gla-3*. Además, se ha reportado que LIN-9, otro miembro de la familia SynMuvB como LIN-35, induce la apoptosis en tejido somático de larvas L1 (Al-Amin *et al.*; 2016). Como no se conoce si LIN-9 tiene una función en la apoptosis en el desarrollo embrionario o en la línea germinal o si tiene alguna relación con el fenotipo de apoptosis aumentada en la línea germinal ante la ausencia de *gla-3*, decidimos estudiar su función en estas dos etapas. Mediante RNAi se silenció a *gla-3* y también se hizo un silenciamiento simultáneo de *gla-3* y *lin-9* en animales adultos de 1 día *ced-1(e1735)* (mutante que facilita la visualización de cuerpos apoptóticos (ver materiales y métodos). Como control se usó el plásmido vacío (PV), el cual no tiene ningún gen clonado. La eficiencia del RNAi fue de aproximadamente 80% y 75% para *gla-3* y *lin-9* respectivamente, lo cual es aceptable (**Apéndice I**).

Se ha reportado previamente que los animales mutantes en *gla-3* tienen una elevada apoptosis en la línea germinal (Kritikou *et al.*, 2006; Morales-Oliva, 2020) y de manera similar encontramos que los embriones y animales adultos *gla-3*(RNAi) presentaron una mayor apoptosis que el control PV (**Figura 13, 14 y 15**). Al realizar el silenciamiento de *lin-9* en embriones y adultos no encontramos diferencias significativas en el número de cuerpos apoptóticos con respecto al control de PV (**Figura 13, 14 y 15**). Estos datos nos sugieren que LIN-9 por sí misma no regula la apoptosis fisiológica (o basal) de la gónada del nematodo ni en la apoptosis embrionaria, a diferencia de lo que sucede en el estadio larvario L1 (Al-Amin *et al.*; 2016). Para probar si *lin-9* participa en la apoptosis junto con *gla-3*, se silenciaron ambos genes al mismo tiempo. Observamos que al silenciar *gla-3* y *lin-9* simultáneamente, en los embriones se observa que el número

de cuerpos apoptóticos son similares a los del control, y en la gónada se observa que incluso son más bajos que el control (Figura 13). Lo que nos indica que la apoptosis elevada de los animales *gla-3*(RNAi) se vio disminuida al silenciar en conjunto *lin-9* y *gla-3* (Figura 13). Estos datos nos sugieren que la proteína LIN-9 es epistática a GLA-3 en la embriogénesis y en la línea germinal.

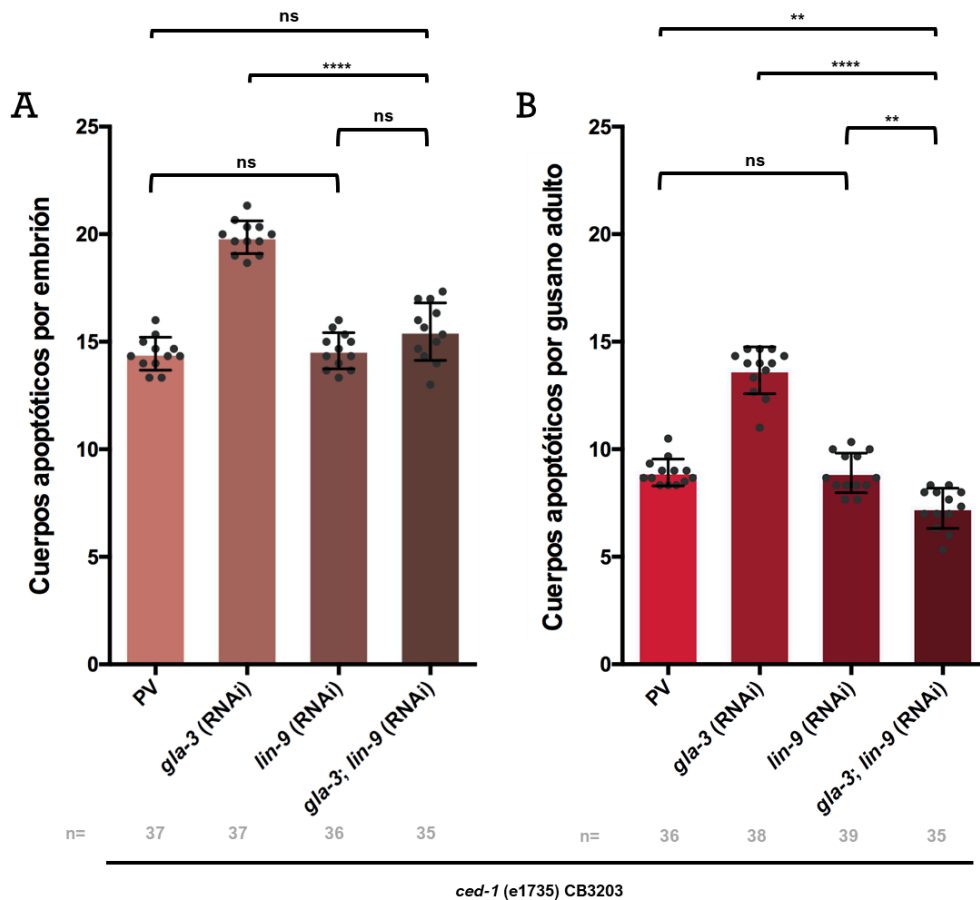


Figura 13: *lin-9* es epistática a *gla-3* en embriones y animales hermafroditas. En esta figura se observan las cuantificaciones correspondientes a los experimentos presentados en las figuras 15, 16, 17 y 18. A) Conteo de cuerpos apoptóticos en embriones. B) Conteo de cuerpos apoptóticos en gónadas de gusanos adultos hermafroditas en condiciones control, choque de calor y ayuno. En todos los experimentos la *n* corresponde a tres replicas independientes.

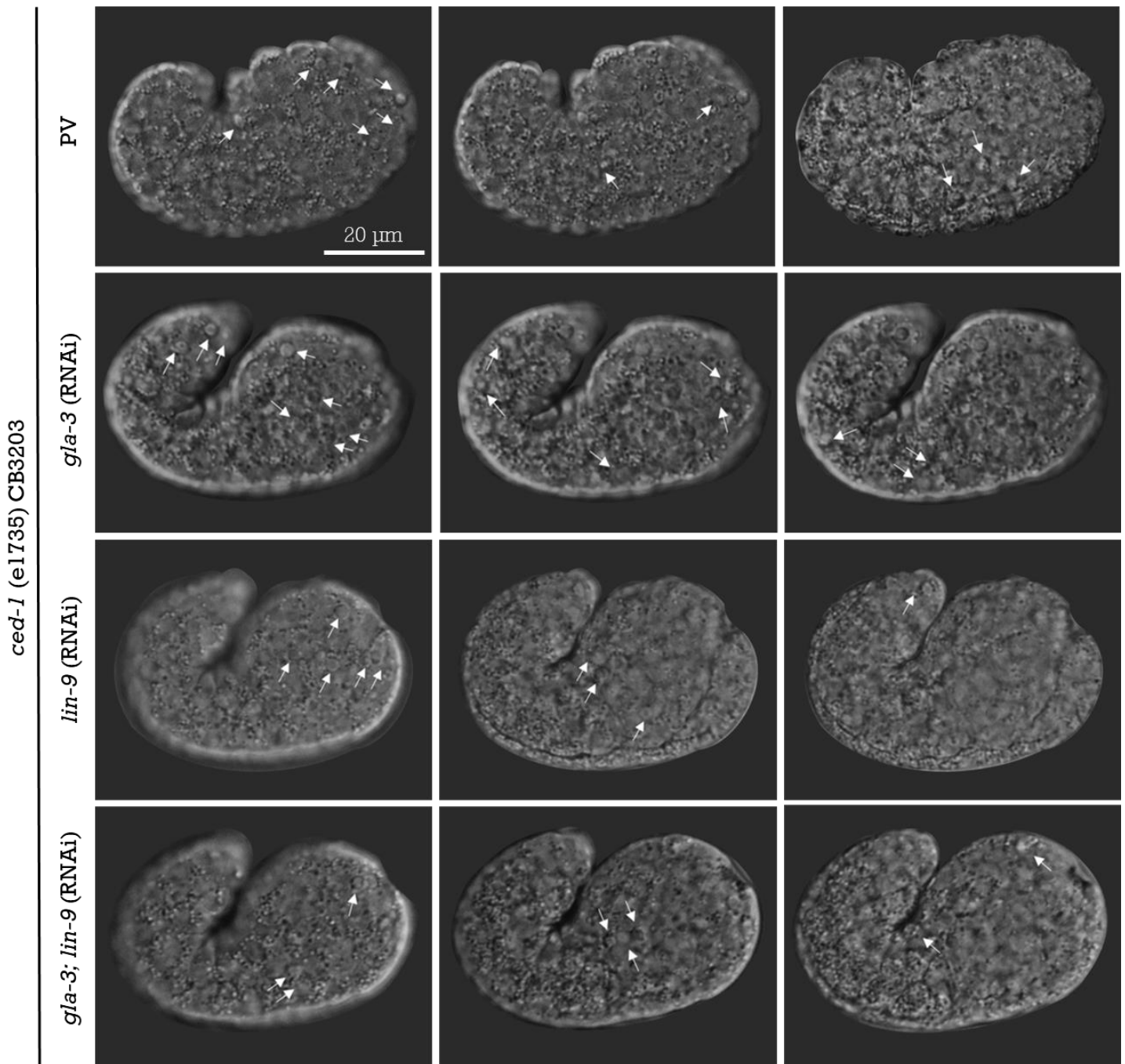


Figura 14: Conteo de cuerpos apoptóticos en embriones. Estos experimentos fueron realizados en embriones mutantes en *ced-1* (e1735) en el estadio de coma y los cuerpos apoptóticos fueron observados por microscopía Nomarski. Se muestran distintos planos donde se observan distintos cuerpos apoptóticos en el mismo embrión, en flechas blancas se marcan cada uno de los cuerpos apoptóticos visibles en las imágenes presentadas.

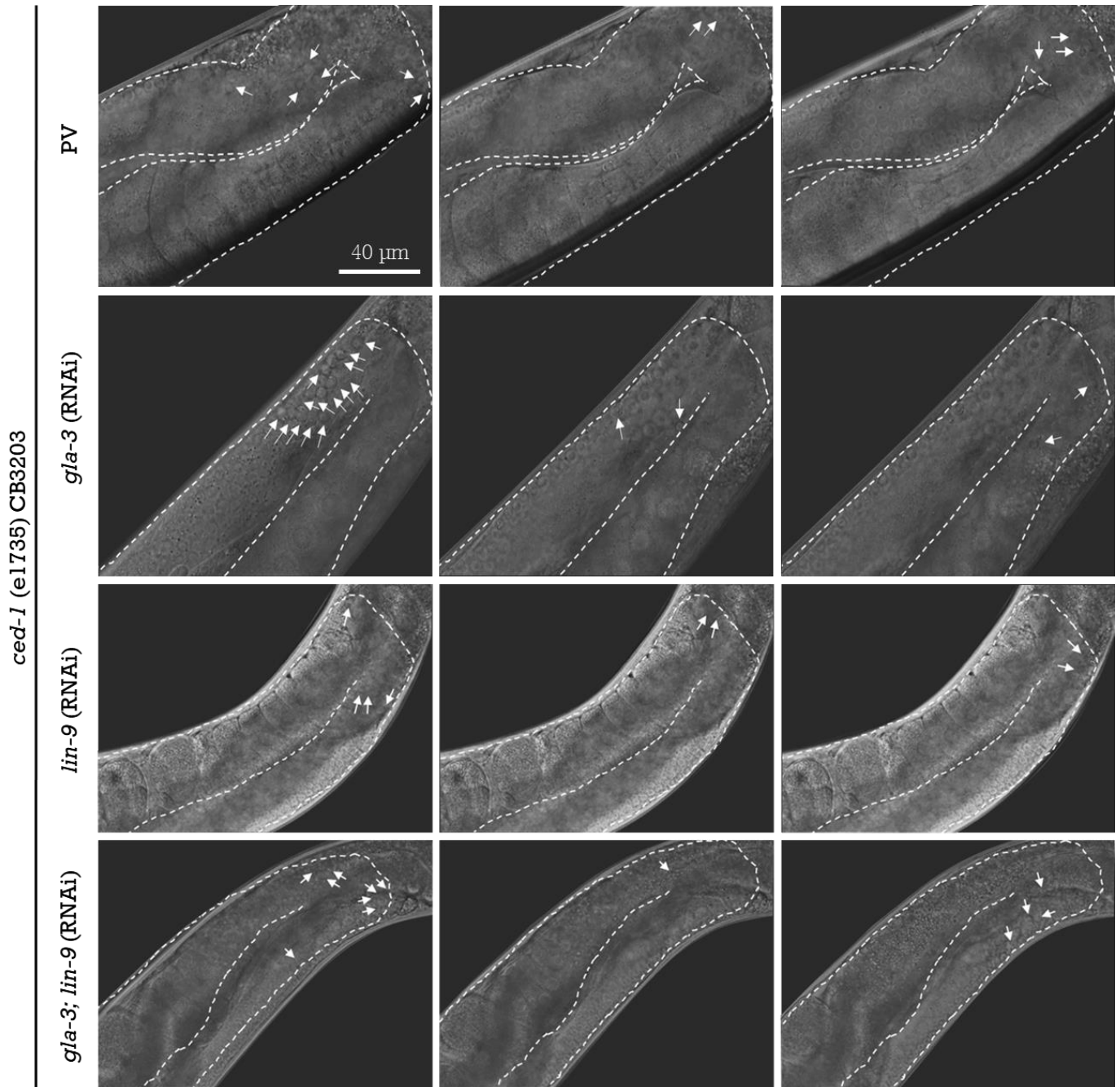


Figura 15: Conteo de cuerpos apoptóticos en la gónada de gusanos hermafroditas adultos. Estos experimentos fueron realizados en gusanos adultos de 1 día, con mutación en *ced-1* (e1735). Los cuerpos apoptóticos fueron observados por microscopía Nomarski. Se muestran distintos planos donde se observan distintos cuerpos apoptóticos en la misma gónada, en flechas blancas se marcan cada uno de los cuerpos apoptóticos visibles en las imágenes presentadas.

lin-9 no regula la apoptosis en el estrés por ayuno o choque de calor en las células germinales

Reportes previos muestran que LIN-35 regula parcial y positivamente la apoptosis durante el estrés por ayuno (Lascarez-Lagunas *et al.*, 2014). Por lo tanto, decidimos investigar si LIN-9 también podía regular positivamente la apoptosis durante el ayuno e incluso otro tipo de estrés como lo es el choque de calor. Realizamos silenciamiento de *lin-9* por medio de RNAi y para inducir el ayuno los animales hermafroditas adultos de un día 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 horas y 30 minutos de recuperación. Encontramos que no hubo diferencias significativas en el número de cuerpos apoptóticos en la condición control de PV o al silenciar *lin-9* (Figura 16 y 17), tanto en ayuno como en choque de calor. Por estos resultados, determinamos que LIN-9 no regula la apoptosis durante el ayuno como lo hace LIN-35.

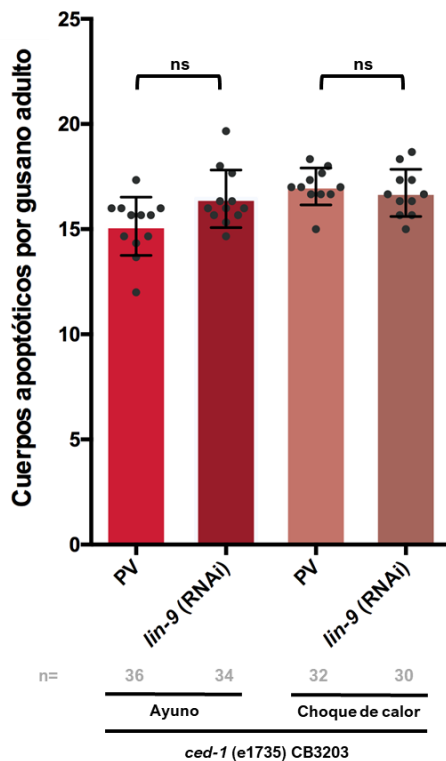


Figura 16: *lin-9* no regula la apoptosis en la gónada hermafroditas de un día durante el estrés por ayuno y choque de calor. En esta figura se observan las cuantificaciones correspondientes a los experimentos presentados en la figura 17. En las dos primeras barras se cuantifica el número de cuerpos apoptóticos en la gónada de gusanos expuestos a estrés por ayuno durante 6 horas (barras rojas). Y en las segundas barras el número de cuerpos apoptóticos en la gónada de gusanos expuestos a choque de calor por 3 horas y 4 horas 30 min de recuperación (barras durazno). No se observan diferencias significativas.

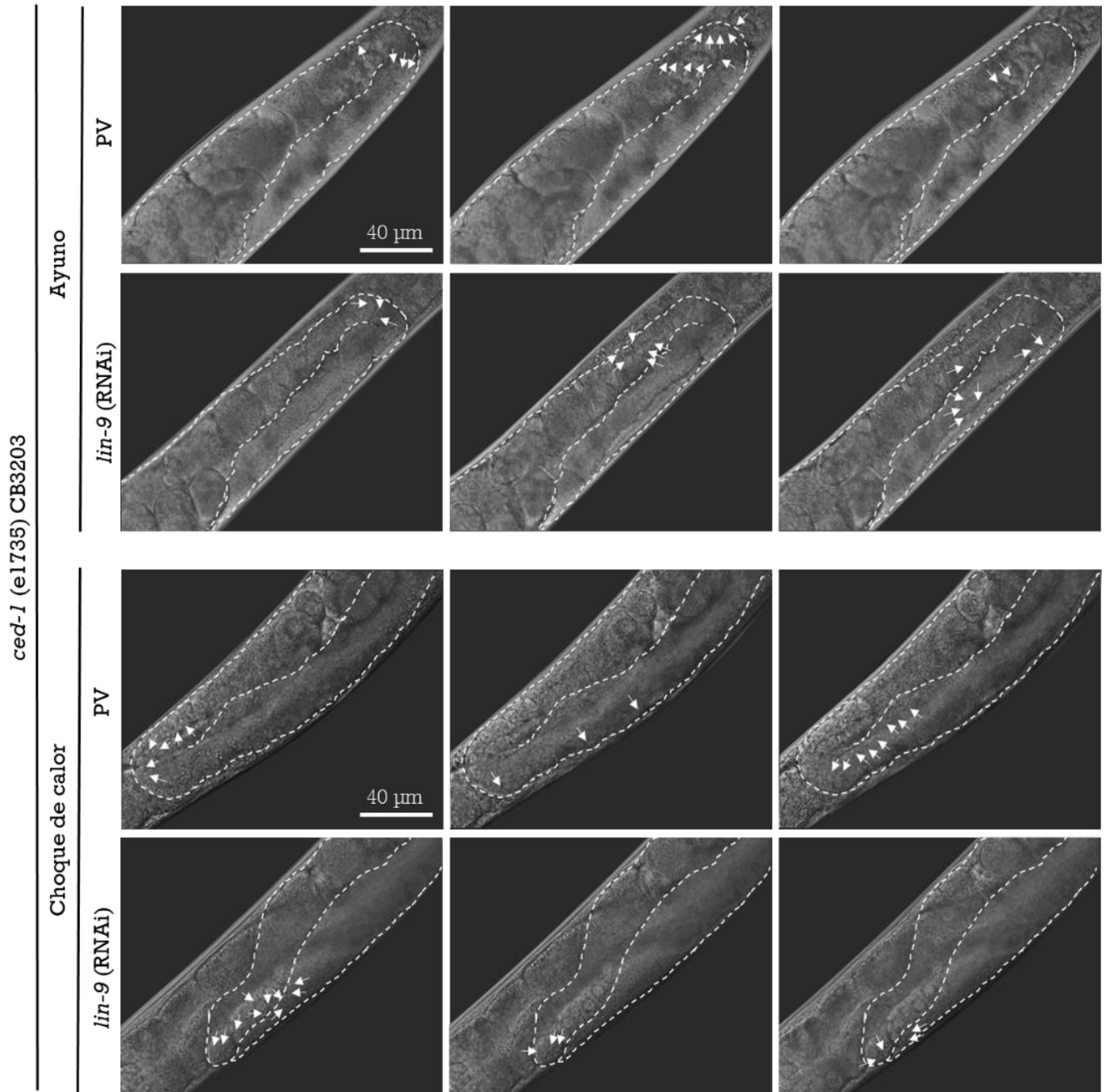


Figura 17: Conteo de cuerpos apoptóticos en la gónada de gusanos hermafroditas adultos durante el estrés por ayuno y choque de calor. Estos experimentos fueron realizados en gusanos adultos de 1 día, con mutación en *ced-1 (e1735)*. Los gusanos fueron ayunados por 6 horas a 20°C. Para el choque de calor los gusanos fueron expuestos a 31°C por 3 horas, con un periodo de recuperación a 20°C por 4 horas 30 minutos. Los cuerpos apoptóticos fueron observados por microscopía Nomarski. Se muestran distintos planos donde se observan distintos cuerpos apoptóticos en la misma gónada, en flechas blancas se marcan cada uno de los cuerpos apoptóticos visibles en las imágenes presentadas.

DISCUSIÓN

En este trabajo encontramos que la secuencia de GLA-3 presenta un 34.88% de identidad con respecto a hTTP. Pues mientras esta última es una proteína de 326 aminoácidos, GLA-3 tiene una longitud de 646 aminoácidos (**Figura 4A**). La localización de los dedos de zinc tampoco es similar pues mientras hTTP presenta los dedos de zinc en tándem, localizados cercanos al centro de la proteína, los dedos de zinc de GLA-3 están cercanos o en los extremos y separados por 554 aminoácidos (**Figura 4A**). También encontramos que GLA-3 no conserva varios de los aminoácidos necesarios para formar puentes de hidrógeno con los sitios AREs o los aminoácidos aromáticos (**Figura 4B**). Además, tampoco logramos identificar alguna secuencia parecida al CNB de hTTP, por lo que concluimos que GLA-3 no tiene este dominio (**Figura 4C y 6**). No obstante, GLA-3 sí conserva las cisteínas e histidinas que hacen a estos dominios, dedos de zinc tipo C_3H_1 (**Figura 4B**). Además de también conservar la estructura tridimensional de los dedos de zinc de este tipo (**Figura 7**), lo que sugiere que GLA-3 no se une a sitios AREs, pero sí tiene la capacidad de unirse a RNA con sus dedos de zinc.

Identificamos 27 transcritos candidatos que pensamos serían regulados por GLA-3 (**Tabla 7**) los cuales fueron clasificados en cuatro categorías: apoptosis, meiosis, citoesqueleto y ubiquitinación (**Figura 9**). A pesar de que encontramos que no tenían enriquecimiento de sitios AREs en el 3' UTR, como sucede con sus transcritos homólogos en mamíferos (**Figura 10 y 11**), pudimos identificar que el mRNA de *lin-9* es positivamente regulado por GLA-3 (**Figura 12**), aunque con estos experimentos aún no podemos concluir si lo hace directa o indirectamente.

Finalmente, decidimos investigar si *lin-9* podía regular la apoptosis en embriones y en la gónada del adulto hermafrodita. Encontramos que por sí sola LIN-9 no puede regular la apoptosis embrionaria ni fisiológica (en la gónada del hermafrodita) (**Figura 13, 14 y 15**). No obstante, parece que LIN-9 es epistática a GLA-3, pues el fenotipo de

apoptosis aumentada presentado en gusanos con silenciamiento de *gla-3* es abolido tras el silenciamiento conjunto de *gla-3* y *lin-9* (Figura 13). Además, identificamos que *lin-9* no puede regular la apoptosis en la gónada del adulto en el estrés por ayuno y choque de calor (Figura 16 y 17). Estos resultados nos sugieren que LIN-9 se encuentra río arriba de GLA-3, que se ha demostrado regula negativamente a la forma activa de MPK-1 quien a su vez regula positivamente la apoptosis (Kritikou *et al.*, 2006). Además, en esta vía sabemos que GLA-3 regula positivamente el transcrito de *lin-9*, no obstante, debe haber otro u otros elementos y/o mecanismos que regulen la traducción de LIN-9, pues cuando se silencia a *lin-9* la apoptosis no se ve aumentada (Figura 18).

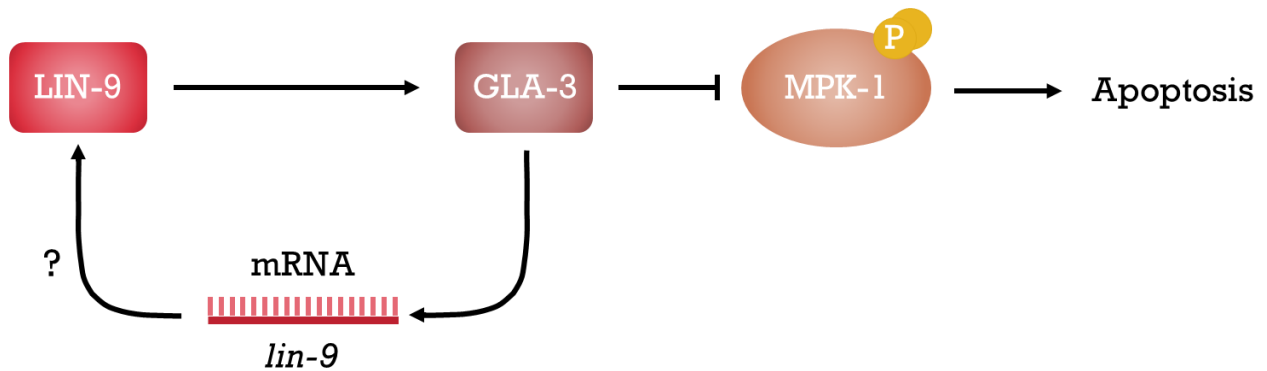


Figura 18: LIN-9 regula negativamente la apoptosis a través de GLA-3, participando en la vía de MPK-1. LIN-9 se encuentra río arriba GLA-3, se conoce que GLA-3 interactúa físicamente con la forma activada de MPK-1 (di fosforilada) para regular negativamente la apoptosis en la línea germinal del nematodo (apoptosis fisiológica) (Kritikou *et al.*, 2006). A su vez, GLA-3 regula positivamente la expresión del mRNA de *lin-9*. Es posible que haya más elementos aún no conocidos que regulen la traducción de LIN-9.

Es posible que GLA-3 no se una a sitios AREs y, por lo tanto, regule de otra manera los genes que encontramos en nuestro análisis

En este trabajo encontramos que hTTP y mTTP conservan la mayoría de los aminoácidos que forman puentes de hidrógeno con los sitios AREs, así como los aminoácidos aromáticos y las cisteínas e histidinas (**Figura 4B**). Por otro lado, encontramos que GLA-3 sólo tiene conservadas las cisteínas, histidinas y la estructura tridimensional que hace a sus dominios dedos de zinc tipo C_3H_1 , pero no conserva la mayoría de los aminoácidos que forman puentes de hidrógeno con los AREs o los aminoácidos aromáticos (**Figura 4B y 7**). También reportamos que otras proteínas con dedos de zinc C_3H_1 de *C. elegans* (OMA-1, MEX-5 y POS-1) (Kaymak *et al.*, 2013; Pagano *et al.*, 2007; Farley *et al.*, 2012) tampoco presentan la mayoría de los aminoácidos formadores de puentes de hidrógeno o los aromáticos (**Figura 8C**). En coincidencia con lo anterior, se ha demostrado que sus motivos de unión al 3'UTR de los mRNAs son distintos a los AREs, pero sí son ricos en adenina y uracilo (**Figura 8B**). Esta información nos brinda indicios de que es probable que GLA-3 tampoco pueda unirse a sitios AREs. Por ahora, no sabemos cuál podría ser la secuencia consenso que reconozca GLA-3, aunque es posible que también sea una secuencia rica en adenina y uracilo.

Observamos que GLA-3 es la única proteína que tiene dos dedos de zinc separados por un *linker* extenso (554 aminoácidos) mientras que hTIS11d, hTTP, mTTP, OMA-1, MEX-5 y POS-1 tienen *linkers* que van desde los 9 hasta los 15 aminoácidos (**Figura 4A y 8A**). Se ha demostrado que la región *linker* de hTIS11d al ser tan corta es en su mayoría una región rígida y tiene una función de estabilización de los dedos de zinc (Hudson *et al.*, 2014), por lo anterior, es posible que esta función de estabilización no esté presente en GLA-3. Se desconoce que otras implicaciones pueda tener esta característica en GLA-3.

El dominio de unión a CCR4-NOT no es el único que puede reclutar proteínas que promueven la desdenilación

Aquí reportamos que GLA-3 no presenta el dominio de unión a CCR4-NOT (CNB) (Figura 4C, 6A y B). Este dominio es el encargado de reclutar al complejo que lleva su nombre, promueve la desdenilación y subsecuente degradación de los mRNAs que se unen a hTTP. Ya que GLA-3 no presenta este dominio, se podría pensar que no conserva su función de degradación de transcritos. No obstante, se ha identificado que hTTP mediante su extremo N-terminal puede reclutar otros componentes de degradación de mRNAs que no pertenecen al complejo CCR4-NOT, como lo son las proteínas DCP2, RRP4 y XRN1 (Sandler *et al.*, 2011; Lykke-Andersen *et al.*; 2005). No se ha identificado un motivo consenso que permita saber si otras proteínas de la familia de las TTP, como mTTP o hTIS11d, pueden reclutar estas proteínas de degradación de RNAs. Sería interesante evaluar si mTTP, hTIS11d e incluso GLA-3, pueden reclutar a DCP2, RRP4 y XRN1.

La disminución en la transcripción de *lin-9* ayuda a explicar otros fenotipos mostrados en gusanos con pérdida de función de GLA-3

En este trabajo identificamos que el mRNA de *lin-9* es regulado positivamente por GLA-3, pues en animales *gla-3* (ep312) la expresión del transcrito de *lin-9* baja, comparado con animales silvestres N2 (Figura 12). En larvas LIN-9 regula positivamente la apoptosis (Al-Amin *et al.*; 2016), pero nosotros encontramos que en embriones y en la gónada de animales hermafroditas LIN-9 por sí sola no puede regular la apoptosis en la gónada (Figura 13, 14 y 15). Uno de los fenotipos más evidentes en aquellos animales sin GLA-3, es el de apoptosis aumentada (Kritikou *et al.*, 2006). Como se esperaba, observamos que al silenciar *gla-3* la apoptosis también estaba aumentada, pero algo que

nos pareció interesante es que este fenotipo desaparece cuando son silenciados *gla-3* y *lin-9* conjuntamente (Figura 13, 14 y 15). Esto nos mostró que LIN-9 es epistática a GLA-3; además es posible que *gla-3* y *lin-9* se encuentren en la misma vía de señalización. Sería interesante indagar en esta propuesta iniciando con determinar si es que existe un bucle de retroalimentación entre *gla-3* y *lin-9*. Además, se debe considerar que al hacer silenciamiento conjunto de *gla-3* y *lin-9*, es posible que la eficiencia sea menor. Por lo que también estamos interesados en replicar los experimentos antes mencionados con cepas mutantes de *gla-3*, *lin-9* y una doble mutante de estos genes.

Otros fenotipos que se han reportado en gusanos mutantes en *gla-3* son: 1) Mayor letalidad embrionaria (Kritikou *et al.*, 2006), 2) extensión de la zona de paquiteno durante la ovogénesis (Kritikou *et al.*, 2006; Morales-Oliva, 2020) y 3) mayor eficiencia del RNAi (datos no publicados). Se ha reportado que gusanos mutantes en *lin-9*, también presentan letalidad embrionaria más alta, así como una mayor eficiencia en el silenciamiento por RNAi (Beitel *et al.*, 2000; Lehner *et al.*, 2006) lo cual nos hace pensar que *lin-9* podría en parte explicar los otros fenotipos reportados en la cepa mutante de *gla-3*. Sin embargo, son necesarios experimentos adicionales para poder aseverar esta sugerencia. Por otro lado, se ha descrito que LIN-9 de ratones es requerida para la progresión de células en paquiteno durante la espermatogénesis (Zhang *et al.*, 2021). En *C. elegans* no se ha estudiado si LIN-9 es requerida también para la correcta progresión durante la espermatogénesis o la ovogénesis, pero sería importante identificar si LIN-9 también está implicada en el fenotipo de extensión de paquiteno durante la ovogénesis.

LIN-9 y su papel en las condiciones de estrés

Como mencionamos anteriormente, decidimos estudiar si LIN-9 regula la apoptosis durante el estrés por ayuno debido a que su compañero en el complejo DRM y de familia, LIN-35, regula positivamente la apoptosis durante el ayuno. También estudiamos si tenía

esta función pero en el estrés por choque de calor, y en ambos casos, encontramos que no regula la apoptosis inducida por estrés (**Figura 16 y 17**). Esto puede ser debido a que LIN-35 funge como proteína *pocket*, es decir, puede interactuar con distintos factores transcripcionales para regular la transcripción. Sin embargo, no descartamos que LIN-9 no tenga un papel importante durante el estrés. Por ejemplo, se ha encontrado que otras proteínas del core del complejo DRM, tienen un papel central en las respuestas a distintos tipos de estrés. Por ejemplo, LIN-37 tiene un papel central en el estrés por rotura de doble cadena del DNA en mamíferos (Chen *et al.*, 2021) y LIN-54 en la tolerancia a estrés oxidativo y por choque de calor en *C. elegans* (Mütel *et al.*, 2019). Por lo anterior, consideramos que es importante estudiar qué otras funciones podría tener LIN-9 durante el estrés por ayuno y choque de calor, así como otros tipos de estrés como el oxidativo o por daño al DNA.

CONCLUSIONES

- Los dedos de zinc de la proteína GLA-3 se encuentran más separados que su homólogo TTP.
- Los aminoácidos requeridos para que se formen los puentes de hidrógeno con los sitios ARES (E157, R160, L169, C174, Q175, E195, R198, P207, C212 y H213), no se encuentran conservados en GLA-3. Tampoco conserva la mayoría de los aminoácidos aromáticos de TTP, los cuales también son importantes para la unión entre dedos de zinc y sitios ARES. Por lo que sugerimos que GLA-3 no regula sus blancos de la misma manera que TTP; promoviendo su degradación.
- Se encontraron 35 genes homólogos de los posibles blancos de TTP en el *C. elegans*. Se probó la expresión de 9 genes en la mutante de *gla-3* y solo *lin-9* bajo

su expresión de manera significativa. Por lo que sugerimos que GLA-3 podría regular positivamente la expresión del mRNA de *lin-9*.

- Por sí sola, la proteína LIN-9 no parece regular la apoptosis ni en la embriogénesis ni en la línea germinal.
- El silenciamiento de *lin-9* rescata el fenotipo de apoptosis elevada durante el silenciamiento de *gla-3* por lo que sugerimos que LIN-9 es epistática a GLA-3 y que ambas proteínas participan en la vía de MPK-1 para regular la apoptosis.
- LIN-9 no participa en la apoptosis inducida por estrés por ayuno o choque de calor.

PERSPECTIVAS

1. Estudiar otras funciones de LIN-9, así como su regulación en *C. elegans*.
 - Realizar una cruce entre gusanos mutantes en *lin-9* (n112) y *gla-3* (ep312) para verificar nuestros resultados.
 - Determinar si existe un bucle de retroalimentación entre GLA-3 y LIN-9.
 - Estudiar si la falta de *lin-9* rescata otros fenotipos que se observan en los animales mutantes en *gla-3*(ep312).
 - Estudiar otros posibles papeles de LIN-9 durante distintas condiciones de estrés.
 - Determinar si la proteína GLA-3 se une al mensajero de *lin-9* mediante hibridación *in situ*.

2. Comprender la función de GLA-3 como proteína de unión a RNA.

- Mediante ensayos de RIP-Chip encontrar transcritos que se unan a GLA-3.
- Determinar el motivo que GLA-3 en los 3'UTR de los mRNAs.
- Probar con mutaciones puntuales el papel de los diferentes dominios de GLA-3 en los fenotipos observados en la mutante en esta proteína.

BIBLIOGRAFÍA

- Al-Amin, M., Min, H., Shim, Y. H., & Kawasaki, I. (2016). Somatically expressed germ-granule components, PGL-1 and PGL-3, repress programmed cell death in *C. elegans*. *Scientific reports*, 6, 33884.
- Altun, Z. F., and D. H. Hall, (2009). Worm Atlas. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Andux, S. and Ellis, R. (2008). Apoptosis Maintains Oocyte Quality in Aging *Caenorhabditis elegans* Females. *PLoS Genetics*, 4(12), p.e1000295.
- Baou, M., Jewell, A., & Murphy, J. J. (2009). TIS11 family proteins and their roles in posttranscriptional gene regulation. *Journal of biomedicine & biotechnology*, 2009, 634520.
- Beitel, G. J., Lambie, E. J., & Horvitz, H. R. (2000). The *C. elegans* gene *lin-9*, which acts in an Rb-related pathway, is required for gonadal sheath cell development and encodes a novel protein. *Gene*, 254(1-2), 253–263.
- Benedetti, C., Haynes, C. M., Yang, Y., Harding, H. P., & Ron, D. (2006). Ubiquitin-like protein 5 positively regulates chaperone gene expression in the mitochondrial unfolded protein response. *Genetics*, 174(1), 229–239.
- Blackshear P. J. (2002). Tristetraprolin and other CCCH tandem zinc-finger proteins in the regulation of mRNA turnover. *Biochemical Society transactions*, 30(Pt 6), 945–952.
- Brady, J. P., Farber, P. J., Sekhar, A., Lin, Y. H., Huang, R., Bah, A., Nott, T. J., Chan, H. S., Baldwin, A. J., Forman-Kay, J. D., & Kay, L. E. (2017). Structural and hydrodynamic properties of an intrinsically disordered region of a germ cell-specific protein on phase separation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(39), E8194–E8203.
- Brenner, S., 1974. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77: 71–94.
- Burke, K. A., Janke, A. M., Rhine, C. L., & Fawzi, N. L. (2015). Residue-by-Residue View of In Vitro FUS Granules that Bind the C-Terminal Domain of RNA Polymerase II. *Molecular cell*, 60(2), 231–241.
- Chang, W. L., & Tarn, W. Y. (2009). A role for transportin in deposition of TTP to cytoplasmic RNA granules and mRNA decay. *Nucleic acids research*, 37(19), 6600–6612.
- Chen, B. R., Wang, Y., Tubbs, A., Zong, D., Fowler, F. C., Zolnerowich, N., Wu, W., Bennett, A., Chen, C. C., Feng, W., Nussenzweig, A., Tyler, J. K., & Sleckman, B. P. (2021). LIN37-DREAM prevents DNA end resection and homologous recombination at DNA double-strand breaks in quiescent cells. *eLife*, 10, e68466.

- Choi, Y. J., Lai, W. S., Fedic, R., Stumpo, D. J., Huang, W., Li, L., Perera, L., Brewer, B. Y., Wilson, G. M., Mason, J. M., & Blackshear, P. J. (2014). The Drosophila Tis11 protein and its effects on mRNA expression in flies. *The Journal of biological chemistry*, 289(51), 35042–35060.
- Ciais, D., Cherradi, N., & Feige, J. J. (2013). Multiple functions of tristetraprolin/TIS11 RNA-binding proteins in the regulation of mRNA biogenesis and degradation. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 70(12), 2031–2044.
- Conicella, A. E., Zerze, G. H., Mittal, J., & Fawzi, N. L. (2016). ALS Mutations Disrupt Phase Separation Mediated by α -Helical Structure in the TDP-43 Low-Complexity C-Terminal Domain. *Structure*, 24(9), 1537–1549.
- Conradt, B., Wu, Y. C., & Xue, D. (2016). Programmed Cell Death During Caenorhabditis elegans Development. *Genetics*, 203(4), 1533–1562.
- Corsi A.K., Wightman B., Chalfie M (2018). *A Transparent window into biology: A primer on Caenorhabditis elegans. Wormbook. Cold Spring Harbor Laboratory Press.*
- Damazo-Hernández, A. A. (2017). La proteína de unión a RNA gla-3 participa en la respuesta al estrés en la gónada del Caenorhabditis elegans. *Tesis de Licenciatura UNAM.*
- Darland-Ransom, M., Wu, Y.-C., & Xue, D. (2009). Programmed Cell Death in C. elegans. In Z. Dong & X.-M. Yin (Eds.), *Essentials of Apoptosis: A Guide for Basic and Clinical Research*(pp. 355-373). Humana Press.
- Desroches-Castan, A., Cherradi, N., Feige, J. J., & Ciais, D. (2011). A novel function of Tis11b/BRF1 as a regulator of Dll4 mRNA 3'-end processing. *Molecular biology of the cell*, 22(19), 3625–3633.
- Detwiler M.R., Reuben M., Li X., Rogers E., Lin R. Two zinc finger proteins, OMA-1 and OMA-2, are redundantly required for oocyte maturation in C. elegans . *Dev. Cell.* 2001;1:187–199.
- Dyson H. J. (2012). Roles of intrinsic disorder in protein-nucleic acid interactions. *Molecular bioSystems*, 8(1), 97–104.
- Ermolaeva, M. A., Segref, A., Dakhovnik, A., Ou, H. L., Schneider, J. I., Utermöhlen, O., Hoppe, T., & Schumacher, B. (2013). DNA damage in germ cells induces an innate immune response that triggers systemic stress resistance. *Nature*, 501(7467), 416–420.
- Fabian, M. R., Frank, F., Rouya, C., Siddiqui, N., Lai, W. S., Karetnikov, A., Blackshear, P. J., Nagar, B., & Sonenberg, N. (2013). Structural basis for the recruitment of the human CCR4-NOT deadenylase complex by tristetraprolin. *Nature structural & molecular biology*, 20(6), 735–739.
- Fallmann, J., Sedlyarov, V., Tanzer, A., Kovarik, P., & Hofacker, I. L. (2016). AREsite2: an enhanced database for the comprehensive investigation of AU/GU/U-rich elements. *Nucleic acids research*, 44(D1), D90–D95.
- Farley, B. M., & Ryder, S. P. (2012). POS-1 and GLD-1 repress glp-1 translation through a conserved binding-site cluster. *Molecular biology of the cell*, 23(23), 4473–4483.
- Fay, D. S., & Yochem, J. (2007). The SynMuv genes of Caenorhabditis elegans in vulval development and beyond. *Developmental biology*, 306(1), 1–9.
- Gally, C., Wissler, F., Zahreddine, H., Quintin, S., Landmann, F., & Labouesse, M. (2009). Myosin II regulation during C. elegans embryonic elongation: LET-502/ROCK, MRCK-1 and PAK-1, three kinases with different roles. *Development (Cambridge, England)*, 136(18), 3109–3119.
- Gartner A., Boag P.R., Blackwell T.K. (2018). Germline Survival and Apoptosis. *Wormbook*. Revisado por última vez en junio de 2021.
- Gauthier KD, Rocheleau CE. Golgi localization of the LIN-2/7/10 complex points to a role in basolateral secretion of LET-23 EGFR in the *Caenorhabditiselegans* vulval precursor cells. *Development*. 2021 Mar 5;148(5):dev194167.
- Ghosh-Roy, A., Goncharov, A., Jin, Y., & Chisholm, A. D. (2012). Kinesin-13 and tubulin posttranslational modifications regulate microtubule growth in axon regeneration. *Developmental cell*, 23(4), 716–728.

- Ghosh-Roy, A., Wu, Z., Goncharov, A., Jin, Y., & Chisholm, A. D. (2010). Calcium and cyclic AMP promote axonal regeneration in *Caenorhabditis elegans* and require DLK-1 kinase. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 30(9), 3175–3183.
- Gingerich, T. J., Stumpo, D. J., Lai, W. S., Randall, T. A., Stepan, S. J., & Blackshear, P. J. (2016). Emergence and evolution of Zfp3613. *Molecular phylogenetics and evolution*, 94(Pt B), 518–530.
- González-Rangel, A. A., & Navarro, R. E. (2021). LIN-35 beyond its classical roles: its function in the stress response. *The International journal of developmental biology*, 65(4-5-6), 377–382.
- Gumienny, T. L., Lambie, E., Hartweg, E., Horvitz, H. R., & Hengartner, M. O. (1999). Genetic control of programmed cell death in the *Caenorhabditis elegans* hermaphrodite germline. *Development (Cambridge, England)*, 126(5), 1011–1022.
- Harrison, M. M., Ceol, C. J., Lu, X., & Horvitz, H. R. (2006). Some *C. elegans* class B synthetic multivulva proteins encode a conserved LIN-35 Rb-containing complex distinct from a NuRD-like complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(45), 16782–16787.
- Hirsh, D., Oppenheim, D., & Klass, M. (1976). Development of the reproductive system of *Caenorhabditis elegans*. *Developmental biology*, 49(1), 200–219.
- Huang, W., Jiang, T., Choi, W., Qi, S., Pang, Y., Hu, Q., Xu, Y., Gong, X., Jeffrey, P. D., Wang, J., & Shi, Y. (2013). Mechanistic insights into CED-4-mediated activation of CED-3. *Genes & development*, 27(18), 2039–2048.
- Hudson, B. P., Martinez-Yamout, M. A., Dyson, H. J., & Wright, P. E. (2004). Recognition of the mRNA AU-rich element by the zinc finger domain of TIS11d. *Nature Structural & Molecular Biology*, 11(3), 257–264.
- Huelgas-Morales, G., & Greenstein, D. (2018). Control of oocyte meiotic maturation in *C. elegans*. *Seminars in cell & developmental biology*, 84, 90–99.
- Iqbal, S., & Jones, M. G. K. (2017). Nematodes. *Encyclopedia of Applied Plant Sciences*, 113–119.
- Jia, L., Bickel, J. S., Wu, J., Morgan, M. A., Li, H., Yang, J., Yu, X., Chan, R. C., & Sun, Y. (2011). RBX1 (RING box protein 1) E3 ubiquitin ligase is required for genomic integrity by modulating DNA replication licensing proteins. *The Journal of biological chemistry*, 286(5), 3379–3386.
- Junger, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Židek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S., Ballard, A. J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., Back, T., ... Hassabis, D. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, 596(7873), 583–589.
- Kamath, R. S., Martinez-Campos, M., Zipperlen, P., Fraser, A. G., & Ahringer, J. (2001). Effectiveness of specific RNA-mediated interference through ingested double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Genome biology*, 2(1), RESEARCH0002.
- Kaymak, E., & Ryder, S. P. (2013). RNA recognition by the *Caenorhabditis elegans* oocyte maturation determinant OMA-1. *The Journal of biological chemistry*, 288(42), 30463–30472.
- Kim, S., Govindan, J. A., Tu, Z. J., & Greenstein, D. (2012). SACY-1 DEAD-Box helicase links the somatic control of oocyte meiotic maturation to the sperm-to-oocyte switch and gamete maintenance in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 192(3), 905–928.
- Kimble, J., & Hirsh, D. (1979). The postembryonic cell lineages of the hermaphrodite and male gonads in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol*, 70(2), 396–417.
- Kimble, J. E., & White, J. G. (1981). On the control of germ cell development in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol*, 81(2), 208–219.
- Kimble, J., and S. L. Crittenden, 2005. Germline proliferation and its control. WormBook 1. Última vez revisado en junio de 2020
- Kontoyiannis D. L. (2018). An RNA checkpoint that keeps immunological memory at bay. *Nature immunology*, 19(8), 795–797.

- 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.
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., Blagosklonny, M. V., El-Deiry, W. S., Golstein, P., Green, D. R., Hengartner, M., Knight, R. A., Kumar, S., Lipton, S. A., Malorni, W., Nuñez, G., Peter, M. E., Tschopp, J., Yuan, J., Piacentini, M., ... Nomenclature Committee on Cell Death 2009 (2009). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell death and differentiation*, 16(1), 3–11.
- Lai W.S., Kennington E.A., Blackshear P.J. (2003). Tristetraprolin and its family members can promote the cell-free deadenylation of AU-rich element-containing mRNAs by poly(A) ribonuclease. *Mol Cell Biol*. 23(11):3798-812.
- Lai, W. S., Carballo, E., Strum, J. R., Kennington, E. A., Phillips, R. S., & Blackshear, P. J. (1999). Evidence that tristetraprolin binds to AU-rich elements and promotes the deadenylation and destabilization of tumor necrosis factor alpha mRNA. *Molecular and cellular biology*, 19(6), 4311–4323.
- Lai, W. S., Carballo, E., Thorn, J. M., Kennington, E. A., & Blackshear, P. J. (2000). Interactions of CCCH zinc finger proteins with mRNA. Binding of tristetraprolin-related zinc finger proteins to Au-rich elements and destabilization of mRNA. *The Journal of biological chemistry*, 275(23), 17827–17837.
- Lai, W. S., Kennington, E. A., & Blackshear, P. J. (2002). Interactions of CCCH zinc finger proteins with mRNA: non-binding tristetraprolin mutants exert an inhibitory effect on degradation of AU-rich element-containing mRNAs. *The Journal of biological chemistry*, 277(11), 9606–9613.
- Lai, W. S., Perera, L., Hicks, S. N., & Blackshear, P. J. (2014). Mutational and structural analysis of the tandem zinc finger domain of tristetraprolin. *The Journal of biological chemistry*, 289(1), 565–580.
- Lai, W. S., Stumpo, D. J., Qiu, L., Faccio, R., & Blackshear, P. J. (2018). A Knock-In Tristetraprolin (TTP) Zinc Finger Point Mutation in Mice: Comparison with Complete TTP Deficiency. *Molecular and cellular biology*, 38(4), e00488-17.
- Lai, W. S., Stumpo, D. J., Wells, M. L., Gruzdev, A., Hicks, S. N., Nicholson, C. O., Yang, Z., Faccio, R., Webster, M. W., Passmore, L. A., & Blackshear, P. J. (2019). Importance of the Conserved Carboxyl-Terminal CNOT1 Binding Domain to Tristetraprolin Activity *In Vivo*. *Molecular and cellular biology*, 39(13), e00029-19.
- Lascarez-Lagunas, LI, Silva-García, CG., Dinkova, T. D., and Navarro, R. E. 2014. LIN-35/Rb Causes Starvation-Induced Germ Cell Apoptosis via CED-9/Bcl2 Downregulation in *Caenorhabditis elegans* *Mol. Cell. Biol.* 34, 2499-2516.
- Lee, M.-H. & Schedl, T. (2006). RNA-binding proteins. *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community.
- Lehner, B., Calixto, A., Crombie, C., Tischler, J., Fortunato, A., Chalfie, M., & Fraser, A. G. (2006). Loss of LIN-35, the *Caenorhabditis elegans* ortholog of the tumor suppressor p105Rb, results in enhanced RNA interference. *Genome biology*, 7(1), R4.
- Lettre, G., & Hengartner, M. O. (2006). Developmental apoptosis in *C. elegans*: a complex CEDnario. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 7(2), 97–108.
- Lettre, G., Kritikou, E. A., Jaeggi, M., Calixto, A., Fraser, A. G., Kamath, R. S., Ahringer, J., & Hengartner, M. O. (2004). Genome-wide RNAi identifies p53-dependent and -independent regulators of germ cell apoptosis in *C. elegans*. *Cell death and differentiation*, 11(11), 1198–1203.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, 25(4), 402–408.

- Lykke-Andersen, J., & Wagner, E. (2005). Recruitment and activation of mRNA decay enzymes by two ARE-mediated decay activation domains in the proteins TTP and BRF-1. *Genes & development*, 19(3), 351–361.
- Ma, Q., & Herschman, H. R. (1995). The yeast homologue YTIS11, of the mammalian TIS11 gene family is a non-essential, glucose repressible gene. *Oncogene*, 10(3), 487–494.
- Maciej, V. D., Mateva, N., Schwarz, J., Dittmers, T., Mallick, M., Urlaub, H., & Chakrabarti, S. (2022). Intrinsically disordered regions of tristetraprolin and DCP2 directly interact to mediate decay of ARE-mRNA. *Nucleic acids research*, 50(18), 10665–10679.
- McGee, M. D., Day, N., Graham, J., & Melov, S. (2012). cep-1/p53-dependent dysplastic pathology of the aging *C. elegans* gonad. *Aging*, 4(4), 256–269.
- Mittag, T., & Parker, R. (2018). Multiple Modes of Protein-Protein Interactions Promote RNP Granule Assembly. *Journal of molecular biology*, 430(23), 4636–4649.
- Molecular Kinetics Inc. (2007) PONDR algorithms. *PONDR*. <http://www.pondr.com/pondr-tut2.html>
- Molina, P., Lim, Y., & Boyd, L. (2019). Ubiquitination is required for the initial removal of paternal organelles in *C. elegans*. *Developmental biology*, 453(2), 168–179.
- Morales-Oliva, E. (2020). *Estudio de la relación entre el estrés, la fusión celular y la apoptosis en la gónada de Caenorhabditis elegans*. Tesis de Maestría UNAM.
- Murphy CT, McCarroll A, Bargmann I, Fraser A, Kamath R, Ahringer J, Kenyon HL, von C. 2003. Genes that act downstream of DAF-16 to influence the life span of *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 424: 277-283.
- Müthel, S., Uyar, B., He, M., Krause, A., Vitrinel, B., Bulut, S., Vasiljevic, D., Marchal, I., Kempa, S., Akalin, A., & Tursun, B. (2019). The conserved histone chaperone LIN-53 is required for normal lifespan and maintenance of muscle integrity in *Caenorhabditis elegans*. *Aging cell*, 18(6), e13012.
- Nezis, I. P., Stravopodis, D. J., Papassideri, I., Robert-Nicoud, M., & Margaritis, L. H. (2000). Stage-specific apoptotic patterns during *Drosophila* oogenesis. *European journal of cell biology*, 79(9), 610–620.
- Ngoc, L. V., Wauquier, C., Soin, R., Bousbata, S., Twyffels, L., Kruys, V., & Gueydan, C. (2014). Rapid proteasomal degradation of posttranscriptional regulators of the TIS11/tristetraprolin family is induced by an intrinsically unstructured region independently of ubiquitination. *Molecular and cellular biology*, 34(23), 4315–4328.
- Okumura, F., Joo-Okumura, A., Nakatsukasa, K., & Kamura, T. (2016). The role of cullin 5-containing ubiquitin ligases. *Cell division*, 11, 1.
- Osterloh, L., von Eyss, B., Schmit, F., Rein, L., Hübner, D., Samans, B., Hauser, S., & Gaubatz, S. (2007). The human synMuv-like protein LIN-9 is required for transcription of G2/M genes and for entry into mitosis. *The EMBO journal*, 26(1), 144–157.
- Pagano, J. M., Farley, B. M., McCoig, L. M., & Ryder, S. P. (2007). Molecular basis of RNA recognition by the embryonic polarity determinant MEX-5. *The Journal of biological chemistry*, 282(12), 8883–8894.
- 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.
- Pomeranz, M., Lin, P. C., Finer, J., & Jang, J. C. (2010). AtTZF gene family localizes to cytoplasmic foci. *Plant signaling & behavior*, 5(2), 190–192.
- Povea-Cabello, S., Oropesa-Ávila, M., de la Cruz-Ojeda, P., Villanueva-Paz, M., de la Mata, M., Suárez-Rivero, J. M., Álvarez-Córdoba, M., Villalón-García, I., Cotán, D., Ybot-González, P., & Sánchez-Alcázar, J. A. (2017). Dynamic Reorganization of the Cytoskeleton during Apoptosis: The Two Coffins Hypothesis. *International journal of molecular sciences*, 18(11), 2393.

- Quevedo, C., Kaplan, D. R., & Derry, W. B. (2007). AKT-1 regulates DNA-damage-induced germline apoptosis in *C. elegans*. *Current biology : CB*, *17*(3), 286–292.
- Raisch, T., Chang, C.T., Levdansky, Muthukumar S., Raunser S. & Valkov E. (2019). Reconstitution of recombinant human CCR4-NOT reveals molecular insights into regulated deadenylation. *Nat Commun* **10**, 3173.
- Reichert, N., Wurster, S., Ulrich, T., Schmitt, K., Hauser, S., Probst, L., Götz, R., Ceteci, F., Moll, R., Rapp, U., & Gaubatz, S. (2010). Lin9, a subunit of the mammalian DREAM complex, is essential for embryonic development, for survival of adult mice, and for tumor suppression. *Molecular and cellular biology*, *30*(12), 2896–2908.
- Riddle, D.L., Blumentahl, T., Meyer, B.J., & Priess J.R. (1997). Summary of Anatomy and Development of the Germ Line. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Section II.
- Rutkowski, R., Dickinson, R., Stewart, G., Craig, A., Schimpl, M., Keyse, S. M., & Gartner, A. (2011). Regulation of *Caenorhabditis elegans* p53/CEP-1-dependent germ cell apoptosis by Ras/MAPK signaling. *PLoS genetics*, *7*(8), e1002238.
- Saini, Y., Chen, J., & Patial, S. (2020). The Tristetraprolin Family of RNA-Binding Proteins in Cancer: Progress and Future Prospects. *Cancers*, *12*(6), 1539.
- Salinas, L. S., E. Maldonado, and R.E. Navarro. 2006. Stress-induced germ cell apoptosis by a p53 independent pathway in *Caenorhabditis elegans*. *Cell Death and Differentiation*. *13* (12) :p.2129-2139
- Sandler, H., Kreth, J., Timmers, H. T., & Stoecklin, G. (2011). Not1 mediates recruitment of the deadenylase Caf1 to mRNAs targeted for degradation by tristetraprolin. *Nucleic acids research*, *39*(10), 4373–4386.
- Sandler, H., Kreth, J., Timmers, H. T., & Stoecklin, G. (2011). Not1 mediates recruitment of the deadenylase Caf1 to mRNAs targeted for degradation by tristetraprolin. *Nucleic acids research*, *39*(10), 4373–4386.
- Sanduja, S., Blanco, F. F., Young, L. E., Kaza, V., & Dixon, D. A. (2012). The role of tristetraprolin in cancer and inflammation. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*, *17*, 174–188.
- Sasagawa, Y., Sato, S., Ogura, T., & Higashitani, A. (2007). *C. elegans* RBX-2-CUL-5- and RBX-1-CUL-2-based complexes are redundant for oogenesis and activation of the MAP kinase MPK-1. *FEBS letters*, *581*(1), 145–150.
- Schertel C. and B. Conradt, 2007. *C. elegans* orthologs of components of the RB tumor suppressor complex have distinct pro-apoptotic functions. *Development* *134*, 3691-3701.
- Schneider S.Q., Bowerman B. Cell polarity and the cytoskeleton in the *Caenorhabditis elegans* zygote. *Annu. Rev. Genet.* 2003;**37**:221–249.
- Schoenberg D.R, Maquat L.E. (2012) Regulation of cytoplasmic mRNA decay. *Nat Rev Genet*;13:246–59.
- Schumacher, B., Hanazawa, M., Lee, M.H., Nayak, S., Volkmann, K., Hofmann, E.R., Hengartner, M., Schedl, T., and Gartner, A. (2005). Translational repression of *C. elegans* p53 by GLD-1 regulates DNA damage-induced apoptosis. *Cell* *120*, 357–368.
- Shelton, C. A., Carter, J. C., Ellis, G. C., & Bowerman, B. (1999). The nonmuscle myosin regulatory light chain gene *mlc-4* is required for cytokinesis, anterior-posterior polarity, and body morphology during *Caenorhabditis elegans* embryogenesis. *The Journal of cell biology*, *146*(2), 439–451.
- Silva-García, C. G., & Estela Navarro, R. (2013). The *C. elegans* TIA-1/TIAR homolog TIAR-1 is required to induce germ cell apoptosis. *Genesis (New York, N.Y. : 2000)*, *51*(10), 690–707.
- Spasic, M., Friedel, C. C., Schott, J., Kreth, J., Leppek, K., Hofmann, S., Ozgur, S., & Stoecklin, G. (2012). Genome-wide assessment of AU-rich elements by the AREScore algorithm. *PLoS genetics*, *8*(1), e1002433.

- Stoecklin, G., Stubbs, T., Kedersha, N., Wax, S., Rigby, W. F., Blackwell, T. K., & Anderson, P. (2004). MK2-induced tristetraprolin:14-3-3 complexes prevent stress granule association and ARE-mRNA decay. *The EMBO journal*, *23*(6), 1313–1324.
- Stoecklin, G., Tenenbaum, S. A., Mayo, T., Chittur, S. V., George, A. D., Baroni, T. E., Blackshear, P. J., & Anderson, P. (2008). Genome-wide analysis identifies interleukin-10 mRNA as target of tristetraprolin. *The Journal of biological chemistry*, *283*(17), 11689–11699.
- Sulston J. E., Schierenberg, E., White, J. G., & Thomson, J. N. (1983). The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol*, *100*(1), 64–119.
- Taylor, G. A., Carballo, E., Lee, D. M., Lai, W. S., Thompson, M. J., Patel, D. D., Schenkman, D. I., Gilkeson, G. S., Broxmeyer, H. E., Haynes, B. F., & Blackshear, P. J. (1996). A pathogenetic role for TNF alpha in the syndrome of cachexia, arthritis, and autoimmunity resulting from tristetraprolin (TTP) deficiency. *Immunity*, *4*(5), 445–454.
- Thermo Fisher. (2022). 18S rRNA, the Best Internal Control. <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/references/ambion-tech-support/rtqcr-analysis/general-articles/using-18s-rna-as-an-internal-control-for-relative-rt-pcr.html>
- Tiwari, M., Prasad, S., Tripathi, A., Pandey, A. N., Ali, I., Singh, A. K., Shrivastav, T. G., & Chaube, S. K. (2015). Apoptosis in mammalian oocytes: a review. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*, *20*(8), 1019–1025.
- Tsukamoto, T., Gearhart, M. D., Spike, C. A., Huelgas-Morales, G., Mews, M., Boag, P. R., Beilharz, T. H., & Greenstein, D. (2017). LIN-41 and OMA Ribonucleoprotein Complexes Mediate a Translational Repression-to-Activation Switch Controlling Oocyte Meiotic Maturation and the Oocyte-to-Embryo Transition in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, *206*(4), 2007–2039.
- Uversky VN, Dunker AK. (2010). Understanding protein non-folding: *Biochimica et Biophysica Acta*. *1804*(6):1231-1264.
- Varnum, B. C., Lim, R. W., Sukhatme, V. P., & Herschman, H. R. (1989). Nucleotide sequence of a cDNA encoding TIS11, a message induced in Swiss 3T3 cells by the tumor promoter tetradecanoyl phorbol acetate. *Oncogene*, *4*(1), 119–120.
- Vernon, R. M., Chong, P. A., Tsang, B., Kim, T. H., Bah, A., Farber, P., Lin, H., & Forman-Kay, J. D. (2018). Pi-Pi contacts are an overlooked protein feature relevant to phase separation. *eLife*, *7*, e31486.
- Wiseman EF, Chen X, Han N, Webber A, Ji Z, Sharrocks AD, Ang YS. (2015). Deregulation of the FOXM1 target gene network and its coregulatory partners in oesophageal adenocarcinoma. *Molecular Cancer*. 14:69.
- Wolke, U., Jezuit, E. A., & Priess, J. R. (2007). Actin-dependent cytoplasmic streaming in *C. elegans* oogenesis. *Development (Cambridge, England)*, *134*(12), 2227–2236.
- Wong, M. C., & Schwarzbauer, J. E. (2012). Gonad morphogenesis and distal tip cell migration in the *Caenorhabditis elegans* hermaphrodite. *Wiley interdisciplinary reviews. Developmental biology*, *1*(4), 519–531.
- Xue, B., Dunbrack, R. L., Williams, R. W., Dunker, A. K., & Uversky, V. N. (2010). PONDR-FIT: a meta-predictor of intrinsically disordered amino acids. *Biochimica et biophysica acta*, *1804*(4), 996–1010.
- Yin, Y., Lin, C., Kim, S. T., Roig, I., Chen, H., Liu, L., Veith, G. M., Jin, R. U., Keeney, S., Jasin, M., Moley, K., Zhou, P., & Ma, L. (2011). The E3 ubiquitin ligase Cullin 4A regulates meiotic progression in mouse spermatogenesis. *Developmental biology*, *356*(1), 51–62.4
- Zarkower D. (2006). Somatic sex determination. *WormBook : the online review of C. elegans biology*, 1–12.

- Zhang, X., Li, M., Jiang, X., Ma, H., Fan, S., Li, Y., Yu, C., Xu, J., Khan, R., Jiang, H., & Shi, Q. (2021). Nuclear translocation of MTL5 from cytoplasm requires its direct interaction with LIN9 and is essential for male meiosis and fertility. *PLoS genetics*, 17(8), e1009753.
- Zhang, Y., Chen, D., Smith, M. A., Zhang, B., & Pan, X. (2012). Selection of reliable reference genes in *Caenorhabditis elegans* for analysis of nanotoxicity. *PloS one*, 7(3), e31849.
- Zhou Z, Hartweg E and Horvitz HR (2001) CED-1 is a transmembrane receptor that mediates cell corpse engulfment in *C. elegans*. *Cell* 104: 43–56
- Zhou, Z., Hartweg, E., & Horvitz, H. R. (2001). CED-1 is a transmembrane receptor that mediates cell corpse engulfment in *C. elegans*. *Cell*, 104(1), 43–56.

APÉNDICE 1

Eficiencia del RNA de interferencia

Para determinar la eficiencia del silenciamiento se hicieron controles para cada gen silenciado. En el caso del silenciamiento de *gla-3*, decidimos utilizar la cepa transgénica GFP::GLA-3, que consiste en la fusión de la proteína verde fluorescente (GFP) con la proteína GLA-3 (tn1 734[gfp::3xflag::gla-3a]) (Tsukamoto *et al.*, 2017), en esta cepa se silenció *gla-3* por RNAi y se cuantificaron las gónadas que presentaban o no fluorescencia después de realizar el silenciamiento. Cabe mencionar que en este experimento se incluyó la condición en que la bacteria que sirve como alimento se diluyó al 50% con medio LB (*gla-3* (RNAi) + LB) como cuando realizamos doble silenciamiento; también incluimos una condición en la que no se diluyó la bacteria, así como el control de plásmido vacío (PV), el cual no tiene ningún gen clonado. Encontramos que al realizar el silenciamiento de *gla-3* sin diluir la bacteria (*gla-3* (RNAi)), el 94.97% de los brazos de gónada contados, ya no presentaban fluorescencia de GFP::GLA-3. Al diluir la bacteria (*gla-3* (RNAi) + LB) observamos que solo el 79.67% de animales ya no presentaban fluorescencia (**Figura 18B y A**). Estos resultados muestran que la eficiencia de nuestro *gla-3* (RNAi) se ve un poco afectado por la dilución de la bacteria, no obstante, continúa conservando un buen porcentaje de eficacia (**Figura 18A**).

Se había reportado que la cepa mutante en *lin-9* (n112) presentaba un fenotipo silvestre, sin embargo, al trabajar con ella nos dimos cuenta de que esto no es así, y en realidad una gran proporción de animales presentaban el fenotipo conocido como “bolsa de gusanos” o “*baggy/bag of worms*”, caracterizado por la eclosión de los embriones dentro del gusano hermafrodita. Debido a esto, para medir la eficiencia del silenciamiento de *lin-9* utilizamos la cepa silvestre N2, a esta se le silenció *lin-9* y posteriormente se contaron los gusanos que presentaban el fenotipo *baggy*, estos resultados se compararon contra los obtenidos en la cepa mutante de *lin-9* (n112) (Beitel *et al.*, 2000). En este experimento también se incluyeron las condiciones de dilución de la bacteria (*lin-9* (RNAi) + LB), no diluida (*lin-9* (RNAi)) y PV. Encontramos que el 37.69% de los animales *lin-9* (n112) presentan el fenotipo *baggy* (**Figura 19D**), el cuál en estos gusanos, se puede deber a un mal funcionamiento de la vulva, pues en larvas L4 no se observa la estructura característica de gusanos con fenotipo silvestre (**Figura 19A**) aunque en la adultez sí se forme la vulva (**Figura 19B y C**). En los animales N2 donde se silenció a *lin-9*, observamos que el 29.64% mostraban el fenotipo *baggy* al silenciarse sin diluir la bacteria (*lin-9* (RNAi)) y el 25.11% cuando la bacteria era diluida (*lin-9* (RNAi) + LB) (**Figura 19D**). Debido a que el porcentaje de animales que presentan el fenotipo *baggy* al ser silenciado *lin-9*, es muy parecido al de animales *lin-9* (n112), podemos afirmar que nuestros silenciamientos tienen un buen porcentaje de eficiencia, incluso al ser diluida la bacteria.

Se ha reportado que otras cepas mutantes *lin-9* presentan problemas en la ovulación, integridad de la gónada y eclosión de embriones, lo que provoca un menor número de progenie por gusano (Beitel *et al.*, 2000); y trabajando con la cepa *lin-9* (n112) observamos que también presenta un menor número de progenie. A modo de una segunda forma de determinar la eficiencia del RNAi para *lin-9*, decidimos realizar un conteo de progenie acompañado de un conteo de letalidad embrionaria en animales *lin-*

9 (n112), en animales con silenciamiento de *lin-9* con y sin la bacteria diluida, y en PV. Observamos que en *lin-9* (n112) el 9.21% de los embriones no eclosionaron (letalidad embrionaria) y tenían una progenie total de ~200. En el silenciamiento de *lin-9* sin diluir la bacteria (*lin-9* (RNAi)), los gusanos presentaron un 16.16% de letalidad embrionaria y progenie total de ~200, al diluir la bacteria (*lin-9* (RNAi) + LB) un 6.54% de letalidad embrionaria y progenie total de ~260 y en PV los animales presentaron 3.79% de letalidad embrionaria y progenie total de ~320 (Figura 19E y F). Cabe mencionar que no hubo diferencias significativas en el número de progenie total entre las condiciones antes mencionadas (Figura 19F). También es importante mencionar que para medir la eficiencia del silenciamiento de *lin-9* por estos fenotipos, es necesario adquirir más experiencia, pues se podría estar sobreestimando el número de progenie total.

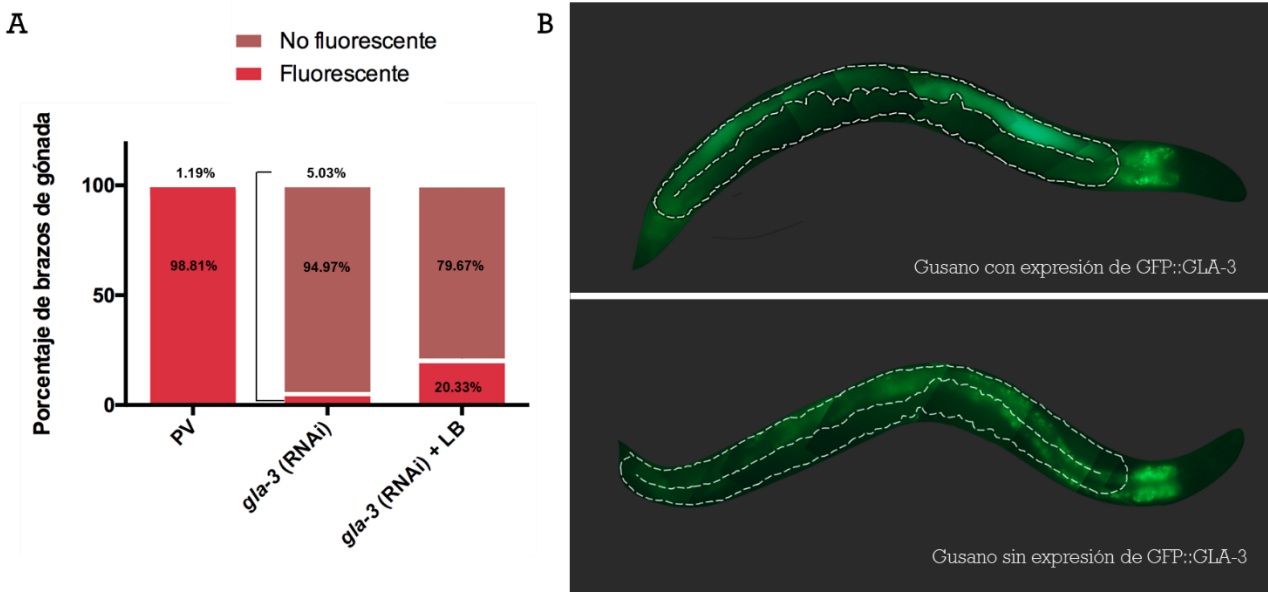


Figura 18: Conteo de brazos de gónada con fluorescencia de GFP::GLA-3, después del silenciamiento de *gla-3* por dsRNA (RNAi) para determinar la eficiencia del silenciamiento. Estos experimentos fueron realizados en gusanos adultos de 1 día transgénicos GFP::GLA-3. A) Gráfica del porcentaje de brazos de gónadas que presentan fluorescencia de GFP::GLA-3, en condición control de PV, *gla-3* (RNAi) y *gla-3* (RNAi) + LB que es la condición en la que se diluye la bacteria al 50%. B) Reconstrucciones de gusanos que presentan fluorescencia (arriba) o no (abajo) de GFP::GLA-3 en ambos brazos de la gónada. La *n* de este experimento corresponde a tres replicas independientes.

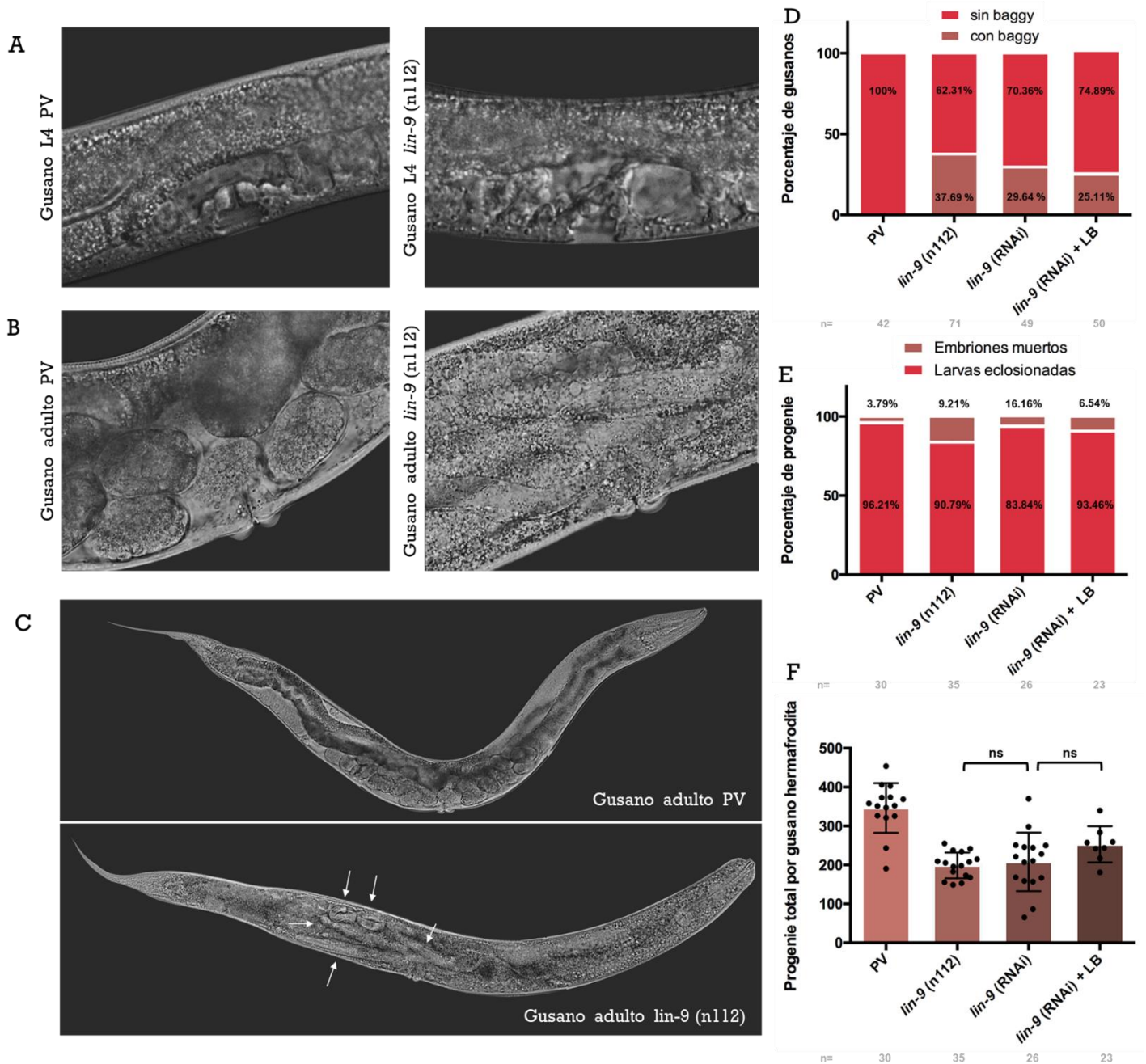


Figura 19: Fenotipos que permiten medir la eficiencia del silenciamiento de *lin-9*. A) Fotografías representativas de la estructura que se observa antes de que se forme la vulva. Estos experimentos fueron realizados con larvas L4 mutantes en *lin-9* (n112) o PV. B) Fotografías representativas de las vulvas formadas en gusanos adultos mutantes en *lin-9* (n112) o PV que formaron *baggy* o no, respectivamente. Estos experimentos fueron realizados en gusanos adultos de 1 día C) Reconstrucciones de gusanos que presentan el fenotipo *baggy* o no. En flechas se señalan los gusanos que han eclosionado dentro del gusano adulto. D) Gráfica del porcentaje de gusanos que presentaron el fenotipo de *baggy* o no. La *n* final es correspondiente a 4 experimentos independientes. E) Gráfica del porcentaje de progenie que presentó letalidad embrionaria (embriones muertos) o aquellos embriones que sí pudieron eclosionar (larvas eclosionadas). La *n* final es correspondiente a 3 experimentos independientes. F) Gráfica que muestra la progenie total. La *n* final es correspondiente a 3 experimentos independientes.