

Tesis de Maestría

Estudio de la expresión de las dos UDP-GLC: glicoproteína glucosiltransferasas codificadas en el genoma de *C. elegans*

Arango Restrepo, Olga Marcela

2008

Tesis presentada para obtener el grado de Magister de la
Universidad de Buenos Aires en Biología Molecular Médica
de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the Master's and Doctoral Theses Collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Arango Restrepo, Olga Marcela. (2008). Estudio de la expresión de las dos UDP-GLC: glicoproteína glucosiltransferasas codificadas en el genoma de *C. elegans*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n4732_ArangoRestrepo

Cita tipo Chicago:

Arango Restrepo, Olga Marcela. "Estudio de la expresión de las dos UDP-GLC: glicoproteína glucosiltransferasas codificadas en el genoma de *C. elegans*". Tesis de Magister. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2008.

http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n4732_ArangoRestrepo

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



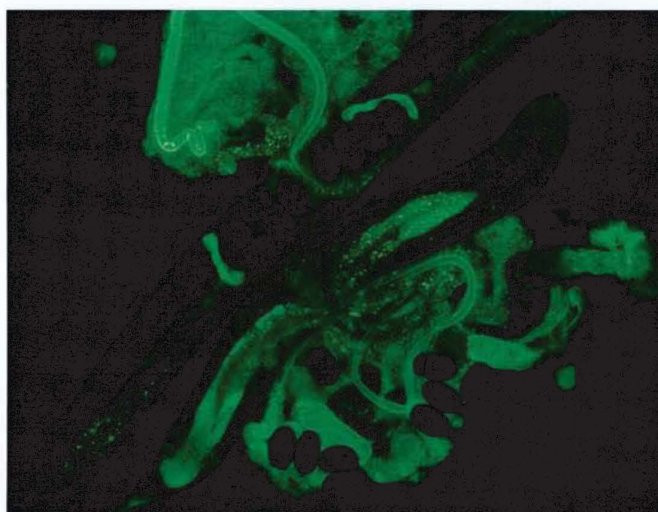
UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Biología Celular y Molecular
Maestría en Biología Molecular

**ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE LAS DOS UDP-GLC:
GLICOPROTEÍNA GLUCOSILTRANSFERASAS
CODIFICADAS EN EL GENOMA DE *C. ELEGANS***



Tesinista: **Olga Marcela Arango Restrepo**

Directora: Dra Olga Alejandra Castro

Lugar de trabajo: Laboratorio de Glicobiología
Fundación Instituto Leloir

Tesina para optar por el título de Magíster en Biología Molecular
Médica de la UBA

80270

Buenos Aires, diciembre 2008

A Christoph, Nicole y Michel

Agradecimientos

Quiero expresar mi agradecimiento a todas las personas que hicieron posible llevar adelante esta tesis y lograr otra meta más en mi vida. La felicidad que hoy siento por la obra terminada resulta indescriptible.

Al Dr. Parodi, quien me permitió realizar la tesis en su laboratorio a pesar de mi inexperiencia y quien con su típico humor supo romper el hielo y hacer que mi paso por el laboratorio fuera una experiencia inolvidable.

A mi Directora de Tesis, Dra. Olga Alejandra Castro por su generosidad al brindarme la oportunidad de recurrir a su capacidad y experiencia científica en un marco de confianza, afecto y amistad, fundamentales para la realización de este trabajo

A los chicos del laboratorio por su presencia incondicional, sus sabios consejos, las sonrisas, las largas charlas, el cariño y por estar siempre dispuestos a darme el empuje para continuar con el desarrollo de este proyecto.

A todas y cada una de las personas del Instituto por haberme acogido con tanto cariño y haberme permitido disfrutar de su compañía. Todos ellos crearon un ambiente agradable para hacer más grato mi paso por este hermoso país.

A mi madre, por su inmenso amor, por estar siempre presente y recorrer miles de kilómetros para venir al rescate sin ninguna duda.

Pero sobretodo quiero agradecer a mi esposo y mis hijos, quienes me han apoyado con su amor incondicional y su infinita paciencia. Espero me disculpen por el tiempo que les he robado. Sin su comprensión, apoyo, ternura y tolerancia no hubiese podido terminar con esta tesis. Son la chispa y el motor de mi vida.

RESUMEN

El plegado de proteínas en una célula viva es un proceso complejo, con alta probabilidad de seguir caminos equivocados. Existen mecanismos destinados a asegurar que las proteínas alcancen una estructura espacial funcional y forman parte del control de calidad de plegamiento de glicoproteínas. Una estrategia es el agregado de la estructura $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ a residuos de asparagina. En el proceso de plegamiento el glicano interacciona con lectinas chaperonas presentes en el retículo endoplasmático (RE), se eliminan las tres glucosas y la proteína plegada sigue su camino hacia el Golgi. La UDP-Glc:glicoproteína glucosiltransferasa (GT) participa en dicho mecanismo ya que se comporta como sensor de la conformación de glicoproteínas y glucosila sólo moléculas que no estén en su conformación nativa, de este modo la interacción de glicoproteínas monoglucosiladas con las chaperonas calnexina y calreticulina presentes en RE facilita el plegamiento ya que previene su agregación y suprime la formación de uniones disulfuro no nativas. Si el plegamiento resulta defectuoso en forma permanente, las glicoproteínas son inicialmente retenidas en el RE y posteriormente transportadas al citosol, donde son degradadas proteolíticamente en los proteosomas.

En humanos, se identificaron dos genes (HUGT1 y HUGT2) cuyas secuencias presentan una alta homología con las secuencias de

los genes que codifican las GT de diferentes organismos. Las proteínas codificadas por HUGT1 y HUGT2 presentan un alto grado de identidad. Sin embargo, solo la proteína codificada por el gen HUGT1 presenta actividad de GT. La proteína codificada por el gen HUGT2 carece de actividad de GT y no se conoce su actividad bioquímica ni tampoco cual es su papel fisiológico. En *C. elegans* se han identificado dos genes (F48E3.3 y F26H9.8) que presentan un alto grado de homología con las GT de diferentes organismos y las proteínas codificadas por ambos genes presentan un alto grado de identidad, en forma análoga a lo que ocurre en humanos.

El objetivo fundamental de esta tesis consistió en estudiar: a) la expresión de las dos UDP-Glc:glicoproteínas glucosiltransferasas codificadas en el genoma de *C. elegans* y b) la participación de ambos genes en el control de calidad de glicoproteínas.

Para ello se utilizó el sistema de de ARN de interferencia para eliminar la expresión de dichas proteínas en el gusano. A partir de ello se realizaron distintas observaciones. Una de ellas fue la sobrevida de los gusanos. Se vio que la falta de expresión de una u otra proteína muestra disminución en la expectativa de vida del gusano y provoca la muerte prematura.

También se cuantificó el número de huevos puestos por gusano por día y se realizaron observaciones de los mismos al microscopio. Se constató la disminución en la puesta de huevos y algunos fenotipos en los grupos de gusanos transformados con los target de los genes

F48E3.3 y F26H9.8. Se hicieron experimentos que miden el envejecimiento ocasionados por la depleción de nuestras proteínas del gusano como a) body bends o movimientos del cuerpo del gusano, donde se notó una disminución en la capacidad motora del nematodo, lo que nos sugiere que la falta de las proteínas para las cuales sus genes han sido silenciados produciría una alteración en el ciclo celular. B) autofluorescencia, del gusano donde se evidenció la acumulación de lipofusina en faringe e intestino principalmente en el grupo de gusanos GT2.

Estos resultados indicarían que ambas proteínas se expresan en *C.elegans* y que juegan un papel relevante durante el desarrollo ya que la depleción de las mismas producen alteraciones morfológicas y funcionales muy importantes, Por otro lado, los resultados obtenidos indicarían que probablemente la proteína codificada por el gen F48E3.3 posea actividad de GT ya que la depleción de la misma induce la expresión de marcadores de estrés de retículo. Los resultados obtenidos en esta tesina fueron parte de la siguiente presentación

Depletion of bother GTs Causes severe defectes in *C.elegans* development

Buzzi, L 1; Arango, O 1; Parodi, A 1; Castro O. 1,2.
1 Fundación Instituto Leloir. Patricias Argentinas 435 Bs As, Argentina. 2 Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular, XVI Congreso de la Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica y Biología Molecular SAIB, Villa Carlos Paz, 8-11 de noviembre 2008

Índice general

1.	INTRODUCCIÓN	10
1.1.	Control de calidad del plegamiento de las glicoproteínas en el Retículo endoplasmático.....	10
1.2.	La UDP-Glc glicoproteína glucosiltransferasa.....	14
1.3.	Respuesta a proteínas mal plegadas (UPR).....	16
1.4.	RNAi y el silenciamiento génico	19
1.5.	Incorporación de RNAi en <i>C. elegans</i>	23
1.6.	<i>Caenorhabditis elegans</i>	24
1.7.	Ciclo de vida del <i>C. elegans</i>	27
2.	OBJETIVO GENERAL Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
2.1.	Objetivo general.....	34
2.2.	Objetivos específicos.....	34
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	35
3.1.	Cepas de <i>C. elegans</i>	35
3.2.	Cepa de bacterias utilizadas.....	36
3.3.	Fragmentos genómicos.....	37
3.4.	Vector de expresión.....	39
3.5.	Medios de cultivo.....	40
3.5.1	LB.....	40
3.5.2	NGM lite	40

3.5.3	NGM enriquecido.....	41
3.5.4	M9.....	41
3.5.5	Medio S.....	42
3.6	Mantenimiento y conservación de bacterias.....	44
3.7	Preparación de bacterias competentes.....	45
3.8	Mantenimiento y conservación del <i>C.elegans</i>	46
3.9	Transferencia de gusanos.....	47
3.10	Decontaminación de <i>C.elegans</i>	48
3.11	Congelado de <i>C. elegans</i>	49
3.12	Descongelado de <i>C.elegans</i>	50
3.13	Montaje de <i>C.elegans</i>	50
3.13.1	Montaje simple.....	50
3.13.2	Montaje con agar.....	51
3.14	Coloraciones.....	52
3.14.1	Dapi.....	53
3.14.2	Faloidina.....	54
3.15	Visualización de <i>C.elegans</i>	56
3.16	Estudio microscópico.....	56
3.16.1	Microscopio esteroscópico.....	56
3.16.2	Microscopio de fluorescencia.....	57
3.16.3	Microscopio biológico.....	57
3.17	Purificación de DNA plasmídico.....	57
3.18	Electroforesis de ácidos nucleicos en gel de azarosa.....	59
3.19	RNAi en <i>C.elegans</i> mediada por inactivación del gen.....	61
3.20	Tecnica de <i>Feeding</i> para RNAi.....	62
3.21	Bioinformática.....	68

4.	RESULTADOS	66
4.1	Caracterización de genes homólogos.....	67
4.2	Supervivencia.....	79
4.3	Body Bends.....	98
4.4	Efecto de la depleción de las proteínas GT1 y GT2.....	118
4.5	Cambios fenotípicos.....	134
4.6	Proteínas involucradas en UPR.....	147
5.	DISCUSIÓN	
6.	CONCLUSIONES	
7.	BIBLIOGRAFÍA	

INTRODUCCIÓN

1.1. Control de calidad del plegamiento de las glicoproteínas en el Retículo endoplasmático.

El plegado de proteínas en una célula viva es un proceso complejo, con alta probabilidad de seguir caminos equivocados y caer en errores imposibles de reparar. Existen mecanismos destinados a asegurar que las proteínas recientemente sintetizadas alcancen una estructura espacial funcional.

Una de las estrategias es el agregado de oligosacáridos de estructura $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ (Fig. 1) a los residuos de Asn en secuencias Asn-X-Ser/Thr de péptidos nacientes a partir del Dol-PP-oligosacárido. La transferencia del oligosacárido desde el Dol-PP-oligosacárido al péptido naciente es catalizada por la oligosacariltransferasa (OST) ubicada en la membrana del RE muy cerca del traslocón a través del cual las proteínas son incorporadas e insertadas en la membrana del mismo (1, 2).

La *N*-glicosilación es un proceso esencial para la viabilidad celular y constituye una de las modificaciones post-traduccionales más frecuentes (3, 4) La adición de oligosacáridos cumple un papel fundamental en la actividad biológica (5, 6) y en las propiedades físico-químicas de las glicoproteínas (7).

La adición de azúcares puede ser beneficiosa durante la

maduración de las glicoproteínas, facilitando el plegamiento de las mismas, al hacer más solubles a los intermediarios de plegamiento y permitiendo la interacción de los polipéptidos con lectinas residentes en el RE, calnexina y/o calreticulina, que tienen la función de chaperonas no convencionales (5, 8). Estas lectinas unen específicamente oligosacáridos monoglucosilados de estructura $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$.

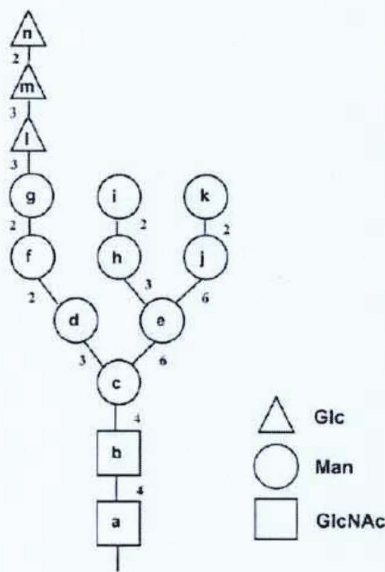


Fig 1 Estructura del oligosacárido transferido a proteínas
El orden de las letras corresponden al orden de agregado de los azúcares durante la síntesis del Dol_PP-oligosacárido.

Estos últimos se pueden formar por deglucosilación parcial del oligosacárido transferido de un derivado de dolicol-P-P a péptidos nacientes. catalizada por dos glucosidasas denominadas I y II (GI y GII) o por reglucosilación de los oligosacáridos libres de glucosa. (Fig 2) Esta reglucosilación es catalizada por la UDP-Glc:glicoproteína glucosiltransferasa (GT) que se comporta como sensor de la

conformación de glicoproteínas ya que solo glucosila moléculas que no estén en su conformación nativa (9, 10).

La interacción de glicoproteínas monoglucosiladas con calnexina/calreticulina facilita el plegamiento ya que previene su agregación y suprime la formación de uniones disulfuro no nativas. Los compuestos reglucosilados por GT son deglucosilados *in vivo* por GII. Si el plegamiento resulta defectuoso en forma permanente, las glicoproteínas son inicialmente retenidas en el RE y posteriormente transportadas al citosol, donde son degradadas proteolíticamente en los proteasomas.

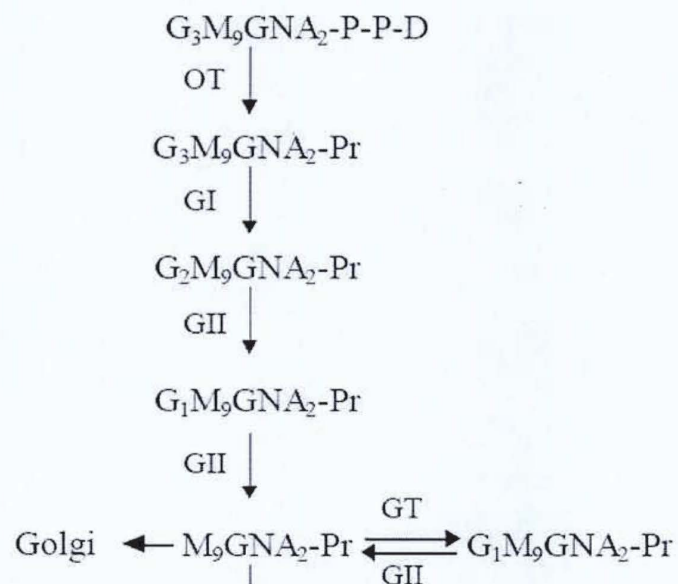


Fig. 2 Procesamiento de los oligosacáridos en el RE. G; M, GNA, D y Pr quieren decir Glc, MAn, GlcNAc, dolicol y proteína respectivamente. OT, GI, GII, y GT indican oligosacariltransferasa, glucosidasa I, glucosidasa II y UDP-Glc: glicoproteína glucosiltransferasa respectivamente.

A pesar que el RE tiene una batería de chaperonas (ejemplo Grp78/Bip) y de proteínas que ayudan al plegamiento además de

CNX/CRT algunas glicoproteínas requieren de la interacción con dichas lectinas para plegarse correctamente. (La Grp78/Bip es una chaperona molecular clásica que reconoce heptapéptidos con aminoácidos hidrofóbicos alifáticos en posiciones alternadas.). Este mecanismo es el denominado control de calidad del plegamiento de glicoproteínas (Fig 3) (11, 12) y opera en todas las células eucariotas estudiadas hasta la fecha con excepción de *S.cerevisiae* (13)

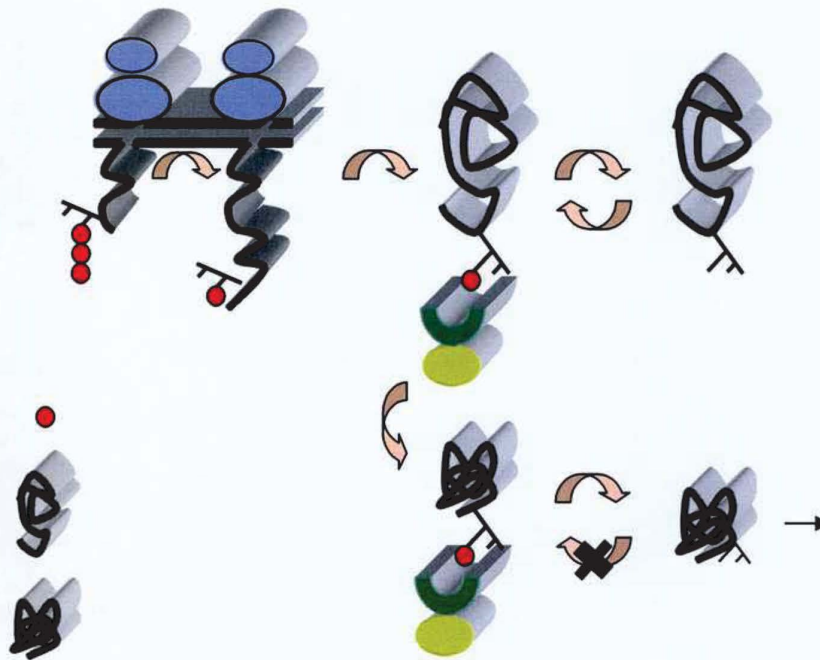


Fig. 3 Modelo propuesto para el control de calidad del plegamiento de glicoproteínas: El oligosacárido de estructura $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ unido a proteína es parcialmente deglucosilado a un derivado monoglucosilado por acción de GI y GII. Esta estructura es reconocida por CNX/CRT. $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ es glucosilado por GT si la deglucosilación completa ocurre antes de la unión a las lectinas. LA glicoproteína es liberada del ancla CNX/CRT por acción de la GII y reglucosilada por la GT solamente si la glicoproteína no está plegada correctamente. Al adoptar su estructura nativa, la glicoproteína es liberada de CNX/CRT y no es reglucosilada por la GT: ERp57 es una enzima de la familia de las PDI que está asociada a CNX/CRT y que promueve la formación de los puentes disulfuros correctos en glicoproteínas monoglucosiladas

Existen numerosas enfermedades asociadas a problemas en el plegamiento de las glicoproteínas (*folding diseases* o *conformational diseases*). Este conjunto de enfermedades se pueden dividir en dos grandes grupos: El primer grupo se caracteriza por la acumulación de proteínas mal plegadas y posterior degradación de éstas en el proteasoma, como ejemplo de este tipo de enfermedades podemos mencionar a la fibrosis quística y a ciertos tipos de enfisema. El segundo grupo, en cambio, está compuesto por enfermedades caracterizadas por la acumulación de proteínas mal plegadas que forman placas insolubles en diversos órganos, en este grupo podemos mencionar a la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson y la diabetes tipo II (42, 43).

1.2. La UDP-Glc glicoproteína glucosiltransferasa

La GT es una enzima soluble de RE que agrega un residuo de Glc a la manosa (g) de los oligosacáridos unidos a proteína (Fig 1) utilizando UDPGlc como dador. Las GTs de diferentes organismos son proteínas de aproximadamente 1500 aminoácidos y requieren concentraciones milimolares de Ca^{+2} para su actividad (14, 15).

La principal característica de esta enzima es que no presenta actividad sobre las proteínas en su conformación nativa (13, 16) y esta característica se basa en el reconocimiento de dos componentes estructurales que no se encuentran expuestos en las proteínas

nativas: el primero es la GlcNAc más interna que se encuentra oculta en la conformación nativa de la proteína y el segundo es una región de aminoácidos hidrofóbicos que se encuentran expuestos en intermediarios de plegamiento con estructura de glóbulo fundido (17, 18, 19).

La GT esta compuesta por dos dominios, el N-terminal, que no presenta homología con otras proteínas conocidas y estaría involucrado en el reconocimiento de los confórmers que aún no han alcanzado su estructura nativa y un dominio C-terminal con actividad catalítica que contiene el sitio de unión a UDP-Glc. Los dominios C-terminal de las GT de diferentes organismos presentan un alto grado de similitud, sin embargo, no ocurre lo mismo con los dominios N-terminal. (20).

En humanos, se identificaron dos genes (HUGT1 y HUGT2) que codifican proteínas con un alto grado de identidad, HUGT1 presenta un 83% de homología y un 55 % de identidad con el gen HUGT 2 y un 31-45 % de identidad con las GT de *Drosophila*, *C.elegans* y *S.pombe*. Se analizó la expresión de los genes HUGT1 y HUGT2 en diversos tejidos y se observó un patrón de expresión de mRNA específicos similar para ambos genes (22). Por otra parte, se midió actividad de GT en células transfectadas con vectores de expresión conteniendo el gen HUGT1 en un caso y el HUGT2 en otro observándose que la proteína HUGT2 no presentaba actividad de GT (14). Se construyeron diferentes quimeras, una de ellas formada por

el dominio C-terminal de la proteína codificada por HUGT2 y el dominio N-terminal de la proteína codificada por HUGT1, que resultó activa y otra formada por el dominio C-terminal de la proteína codificada por HUGT1 y el dominio N-terminal de la proteína codificada por HUGT2, que resultó inactiva. Estos resultados demuestran que el dominio con actividad de GT era activo en la HUGT2 y el dominio N-terminal involucrado en reconocimiento de las proteínas mal plegadas era inactivo.

1.3. Respuesta a proteínas mal plegadas (UPR)

La UPR es un complejo sistema de señales intracelulares transcripcionales y traduccionales activadas en respuesta a la acumulación de proteínas mal plegadas en el lumen del RE para prevenir dicha acumulación. La UPR es crítica para el mantenimiento celular ante estrés de RE ya que en estas condiciones las proteínas fallan en adquirir su conformación nativa y se pueden formar agregados insolubles. La acumulación de estas proteínas en el lumen inicia un sistema de señales que son transmitidas tanto al núcleo como al citoplasma que tienen tres funciones: 1) Activar transcripcionalmente genes que codifican para proteínas chaperonas residentes en el RE para aumentar la capacidad de plegamiento, 2) Degradar a través de complejos de degradación de proteínas aquellas proteínas mal plegadas, 3) Atenuar la traducción para limitar el

número de proteínas mal plegadas en el RE (24, 25). Si fallan estas respuestas entonces se inicia una respuesta apoptótica y se activa la protein-kinasa JNK y las caspasas 7, 12 y 3 (26, 27, 28).

La UPR fue caracterizada en levaduras y luego se probó su existencia en otros organismos eucariotas superiores (29). Actualmente se sabe que la UPR es operativa en tanto en mamíferos como en *C. elegans* también. En mamíferos la UPR está mediada por tres tipos de proteínas de membrana de RE: IRE-1 (protein-kinasa y endoribonucleasa sitio específica), ATF-6 (activador transcripcional) (30) y PERK/PEK (factor kinasa 2 eucariótico de iniciación de la traducción) (31, 32). La BiP (homóloga a la hsp4 de *C. elegans*) se encuentra unida al dominio luminal de éstas en condiciones normales. Si aumenta el número de proteínas mal plegadas, la BiP se une preferentemente a estas y libera el dominio luminal de IRE-1, PERK y ATF-6. IRE-1 se dimeriza y se activa su dominio RNasa citosólico que corta 26 nucleótidos de una secuencia intrónica del mRNA de la proteína de unión a DNA X-box (XBP1) (33). XBP1 migra al núcleo y se une al elemento UPR en el DNA (UPRE) para activar los genes de la UPR esenciales para el plegamiento y degradación de proteínas en el RE (34). ATF-6 al liberarse la BiP, migra al Golgi y un dominio citosólico de 50KDa es cortado por la proteasa site-1 (S1P) y site-2 (S2P) (35). Este fragmento citosólico entonces se dirige al núcleo donde se une el elemento de respuesta a estrés de RE (ERSE) con el factor de unión CCAAT (CBF) para promover la transcripción de

chaperonas y otras enzimas de plegamiento (36). PERK se homodimeriza y atenúa temporalmente la síntesis de proteínas con la fosforilación de la subunidad α del factor de iniciación 2 (eIF2 α) que al fosforilarse ya no puede atraer al tRNA de metionina a la subunidad ribosomal 40s. De todas formas, se pueden traducir preferentemente algunos mRNAs con eIF2 α fosforilado ya que hay ORFs en la región 5' sin traducir del mRNA (37). El factor de transcripción 4 (ATF4) aumenta su traducción a partir de la fosforilación de eIF2 α y activa genes involucrados con el metabolismo y transporte de aminoácidos, reacciones de óxido-reducción y apoptosis inducida por estrés de RE. Alternativamente ante UPR prolongado se pierde la homeostasis del calcio del RE llevando a la activación de caspasas 12 que activa a caspasas 9 y 3 llevando a apoptosis (33).

Estímulos fisiológicos y bioquímicos pueden alterar la capacidad del ER para plegar correctamente las proteínas y se activan caminos de señalización específicos destinados a eliminar el exceso de proteínas mal plegadas (23). Se observó un incremento en la expresión de los mRNA correspondientes al gen HUGT1 pero no se observó variación en los niveles de expresión del mRNA correspondiente al gen HUGT2 cuando células humanas en cultivo fueron sometidas a condiciones que provocan la acumulación de proteínas mal plegadas. Aún no se ha dilucidado el papel que juega la proteína codificada por el HUGT2 en humanos en el control de calidad de glicoproteínas (21, 22).

En *C. elegans* se han identificado dos genes que codifican proteínas con un alto grado de homología con la GT de levadura y las GTs de diversos organismos, pero se desconoce si ambas codifican proteínas poseen actividad de GT, si ambas participan en el mecanismo de control de calidad o si alguna de las dos proteínas codificadas por estos genes participa de algún otro proceso en la célula no relacionado con el control de calidad del plegamiento de glicoproteínas.

SeqA	Nombre	Long (aa)	SeqB	Nombre	Long (aa)	% de identidad
1	HUGT1	1531	2	HUGT2	1516	54
1	HUGT1	1531	3	F48E3.3	1493	41
2	HUGT2	1516	3	F48E3.3	1493	40
3	F48E3.3	1493	4	F26H9.8	1377	40
1	HUGT1	1531	4	F26H9.8	1377	35
2	HUGT2	1516	4	F26H9.8	1377	34
3	F48E3.3	1493	5	S. pombe	1447	29
1	HUGT1	1531	5	S. pombe	1447	28
2	HUGT2	1516	5	S. pombe	1447	27
4	F26H9.8	1377	5	S. pombe	1447	26

=====

C. elegansGT1= F26H9.8
C. elegansGT2= F48E3.3

Tabla 1 Se muestran los porcentajes de identidad entre las diferentes proteínas mencionadas en este preyecto. Los porcentajes fueron calculados utilizando el programa de comparación de secuencias CLUSTALW.

1.4. RNAi y el silenciamiento génico

La interferencia de RNA es un método eficiente para inhibir la expresión de genes y es utilizada como estrategia en la investigación científica. Esta estrategia de estudio por pérdida de función por

depleción de una proteína permite evaluar los cambios que ocurren en los organismos y así definir el papel que juega dicha proteína.

Inicialmente, los científicos utilizaron la interferencia por el RNA exógeno (exo-RNAi) como un elemento eficaz en la inhibición de la expresión génica del *C. elegans* (38). El llamado silenciamiento génico, el cual es mediado por RNA (RNA *silencing*), es un mecanismo que ocurre a nivel de la regulación de la expresión génica, impidiendo la expresión de un gen, que debería estar encendido en condiciones normales, mediante la degradación específica de secuencia del mRNA. Este mecanismo se induce por la producción deliberada de moléculas de RNA doble cadena. La destrucción de este mRNA impide su normal traducción y por lo tanto no se sintetiza la proteína correspondiente. Diferentes estudios realizados permitieron precisar que el mecanismo de esta inhibición mostraba que la molécula de RNA doble cadena iniciaba la represión de un gen específico en el *C. elegans* de manera mucho más significativa que un RNA simple cadena (39).

La anulación de función se puede realizar de maneras diferentes con estrategias que requieren modificar la información a nivel del DNA, para las cuales se requiere un entrenamiento especial y herramientas genética adecuadas. La estrategia más antigua consiste en inducir una mutación en el gen que codifica la proteína de interés, esta puede ser una delección parcial o total inhibiendo la expresión de todo el mensaje o generando una proteína truncada

carente de actividad o una mutación puntual que ocasione la pérdida de función de la proteína.

La interferencia de RNA es un mecanismo altamente conservado en la naturaleza a través del cual las moléculas de RNA doble cadena (ds RNA) regulan la expresión de genes y es una herramienta eficiente y fácil de utilizar en los laboratorios para controlar la expresión génica.

Se han descrito varias clases de moléculas pequeñas de RNA que desencadenan el proceso de silenciamiento por interferencia. Las más ampliamente conocidas son los RNA interferentes pequeños (siRNA) y los microRNA (miRNA).

Los siRNA son moléculas pequeñas de 21 a 25 nucleótidos y son producidos a partir de precursores de RNA de doble cadena que pueden variar de origen y tamaño, los cuales son procesados por miembros de la familia de enzimas que degradan RNA (RNAsa tipo III). A las enzimas que degradan los precursores de dsRNA hasta siRNA se las conoce como *dicer*. Los siRNA resultantes son incorporados al complejo siRISC (*RNA-induced silencing complex*), el cual está compuesto por proteínas celulares. La incorporación del siRNA al siRISC está acoplada a la separación de dos cadenas a cadenas sencillas. Sólo la cadena guía se mantiene asociada al complejo y sirve para identificar el mRNA con la secuencia complementaria. Cuando ambas moléculas complementarias se

encuentran son encontradas, la interacción entre siRNA y mRNA genera en el corte del RNA mensajero y su posterior degradación.

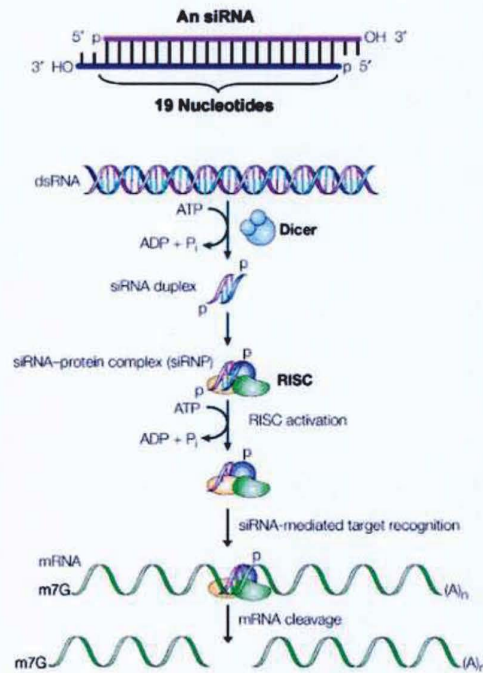


Fig. 4 Esquema de la producción de RNAi. Una vez que el mRNA es clivado mediante el mecanismo del RNAi, este es degradado rápidamente por las RNAsas celulares ya que sus extremos no se encuentran protegidos

En algunos organismos, como *C. elegans*, el silenciamiento es heredable, ya que los mediadores de interferencia pueden viajar desde las células en que se producen hasta otras células del organismo, logrando así el silenciamiento génico en el organismo completo y en su descendencia. Actualmente existen compañías que disponen de bibliotecas de siRNA que contienen el genoma de algunos organismos, lo cual permite realizar el silenciamiento génico fácilmente y con mayor frecuencia en laboratorios pequeños.

1.5. Incorporación de RNAi en *C. elegans*.

Existen tres métodos para incorporación del RNAi en *C. elegans*.

- Soaking* (remojo): los gusanos son empapados en una alta concentración de RNA durante varias horas para que ellos o sus progenies inicien una respuesta al RNAi.
- Inyección: el RNAi producido *in vitro* es introducido en el *C. elegans* hermafrodita adulto y sus progenies marcadas están catalogadas por fenotipos mutantes.
- Feeding*: los gusanos son alimentados con bacterias transformadas que producen RNAi doble cadena.

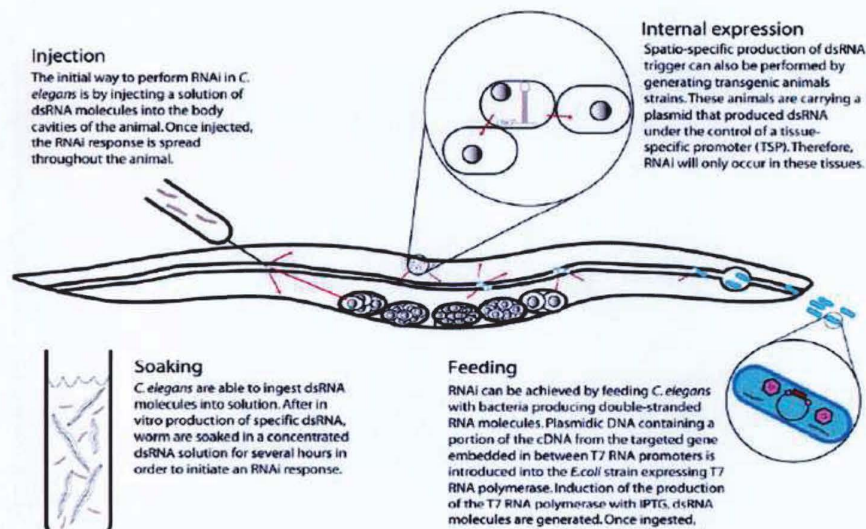


Fig. 5. Diferentes medios de incorporación del RNA doble cadena por los *C. elegans*

1.6. *Caenorhabditis elegans*

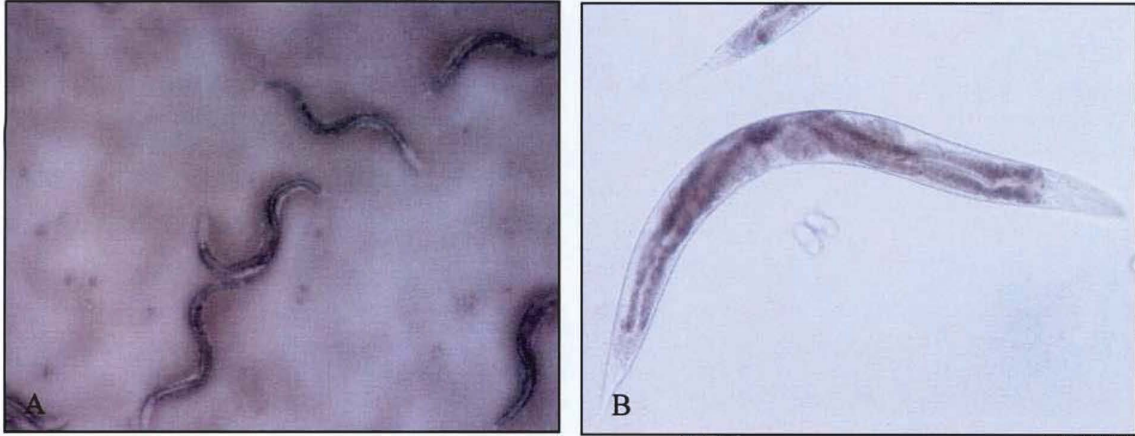


Fig. 6. *C.elegans* en diferentes estadios Panel A Larva 4, Panel B Hembra hermafrodita

Es un organismo eucariota microscópico, multicelular, metazoario; hace parte de una de las 10.000 especies de nemátodos. Catalogado como pseudocoelomata, chromadorea (por su cutícula) rabditida, pelloderinae (40).

C. elegans es un gusano pequeño con estructura bilateral simétrica, vermiforme con un cuerpo cilíndrico tubular típico de cualquier nemátodo. Comparte estructuras celulares y moleculares con organismos superiores. Posee 4 cordones epidérmicos y una cavidad que contiene una serie de fluidos que le dan aspecto transparente. De alrededor un milímetro de largo en estado adulto, está constituido por un número de células fijas. Realiza un movimiento sinusoidal gracias a sus músculos longitudinales. El macho XO adulto está compuesto de 1031 células, mientras que el hermafrodita XX está

constituido de 959 células; en cada una de ellas hay 100 millones de bases. El hermafrodita es capaz de autofecundarse y de engendrar únicamente hermafroditas. El 50% de los genes de este gusano están también en las células humanas y codifican para proteínas que tienen funciones muy semejantes. Posee una cabeza con un orificio bucal que le permite ingerir las bacterias con las que se alimenta. Su único requerimiento de crecimiento y reproducción es un medio húmedo y ambiente templado con oxígeno en la atmósfera.

C. elegans se ha convertido en un importante modelo de estudio para la biología, especialmente para la genética de desarrollo, y fue introducido en laboratorios de genética y bioquímica en los años 70 por Sydney Brenner.

Este organismo modelo en biología molecular, se ha adaptado para estudios genéticos con el fin de estudiar entre otros mecanismos:

- la regulación de proteínas para describir el apagado de un gen determinado, el llamado silenciamiento génico;
- la apoptosis o muerte celular programada y su relación con el proceso de desarrollo animal;
- el envejecimiento celular;
- el desarrollo embrionario;
- la fisiología sensorial.

C. elegans presenta varias condiciones morfológicas y funcionales favorables para la investigación, entre ellas:

- ciclo de vida corto y genoma compacto;
- transparencia a lo largo de toda su vida, lo que facilita la observación de su desarrollo temprano bajo el microscopio;
- el hecho de ser hermafrodita favorece la obtención y mantenimiento de individuos con mutaciones recesivas;
- por ser un organismo simple en cuanto a su número de células (959), resulta relativamente fácil interrumpir genes específicos con interferencia de RNAi;
- dado que es uno de los organismos más simples con un sistema nervioso (302 células nerviosas frente a 100.000 millones en el cerebro humano), se lo usa ampliamente para investigar los mecanismos neurales;
- es un organismo diploide de fácil mantención en el laboratorio en cajas de Petri a una temperatura constante de 20°C;
- tiene un gran número de descendencia;
- el fenotipo que se da en el nemátodo es sencillo de observar o medir.

La persona que apreció por primera vez el potencial de *C. elegans* como modelo de investigación fue Sydney Brenner, que recibió, junto con John Sulston y Bob Horvitz, el Premio Nóbel en 2002 por sus

descubrimientos en este gusano. En 2006, esta distinción fue otorgada a Fire y Mello por su trabajo con *C. elegans*. Por otra parte, el laboratorio de Martin Chalfie, uno de los tres ganadores del Premio Nóbel de Química 2008, utiliza *C. elegans* para investigar el desarrollo y funcionamiento de las neuronas. *C. elegans* fue el primer organismo multicelular cuyo genoma pudo secuenciarse completo. Es relativamente pequeño (9.7×10^7 pares de bases o 97 megabases); se estima que tiene 13.500 genes repartidos en seis cromosomas. El primer esbozo avanzado de su secuencia, publicado en 1998, fue corregido en 2002. Fue el primer animal en ser estudiado con una proteína reportera, la GFP (*green fluorescent protein*) que proviene de *jellyfish aequorea victoria*. Su apoptosis fue descubierta por Bob Horvitz.

1.7. Ciclo de vida del *C. elegans*

La embriogénesis del *C. elegans* ocurre en aproximadamente 12 horas durante las cuales el embrión se continúa dividiendo, utilizando las reservas energéticas almacenadas en los gránulos. Al finalizar el desarrollo embrionario, nace una larva L1 con 558 células (hermafrodita) o 560 células (macho), donde la organogénesis está casi terminada. Las divisiones celulares suplementarias (959 células) se producirán hasta el desarrollo del estado adulto (2.5 días). Cuatro estadios larvarios se suceden entre la eclosión y el adulto y van de L1

a L4. Se reproduce cada 2 ó 3 días, coloca entre 200 y 300 huevos y tiene una esperanza de vida de 2 a 3 semanas.

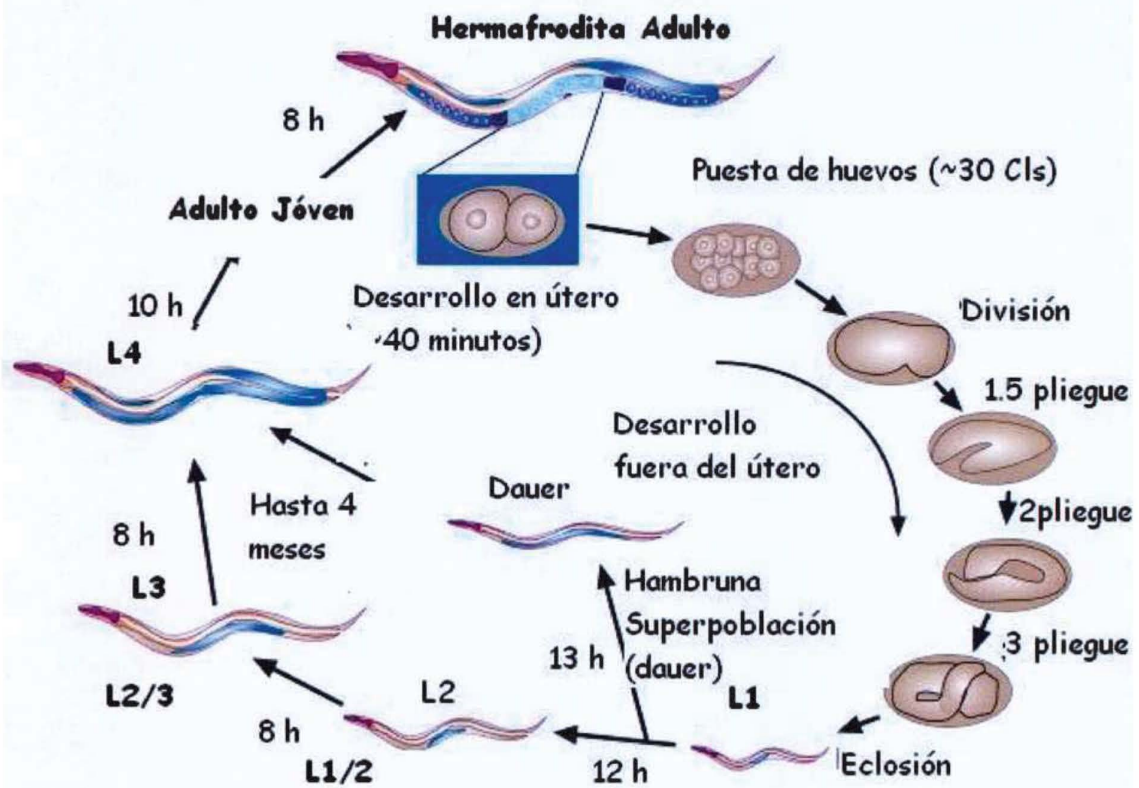


Fig. 7 Ciclo de vida de *C.elegans* indicando los distintos estadios de desarrollo y la duración aproximada de los mismos.

En caso de sobrepoblación, ausencia de alimento o cambios de temperatura, la larva en estado L1 puede entrar en un estadio larvario alternativo o de hibernación, generando la formación de individuos *dauer* (*dauer state*) que no se alimentan más, poseen un metabolismo particularmente lento y pueden sobrevivir así más de cuatro meses, siendo resistente al estrés y al envejecimiento. Cuando el gusano está en *dauer*, su cutícula es más densa y cierra todos los orificios para evitar la pérdida de agua (41).

C.elegans como dijimos antes, tienen un número (959) de núcleos somáticos del adulto invariable y las posiciones relativas de las células durante el desarrollo también es invariable de individuo a individuo, de modo que todo el proceso de desarrollo, desde el cigoto al adulto, puede esquematizarse como un árbol genealógico celular. El árbol genealógico de las células de *C. elegans* se conoce en forma completa, ya que el estudio de su desarrollo, permitió seguir el camino de sus células a través de las divisiones celulares.

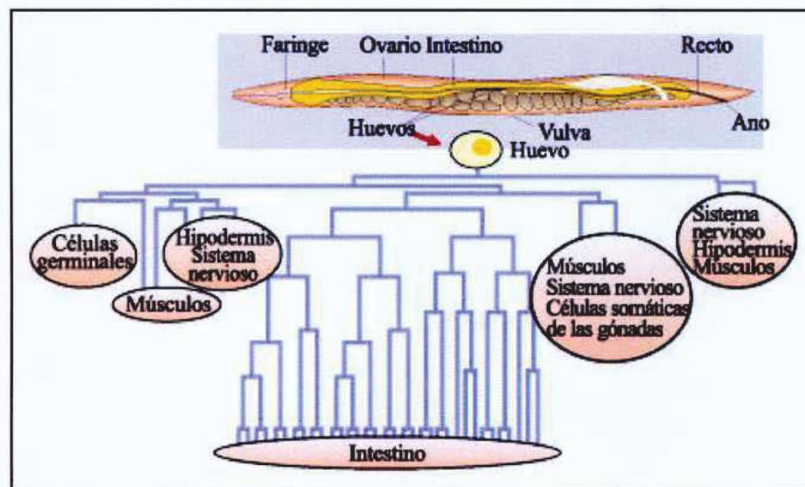


Fig. 8 Muestra el destino final de cada una de las células presentes en el embrión. Cada bifurcación representa una división celular. (No todas las divisiones se muestran). Los globos de color rosa denotan conjuntos celulares.

En *C. elegans*, esta cadena de divisiones mitóticas se inicia con el huevo fecundado, que se encuentra dentro de una dura cáscara externa. Las tres primeras divisiones producen un embrión de cuatro células, cada una con un destino embriológico determinado. En la primera división se produce la segregación de factores citoplasmáticos, se obtiene, por lo tanto, dos células con contenidos

distintos. Una de ellas, la célula P, dará lugar al polo posterior del embrión, mientras que la otra, la célula AB, dará lugar al polo anterior.

En el desarrollo temprano de *C. elegans*, la complejidad celular aumenta a través de varios mecanismos. El gameto femenino de *C. elegans* contiene una cubierta muy dura que limitará los movimientos de las células que se formarán en su interior luego de la fecundación.

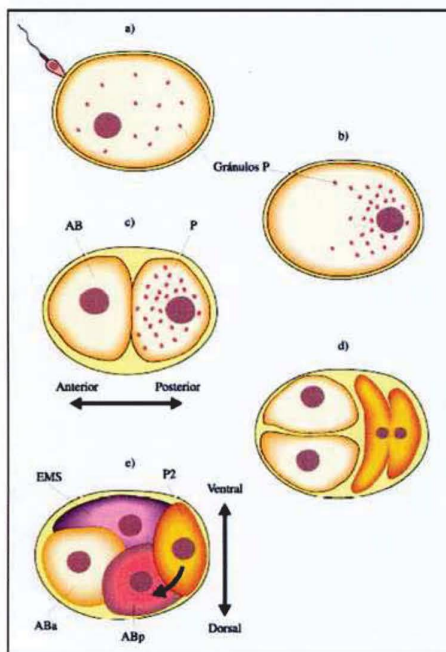


Fig. 9 Desarrollo temprano del *C.elegans*

a) El espermatozoide penetra por un agujero a través de la cáscara y se produce la fecundación .

b) En el punto de entrada del espermatozoide, se organiza un eje de división celular y se concentran unos gránulos oscuros llamados "gránulos P". Los gránulos P promueven el desarrollo de estructuras posteriores.

c) La primera división celular conlleva la segregación de factores citoplasmáticos y produce dos células distintas: la célula P (que contiene gránulos P) y que genera las estructuras posteriores, y la célula AB, que produce las estructuras anteriores.

Esta primera división, por lo tanto, define el eje antero-posterior del animal.

d) La célula P se divide en dos células distintas llamadas EMS y P2. La célula AB se divide en dos células equivalentes pero, debido al espacio limitado dentro de la cáscara del huevo, sólo una de ellas estará físicamente en contacto con la célula P2. Esta última produce una señal (representada por una flecha) que permanece adherida a su membrana citoplasmática y promueve cambios en su célula vecina. Así, una célula descendiente de AB queda en contacto con la célula P2 y pasa a convertirse en la célula ABp. La otra célula que deriva de AB es la célula ABa que no tiene contacto con P2. ABa y ABp dan lugar a estructuras diferentes; sus destinos dependen de la señal producida por P2. ABp define la región dorsal del embrión, por lo que este proceso de comunicación celular también define, en parte, el eje dorso-ventral del animal. La célula P también se divide asimétricamente por segregación de factores citoplasmáticos. La célula AB, sin embargo, da lugar a células con potencialidades idénticas pero que pronto adquieren identidades distintas al recibir señales de su entorno. Las limitaciones de espacio dentro de la dura

cáscara del huevo obligan a estas células a ocupar determinadas posiciones con respecto a las demás. Las células se encuentran, por lo tanto, expuestas a diferentes señales químicas y, en consecuencia, asumen identidades y destinos embriológicos diferentes. Este es un claro ejemplo de división asimétrica por comunicación celular. Es notable que, las diferentes células del embrión de *C. elegans* tienen destinos embriológicos específicos desde temprano. Si cualquiera de estas células es destruida, ninguna de las otras podrá generar las estructuras que éstas hubieran generado.

El desarrollo temprano del gusano *C. elegans* está dado, entonces, por dos factores. Por un lado, las limitaciones de espacio impuestas por la cáscara del huevo obligan a las células a ocupar posiciones determinadas unas con respecto a otras por lo que cada una recibe distintas señales químicas. Por otro lado, las divisiones celulares asimétricas asignan un destino determinado a cada célula en cada posición. El desarrollo de la vulva del gusano *C. elegans* comienza cuando el embrión ya está compuesto por numerosas células e ilustra otro mecanismo por el cual se genera una coherencia espacial en la disposición de las células. La vulva de *C. elegans* es un órgano sencillo: un pequeño orificio por donde entra el esperma y salen los huevos. Está compuesta por dos tipos celulares específicos: el tipo 1 que conecta la gónada con el exterior, y el tipo 2, que brinda protección al primer tipo. En total son 22 células, derivadas en

principio de un conjunto de tres células ubicadas en el lado ventral del gusano. Para que el órgano se desarrolle con su estructura correcta, las células precursoras deben tener una disposición que denominaremos 2-1-2 (una célula precursora del tipo 1 rodeada, a cada lado, por una célula precursora del tipo 2). Esta sencilla disposición se establece por un sistema de comunicación de señales entre células. Los dos tipos celulares mencionados derivan de un conjunto de células epidérmicas equivalentes, todas con el potencial de diferenciarse en tipos 1 ó 2. El desarrollo de la vulva es gatillado por una célula que no formará parte de ese órgano conocida como célula ancla. Si la célula ancla es destruida, por ejemplo, por ablación con láser, la vulva no se forma en absoluto. La célula ancla produce una proteína señal que es liberada al medio extracelular por exocitosis. La célula epidérmica más cercana a la célula ancla adquirirá, por acción de la proteína señal, la identidad de tipo 1. Esta célula, a su vez, producirá una segunda señal, que difundirá desde la célula tipo 1, induciendo a sus dos vecinas a convertirse en células del tipo 2. El resultado de esta concatenación en el tiempo de señales de acción a corta distancia es el patrón 2-1-2 de la vulva.

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

Esta tesina es parte de un proyecto general cuyo objetivo consiste en esclarecer el papel que desempeñan cada una de las dos proteínas codificadas en el genoma de *C.elegans* con putativa actividad de GT en el control de calidad del plegamiento de glicoproteínas y utilizar los resultados obtenidos para analizar posteriormente el papel que desempeña la proteína codificada por el gen HUGT2 en humanos.

2.2. Objetivos específicos:

- Realizar un análisis funcional de ambas proteínas, utilizando la técnica de silenciamiento génico (RNAi) para ambos genes (F48E3.3 y F26H9.8) y se analizarán los fenotipos encontrados
- Analizar la participación de ambas proteínas en la respuesta a proteínas mal plegadas. Para ellos se utilizará una cepa de gusanos transgénica que expresa marcadores de *stress* de RE

3. Materiales y métodos

3.1. Cepas de *C.elegans*

Las cepas de gusanos utilizadas en este experimento fueron de fenotipo sensible para RNAi proporcionadas por el Caenorhabditis Genetics Center (CGC) de la Universidad de Minnesota, EE.UU., y construidas por el grupo Julie Ahringer's del CRC Institute de la Universidad de Cambridge, Gran Bretaña.

Cepa: KP3948

Especie: *Caenorhabditis elegans*

Genotipo: *eri-1(mg366) IV; lin-15B(n744) X*.

Descripción: Sensible para RNAi. Crecimiento de 15 a 20°C.

Temperatura sensible: 25°C.

Mutágeno: EMS

Cepa: SJ4005

Especie: *Caenorhabditis elegans*

Genotipo: *zcIs4[hsp-4::GFP] V*.

Descripción: El hsp-4::GFP reportero integrado en el *cluster* LG V. Los animales expresan niveles de GFP según las condiciones basales. Sin embargo, la expresión de GFP en el intestino y en la hipodermis pueden incrementarse en respuesta a un tratamiento con tunicamicina o un *shock* térmico.

Mutágeno: Psoralin/UV

3.2. Cepas de bacterias utilizadas

La bacteria *E. coli* cepa OP 50 auxótrofa para uracilo como fuente de alimento para mantenimiento del *C. elegans* fue crecida en medio LB líquido *overnight* a 37°C con agitación a 200 rpm/min. Aplicando la técnica de esterilidad, fueron agregados 300 µl del cultivo líquido de OP 50, en el centro de las placas limpias de medio NGM con una pipeta estéril, dejándolas en incubación nuevamente a 37°C. Una vez supervisadas las placas durante 24 horas y libres de contaminación, fueron puestas en uso. Las placas de OP 50 se guardaron a 4°C y fueron utilizadas durante 2 ó 3 semanas.

Las cepas de bacteria HT1115 transformadas con los *target* de los genes F48E3.3 y F26H9.8, con el vector vacío y con el plásmido PBT5 (L4440 conteniendo un fragmento *target* de un gen, la

depleción de la proteína codificada por este gen causa letalidad embrionaria) fueron crecidas en medio LB *overnight* a 37°C. y puestas sobre placas limpias de NGM enriquecido con IPTG 1mM y carbenicilina 100 µg/µl Las placas fueron incubadas nuevamente a 37°C y utilizadas 24 horas después si no presentaban contaminación. Las placas fueron preparadas 24 horas antes de cada experimento, guardadas a 4°C y conservadas para su uso hasta durante 20 días.

3.3. Fragmentos genómicos

Los fragmentos genómicos de los *target* de los genes F48E3.3 y F26H9.8 de *C. elegans* que se usaron fueron obtenidas del GCG. Los fragmentos genómicos conteniendo regiones codificantes y regiones correspondientes a intrones, fueron amplificados por PCR, clonados dentro del sitio EcoRV, en el vector L4440, proveniente de Timmons and Fire (44) y transformados dentro de una bacteria HT115(DE3) (45).

- F48E3.3 (proteína WP: CEO2751)

Este gen tiene un dominio de UDP-glucosa:glicoproteína glucosiltransferasa y posee 1493 aminoácidos. Según un análisis preliminar este gen se expresaría en faringe, células

glandulares de la faringe, células excretoras, sistema nervioso, neuronas alrededor del cuerpo, tallo neuronal.

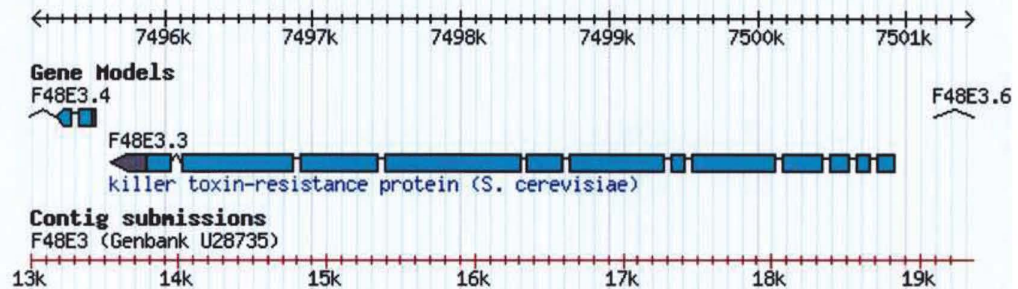


Fig. 10 Estructura del gen se muestra en color los segmentos codificantes (exones) y con líneas negras las regiones no codificantes (intrones)

- F26H9.8 (proteína WP:CE42103)

Este gen tiene un dominio de UDP-glucosa:glucoproteína glucosiltransferasa y posee 1381 aminoácidos.

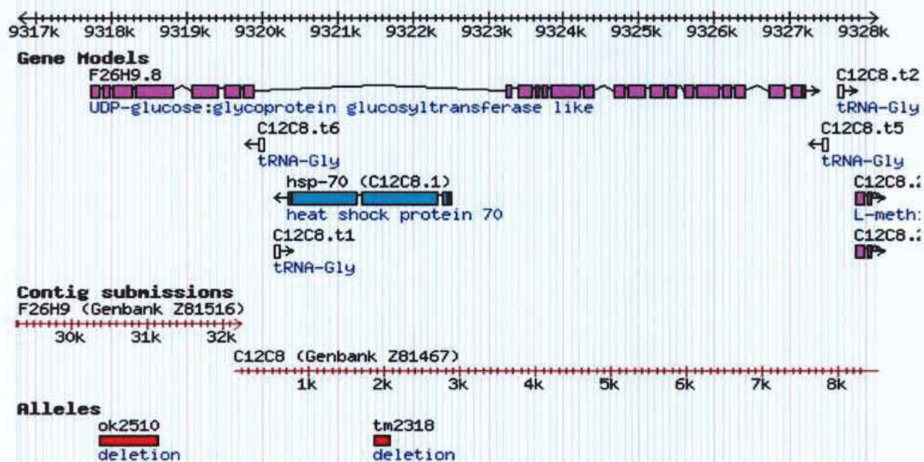


Fig. 11 Estructura del gen, segmentos codificantes y alelos descriptos.

3.4 Vector de expresión

El vector de expresión para RNAi L4440 tiene 2790 pb, porta dos promotores de T7 RNA polimerasa con orientación invertida, un sitio de replicación Ori, LacZ y un gen que codifica resistencia a la ampicilina. Este vector permite la inserción de la región que se desea utilizar para interferir los genes target (blanco de la interferencia). entre dos promotores regulados por la expresión de la polimerasa de T7 que generan los RNA complementarios. Para producir los clones relevantes, el plásmido es transferido a una cepa de *E. coli*. que expresa el gen de la T7-RNA polimerasa bajo el control de un promotor inducible por IPTG..

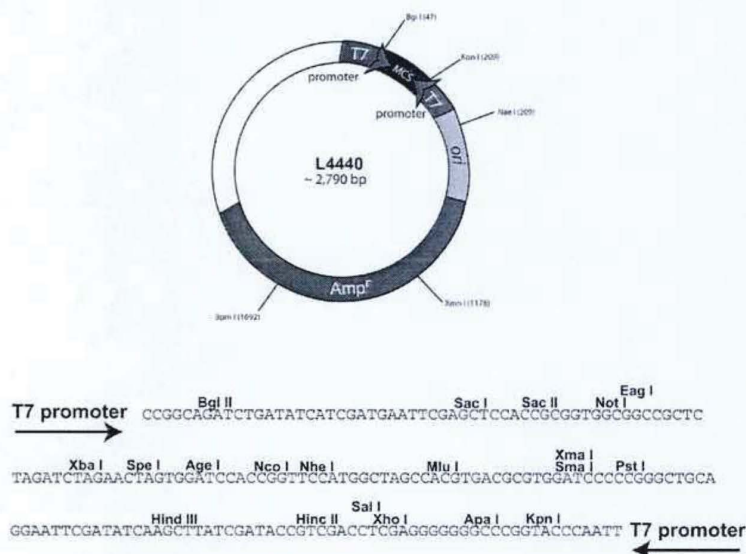


Fig. 12 Mapa del L4440 y estructura del sitio de clonado múltiple.

3.5. Medios de cultivo

3.5.1. LB

Utilizado como medio, para mantenimiento y propagación de *E. coli*.

Triptona o peptona de caseína	10 g.
Extracto de levadura	5 g.
Cloruro de sodio	5 g.
Agar (sólo para LB sólido)	8.5 g.
Agua	1.000 ml.

3.5.2. NGM lite (Nematode Growth Medium)

Para mantenimiento de *C. elegans*

NaCl	1.5 g
Bactopeptona	1.25 g
Agar	8.5 g
Agua	500 ml

Esterilizar en autoclave. Calentar a 55°C y añadir antes de usar.

Buffer 1M KPO ₄	12.5 ml
CaCL ₂	0.5 ml
MgSO ₄	0.5 ml
Colesterol	0.5 ml

3.5.3. NGM enriquecido

Para experimentos de RNAi.

NaCl	1.5 g
Bactopeptona	1.25 g
Agar	8.5 g
Agua	500 ml

Esterilizar en autoclave. Calentar a 55°C y añadir antes de usar.

Buffer 1M KPO ₄	12.5 ml	
CaCl ₂	0.5 ml	
MgSO ₄	0.5 ml	
Colesterol	0.5 ml	
IPTG	625 µl	0-8 M
Carbenicilina	125 µl	100 mg/ml

3.5.4. M9 Minimal Medium:

Para levantar y lavar los gusanos.

Na ₂ HPO ₄	5.8 g
K ₂ HPO ₄	3 g
NaCl	0.5 g

NH ₄ CL	1 g
Agua	1.000 ml

3.5.5. Medio S

Para cultivo líquido de *C. elegans*.

a. Basal

NaCl	5.85 g
K ₂ HPO ₄	1 g
Colesterol (5 mg/ml de etanol)	1 ml
Agua	1.000 ml

b. Citrato de potasio 1M

Acido Cítrico	20 g
Citrato de Potasio	293.5 g
Agua	1.000 ml

c. Solución trace metal

EDTA disódico	1.86 g
FeSO ₄ 7H ₂ O	0.69 g
MnCl ₂ 4H ₂ O	0.2 g
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0.29 g

CuSO ₄ 5H ₂ O	0.025 g
Agua	1.000 ml.

d. CaCl₂

Ca	55.5 g
Agua	1.000 ml

e. MgSO₄

MgSO ₄	120.4 g
Agua	1.000 ml

Todos las soluciones anteriores se deben autoclavar.

Mezcla del medio S

S. Basal	1000 ml
Citrato de potasio	10 ml
Solución trace metal	10 ml
Cloruro Calcio 1M	3 ml
M MgSO ₄ 1M	3ml

Adicionar todos los componentes en esterilidad, pero no volver a autoclavar.

Procedimiento

- En un Erlenmeyer de un litro, poner 250 ml de medio S preparado.
- Inocular el concentrado de *E.coli* OP 50, proveniente de 2 litros de cultivo *overnight* de OP50 en LB que fue centrifugado a 4°C durante 10 minutos a 7.500 rpm.
- Levantar los nemátodos sincronizados de 4 cajas de Petri con el medio S y adicionarlos al medio de cultivo.
- Poner el cultivo en un *shaker* con agitación a 18°C.
- Monitorear los cultivos en el microscopio. Si el medio S necesita mas *E. coli*, suplir esa necesidad de alimento. Cuando la mayoría de los gusanos estén en etapa adulta (usualmente al 4° o 5° día) poner el medio en hielo por 15 minutos para que los gusanos se asienten.
- Aspirar el sobrenadante.
- Transferir los gusanos a *falcons* cónicos estériles de 50 ml.
- Centrifugar los tubos por 2 minutos a 3.400 rpm para obtener un *pellet* de gusanos.
- Aspirar el líquido remanente.

3.6. Mantenimiento y conservación de bacterias

Las cepas de *E.coli* OP50 como fuente de alimento para *C.elegans* y las cepas de bacterias transformadas HT115 con los

target de los genes F48E3.3 y F26H9.8 fueron conservadas a una temperatura de 4°C y -22°C, respectivamente. Se congelaron cepas de cultivos crecidos en fase exponencial a -80°C y fueron suplementados con glicerol estéril a una concentración final de 30%.

3.7. Preparación de bacterias competentes

- Al medio LB líquido, se le adicionan las bacterias OP 50, en condiciones estériles.
- Se dejan crecer *overnight* a 37°C en el *shaker* con agitación (200 rpm).
- Sacar en condiciones de esterilidad el cultivo y centrifugar en frío a 7.500 rpm durante 10 minutos.
- Descartar el sobrenadante y poner el *pellet* en falcons de 30 ml.
- Si no se usan inmediatamente, poner con glicerol al 10% para que no se rompan y llevar a congelar a -80°C.

3.7.1 Preparación de bacterias competentes para RNAi en medio líquido

- Utilizar 4 Erlenmeyer de 1.000 ml.
- A cada medio LB líquido se le inoculan en condiciones estériles las bacterias HT115(DE3) transformadas que se quieren inducir.
Control(-) (vector vacío)
Control (+) PBT5
GT1 (F26H9.8)

GT2 (F48R3.3)

- Se dejan crecer *overnight* a 37°C en el *shaker* con agitación (200 rpm).
- Sacar en condiciones de esterilidad el cultivo y hacer una dilución del cultivo (250 ml del cultivo crecido *overnight* en 750 ml de LB).
- Ponerlo en el *shaker* a 37°C por una hora.
- Añadir 250 microlitros ml de IPTG al 0.8%.
- Dejar 3 horas induciendo.
- Centrifugar en una centrífuga Beckman Coulter en frío a 4°C a 7.500 rpm durante 10 minutos.
- Descartar el sobrenadante y poner el *pellet* en *falcons* de 30 ml.
- Si no se usan inmediatamente, poner con glicerol al 10% para que no se rompan y llevar a congelar a -80°C.

3.8 Mantenimiento y conservación del *C. elegans*

Los nemátodos fueron mantenidos en el laboratorio en agar sólido NGM en cajas de Petri y algunas veces en medio líquido (para experimento de RNAi) al cual se le disemina con *E. coli* (cepa OP50 auxótrofa de uracilo que limita el crecimiento) como fuente de recurso y mantenido a 18°C. Las cepas de gusanos fueron pasadas a placas frescas cada dos días aproximadamente. Para los experimentos de RNAi se replicaron gusanos hermafroditas en estadio

L4 a placas de Petri, de 100 mm de diámetro, con medio NGM mediante un asa de platino y monocapa de bacteria transformada con los *target* de los genes F48E3.3 y F26H9.8 y con el vector vacío para el control.



Fig 13 Placas de NGM conteniendo los gusanos utilizados en los experimentos de RNAi y *C.elegans* crecidos en la mismas placas observados bajo lupa (Aumento 6X)

3.9. Transferencia de gusanos

Se usan muchos métodos para transferir *C. elegans* de una placa a otra (con espátula, escalpelo, anza de platino, papel filtro), pero la más usada es llevar trozos de agar pequeños de una placa a otra. Esta última es la elegida para pasar en masa gusanos y así mantener los nemátodos hasta preparados y en cantidad suficiente para iniciar los experimentos. Se apoya el trozo del agar (± 0.8 mm) cortado en triángulo sobre la placa limpia de medio NGM y se desliza suavemente para que los gusanos se muevan. También se utilizó el paso de gusanos con el anza o "*pick*" que se hace montando 2,5 cm

de un alambre de platino dentro de una pipeta de Pasteur, la cual es flameada para que se adhiera al vidrio. Fue utilizada para pasar nemátodo por nemátodo.



Fig 14: Técnica de transferencia de gusanos con pequeñas

3.10. Decontaminación de *C. elegans*

Se presentaron dos formas de contaminación en las placas de *C. elegans*: hongos y bacterias. Se utilizaron los siguientes métodos descontaminantes.

- Hongos: la contaminación podía venir de las placas o de las bacterias; se revisaron las placas NGM durante varios días y luego los *C. elegans* fueron pasados regularmente a placas nuevas día tras día hasta estar seguros que la contaminación había desaparecido.
- Bacterias: aparecieron bacterias diferentes a la OP50, por lo que se utilizó una solución limpiadora con NaOH 5 M y NaOCL

5% en relación 1:1; se tomaron los nemátodos hermafroditas grávidos, se colocaron en una placa de NGM limpia; fueron sumergidos en una gota de esta solución, la cual mató los gusano y la contaminación, pero dejó libres los huevos; al día siguiente las larvas eclosionaron dentro de la OP 50 limpia y fueron transferidas a una nueva placa de NGM.

3.11. Congelado de *C. elegans*

Se usaron 3 placas frescas (transferidas en los últimos dos días) con gran cantidad de larvas L1 y L2. A cada una se le agregó 3 ml de *buffer* M9 (para las placas lite). Para los experimentos de RNAi fue agregado medio S.

Se levantaron las larvas con un *tip* estéril que fue cortado en la punta y se colectaron en un Eppendorf de 1.5 ml estéril.

Se realizó una solución de glicerol 30% (300 µl glicerol, 700 µl M9) y se conservaron así:

- 500 µl de larvas y 500 µl de solución estéril de glicerol al 30% y M9. Se metieron en un criotubo o Eppendorf y fueron llevados dentro de una caja de tecnopor bien cerrada a -80°C por 48 horas para que los nemátodos se fueran congelando poco a

poco. Después de pasado este tiempo, fueron puestas en cajas de almacenamiento hasta ser utilizadas a -80°C .

3.12. Descongelado de *C. elegans*

Los Eppendorf o criotubos que se sacaron de -80°C , se dejaron descongelar a temperatura ambiente. El contenido de cada Eppendorf, fue puesto en dos placas de NGM con OP 50 limpias y se observaron con lupas hasta ver el movimiento de las larvas.

Luego de dos o tres días, se transfirieron con un *pick* de platino a placas diferentes. Un gusano por placa. (+/- 10-15 placas)

Se espero que pasara una generación para usar los gusanos en los experimentos.

3.13. Montaje de *C. elegans* para observación al microscopio

Se ulitizaron dos métodos simples para la observación de los nemátodos.

3.13.1. Montaje simple

Se resuspendieron gusanos de la cepa SJ 4005 y KP 3948 (en varios estadíos larvarios, según el experimento) en buffer M9 y se anestesiaron con azida al 2%. Se montaron en portaobjetos y fueron cubiertos con cubreobjetos sellando estos con esmalte transparente. Se observaron en el microscopio biológico Olympus, BX 60.

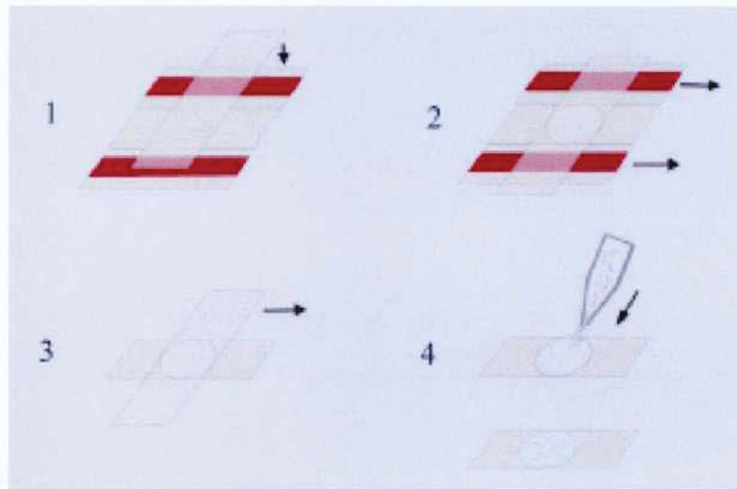
3.13.2. Montaje con agar

1. Preparación del agar

a. Materiales:

- Solución de agar con agua al 5%
- Pipeta de Pasteur
- 2 portaobjetos cubiertos con cinta en toda la superficie
- 2 portaobjetos limpios

b. Preparación del montaje



Poner los dos portaobjetos cubiertos en una superficie plana y en medio de ellos, poner el portaobjetos limpio tipo sandwich. Usando la pipeta de Pasteur, adicionar una gota del agar sobre el portaobjetos limpio. Cubrir el agar con otro portaobjetos limpio, en posición perpendicular a los tres portaobjetos. Presionar suavemente

sobre el agar hasta que quede un círculo de alrededor 0.4 mm, evitando que se formen burbujas. Cuando el agar este solidificado, separar suavemente los dos portaobjetos limpios. El agar quedará adherido a uno de ellos.

2. Montaje del gusano:

- Poner 2 micro gotas de M9 conteniendo 10-25 mM azida de sodio (NaN_3), en el centro del agar. La azida de sodio, anestesia los gusanos, por lo tanto no se mueven y esto hace que sea más fácil su observación.
- Transferir los gusanos que van a ser observados en la preparación, con un pick de platino.
- Suavemente poner el cubreobjetos sobre el preparado con los gusanos.
- Sellar la preparación con esmalte transparente por los bordes del cubreobjetos
- Poner en cámara húmeda.

Los gusanos dejan de moverse en el cabo de 1 o 2 minutos.

3.14. Coloraciones

Se realizaron en gusanos sin fijar y en gusanos fijados con una solución de NaPO_4 10 mM y paraformaldehído 0.05 M a pH de 7.4 durante una hora a temperatura ambiente, los cuales fueron lavados

3 veces con PBS 1X. Los gusanos también fueron visualizados con las siguientes tinciones:

3.14.1. DAPI

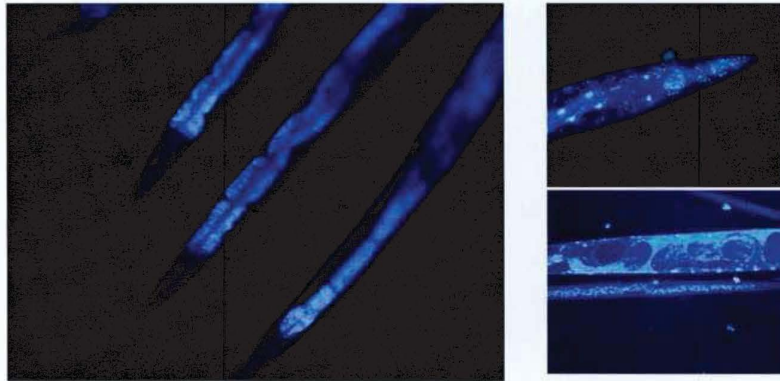


Fig 15 Tinción con DAPI de *C.elegans* de diferentes estadios y detalle de los mismos

DAPI: Diamidino 4'6'-fenilindol - 2 diclorhidrato. Colorante fluorescente perteneciente al grupo de colorantes del indol y utilizado para colorear y hacer visible el ADN en el *C. elegans* (núcleos de las células)

El método puesto a punto consiste del siguiente procedimiento:

Los gusanos fueron levantados con 2 ml de PBS y fijados con una solución de paraformaldehído durante dos horas. Después de la fijación, se transfirieron a un eppendorf con un poco de PBS y fueron centrifugados 1 min a 3.400 rpm. Se removió el sobrenadante, se lavó nuevamente con PBS y se incubaron con 100 ng/ml de DAPI en buffer neutro. Se incubaron durante 30 minutos y vueltos a lavar 3X en PBS. Con la ayuda de un tip cortado en la punta, fueron

transferidos los gusanos dentro del portaobjetos directamente o en los portaobjetos que contenían el agar. Fueron cubiertos con cubreobjetos. Se sacó el exceso de líquido y se cerró con esmalte transparente. Se observó en el microscopio de fluorescencia hasta la excitación del dapi por la luz UV (310nm) con un amplio margen de alrededor de 430nm.

3.14.2. Faloidina

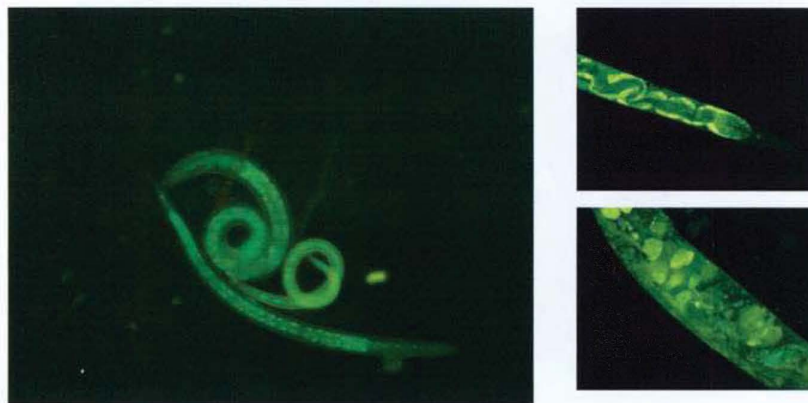


Fig16 Tinción con FITC-faloidina de *C.elegans* de diferentes estadios y detalle de los mismos.

La faloidina es un heptapéptido bicíclico tóxico que está presente en la seta venenosa *Amanita phalloides*, fue utilizado como colorante fluorescente unido a FITC (fluoresceína verde) para ver los filamentos de actina en las células hipodérmicas del *C.elegans*.

La actina, es una proteína que se conoce como responsable de la contracción de las células. La actina es una proteína globular que a su vez se polimeriza dando largos filamentos. Cada molécula de actina tiene varios dominos con diferentes funciones y tiene una polaridad definida, con una "cabeza" y una "cola" de modo que siempre se une

con las demás moléculas de actina siguiendo una dirección determinada. Hay un conjunto de moléculas de actina aislada, que se denomina ACTINA G (Globular) que debe unir ATP para poder formar microfilamentos, se une en largas cadenas de de a 2 forman una doble hélice: esta fibrilla se denomina ACTINA F (fibrilar). Las moléculas de actina se unen a otras proteínas pequeñas que son capaces de regular la polimerización. Los microfilamentos de actina se encuentran distribuidos por toda la célula, pero de maneras diferentes. La actina es la proteína más abundante en las células eucariontes. La actina alfa es la que se encuentra en las células musculares y la actina beta y gama en las células no musculares.

El método puesto a punto consiste en :

Los gusanos fueron levantados con medio S basal y lavados varias veces en microcentrifuga a 3.400 rpm por 2 minutos para quitar los excesos de bacteria.

Fueron fijados en una solución buffer de NaPO_4 y paraformaldehído 0.05 M durante una hora a temperatura ambiente, lavados tres veces en PBS y se les adicionó 8 μl faloidina acoplada a fluoresceína (2 μl de 0.1 mg/ml Faloidina FITC en metanol, diluidos en una solución al 0.05% triton 100X, NaCl 0.1 M y 3.7% sucrosa). Fueron puestos en un portaobjetos con cubreobjetos, eliminando el exceso de líquido con un papel toalla, hasta que la larva quedara suavemente comprimida. Las láminas fueron incubadas por 45 minutos a temperatura ambiente y examinada al microscopio de fluorescencia (543 nm).

3.15. Visualización de *C. Elegans*

Para estudiar el *C. elegans* debido a su tamaño reducido, debemos recurrir a varias técnicas. Podemos verlo macroscópicamente cuando es adulto, ya que su tamaño alcanza de 1mm a 1.2 mm de largo, pero no podemos identificarlo. En lupa podemos observar e identificar sus estadíos larvarios, intestino, faringe , vulva y ver su producción de huevos. Sin embargo, para poder examinar en detalle su citoesqueleto, cromatina y organelas y cambios fenóticos, se utilizó el microscopio.

3.16. Estudio Microscopico

Se realizó en nemátodos del estadio adulto, en los días 3,6 y 9 que fueron sincronizadas para las cepas Kp 948 y en días 3 y 6 de estadio adulto para las larvas SJ 4005 que tenían el gen reportero GFP.

Para algunos se realizó fijación con paraformaldehído 0.05M y se procedió a hacer el montaje en portaobjetos y fueron observados en:

3.16.1. Microscopio Esteroscópico marca Nikon 2064446

Se realizaron observaciones diarias de los nemátodos, con un zoom de 10X. Se pusieron a punto las técnicas y se sincronizar los gusanos en los estadíos larvarios requeridos.

3.16.2. Microscopio de fluorescencia olympus MVX 10

Nos ofrece un sistema de macro fluorescencia y nos permite mirar no solo el impacto de la expresión del gen, sino observar todo el organismo a nivel celular. Se observó fluorescencia natural del *C. elegans* (autofluorescencia) y la producida como resultado de la expresión de marcadores fusiones a GFP (Green fluorescent protein).

Este microscopio, nos brindó sensibilidad, buena resolución y precisión. Se observó 4X

3.16.3. Microscopio biológico Olympus, BX 60

La visualización de los *C. elegans* con este microscopio de investigación de barrido láser multifotónico, permitió ver las imágenes que se generaron por la fluorescencia y observar en detalle el *C.elegans*. Está acoplado a una computadora, mediante un completo software de comandos, la cual nos brinda una plataforma ideal para generar imágenes.

3.17. Purificación de DNA Plasmídico

- Para la extracción del DNA plasmídico , se crecieron 3 mililitros de bacterias portadoras del plásmido en medio LB con antibiótico (ampicilina).

- Transferir el cultivo a un tubo eppendorf (1.5 ml) y centrifugar las células en micro centrifuga durante 1 minuto. (Hacer el mismo procedimiento 2 o 3 veces.
- Eliminar el sobrenadante por aspiración o con una pipeta.
- Añadir 200µl de Solución P1 (solución de resuspensión celular) y mezclar mediante agitador ("vortex") o pipeteando arriba y abajo hasta que la resuspensión sea homogénea.
- Adicionar 300 µl de Solución 2 (solución de lisis celular, NaOH 0.2 N+SDS 1%) durante 2 minutos y mezclar suavemente invirtiendo el tubo cerrado unas 10 veces (no mezclar con agitador). La solución debe hacerse viscosa ligeramente transparente, señal de que las células se han lisado.
- Incubar en hielo por 3 a 5 minutos.
- Añadir 300µl de Solución 3 (solución de neutralización, acetato de potasio ph 4.8) mezclar por inversión y dejar durante 5 minutos en hielo, para precipitar el DNA cromosomal.
- Centrifugar 20 minutos en microcentrífuga a 14.000 rpm y transferir el sobrenadante a un tubo limpio.
- Adicionar 10 µl de RNAsa con una concentración final de 20 µg/ml.
- Incubar el tubo por 20 a 30 minutos a 37 grados.
- Realizar la extracción con cloroformo isoamílico (400 µl) y se mezcla por inversión 30 segundos.
- Centrifugar 3 minutos y tomar la fase acuosa.

- Pasar a un tubo limpio sin tocar las proteínas.
- Precipitar el DNA total, adicionando isopropanol (volumen equivalente al 100%. Proporcional al DNA) y dejar 15 minutos en hielo.
- Centrifugar 20 minutos centrifuga refrigerada.
- Descartar el sobrenadante y se colocaron 500 µl de Etanol 70%
- Centrifugar durante 5 minutos a 14.000 rpm y dejar secar el pellet a temperatura ambiente.
- Resuspender el pellet en 20 µl de agua desionizada y correr en gel de agarosa.

3.18. Electroforesis de ácidos nucleicos en gel de agarosa

Preparación del gel agarosa 1%

En un erlenmeyer mezclar 1 gramo de agarosa con 100 ml de tampón TAE 50X.

Calentar la mezcla con la ayuda de un microondas hasta fundir y disolver completamente la agarosa. Añadir 3 µl de una solución de bromuro de etidio (10 mg/ml).

Dejar enfriar ligeramente la mezcla (gel) hasta que alcance una temperatura de entre 50 °C a 60 °C y verterla, seguidamente, sobre una "cama electroforética", previamente preparada, colocando el "peine" adecuado para formar los pocillos.

Dejar enfriar a temperatura ambiente hasta que gelifique completamente.

Procedimiento

- En un tubo eppendorf limpio añadir 20 μ l (10 μ l del ADN aislado anteriormente + 10 μ l de agua) de la disolución de ADN y 3 μ l de "tampón de carga".
- Centrifugar ligeramente la mezcla si hay demasiadas gotas repartidas dentro del tubo, con objeto de recoger todo el volumen de muestra.
- Depositar la muestra en uno de los pocillos del gel de agarosa al 1% previamente fabricado (éste se ha colocado con anterioridad sumergido en tampón TBE en una cubeta de electroforesis)
- Cerrar o tapar la cubeta de electroforesis, colocar los electrodos de tal forma que el polo negativo quede al lado de los pocillos y el polo positivo en el extremo opuesto del gel, hacia donde va a migrar el ADN, y aplicar una corriente eléctrica continua de 100-120 voltios
- Detener la electroforesis tras unos 60 minutos o cuando el colorante haya recorrido las tres cuartas partes del gel.
- Visualizar el ADN con ayuda de un transiluminador de luz ultravioleta de onda corta y fotografiarlo con un sistema digital de adquisición de imágenes.

3.19. RNAi en *C. elegans*, mediada por inactivación del gen

Se inhibieron de forma específica los genes F48E3.3 y F26H9.8 del *C. elegans*, utilizando la estrategia del silenciamiento génico (RNAi) y se analizó las consecuencias que genera la depleción de dichas proteínas

Para ello, se utilizaron cepas de gusanos hipersensibles al RNAi.

- Cepa KP 948. Sensible hipersensible al RNAi
- Cepa SJ 4005 Es una cepa transgénica la cual posee una construcción en la cual la expresión de la GFP se encuentra bajo el control del promotor del gen hsp4, miembro de la familia de las HSP70. La HSP4 es la proteína homóloga a Bip involucrada en la respuesta al estrés en retículo endoplasmático.

Para realizar el silenciamiento génico, se eligió el método de RNAi Feeding (Ver explicación en introducción). Es un método, rápido, poco costoso, en el cual los gusanos son alimentados con bacterias modificadas genéticamente HT115(DE3) que expresan dsRNAs codificados por los diferentes vectores que contienen los fragmentos target de los genes de interés que se desean estudiar.

Los plásmidos conteniendo los fragmentos genómicos utilizados fueron obtenidos en el CGC. Estos clones fueron realizados por amplificación por PCR de fragmentos de DNA de los genes de interés (F48E3.3 y F26H9.8) e introducidos en el vector L4440 (ver sección 3.4) que permite la expresión de dsRNA en la bacteria por

transcripción con polimerasa T7. Los plásmidos fueron transformados dentro de una linaje de bacteria HT115(DE3) Estos clones fueron enviados por correo al laboratorio y con ellos comenzamos nuestro trabajo experimental.

Experimento 1.

C. elegans KP948 fue alimentadas con bacterias HT115(DE3) transformadas con el vector L4440 vacío, o con los fragmentos genómicos target de los genes F48E3.3 y F26H9.8 en placas de NGM conteniendo IPTG 1 mM y carbenicilina 100 µg/ml. En estas bacterias, la expresión de la polimerasa de T7 está regulada por un promotor inducible por IPTG y el gen que codifica para la RNAsaIII que digiere DNAs disrupta con un marcador de tetraciclina.

<u>Cepas utilizadas</u>	<u>Característica relevantes</u>
KP948	Eri1, lin15B
SJ4005	P: hsp4:: GFP

3.20. Técnica de Feeding para RNAi

Esta técnica, permitió introducir el RNAi, de manera eficiente. Se tomaron bacterias incubadas durante 6-12 horas en LB+ ampicilina, luego fueron puestas en placas 300 µl de bacterias en el agar NGM con los aditivos de IPTG y carbenicilina. Se inducen overnight a temperatura ambiente. Al día siguiente transferir 10

larvas a cada caja de petri con larvas en estadio L4 hermafroditas en placas que contienen las bacterias que expresan el RNAi.

- Placas del 1 al 6 Control (-) con el vector L4440 vacío
- Placas del 7 al 12 Control (+) con el vector L4440 + PBT5 (gen que produce letalidad embrionaria)
- Placas del 13 al 18 GT1 con el fragmento genómico target del gen F26H9.8
- Placas del 19 al 24. GT2 con el fragmento genómico target del gen F48E3.3

Se incuban a 18°C durante 24 horas y se observan los gusanos hasta que lleguen a adultos. Cuando inician la puesta de huevos se comienzan a pasar los gusanos a una segunda placa conteniendo bacterias con RNAi y así día tras día, con todas las placas, hasta que los gusanos no pongan más huevos. De igual manera se fueron observando las F1 de cada placa.

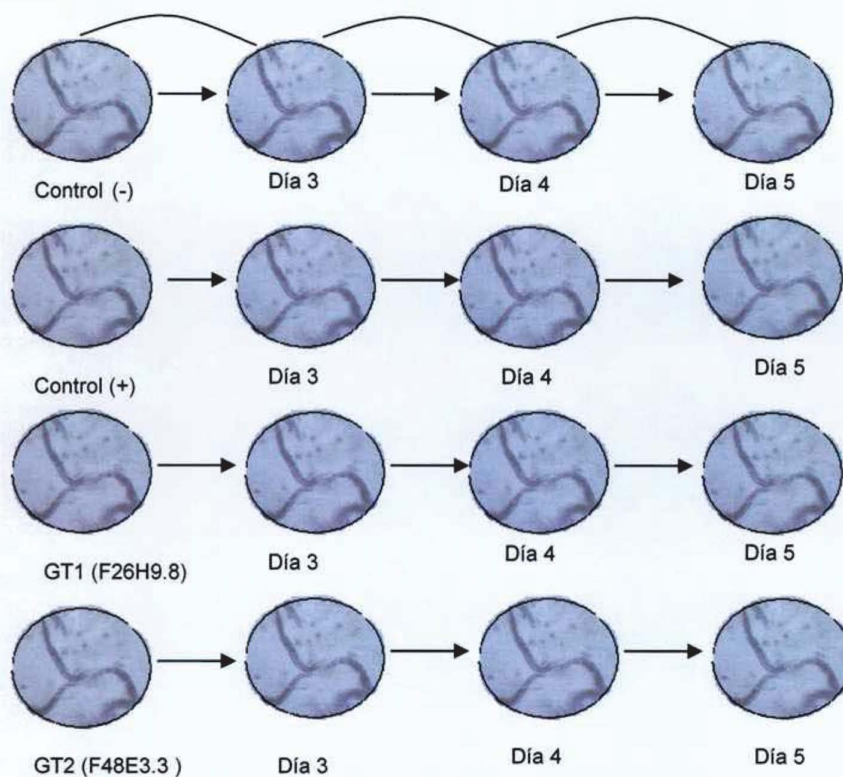
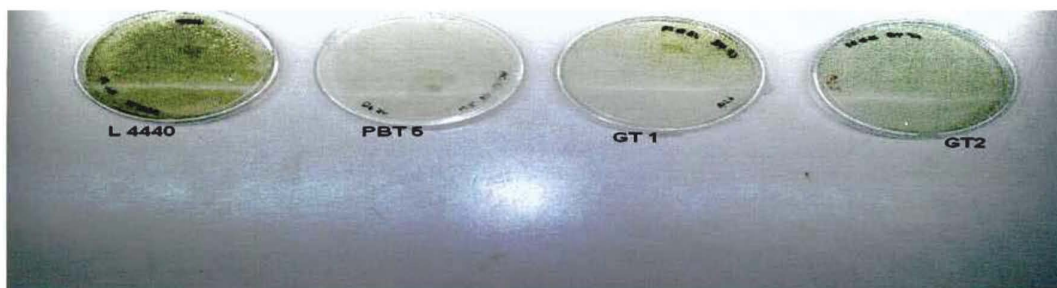


Fig 17 Esquema general utilizado en los experimentos de RNAi

Se tuvo como criterio de observación, evaluar cualquier cambio fenotípico en el gusano adulto y en sus progenies. Los resultados fueron reproducidos al menos tres veces mostrando cambios fenotípicos importantes. Los clones bacterianos utilizados fueron

verificados secuenciando el plásmido que expresaba el RNAi contra el gen que se deseaba interferir.

3.21. Bioinformática

La comparación de secuencias es un proceso fundamental en el análisis de las misma y nos permitió inferir si nuestras secuencias F48E3.3 y F26H9.8 presentaban homología con otras proteínas mediante los algoritmos de alineación. Utilizamos el programa de BLAST, para realizar las búsquedas en la base de datos del NCBI. Los resultados obtenidos con su respectivo score, fueron guardados en formato Fasta con el fin de realizar alineamientos múltiples utilizando el programa ClustalW, Blast 2-sequences y permitiendo elaborar un árbol filogenético con nuestras secuencias homólogas.

4. RESULTADOS

Capítulo I: Análisis bioinformática

Las glicosiltransferasas son enzimas involucradas en la biosíntesis de oligosacáridos y glicoconjugados. Están ampliamente distribuidas en los sistemas vivos, desde bacterias hasta el hombre, por lo que sus funciones pueden considerarse fundamentales en la vida. Están involucradas en la síntesis y el procesamiento de oligosacáridos unidos a asparagina, que ocurre en el RE y del correcto plegamiento de las glicoproteínas.

La GT's de diversos organismos pertenecen a la familia 8 de glicosiltransferasas y están compuesta por dos dominios.

- Dominio N-terminal que compone el 80% de la molécula y no tiene similitud significativa con otros miembros de la familia 8 de las glucosiltransferasas y estaría involucrada con el reconocimiento de los confómeros que aun no han alcanzado su estructura nativa.
- Dominio C-terminal o dominio catalítico con actividad catalítica que contiene el sitio de unión a UDP-Glc y y que tienen similitud significativa con los miembros de la familia 8 de las glucosiltransferasas.

Los dominios C-terminal de las proteínas HUGT1 y HUGT2 de humanos y de diferentes organismos, presentan un alto grado de

similitud con los dominios C-terminal de las proteínas del *C.elegans*, no ocurriendo lo mismo con el dominio N-terminal.. Un proyecto de trabajo que está siendo realizado en el laboratorio de glicobiología, consiste en la expresión heteróloga en levaduras de las proteínas codificadas por los genes **F26H9.8 y F48E3.3**. a fin de determinar si ambos o alguno de los dos genes posee actividad de GT.

4.1 Caracterización de genes homólogos

Para comenzar a desarrollar la hipótesis de trabajo sobre la función de nuestros genes y sus relaciones filogenéticas, se realizó una búsqueda bioinformática de los genes ortólogos a los genes HUGT1 y HUGT2 de humanos. En *C.elegans* se encontraron dos genes (F48E3.3 y F26H9.8), los cuales se encuentran caracterizados en www.wormbase.com al igual que el resto del genoma. Las proteínas codificadas por ambos genes pertenecen a la familia 8 de las glicosiltransferasas. Se realizó una comparación de secuencias de las proteínas codificadas por estos genes utilizando el programa BIOEDIT que se encuentra disponible en www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html. Los resultados se muestran en la figura 18.

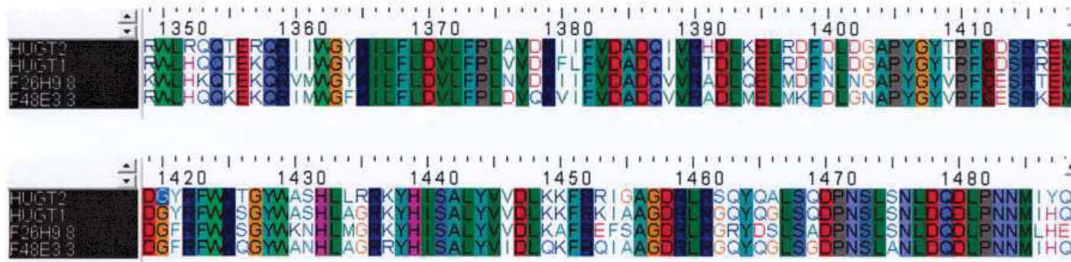


Fig 18 La figura muestra la sombra de identidades y similitudes de los aminoácidos de las proteínas HUGT1; HUGT2, F26H9.8 y F48E3.3 en alineamiento window

Se realizó un alineamiento en el programa Blast 2 sequences y la matriz Blosum62 para los genes HUGT1 y HUGT2. Los resultados se muestran en la figura 19.

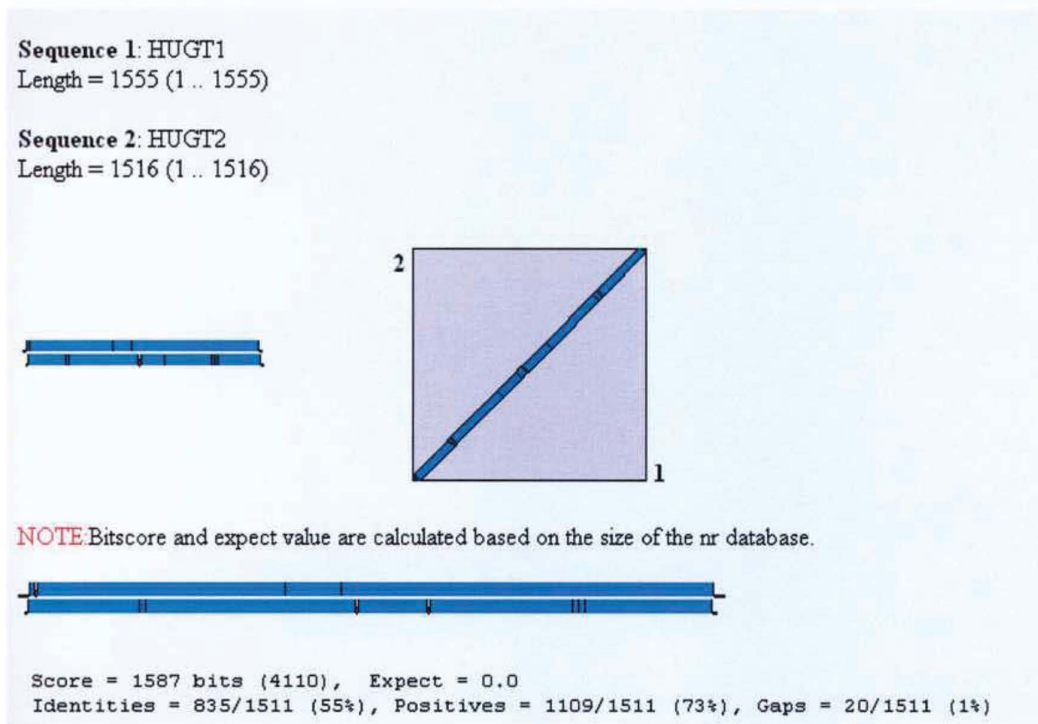


Fig.19 Alineamiento secuencias HUGT1 y HUGT2

Este alineamiento analizó las regiones conservadas de esta familia de proteínas y comprobó las frecuencias relativas de aparición de los aminoácidos y las posibilidades de sustitución entre ellos, mostrando un porcentaje de identidad del orden del 55%. Este porcentaje de identidad nos indica la proporción de bases o aminoácidos idénticos que comparten las dos secuencias HUGT1 y HUGT2

También se realizó un alineamiento en el programa Blast 2 sequences, con la matriz Blosum62 entre las dos secuencias de las proteínas codificadas por los genes F26H9.8 y F48E3.3 de *C.elegans* y se encontró que tenían 52 % de identidad, se observó también un alto grado de similitud en el dominio C-terminal de las dos proteínas (Fig. 20).

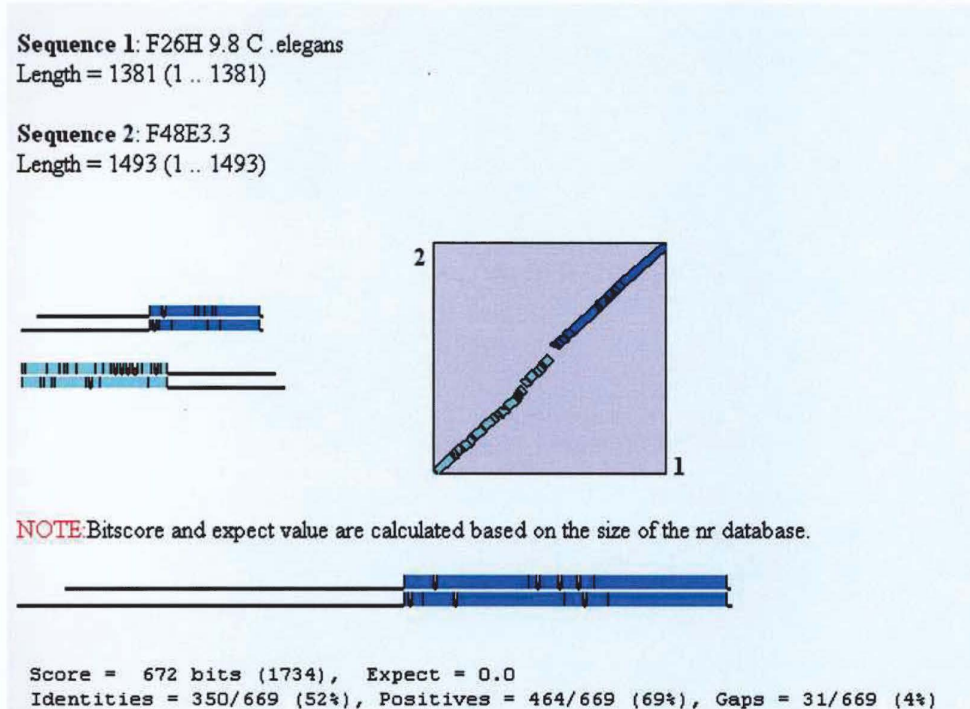


Fig.20 Alineamiento secuencia F26H9.8 y F48E3.3 de *C.elegans*

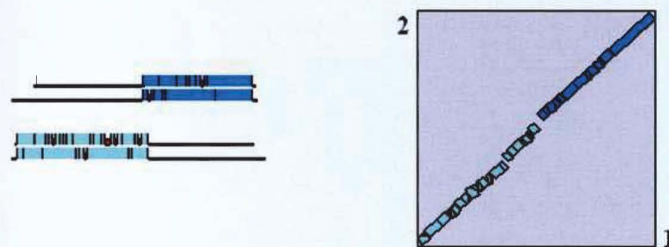
Utilizando el programa Blast 2 sequences y la matriz Blosum62 se realizaron las comparaciones entre las proteínas codificadas por los genes F26H9.8 y F48E3.3 de *C.elegans* con las proteínas humanas codificadas por los genes HUGT1 y HUGT2 para ver si presentaban una similitud suficiente que justifique la inferencia de una relación evolutiva.

Cuando se comparó la secuencia de la proteína F26H9.8 con la proteína HUGT1, se obtuvo una identidad del 48%, mientras que cuando se comparó la secuencia de esta misma proteína con la secuencia de la proteína HUGT2, se obtuvo un 34% de identidad (Fig 21 A) Cuando se realizó este mismo análisis con la a secuencia de la proteína codificada por el gen F48E3.3 se encontró que la misma presentaba una identidad similar con las dos proteínas humanas HUGT1 y HUGT de 42 y 41% respectivamente (Fig 21 B).

Sequence 1: F26H 9.8 C .elegans
Length = 1381 (1 .. 1381)

Sequence 2: HUGT1
Length = 1555 (1 .. 1555)

A



NOTE: Bitscore and expect value are calculated based on the size of the nr database.



Score = 619 bits (1595), Expect = 1e-174
Identities = 325/676 (48%), Positives = 437/676 (64%), Gaps = 37/676 (5%)

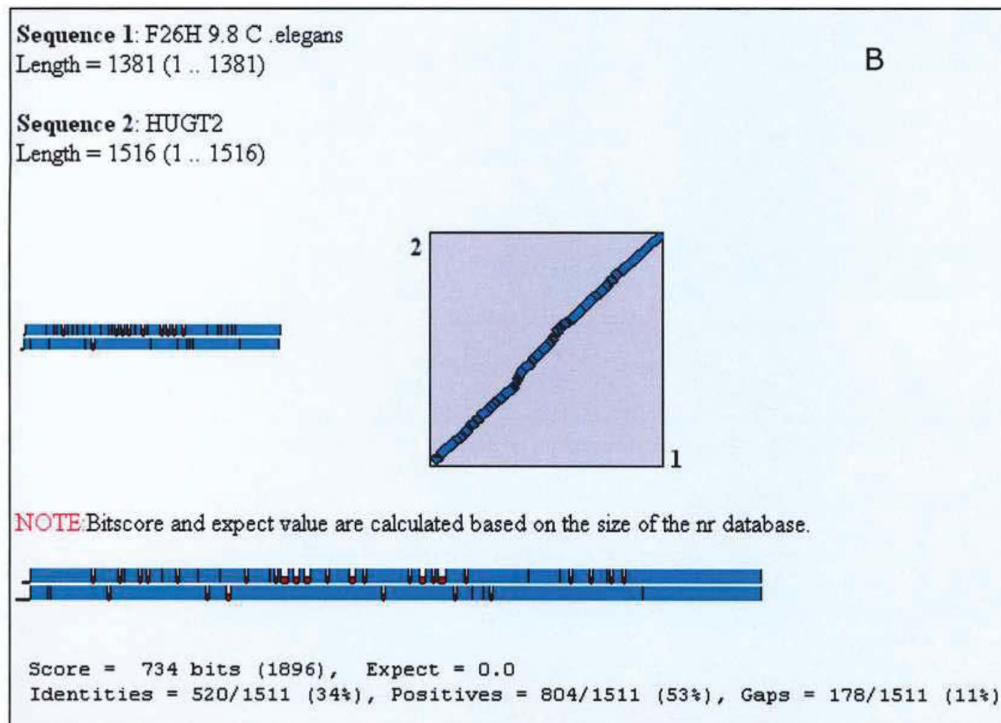


Fig.21 Alineamiento de las secuencias de las proteínas codificadas por los genes F26H9.8 y HUGT1 (A) y F26H9.8 y HUGT2 (B)

Cuando se realizó este mismo análisis con la a secuencia de la proteína codificada por el gen F48E3.3 se encontró que la misma presentaba una identidad similar con las dos proteínas humanas HUGT1 y HUGT de 42 y 41% respectivamente (Ver Fig 22, A y B) .

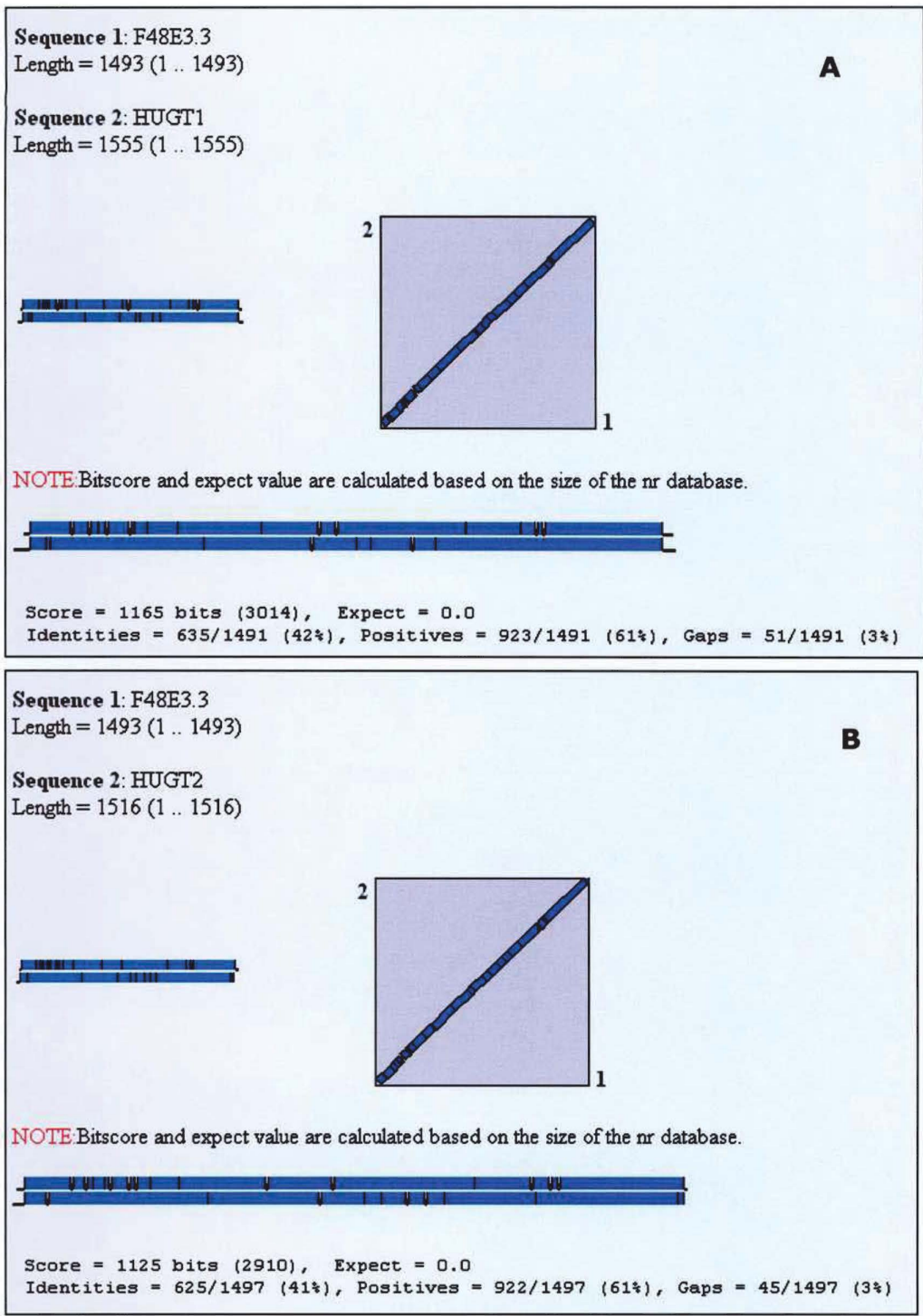


Fig.22 Alineamiento de secuencias de las proteínas codificadas por los genes F48E3.3 y HUGT1 (A) y F48E3.3y HUGT2 (B)

En los alineamientos y comparaciones realizadas entre los genes F26H9.8 y F48E3.3 de *C.elegans* y los HUGT1 y HUGT2 de humanos los porcentajes de identidad superan el 30 %. En general valores superiores al 30% de similitud o de identidad nos indican estructuras homólogas.que se derivan de un mismo gen ancestral.

Se buscaron proteínas de diferentes organismos ya caracterizados que presentaran un alto grado de homología con los genes F48E3.3 y F26H9.8 del *C. elegans* utilizando el programa BlastP del NCBI y se encontró que tenía homología con la familia de las UDP glucosa:glucosiltransferasa. En el alineamiento se observa que tanto la proteína codificada por el gen F26H9.8 como la proteína codificada por el gen F48E3.3 poseen dominios conservados presentes en las proteínas pertenecientes a la superfamilia 8 UDP-g-CGTase. (fig.23)

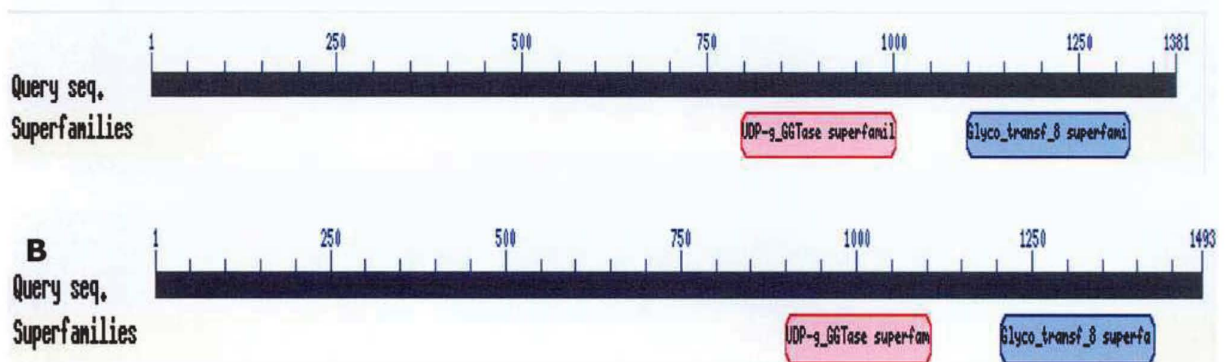
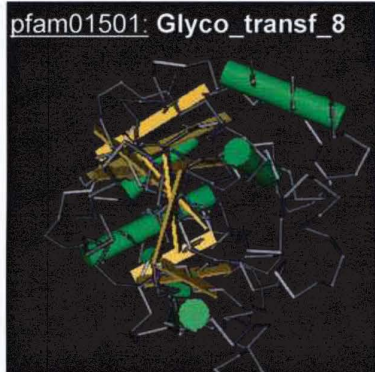


Fig 23 (A) Los dominios conservados para el gen F26H9.8 son de la superfamilia de UDP_g_GGTasa aproximadamente entre los aminoácidos 700 y 900 y el dominio de la superfamilia de las Glicotransferasas 8 entre los aminoácidos 1050 y 1250. (B) Los dominios conservados para el gen F48E 3.3 son de la superfamilia de UDP_g_GGTasa aproximadamente entre los aminoácidos 800 y 1000 y el dominio de la superfamilia de las Glicotransferasas 8 entre los aminoácidos 1100 y 1350.



La topología de las superfamilias de las glucosiltransferasas está representado por un plegamiento tipo sándwich monodominio y son metalo dependientes. Consiste en un arreglo central de láminas beta paralelas, rodeado de un número variable de hélices alfa por ambos lados. Este dominio ha sido denominado UBD, ya que un gran número de glucosiltransferasas utilizan como sustrato donador de azúcar nucleótidos de uridina.

Fig. 24 En esta figura se muestra con detalle la estructura del dominio de la superfamilia de la glicosiltransferasas 8 Pfam 01501,

Cuando se analizaron estas proteínas se observó que el dominio N-terminal presentaban dominios conservados presentes en la familia de proteínas Pfam 06427

a) **Pfam 06427**, UDP-g_GGTase, UDP glucosa:Glicoproteína Glucosiltransferasa.

El N-terminal en este grupo de proteínas es requerido para el plegamiento de proteínas en el retículo endoplasmático.

Description		Pssmid	Multi-dom	E-value
pfam06427, UDP-g_GGTase, UDP-glucose:Glycoprotein Glucosyltransferase		69921	no	8e-84
CD Length: 210 Bit Score: 307.99 E-value: 8e-84				
	10 20 30 40 50 60 70 80			
18776	899 VGSNTVFSIAGHVKGHASQKRTWVSIQGDHSHVVTLPADENDRPVAVDVLAVVDPLTMEAQKLGSLHLIKKVTNCEIKI	978		
pfam06427	1 NNSDVIMKVSASLSPRFKSSPKLFEFLES DSHSVVKLPKEATVPYFDVLAVVDPLSREAQKLGSLHLIKKVTNCEIKI	80		
	90 100 110 120 130 140 150 160			
18776	979 VMNPKDKHSELPLKRFYRYAAASELSFDHNGNLNTN-VVRFDNLPKQLLTLQLQAPDSWIVEAVSAKYDLDNKMEQAN	1057		
pfam06427	81 ILNPKSSSELPLKRFYRYVLEPELEFNANGVLENGPVAKFSNLPASPLTLNLETPESWLVEPVIAKYDLDNKLEDLG	160		
	170 180 190 200 210			
18776	1058 GDVTAEFALQHLLLDGQCDFEVSQGPPLRLQFTLGTDKNPKQFDTIIVMAN	1107		
pfam06427	161 EDVTAEYELEYLLEGHCFDKTSGQPPLRLQLTLGTQTNPHVVDTIIVMAN	210		

Fig.25 Descripción de pfam 06427, UDP-g_GGTase, UDP-glucose Glycoprotein Glucosyltransferase

Pfam 01501,

Esta familia incluye enzimas transfieren un residuo de azúcar a moléculas receptoras. Dentro de esta familia, están incluidos las galactosiltransferasas, lipopolisacáridos glucosiltransferasa 1 y glicogenia glucosiltransferasa.

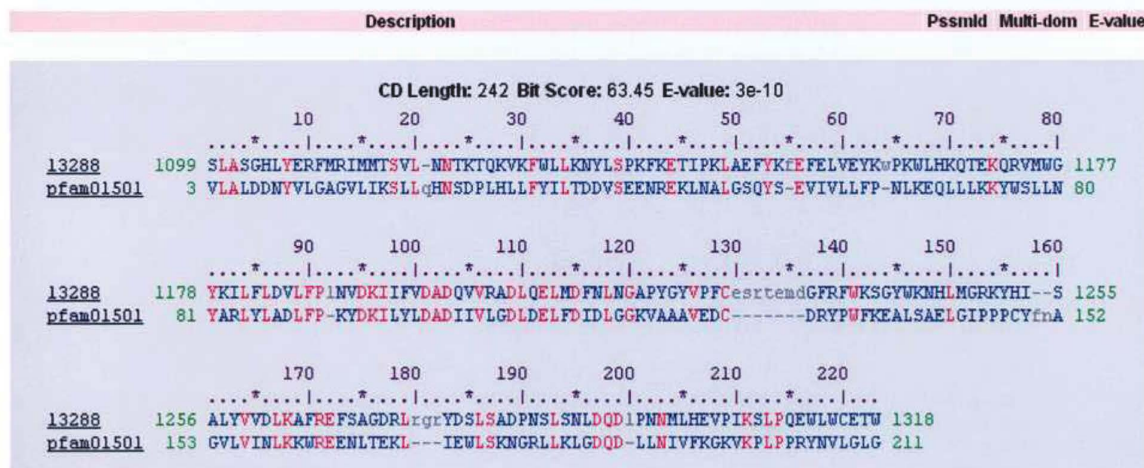


Fig. 27 Descripción de pfam 01501, Glyco_transf_8, Glycosiltransferasa family 8.

A partir de los resultados obtenidos en la búsqueda de secuencias homólogas en el Blast, se realizó un alineamiento de secuencias con el programa Clustal W, a fin de establecer los porcentajes de identidad con los genes que codifican para las GT de diferentes organismos y se encontraron los resultados.

Porcentajes de Identidad encontrados utilizando el programa ClustalW entre las secuencias que codifican para las diferentes GT de retículo.

SeqA	Name	Len(aa)	SeqB	Name	Len(aa)	Score
F26H9.8		1381	F48E3		3149	40
F26H9.8		1381	HUGT1		1555	36
F26H9.8		1381	HUGT2		1516	34
F26H9.8		1381	Ugcgl1_RAT		1553	35
F26H9.8		1381	Ugcgl2_RAT		1525	27
F26H9.8		1381	Ugt-RA_DROME		1548	34
F26H9.8		1381	Smp_SCHMA		1673	32
F26H9.8		1381	A.thaliana		1672	29
F26H9.8		1381	S.pombe		1447	26
F48E3.3		1493	HUGT1		1555	41
F48E3.3		1493	HUGT2		1516	40
F48E3.3		1493	Ugcgl1_RAT		1553	42
F48E3.3		1493	Ugcgl2_RAT		1525	32
F48E3.3		1493	Ugt-RA_DROME		1548	39
F48E3.3		1493	Smp_SCHMA		1673	36
F48E3.3		1493	A.thaliana		1672	32
F48E3.3		1493	S.pombe		1447	29
HUGT1		1555	Ugcgl1_RAT		1553	91
HUGT1		1555	Ugcgl2_RAT		1525	42
HUGT2		1516	Ugcgl1_RAT		1553	54
HUGT2		1516	Ugcgl2_RAT		1525	60
HUGT1		1555	HUGT2		1516	54

Fig.28 Alineamiento múltiple de secuencias, con el programa clustal W

Se encontró que la proteína codificada por el gen F26H9.8 presenta un 36 y 38% de identidad con las proteínas codificadas por los genes HUGT1 y HUGT2 de humanos respectivamente. Por otro lado, la proteína codificada por el gen F48E 3.3 presenta un porcentaje de identidad de 41y 40 % con las proteínas codificadas por los genes HUGT1 y HUGT2.

Si bien la proteína codificada por el gen F48E 3.3 presenta un porcentaje de identidad ligeramente superior con ambos genes de humanos, en particular 41 % con la proteína codificada por el gen

HUGT1, los porcentajes de identidad no son suficientemente altos para asegurar que la proteína codificada por el gen F48E 3.3 de *C.elegans* sea el que posee actividad de GT

Se procedió a hacer el árbol guía filogenético a fin de comparar las distancias evolutivas existentes entre cada uno de estos genes (Fig 29)

Phylogram

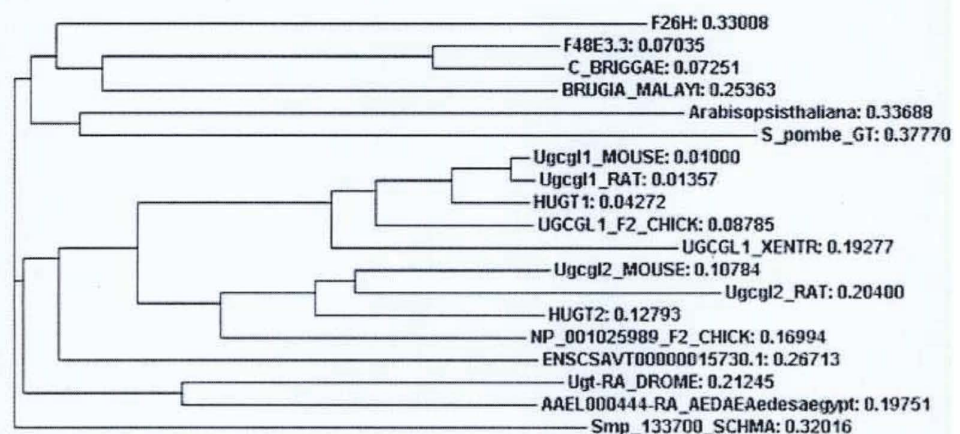


Fig. 29 **Análisis filogenético de las secuencias encontradas en genes homólogos a *C.elegans*. obtenidos con el programa Clustal W, donde se comparan las secuencias de distintas especies. Al nombre del gen le sigue el número de acceso en la base de datos proteica.**

Un estudio filogenético nos permitiría analizar si existió un único evento de duplicación que generó los dos genes F48E3.3 y F26H9.8 y también HUGT1 y HUGT2, o si por el contrario existieron eventos independientes que generaron dos duplicaciones, uno que dio origen a HUGT1 y HUGT2 y a sus homólogos presentes en vertebrados y otro evento que dio origen a los genes F48E3.3 y F26H9.8 de *C. elegans*. Sin embargo, de los datos de las secuencias

que se disponen de las putativas GT's presentes en los distintos organismos no se puede concluir cual de las dos hipótesis es la verdadera, ya que falta información de secuencias de grupos de organismo para generar árboles más completos.

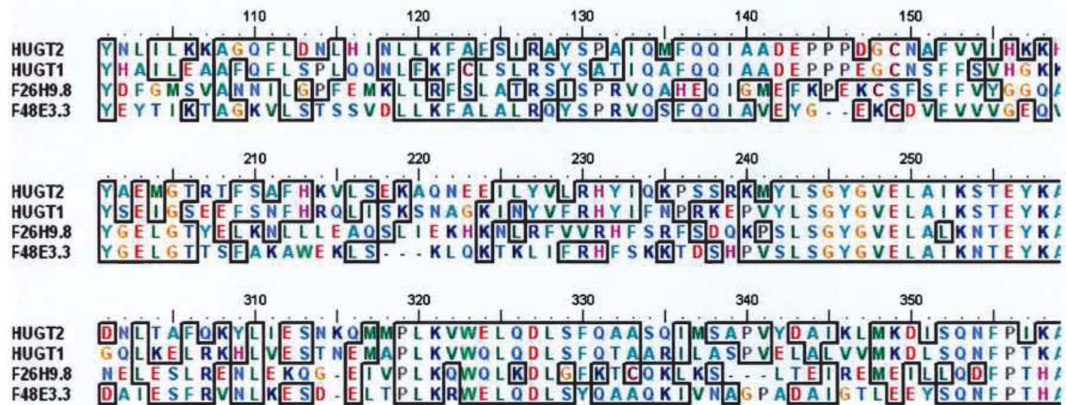


Fig.30 Análisis comparativo de las cuatro secuencias y algunas de las regiones conservadas idénticas.

Capítulo 2

Experimentos de Silenciamiento génico

Como ya se explicó en el capítulo I de esta tesina por análisis bioinformático se identificaron dos genes en el genoma de *C.elegans* que codificarían dos putativas glucosiltransferasas con actividad de GT. Otro proyecto de investigación que se lleva a cabo en el laboratorio consiste en la expresión heteróloga de las proteínas codificadas por ambos genes en levadura a fin de determinar si uno o ambos genes poseen actividad de GT. En el capítulo II de esta tesina se estudiará los efectos causados por la depleción de las proteínas codificadas por ambos genes durante el desarrollo.

4.2 Supervivencia

En el *C.elegans* el proceso de desarrollo es corto y en el laboratorio puede sobrevivir por aproximadamente dos semanas. La senescencia o envejecimiento es el conjunto de modificaciones morfológicas y fisiológicas que aparecen con el tiempo y nos lleva a un proceso de decadencia y degeneración por la disminución de la capacidad de adaptación. Sin embargo, se cree que este proceso está activamente regulado y la falta de algunas proteínas esenciales para el desarrollo, la fisiología y la adaptación puede modificarlo.

Para determinar cómo afecta la supervivencia del gusano la depleción de las proteínas codificadas por los genes F48E3.3 y F26H9.8, se realizó una curva de supervivencia en la cual se incluyó un total de 180 gusanos, 60 gusanos que no se encuentran sometidos a silenciamiento, 60 gusanos sometidos a silenciamiento para el gen F48E3.3 y 60 gusanos sometidos a silenciamiento para el gen F26H9.8. El experimento comenzó con la transferencia de 10 larvas de la cepa KP 948 (hipersensible a los ensayos de RNAi, ver materiales y métodos), en estadio L4 hermafrodita, a placas de Petri con medio NGM suplementado con IPTG y carbenicilina e inoculadas con bacterias que contienen el vector vacío L4440 (CONTROL) y el mismo vector conteniendo los fragmentos genómicos blanco de los genes F48E3.3 (GT2) y F26H9.8 (GT1) que expresan el RNA de interferencia a 18°C. Se utilizaron 18 cajas de Petri en total: 6 placas para el control, 6 para GT1 y 6 para GT2.

Se subdividió el período de observación en intervalos de tiempo de un día, y se transfirieron los gusanos a placas frescas conteniendo las bacterias correspondientes según se indica más arriba hasta finalizar la puesta de huevos.

Se graficó el porcentaje de gusanos vivos con respecto al tiempo (días) y se definió como día de inicio del seguimiento (día 0) al momento en que se transfieren las larvas en estadio L4.

A fin de verificar los resultados, los experimentos fueron reproducidos tres veces. Los datos fueron analizados en primera instancia con Excel y luego se realizó un análisis predictivo más detallado con el programa estadístico SPSS 15.0, ya que este permite la obtención de patrones y tendencias más claro en nuestros resultados.

Para simplificar la expresión de los resultados obtenidos se nombraron los grupos incluidos en este experimento de silenciamiento génico como grupo control, grupo de gusanos que fueron alimentados con bacterias que contenían el vector L4440 vacío, grupo GT1 grupo de gusanos que fueron alimentados con bacterias que contenían el vector L4440 conteniendo el fragmento target del gen F26H9.8 y grupo GT2, grupo de gusanos que fueron alimentados con bacterias que contenían el vector L4440 conteniendo el fragmento target del gen (F48E3.3)

Curva de supervivencia de los gusanos Kp 948. sometidos a silenciamiento génico de los genes F26H9.8 y F48E3.3.

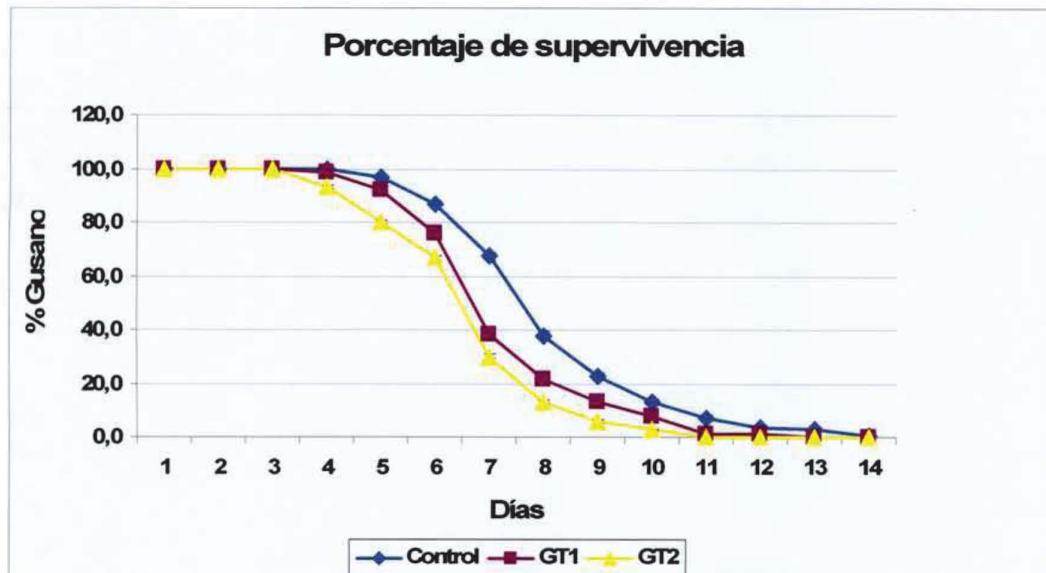


Fig.3 Curva de supervivencia de los gusanos Kp 948. GT1(F26H9.8), GT2 (F48E3.3) y los gusanos control realizada con Excel. Se introdujo la variable tiempo (días) y los eventos de muerte de los diferentes grupos de gusanos.

A partir de este gráfico se calcula la vida de media para cada uno de los grupos y los valores obtenidos fueron 8.37 días para el grupo control, 7.45 días para el grupo GT1(F26H9.8) y 6.75 días para el grupo GT2(F48E3.3). Los días en que las curvas tocan el eje x son 11, 12 y 13

Se realizó un estudio predictivo utilizando el SPSS 15.0. Podemos ver como están distribuidos los datos de nuestros grupos de gusanos y las diferencias en los días de muerte, entre los grupos control, GT1 y GT2.

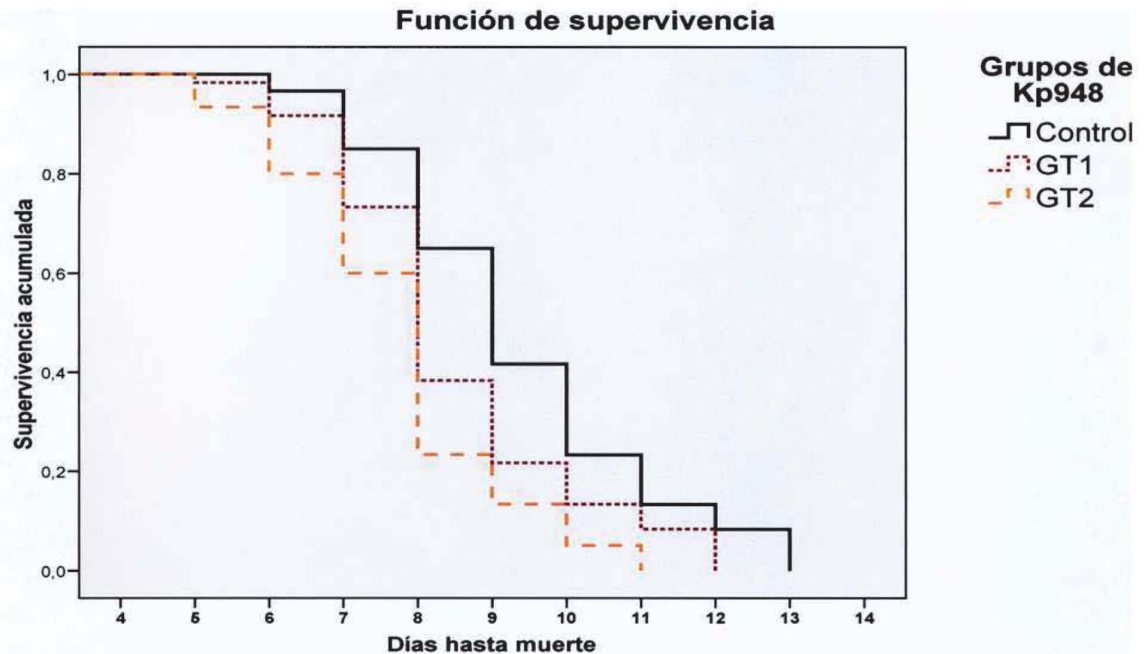


Fig 33 Comparación grafica de las curvas de sobrevida entre Control, GT1(F26H9.8) , GT2 (F48E3.3) Representación gráfica de la probabilidad de un gusano de estar vivo, en función del tiempo, mediante la proporción de gusanos vivos con relación a los que comenzaron en el estudio.

El tiempo se representa en el eje horizontal y la probabilidad de sobrevida en el eje vertical. En el momento de inicio del experimento ($t=0$) la curva parte de 1.0 (=100%) porque todos están vivos. Nótese que al finalizar los períodos de observación, la sobrevida queda en 0 porque se continuó el experimento hasta la muerte del último gusano.

Para el análisis de estos datos con el programa SPSS se utilizó el método de Kaplan Meier que se basa en maximizar la función de verosimilitud de la muestra. Este método calcula la supervivencia cada vez que un gusano muere y da proporciones exactas de supervivencia debido a que utiliza tiempos de supervivencia precisos. La característica más importante de estos datos (tiempo hasta que ocurre la muerte) es que los valores de la curva del análisis de supervivencia se calcularon en el momento en que se produjo la muerte del gusano.

Kaplan-Meier

Se introdujeron los datos de los tres grupos de gusanos utilizados en cada experimento. Las comparaciones globales para calcular las diferencias en las curvas de supervivencia global se realizaron utilizando los tests de Log Rank, Breslow y Tarone-Ware.

Comparaciones globales

	Chi-cuadrado	Gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	24,273	2	,000
Breslow (Generalized Wilcoxon)	23,581	2	,000
Tarone-Ware	24,212	2	,000

Tabla. 1 Prueba de igualdad de distribuciones de supervivencia para diferentes niveles de kp948. El Chi-cuadrado, nos permite determinar que existe una relación entre las variables. Los grados de libertad (gl) es el estimador del número de categorías independientes y el valor de significación (sig) para aceptar o rechazar la asociación entre las variables.

El valor de significación (p) obtenido utilizando las diferentes comparaciones globales resultó siempre menor a 0.05 ($p < 0,0001$) indicando que hay diferencias significativas en los tres grupos.

Días hasta muerte

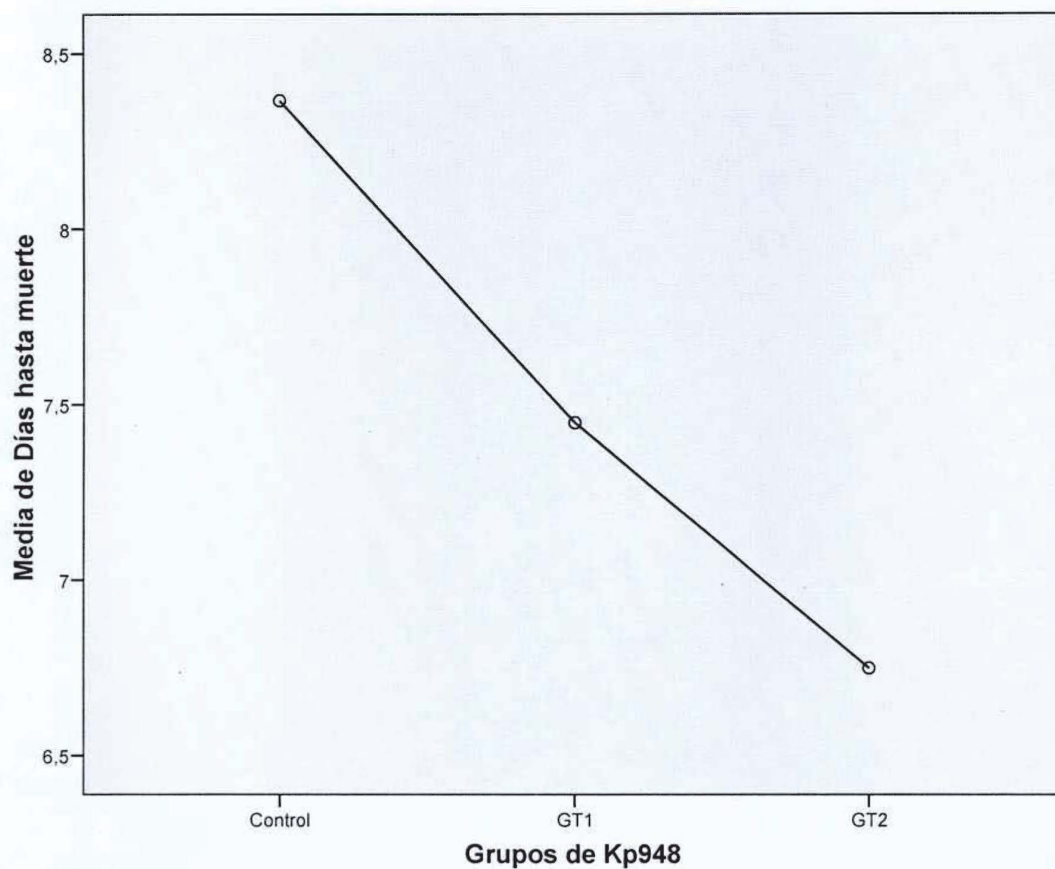
	N	Media	t	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
Contro l	60	8,37	1,886	,244	7,88	8,85	5	13
GT1	60	7,45	1,651	,213	7,02	7,88	4	11
GT2	60	6,75	1,480	,191	6,37	7,13	4	10
Total	180	7,52	1,798	,134	7,26	7,79	4	13

Tabla.2 Tabla de días hasta la muerte: La tabla muestra el número de gusanos utilizados en cada grupo, la media de cada grupo de gusanos,, la desviación típica, que informa de la media de distancias que tienen los datos respecto de su media aritmética (dispersión de los datos) , el error típico o error de la muestra, los intervalos de confianza dentro de los que se sitúan el parámetro poblacional de los gusanos a estimar . El minimo, es el día en que empezaron a morir los gusanos y el maximo, es el día hasta el cual llegaron vivos los gusanos.

Los datos analizados revelaron que la cepa de gusanos KP 948 tuvo una vida media total de 7.52 (7días, 12 horas). Para los gusanos control la vida media es de 8.37 días (que corresponde a 8 días 8 horas), siendo menores los valores de vida media obtenidos para los gusanos sometidos a RNAi contra los genes F26H9.8 (GT1) y F48E3.3 (GT2). La vida media calculada para los gusanos sometidos a silenciamiento génico contra el gen F26H9.8 (GT1) fue de 7.45 días (corresponde a 7 días y 11 horas); siendo 1 día menor que la vida media de los gusanos control. Para los gusanos sometidos a silenciamiento génico contra el F48E3.3 (GT2) el valor obtenido fue

de 6.75 días (6 días, 18 horas) tocando la curva antes y con 1 día y 14 horas de diferencia con respecto al control. Otras observaciones que acompañan los resultados de vida media: a) el día en que los gusanos comienzan a morir (los gusanos sometidos a silenciamiento génico para ambos genes F26H9.8 y F48E3.3 empezaron a morir a partir del día 4 y los gusanos control 24 horas después) b) el día en que se observa la tasa más alta de mortalidad. El día 8 se observó la tasa más alta de mortalidad para los gusanos control, a diferencia de lo observado para los gusanos sometidos a silenciamiento génico los genes F26H9.8 y F48E3.3 para los cuales este evento ocurrió 24 horas antes, duplicando el número de gusanos muertos, c) Los gusanos control fueron capaces de sobrevivir 13 días y medio, frente a los 10 y 11 días de los gusanos silenciados con nuestros genes de interés.

Gráfico de las medias



- **Fig. 34** En este gráfico de medias, podemos ver más claramente que las medias de sobrevivencia de los tres grupos, de gusanos Control (vector vacío), GT1 (F26H9.8) y GT2 (F48E3.3) son muy diferentes.

Como queríamos comparar nuestros tres grupos de gusanos en una variable cuantitativa, se realizó el análisis de varianza (Anova) de un factor. Así pudimos determinar que los tres grupos difieren en sus medias (Fig.34)

Prueba de homogeneidad de varianzas

Días hasta muerte

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
1,840	2	177	,162

ANOVA

Días hasta muerte

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	78,878	2	39,439	13,960	,000
Intra-grupos	500,033	177	2,825		
Total	578,911	179			

Tabla 3 Anova: Cuantificación de las fuentes de variación, los grados de libertad asociados a cada suma de cuadrados y el valor adoptado por cada estimador de varianza poblacional de gusanos.

El cociente entre estas dos medias cuadráticas nos proporcionaron el valor de F (13.960) el cual se acompaña de su nivel crítico o nivel de significación (<0.001). Puesto que es menor de 0.05 decimos rechazar la hipótesis de igualdad de las medias o varianzas y

concluimos que nuestra población de gusanos KP 948 no poseen el mismo valor medio.

Ya que el F se mostró significativo, se emplearon las prueba post Hoc para evaluar las diferencias entre las medias de nuestros tres grupos de gusanos (control, GT1 y GT2) y establecer en que grupos de gusanos se encuentran estas. Utilizamos Games-Howell ya que la distribución de nuestra muestra no era muy simétrica como lo vemos en la figura del box-plot

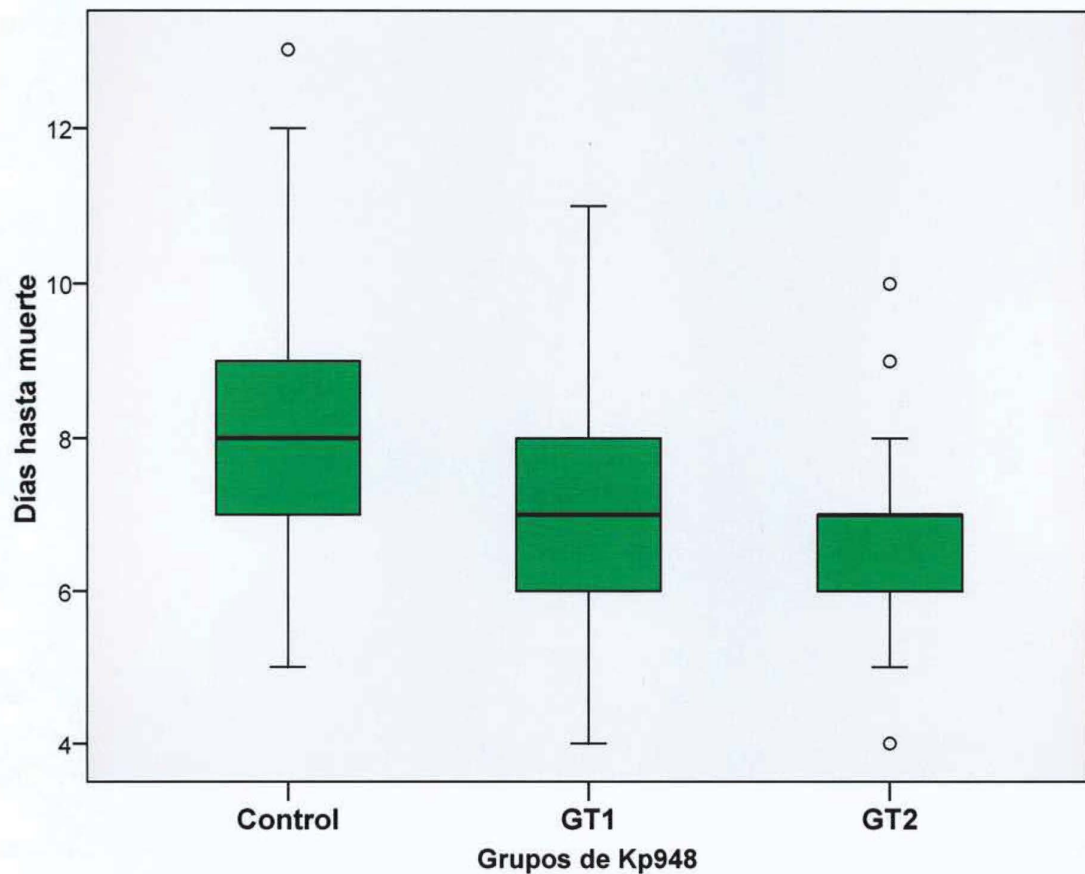


Fig. 35 Box-plot. Se visualiza el conjunto de datos de nuestras

tres poblaciones de gusanos. (Control, GT1, GT2). Vemos la asimetría de las muestras y la indicación de la mediana para cada muestra. Nos marca algunos datos atípicos fuera del intervalo.

Pruebas post hoc

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: Días hasta muerte

	(I) Grupos de Kp948	(J) Grupos de Kp948	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite superior	Límite inferior
Games- Howell	Control	GT1	,917(*)	,324	,015	,15	1,69
		GT2	1,617(*)	,310	,000	,88	2,35
	GT1	Control	-,917(*)	,324	,015	-1,69	-,15
		GT2	,700(*)	,286	,042	,02	1,38
	GT2	Control	-1,617(*)	,310	,000	-2,35	-,88
		GT1	-,700(*)	,286	,042	-1,38	-,02
t de Dunnett (bilateral)(a)	GT1	Control	-,917(*)	,307	,006	-1,60	-,23
	GT2	Control	-1,617(*)	,307	,000	-2,30	-,93

- La diferencia de medias es significativa al nivel .05.

Tabla. 4 Las pruebas t de Dunnett tratan un grupo como control y lo compara con todos los demás grupos. Esta prueba nos permite calcular el error típico, el valor de significancia y los intervalos de confianza.

Los resultados obtenidos mediante la prueba de Games-Howell nos muestran que P o valor de significancia entre el control y nuestro

grupo de gusanos GT2 (F48E3.3) es altamente significativo con un P menor de 0.001. El valor obtenido en la comparación entre el control y GT1 (F26H9.8) tiene una diferencia significativa de 0.015. El valor P obtenido entre GT1(F48E3.3) y GT2 (F26H9.8) es de 0.042, lo que nos sugiere que existen diferencias entre los grupos de gusanos silenciados con los target de los genes F48E3.3 y F26H9.8. De acuerdo a los resultados obtenidos en los valores de significancia muestran que los gusanos silenciados para el gen GT2 fueron los gusanos más afectados de los tres grupos.

Control de primer orden: kp948

Control-GT1

Medias y medianas del tiempo de supervivencia

Grupos de Kp948	Media(a)				Mediana			
	Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%		Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior			Límite inferior	Límite superior
Control	8,367	,244	7,889	8,844	8,000	,273	7,465	8,535
GT1	7,450	,213	7,032	7,868	7,000	,179	6,648	7,352
Global	7,908	,167	7,582	8,235	8,000	,179	7,650	8,350

a La estimación se limita al mayor tiempo de supervivencia si se ha censurado

Tabla 5 Vemos las diferencias entre las medias y las medianas de sobrevivencia en los grupos Control (vector solo) y GT1 (F26H9.8), sus estimaciones, error típico de intervalos de confianza

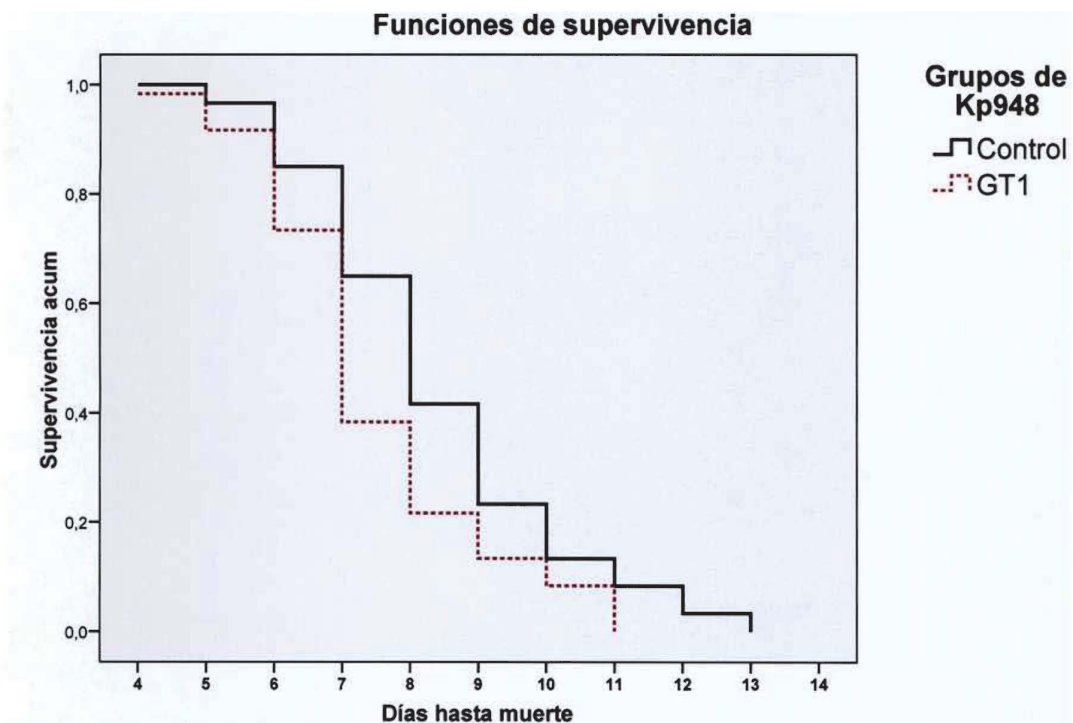


Fig. 36 Comparación grafica de las curvas de sobrevida entre gusanos pertenecientes al grupo Control y gusanos pertenecientes al grupo GT1(F26H9.8)

Mediana del tiempo de supervivencia.

Controles de primer orden		Tiempo med.
Grupos de Kp948	Control	8,37
	GT1	7,45

Tabla.6 La tabla muestra la media entre el grupo GT1 y el grupo control.

Control-GT2

Medias y medianas del tiempo de supervivencia

Grupos de Kp948	Media(a)				Mediana			
	Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%		Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior			Límite inferior	Límite superior
Control	8,367	,244	7,889	8,844	8,000	,273	7,465	8,535
GT2	6,750	,191	6,375	7,125	7,000	,149	6,708	7,292
Global	7,558	,171	7,223	7,894	7,000	,160	6,686	7,314

a La estimación se limita al mayor tiempo de supervivencia si se ha censurado.

Tabla 7 Vemos las diferencias entre las medias y las medianas de supervivencia de los grupos Control (vector solo) y GT2 (F48E3.3), sus estimaciones, error típico, intervalos de confianza

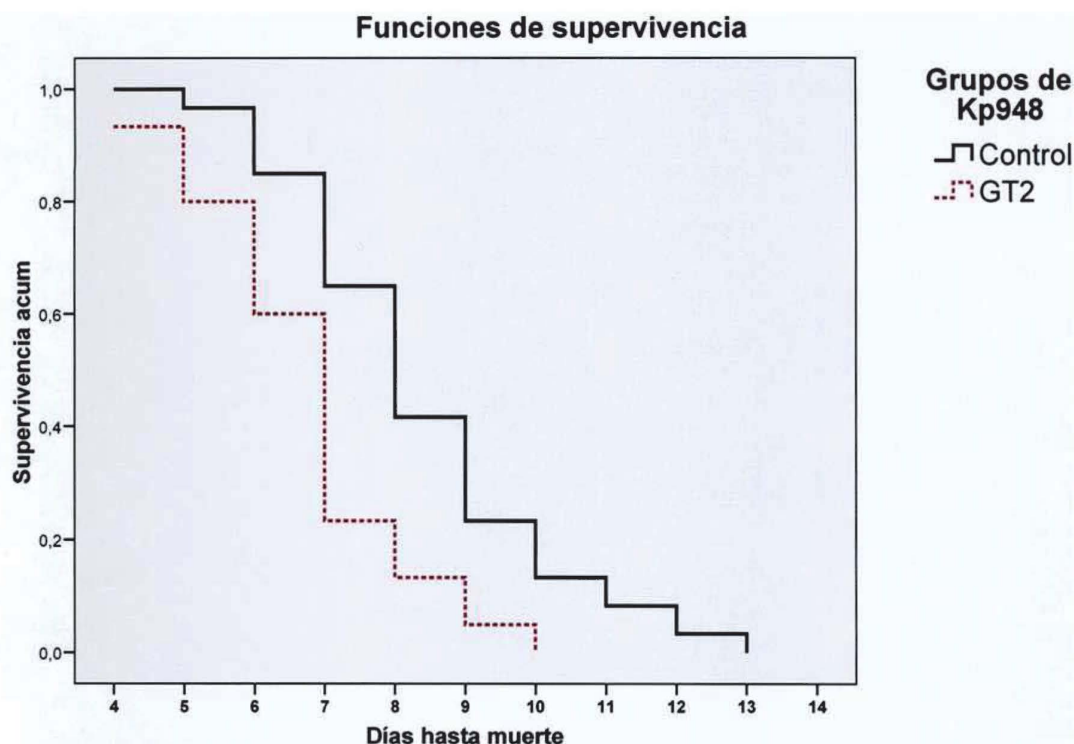


Fig. 37 Comparación grafica de las curvas de sobrevida entre gusanos pertenecientes al grupo Control y gusanos pertenecientes al grupo GT2 (F48E3.3).

Mediana del tiempo de supervivencia

Controles de primer orden		Tiempo med.
Grupos de Kp948	Control	8,37
	GT2	6.75

Tabla. 8 La tabla muestra la media entre el grupo GT2 y el grupo control.

GT1-GT2

Medias y medianas del tiempo de supervivencia

Grupos de Kp948	Media(a)				Mediana			
	Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%		Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior			Límite inferior	Límite superior
GT1	7,450	,213	7,032	7,868	7,000	,179	6,648	7,352
GT2	6,750	,191	6,375	7,125	7,000	,149	6,708	7,292
Global	7,100	,146	6,814	7,386	7,000	,118	6,769	7,231

a La estimación se limita al mayor tiempo de supervivencia si se ha censurado.

Fig. 9 Vemos las diferencias entre las medias y las medianas de supervivencia de los grupos GT1 (F26H9,8) y GT2 (F48E3.3) , sus estimaciones, error típico, intervalos de confianza

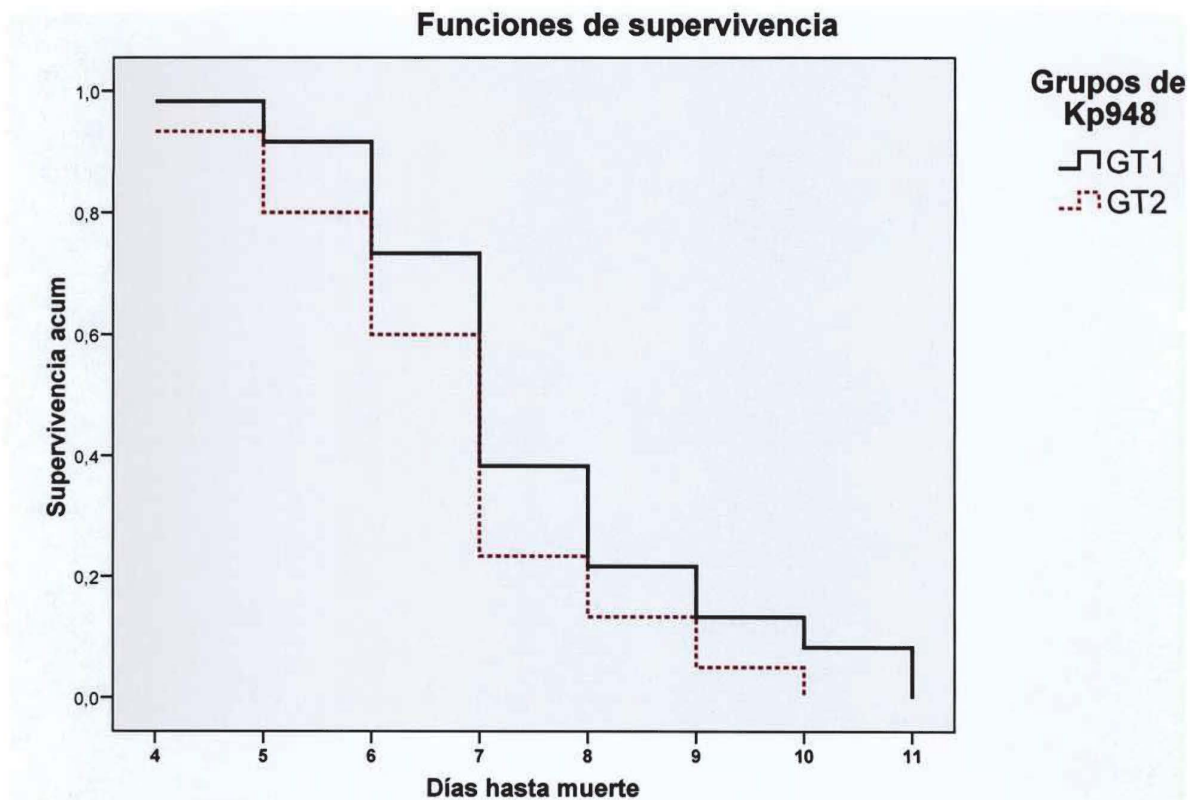


Fig. 38 Comparación grafica de las curvas de sobrevivencia entre gusanos pertenecientes al grupo GT1 (F26H9,8) y gusanos pertenecientes al grupo GT2 (F48E3.3).

Mediana del tiempo de supervivencia

Controles de primer orden		Tiempo med.
Grupos de Kp948	GT1	7,45
	GT2	6.75

Tabla.10 La tabla muestra la media entre el grupo GT1 y el grupo GT2.

Después de analizar en detalle la prueba de Games-Howell podemos afirmar que existen diferencias significativas entre los tres grupos de

gusanos, siendo la diferencia más importante *C.elegans* la encontrada en la comparación de las medianas obtenidas entre el Control y GT2 (F48E3.3).

Como los resultados obtenidos en los ensayos de supervivencia mostraron una disminución en la expectativa de vida se analizaron otros parámetros relacionados con la supervivencia y el envejecimiento.

4.3 Body bends

La locomoción de *C.elegans* es uno de los aspectos más complejos de la fisiología del gusano, ya que puede reorientar su dirección debido a su locomoción delantera y reversa. Este movimiento sinusoidal del gusano típico de hermafroditas jóvenes, se ve disminuido y poco coordinado en los gusanos hermafroditas viejos.



Fig.39 Crecimiento en placas de NGM de los gusanos control, GT1 (F26H9,8) y GT2 (F48E3.3)

En experimentos preliminares, se observó que los gusanos tratados con RNAi, reducían la motilidad con el transcurso de los días de forma más notable que los gusanos control. Por ello, se empezaron a examinar los efectos que la depleción de nuestras proteínas causaban sobre la movilidad del gusano midiendo los movimientos graduales de su cuerpo.

Se utilizaron dos aproximaciones para medir los *body bends* del gusano;

- Se cuantificaron los movimientos del cuerpo del nematodo. Se determinó el número de curvaturas del cuerpo que realiza el gusano (*body bends*) en 30 segundos, por un periodo total de 8 minutos a través de un microscopio. Se incluyeron 60 gusanos en cada grupo y se calculó la media y el error para cada grupo durante once días. Para este día todos los gusanos incluidos en los grupos de GT1 y GT2 se habían muerto y los pocos gusanos del grupo control que se encontraban vivos eran casi inmóviles.
- Se observaron los gusanos y se definieron dentro de las categorías propuestas por Ozono, Herndon y Huang (46).

Categorías:

Clase A (Herndon) o tipo I (Hosono): Los animales progresan con movimientos de ritmo sinusoidal

Clase B (Herndon) o tipo II (Hosono) Gusanos no coordinados y poco activos

Clase C (Herndon) o tipo III(Huang) Gusanos incapaces de avanzar, solo mueven la cabeza o cola espontáneamente y responden al tacto con el pick.

Los resultados obtenidos se muestran en la Fig 40

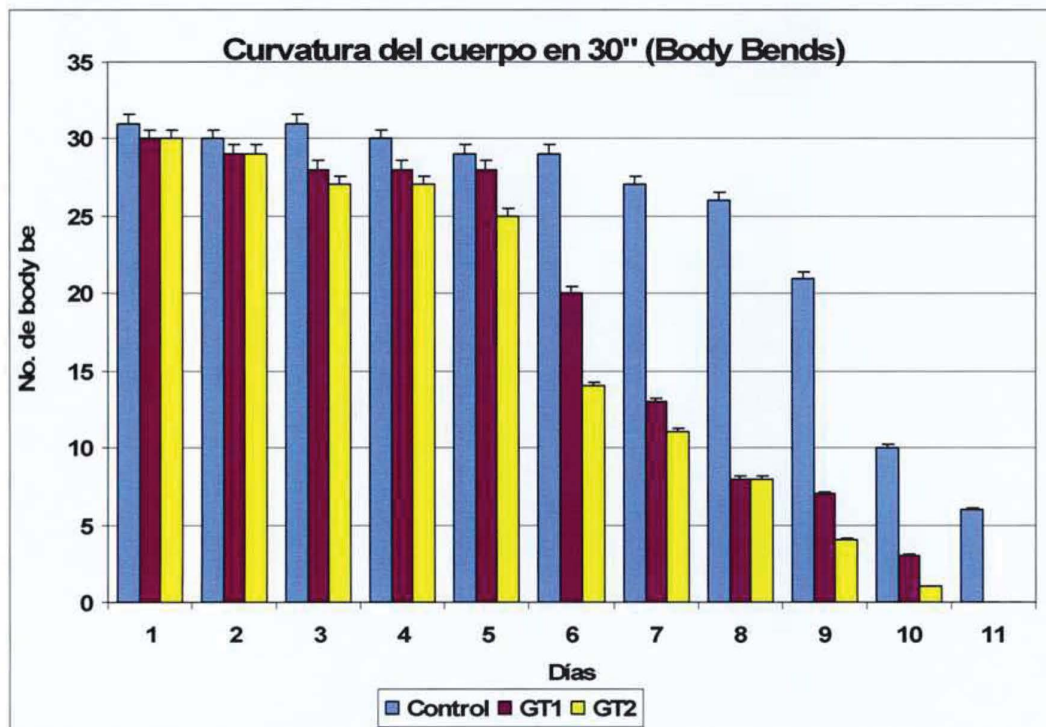


Fig.40 Número de curvaturas del cuerpo de *C.elegans* en 30 segundos para los gusanos control, gusanos silenciados para los genes GT1 (F26H9,8) y GT2 (F48E3.3). Los valores obtenidos fueron medidos en períodos de 30 segundos por 8 minutos, con intervalos de 30 minutos entre cada medición durante 11 días.

	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8	Día 9	Día 10	Día 11
Control	31	30	31	30	29	29	27	26	21	10	6
GT1	30	29	28	28	28	20	13	8	7	3	0
GT2	30	29	27	27	25	14	11	8	4	1	0

Tabla.11 Se muestra las medias de las curvaturas del cuerpo para cada día, en cada grupo de gusanos control, GT1 y GT2

Se observó una disminución en la movilidad de los gusanos del grupo control con el transcurso de los días de acuerdo a lo esperado como consecuencia del envejecimiento normal de los mismos. La disminución en la movilidad de los gusanos en los que se habían silenciado los genes GT1 (F26H9,8) y GT2 (F48E3.3) fue mayor, siendo muy marcado el efecto observado cuando se depletó la proteína codificada por el gen GT2. Los gusanos incluidos en este grupo comenzaron a presentar un número notablemente menor de *body bends* a partir del día 6 y la frecuencia de sus movimientos para ese día fue reducida en un 52% con respecto al control. Sin embargo, la categoría de su movimiento corresponde aún a la categoría clase I. Resultados similares se obtuvieron para los gusanos GT1, con una reducción del 35%. A partir del día seis, la dificultad motora de los gusanos GT1 y GT2 aumentó bruscamente, siendo significativamente mayor en los gusanos GT2. Hacia el día ocho los gusanos GT1 y GT2 además de mostrar cambios significativos en su locomoción presentan características típicas de envejecimiento. En

un 20% de estos gusanos se vio la característica tipo III descrita anteriormente, moviéndose solo después de ser estimulados con el pick o anza.

Los gusanos del grupo control, comenzaron a presentar los defectos en la motilidad correspondientes a los esperados para un gusano envejecido a partir del día 9, en el caso de los gusanos GT1 y GT2 la disminución en la movilidad se inició con 3 días de anticipación. Esta observación podría considerarse como un síntoma de envejecimiento prematuro. La dificultad en la realización del movimiento sería una consecuencia secundaria de la falta de las proteínas para las cuales sus genes han sido silenciados y esta carencia produciría que algún proceso fisiológico no se lleve a cabo correctamente produciendo alguna alteración en el ciclo celular.

Estos resultados muestran una vez más que la disminución en los movimientos del gusano están relacionados con la disminución de la probabilidad de sobrevivir y que la depleción de estas proteínas (GT1 (F26H9.8) y GT2 (F48E3.3)) reducen la capacidad de contracción muscular en el gusano, o se afecta el funcionamiento del sistema nervioso, iniciándose un proceso de envejecimiento temprano.

Para comprobar la existencia de diferencias en la movilidad entre los tres grupos, se realizó la prueba del Test de Student.

Hipótesis nula o H_0 = No hay diferencias en los movimientos de los *C. elegans* entre el grupo control, GT1 y GT2 .

La hipótesis que quiero contrastar es $H_0 = H_{GT1} = H_{GT2} = 0$.

Utilizo para comparar las medias de los distintos grupos y si esta diferencia es al azar o no es significativa, mi nivel de significancia P será mayor a 0.05.

	Media	Desvío estándar	T Student
Control	26.9	5.2	C-GT1= 0.03
GT1	19.4	11.7	GT1-GT2= 0.74
GT2	15.9	12.0	C-GT2= 0.01

Tabla.12 En la tabla vemos las diferencias entre las medias, el desvío estándar y el test de student.

Los valores de p obtenidos en el test de student cuando se comparan el grupo de gusanos control contra GT1 (F26H9.8) y el grupo de gusanos control contra GT2 (F48E3.3) son menores a 0.05 por lo tanto puedo rechazar la hipótesis nula (H_0), indicando que existen diferencias significativas en la movilidad que presentan los gusanos del grupo Control y los gusanos del grupo -GT1 (F26H9.8) y GT2 (F48E3.3). Por otro lado, el valor de p obtenido cuando se compararan los grupos de gusanos GT1 y GT2 es mayor a 0.05 indicando que no existen diferencias significativas entre los grupos de GT1 y GT2. En este ensayo de silenciamiento génico para estos dos genes no se observa la existencia de dos grupos distintos, pero

si, ambos resultan significativamente diferentes con respecto al grupo control de *C.elegans*.

Cambios morfológicos observados en la estructura de los gusanos relacionadas al envejecimiento prematuro

Al examinar gusanos sometidos a silenciamiento génico para ambos genes al microscopio, se observaron severas alteraciones morfológicas como la aparición de pequeñas vacuolas en el intestino a partir del día 6, el número de las mismas fue incrementándose al pasar de los días (Fig.41) así como necrosis en el intestino que aparece con un color mucho más oscuro y la aparición de vulvas protruyentes y posteriormente la exclusión del intestino fuera del cuerpo del gusano.

En la figura 41 se muestran algunos de los cambios morfológicos mencionados, la aparición de vacuolas y el oscurecimiento del intestino en un gusano sometido a silenciamiento génico contra el GT1.

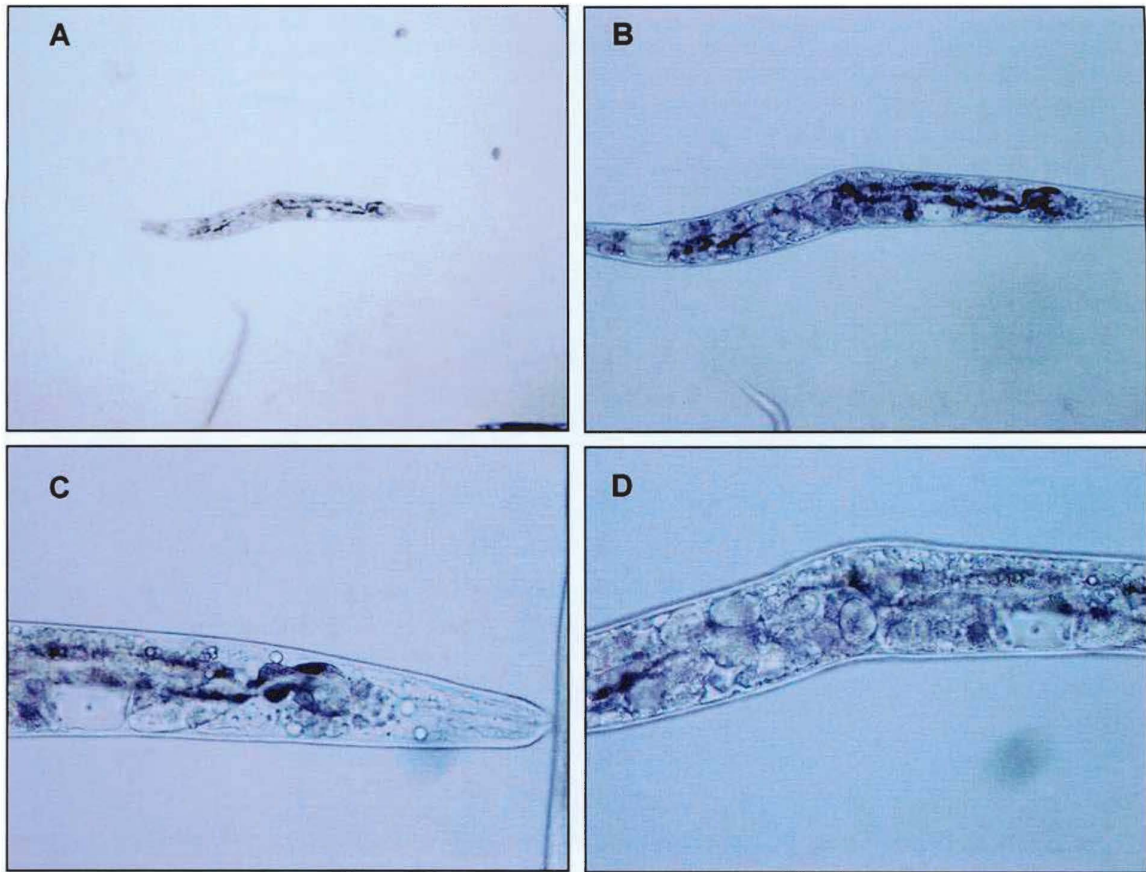


Fig 41 Cambios morfológicos observados. Panel A gusano entero. B y C detalles del gusano donde se observan vacuolas en el intestino y la faringe, Panel D Detalle donde se ven las vacuolas y la descomposición general del tejido del intestino en un gusano sometido a silenciamiento génico para el GT1.

Acumulación de lipofusina.

Otra de las características asociadas al envejecimiento es la acumulación de lipofusina (este compuesto es fluorescente) en depósitos lisosomales a través del tiempo como resultado de la degradación oxidativa y la autofagocitosis de componentes celulares (47) La acumulación de la lipofusina genera un incremento en la autofluorescencia que presentan los gusanos.

Se observaron gusanos del grupo control, grupo GT1 y grupo GT2 a los tres, seis y nueve días de iniciado el experimento de silenciamiento génico en microscopio de fluorescencia.

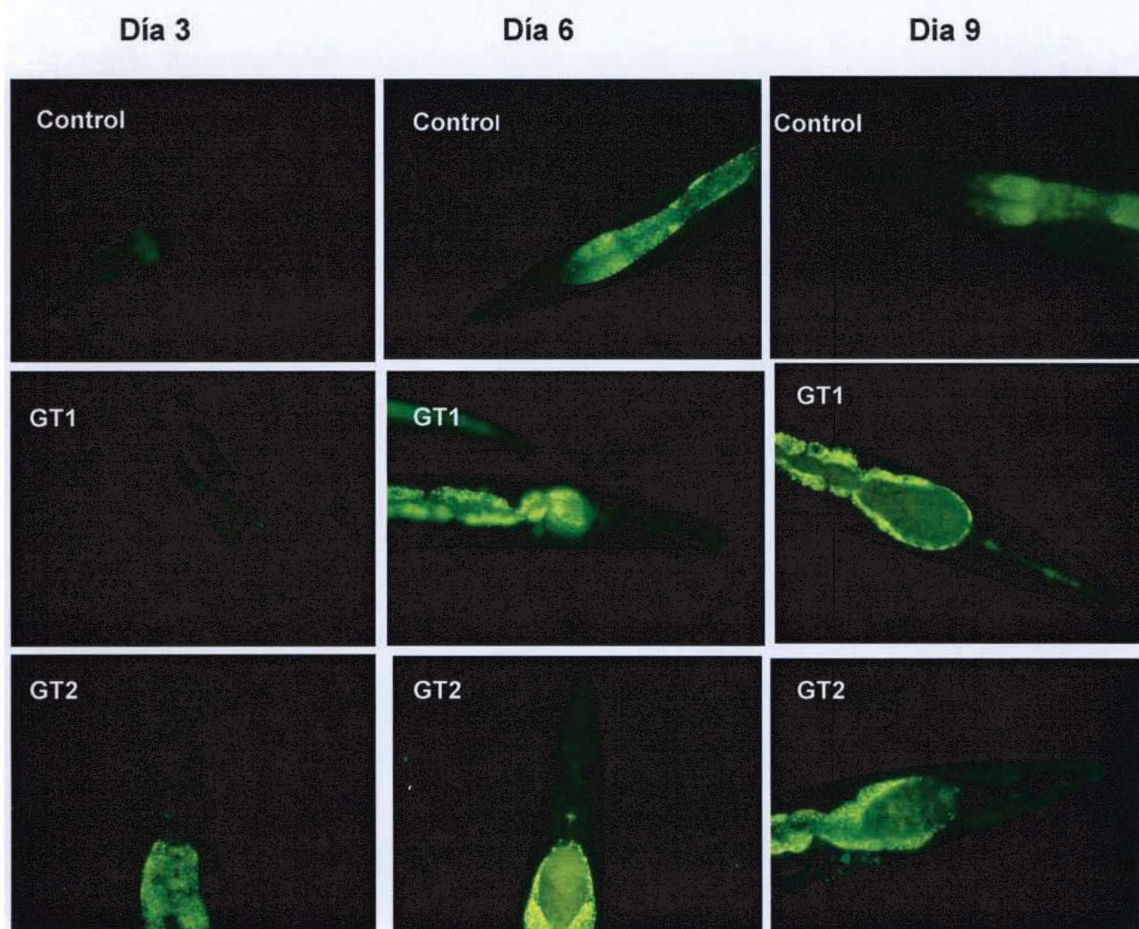


Fig 42 Acumulación de lipofusina autofluorescente con la edad. Se fotografiaron en idénticas condiciones gusanos pertenecientes al grupo control, grupo GT1 y grupo GT2 a los 3, 6 y 9 días después de iniciado el experimento de silenciamiento génico. Detalle de las región correspondiente a la faringe.

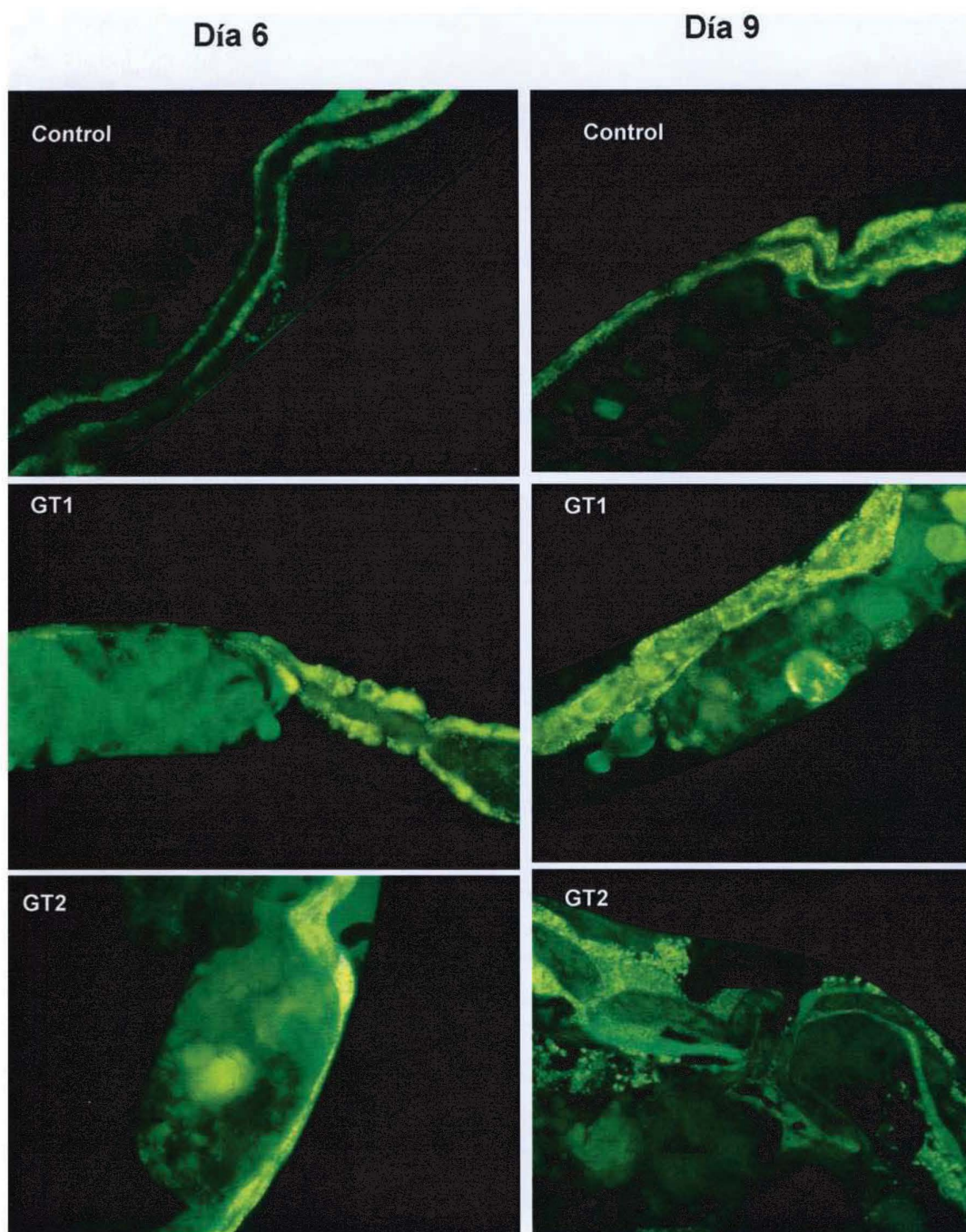


Fig.43 Acumulación de lipofusina autofluorescente con la edad. Se fotografiaron en idénticas condiciones gusanos pertenecientes al grupo control, grupo GT1 y grupo GT2 a los 6 y 9 días después de iniciado el experimento de silenciamiento génico. Detalle de la región correspondiente al intestino.

Los gusanos fueron fotografiados en las mismas condiciones en todos los casos y se observó una acumulación más rápida de lipofusina en los gusanos de los grupos GT1 (F26H9,8) y GT2 (F48E3.3). En el día 3 la autofluorescencia en el grupo de los gusanos control y GT1 es casi indetectable, mientras que ya se observa acumulación de lipofusina importante en los gusanos del grupo GT2 en la faringe. La acumulación de lipofusina continuó con el transcurso de los días mostrando fuertes diferencias de autofluorescencia entre el grupo control y los grupos GT1 y GT2 en la región de la faringe y del intestino, que para el día 9 presenta además diferencias anatómicas. El intestino se ha deformado y en algunos gusanos ya se ha expulsado hacia el exterior. (ver explicación y figura 4.5.6 en la sección siguiente)..

Alteraciones morfológicas en la estructura de la faringe y el intestino del gusano.

Otras características importantes que se observaron en los gusanos de los grupos GT1 (F26H9,8) y GT2 (F48E3.3) pero notablemente incrementado en los gusanos del grupo GT2, fueron a) la desconexión progresiva entre el intestino y la faringe y b) la necrosis y degradación del intestino. A partir del día 6 después de iniciado el experimento de silenciamiento génico se comienza a apreciar la aparición de vacuolas en el intestino y progresivas

alteraciones en la apariencia y la estructura del mismo. El intestino comienza a plegarse sobre si mismo, se observan regiones en las que se encuentra comprimido y otras en las que aparece distendido, este proceso culmina en muchos casos con la expulsión del mismo al exterior. Este proceso se acompaña por la desconexión progresiva entre el intestino y la faringe. Hacia el día 6 la faringe comienza a estrecharse al mismo tiempo que el tejido del intestino se pone mucho más oscuro (día 8). Luego comienza a observarse la degradación celular, y el intestino aparece degradado y sin estructura. Este fenotipo es característico de necrosis (48).

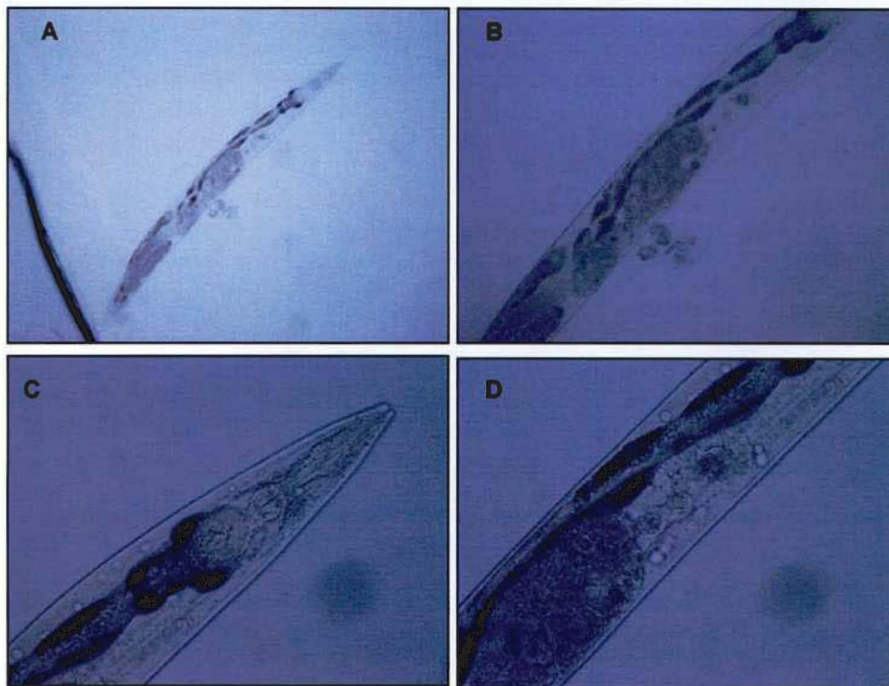


Fig. 44 Alteraciones presentes en el Intestino con características de necrosis en el grupo de *C.elegans* GT1. Panel A gusano entero. B detalle del intestino con estructura irregular. C detalle de la faringe con características de procesos necróticos. D intestino necrosado, aparición de vacuolas citoplasmáticas, destrucción de orgánulos y pérdida de funcionalidad de la membrana

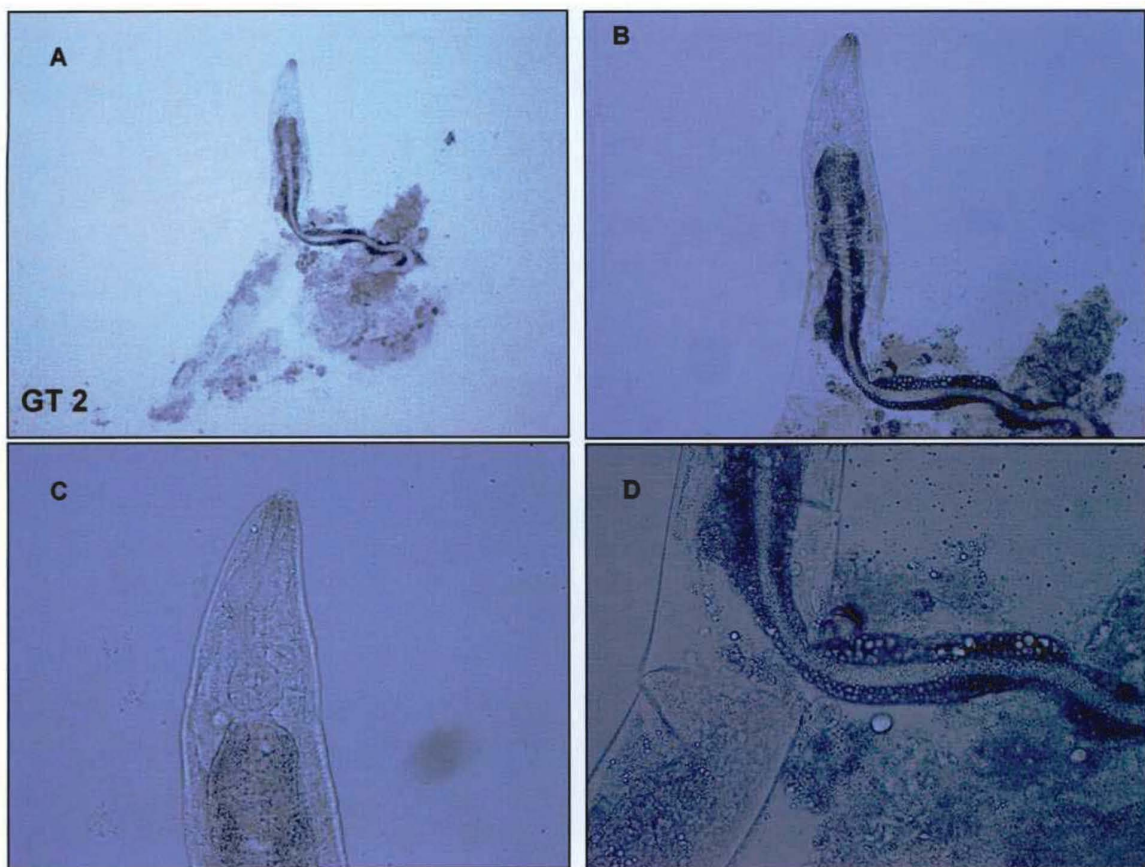


Fig.45 Alteraciones presentes en el Intestino con características de necrosis en el grupo *C.elegans* GT2, mostrando la faringe y el Intestino de un color negro y posteriormente fuera del cuerpo. Este fenotipo es característico de procesos necróticos.

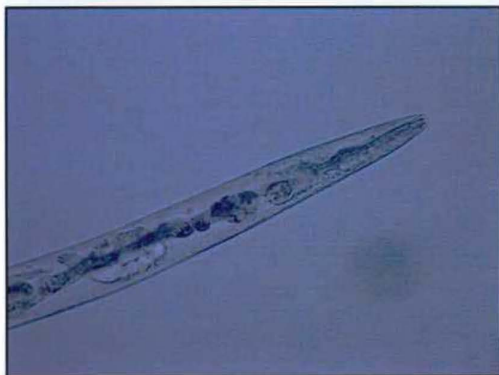


Fig. 46 Alteraciones presentes en gusanos del grupo GT2 mostrando desprendimiento del intestino. Este fenotipo necrótico se debió a situaciones de estrés fisiológico no resuelto por defecto fenotípico.

Sarcopenia del gusano

Otra observación que acompaña el envejecimiento prematuro y que está relacionada con la falta de movilidad es la sarcopenia. Muchos factores están correlacionados con la sarcopenia como la injuria celular, estrés oxidativo, cambios endocrinos y potencial regenerativo reducido. En los días 9 y 10 los nemátodos se acompañaron de sarcopenia, debido al deterioro progresivo del tejido muscular.

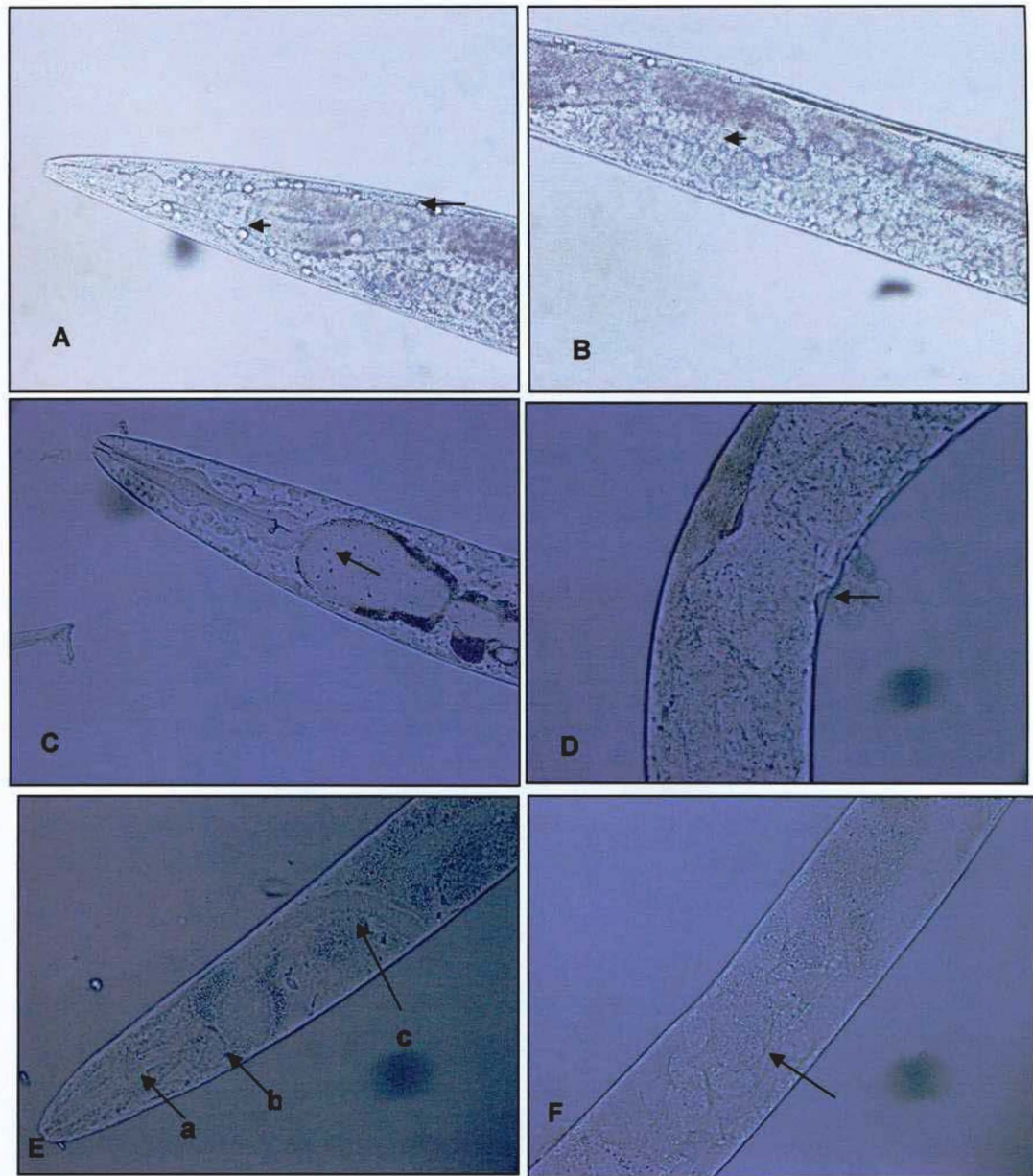


Fig.47 Sarcopenia presente en Gusanos KP 948. Paneles A y B. gusanos envejecidos del grupo control, con presencia de vacuolas citoplasmáticas. Panel C, detalle de la faringe de un gusano del grupo GT1 (F26H9,8) con características de sarcopenia y engrosamiento del intestino al finalizar la válvula faringea intestinal D. detalle de vulva del gusano y evidencia de la pérdida de la masa muscular . E. detalle de la faringe de un gusano del grupo GT2 (F48E3.3) con sarcopenia, (a) metacarpus irregular, (b) bulbo terminal engrosado, (c) desconexión del intestino. F detalle del intestino del gusano con órganos indiferenciados.

Se comenzó a poner a punto la coloración de faloidina para ver el contenido de los filamentos de actina y así terminar de observar la estructura de los grupos musculares los órganos afectados de los *C.elegans*.

Se realizó una tinción con Faloidina acoplada a FITC. Se observaron los microfilamentos de actina y se observaron múltiples cambios en la composición del gusano y una concentración muy alta de faloidina en los gusanos más viejos, debido al deterioro del músculo. La puesta a punto de la técnica no ha sido fácil y sigue siendo objeto de estudio en el laboratorio ya que no se pudo observar con un alto grado de definición la estructura de los grupos musculares.



Fig. 48 Coloración con faloidina de los gusanos pertenecientes al grupo control, grupo GT1 y grupo Gt2.

4.6 Efecto de la depleción de las proteínas GT1 y GT2 sobre la puesta de huevos:

C.elegans se auto-fertilizan, producen esperma, el cual se almacena en la espermateca y luego los oocitos. En el primer día del paso L4/adulta hermafrodita, se acumulan los huevos fertilizados en el útero. Una hermafrodita adulta tiene por lo general entre diez y quince huevos en el útero al mismo tiempo ubicados en forma ordenada..

En este experimento quisimos observar el efecto de la depleción de nuestras proteínas de interés en la puesta de huevos de *C.elegans* KP948. Para ello, los gusanos fueron seguidos durante 8 días, y mantenidos a una temperatura constante de 18°C. en placas de NGM en condiciones similares a las utilizadas en el experimento de silenciamiento génico. La progenie fue controlada diariamente y se contaron el número de huevos puestos en cada placa. En el histograma se representa el promedio de huevos puestos por gusano en tres experimentos independientes con un n=60 cada experimento, en gusanos del grupo control, grupo GT1 y grupo GT2 donde 0 corresponde a gusano estadio L4.

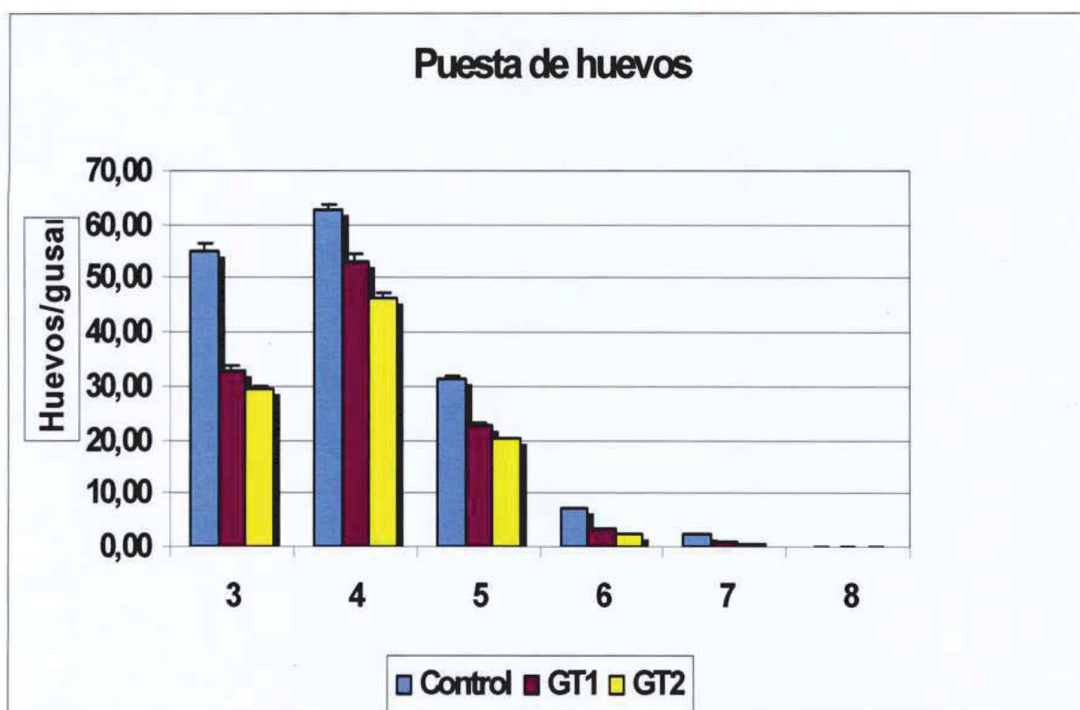


Fig 49 Puesta de huevos: La figura muestra la media y el error de los huevos puestos por gusano por día hasta terminar el ciclo reproductivo. Se observó una disminución en el tamaño de la puesta de huevos de un 17 % para el grupo GT1 y de un 28% para el grupo GT2 con respecto al grupo control.

Días	1	2	3	4	5	6	7	8	TOTAL
Control	0,00	0,00	55,24	62,54	31,27	7,33	2,39	0,00	158,77
GT1	0,00	0,00	32,63	53,08	22,66	3,38	0,96	0,00	112,71
GT2	0,00	0,00	29,23	46,51	20,10	2,46	0,41	0,00	98,70

Tabla.13 La tabla muestra los valores obtenidos para las medias correspondiente a los valores de los huevos puestos por gusano durante 7 días.

La puesta de huevos de los gusanos GT1 (F26H9,8) y GT2 (F48E3.3) tuvo una disminución con respecto a los Control de 17 y 30 por

ciento respectivamente. Esta diferencia no se debe a la incapacidad de formar los huevos o embriones sino a la incapacidad de realizar la puesta correctamente, probablemente debido a algún efecto del silenciamiento génico sobre la estructura de los músculos que poseen una estructura afectada y no pueden realizar el movimiento involucrado en la puesta (Fig.50). Debemos tener en cuenta que para el día 1 en que empezaron a tener progenie y se empezaron a tener en cuenta para la estadística, los gusanos tratados tenían un retraso de crecimiento con respecto a los gusanos control. Los días tres y cuatro son los días donde los gusanos tratados tuvieron mayor producción de huevos y la diferencia con respecto al control fue de 41% para la GT1 (F26H9.8) y de 48% para la GT2 (F48E3.3). en el día tres la diferencia en la producción, fue de 16% en GT1 y 25% en GT2 con respecto a los Control.

Los días cinco y seis, los gusanos empiezan a disminuir notablemente la producción de huevos y hay una disminución significativa de huevos en los gusanos tratados

GT1 28 % en el día cinco y 54% en el día seis.

GT2 36% en el día cinco y 67 % en el día seis.

A partir del día cuatro del desarrollo del gusano, se empezaron a notar cambios en la morfología del gusano y la incapacidad de este, para poner los huevos. – Muchos de los gusanos eclosionaron dentro de la madre (fig.52)

Para comprobar la existencia de diferencias en la puesta de huevos entre los tres grupos, se realizó la prueba del Test de

Student. Hipótesis nula o H_0 = No hay diferencias en la puesta de huevos de *C. elegans* entre el grupo control, GT1 y GT2 .

La hipótesis que quiero contrastar es $H_0 = H_{GT1} = H_{GT2} = 0$.

Utilizo para comparar las medias de los distintos grupos y si esta diferencia es al azar o no es significativa, mi nivel de significancia P será mayor a 0.05.

	Media	Desvio standard	T Student
Control	1022.6	1497.7	C-GT1= 0.048
GT1	691.7	1200.9	GT1-GT2= 0.07
GT2	588.3	1060.5	C-GT2= 0.04

Tabla.14 En la tabla vemos las diferencias entre las medias, el desvío estándar y el test de student entre los grupos control, GT1 y GT2.

Los valores de p obtenidos en el test de student cuando se comparan el grupo de gusanos control contra GT1 (F26H9.8) y el grupo de gusanos control contra GT2 (F48E3.3) son menores a 0.05 por lo tanto puedo rechazar la hipótesis nula (H_0), indicando que existen diferencias significativas en la puesta de huevos que presentan los gusanos del grupo Control y los gusanos del grupo -GT1 (F26H9.8) y GT2 (F48E3.3). Sin embargo, el valor de p obtenido cuando se compararan los grupos de gusanos GT1 y GT2 es mayor a 0.05 indicando que no existen diferencias significativas entre los grupos de GT1 y GT2, donde esas diferencias en la media de puesta de

huevos se debieron al azar, pero si, ambos resultan significativamente diferentes con respecto al grupo control de *C.elegans*.

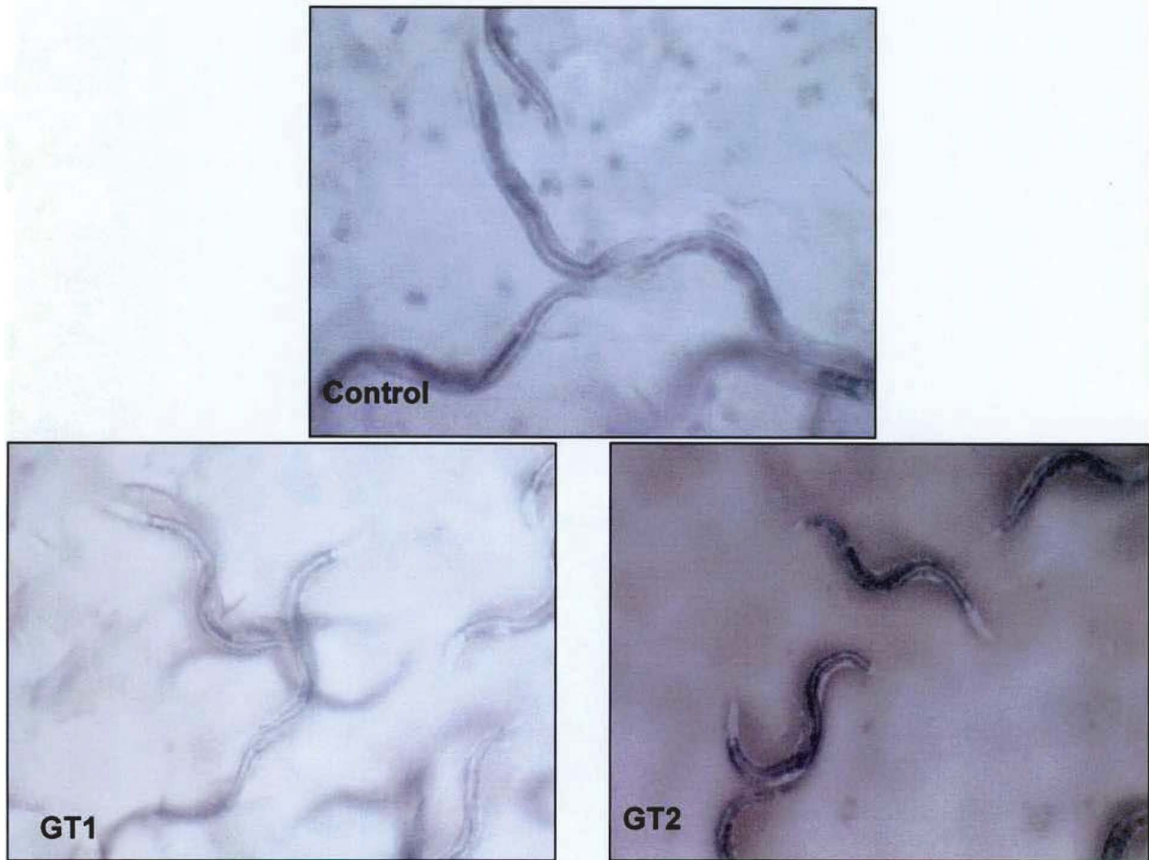


Fig.50 Crecimiento en placas de NGM de los gusanos control, GT1 (F26H9,8) y GT2 (F48E3.3) En el control se puede apreciar la evolución de los gusanos depositando sus nuevos huevos. En las otras dos fotos, se aprecian los gusanos GT1 y GT2 con menos puesta de huevos.

En los gusanos control se puede apreciar la evolución de la placa durante tres días. La F1 es capaz de crecer y depositar sus huevos.

En los gusanos pertenecientes al grupo GT1, hay menos progenie que en los Control y en el grupo GT2 esta diferencia es aun mayor

con respecto la progenie de la F1, es menor que en las anteriores, ya que muchos de los huevos aún no han sido puestos por las hembras hermafroditas.

Morfología de los huevos.

La morfología de los huevos puestos por los gusanos pertenecientes al grupo GT1 es normal, muy similares a los huevos puestos por el grupo control. La morfología de los huevos puestos por los gusanos pertenecientes al grupo GT2 se encuentra alterada, los mismos presentan una forma más redondeada, color más traslúcido y no han podido eclosionar. Esta morfología se observa en un porcentaje pequeño de los mismos..

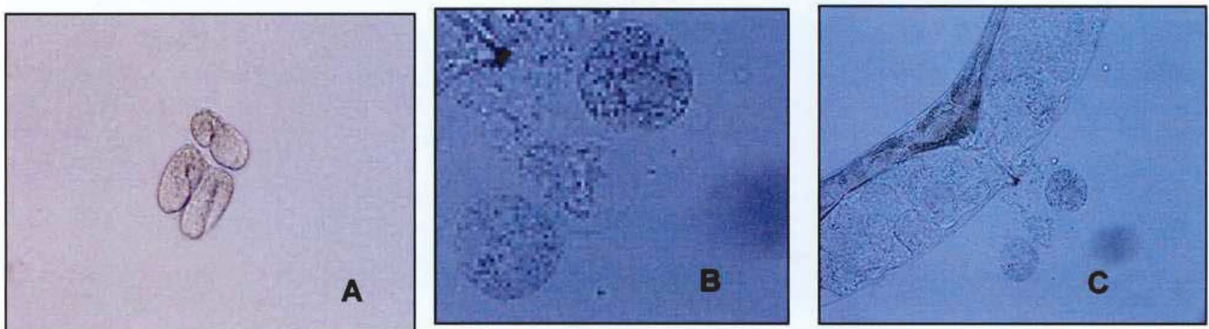


Fig. 51 (A) Huevos normales, (B) huevos anormales redondeados de GT2,(C) larva hermafrodita progenitora de huevos anormales.

La puesta de huevos en los gusanos pertenecientes al grupo GT2, es más lenta comparado con los gusanos control y van disminuyendo paulatinamente a medida que pasan los días. A partir del día cinco, se empezó a ver la incapacidad de las larvas grávidas

de los grupos GT1 y GT2, para poner sus huevos. En el interior de estas, se observan gran cantidad de huevos ocupando casi todo el cuerpo y un problema para expulsarlos, siendo acumulados al interior. Esto corresponde al denominado fenotipo egl (egg.laying abnormal). El egg-laying ocurre, cuando musculos especializados sexuales se contraen, abren la vulva y los huevos son expulsados. El comportamiento *Egg-laying* puede verse reducido dependiendo de cómo el animal controle el tiempo y la posición *espacial* para ese evento, el cual es regulado por el entorno, la entrada a la homeostasis o por la incapacidad para llevar a cabo este proceso. Este fenotipo se presentó con mayor frecuencia en los GT2 (49).

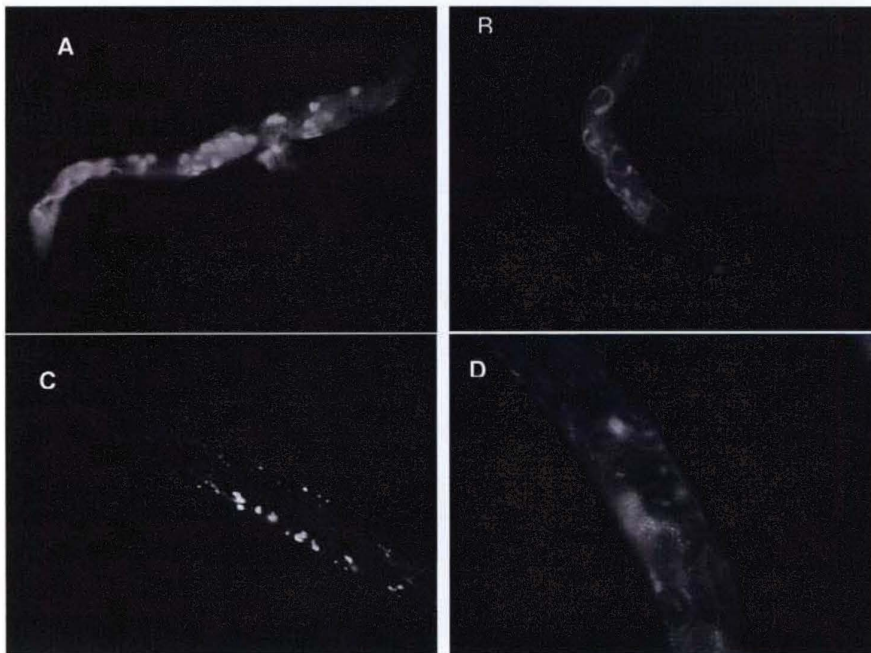


Fig.52 Alteraciones presentes en hembras hermafroditas observadas en microscopio de fluorescencia. (A) gusano con gran cantidad de huevos en todo el cuerpo y sin posibilidades de expulsión.(B) gusano del grupo GT1 con larvas eclosionando dentro de la madre.(C-D) gusanos pertenecientes al grupo GT2 con larvas eclosionando dentro de la madre.

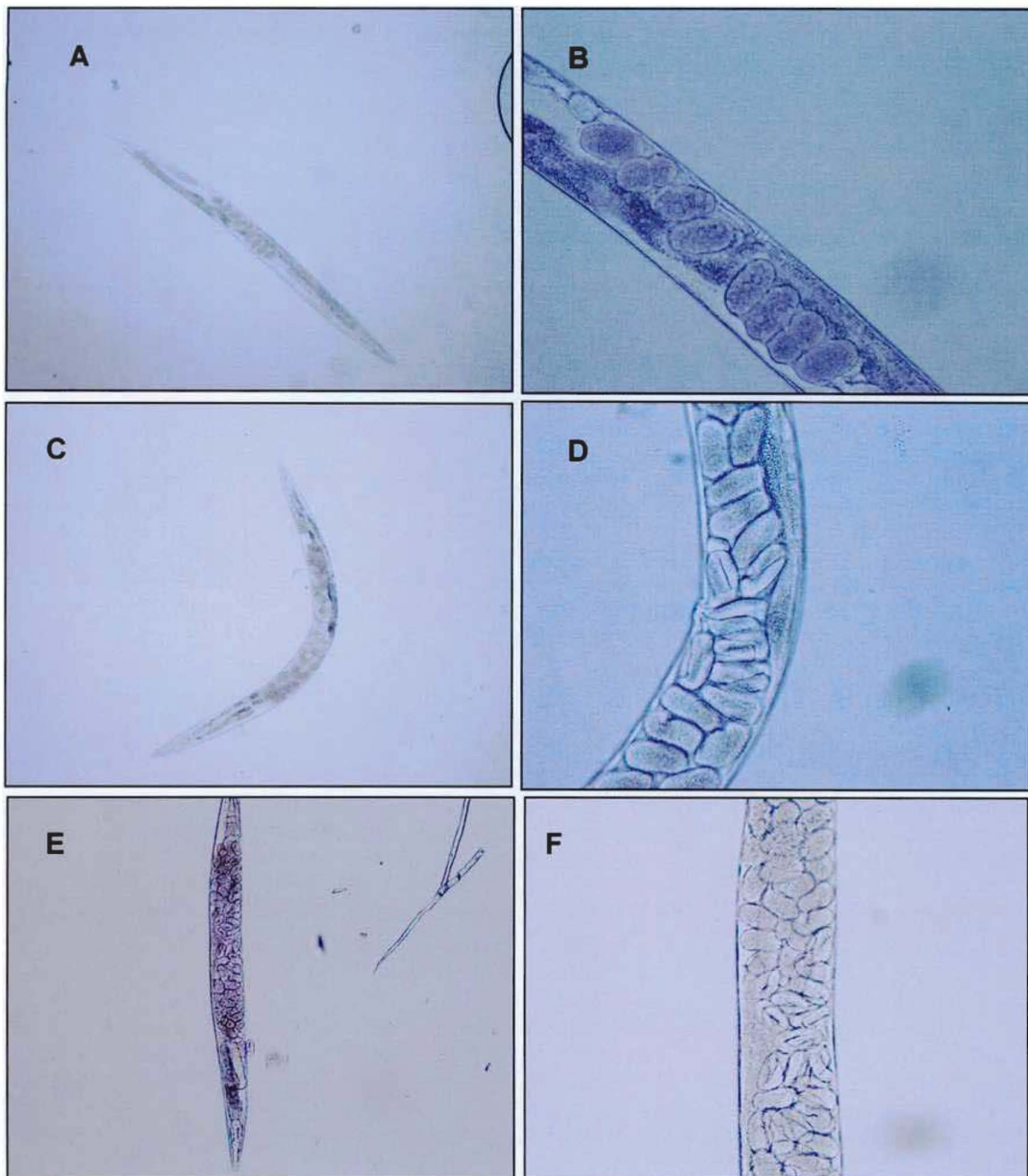


Fig.53 Hembras hermafroditas de *C.elegans* grávidas conteniendo huevos pertenecientes al grupo Control (A-B) y grupos GT1 (C-D) y GT2 (E-F) con gran acumulación de huevos en su interior, Detalle de las mismas mostrando la mayor cantidad de huevos y la disposición irregular de los mismos en su interior.

A medida que envejecían los gusanos pertenecientes a los grupos GT1 y GT2 se observó la acumulación de huevos en un número anormal y los mismos se encontraban guardando una disposición irregular. Los huevos pertenecientes a los gusanos del grupo control se encuentran ordenados y guardando una disposición regular y las hembras hermafroditas llegan al estadio de adulto envejecido sin huevos en su interior.. En la figura 4.6.5 se muestra la existencia de muchos huevos al interior de las gónadas del nematodo y en estadios en los cuales las hembras se debieran encontrar sin huevos. En algunas ocasiones se pudo observar que los huevos eclosionan en el interior del gusano (fig.52) debido a la incapacidad de este para expulsarlos o por el contrario el útero del gusano no resistió más la gran cantidad de huevos y sufrió un estallido (Fig. 54). Es importante señalar que no se detectó ese mismo efecto en gusanos del grupo control en ningún caso..

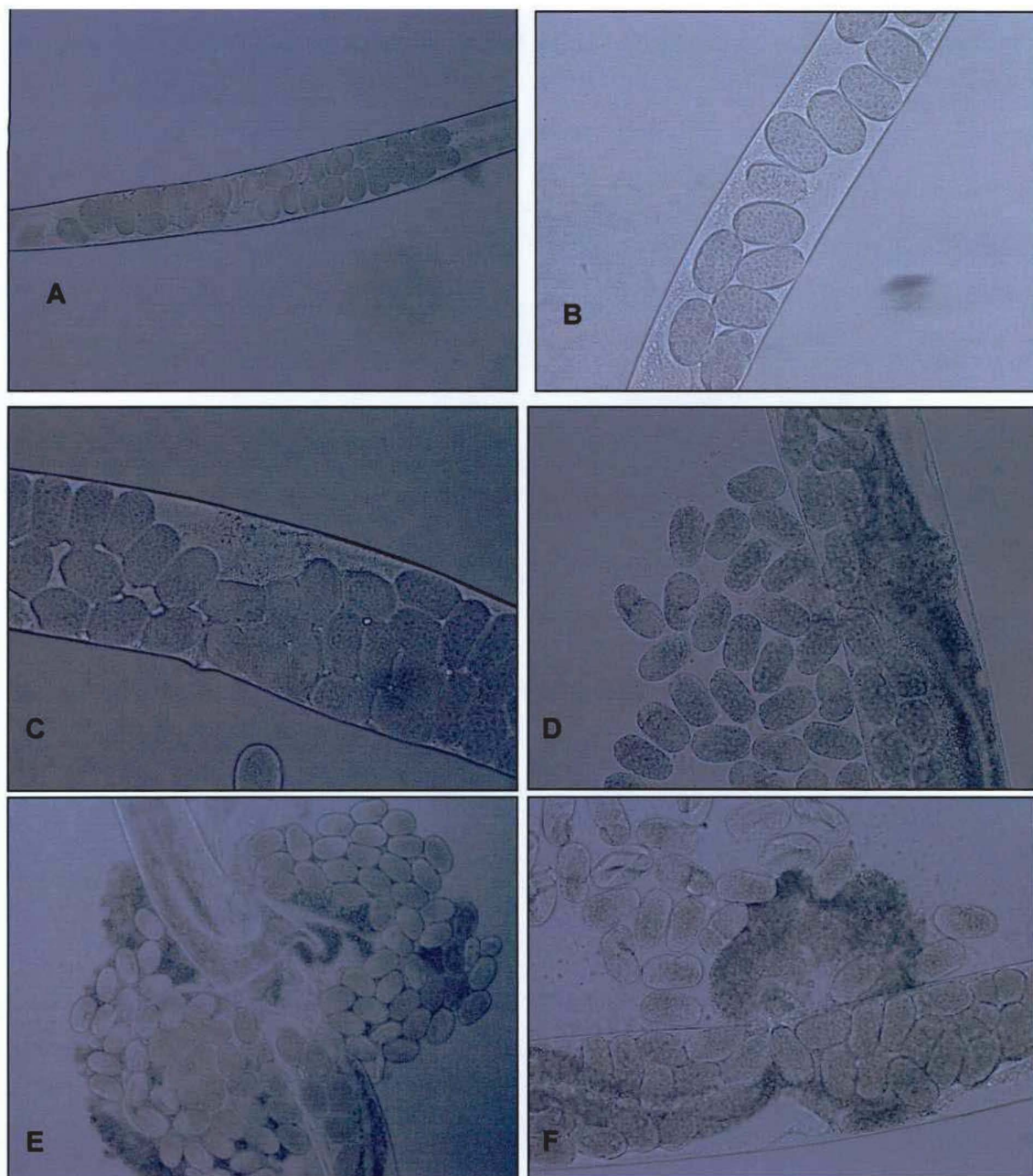


Fig. 54. (A-B) Hembras adultas grávidas del grupo control, (C-D) hembras adultas perteneciente al grupo GT1 en las que se observa gran acumulación de huevos y (E-F) pertenecientes al grupo GT2 en la cual se observa el estallido uterino.

Analisis de la progenie F1

A fin de analizar si la depleción de las proteínas codificadas por los genes GT1 y GT2 causaba alguna alteración en la velocidad de crecimiento o algún defecto en el desarrollo de los gusanos pertenecientes a dichos grupos se realizó un recuento de la descendencia o F1 y se observó la puesta de huevos, la eclosión y evolución de estos. Para ello se subdividió el período de observación en intervalos de tiempo de 1 día. En cada intervalo, se determinó para toda la población de gusanos en cual estadio de desarrollo se encontraba en ese momento. y se contaron con un contador de células los gusanos en las diferentes etapas larvarias para calcular el porcentaje de gusanos.

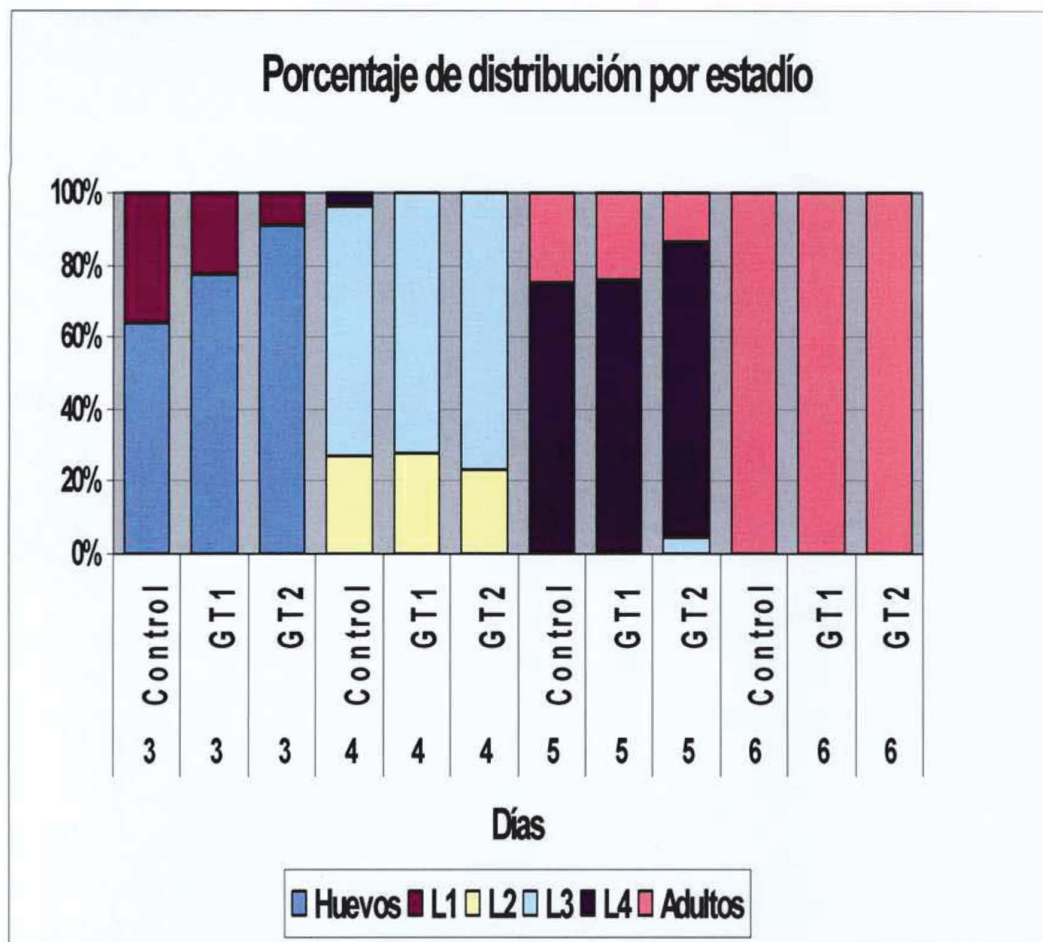


Fig.55 La figura muestra la distribución en cada una de las etapas larvaria y de adulto de los gusanos correspondientes a cada uno de los tres grupos en función de los días de desarrollo hasta llegar a la adultez.

Días	Grupos	Huevos	L1	L2	L3	L4	Adultos
3	Control	63,90%	36,10%	0	0	0	0
3	GT1	77,10%	22,90%	0	0	0	0
3	GT2	90,80%	9,20%	0	0	0	0
4	Control	0	0	27,30%	69,26%	3,40%	0
4	GT1	0	0	27,60%	72,39%	0	0
4	GT2	0	0	23,60%	76,36%	0	0
5	Control	0	0	0	0	75,42%	24,60%
5	GT1	0	0	0	0	75,67%	24,30%
5	GT2	0	0	0	4,50%	82,17%	13,30%
6	Control	0	0	0	0	0	100%
6	GT1	0	0	0	0	0	100%
6	GT2	0	0	0	0	0	100%

Tabla 13 Tabla de distribución de las progenies en los gusanos control, GT1 (F26H9,8) y GT2 (F48E3.3) en función de los días de desarrollo.

A partir de la observación de la evolución de desarrollo de la progenie F1 en placas, se determinó que la depleción de las proteínas GT1 y GT2 no produce letalidad embrionica., sin embargo se observó que un porcentaje muy pequeño de los huevos pertenecientes al grupo GT2 poseían una morfología alterada (como se indica en la fig 51. los mismos no eclosionan. Los gusanos pertenecientes a los grupos GT1 y GT2 mostraron una velocidad de crecimiento menor y el desarrollo a los progresivos estados larvarios se encontraba retrasado con respecto a los gusanos del grupo control por unas horas. En promedio se observa un retraso de unas 15 horas

en llegar a los diferentes estadios. Este es el llamado fenotipo gro (*growth rate abnormal*) (50).

Los adultos de los grupos GT1 y GT2 tienen en su interior huevos que no fueron puestos y presentan alteraciones morfológicas como se detalla mas en el caso de la parental.

Hacia el día tres los gusanos control tenían más gusanos en estadio L1 que los gusanos pertenecientes a los grupos GT1 y GT2. Para el día cuatro ya aparecen en los gusanos control larvas en estadio L4, a diferencia de los otros grupos. La velocidad del crecimiento en este grupo mantiene diferencias significativas con respecto a los demás. En el día cinco los gusanos GT2 tienen aún larvas en estadio L3, cosa que no ocurre en los otros dos grupos de nemátodos. El crecimiento de los gusanos GT2, fue retardado y tuvieron una inhibición en el desarrollo con respecto al control, siendo los más lentos. Hasta este día, las diferencias entre los gusanos se mantienen, pero al final toda la progenie llega a su estadio adulto en el día seis, con tan solo unas horas de diferencia. Si bien se encontraron diferencias en el crecimiento de las progenes, ya que los gusanos GT1 y GT2 fueron retrasados con respecto al control y tuvieron una inhibición en el desarrollo, la depleción de las proteínas no causo letalidad en el gusano, sino unas

diferencias conservadas en la velocidad de crecimiento como en el caso de la generación parental.

Para analizar correctamente estos datos, se realizó nuevamente el test de Student, obteniendo la siguiente tabla:

Huevos	T student
C-GT1	0.54
C-GT2	0.59
GT1-GT2	0.88
Larvas 1	
C-GT1	0.04
C-GT2	0.0004
GT1-GT2	0.0009
Larvas 2	
C-GT1	0.55
C-GT2	0.02
GT1-GT2	0.0002
Larvas 3	
C-GT1	0.5
C-GT2	0.01
GT1-GT2	0.02
Larvas 4	
C-GT1	0.83
C-GT2	0.1
GT1-GT2	0.09
Adultos	
C-GT1	1
C-GT2	0.01
GT1-GT2	0.01

Tabla 41 Tabla del p o nivel de significación para cada grupo, en los diferentes estadios larvarios.

En este cuadro vemos que existen diferencias significativas entre los porcentajes de gusanos en los distintos estadios de crecimiento entre el grupo control y el grupo GT2 desde el estadio

larvario hasta el estadio adulto. Con estos datos podemos hipotetizar que el crecimiento es un parámetro en el cual se manifiestan diferencias entre el grupo control de gusanos y los gusanos GT2, este silenciamiento génico produce cambios significativos en el retardo del crecimiento.

4.5 Cambios fenotípicos

Al realizar los estudios correspondientes a la supervivencia de *C.elegans*.. se observó que un alto porcentaje de los gusanos pertenecientes a los grupos GT1 y GT2 presentaban alteraciones morfológicas durante su desarrollo además de síntomas de envejecimiento prematuro que se relacionan con una disminución en la esperanza de vida. Para cuantificar las alteraciones morfológicas en los gusanos KP 948 tratados con RNAi, colocamos en cada placa de NGM (6x WT, 6x GT1, 6x GT2) 10 gusanos con las cepas de E Coli HT 115(DE3) conteniendo el vector con los diferentes fragmentos como en el experimento de supervivencia. El RNAi se introdujo a través de la faringe y se distribuyó a los tejidos somáticos y a la línea germinal. Los cultivos se crecieron a 18°C. y posteriormente se siguió la evolución de la morfología de los gusanos.

Analizando las cepas de gusanos inducidas con RNAi durante varios días, se vio que las células del *C. elegans* incorporaron en su genoma los elementos necesarios para la fabricación de la molécula de RNA doble cadena, la cual llegó al citoplasma por medio de los vectores L4440 lo cual ocasionó defectos morfológicos durante el desarrollo del gusano, relacionados con la debilidad muscular, la aparición de la vulva protruyente, y la incorrecta localización del intestino en el nematodo. Esto fue observado bajo el microscopio y empezaron a aparecer a partir del día cuatro de estado adulto.

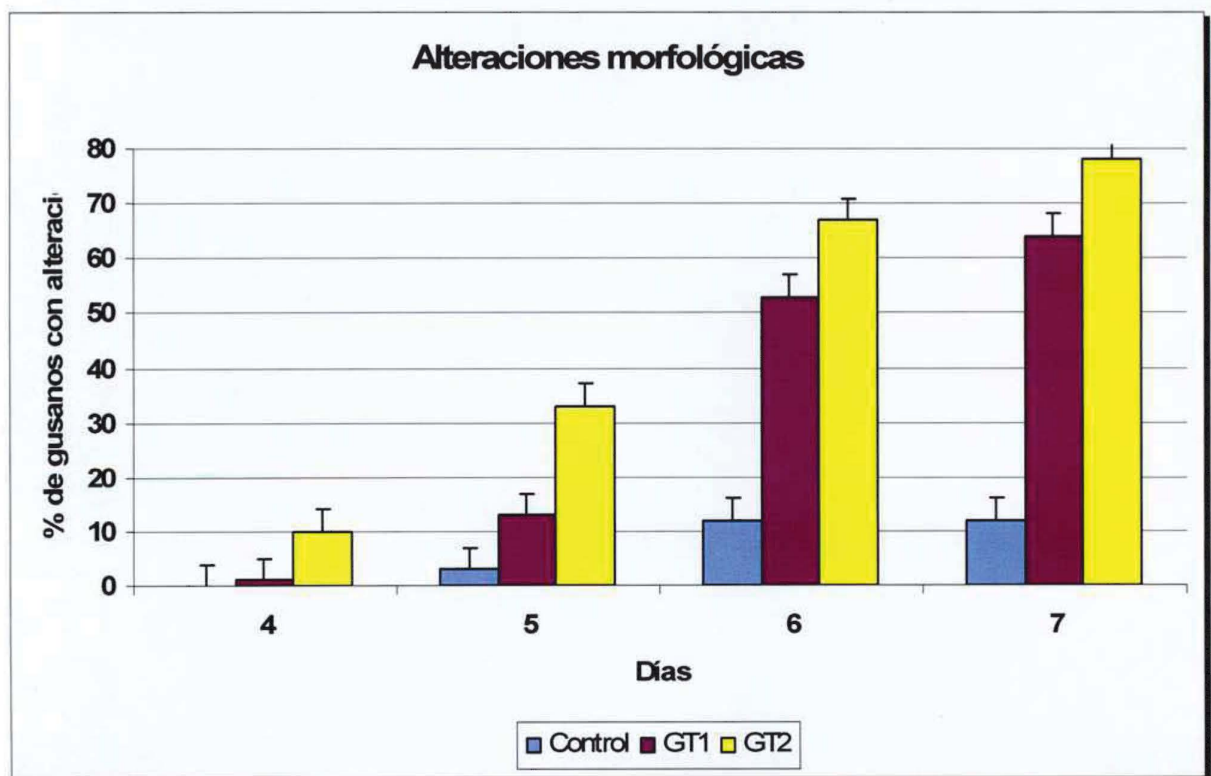


Fig.56 Alteraciones morfológicas. Vemos el porcentaje de gusanos afectados., con los diferentes fenotipos de Vulva protruyente, vulva ectópica, multivulva, intestino afuera en gusanos Control, GT1 (F26H9,8) y GT2 (F48E3.3)

Días	4	5	6	7
Control	0	3%	12%	12%
GT1	1	13%	53%	64%
GT2	10	33%	67%	78%

Tabla 15 Porcentajes de alteraciones morfológicas que se presentaron en los diferentes grupos de gusanos, control, GT1 y GT2, durante 7 días.

Los cambios morfológicos se hicieron mas frecuentes y visibles en los gusanos con RNAi. Los gusanos GT2 (F48E3.3) presentaron hacia el día siete un 78% de alteraciones incluida vulva protruyente, vulva ectópica o vulvaless, multivulva e intestino afuera, los tratados con RNAi GT1 (F26H9.8) un 64%. Una diferencia altamente significativa con los gusanos control que tan solo presentaron un 12% y su unico fenotipo fue la vulva protruyente.

La depleción de estas proteínas probablemente impida que alguna proteína importante en algún proceso fisiológico no se pliegue correctamente y no adquiera su estructura funcional o se genere una acumulación de proteínas mal plegadas en general que ocasiona debilidad de los músculos, torpeza extensa y dificultad para moverse, perdida general del control del motor, lo que nos indica que el silenciamiento génico por RNAi se diseminó por todo el organismo y permitió reprimir la expresión de nuestro gen blanco ya que desarrollo respuestas RNAi sistémicas.

En estos gusanos tratados, las células no se fusionan, migran anormalmente provocando estas aberraciones morfológicas en

diversos órganos, incluyendo la vulva, la faringe y el intestino. La vulva (órgano de deposición de huevos y de apareamiento), es un órgano de desarrollo post-embriionario, desarrollado por precursores ventrales epidérmicos, el cual conecta el útero con el medio externo. En el adulto la vulva es necesaria para el egg.laying y para la copulación con machos. Si esta no se desarrolla bien, debido a fallas en líneas celulares, se observan fenotipos morfológicos en este órgano. Y no funciona correctamente como ocurrió en nuestro experimento.

El intestino en el gusano también juega una parte importante y sobre todo en su esperanza de vida (*lifespan*). Este órgano también se vio afectado con localización incorrecta y expulsión definitiva.

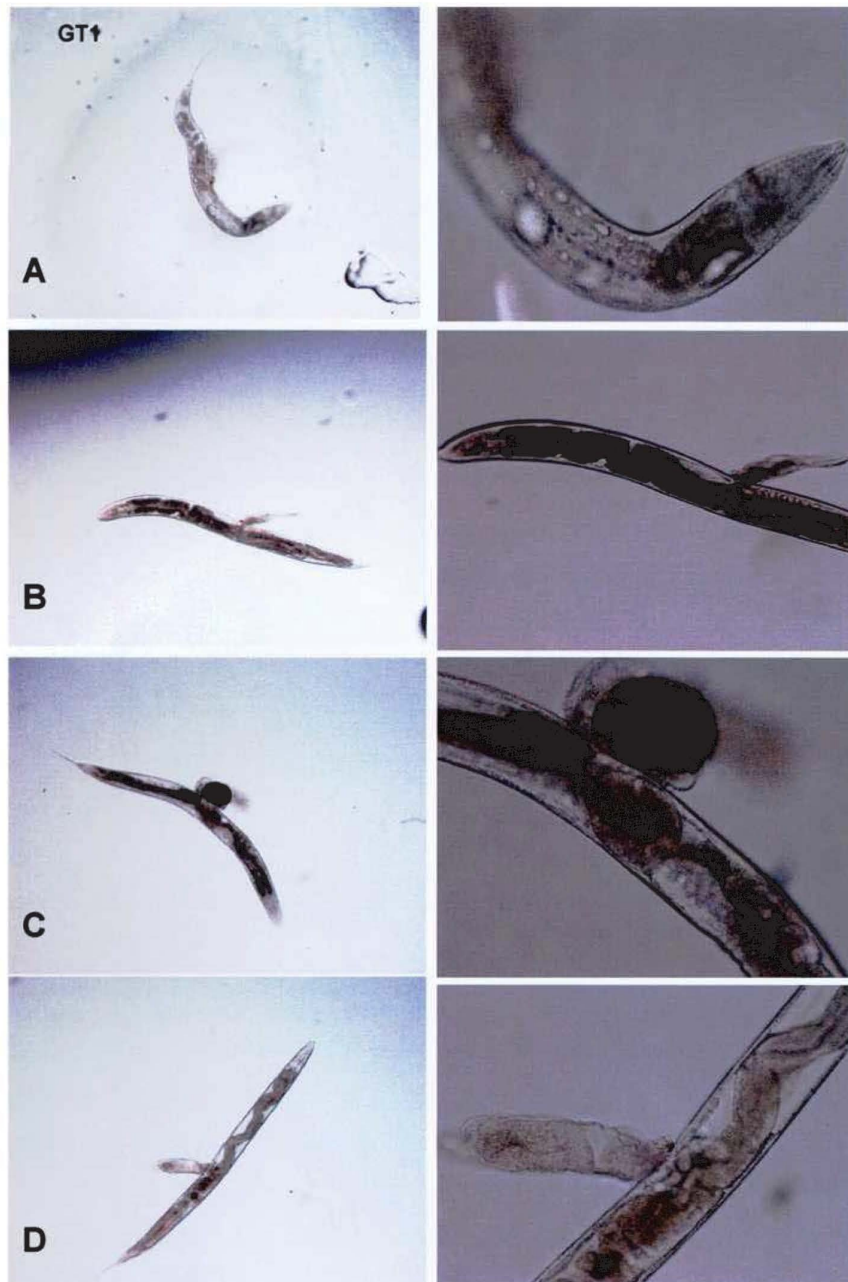


Fig 57 Detalles de alteraciones morfológicas ocurridas en gusanos GT1 (F26H9.8)
A. curvatura anormal del cuerpo, **B-D** intestino afuera, **C** vulva protruyente.

Los problemas en el desarrollo de vulva fueron visibles a partir del día cuatro en los gusanos. En algunos gusanos se observó el fenotipo *EGg-Laying-defective* (EGL). Las hermafroditas de seis días

no pudieron poner sus huevos, el utero se ensanchó debido a la cantidad de huevos, no resistió y estalló.

El Fenotipo de Vulva protruyente (Pvl) o *Protruding Vulva* o *abnormal-Eversion of the vulva (Evl)* se observó con mucha frecuencia tanto en los gusanos GT1 como en los GT2 lo que nos indica defectos en las células vulvares, y en la vulva uterina.

El fenotipo Vulvaless (Vul) , se observó en casos esporádicos. Este fenotipo es causado por la disminución de la actividad del EGF-receptor *let-23* en los cuales las hermafroditas tienen fertilizados los huevos, se incuban por dentro y eventualmente se escapan en el cuerpo de la madre.

El fenotipo MultiVulva (Muv) donde hermafroditas muestran una vulva funcional y protrusiones ventrales adicionales como una especie de pseudovulva fueron observadas en GT1 y GT2, lo cual se debió quizás a una mutación de *let-23* ocasionada por nuestro silenciamiento génico.

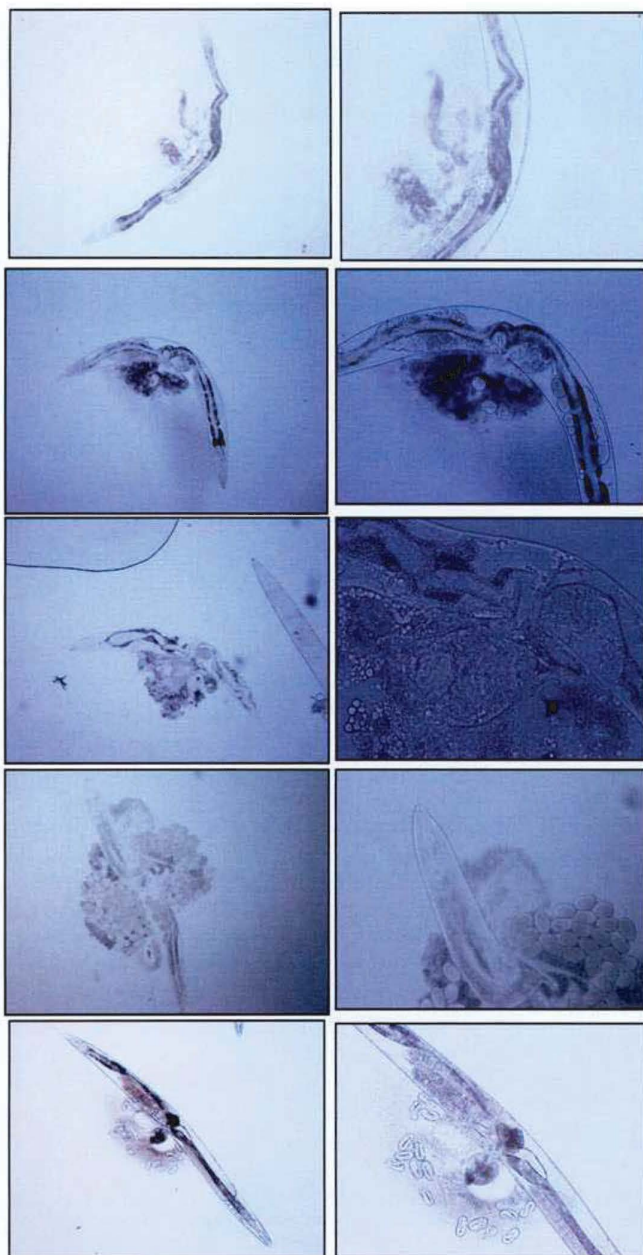


Fig..58 Alteraciones morfológicas en los gusanos GT2 (F26H9.8), vulva protruyente e intestino afuera.

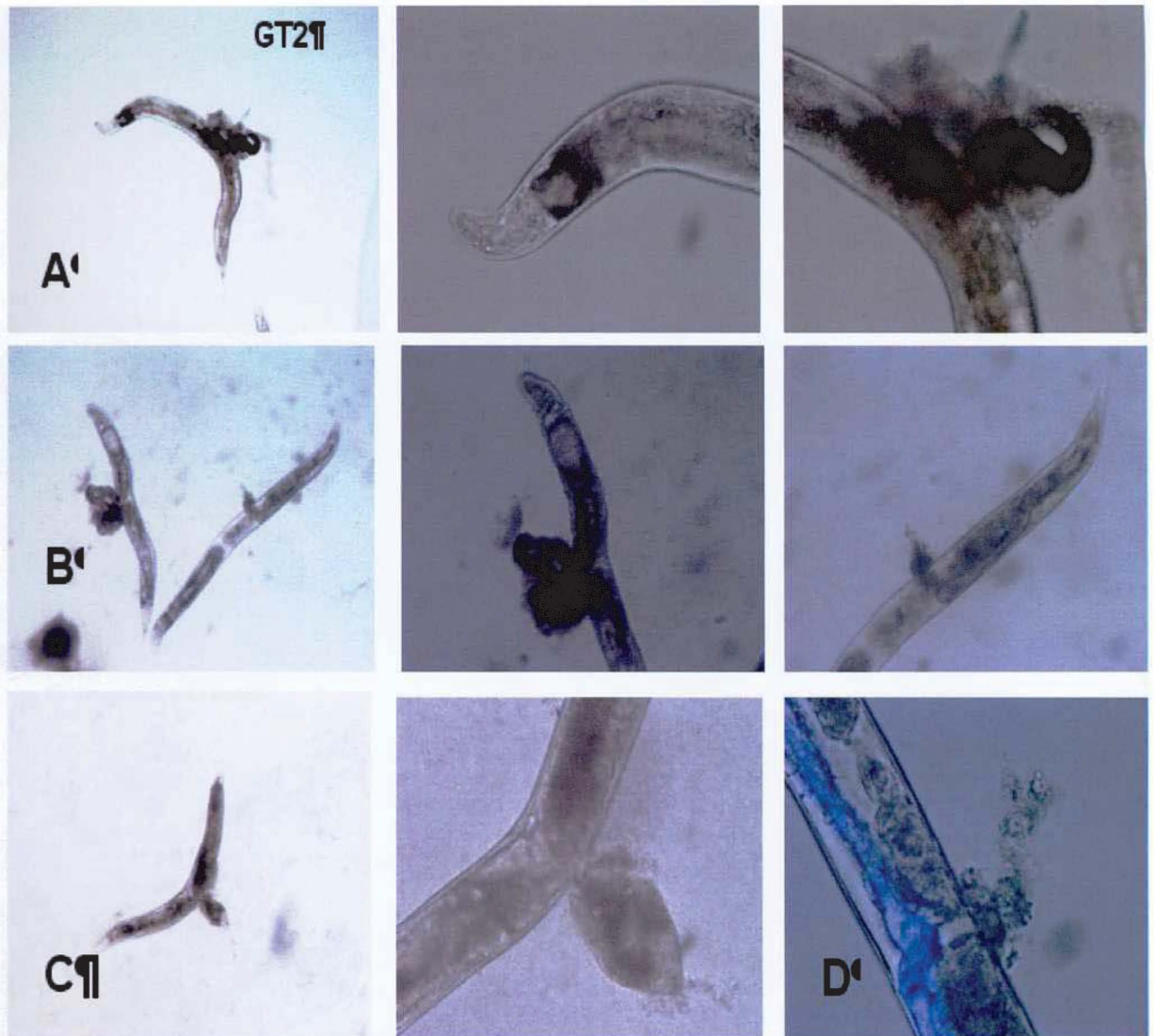


Fig 59 Alteraciones morfológicas de los gusanos GT2 (F48E3.3)
A. Gusano hermafrodita con problemas en el cuello, y con multivulva, B gusanos con vulva protruyente e intestino afuera, C. vulva protruyente, D.vulva ectópica.

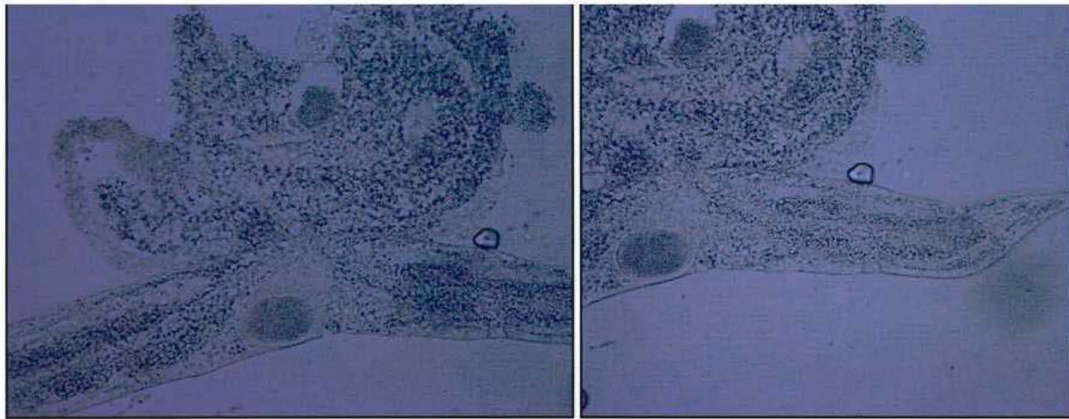


Fig. 60 Gusano adulto hermafrodita perteneciente al grupo de gusanos GT2, observado al octavo día. Presenta intestino afuera, huevos en la espermateca, cabeza y cola más curvas de lo normal y muestras de envejecimiento.

Observación de las alteraciones morfológicas mediante la tinción con el colorante Fluorescente Dapi

El colorante fluorescente Dapi , fue utilizado en los gusanos control, GT1 (F26H9.8), GT2 (F48E3.3) .para ver los núcleos de las células del *C.elegans*, ya que este tiene afinidad con el ADN. Y poder observar con mayor claridad las células que se encuentran afectadas en los gusanos pertenecientes a los grupos GT1 y GT2.

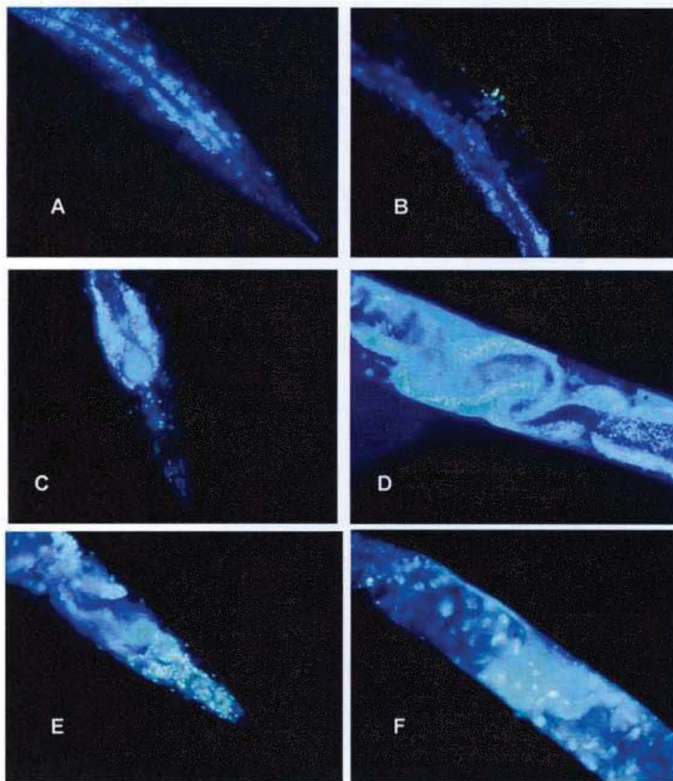


Fig.61 Gusanos control, GT1 (F26H9.8), GT2 (F48E3.3) con tinción de Dapi

Tinción con Dapi en Gusanos KP 948. (A) Se observa el detalle de la faringe normal de un gusano control, (B).visualización del intestino bien distribuido en un gusano del grupo control, (C), detalle de la faringe de un gusano del grupo GT1 (F26H9,8) con características de sarcopenia y engrosamiento del bulbo faringeo, (D), detalle del intestino de un gusano perteneciente al grupo GT1 con evidencia de enrollamiento del mismo, (E). detalle de la faringe de un gusano del

grupo GT2 (F48E3.3) con características de procesos necróticos y estructura irregular (F) detalle del intestino con estructura irregular, aparición de masas vacuolares difusas, huevos en el interior y indiferenciación de los órganos

Al analizar la marca fluorescente Dapi, correspondiente a los núcleos de las células, se observó que los gusanos pertenecientes al grupo GT2 siempre se teñían más intensamente con el colorante, en cambio en el grupo control y en el grupo GT1 el mismo se encontró distribuido el colorante de manera relativamente homogénea. El último día en que los gusanos fueron observados se vio que las células que mueren son removidas del organismo por células que lo fagocitan ya que el contenido del mismo comienza a aparecer como una masa difusa continua sin superficie de separación entre las distintas células. Se observó degradación del intestino y el resto de los órganos. La cutícula queda en el medio por dos días más antes de ser degradada. Si bien este proceso se observa también en los gusanos del grupo control el proceso se lleva a cabo con una mayor velocidad y el aspecto general se encuentra muy desmejorado..



Fig 62 La figura muestra gusanos pertenecientes al grupo GT2 donde se puede observar los diferentes tejidos que se encuentran en proceso de degradación.

4.6 Proteínas involucradas en la UPR

Las células se enfrentan con diferentes condiciones de estrés ambiental o fisiológico con las que tienen que lidiar y para eso han desarrollado un conjunto de respuestas adaptativas conocidas como UPR. La exposición de las células a condiciones de temperatura extrema, infecciones virales falta de oxígeno o nutrientes etc.. Induce cascadas de señales que le indican a la célula la situación de emergencia en la que se encuentra y que le permite a su vez, responder mediante un conjunto de respuestas coordinadas que le permitirán adaptarse y soportar temporalmente las condiciones estresantes. En este proceso participan diferentes proteínas involucradas en diferentes procesos incluyendo las proteínas que asisten al plegamiento de las proteínas como las chaperonas, la Bip y las glucosiltransferasas o GT.

A fin de analizar si las proteínas codificadas por los genes GT1 (F26H9.8), GT2 (F48E3.3) participan en el control de calidad del plegamiento asistiendo en este proceso, se utilizó una cepa de gusanos transgénica SJ4005 que contiene una fusión compuesta del promotor de la proteína hsp4 (que es la proteína homóloga a la Bip en *C. elegans*) y la GFP. Si la depleción de las proteínas codificadas por dichos genes produce una disminución en la eficacia del plegamiento de las mismas se producirá la acumulación de proteínas del RE poniendo en funcionamiento la UPR. Uno de los genes que se

induce en la respuesta a proteínas mal plegadas es la Bip, en este caso la hsp4. Por lo tanto, si estas proteínas están involucradas en este proceso la depleción de las mismas producirá la expresión de la Bip y por ende de la GFP que se encuentra bajo el control del mismo promotor

Estudios de Estrés

Se realizaron experimentos de silenciamiento génico siguiendo el método de "RNAi feeding" en placas de agar en gusanos sincronizados en estadio L4.

Se adicionaron 10 gusanos por placa (en total 4 placas), para cada grupo de bacterias transformadas. Se observaron diariamente y se tomaron muestras cada día por 5 días, para realizar el ensayo de estrés. Se realizaron estudios de tolerancia al estrés con los distintos tipos de cambios externos. Para ello se sometieron los gusanos SJ 4005 adultos control y las cepas de gusanos SJ 4005 sometidos a silenciamiento génico para los genes (F26H9.8) GT1 y (F48E3.3) GT2 a diferentes tratamientos de estrés capaces de inducir la acumulación de proteínas mal plegadas en el RE.

Como control de los niveles de expresión de la Bip en condiciones de stress de retículo se sometieron a gusanos del grupo control a

diferentes tratamientos que inducen la respuesta a proteínas mal plegadas

Tratamiento con DTT:

Se trataron los gusanos con una solución 5 mM de DTT y se incubaron a 18°C durante 2 horas.

Shock térmico:

Se sometieron los gusanos a un shock térmico, Los gusanos se incubaron a 37°C, durante 2 horas.

Los gusanos fueron tratados como en el experimento de silenciamiento génico mostrado en la sección y al día 6 de iniciado el experimento se analizó la expresión de GFP en los gusanos del grupo control y de los grupos GT1 y GT2. Se observó que los gusanos sometidos a los tratamiento mencionados más arriba indujeron la UPR en respuesta al estrés, mostrando una acumulación de la proteína GFP. Los gusanos presentaban una fluorescencia alta, indicando un alto nivel de expresión del promotor de la hsp4, a diferencia de los gusanos control en los cuales solo se observó una fluorescencia muy baja.



Fig. 63 Gusanos de la cepa SJ 4005 (A) Control sin tratamiento, Control negativo. (B) sometidos a condiciones de estrés. (C) sometidos a silenciamiento génico contra GT1(F26H9.8), presentando fluorescencia solo en algunos puntos y (D) gusanos sometidos a silenciamiento génico para GT2 (F48E3.3), presentando una fluorescencia intensa en todo el cuerpo.

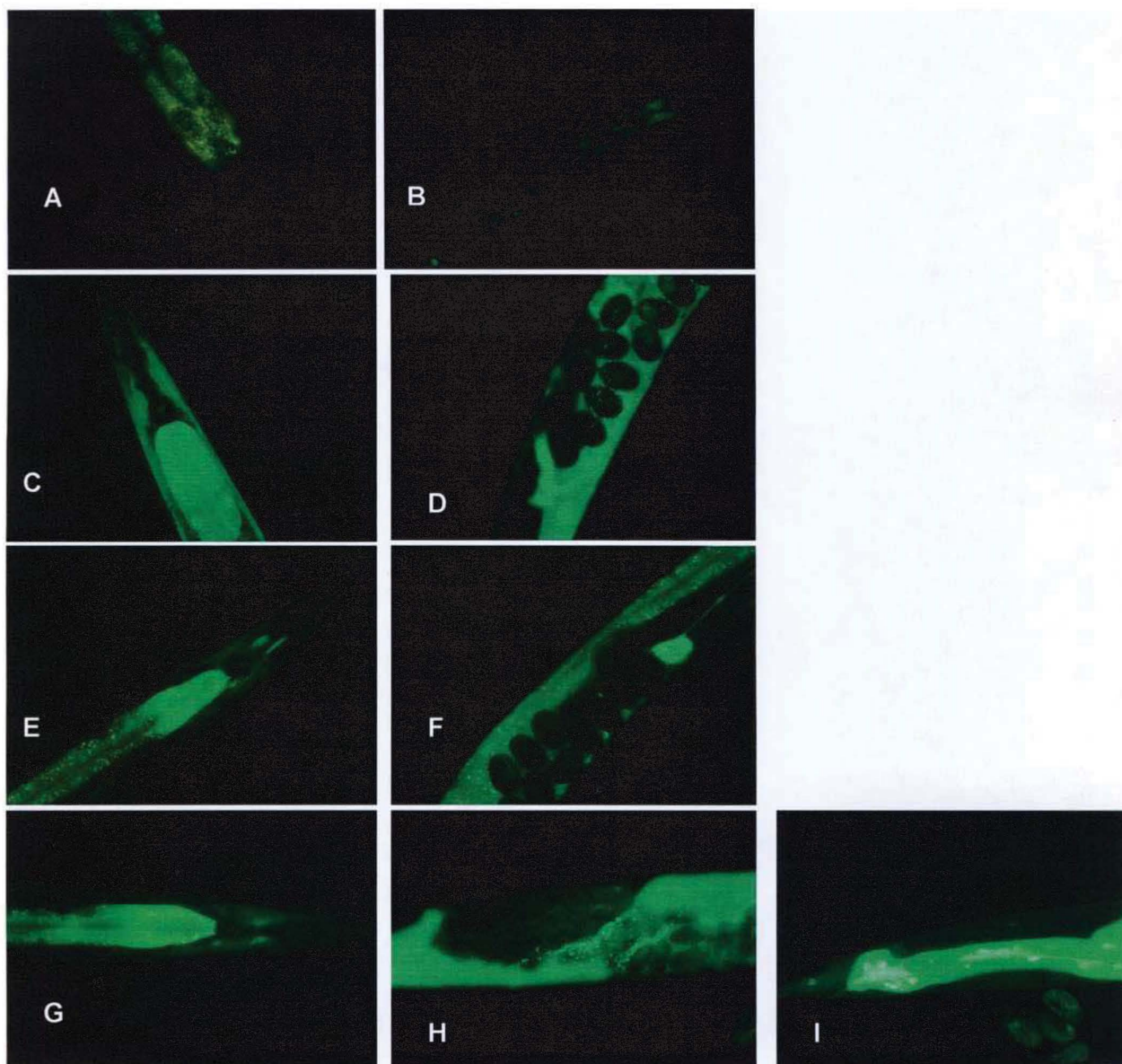


Fig.64 Detalle de los gusanos SJ 4005 sometidos a diferentes tratamientos como se indica en la figura anterior A Control sin tratamiento, (Control negativo) B sometidos a condiciones de estrés. (C-D) sometidos a silenciamiento génico contra GT1(F26H9.8), presentando fluorescencia solo en algunos puntos y (G-H-I) Gt2 sometidos a silenciamiento génico para GT2 (F48E3.3), presentando una fluorescencia intensa en todo el cuerpo.

Dos diferentes patrones de expresión son visibles en la cepa SJ 4005. Un patrón para los GT1 (F26H9.8) donde se encuentran solo

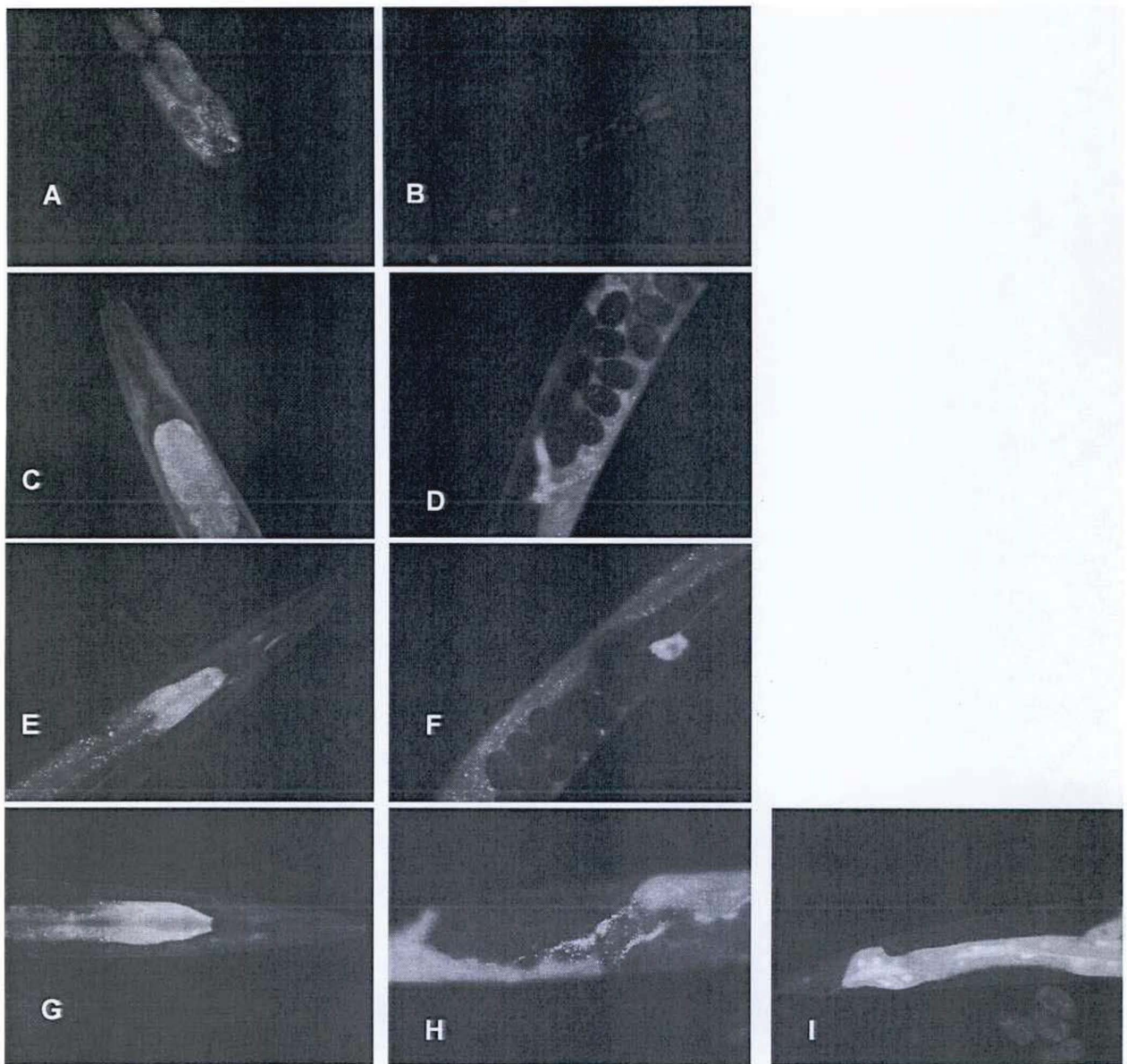


Fig.64 Detalle de los gusanos SJ 4005 sometidos a diferentes tratamientos como se indica en la figura anterior A Control sin tratamiento, (Control negativo) B sometidos a condiciones de estrés. (C-D) sometidos a silenciamiento génico contra GT1(F26H9.8), presentando fluorescencia solo en algunos puntos y (G-H-I) Gt2 sometidos a silenciamiento génico para GT2 (F48E3.3), presentando una fluorescencia intensa en todo el cuerpo.

Dos diferentes patrones de expresión son visibles en la cepa SJ 4005. Un patrón para los GT1 (F26H9.8) donde se encuentran solo

algunas zonas fluorescentes, se observa también algunas zonas de autofluorescencia (fluorescencia de color amarillo) y otro patrón para los GT2 (F48E3.3) donde se puede observar fluorescencia distribuida por todo el gusano. En los gusanos del grupo. negativo solo tiene zonas donde presenta autofluorescencia y los gusanos pertenecientes al grupo del control positivo tratamiento con DTT se observa fluorescencia en todo el gusano.

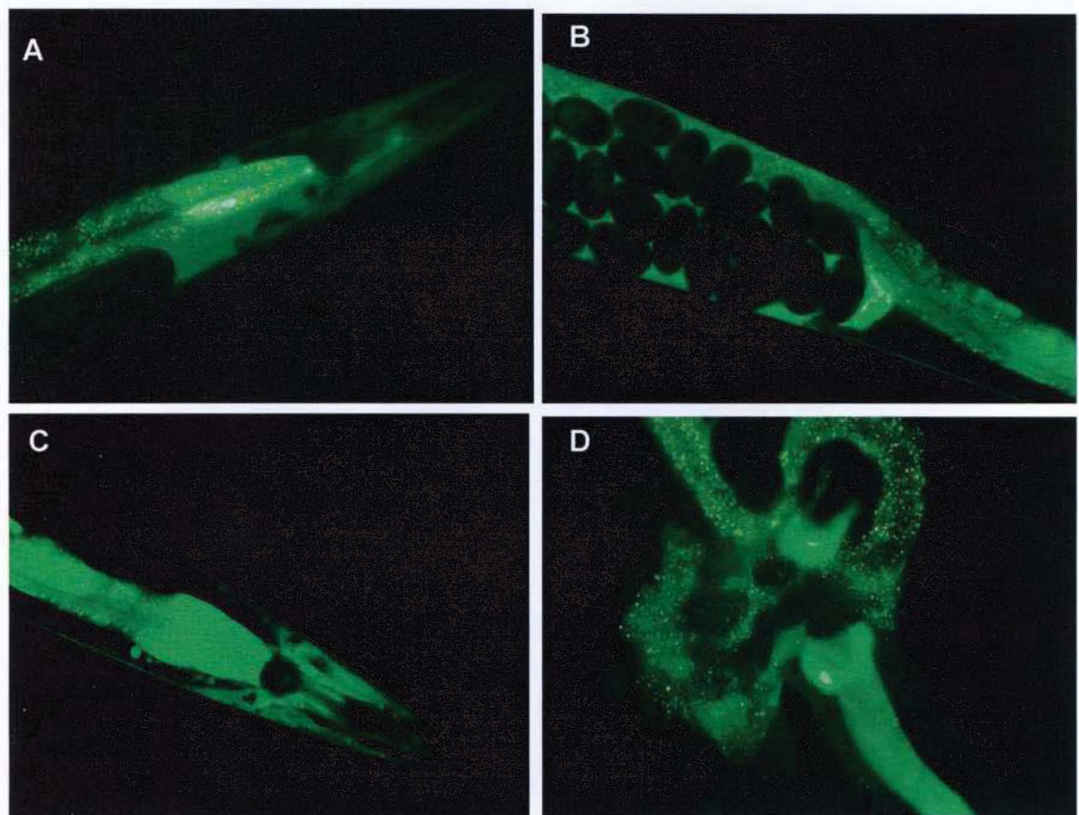
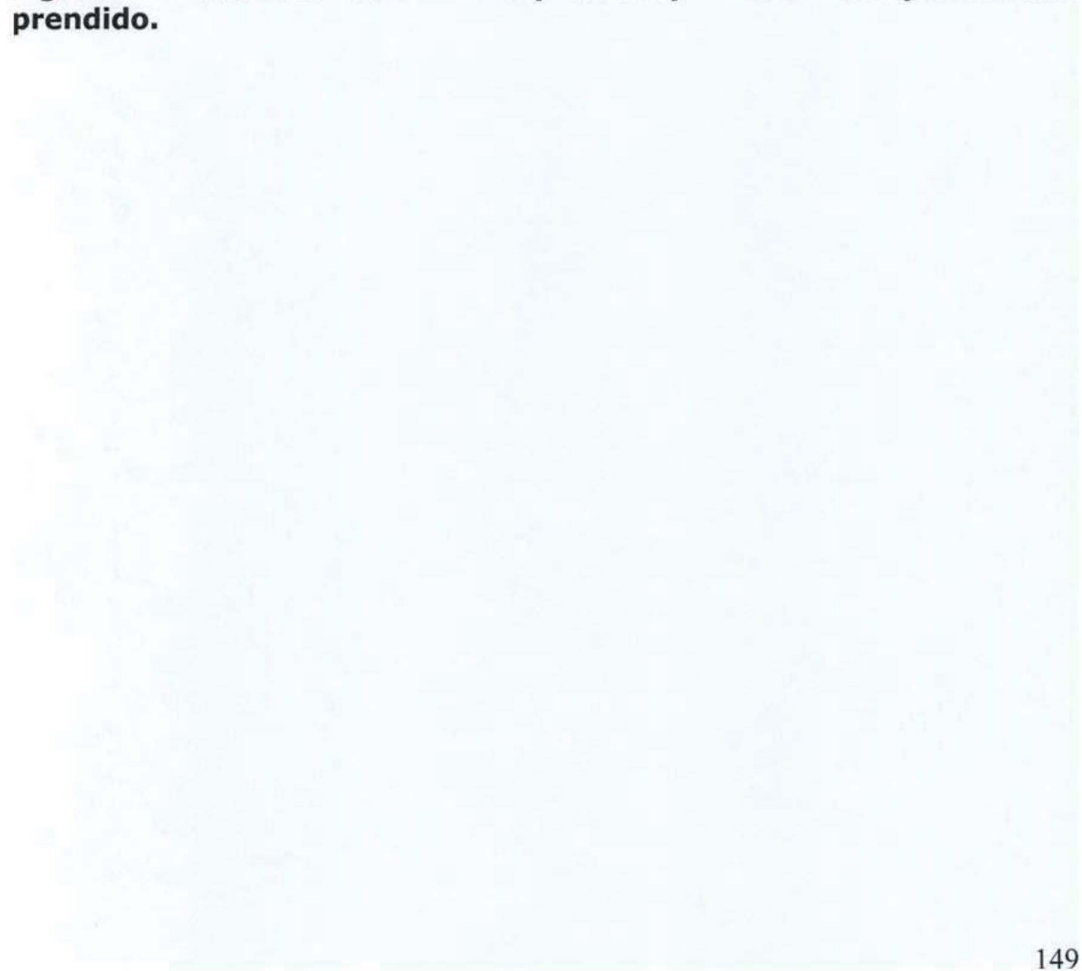


Fig. 65 Gusanos tratados con silenciamiento génico y observados en el día seis (A) se observa la faringe de un gusano del grupo GT1 (F26H9.8) con fluorescencia y pequeños puntos amarillos autofluorescentes. (B) se observa gran cantidad de huevos, fluorescencia en la espermateca y autofluorescencia en el intestino.(C) faringe de un gusano perteneciente al grupo GT2 (F48E3.3) con gran cantidad de fluorescencia. (D) se observa defecto morfológico en el intestino (Intestino afuera),

autofluorescencia amarilla y gran cantidad de fluorescencia en todo el intestino.

En los gusanos interferidos con GT1 se observó un patrón discreto con fluorescencia fundamentalmente concentrada en la faringe y en la espermateca. Se encuentran prendidos, con mayor intensidad el día seis.

Fig 66 Gusanos con GT2(F48E3.3) GFP completamente prendido.



5.DISCUSIÓN

Una de las características que definen a un sistema vivo es la habilidad de ensamblar con una gran precisión todos y cada uno de sus componentes moleculares. Descubrir el mecanismo por el cual se lleva a cabo cada uno de estos procesos es el gran desafío de la ciencia.

En esta tesina se quería estudiar la expresión de las dos proteínas codificadas en el genoma de *C.elegans*; con putativa actividad de GT y los experimentos que realizamos indican que pudimos reproducir resultados que se han venido haciendo en este campo en diversos genes de *C.elegans*. Se realizaron dos tipos de aproximaciones: por un lado, el análisis bioinformático de los genes que codificaban estas proteínas y por otro lado se realizaron experimentos de silenciamiento génico para estudiar los efectos causados por la depleción de dichas proteínas.

El análisis bioinformático combinó métodos de análisis en diferentes programas y nos permitió caracterizar los genes, estudiar el entorno genómico de los genes F48E3.3 y F26H9.8 que resultaron estar enmarcados en la familia 8 de las glicoproteínas. junto a otros genes y comparar las secuencias de los genes que codifican para las proteínas humanas HUGT1 y HUGT2 con los genes que codifican para las proteínas F48E3.3 y F26H9.8 de *C.elegans*, por medio del programa Blast-2-sequences. Al comparar la secuencia de la proteína

F26H9.8 con la proteína HUGT1, se encontró que la proteína codificada por el gen F26H9.8 presenta un 36 y 38% de identidad con las proteínas codificadas por los genes HUGT1 y HUGT2 de humanos respectivamente. Por otro lado, la proteína codificada por el gen F48E 3.3 presenta un porcentaje de identidad de 41 y 40 % con las proteínas codificadas por los genes HUGT1 y HUGT2.

Si bien la proteína codificada por el gen F48E 3.3 presenta un porcentaje de identidad ligeramente superior con ambos genes de humanos, en particular 41 % con la proteína codificada por el gen HUGT1, los porcentajes de identidad no son suficientemente altos para asegurar que la proteína codificada por el gen F48E 3.3 de *C.elegans* sea el que posee actividad de GT

Aunque realizamos un árbol filogenético no pudimos argumentar si existió un único evento de duplicación que generó los dos genes F48E3.3 y F26H9.8 y también HUGT1 y HUGT2, o contrario existieron eventos independientes que generaron dos duplicaciones, uno que dio origen a HUGT1 y HUGT2 y a sus homólogos presentes en vertebrados y otro evento que dio origen a los genes F48E3.3, y F26H9.8 ya que no se dispone de información de secuencias que codifiquen proteínas con homologas a la GT en grupos de organismos que puedan ayudarnos a generar un árbol más completo y analizar en detalle las relaciones filogenéticas..

La técnica de silenciamiento génico (RNAi), por depleción de las proteínas F48E3.3 y F26H9.8 utilizando el método del RNA feeding,

se realizó con éxito. Al realizar el ensayo pudimos analizar los cambios que ocurrieron en el nematodo, definir el impacto de dicha proteína en diferentes tejidos y analizar la participación de ambas en la respuesta a proteínas mal plegadas. Se determinó la obtención de un fenotipo al inhibir cualquiera de los dos genes y se observaron algunas características adquiridas por el gusano.

Inicialmente se tomo como parámetro principal de la depleción de las proteínas la supervivencia del gusano. Se utilizaron comparaciones globales para analizar los datos y el valor de significación obtenido entre los tres grupos siempre fue significativo (<0.05), lo que nos sugiere que existen diferencias entre los grupos de gusanos silenciados con los target de los genes F48E3.3 y F26H9.8. Además, las diferencias observadas entre la vida media de los gusanos fueron 8.37 días para el grupo control, 7.45 días para el grupo GT1(F26H9.8) y 6.75 días para el grupo GT2(F48E3.3), siendo los gusanos silenciados para el gen GT2 los gusanos más afectados de los tres grupos. Los resultados obtenidos en este ensayo, nos muestra una disminución en la esperanza de vida de los gusanos silenciados., por ello, se midieron diversos parámetros que están relacionados con el envejecimiento, entre ellos los *body bends*.

La locomoción del gusano se vio afectada, por lo tanto se empezaron a examinar los efectos que la depleción de nuestras proteínas causa sobre la movilidad del gusano midiendo los movimientos graduales de su cuerpo. Se cuantificaron los

movimientos del cuerpo del nematodo. Se determinó el número de curvaturas del cuerpo que realiza el gusano (*body bends*) en 30 segundos, por un periodo total de 8 minutos. Se observó una disminución en la movilidad de los gusanos del grupo control con el transcurso de los días de acuerdo a lo esperado como consecuencia del envejecimiento normal de los mismos. La disminución en la movilidad de los gusanos en los que se habían silenciado los genes GT1 (F26H9.8) y GT2 (F48E3.3) fue mayor, siendo muy marcado el efecto observado cuando se depletó la proteína codificada por el gen GT2. Hacia el día ocho los gusanos GT1 y GT2 además de mostrar cambios significativos en su locomoción presentaron características típicas de envejecimiento. Cuando se comparan el grupo de gusanos control contra los dos grupos de gusanos GT1 (F26H9.8) y GT2 (F48E3.3) los valores de significación son menores a 0.05 lo cual sugiere que existen diferencias significativas en la movilidad. Sin embargo, el valor de p obtenido cuando se compararan los grupos de gusanos GT1 y GT2 es mayor a 0.05 indicando que no se encontraron diferencias significativas entre los grupos de gusanos silenciados.

La disminución en los movimientos del gusano están relacionados con la disminución de la probabilidad de sobrevivir y la depleción de estas proteínas GT1 (F26H9.8) y GT2 (F48E3.3) reducen la movilidad del gusano y sugieren una afectación en el funcionamiento de su sistema nervioso, o en desarrollo de su tejido muscular. Estas alteraciones pueden ser consecuencia de la

incapacidad para llevarse a cabo adecuadamente algún proceso esencial en el desarrollo que provoca que se produzca un proceso de envejecimiento prematuro..

Al depletar las proteínas F48E3.3 y F26H9.8 se obtuvo un fenotipo característico que siempre se repitió en diferentes experimentos en forma independiente,, lo que da una idea de que es consistente y repetitivo. Todas estas observaciones fueron sometidas a diferentes análisis estadísticos que ponen de manifiesto la existencia de diferencias significativas con el grupo control. Este fenotipo consiste en diversas alteraciones morfológicas observadas como la aparición de pequeñas vacuolas en el intestino, necrosis en el intestino que aparece en las imágenes obtenidas con un color mucho más oscuro, la aparición de vulvas protruyentes que indican la incapacidad por parte de los mismos de realizar la formación de dicho órgano en forma adecuada y posteriormente la exclusión del intestino fuera del cuerpo del gusano como consecuencia de la debilidad estructural de la zona afectada y la presión ejercida por la gran cantidad de embriones y huevos retenidos en su interior.

También se observó otra característica ligada al envejecimiento y fue la acumulación de lipofusina como resultado de la degradación oxidativa. Los gusanos de los grupos GT1 (F26H9,8) y GT2 (F48E3.3) presentaron una acumulación más rápida de lipofusina en el intestino y la faringe., estos mismos presentaron sarcopenia,

debido al deterioro progresivo del tejido muscular, siendo mas visible en los gusanos del grupo GT2.

.La depleción de las proteínas GT1 (F26H9,8) y GT2 (F48E3.3), tuvo un impacto importante en la puesta de huevos. La puesta de huevos de los gusanos GT1 (F26H9,8) y GT2 (F48E3.3) tuvo una disminución con respecto a los Control, esta diferencia no se debe a la incapacidad de formar los huevos o embriones sino a la incapacidad de realizar la puesta correctamente, probablemente debido a algún efecto del silenciamiento génico sobre la estructura de los músculos que poseen una estructura afectada y no pueden realizar el movimiento involucrado en la puesta. o a la incapacidad del gusano de formar una vulva con la estructura adecuada, Se observó la incapacidad de las larvas grávidas de los grupos GT1 y GT2, para poner sus huevos. En el interior de estas, se observan gran cantidad de huevos ocupando casi todo el cuerpo y un problema para expulsarlos, siendo acumulados al interior(fenotipo egg-laying) se presentó este fenotipo con mayor frecuencia en los gusanos del grupo GT2.

En lo que al crecimiento se refiere, se presentaron diferencias en las diferentes etapas larvarias con respecto a los gusanos controles, (fenotipo estarved), gusanos GT1 y GT2 fueron retrasados tuvieron una inhibición en el desarrollo, pero al final todos llegaron a adultos con unas horas de diferencia.

Resultaron evidentes los cambios morfológicos que se presentaron frecuentemente en los gusanos con RNAi. Los gusanos GT2 (F48E3.3) presentaron hacia el día siete un 78% de alteraciones incluida vulva protruyente, vulva ectópica o vulvaless, multivulva e intestino afuera, los tratados con RNAi GT1 (F26H9.8) un 64%. Una diferencia altamente significativa con los gusanos control que tan solo presentaron un 12% y su único fenotipo fue la vulva protruyente.

Estos fenotipos podrían estar relacionados con problemas relacionados con la incapacidad en adquirir la estructura correcta por parte de alguna proteína que desarrolla una actividad relevante (aún no determinada y que será objeto de futuros proyectos) en algún proceso esencial durante el desarrollo.

Una de las razones que nos sugiere que los genes F48E3.3 y F26H9. participan en la respuesta a proteínas mal plegadas, así como su interacción con chaperonas del RE como BIP/grp 78, es la respuesta que obtuvimos en los ensayos. Obtuvimos una inducción de la UPR en respuesta al estrés, mostrando una acumulación de la proteína GFP. Los gusanos GT2 y GT1 presentaban una fluorescencia alta., siendo notablemente mayor en el caso de los gusanos pertenecientes al grupo GT2 indicando un alto nivel de expresión del promotor de la hsp4 desencadenada por el estrés celular en el gusano, sugiriendo que estarían involucrados en el control de calidad en el RE.

Como conclusión, aunque la depleción de estos genes F48E3.3 y F26H9.8. no producen letalidad en el gusano, si provocan cambios morfológicos y alteraciones en el envejecimiento, lo que lleva a pensar que la proteína que codifica para GT con actividad sería la F48E3.3 que ha sido la proteína más afectada durante todo el proyecto de investigación.

Son múltiples las investigaciones que se podrían iniciar a partir de este trabajo de investigación, en las que se utiliza la interferencia de RNAi, para establecer la función de estos genes en particular.

6. CONCLUSIONES

De este un proyecto de investigación se desprenden una serie de conclusiones

En los alineamientos y comparaciones realizadas entre los genes F26H9.8 y F48E3.3 de *C.elegans* y los HUGT1 y HUGT2 de humanos los porcentajes de identidad superan el 30 %, pero no podemos concluir si existió un único evento de duplicación que generó los dos genes F48E3.3 y F26H9.8 y HUGT1 y HUGT2, o si existieron dos eventos independientes que generaron dos duplicaciones y a los genes HUGT1 y HUGT2 (y a la familia de genes homólogos presentes en vertebrados) ya que no se dispone de los datos suficientes para completar el estudio filogenético

Se encontró que en *C. elegans*, el silenciamiento es heredable, ya que los mediadores de interferencia pueden viajar desde las células en que se producen hasta otra célula del organismo, logrando así el silenciamiento génico en el organismo completo y esto lo pudimos observar en nuestro experimento

La inhibición de la expresión de las proteínas codificadas por los genes F483.3 y F26H9.8 no produjo letalidad en el gusano, pero si tuvo efectos obre la supervivencia, la morfología, la puesta de

huevos, la velocidad de crecimiento, los body bends y el envejecimiento

Al realizar los experimentos de silenciamiento génico, se observó que la inhibición de la expresión de los genes F483.3 y F26H9.8 provocó un stress en el RE de *C.elegans*. indicando que las proteínas estarían involucradas en el sistema de control de calidad de glicoproteínas

La dificultad en la realización del movimiento del *C.elegans* sería una consecuencia secundaria de la falta de las proteínas para las cuales sus genes han sido silenciados y esta carencia produciría que algún proceso fisiológico no se lleve a cabo correctamente produciendo alguna alteración en el ciclo celular.

Estos resultados muestran una vez más que la disminución en los movimientos del gusano están relacionados con la disminución de la probabilidad de sobrevivir y que la depleción de estas proteínas GT1 (F26H9.8) y GT2 (F48E3.3) reducen la capacidad de contracción muscular en el gusano, ya sea porque se afecta el funcionamiento del sistema nervioso, o algún proceso fisiológico no puede ser llevado a cabo correctamente lo que provoca que el gusano se inicie un proceso de envejecimiento temprano.

En estos gusanos tratados, las células no se fusionan, migran anormalmente provocando estas aberraciones morfológicas en diversos órganos, incluyendo la vulva, la faringe y el intestino

El estudio del papel que desempeñan las dos proteínas codificadas por los genes F48E3.3 y F26H9.8 en el permitirá conocer más en detalle los procesos moleculares involucrados en el control de calidad del plegamiento de glicoproteínas

Dicho mecanismo se relaciona con un número importante de enfermedades congénitas denominadas enfermedades de plegamiento (folding diseases o conformational diseases). Este conjunto de enfermedades se puede dividir en dos grandes grupos. El primer grupo se caracteriza por la acumulación de proteínas mal plegadas y posterior degradación proteosomal de las glicoproteínas incapaces de plegarse correctamente, como ejemplo de este tipo de enfermedades podemos mencionar a la fibrosis quística y a ciertos tipos de enfisema. El segundo grupo, en cambio, está compuesto por enfermedades caracterizadas por la acumulación de proteínas mal plegadas que forman placas insolubles en diversos órganos, en este grupo podemos mencionar a la enfermedad de Alzheimer's, la enfermedad de Parkinson y la diabetes tipo II .

El objetivo general del proyecto consiste en esclarecer el papel que desempeña cada una de las dos proteínas codificadas en el genoma de *C.elegans* con putativa actividad de GT en el control de calidad del plegamiento de glicoproteínas y tratar de utilizar los

resultados obtenidos para analizar posteriormente el papel que desempeña la proteína codificada por el gen HUGT2 en humanos.

BIBLIOGRAFIA

- 1-Johnson A. E. y van Waes, M. A. (1999). *Ann. Rev. Cell Dev Biol.* 15, 799-842.
- 2- Karaoglu, D., Kelleher D. J. y Gilmore R. (2001) *Biochemistry*, 40, 12193-12206.
- 3- Kornfeld, R., y Kornfeld, S (1985) *Annu. Rev. Biochem.* 54, 631-664
- 4-Huffaker, T.C., y Robbins, P. W. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 3203-3210
- 5- Parodi, A. J. (2000) *Annu. Rev. Biochem.* 69, 69-95.
- 6- Parodi, A. J. (2000). *Biochem. J.* 348, 1-13.
- 7-Varki, A. (1993) *Glycolbiology* 3., 97-130
- 8- Trombetta E. S. y Parodi A. J. (2002) *Adv. Prot. Chem* 59, 303-344
- 9- Trombetta E. S, Bosch, M . y Parodi A. J. (1989) *Biochemistry* 28, 8108-8116
- 10- Sousa. M Ferrero-García y Parodi A.J. (1992) *Biochemistry* 31, 97-105.
- 11-Anelli T y Sitia R *EMBO J* (2008) 27,315-327
- 12-Caramelo J.J y Parodi A J. *Biol. Chem* (2008) 283,10221-10225
- 13- Fernandez, F, Trombetta E. S, Hellman, U y Parodi A. J. (1994) *J. Biol. Chem.*269, 30701-30706
- 14- Trombetta E. y Parodi AJ. (1992) - *J Biol Chem.* 267 9236-40
- 15-Trombetta SE, Ganán SA, Parodi AJ. (1991) - *Glycobiology.* 2 :155-61
- 16-Fernandez F, D'Alessio C, Fanchiotti S, Parodi AJ. (1998) - *EMBO J.* 17: 877-86.
- 17 Sousa M y Parodi AJ (1995) - *EMBO J.*14 4196-4213
- 18-Caramelo JJ, Castro OA , Alonso L , de Prat-Gay G , y. Parodi AJ (2003) - *Proc Nat. Acad. SciUSA* 100 86-91
- 19- Caramelo JJ, Castro OA, de Prat-Gay G, Parodi AJ (2004) - *J. Biol. Chem* 279, 46280- 46285
- 20- Guerin M y Parodi AJ. (2003) *J- Biol Chem.* 278:20540-6
- 21-Arnold SM, Kaufman RJ. (2003) *J- Biol Chem:* 278: 43320-8
- 22-Arnold SM, Fessler LI, Fessler JH, Kaufman RJ.- *Biochemistry.* 39 2149-63
- 23 Schroder M, Kaufman RJ (2005) – *Annu. Rev. Biochem.* 2005;74:739-89
- 24- Lee Dukgyu Lee et al *J.Mol. Bio.* (2007) 372, 331-340
- 25-B aran R Aronoff R y Garriga G. *Development* (1999) 1262241-2251
- 26- Urano et al, 2000^a
- 27- Nakagawa et al. (2000)
- 28-Yoneda et al. (2001)
- 29- Y. Ma, L. M. Hendershot, *Cell* 107, 827 (2001).

- 30- Yoshida et al. (1998 y 2001a)
- 31- Shi et al. (1998)
- 32- Harding et al. (1999)
- 33- K. Zhang, R. J. Kaufman, J. Biol. Chem. 279, 25935 (2004).
- 34- H. Yoshida et al., Dev. Cell 4, 265 (2003)
- 35- J. Ye et al., Mol. Cell 6, 1355 (2000).
- 36- R. J. Kaufman et al., Nat. Rev. Mol. Biol. 3, 411 (2002).
- 37- H. P. Harding, M. Calton, F. Urano, I. Novoa, D. Ron, Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 18, 575 (2002).
- 38- Guerin M, Parodi AJ. The UDP-glucose:glucoprotein glucosyltransferase is organized in at least two tightly bound domains from yeast to mammal. 2003
- Guo and Kemphues. par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. Cell. 1995 May 19;81 :611-20.
- 39- Fire, A. et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. Nature 391, 806-811 (1998)
- 40- [www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Undefined&name=Caenorhabditis elegans &lvl=0&srchmode=1](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Undefined&name=Caenorhabditis%20elegans&lvl=0&srchmode=1)
- 41- wormatlas.org/handbook/anatomyintro/anatomyintro.htm.
- 42- Hurlley, S. M. & Helenius (1989). Annu. Rev. Cell Biol. 5, 277-308
- 43- Int J Biochem Cell Biol. 2008;40:1403-14.
- 44- Timmons and Fire, Nature 395, 854.
- 45- Gene, 263, 103-112.
- 46- Herndon, LA; Schmeissner, PJ; Dudaronek, JM; Brown, PA; Listner, KM; Sakano, Y; Paupard, MC; Hall, DH; Driscoll, M. Stochastic and genetic factors influence tissue-specific decline in ageing *C. elegans*. Nature. 2002;419:808-814. [PubMed]
- 47- D. Uccelletti*, A. Pascoli*, F. Farina†, A. Alberti‡, P. Mancini§, C. B. Hirschberg||, and C. Palleschi. APY-1, a Novel *Caenorhabditis elegans* Apyrase Involved in Unfolded Protein Response Signalling and Stress Responses. June 8, 2007; Revised January 4, 2008; Accepted January 10, 2008. Monitoring Editor: Benjamin Glick
- 48- Chow, D.K., Glenn, C.F., Johnston, J.L., Goldberg, I.G., and Wolkow, C.A. (2006). Sarcopenia in the *Caenorhabditis elegans* pharynx correlates with muscle contraction rate over lifespan. Exp. Gerontol. 41, 252-260.
- 49- White et al, 1986 egg laying.
- 50- Paul W. Sternberg. Vulval development. Wormbook.
- 51- Fire, Xu et al. 1998
- 52- Hosono, R., Sato, Y., Aizawa, S. I. & Mitsui, Y. (1980) Exp. Gerontol. 15,285-289.
- 53- H Huang, C; Xiong, C; Kornfeld, K. Measurements of age-related changes of physiological processes that predict lifespan of *Caenorhabditis elegans*. Proc Natl Acad Sci. 2004;101:8084- 8089. [PubMed]

- 54- Guerin M, Parodi AJ. The UDP-glucose:glucoprotein glucosyltransferase is organized in at least two tightly bound domains from yeast to mammal. 2003
- Guo and Kemphues. *par-1*, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell*. 1995 May 19;81 :611-20.
- 55- Kamel, H. Sarcopenia and aging. *Nutr Rev*. 2003;61:157-167. [PubMed]
- 56- Asikainen S, Heikkinen L, Wong G, Storvik M. Functional characterization of endogenous siRNA target genes in *Caenorhabditis elegans*. *BMC Genomics*. 2008 Jun 3;9:270
- 57- Albertson, D.G., and Thomson, J.N. (1976). The pharynx of *Caenorhabditis elegans*. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 275, 299-325.
- 58- Rea, SL; Wu, D; Cypser, JR; Vaupel, JW; Johnson, TE. A stress-sensitive reporter predicts longevity in isogenic populations of *Caenorhabditis elegans*. *Nat Genet*. 2005;37:894-898. [PubMed]
- 59- Tavi S. Kamath and Julie Ahringer. Genome-wide RNAi screening in *Caenorhabditis elegans* (2003)
- 60- Fuchs F, Boutros M. Cellular phenotyping by RNAi., *Brief Funct Genomic Proteomic*. 2006 Mar;5(1):52-6. Epub 2006 Feb 23
- 61- James F. Morley, and Richard I. Morimoto Regulation of Longevity in *Caenorhabditis elegans* by Heat Shock Factor and Molecular Chaperones *Mol Biol Cell*. 2004 -Feb ; 6547-64
- 62- M . Fujiwara , P . Sengupta , S . McIntire. Regulation of Body Size and Behavioral State of *C. elegans* by Sensory Perception and the EGL-4 cGMP-Dependent Protein Kinase . *Neuron* , Volume 36 , Issue 6 , Pages 1091 – 1102
- 63- Herndon, L. A., Schmeissner, P. J., Dudaronek, J. M., Brown, P. A., Listner, K. M., Sakano, Y., Paupard, M. C., Hall, D. H. & Driscoll, M. (2002) *Nature* 419, 808-814.
- 64- Schafer WF. Genetics of egg-laying in worms, *Annu Rev Genet*. 2006;40:487-509.
- 65-Trent C, Tsuing N, Horvitz HR. Egg-laying defective mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. 1983 Aug;104(4):619-
- 66-Minniti AN, Labarca M, Hurtado C, Brandan E. *Caenorhabditis elegans* syndecan (SDN-1) is required for normal egg laying and associates with the nervous system and the vulva. *J Cell Sci*. 2004 Oct 1;117(Pt 21):5179-90.
- 67-Lee SJ, Yook JS, Han SM, Koo HS. A Werner syndrome protein homolog affects *C. elegans* development, growth rate, life span and sensitivity to DNA damage by acting at a DNA damage checkpoint. *Development*. 2004 Jun;131(11):2565-75. Epub 2004 Apr 28.
- Minniti AN, Labarca M, Hurtado C, Brandan E. *Caenorhabditis elegans* syndecan (SDN-1) is required for normal egg laying and associates

with the nervous system and the vulva. J Cell Sci. 2004 Oct 1;117(Pt 21):5179-90.

68- D. Uccelletti*, A. Pascoli*, F. Farinat, A. Alberti†, P. Mancini§, C. B. Hirschberg||, and C. Palleschi. APY-1, a Novel *Caenorhabditis elegans* Apyrase Involved in Unfolded Protein Response Signalling and Stress Responses. June 8, 2007; Revised January 4, 2008

69- Castro OA , Alonso L , de Prat-Gay G , y. Parodi AJ (2003) - Proc Nat. Acad. SciUSA 100 86-91

70-Kamel, H. Sarcopenia and aging. Nutr Rev. 2003;61:157-167. [PubMed]

71-Asikainen S, Heikkinen L, Wong G, Storvik M. Functional characterization of endogenous siRNA target genes in *Caenorhabditis elegans*. BMC Genomics. 2008 Jun 3;9:270

72-Albertson, D.G., and Thomson, J.N. (1976). The pharynx of *Caenorhabditis elegans*. Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci. 275, 299-325.

Oungor Ouedoun