

Universidad de Salamanca-CSIC
Departamento de Microbiología y Genética
Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer

*Identificación del gen ccz-1 como
un nuevo elemento en la ruta de degradación de
cuerpos apoptóticos en Caenorhabditis elegans*

Tesis Doctoral
María Cristina Nieto García
Salamanca, 2011

Directores: Dr. Sergio Moreno Pérez
y Dr. Juan Cabello Pardos

Universidad de Salamanca-CSIC
Departamento de Microbiología y Genética
Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer

Tesis Doctoral:
**“Identificación del gen *ccz-1* como un nuevo
elemento en la ruta de degradación de cuerpos
apoptóticos en *Caenorhabditis elegans*”**

Doctorando: María Cristina Nieto García

Directores de la tesis:

- Dr. Sergio Moreno Pérez

Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas en el Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer de Salamanca.

- Dr. Juan Cabello Pardos

Investigador del Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer de Salamanca y Jefe del Grupo de Investigación de la Unidad de Proliferación y Diferenciación en Cáncer del Centro de Investigación Biomédica de La Rioja.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis directores de tesis todo el apoyo que me han brindado durante estos años, sin el cuál este trabajo no habría sido posible. A Sergio, por haber depositado tu confianza en mí, al aceptarme en un grupo de investigación excelente, por tus sabios consejos y por tu comprensión en todo momento. A Juan, por tu paciencia infinita conmigo, por todos los conocimientos y experiencias que has sabido transmitirme durante este periodo, por tu optimismo frente a las adversidades y por contagiarme tu entusiasmo por la ciencia en general, y por el “gusano”, en particular. Me considero muy afortunada por haber podido contar con vosotros dos, magníficas personas e investigadores, como directores de este proyecto.

Gracias también a todos los que habéis estado a mi lado durante estos años, haciendo más llevadero y más sencillo este trabajo:

A todos mis compañeros del laboratorio 10, tanto a los que siguen allí, como a los que se marcharon, por vuestra inestimable ayuda, por estar siempre dispuestos a explicarme mis mil dudas y darme ánimos para seguir, gracias por aguantar con paciencia mi inexperiencia y por haber hecho más agradable el trabajo en el día a día con vuestro buen humor y alegría. Para mí habéis sido unos compañeros maravillosos y os admiro a cada uno de vosotros por vuestra valentía a la hora de afrontar todos los retos que la ciencia y la vida ha puesto en vuestro camino. A todos vosotros, AnaE, AnaB, Anal, Noelia, Javi, Livia, Cristina, Irene, Miriam, muchísimas gracias por todo.

Al resto de compañeros y personal del Centro de Investigación del Cáncer, especialmente a los del laboratorio 5, por su ayuda, su generosidad y simpatía en todo momento.

A todos vosotros, mis amigos del CIC, por estar ahí siempre que lo he necesitado, con vuestras palabras de cariño y apoyo, compartiendo vuestras dudas, tristezas y alegrías conmigo.

Agradecimientos

A toda la gente del laboratorio del Dr. Hengartner, en Suiza, por hacer que los cuatro meses que estuve allí fuesen inolvidables, por enseñarme tantas cosas en tan poco tiempo y por acogerme tan bien en su laboratorio. Gracias en especial a Johann y Stephan por su colaboración en mi proyecto.

A mis amigas de toda la vida, Miri, Cris, Ana Cinos, Ana piper, Bea, Ali, por animarme siempre y ayudarme a superar los malos momentos, por compartir conmigo todos los buenos momentos que hemos vivido juntas, por vuestra amistad durante tantos y tantos años, por interesaros por mi trabajo, a pesar de ni siquiera entender muy bien de qué os estaba hablando. Sabéis que siempre, esté donde esté, podréis contar conmigo.

Al resto de mis amigos, incluidos aquellos que me han ayudado a comenzar una nueva vida, por estar a mi lado, por aguantarme cuando me quejo, por enseñarme a desconectar y a disfrutar de la vida, y por regalarme vuestra amistad.

A mi familia, en especial, a mis hermanos, y sobre todo, a mis padres, porque todo lo que soy es gracias a vosotros, porque sin vuestro apoyo nunca habría llegado hasta aquí, y porque siempre habéis luchado por darme lo mejor que me podíais ofrecer, vuestro amor, vuestra comprensión y una buena educación. Ya sabéis, lo mucho que os quiero.

Y por último, a ti, Álvaro, por haberte cruzado en mi camino, por haberte convertido en este tiempo en la persona más cercana a mí, por tu amor y por toda la paciencia que tienes conmigo, por haber sabido cómo construir un puente para cruzar el río que nos separa. Sabes que te quiero mucho y me gustaría dedicarte este trabajo, porque sin tus ánimos y tu ayuda nunca lo hubiera realizado.

RESUMEN

Durante el desarrollo, los procesos de división celular, diferenciación y apoptosis deben estar coordinados de forma precisa para poder mantener la homeostasis de los tejidos. El nematodo *Caenorhabditis elegans* es un organismo modelo muy importante en el estudio de la muerte celular y su control. Las células apoptóticas en *C. elegans* se condensan y forman cuerpos refráctiles a la luz, que pueden ser observados mediante microscopía de contraste interferencial (DIC) o Nomarski. La activación de la GTPasa CED-10 (Rac) en una célula vecina controla el reconocimiento y la fagocitosis del cuerpo apoptótico. Posteriormente a la inclusión del cuerpo fagocitado en el interior del fagosoma, diferentes proteínas son reclutadas secuencialmente sobre la superficie de este orgánulo, promoviendo su acidificación y su fusión con los lisosomas, y provocando la degradación enzimática del cuerpo apoptótico. En este trabajo se muestra que la proteína CCZ-1, la cuál está conservada desde levaduras hasta humanos, participa en la digestión de dichos cuerpos apoptóticos. La proteína CCZ-1 parece actuar además en la biogénesis de lisosomas, así como en la maduración del fagosoma mediante el reclutamiento de la GTPasa RAB-7 sobre el fagosoma.

During development, the processes of cell division, differentiation and apoptosis must be precisely coordinated in order to maintain tissue homeostasis. The nematode C. elegans is a powerful model system in which to study cell death and its control. C. elegans apoptotic cells condense and form refractile corpses under differential interference contrast (DIC) microscopy. Activation of the GTPase CED-10 (Rac) in a neighbouring cell mediates the recognition and engulfment of the cell corpse. After inclusion of the engulfed corpse in a phagosome, different proteins are sequentially recruited onto this organelle to promote its acidification and fusion with lysosomes, leading to the enzymatic degradation of the cell corpse. In this project, it is shown that CCZ-1, a protein conserved from yeasts to humans, mediates the digestion of these apoptotic corpses. CCZ-1 seems to act in lysosome biogenesis and phagosome maturation by recruiting the GTPase RAB-7 over the phagosome.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

INTRODUCCIÓN

| | |
|---|----|
| 1. <i>Caenorhabditis elegans</i> | 1 |
| 1.1. <i>C. elegans</i> como organismo modelo..... | 1 |
| 1.2. Ciclo de vida y embriogénesis de <i>C. elegans</i> | 7 |
| 1.3. Anatomía de <i>C. elegans</i> | 16 |
| 2. Bases moleculares de la apoptosis | 26 |
| 2.1. Descubrimiento de la apoptosis..... | 26 |
| 2.2. Rutas que conducen a la apoptosis..... | 30 |
| 2.3. La apoptosis a nivel fisiológico y a nivel patológico..... | 37 |
| 2.4. El proceso de apoptosis en <i>C. elegans</i> | 41 |
| 3. La fagocitosis y degradación de cuerpos apoptóticos | 48 |
| 3.1. Relevancia de los procesos..... | 48 |
| 3.2. La fagocitosis de las células apoptóticas en <i>C. elegans</i> | 49 |
| 3.3. La degradación de los cuerpos apoptóticos en <i>C. elegans</i> | 55 |
| OBJETIVOS | 65 |

MATERIALES Y MÉTODOS

| | |
|--|----|
| 1. Cepas de <i>Caenorhabditis elegans</i> | 71 |
| 2. Cepas de <i>Escherichia coli</i> | 78 |
| 3. Medios y condiciones de cultivo | 79 |
| 3.1. Cultivo de las cepas de <i>C. elegans</i> | 79 |
| 3.2. Cultivos de <i>E. coli</i> | 79 |
| 3.3. Limpieza de las cepas..... | 80 |
| 3.4. Congelación de las cepas..... | 80 |
| 4. Mutagénesis con Etilmetanosulfonato (EMS) | 81 |
| 5. Complementación de cepas | 82 |
| 6. Análisis de ácidos nucleicos | 84 |
| 6.1. Métodos de extracción..... | 84 |
| 6.1.1. Extracción de DNA genómico de <i>C. elegans</i> | 84 |
| 6.1.2. Extracción de RNA de <i>C. elegans</i> | 84 |
| 6.1.3. Extracción de plásmidos de <i>E. coli</i> | 85 |

Índice de contenidos

| | |
|---|------------|
| 6.2. Amplificación de DNA: Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) | 85 |
| 6.2.1. Oligonucleótidos | 85 |
| 6.3. Reacción en cadena de la polimerasa en transcripción reversa (RT-PCR) | 87 |
| 6.4. Procesamiento de fragmentos de DNA | 88 |
| 6.4.1. Separación de DNA mediante electroforesis | 88 |
| 6.4.2. Purificación de moléculas de DNA..... | 88 |
| 6.4.3. Digestión de moléculas de DNA | 88 |
| 6.4.4. Desfosforilación de moléculas de DNA..... | 88 |
| 6.4.5. Ligación de fragmentos de DNA | 89 |
| 6.4.6. Secuenciación de DNA | 89 |
| 6.5. Construcciones de los plásmidos pCN1 y pCN2 | 89 |
| 7. Técnicas de microscopía | 94 |
| 7.1. Microscopía de contraste interferencial (Nomarski) y fluorescencia..... | 94 |
| 7.2. Microscopía en 4D | 94 |
| 7.3. Cuantificación de los cuerpos apoptóticos en la gónada del hermafrodita adulto | 96 |
| 7.4. Migración de la gónada..... | 97 |
| 7.5. Tinción con naranja de acridina | 98 |
| 7.6. Microscopía electrónica | 99 |
| 7.7. Análisis de las proteínas de la ruta de maduración de los fagosomas | 101 |
| 8. Análisis mediante snip-SNP | 101 |
| 9. Inactivación genética mediante RNA de interferencia | 106 |
| 10. Técnicas de transformación | 109 |
| 10.1. Transformación de <i>E. coli</i> | 109 |
| 10.2. Transformación de <i>C. elegans</i> mediante microinyección | 109 |
| 10.3. Transformación de <i>C. elegans</i> con cañón de partículas..... | 115 |
| 11. Tratamiento informático de los datos | 120 |

RESULTADOS

| | |
|--|------------|
| 1. Escrutinio de mutantes con letalidad embrionaria..... | 123 |
| 2. Caracterización fenotípica de los mutantes <i>t2129</i>, <i>t2070</i> y <i>t2170</i> | 125 |
| 2.1. Caracterización fenotípica embrionaria | 125 |
| 2.2. Caracterización fenotípica del mutante hermafrodita adulto..... | 135 |
| 2.2.1. Cuantificación de la acumulación de los cuerpos apoptóticos de la línea germinal..... | 135 |
| 2.2.2. Migración de la gónada..... | 138 |

| | |
|---|------------|
| 2.2.3. Tinción con naranja de acridina..... | 139 |
| 2.2.4. Microscopía electrónica del hermafrodita adulto | 140 |
| 3. Mapeo del gen afectado en los mutantes <i>t2129</i>, <i>t2070</i> y <i>t2170</i>..... | 143 |
| 3.1. Complementación con deleciones..... | 143 |
| 3.2. Mapeo del gen mutado utilizando snip-SNP | 145 |
| 3.2.1. Análisis mediante snip-SNP | 145 |
| 3.2.2. Análisis de heterocigotos para <i>t2129</i> con el primer snip-SNP | 153 |
| 3.2.3. Análisis de heterocigotos para <i>t2129</i> con el segundo snip-SNP..... | 154 |
| 3.2.4. Análisis de heterocigotos para <i>t2129</i> con el tercer snip-SNP | 155 |
| 3.2.5. Análisis de homocigotos para <i>t2129</i> con el tercer snip-SNP..... | 156 |
| 3.2.6. Análisis de homocigotos para <i>t2129</i> con el cuarto snip-SNP..... | 157 |
| 3.3. Comprobación de genes letales embrionarios mediante RNA de interferencia..... | 159 |
| 3.4. Inyección de cósmidos del intervalo genético | 161 |
| 3.5. Revisión bibliográfica de los genes del intervalo..... | 162 |
| 3.6. Experimento de RNAi con el gen candidato..... | 164 |
| 3.7. Secuenciación del gen <i>ccz-1</i> en los mutantes <i>t2129</i> , <i>t2070</i> y <i>t2170</i> | 165 |
| 3.8. Complementación con la cepa <i>ccz-1 (ok2182)</i> | 167 |
| 3.9. Rescate del mutante <i>t2129</i> con el gen <i>ccz-1</i> | 169 |
| 3.10. Análisis del RNA mensajero de los mutantes <i>t2129</i> , <i>t2070</i> y <i>t2170</i> y de la cepa <i>ccz-1 (ok2182)</i> | 174 |
| 4. Caracterización de la función de la proteína CCZ-1 en la ruta de maduración de fagosomas | 177 |
| 4.1. Análisis de la localización de las proteínas de la ruta en el silvestre y en el mutante <i>ccz-1</i> | 179 |
| 4.1.1. Estudio de la actividad de la quinasa VPS-34..... | 180 |
| 4.1.2. Análisis del reclutamiento de la GTPasa RAB-5 | 182 |
| 4.1.3. Análisis del reclutamiento de la GTPasa RAB-7 | 183 |
| 5. Análisis de la influencia de los genes de la ruta de maduración de los fagosomas sobre la localización de CCZ-1::YFP | 186 |
| 5.1. Influencia del gen <i>dyn-1</i> sobre la localización de CCZ-1::YFP | 186 |
| 5.2. Influencia del gen <i>vps-34</i> sobre la localización de CCZ-1::YFP..... | 187 |
| 5.3. Influencia del gen <i>rab-5</i> sobre la localización de CCZ-1::YFP | 188 |
| 5.4. Influencia del gen <i>sand-1</i> sobre la localización de CCZ-1::YFP | 189 |
| 5.5. Influencia del gen <i>rab-7</i> sobre la localización de CCZ-1::YFP | 191 |
| 5.6. Influencia de varios genes del complejo HOPS (<i>vps-16</i> , <i>vps-18</i> y <i>vps-11</i>) sobre la localización de CCZ-1::YFP | 192 |

Índice de contenidos

| | |
|--|-----|
| 6. Cuantificación de los cuerpos apoptóticos embrionarios y de la línea germinal en diferentes mutantes de la ruta de maduración de fagosomas .. | 194 |
| 7. Identificación de células supervivientes en un doble mutante <i>ced-3 (n717); ccz-1 (t2129)</i> | 197 |
| 8. Análisis de la sobreexpresión de RAB-7 en un mutante <i>ccz-1 (t2129)</i> | 199 |
| 9. Estudio del origen de las vesículas presentes en los embriones de los mutantes <i>t2129, t2070</i> y <i>t2170</i> | 200 |
| 10. Observación de la biogénesis de los lisosomas mediante tinción con naranja de acridina | 201 |
| 11. Análisis del patrón de expresión de la proteína CCZ-1::YFP | 203 |

DISCUSIÓN

| | |
|---|-----|
| 1. Los mutantes <i>t2129, t2070</i> y <i>t2170</i> de <i>C. elegans</i> tienen mutado el gen <i>ccz-1</i> | 207 |
| 2. Localización y función del complejo SAND-1/CCZ-1 en la ruta de degradación de los cuerpos apoptóticos | 212 |
| 3. Implicación del gen <i>ccz-1</i> en la ruta endocítica y en la biogénesis de los lisosomas | 220 |
| 4. Relación entre el complejo SAND-1/CCZ-1 y la ruta de señalización Wnt | 221 |

| | |
|---------------------------|-----|
| <i>CONCLUSIONES</i> | 229 |
|---------------------------|-----|

| | |
|---------------------------|-----|
| <i>BIBLIOGRAFÍA</i> | 233 |
|---------------------------|-----|

| | |
|---------------------------|-----|
| <i>ABREVIATURAS</i> | 267 |
|---------------------------|-----|

INTRODUCCIÓN

1. *Caenorhabditis elegans*

1.1. *C. elegans* como organismo modelo

El nematodo *Caenorhabditis elegans* fue establecido como un organismo modelo para el estudio del desarrollo animal, por Sydney Brenner en 1965. Inicialmente, este organismo había sido descrito en 1900 por Maupas como *Rhabditis elegans*, modificándose posteriormente su nombre. En investigación se han utilizado dos cepas diferentes de *C. elegans*: la cepa Bergerac, que fue aislada en Francia por V. Nigon en 1949, y la cepa Bristol, aislada por L.N. Staniland en Bristol (Inglaterra), en 1959. Debido a que la cepa Bergerac presentaba una alta frecuencia de mutaciones espontáneas y que los machos de dicha cepa son menos fértiles que los de la cepa Bristol, prácticamente la totalidad de las cepas utilizadas actualmente derivan de la cepa Bristol. En concreto, la cepa N2 obtenida por Sydney Brenner a partir de la cepa Bristol, es la cepa silvestre de referencia. Por otra parte, la especie *Caenorhabditis briggsae*, la cuál fue aislada en Stanford por M. Briggs en 1954, ha sido utilizada también como organismo modelo. Sin embargo, esta cepa ha acumulado numerosas mutaciones durante su utilización, por lo que apenas se usa actualmente (*C. elegans* II, CSHL, 1997)

A partir del aislamiento de las cepas de *C. elegans*, se llevaron a cabo numerosas investigaciones que permitieron descubrir los aspectos principales de dicho organismo. Por ejemplo, el ciclo sexual de *C. elegans*, así como el número haploide de cromosomas que posee, fue determinado en 1949 por Nigon. En 1959, Dougherty y sus colaboradores realizaron un amplio estudio sobre la nutrición y el crecimiento de *C. elegans* y otros nematodos relacionados. A mediados de los años 60, Brenner comenzó su proyecto sobre *C. elegans* para conseguir establecer la genética del organismo silvestre y generar los primeros mutantes.

Brenner trató cultivos de nematodos hermafroditas con una solución de etilmetanosulfonato (EMS), un agente mutagénico alquilante. Se identificaron aproximadamente 300 mutaciones inducidas por EMS, la mayoría de las cuales eran recesivas, que permitieron la caracterización de más de 100 genes (Brenner, 1974; revisado por Ankeny R., 2001; *C. elegans II*, CHSL, 1997).

Dado que el objetivo principal de Brenner para la elección del organismo modelo fue el estudio del desarrollo animal y la neurofisiología, decidió continuar su proyecto realizando una descripción detallada de la estructura neuronal del nematodo. Para poder conseguirlo, Brenner y White, junto con otros miembros de su grupo, reconstruyeron la arquitectura del sistema nervioso del nematodo a partir de microfotografías en serie realizadas mediante microscopía electrónica. El proyecto fue finalizado en 1984 y publicado dos años más tarde en un extenso artículo denominado abreviadamente "The mind of a worm", en el cual se incluían diagramas que representaban cada célula nerviosa y sus conexiones. A partir de este estudio, se concluyó que *C. elegans* poseía 302 neuronas que formaban más de 8000 sinapsis en un hermafrodita (White et al., 1986; revisado por Ankeny R., 2001). Posteriormente, John Sulston y sus colaboradores llevaron a cabo una descripción completa del linaje celular de *C. elegans*, al publicar el linaje celular embrionario completo en 1983 (Sulston et al., 1983). El conocimiento del linaje celular permitió establecer correlaciones entre diversas mutaciones y procesos del desarrollo, realizando estudios de ablación celular. En el año 2002, Sydney Brenner, John E. Sulston y H. Robert Horvitz fueron galardonados con el Premio Nobel de Medicina por su labor en el desciframiento del linaje celular de *C. elegans* y en el establecimiento de la ruta genética de la apoptosis.

Este organismo modelo ha permitido realizar varios descubrimientos relevantes tanto en biología básica como aplicada. Por ejemplo, en 1993, se descubrió en *C. elegans* la primera presenilina (Sundaram y Greenwald, 1993).

Posteriormente, se encontraron mutaciones en el homólogo humano de dicha proteína en pacientes con enfermedad de Alzheimer, identificándose como una proteína clave en la etiología de esta enfermedad (Sherrington et al., 1995). Otro importante descubrimiento biomédico consistió en la identificación de reguladores negativos de la ruta de señalización de la insulina en *C. elegans* en 1997, como el gen *daf-16* (Ogg et al., 1997). Dicho gen es el ortólogo del factor de transcripción de mamíferos FOXO. Años más tarde, se comprobó que la pérdida de función del factor FOXO permitía rescatar el fenotipo diabético de ratones resistentes a la insulina (Nakae et al., 2002). A nivel farmacológico, *C. elegans* puede servir como organismo modelo para estudiar el mecanismo de acción de diversos fármacos. Por ejemplo, se comprobó que el antidepresivo fluoxetina era capaz de incrementar la señalización serotoninérgica en *C. elegans*, mediante inhibición del transportador de recaptación de la serotonina (Ranganathan et al., 2001).

En 1998, el genoma de *C. elegans* fue completamente secuenciado, habiendo sido incluido previamente como organismo modelo en el Proyecto del Genoma Humano (The *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998). La comparación del genoma humano con el de *C. elegans*, así como numerosos estudios realizados utilizando este animal como organismo modelo, han permitido establecer que existe una alta conservación de las rutas moleculares y celulares entre nematodos y mamíferos, y que la mayoría de los genes implicados en enfermedades humanas se encuentran en *C. elegans* (The *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998). En la actualidad, *C. elegans* es utilizado para estudiar gran variedad de procesos biológicos, entre los cuáles se incluyen: apoptosis, ciclo celular, señalización celular, regulación genética, envejecimiento, comportamiento, determinación sexual, metabolismo, etc (revisado por Ankeny R, 2001 y por Kaletta y Hengartner, 2006).

Los nematodos son organismos capaces de crecer en la mayoría de los hábitats, tanto terrestres como marinos, bien alimentándose de bacterias o bien parasitando a gran variedad de plantas y animales. De igual modo, *C. elegans* habita en numerosos entornos, de forma no parasitaria, alimentándose de bacterias. Tiene un ciclo de vida muy rápido de 3,5 días a 20°C y una vida media en la fase adulta de 2 a 3 semanas en condiciones favorables (The nematode *C. elegans*, CHSL, 1988). *C. elegans* presenta numerosas ventajas como organismo modelo, ya que se trata de un organismo simple, tanto a nivel anatómico como genético. El adulto hermafrodita contiene únicamente 959 núcleos somáticos y el adulto macho, tan sólo 1031. De estas células, 302 son las neuronas que componen el sistema nervioso (*C. elegans II*, CHSL, 1997).

Además, su cultivo en el laboratorio es muy sencillo y es posible realizarlo a gran escala, pudiendo crecer los nematodos tanto en placas Petri de agar como en cultivo líquido, utilizando *Escherichia coli* como alimento. Tiene un tamaño de aproximadamente 1mm de longitud y 80µm de diámetro, y es fácilmente manipulable con ayuda de un microscopio de disección o lupa binocular (Figura 1.1). La transparencia a la luz que presentan estos animales permite la visualización de las células y órganos del individuo mediante microscopía Nomarski. Su pequeño tamaño ha permitido además la realización de una descripción anatómica completa del animal a nivel de microscopía electrónica (The nematode *C. elegans*, CHSL, 1988).

Otra de las ventajas que presenta este organismo es que las cepas de *C. elegans* pueden ser almacenadas indefinidamente en nitrógeno líquido, permitiendo la posibilidad de mantener grandes colecciones de mutantes. El desarrollo es reproducible de un individuo a otro, con un linaje celular prácticamente invariable, siendo constante el número y la posición de cada célula. Se pueden obtener mutantes mediante mutagénesis química, tras la exposición a radiación ionizante o por inserción de transposones (*C. elegans II*, CHSL, 1997).



Figura 1.1. Visualización de *C. elegans* mediante lupa binocular y su cultivo en placas Petri con agar.

Dado que el genoma de *C. elegans* es pequeño y ha sido secuenciado en su totalidad es posible hacer estudios genéticos reversos mediante la inactivación de genes utilizando RNA de interferencia (RNAi). Su genoma contiene aproximadamente unos cien millones de pares de bases y se estima que entre un 60-80% de sus genes tienen homología en humanos. Los genes se encuentran distribuidos en seis cromosomas, los cuales son holocéntricos, de forma que sus cinetocoros están dispuestos a lo largo de su longitud, en vez de localizados en un único punto del cromosoma. De estos seis cromosomas, cinco de ellos son autosomas y uno de ellos determinante del sexo (cromosoma X). En *C. elegans* existen dos tipos sexuales: el hermafrodita, diploide para los seis cromosomas (XX), y el macho, que es diploide para los cromosomas autosómicos, pero contiene únicamente un cromosoma X (XO) (Nigon, 1949; revisado por Hodgkin, 2005). Los animales hermafroditas son capaces de producir tanto oocitos como esperma, de manera que el esperma es almacenado en la espermateca y fecunda a los oocitos que van pasando a través de ella, convirtiéndolos en embriones. Los hermafroditas por tanto son capaces de autofecundarse y producir una progenie de aproximadamente 300

Introducción

embriones durante su vida reproductiva. Esta capacidad de reproducción aumenta significativamente cuando un hermafrodita es fecundado por un macho. Los machos pueden aparecer de forma espontánea a partir de poblaciones hermafroditas mediante la eliminación de un cromosoma X, con una frecuencia de aproximadamente 0,1%. Sin embargo, cuando se cruzan un macho y un hermafrodita el porcentaje de machos y hermafroditas producidos es equivalente. El cruce entre ambos sexos permite obtener el genotipo deseado (*C. elegans* // CSHL, 1997; revisado por Markaki y Tavernarakis, 2010).



Figura 1.2. Imagen de un adulto hermafrodita de *C. elegans* obtenida mediante microscopía Nomarski. (Imagen adaptada de <http://www.wormatlas.org>).

La mayoría de la información obtenida por los diferentes grupos de investigación a nivel internacional está disponible en la base de datos pública de *C. elegans* wormbase (<http://www.wormbase.org/>). Esta base de datos fue creada en el año 2000 y es mantenida por un consorcio internacional de biólogos e informáticos. Permite facilitar el intercambio de información referente a *C. elegans* y su accesibilidad a nivel global. Recoge datos acerca de diferentes aspectos del organismo, como por ejemplo: información genética y protéica, mutantes disponibles, estudios genéticos, patrones de expresión, interacciones entre proteínas, fenotipos obtenidos mediante RNAi, datos de microarrays, homología con otros organismos, etc. (revisado por Kaletta, 2006)

Aparte de esta base de datos, existen otros recursos telemáticos en el campo de investigación de *C. elegans*, entre los que se incluyen:

- Wormatlas (<http://www.wormatlas.org>), es una base de datos sobre la estructura anatómica de *C. elegans*, en la cuál se encuentran fotografías realizadas mediante microscopía electrónica de todas las secciones del animal.
- Proyecto ORFeome (<http://worfdb.dfci.harvard.edu>), el cuál predice todos los marcos abiertos de lectura (*open reading frames*: ORFs) que codifican para proteínas.
- Interactoma de *C. elegans* (<http://vidal.dfci.harvard.edu>), contiene mapas de interacción entre las proteínas.
- *C. elegans* SAGE data: (<http://elegans.bcgsc.ca/home/sage.html>), que incluye el análisis de la expresión de genes en diferentes estadios del desarrollo de *C. elegans* y en diferentes tipos de células y tejidos.

1.2. Ciclo de vida y embriogénesis de *C. elegans*

La embriogénesis de *C. elegans* dura aproximadamente 14 horas a 22°C. La primera fase, que dura unas 7 horas, consiste en una proliferación celular muy rápida durante la cuál se sigue un patrón invariable entre un embrión y otro, en lo que respecta a las divisiones celulares, al posicionamiento de las células y a las muertes celulares. Posteriormente, se produce la organogénesis y la morfogénesis, durante la cual se produce la elongación del embrión (The nematode *C. elegans*, CHSL, 1988). La embriogénesis se inicia cuando los oocitos maduros atraviesan la espermateca y son fecundados por el espermatozoides del propio hermafrodita o bien por el espermatozoides de un macho, si se hubiese

producido anteriormente un cruce entre ambos. El oocito fecundado se convierte en un embrión que comienza su desarrollo en el útero del hermafrodita. En este momento, se establece la polaridad anterior-posterior del embrión, ya que el sitio de entrada del pronúcleo del espermatozoide determina el polo posterior (Albertson, 1984). Tras la fecundación, el pronúcleo materno que estaba detenido en la profase de la primera meiosis, finaliza la meiosis (Albertson, 1984; revisado por Marcello y Singson, 2010). Se forma además un caparazón alrededor del embrión, constituido por tres capas: una capa interna de vitellogenina, impermeable a la mayoría de los solutos, otra capa de quitina y una última capa lipídica y proteica. Este caparazón es necesario para generar una barrera osmótica entre el embrión y el medio que le rodea. Adicionalmente, es requerido para la correcta polarización del embrión y para minimizar los errores de segregación del DNA en la meiosis (Johnston et al., 2006).

Durante la embriogénesis se producen cinco divisiones asimétricas que dan lugar a las seis células fundadoras: AB, MS, E, C, D y P₄. La primera división asimétrica comienza aproximadamente a los 35 minutos de la fecundación, formándose dos células: la célula anterior AB de mayor tamaño y la célula posterior P₁ (Sulston et al., 1983) (Figura 1.3).

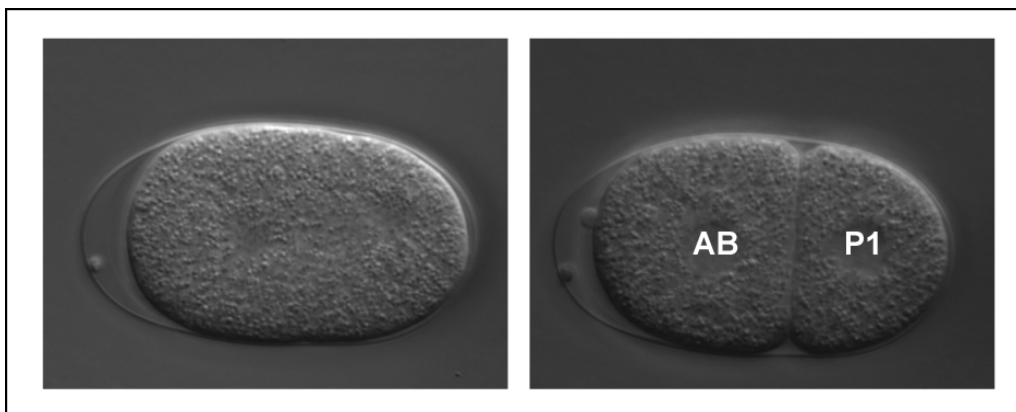


Figura 1.3. Primera división asimétrica del embrión de *C. elegans*. Dicha división da lugar a dos células, una anterior, AB y otra célula posterior de menor tamaño, P₁.

El linaje celular es invariable entre un embrión silvestre y otro. Como se representa en la Figura 1.4, a partir de la célula AB se formarán tejidos hipodérmicos, neuronales, musculares y estructurales, formándose principalmente tejidos del ectodermo. Numerosas células, en concreto 98 de ellas, sufrirán muerte celular. La célula P1 se divide asimétricamente en dos células EMS y P₂. La célula EMS a su vez se divide en dos células: la célula E, que dará lugar al intestino, y la célula MS, que producirá principalmente tejidos musculares y neuronales, aunque también glándulas y células somáticas de la gónada. De igual modo, 14 de estas células se morirán por apoptosis. La célula P₂ se subdivide a su vez en las células C y P₃. La célula C generará tejidos musculares e hipodérmicos principalmente, aunque también algunas neuronas. Una de estas células sufrirá apoptosis. La célula P₃ también se divide en dos células: la célula D, que producirá tejido muscular y la célula P₄, a partir de la cuál se formará la línea germinal (Sulston et al., 1983).

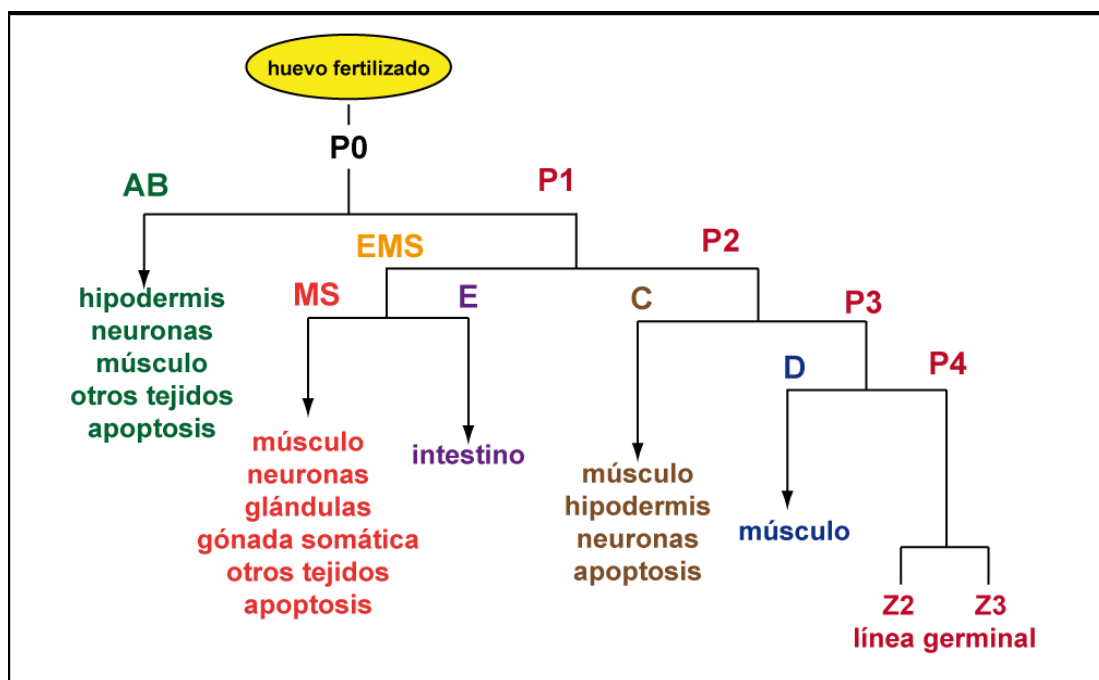


Figura 1.4. Linaje celular de un embrión de *C. elegans*. En la figura se recogen las divisiones celulares principales que se producen durante la embriogénesis, así como los tejidos que se formarán a partir de cada uno de los precursores celulares.

Durante estas divisiones celulares se establecen los tres ejes principales de la estructura del nematodo. El eje antero-posterior es generado cuando el centrosoma derivado del esperma rompe la asimetría del oocito durante la fecundación (Cowan y Hyman, 2004). La primera división asimétrica del cigoto produce una polaridad antero-posterior entre ambas células hijas, existiendo diversas proteínas, como por ejemplo las proteínas PAR, que son distribuidas de forma asimétrica en el embrión y mantienen dicha polaridad (Kemphues et al., 1988; Cheng et al., 1995; revisado por Nance, 2005). El eje dorso-ventral surge en la transición del estadio de dos células al de cuatro células, cuando la célula EMS marca la posición ventral del embrión (Sulston et al., 1983). Por último, el eje izquierda-derecha se establece en la transición entre el estadio de cuatro células al de seis células, cuando las células Abal y ABpl, descendientes de la célula AB, se sitúan en la parte izquierda del embrión (Hutter y Schnabel, 1995).

El destino celular es definido por la segregación desigual de diferentes factores durante el inicio de la embriogénesis. Existen diferentes mecanismos que permiten llevar a cabo este proceso: un transporte dirigido, una degradación localizada y un control de la traducción de los RNA mensajeros aportados maternalmente (Hird et al., 1996). Por ejemplo, debe existir un control del transporte de los gránulos P hacia la parte posterior del embrión. Estos gránulos P son complejos ribonucleoprotéicos destinados a la línea germinal, que inicialmente se encuentran distribuidos de forma uniforme en el embrión. En el momento de la fecundación, se comienzan a transportar hacia la parte posterior del embrión y mediante degradación localizada son eliminados de la parte anterior del mismo (Hird et al., 1996). El destino de la línea germinal viene determinado por la acumulación de estos gránulos P, así como por la represión transcripcional llevada a cabo por el gen *pie-1* y la función de las proteínas MES que permiten la organización de la cromatina (Strome, 2005).

Para poder asegurar una correcta segregación de los factores determinantes del destino celular es necesario el establecimiento de la polaridad, así como un correcto posicionamiento del huso mitótico de la célula. En el embrión de una célula, una vez se ha generado el eje antero-posterior, se producen unos movimientos asimétricos del huso mitótico que permiten una correcta segregación de dichos factores a las células hijas. La primera división asimétrica genera la célula anterior AB y la célula posterior P1. Durante la siguiente división, AB se divide simétricamente, situándose su huso mitótico perpendicular al eje antero-posterior, mientras que el huso mitótico de P1 se mantiene de manera longitudinal a dicho eje. Tanto en las células P0 como P1 se produce una rotación del huso mitótico, que permite orientarlo de forma longitudinal, sobre el eje antero-posterior. Esta rotación está regulada por las proteínas PAR, siendo la proteína PAR-3 la que evita la rotación del huso mitótico de la célula AB, impidiendo que se coloque sobre el eje antero-posterior (Tsou et al., 2003).

Las interacciones celulares que se producen en el embrión de cuatro células permiten distinguir el eje dorso-ventral, situándose la célula EMS en la posición ventral del embrión (Sulston et al., 1983). Las células descendientes de la célula AB expresan el receptor de membrana de la ruta de señalización Notch, GLP-1, activándose dicha ruta en la célula ABp y controlando los destinos celulares de los descendientes de esta célula situados en la parte dorsal del embrión. La expresión del receptor GLP-1 es inducida por el contacto de la célula ABp con la célula P₂, que expresa el ligando de Notch APX-1 (Mello et al., 1994).

El eje izquierda-derecha se establece tras las divisiones de ABa y ABp. Durante la división de dichas células, sus husos mitóticos se mueven hacia la parte anterior, de manera que las células hijas de la parte izquierda del embrión están situadas en una posición más anterior que las de la parte derecha del embrión y sus contactos con otras células son diferentes. Para la determinación

Introducción

de los destinos celulares de la región derecha e izquierda del embrión, se utiliza igualmente la señalización mediante GLP-1, entre los descendientes de la célula AB y de la célula MS (Hutter y Schnabel, 1995).

Posteriormente, se produce la división asimétrica de la célula EMS en la célula E y la célula MS. Las rutas de señalización Wnt y SRC-1/MES-1 permiten la polarización de la célula EMS, de forma que la célula hija más próxima a la célula P₂ se convierte en la célula E, como se observa en la Figura 1.5. Adicionalmente, ambas rutas regulan la orientación del huso mitótico de la célula EMS hacia la célula P₂ (Thorpe et al., 1997; Bei et al, 2002). Se ha comprobado también que la ruta Wnt controla la rotación del huso mitótico de los blastómeros EMS y ABar de un embrión silvestre, ya que se observó que en mutantes que afectaban al receptor MOM-5 de la ruta Wnt, los husos mitóticos de ambos blastómeros se situaban en paralelo en lugar de en perpendicular, como ocurre en un embrión silvestre. Este defecto en la orientación del huso mitótico de los blastómeros EMS y ABar también ha sido observado en mutantes que afectan al gen *ced-10*, el cuál interviene en la ruta de fagocitosis de los cuerpos apoptóticos. La orientación incorrecta del huso mitótico de estos blastómeros provoca una alteración en la asimetría izquierda-derecha del embrión, provocando fallos en la morfogénesis del embrión (Cabello et al., 2010).

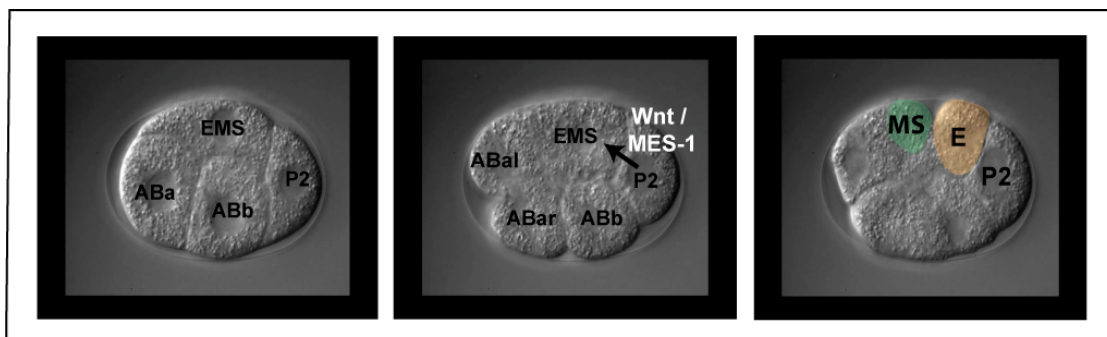


Figura 1.5. Control de la división de la célula EMS mediante la señalización Wnt y SRC-1/MES-1. La célula P₂ controla la división de la célula EMS, de manera que la célula más próxima a ella se convierte en la célula E, que dará lugar al endodermo.

Después de la división de EMS, la célula P_2 se divide asimétricamente produciendo las células C y P_3 , y ésta última se dividirá para generar D y P_4 (Sulston et al., 1983). Tanto la posición de las células P_2 y P_3 , así como la orientación de las divisiones tiene una polaridad reversa respecto a la de las primeras divisiones del embrión, que es regulada mediante la señalización de MES-1 (Berkowitz y Strome, 2000). Las interacciones celulares y las divisiones asimétricas permiten la localización específica de diferentes factores determinantes del destino celular, que regulan el patrón de división celular y de desarrollo del embrión (*C. elegans II*, CHSL, 1997).

La gastrulación comienza aproximadamente 100 minutos después de la primera división, en el estadio de 26 células. En ese momento las dos células E_a y E_p se retraen hacia una cavidad interior del embrión denominada blastocele, como se puede observar en la Figura 1.6 y en el Vídeo 1.1. La formación del blastocele es regulada por la localización de las proteínas PAR, en concreto, PAR-3 (Nance y Priess, 2002; Nance, 2005). El movimiento de las células E_a y E_p libera un espacio entre dichas células y la cobertura de vitellogenina, que es ocupado por seis células vecinas: tres descendientes de la célula MS, dos de la célula AB y la célula P_4 . Estos movimientos son controlados mediante la actividad contráctil de la miosina. Posteriormente, la zona de entrada se ensancha y se alarga y los mioblastos procedentes de los linajes C y D, así como las células precursoras de la faringe derivadas de la célula AB, se internalizan (Figura 1.6) Las células del interior se dividen formando un cilindro central y se cierra la abertura originada al internalizarse las células. Durante la organogénesis continúan formándose los diferentes tejidos a partir de cada célula precursora (Labouesse y Mango, 1999; Nance y Priess, 2002; Lee y Goldstein, 2003).

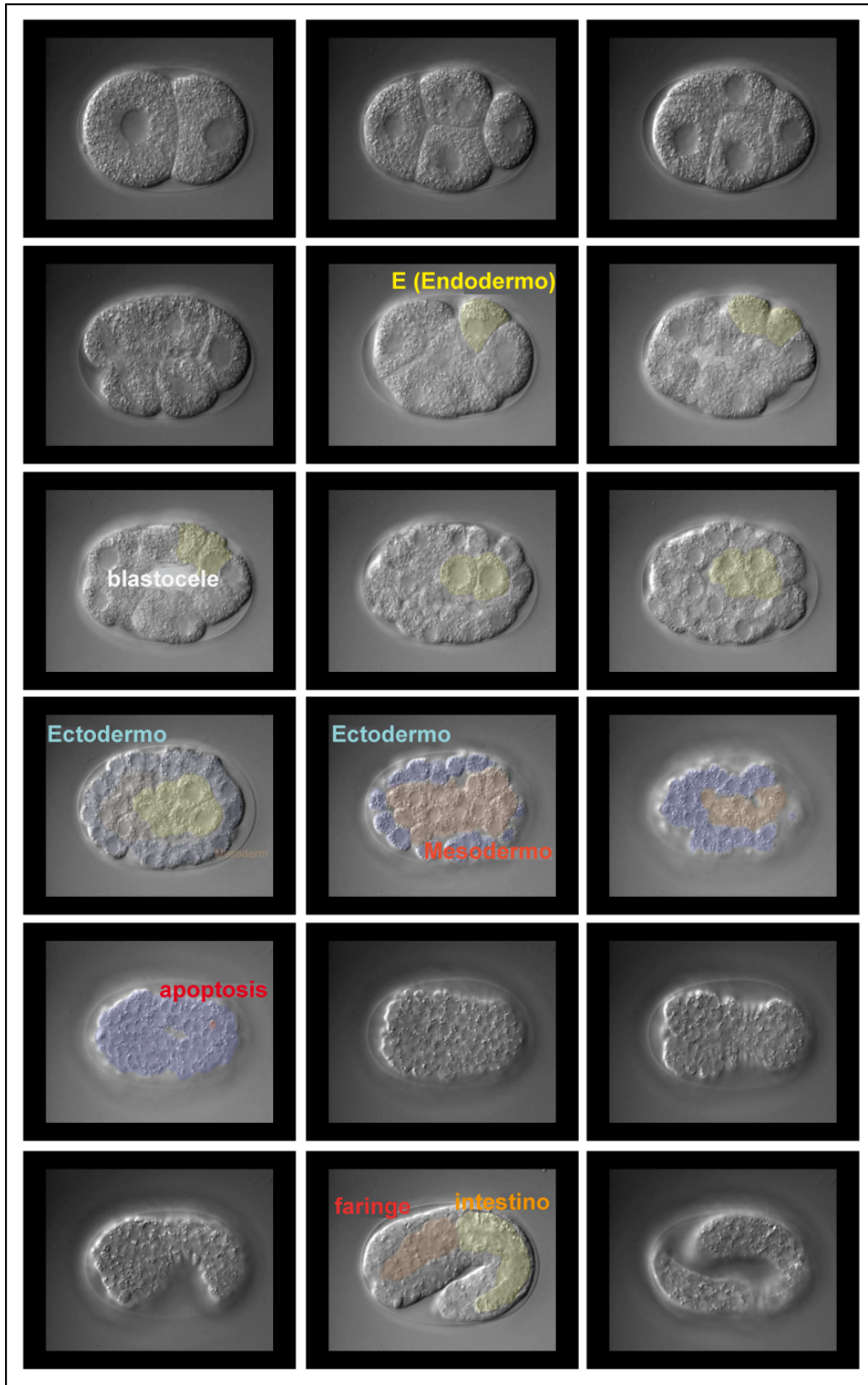


Figura 1.6. Diferentes fases de la embriogénesis de *C. elegans*. (Imágenes de microscopía en 4D realizadas por el Dr. Juan Cabello, vídeo 1.1).

Aproximadamente 350 minutos después de la primera división, la proliferación celular se ralentiza y comienza la morfogénesis. Se inicia el dimorfismo sexual ya que cuatro neuronas específicas sufren apoptosis en el hermafrodita, mientras que en el macho se mueren dos neuronas más (Sulston et al., 1983). El embrión se elonga formando varios pliegues sucesivamente, de forma que se transforma del estadio de dos pliegues en el de tres pliegues. Esta elongación es controlada por los filamentos de actina y microtúbulos que forman anillos alrededor del embrión y por la presión hidrostática de éste (Ciarletta et al., 2009). Posteriormente, los embriones serán expulsados del útero a través de la vulva. Finalmente, a las 14h del comienzo de la embriogénesis, los embriones, una vez formados, rompen la cutícula que los rodea y salen al medio exterior como larvas L1. En este momento, numerosos genes embrionarios son requeridos, ya que el aporte materno disminuye gradualmente (*C. elegans II*, CHSL, 1997).

Las larvas se desarrollan atravesando cuatro estadios larvarios distintos, L1, L2, L3 y L4, hasta convertirse en adultos. Cada estadio larvario diferente conlleva una nueva síntesis de la cutícula, que es distinta, tanto estructuralmente como molecularmente, en cada estadio larvario. En el estadio L1 aproximadamente el 10% de las células son células somáticas inmaduras, que seguirán dividiéndose durante el desarrollo larvario, para dar lugar al sistema nervioso, la hipodermis, la musculatura y las células somáticas de la gónada. Las divisiones celulares postembriónicas siguen un patrón invariable, exceptuando aquellas producidas en la línea germinal, ya que existen algunas diferencias entre ambos sexos, de forma que en el hermafrodita se deben formar las estructuras de la gónada, el útero y la vulva, mientras que en el macho se deben generar las estructuras de la cola especializadas en el apareamiento (revisado por Sulston, 1988; *The nematode C. elegans*, CHSL, 1988).

1.3. Anatomía de *C. elegans*

La anatomía de *C. elegans* ha sido estudiada profundamente gracias a la visualización de secciones del nematodo al microscopio electrónico, que fueron realizadas inicialmente para investigar la estructura del sistema nervioso (White, 1986). El linaje celular de *C. elegans* es invariable, lo cual permite asignar a cada célula un nombre determinado. Al igual que el resto de nematodos, *C. elegans* consta de un cuerpo plano formado por dos tubos concéntricos separados por un espacio relleno de un fluido, denominado pseudoceloma. La forma del animal es mantenida gracias a la presión hidrostática interna (*C. elegans* II CSHL Press, 1997; The Nematode *C. elegans* CSHL Press, 1988).

En este animal existen diferentes tejidos: epitelial, muscular, nervioso, membranoso, etc. El tejido epitelial se distingue entre el epitelio externo, denominado hipodermis, y el epitelio interno, que recubre los distintos órganos. Las células epiteliales están conectadas entre sí por desmosomas y constan de dos regiones diferentes: la superficie apical y la superficie basal. Estas células segregan la cutícula que se acumula en la superficie apical, y está formada por diversas proteínas, mayoritariamente colágenos. La cutícula se renueva cada vez que se cambia de estadio larvario, desechando la anterior y generando una cutícula nueva con proteínas específicas para cada fase (Kramer, 1994).

Numerosas células de la hipodermis son multinucleadas y conforman sincitios celulares que se extienden a lo largo de amplias regiones de la superficie externa del animal. El sincitio celular mayor es *hyp-7*, que se extiende casi en toda su longitud. Las células hipodérmicas contienen algunos orgánulos subcelulares específicos de este tejido, como por ejemplo los cuerpos multivesiculares, y además, almacenan gránulos lipídicos. En la hipodermis se encuentran también las células “seam”, que forman dos hileras sincitiales que recorren toda la longitud del animal y son las responsables de producir unas estructuras específicas de la cutícula denominadas alas, como se observa en la

Figura 1.7. Las células de la hipodermis se encargan además de la eliminación de la mayoría de las células que sufren apoptosis durante el desarrollo (Sulston et al., 1983). Algunas de las células hipodérmicas se comportan como células madre, dividiéndose asimétricamente para dar lugar a una célula hija que hereda las características de la célula madre y otra célula hija que se desarrolla como otro tipo celular diferente (The nematode *C. elegans*, CHSL, 1988).

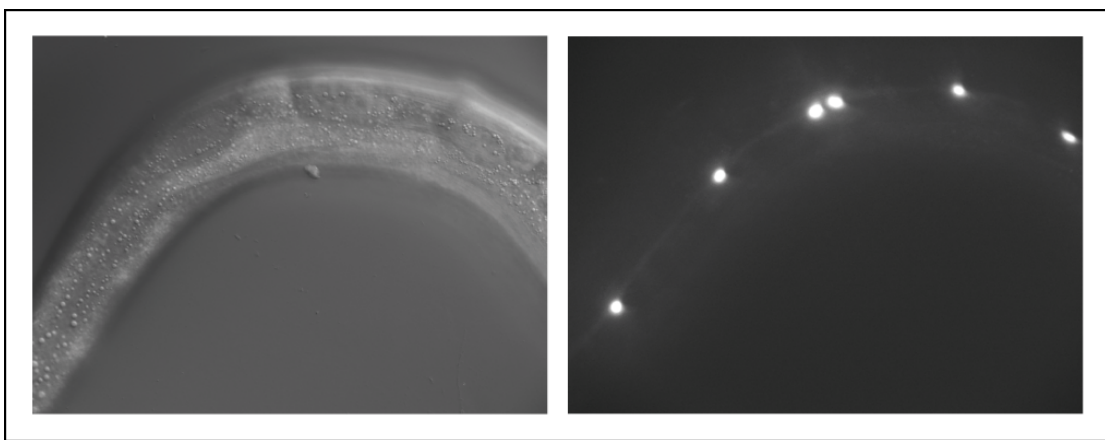


Figura 1.7. Visualización de una de las hileras de las células seam.

La cavidad pseudocelómica está rodeada por una membrana basal que separa la musculatura de los tejidos nerviosos e hipodérmicos. Asimismo, la gónada, el intestino y la faringe también están envueltos por membranas basales. El sistema nervioso está compuesto por el anillo nervioso central, así como por el cordón dorsal y el cordón ventral, que recorren toda la longitud del animal, como se observa en la Figura 1.8. Los cuerpos celulares de la mayoría de las neuronas están situados alrededor de la faringe, a lo largo de la línea ventral y en la cola. Los nervios de estas neuronas forman un anillo alrededor de la faringe, o bien se unen en los cordones dorsal y ventral (revisado por Pilon y Mörck, 2005). La mayoría de las neuronas quimiosensibles y mecanosensibles extienden nervios aferentes desde el anillo nervioso a los órganos sensores situados en los extremos del animal. El anillo nervioso recibe

e integra la información sensorial y conecta con las neuronas motoras de la cabeza o de los cordones nerviosos dorsal y ventral (White et al., 1986).

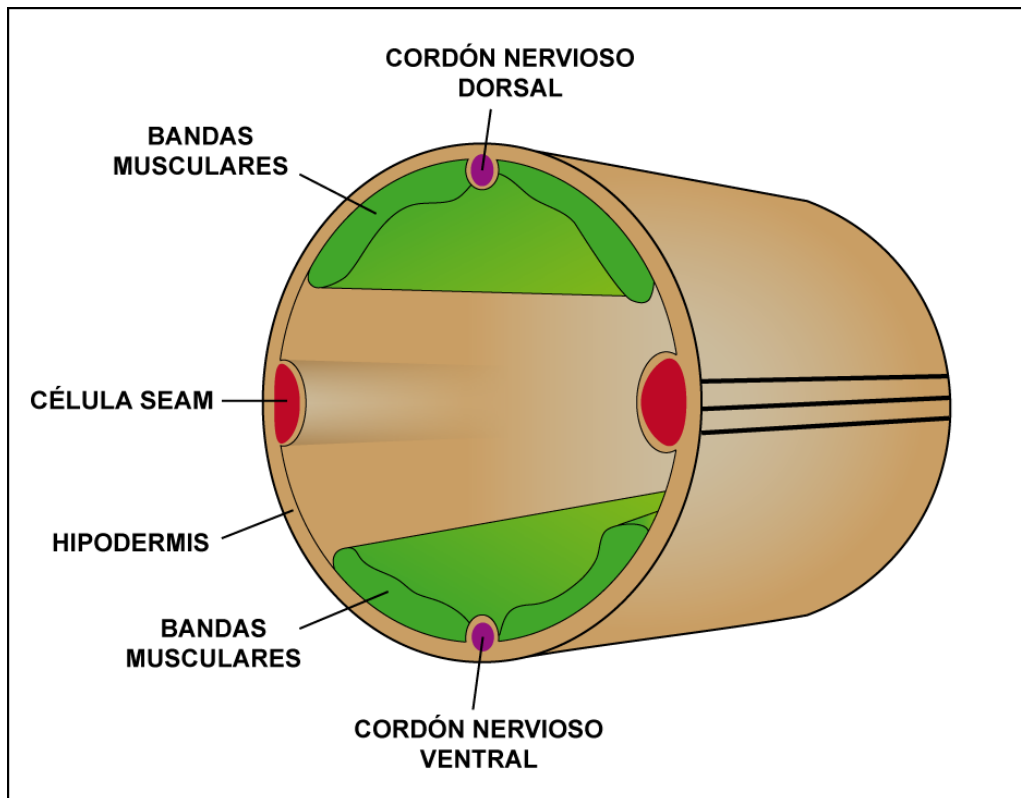


Figura 1.8. Esquema anatómico de *C. elegans*. En la figura se observan algunas de las estructuras anatómicas fundamentales, entre las que se encuentran las bandas musculares y los cordones nerviosos que recorren longitudinalmente el animal.

Existen dos tipos diferentes de musculatura en *C. elegans*: músculos estriados que contienen numerosos sarcómeros, como por ejemplo los músculos del cuerpo responsables del movimiento, y músculos con un único sarcómero que tienen anclajes puntuales en los extremos, como son los músculos del intestino. La musculatura del cuerpo está organizada en cuatro bandas longitudinales que se anclan a la cutícula a través de la hipodermis, como se puede apreciar en la Figura 1.8.

El movimiento sinusoidal del animal es generado por la simultánea contracción de las dos bandas musculares subventrales y relajación de las dos subdorsales y viceversa. La musculatura del cuerpo se divide entre los músculos anteriores, inervados por motoneuronas ubicadas en el anillo nervioso central, los siguientes músculos, inervados a la vez por motoneuronas del anillo nervioso y motoneuronas situadas en el cordón ventral, y por último, los músculos inervados únicamente por motoneuronas procedentes del cordón ventral (revisado por Moerman y Fire, 1997).

El tubo interno está compuesto por la faringe y por el intestino. La faringe procesa la comida ingerida y posteriormente la bombea hacia el intestino. Está compuesta por células musculares, neuronas y células epiteliales, que se encuentran envueltas por una membrana basal más gruesa que las del resto de órganos. Como se ilustra en la Figura 1.9, la faringe contiene dos estructuras bulbares que permiten procesar la comida y las células musculares, que se distribuyen en una simetría triradial. Además, existen glándulas faríngeas, las cuáles se sitúan principalmente en el bulbo terminal. La faringe posee un sistema nervioso prácticamente autónomo y está conectada con el intestino a través de una especie de válvula que regula el paso de la comida hacia el intestino (Albertson y Thomson, 1976; revisado por Mango, 2007).

El intestino se conecta con el recto a través de otra válvula similar a la que separa la faringe del intestino y posee una cavidad interna longitudinal que está provista de microvellosidades que aumentan la superficie de absorción de nutrientes. Las células del intestino segregan enzimas, como por ejemplo la endodeoxirribonucleasa, que permite digerir el DNA procedente de las bacterias ingeridas. Las células intestinales también permiten la acumulación de nutrientes, formando gránulos rellenos de lípidos, proteínas o carbohidratos. Algunos de estos gránulos intestinales son autofluorescentes a la luz UV. En el animal hermafrodita adulto, las proteínas del vitelo son producidas por las células intestinales y transportadas hasta los oocitos (Kimble y Sharrock, 1983; revisado por McGhee, 2007).

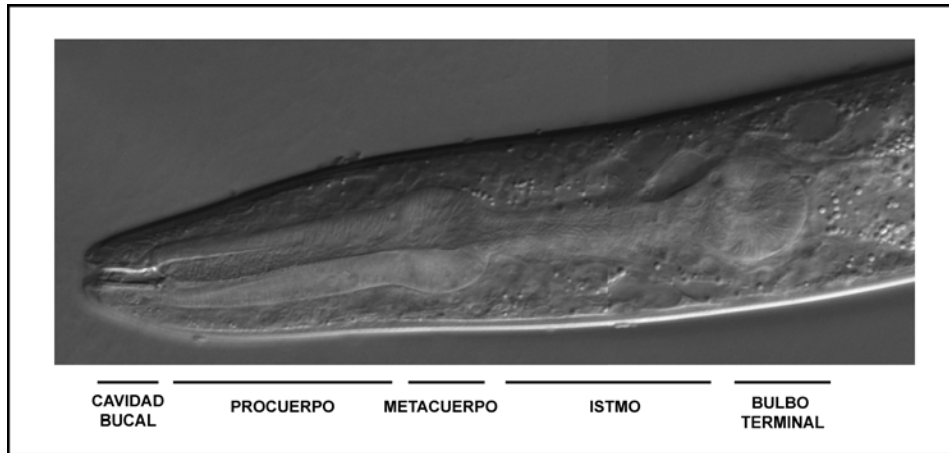


Figura 1.9. Las diferentes partes de la faringe de *C. elegans*. En la imagen de microscopía Nomarski de la faringe se puede observar que consta de una cavidad bucal y dos estructuras bulbosas, conectadas entre sí, que permiten el procesamiento de la comida.

El sistema excretor está formado por tres células: una única célula excretora, que es la más grande, una célula que es un canal excretor que recorre toda la longitud del cuerpo del animal y que está conectada con una célula que actúa como poro excretor, situada en la zona ventral de la cabeza. Además, existe una glándula excretora situada en torno al poro excretor. Aparte de su función excretora, este sistema está asimismo implicado en la secreción de glicoproteínas que recubren la cutícula y en la osmorregulación (Nelson y Riddle, 1984).

El sistema reproductor del hermafrodita está compuesto por una gónada que posee dos brazos independientes funcionalmente, dispuestos simétricamente en forma de U, que se unen en un útero común y una vulva, en la cual desemboca el útero (Kimble y Hirsh, 1979). Como se puede observar en la Figura 1.10, cada brazo de la gónada consta de: un ovario, un oviducto distal, una curvatura, un oviducto proximal y una espermateca. El extremo de cada gónada tiene una célula distal somática que proporciona un efecto mitogénico sobre las células germinales del ovario (Kimble y White, 1981). Estas células

distales expresan el factor de crecimiento LAG-2, el cuál mantiene a las células germinales adyacentes como células madre, promoviendo su proliferación (Gummienny et al., 1999).

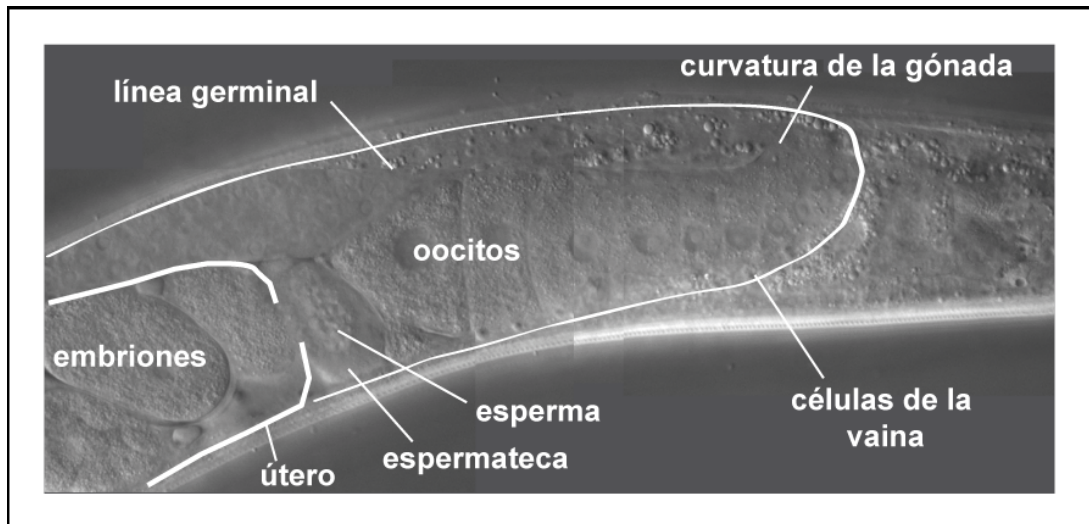


Figura 1.10. Diferentes partes de las que consta la gónada del hermafrodita adulto. En la imagen de la gónada del animal hermafrodita obtenida mediante microscopía Nomarski se aprecian las distintas partes que componen la gónada.

Los núcleos de las células germinales en estadio de mitosis y de meiosis temprana sólo están englobados parcialmente por la membrana plasmática, por lo tanto están formando un sincitio celular. Sin embargo, los núcleos de este sincitio no están sincronizados y se comportan como unidades celulares independientes, que se encuentran en distintos estadios de la mitosis y la meiosis temprana. Las células germinales pueden seguir destinos diferentes: comenzar la mitosis, entrar en meiosis y diferenciarse bien en espermata o bien en oocitos, o por el contrario, entrar en apoptosis (Gumienny et al., 1999). Las células germinales que entran en meiosis avanzan hasta el estadio de paquitene de la meiosis I. Estas células salen de paquitene cuando llegan a la curvatura de la gónada, activadas por la ruta ras/MAPK y empiezan a crecer en

tamaño. Posteriormente, las células germinales progresan al estadio de diacinesis de la profase I en el brazo proximal de la gónada y aumentan de tamaño convirtiéndose en oocitos que forman una fila única en el brazo proximal (Gumienny et al., 1999). Los oocitos permanecen conectados con la parte central del sincitio mientras avanzan por el oviducto, perdiendo dicha conexión justo antes de que se produzca su fertilización al pasar por la espermateca. La espermateca está formada por células endoteliales conectadas entre sí mediante desmosomas. Los oocitos pasan a través de la espermateca, donde son fertilizados, y entran en el útero atravesando una válvula situada en el final de la espermateca. Al ser fertilizado, el núcleo del oocito completa la meiosis y los dos pronúcleos procedentes del oocito y del esperma se fusionan, comenzando las divisiones embriónicas. Los embriones se desarrollan en el útero, donde se almacenan hasta que son expulsados al exterior a través de la vulva (revisado por Hubbard y Greenstein, 2000).

Los músculos del útero empujan a los embriones y los músculos de la vulva permiten abrir el orificio de la vulva, cuando salen los embriones. La formación de la vulva comienza en el estadio larvario L2, cuando una célula específica del útero, denominada célula ancla ("*anchor cell*") estimula a las células hipodérmicas próximas para que se desarrollen como células de la vulva (Kimble y Hirsh, 1979). Esta célula ancla conecta inicialmente el útero y la vulva y posteriormente desaparece, generando una unión entre ambos (revisado por Kornfeld, 1997; Gumienny et al., 1999). En hermafroditas adultos, aproximadamente la mitad de los oocitos potenciales son eliminados durante la maduración meiótica, limitando el número de oocitos que compiten por los nutrientes en la gónada y permitiendo la maduración del resto de células como oocitos (Gumienny et al., 1999). Las células destinadas a morir se celularizan rápidamente separándose del sincitio común del útero, y aislándose físicamente del resto de núcleos celulares que las rodean. La célula generada es reconocida y fagocitada por las células somáticas de la vaina (denominadas "*sheath cells*") presentes en la gónada.

Existen 5 pares de células de la vaina por cada brazo de la gónada y están compuestas por células mioepiteliales que contienen filamentos musculares (Figura 1.11) que se encuentran rodeando la gónada y están especializadas en la fagocitosis de las células apoptóticas de la gónada (Gumienny et al., 1999). Aparte de esta función, dichas células facilitan el movimiento de los oocitos hacia la espermateca y además intervienen en el transporte de las proteínas del vitelo desde el intestino donde son sintetizadas hasta el oviducto, lugar en el que son requeridas por los oocitos (Kimble y Sharrock, 1983). En *C. elegans* existen cuatro glicoproteínas diferentes en la composición del vitelo: las proteínas YP170A e YP170B (las cuáles resultan de la transcripción genética de los genes *vit-1*, *vit-2*, *vit-3*, *vit-4* y *vit-5*), y las proteínas YP115 e YP88 (cuyo precursor está codificado por un único gen, *vit-6*) (Spieth y Blumenthal, 1985).

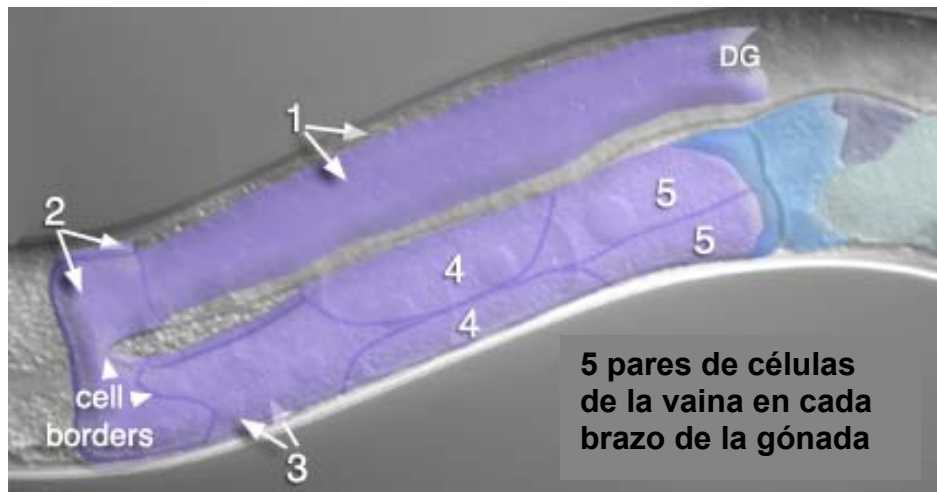


Figura 1.11. Células de la vaina de la gónada del hermafrodita adulto. Cada brazo de la gónada del hermafrodita adulto contiene cinco pares de células de la vaina o *sheath cells*. Estas células somáticas están especializadas en la fagocitosis de los cuerpos apoptóticos producidos en la línea germinal. (Imagen procedente de <http://www.wormatlas.org>).

En ambos sexos, los precursores de la gónada somática son las células Z1 y Z4, procedentes de la célula embrionaria EMS, mientras que la línea germinal de la gónada proviene de las células precursoras Z2 y Z3, que son hijas de la célula embrionaria P₄. En el estadio larvario L1, la gónada consta únicamente de cuatro células, las dos células precursoras de la línea germinal, Z2 y Z3, y las dos células precursoras de la gónada somática, Z1 y Z4. Los descendientes de Z1 y Z4 formarán en el hermafrodita los brazos de la gónada, la espermateca y el útero, mientras que en el macho formarán el brazo de la gónada, el vaso deferente y la vesícula seminal (revisado por Hubbard y Greenstein, 2000). La gonadogénesis se completa en el estadio larvario L4, durante el cual las células germinales de la gónada realizan la meiosis y se forman las células del esperma, que será almacenado en la espermateca. Una vez cesa la producción de esperma, las meiosis siguientes se diferencian en oocitos. Entonces, se abre la vulva al exterior, posibilitando el apareamiento con los machos y comienza la autofecundación de los oocitos al pasar por la espermateca del hermafrodita. Los animales hermafroditas son fértiles durante 4 días. Mientras que un hermafrodita no fecundado produce aproximadamente 300 embriones, si éste es fecundado por un macho su capacidad reproductiva aumenta hasta 1000 embriones (Gumienny et al., 1999; revisado por Hubbard y Greenstein, 2000).

El macho posee en su cola un aparato copulatorio, denominado bolsa copulatoria, el cuál contiene una especie de abanico con multitud de receptores sensoriales, como se aprecia en la Figura 1.12. Estos receptores permiten al macho localizar la vulva del hermafrodita, al recorrer su cuerpo del hermafrodita con la bolsa copulatoria. Una vez localizada la vulva, el macho inserta en ella las dos espículas copulatorias retráctiles que posee, expulsa el esperma a través del vaso deferente y éste atraviesa la vulva hasta el útero del hermafrodita. La vesícula seminal está conectada a través del vaso deferente con las células de las espículas copulatorias. El vaso deferente también está

conectado con la cloaca, que es el órgano que sustituye al recto en el macho (revisado por L'Hernault, 2009).

La gónada masculina consta de un testículo que, al igual que la gónada femenina, posee dos células distales que ejercen una influencia mitogénica sobre las células germinales próximas, las cuáles entran en profase meiótica al alejarse de ellas (Kimble y White, 1981). Las células germinales del testículo, al igual que los oocitos, están conectadas entre sí formando un sincitio dispuestas alrededor de un núcleo central. Este sincitio está rodeado de una membrana basal. Los espermatoцитos producidos por el testículo pasan a la vesícula seminal, en la cuál maduran, convirtiéndose en espermátidas, tras llevar a cabo dos divisiones meióticas. Las espermátidas se acumulan en la vesícula seminal hasta el momento de la eyaculación (revisado por L'Hernault, 2009).

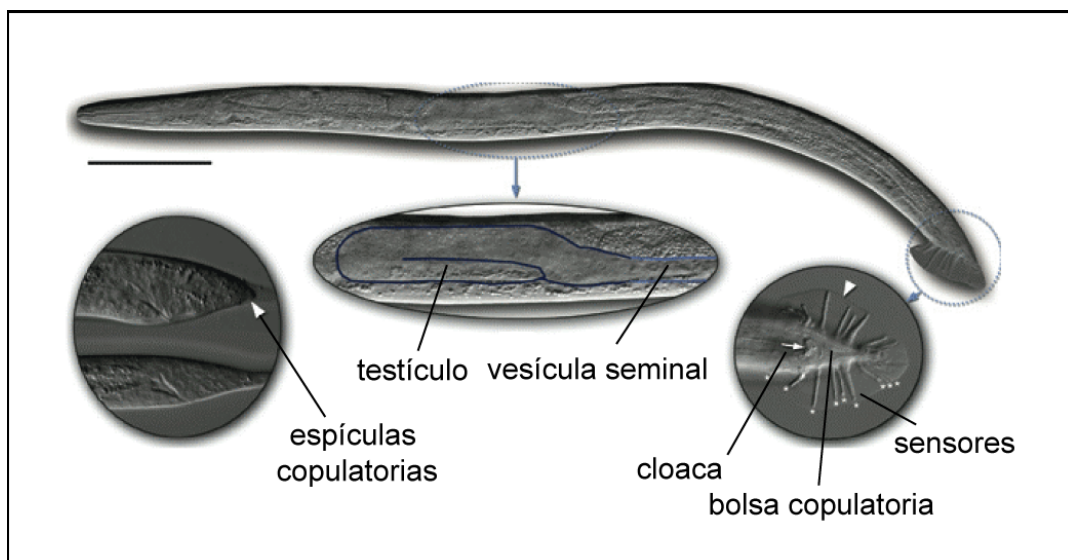


Figura 1.12. Aparato reproductor de un individuo macho adulto de *C. elegans*. En la imagen de microscopía Nomarski de un macho se observan las diferentes partes que componen su aparato reproductor (imagen procedente de <http://www.wormatlas.org>).

2. Bases moleculares de la apoptosis

2.1. Descubrimiento de la apoptosis

El término apoptosis (procedente del término griego *a-po-toe-sis*, que significa la caída de las hojas de los árboles en otoño) fue utilizado por primera vez por Kerr, Wyllie y Currie en 1972, para describir un tipo de muerte celular distinta morfológicamente a la necrosis (Kerr et al., 1972; revisado por Kerr, 2002). En 1962, John Kerr descubrió un tipo de muerte celular diferente a la necrosis, mientras realizaba estudios histológicos de tejidos hepáticos con daño isquémico. Las células observadas finalizaban convertidas en pequeñas masas de citoplasma, que contenían orgánulos sin degradar y fragmentos de cromatina nuclear condensada. Estos corpúsculos eran fagocitados por los hepatocitos que las rodeaban o por fagocitos mononucleares. Mediante histoquímica, se comprobó que tanto los lisosomas como las mitocondrias y los ribosomas de dichas células permanecían intactos, sin sufrir la degradación que se observaba en las células que sufrían necrosis (Kerr, 1965).

Mediante la observación de estos tejidos por microscopía electrónica se pudo visualizar la integridad de los orgánulos y de la membrana plasmática de la célula y se descubrió que los corpúsculos eran generados a partir de una condensación previa de la célula, seguida de una rápida emisión de pseudópodos en la superficie de ésta (Kerr, 1971). Se encontró que este proceso también ocurría de forma espontánea en tumores malignos. Asimismo, se observó que en carcinomas de piel, este tipo de muerte se veía incrementado como una respuesta a la radioterapia (Kerr y Searle, 1972).

Posteriormente, se descubrió que este proceso era regulado por hormonas en tejidos sujetos a un control endocrino, como por ejemplo, la corteza adrenal (Wyllie et al., 1973). Se observó que la regresión de algunos carcinomas de mama estaba asociada con una delección extensiva de células

que se morían siguiendo este patrón de muerte celular (Kerr et al., 1972). Por otra parte, se comprobó que este tipo de muerte celular también se producía durante el desarrollo de la espina dorsal en los fetos de rata (Crawford et al., 1972). Estas observaciones, así como otras realizadas previamente, demostraron que este proceso difería de la muerte celular por necrosis y le fue asignado el nombre de apoptosis para diferenciarla.

Uno de los primeros organismos utilizados para el estudio del proceso de apoptosis fue el nematodo *C. elegans*, en el cuál las apoptosis producidas son invariables, produciéndose siempre en determinados puntos del linaje celular (Horvitz, 1999). En la apoptosis se pueden distinguir cuatro etapas diferenciadas: la elección del destino de la célula entre sobrevivir o morir, el inicio de la muerte celular en la célula destinada a sufrir apoptosis, la fagocitosis de la célula apoptótica por una célula vecina y finalmente, la degradación de la célula apoptótica dentro de la célula fagocitaria.

La apoptosis es un mecanismo homeostático del organismo que permite controlar las poblaciones celulares en los tejidos y que se produce de forma natural durante el desarrollo y el envejecimiento. Adicionalmente, este proceso puede actuar como un mecanismo de defensa si las células son dañadas por una enfermedad o por agentes nocivos. Numerosos estímulos, tanto fisiológicos como patológicos pueden inducir a la apoptosis, aunque no todas las células mueren en respuesta a los mismos estímulos. Estos estímulos pueden ser de diferentes tipos: hormonas, ligandos específicos, radiaciones, quimioterapia, etc. (revisado por Elmore, 2007). El que una célula muera por apoptosis o por necrosis, puede depender de la naturaleza o el grado de intensidad de dicho estímulo, del tipo de tejido y su estadio de desarrollo, de la disponibilidad celular de energía o de los niveles de caspasas celulares, entre otros factores (Zeiss, 2003). Mientras que la necrosis es un proceso incontrolado y no dependiente de energía, que puede afectar a grandes cantidades de células, la apoptosis es un proceso controlado y dependiente de energía, que suele producirse en células

individuales. Como se ilustra en la Figura 1.13, durante la necrosis se aumenta el volumen de la célula, se fragmentan los orgánulos celulares, se rompe el núcleo (“*karyolysis*”) y se pierde la integridad de las membranas, con lo cuál los componentes celulares son liberados al espacio intersticial, enviando señales quimiotácticas que activan el proceso de inflamación. En cambio, en la apoptosis se reduce el volumen celular, condensándose el citoplasma y empaquetándose los orgánulos celulares, se fragmenta el núcleo (“*karyorhexis*”) y se condensa la cromatina (“*pyknosis*”) (Majno y Joris, 1995).

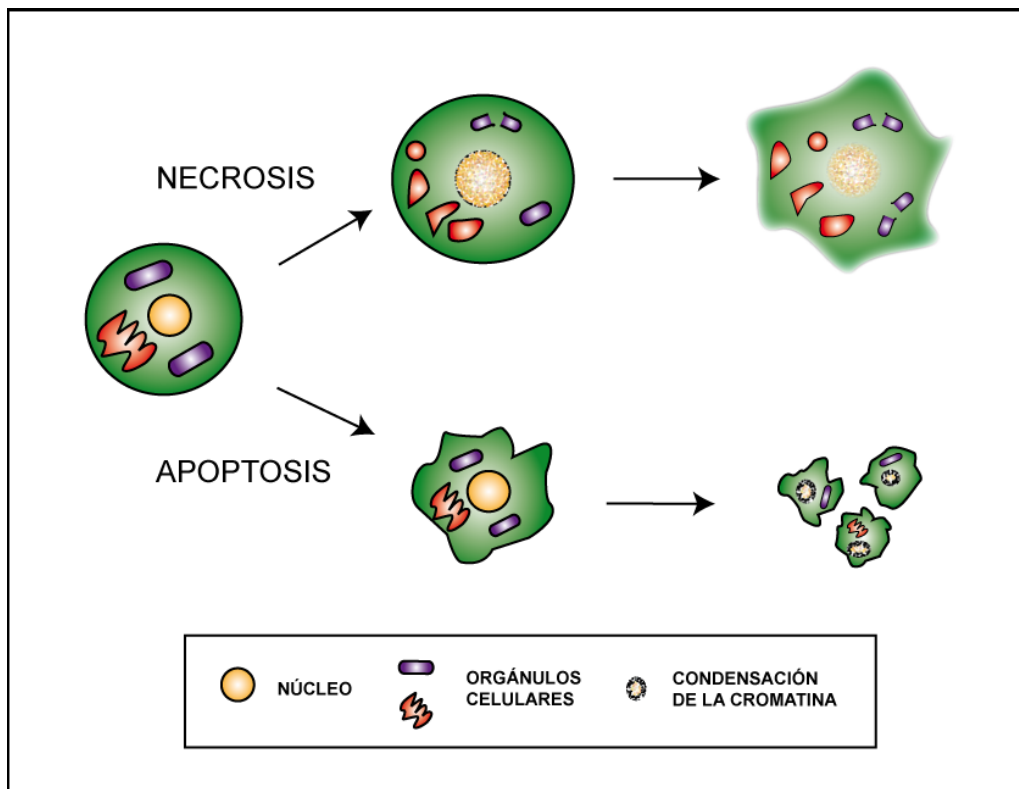


Figura 1.13. Diferencias entre necrosis y apoptosis. La figura ilustra las diferencias entre ambos procesos, de forma que en la necrosis se produce un aumento del volumen celular, la fragmentación de los orgánulos celulares y la rotura de las membranas, tanto plasmática como nuclear. Por el contrario, durante la apoptosis, el volumen de la célula disminuye, se empaquetan los orgánulos celulares y se condensa la cromatina, fragmentándose posteriormente el núcleo y la célula en diferentes cuerpos apoptóticos.

En la apoptosis, la integridad de los orgánulos, así como la de la membrana plasmática se mantiene hasta el final. La membrana plasmática sufre una vesiculización y emite pseudópodos en su superficie, produciéndose la fragmentación de la célula apoptótica en diversos cuerpos apoptóticos. Éstos normalmente constan de un citoplasma con orgánulos comprimidos y en ocasiones, un fragmento nuclear. Los cuerpos apoptóticos son fagocitados por los macrófagos, células parenquimales o células neoplásicas y degradados en los fagolisosomas. La apoptosis no conlleva una reacción inflamatoria asociada debido a que las células apoptóticas no liberan sus componentes al medio intersticial, y son rápidamente fagocitadas por las células que las rodean, evitando de esta manera que se produzca una necrosis secundaria (Majno y Joris, 1995).

Tradicionalmente, la apoptosis se ha considerado un proceso irreversible. Sin embargo, diversos estudios han demostrado que la fagocitosis de células apoptóticas podría también influir en el proceso apoptótico. En mamíferos se descubrió que la eliminación de macrófagos en una parte del ojo de la rata permitía la supervivencia de células endoteliales vasculares que normalmente sufren apoptosis (Diez-Roux y Lang, 1997). Además, algunas células, en las cuáles se había inducido apoptosis mediada por p53, pero que se encontraban en los estadios iniciales de la apoptosis, podían ser rescatadas de la muerte por apoptosis, si el estímulo que la había inducido era eliminado (Geske et al., 2001). En embriones de *C. elegans*, se observó que al bloquear genes de la fagocitosis se favorecía la supervivencia de células sobre las que actuaban señales pro-apoptóticas débiles (Hoeppner et al., 2001). Asimismo, en *C. elegans*, se comprobó que mutaciones en genes de la fagocitosis, permitían la supervivencia y la diferenciación de células que estaban destinadas a morir por apoptosis (Reddien et al., 2001). Estos resultados sugieren que las proteínas que median la eliminación de los cuerpos apoptóticos también pueden estar activando la muerte celular, asegurándose de que aquellas células que

comienzan la apoptosis mueran definitivamente, en vez de que puedan recuperarse tras los primeros estadios de la apoptosis y sobrevivir.

2.2. Rutas que conducen a la apoptosis

Inicialmente, en las células apoptóticas se expresan varios marcadores que son reconocidos por las células fagocitarias. Por ejemplo, se produce un movimiento de la fosfatidilserina desde el interior de la membrana plasmática que es donde normalmente se localiza, a la parte exterior de la misma (Bratton et al., 1997; Gazulli et al., 2008). Existen diferentes rutas implicadas en el proceso de apoptosis: la ruta extrínseca mediada por un receptor de muerte, la ruta intrínseca o mitocondrial, la apoptosis mediada por la perforina, por las granzimas A y B, y por células T citotóxicas.

La ruta extrínseca es iniciada por la interacción de un ligando con un receptor transmembranal de la familia de los receptores del factor de necrosis tumoral (TNF). Los receptores de esta familia contienen dominios extracelulares ricos en cisteína y tienen un dominio citoplasmático de unos 80 aminoácidos, denominado el “dominio de muerte” (“*death domain*”), que es el que transmite la señal apoptótica al interior de la célula. Algunos de los ligandos y receptores de muerte son: FasL/FasR, TNF- α /TNFR1, Apo3L/DR3, Apo2L/DR4 y Apo2L/DR5 (revisado por Elmore, 2007).

A diferencia de la ruta extrínseca, la ruta intrínseca no conlleva la participación de un receptor de membrana, sino que diversos estímulos provocan una serie de señales intracelulares, que concluyen en cambios en la membrana mitocondrial y la liberación de factores pro-apoptóticos desde el espacio intermembranal de la mitocondria al citosol (Saelens et al., 2004).

Por otra parte, los linfocitos T citotóxicos son capaces de provocar la apoptosis en células tumorales y en células infectadas por virus a través de la secreción de una molécula denominada perforina que genera poros en la membrana citoplasmática de la célula diana. Entonces segregan unos gránulos citoplasmáticos que son introducidos a través de esos poros y los cuáles contienen las serín proteasas granzima A y granzima B (Trapani y Smyth, 2002).

Tanto la ruta extrínseca, como la intrínseca y la generada por la granzima B confluyen en la activación de la caspasa-3 y provoca la fragmentación del DNA, la degradación de proteínas celulares, la formación de puentes entre proteínas ("*cross-linking*"), la generación de cuerpos apoptóticos y la expresión de ligandos para los receptores de las células fagocitarias (revisado por Hengartner, 2000). Por el contrario, la ruta mediada por la granzima A activa una ruta independiente de caspasas y provoca un daño en el DNA de cadena sencilla (Martinvalet et al., 2005).

La mayoría de los cambios morfológicos que ocurren en una célula apoptótica son debidos a la activación específica de las caspasas. Las caspasas son una serie de cisteín-proteasas que han sido conservadas a lo largo de la evolución, desde nematodos e insectos hasta humanos (revisado por Bergmann y Steller, 2010). En mamíferos han sido identificadas alrededor de 14 caspasas, siendo las principales las caspasas iniciadoras (caspasa-2, -8, -9 y -10), las ejecutoras (caspasa-3, -6 y -7) y las caspasas inflamatorias (caspasa-1, -4 y -5) (Cohen, 1997; Rai et al., 2005). Tanto la ruta extrínseca como la intrínseca confluyen en la activación de las caspasas ejecutoras, las cuáles activan las endonucleasas citoplasmáticas, que degradan el material nuclear, y las proteasas, que degradan las proteínas citoesqueléticas y nucleares. La principal caspasa ejecutora es la caspasa-3, que puede ser activada por cualquiera de las caspasas iniciadoras (caspasa-8, -9 o -10) (revisado por Elmore, 2007).

Todas las caspasas poseen una cisteína en el sitio activo y degradan a sus sustratos en sitios de restricción en los que se encuentra un residuo de ácido aspártico, estando determinada su especificidad por los cuatro residuos anteriores al sitio de corte. Las caspasas pueden actuar bien inactivando su sustrato, mediante proteólisis del mismo o desensamblando su estructura, si se trata de un complejo multiproteico; o bien activándolo, por eliminación de una subunidad inhibidora del mismo u otros mecanismos (revisado por Hengartner, 2000).

Un ejemplo de la activación por caspasas es el de la nucleasa denominada DNasa activada por caspasas (*Caspase-activated DNase* o CAD). Esta nucleasa degrada el DNA genómico de la célula apoptótica, cortándolo entre sus nucleosomas y formando la “escalera de DNA” característica de la apoptosis, la cuál posee bandas con un tamaño múltiplo de aproximadamente 180 bp, y puede ser visualizada mediante electroforesis en gel de agarosa (Wyllie, 1980). Dicha nucleasa se encuentra formando un complejo inactivo en asociación con una subunidad inhibitoria, denominada ICAD. La activación de CAD ocurre cuando la caspasa-3 degrada la subunidad inhibidora de este complejo, liberándose la subunidad catalítica activa (Sakahira et al., 1998; Nagata, 2000).

En otros procesos que se desarrollan durante la apoptosis también intervienen las caspasas, siendo las responsables de la lisis de la lámina nuclear, que debe producirse para que el núcleo reduzca su volumen durante la apoptosis, así como de la rotura de algunas proteínas citoesqueléticas, como por ejemplo, la gelsolina o la fodrina (Slee et al., 2001). La gelsolina actúa como un núcleo para la polimeración de actina y también se une al fosfatidilinositol-bifosfato, interviniendo en la transducción de señales. La caspasa-3, al partir la proteína gelsolina, genera la rotura de los filamentos de actina; de manera que se provoca una interrupción del citoesqueleto, del transporte intracelular, de la división celular y de la transducción de la señal (Kothakota et al., 1997).

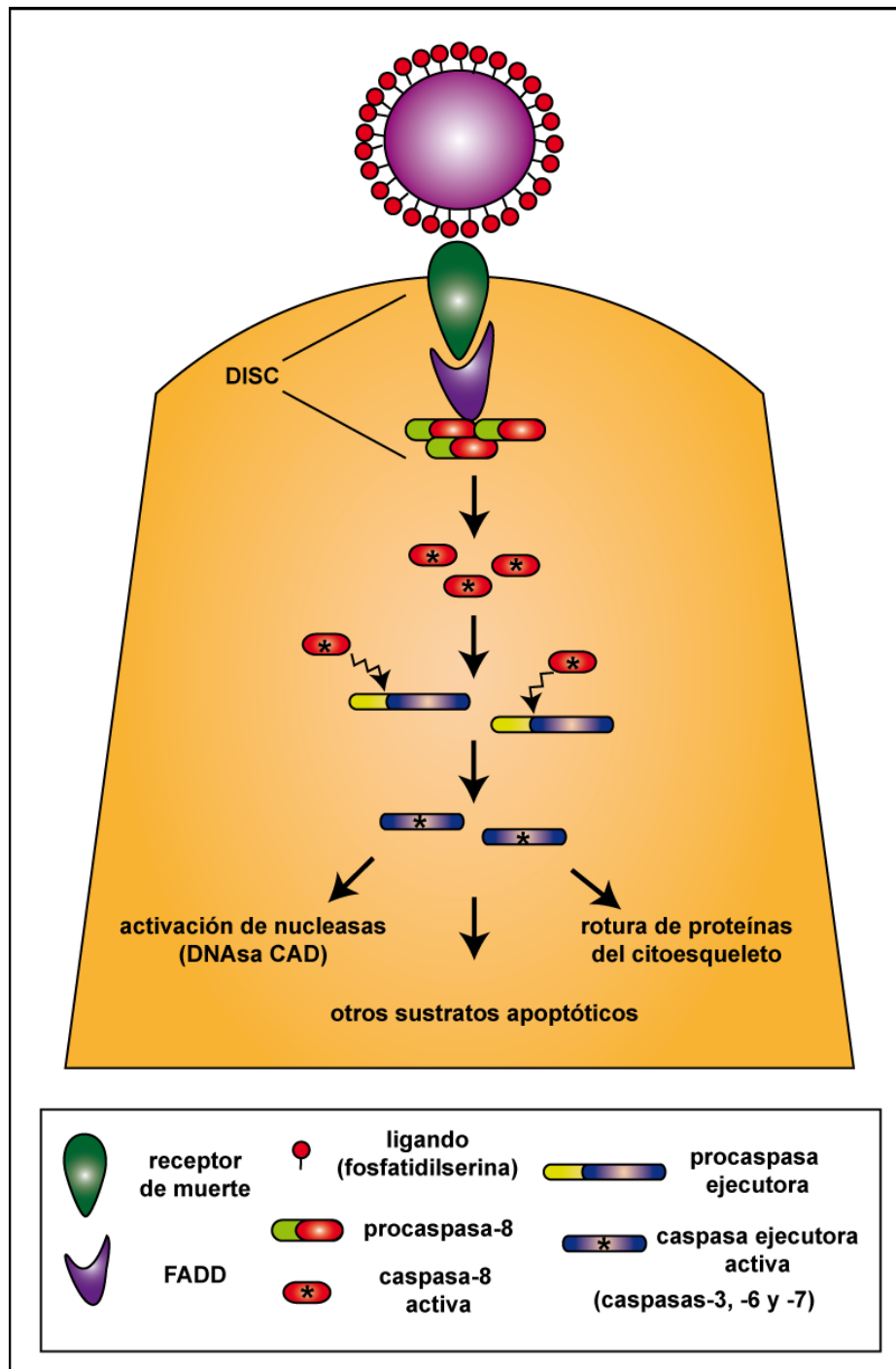


Figura 1.14. Activación de la caspasa-3 por medio de un receptor de muerte. Al interactuar un ligando (fosfatidilserina, por ejemplo) con un receptor de muerte, éste forma el complejo DISC junto con la proteína FADD y varias moléculas de la procaspasa-8, la cuál es activada por proximidad. Una vez activa, la caspasa-8 activará mediante proteólisis a las caspasas ejecutoras (caspasas-3, -6 y -7).

Las caspasas son sintetizadas como zimógenos inactivos enzimáticamente, los cuáles poseen tres dominios: un prodominio N-terminal, y los dominios p20 y p10, que también están presentes en la enzima activa. La enzima activa es un heterotetrámero que contiene dos heterodímeros p20/p10 y dos sitios activos. Las interacciones con proteínas se producen en el prodominio N-terminal, el cuál contiene dos tipos de motivos de interacción proteína-proteína: dominio DED (*death effector domain* o dominio de efectores de muerte) y el dominio CARD (*caspase activation and recruitment domain* o dominio de reclutamiento y activación de caspasas) (Degterev et al., 2003).

La activación de las caspasas puede llevarse a cabo principalmente mediante tres mecanismos generales:

a) la mayoría de las caspasas son activadas mediante proteólisis del zimógeno entre los dominios p20 y p10 y entre el prodominio y el dominio p20. Como todos los sitios de corte son del tipo Asp-Xxx existe la posibilidad de activación autocatalítica. De hecho, la forma más sencilla de activación consiste en que una caspasa activada corta una procaspasa activándola, como se observa en la Figura 1.14 (página anterior). Esta cascada de caspasas es la responsable de la activación de las caspasas ejecutoras, las caspasas-3, -6 y -7, y permite amplificar enormemente la señal pro-apoptótica (Budihardjo et al., 1999).

b) mediante autoactivación por agregación de varias moléculas de procaspasas. Es el caso de la caspasa-8, que es la caspasa iniciadora del proceso en la ruta de señalización iniciada por un receptor de muerte. Cuando un ligando se une a un receptor de muerte, el receptor forma unos complejos de señalización que reclutan proteínas adaptadoras, como por ejemplo la proteína FADD. La proteína FADD se asocia a la procaspasa-8 y se forma el complejo de señalización inductor de muerte (DISC, *death-inducing signaling complex*), que provoca la activación auto-catalítica de las moléculas de procaspasa-8 por

proximidad (Muzio et al., 1998; Salvesen y Riedl, 2009). La Figura 1.14 recoge un esquema de dicha activación. Esta forma de activación es la misma que ocurre en *C. elegans* para activar la caspasa CED-3 (Yang et al., 1998).

c) gracias a la interacción con un subunidad reguladora. Por ejemplo, la procaspasa-9 se activa mediante la interacción con el cofactor de activación, Apaf-1. Este cofactor es en realidad una subunidad reguladora del apoptosoma, que es un complejo que contiene la caspasa-9, la subunidad Apaf-1, y otras proteínas adicionales, como por ejemplo, el citocromo C (Budihardjo et al., 1999).

La ruta intrínseca puede ser activada por diferentes señales intracelulares, que pueden ser tanto positivas como negativas. Las señales negativas pueden ser la ausencia de ciertos factores de crecimiento, hormonas y citocinas, que pueden generar un fallo en la supresión de la muerte celular, induciendo por tanto la apoptosis. Los estímulos de carácter positivo pueden ser radiaciones, toxinas, hipoxia, hipertermia, infecciones virales, radicales libres, etc. Todos estos estímulos provocan cambios en la membrana mitocondrial interna, generando la pérdida del potencial transmembranal de la mitocondria, aumentando la permeabilidad de la membrana y liberando proteínas pro-apoptóticas que se encuentran normalmente secuestradas en el interior del espacio intermembranal (Saelens et al., 2004, revisado por Elmore, 2007). Estas proteínas pueden ser de dos grupos: el primer grupo consiste en el citocromo C, Smac/DIABLO y la serín proteasa HtrA2/Omi. Como fue descrito anteriormente, el citocromo C activa la proteína Apaf-1 y la procaspasa-9, formando el complejo denominado apoptosoma (Hill et al., 2004). Las caspasas pueden ser inhibidas por las proteínas inhibidoras de apoptosis (IAPs), las cuáles pueden unirse a las caspasas inactivándolas. Se cree que estas proteínas actúan regulando las rutas apoptóticas, de forma que si en una célula se activasen de manera accidental un pequeño número de caspasas, las IAPs pudiesen inhibir dicha activación. A su vez, estas proteínas IAP pueden ser

antagonizadas por otras proteínas, como por ejemplo los factores pro-apoptóticos Smac/DIABLO o HtrA2/Omi. De forma que cuando se produce la apoptosis, Smac/DIABLO es liberado al citosol, secuestrando las proteínas IAP y asegurándose que estas proteínas no inhiben el programa apoptótico (Schimmer, 2004; revisado por Dubrez-Daloz et al., 2008).

El segundo grupo de proteínas pro-apoptóticas que pueden ser liberadas de la mitocondria son: AIF, endonucleasa G y CAD. El factor AIF se transloca al núcleo y provoca la fragmentación del DNA y la condensación de la cromatina nuclear periférica. La endonucleasa G también se dirige al núcleo y degrada la cromatina nuclear en fragmentos de DNA. Tanto AIF como la endonucleasa G no son dependientes de las caspasas. En cambio, CAD es activado por la caspasa-3 y genera la fragmentación del DNA y una condensación de la cromatina más pronunciada (Li et al., 2001; Widlak y Garrard, 2005).

La regulación de la ruta intrínseca está mediada por proteínas de la familia Bcl-2. La familia de proteínas Bcl-2 está dividida en tres grupos: los miembros del grupo I poseen actividad anti-apoptótica, mientras que los miembros de los grupos II y III tienen una actividad pro-apoptótica. Las proteínas anti-apoptóticas son Bcl-2, Bcl-x, Bcl-XL, Bcl-XS, Bcl-w, BAG, y las proteínas pro-apoptóticas son Bcl-10, Bax, Bak, Bid, Bad, Bim, Bik y Blk. Estas proteínas pueden formar homodímeros, pero también heterodímeros, entre miembros pro- y anti-apoptóticos (Cory y Adams, 2002). La función principal de los miembros de la familia Bcl-2 es la de regular la liberación de los factores pro-apoptóticos del compartimento intermembranal de la mitocondria al citosol, alterando la permeabilidad de la membrana mitocondrial (Cory y Adams, 2002; Cory et al., 2003). En *C. elegans*, la proteína CED-9, que es un homólogo del Bcl-2 anti-apoptótico, protege a las células de la apoptosis secuestrando a la proteína CED-4, el homólogo de Apaf-1 (Metzstein et al., 1988).

2.3. La apoptosis a nivel fisiológico y a nivel patológico

A nivel fisiológico, la apoptosis es un mecanismo muy importante durante el desarrollo. Por ejemplo, tanto el sistema nervioso como el sistema inmune son generados mediante una sobreproducción de células, seguida de una apoptosis específica de aquellas células que no son capaces de establecer las conexiones sinápticas adecuadas o que no contienen el antígeno correcto, respectivamente. La apoptosis también permite eliminar células con capacidad autoinmune, durante la maduración del timo o la médula ósea, o de los tejidos periféricos (Nijhawan et al., 2000; Opferman y Korsmeyer, 2003), y células que han sido infectadas por patógenos. Asimismo, durante la cicatrización de heridas, si se produce una incorrecta regulación de la apoptosis que permita retirar las células inflamatorias, se podría generar una cicatrización excesiva y fibrosis (Greenhalgh, 1998).

Por otra parte, la apoptosis permite el remodelamiento de tejidos y órganos en el adulto, por ejemplo, la involución de la glándula mamaria una vez se ha finalizado la lactancia (Lund et al., 1996). Durante el envejecimiento, algunas células se deterioran más rápido y deben ser eliminadas mediante apoptosis. El estrés oxidativo genera la acumulación de radicales libres que dañan el DNA mitocondrial, provocando una apoptosis fisiopatológica inducida por el envejecimiento (Ozawa, 1995; Le Gall y Ardaillou, 2009).

Aparte de su papel fisiológico, una incorrecta regulación de la apoptosis puede conducir a diversas patologías: cáncer, enfermedades autoinmunes, SIDA, isquemia, enfermedades neurodegenerativas (Parkinson, Alzheimer, enfermedad de Huntington), etc. El cáncer se produce cuando existe una proliferación celular excesiva o una disminución de la muerte celular. Las células tumorales pueden adquirir resistencia a la apoptosis mediante la expresión de proteínas anti-apoptóticas, como por ejemplo Bcl-2, o mediante la mutación de proteínas pro-apoptóticas, como Bax (revisado por Elmore, 2007).

En humanos, algunos linfomas de células B, tienen una sobreexpresión de Bcl-2 (Vaux et al., 1988). Las células tumorales también pueden suprimir la apoptosis evadiendo la respuesta inmune. Algunas células evitan que las células T las destruyan, disminuyendo la respuesta del receptor Fas al ligando Fas producido por las células T. Esto lo pueden conseguir disminuyendo la expresión del receptor Fas en las células tumorales, expresando un receptor Fas anómalo, segregando altos niveles de una forma de receptor Fas soluble que secuestre el ligando Fas o expresando ligando Fas en la superficie de las células tumorales (Smyth et al., 2001).

La expresión de Bcl-2 y de Bax está regulada por el gen supresor de tumores p53, el cuál es el gen que se encuentra mutado con mayor frecuencia en los cánceres humanos (Miyashita, 1994). Dicho gen es capaz de activar las proteínas reparadoras de DNA, de detener el ciclo celular en el punto de regulación G1/S si se comprueba que existe daño en el DNA y de iniciar la apoptosis si el daño en el DNA es irreparable (Pientenpol y Stewart, 2002). Si p53 está mutado, la supresión tumoral se encuentra enormemente reducida. El gen p53 puede ser dañado por radiación, virus (como el papilomavirus) o agentes químicos. Aquellas personas que heredan únicamente una copia funcional de p53 probablemente desarrollarán el síndrome de Li-Fraumeni, que se caracteriza por el desarrollo de tumores en la fase adulta (Gu et al., 2001).

Otras enfermedades provocadas por una reducción en la apoptosis son las enfermedades autoinmunes. Por ejemplo, si existe una producción excesiva de células B o una apoptosis insuficiente de las células T que reaccionan frente a auto-antígenos, se produce una enfermedad autoinmune, caracterizada por anemia hemolítica, trombocitopenia y neutropenia autoinmunitarias (revisado por Nagata, 2010). Por el contrario, una apoptosis excesiva también puede generar otras enfermedades, como por ejemplo enfermedades autoinmunes, neurodegenerativas o daño isquémico. Un caso de este tipo es el SIDA, una enfermedad autoinmune provocada por la infección de las células CD4+ T por el

virus VIH. El virus lleva a cabo un aumento de la expresión del receptor Fas en la célula T infectada, resultando en una excesiva apoptosis de las células T, que conduce a una deficiencia inmunitaria (Dianzani et al., 2003).

En este contexto se encuentra la enfermedad de Alzheimer, que es una enfermedad neurodegenerativa y está causada por mutaciones en diversas proteínas, como la proteína precursora amiloide (APP) y las presenilinas. Las presenilinas regulan el procesamiento de APP en amiloide β . En el Alzheimer, se producen placas de amiloide β que son neurotóxicas e inducen la apoptosis por estrés oxidativo o aumento de la expresión del ligando Fas en neuronas y en células de la glía (Ethell y Buhler, 2003).

La enfermedad de Parkinson consiste en un desorden crónico y degenerativo, caracterizado por una apoptosis a gran escala de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra del mesencéfalo. Esta muerte neuronal provoca una pérdida progresiva de la capacidad de coordinar los movimientos, de manera que los pacientes sufren rigidez muscular, temblor de reposo y lentitud en la iniciación de los movimientos. Se ha identificado al oncogén p53 como una de las proteínas más importantes en la etiología de dicha enfermedad (Alves da Costa C. y Checler F., 2011).

Otra enfermedad neurodegenerativa en la cuál existe un aumento del número de apoptosis es la enfermedad de Huntington. Esta enfermedad está caracterizada por movimientos hipercinéticos involuntarios, incapacidad para controlar los movimientos voluntarios y una disminución de la capacidad cognitiva. Los pacientes con esta enfermedad poseen una versión mutada del gen huntingtina, la cuál contiene una repetición exagerada del triplete CAG en el primer exon de dicho gen. Esta forma mutada del gen induce la activación de caspasas y la apoptosis celular en diferentes regiones del cerebro, provocando una neurodegeneración (Nijhawan et al., 2000).

En el daño isquémico existe igualmente una excesiva apoptosis de los cardiomiocitos. Aparte de la necrosis, se ha detectado una sobreexpresión de BAX en el tejido miocárdico isquémico y las terapias que reducen la apoptosis han demostrado tener éxito en la reducción del daño tisular durante la isquemia (Hochhauser et al., 2003).

Dado que existen muchas enfermedades, como las anteriormente mencionadas, caracterizadas por un exceso en el número de apoptosis, las terapias farmacológicas conducidas a inhibir artificialmente la apoptosis podrían tener una aplicación para el tratamiento de estos desórdenes. (Nicholson, 2000). Algunas de estas terapias son:

- Estimulación de las proteínas inhibidoras de la apoptosis.
- Inhibición de las caspasas.
- Inhibición de las proteínas Bcl-2.
- Estimulación de la ruta PKB/Akt a través de la infusión del factor de crecimiento similar a insulina (IGF-1 Insulin-like growth factor-1), que promueve la supervivencia celular (Fujio et al., 2000).
- Inhibición de Bax para prevenir la liberación del citocromo C de la mitocondria y proteger las células de la apoptosis por la vía intrínseca (Hochhauser et al., 2003).
- Inhibición de la enzima convertidora de Interleukina-1 β , una cisteín proteasa denominada caspasa-1, que media la degradación protéica intracelular durante la apoptosis. Su inhibición permite reducir la interleukina-1 β y tratar enfermedades inflamatorias, como la artritis reumatoide (Le y Abbenante, 2005).

2.4. El proceso de apoptosis en *C. elegans*

De las 1090 células que se generan durante el desarrollo somático de un *C. elegans* hermafrodita, 131 células se mueren por apoptosis (Sulston y Horvitz, 1977; Kimble y Hirsh, 1979; Sulston et al., 1983). En *C. elegans* existen dos tipos diferenciados de apoptosis: aquellas producidas durante el desarrollo embrionario y post-embrionario, y aquellas producidas en la línea germinal de la gónada del hermafrodita adulto (Sulston y Horvitz, 1977; Sulston et al., 1983; Gumienny et al., 1999). Dado que el linaje celular de *C. elegans* es esencialmente invariable entre individuos, es posible establecer la identidad de las células apoptóticas, así como el momento en el desarrollo del organismo en el que se mueren dichas células (Sulston et al., 1983). La mayor parte de las células apoptóticas son neuronas u otras células asociadas al sistema nervioso, aunque también mueren por apoptosis algunas células hipodérmicas. De las células mesodérmicas (células musculares, células de la faringe...) tan sólo un pequeño número de ellas sufre apoptosis y ninguna célula intestinal muere en *C. elegans*. De las 131 células que sufren apoptosis durante el desarrollo de *C. elegans*, 113 células se mueren durante la embriogénesis (Sulston et al., 1983). Hay una segunda ronda de apoptosis durante las divisiones de los neuroblastos en el segundo estadio larvario (L2). Posteriormente, en los hermafroditas no se observan más muertes celulares por apoptosis en el tejido somático. Sin embargo, en los machos existen varias muertes celulares programadas durante el cuarto estadio larvario (L4). Además de las muertes por apoptosis en el desarrollo somático, un gran número de células sufren apoptosis en la línea germinal del hermafrodita adulto (revisado por Hengartner, *C. elegans II*, 1997).

Los primeros cambios morfológicos que pueden ser observados mediante microscopía Nomarski en una célula que inicia la apoptosis son una disminución en la refractividad del citoplasma, seguida de una pérdida en la textura y un aumento en la refractividad del núcleo. Seguidamente, tanto el citoplasma como el núcleo de la célula apoptótica se vuelven altamente

refráciles, convirtiéndose la célula apoptótica en un punto redondo y plano, observable al microscopio (Sulston y Horvitz, 1977). Este disco refráctil irá desapareciendo gradualmente cuando la célula vecina fagocite a la apoptótica. Las células apoptóticas se caracterizan por una condensación temprana de la cromatina del núcleo y una reducción del volumen celular. Los orgánulos citosólicos tienen una apariencia normal hasta que el proceso de apoptosis está muy avanzado. Al final de la apoptosis, la célula apoptótica se acaba fragmentando en varias vesículas y las vacuolas autofágicas que aparecen en el citoplasma de la célula fagocitaria digieren estos fragmentos eliminando completamente la célula apoptótica (Robertson y Thomson, 1982; Hedgecock et al., 1983; Ellis et al., 1991).

Los escrutinios genéticos realizados en *C. elegans* han permitido aislar alrededor de 100 mutaciones que pueden afectar al proceso biológico de la apoptosis, entre las cuáles más de una docena de genes están implicados directamente en alguna de las fases de la apoptosis y la degradación de cuerpos apoptóticos (Hedgecock et al., 1983; Ellis y Horvitz, 1986; Ellis et al., 1991; Hengartner et al., 1992; Horvitz, 1999). Existen tres genes que son promotores de la apoptosis, *egl-1*, *ced-3* y *ced-4*; mientras que el gen *ced-9* protege a las células de la apoptosis durante el desarrollo de *C. elegans* (Hengartner et al., 1992).

El gen *ced-3* codifica una proteína que presenta una homología significativa con la enzima convertidora de interleukina-1 β o caspasa-1, presente en mamíferos (Yuan et al., 1993). Dicho gen fue identificado al realizar un escrutinio genético que permitiese encontrar mutantes que fueran capaces de eliminar la acumulación de cuerpos apoptóticos que se producía en mutantes *ced-1*, los cuáles eran incapaces de fagocitar las células apoptóticas (Ellis y Horvitz, 1986). Posteriormente, se demostró que en los mutantes *ced-1*, no se acumulaban cuerpos apoptóticos si estaba mutado *ced-3*, debido a que el proceso de apoptosis no había comenzado, ya que *ced-3* actúa como un

iniciador de la apoptosis celular (revisado por Yuan y Horvitz, 2004). La función de CED-3 como promotora de la apoptosis está correlacionada con su actividad como proteasa (Xue y Horvitz, 1995). Al igual que otras caspasas, CED-3 es sintetizada como una proenzima que se activa proteolíticamente convirtiéndose en una proteasa (Xue et al., 1996). La sobreexpresión de CED-3 induce la muerte celular por apoptosis en células de mamíferos (Wang et al., 1994).

Así mismo, se descubrió que existía otro gen, que también regulaba el comienzo del mecanismo de apoptosis. El gen *ced-4* produce una proteína de 549 aminoácidos, que contiene dos regiones con homología de dominios de unión al calcio (Yuan y Horvitz, 1992). Esta proteína guarda similitud con el factor humano Apaf-1, que activa la caspasa-9, conteniendo ambas un dominio de reclutamiento de caspasas (dominio CARD) y de unión a nucleótidos (Yuan y Horvitz, 1992; Zou et al., 1997; Zou et al., 1999). La proteína CED-4 se expresa con mayor abundancia en embriones, sin embargo, está presente en todos los estadios del desarrollo y su expresión no se restringe únicamente a las células apoptóticas (Yuan y Horvitz, 1992; Hengartner et al. 1992). El mRNA de *ced-4* tiene un procesamiento alternativo, de forma que existen al menos dos isoformas de la proteína CED-4: una proteína más grande (CED-4_L) y otra más pequeña (CED-4_S). Mientras que la isoforma más pequeña (CED-4_S) tiene un efecto pro-apoptótico, una sobreexpresión de la isoforma de mayor tamaño (CED-4_L) previene la muerte celular (Shaham y Horvitz, 1996).

Los genes *ced-3* y *ced-4* son esenciales para la muerte celular programada en *C. elegans*. Para ambos genes se ha visto una clara correlación entre la pérdida de la función del gen y la supervivencia de células que estaban destinadas a morir por apoptosis, ya que aquellas mutaciones que inactivan completamente uno de estos dos genes previenen que se produzca cualquier apoptosis (revisado por Yuan y Horvitz, 2004). La realización de análisis de mosaico indica que los genes *ced-3* y *ced-4* probablemente son activados dentro de la célula apoptótica de una manera autónoma (Yuan and

Horvitz, 1990). Las mutaciones débiles de estos genes, por ejemplo *ced-3* (*n2438*) y *ced-4* (*n2273*), provocan una supresión parcial de la apoptosis, de forma que sólo una parte de las células sobrevive (revisado por Hengartner, C. *elegans II*, 1997).

Dado que los mutantes *ced-3* y *ced-4* previenen la muerte celular, los individuos tienen un 12% más de células somáticas que en un silvestre. Sin embargo, este aumento en el número de células no conlleva anomalías en el comportamiento o morfológicas evidentes, únicamente tienen un crecimiento más lento, una fertilidad ligeramente reducida y algunos defectos en tareas complejas, como por ejemplo la quimiotaxis (Ellis et al., 1991). El destino de estas células que no sufren la apoptosis en los mutantes de *ced-3* y *ced-4* suele ser el de sus células hermanas, aunque algunas veces adoptan el destino de células de anteriores generaciones o de células que tienen posiciones equivalentes en otros linajes celulares (Ellis y Horvitz, 1986).

Niveles altos de *ced-3* pueden suplir la ausencia de *ced-4*, sin embargo, *ced-4* es dependiente de *ced-3*, ya que si *ced-3* no actúa correctamente, *ced-4* no puede promover la apoptosis. Altos niveles de *ced-3* o *ced-4* pueden sobrepasar la acción protectora de *ced-9* sobre la apoptosis (Shaham y Horvitz, 1996). El gen *ced-9* es un regulador negativo de la apoptosis en *C. elegans* (Hengartner et al., 1992). La sobreexpresión de *ced-9* induce la supervivencia de aquellas células destinadas a sufrir apoptosis, provocando un fenotipo similar al de los mutantes de *ced-3* o *ced-4*. Por el contrario, en aquellos mutantes en los cuales *ced-9* no es funcional, se activa de forma anormal la muerte celular programada, de forma que muchas células que en un silvestre sobreviven, en estos mutantes se mueren por apoptosis (Hengartner y Horvitz, 1994a). En los mutantes homocigóticos para *ced-9* que proceden de madres heterocigóticas para *ced-9* (mutantes F1), el aporte materno de *ced-9* protege a la mayoría de las células embrionarias de la muerte por apoptosis. Sin embargo, al desarrollarse el embrión, el aporte materno de *ced-9* disminuye,

produciéndose muertes ectópicas en varias de sus células, especialmente en las células germinales y en las neuronas. Estas muertes provocan varios defectos, incluyendo un fenotipo *unc*, con movimiento incoordinado, y esterilidad, en mutantes con mayor penetrancia (Hengartner et al., 1992). Las mutaciones en los genes *ced-3* y *ced-4* son capaces de bloquear las muertes ectópicas y la letalidad presentes en los mutantes de *ced-9*, ya que *ced-9* actúa anteriormente a *ced-3* y *ced-4*. Normalmente, *ced-9* previene la muerte celular antagonizando las funciones de *ced-3* y *ced-4* (Hengartner et al., 1992).

El gen *ced-9* codifica una proteína de 280 aminoácidos que guarda similitud estructural y a nivel de secuencia con el proto-oncogén de mamíferos Bcl-2 (Hengartner and Horvitz, 1994b). Estas dos proteínas también guardan similitud a nivel funcional, ya que en ambos casos, la sobreexpresión de la proteína consigue proteger de la muerte celular, mientras que una pérdida de su función hace que las células sean más sensibles a la apoptosis (Reed, 1994; Adams y Cory, 2001). Además, el gen humano Bcl-2 puede prevenir la muerte celular programada en *C. elegans* e incluso sustituir a *ced-9* en animales deficientes en dicho gen (Hengartner y Horvitz, 1994b).

Entre mamíferos y nematodos existe una conservación tanto estructural como funcional de las proteínas que controlan la ruta apoptótica, por ejemplo: Bcl-2/*ced-9* e ICE/*ced-3*. Esto sugiere que los mamíferos y nematodos comparten una ruta molecular común que controla la muerte celular programada, que ha sido conservada a lo largo de la evolución (revisado por Schwartz y Osborne, 1994).

El gen *egl-1* codifica una pequeña proteína que contiene un motivo estructural BH3 (Región 3 de homología con Bcl-2), el cuál habitualmente está presente en los miembros pro-apoptóticos de la familia Bcl-2 y que actúa como dominio de unión a miembros anti-apoptóticos Bcl-2 (Conradt y Horvitz, 1998; Bouillet y Strasser, 2002). Diferentes análisis bioquímicos y celulares realizados

han permitido establecer un modelo bioquímico de interacción entre las proteínas EGL-1, CED-9, CED-4 y CED-3. En la célula que sobrevive, CED-9 mantiene inactivada a la proteína CED-4, formando un complejo que se localiza en la mitocondria (Chinnaiyan et al., 1997; Chen et al., 2000). La expresión de *egl-1* provoca la disociación del complejo entre CED-9 y CED-4, liberándose la proteína CED-4 que es translocada desde la mitocondria hasta la membrana perinuclear (del Peso et al., 1998; Yan et al., 2004). Esta translocación promueve la oligomerización de CED-4 y atrae proenzimas de CED-3, que se activarán autocatalíticamente (Yang et al., 1998). La proteína CED-9 es sustrato de la proteína CED-3, y no sólo actúa como inhibidor de la apoptosis, secuestrando a la proteína CED-4 en la mitocondria, sino que también actúa como un inhibidor competitivo de CED-3 (Xue y Horvitz, 1997). La Figura 1.15 representa un esquema de la interacción proteica entre dichas proteínas.

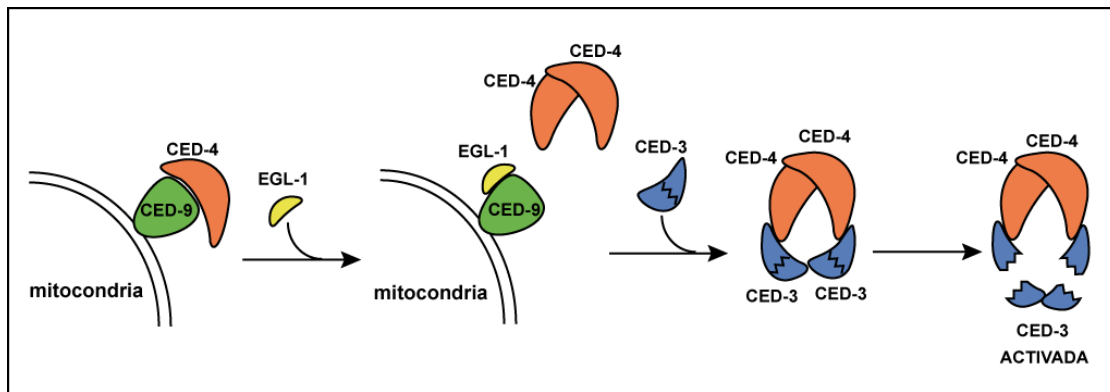


Figura 1.15. Esquema de la activación de la proteína CED-3 inducida por EGL-1. La proteína EGL-1 provoca una disociación del complejo formado por CED-9 y CED-4, liberándose la proteína CED-4. Se forma una oligomerización de varias proteínas CED-4, que interaccionan con moléculas inactivas de la proteína CED-3. Éstas al interactuar entre sí se activan autocatalíticamente.

En aquellas células destinadas a sobrevivir, la actividad de EGL-1 es baja o inexistente, mientras que en las 131 células destinadas a morir por apoptosis durante el desarrollo de *C. elegans*, la expresión del gen *egl-1* está

incrementada, de manera que se inhibe la función de CED-9 y se activan CED-4 y CED-3, iniciando el proceso apoptótico. La actividad de EGL-1 está regulada a nivel de la transcripción, de forma que existen diferentes reguladores transcripcionales que controlan su expresión (Conradt y Horvitz, 1999).

Al contrario que en otros organismos, en los cuáles la apoptosis es inducida por células vecinas o bien por señales extracelulares, en *C. elegans* las apoptosis que ocurren durante su desarrollo son autónomas, es decir el destino celular de dicha célula está predeterminado desde su nacimiento para que acabe muriendo por apoptosis (Sulston y White, 1980). Sin embargo, en la línea germinal de *C. elegans* se ha comprobado que existen factores capaces de activar la apoptosis de una manera no autónoma respecto a la célula apoptótica, como por ejemplo el factor *kri-1*, el cuál regula la activación de la muerte celular dependiente de daño genético (Ito et al., 2010).

Cuando la célula inicia la apoptosis se producen diversos cambios bioquímicos y morfológicos dentro de ella, como la fragmentación del DNA cromosómico. En *C. elegans* se han identificado diversos genes implicados en la degradación del DNA nuclear durante la apoptosis, entre los cuáles se encuentran los genes: *nuc-1* (*nuc*: “*nuclease defective*”), *cps-6* (*cps*: “*CED-3 protease suppressors*”), *wah-1* (*wah*: “*worm AIF homologue*”), los genes del *crn-1* al *crn-6* (*crn*: “*cell death related nucleases*”) y *cyp-13* (*cyp*: “*cyclophilins*”) (Parrish and Xue, 2003; Wang et al., 2002; Wu et al., 2000). Una incorrecta degradación del DNA de la célula apoptótica conduce además a defectos en la fagocitosis de los cuerpos apoptóticos, indicando que la degradación del DNA es necesaria para llevar a cabo el proceso apoptótico y promueve la eliminación de los cuerpos apoptóticos (Parrish y Xue, 2003).

3. La fagocitosis y degradación de cuerpos apoptóticos

3.1. Relevancia de los procesos

La fagocitosis es un proceso biológico mediante el cual las células eucariotas son capaces de internalizar partículas de un tamaño superior a 0,5µm. Si las partículas son bacterias o levaduras serán internalizadas por macrófagos, mientras que otros microorganismos suelen ser recubiertos por anticuerpos o partículas del complemento, previamente a su internalización. La fagocitosis de las células apoptóticas es uno de los tipos de fagocitosis más frecuentes (revisado por Kinchen y Ravichandran, 2008).

Durante el proceso de fagocitosis, generalmente cuando se une un ligando soluble a un receptor, la membrana celular se invagina formando una vesícula, que se escinde de la membrana plasmática hacia el interior de la célula. La vesícula que contiene la partícula fagocitada se denomina fagosoma y debe seguir un proceso de maduración, que consiste en una acidificación progresiva, denominada maduración del fagosoma (revisado por Kinchen y Ravichandran, 2008). Durante esta maduración, los fagosomas van adquiriendo secuencialmente sobre su membrana diferentes proteínas y finalmente se fusionan con lisosomas que acidifican aún más su contenido (Luzio et al., 2000). Durante la acidificación del fagosoma la partícula fagocitada se disocia del receptor y el receptor puede ser reciclado de vuelta a la membrana. El ligando que se unió al receptor podrá ser, bien utilizado por la célula o bien degradado (revisado por Maxfield y McGraw, 2004).

En el caso particular de la fagocitosis de células apoptóticas, éstas deben ser marcadas mediante diferentes alteraciones celulares para poder ser reconocidas y posteriormente fagocitadas, bien por células vecinas o bien por células especializadas en la fagocitosis, como es el caso de los macrófagos o células dentríticas (revisado por Kinchen y Ravichandran, 2008).

Los defectos en la fagocitosis y degradación de las células apoptóticas pueden conducir a diversas enfermedades, como la aterosclerosis o enfermedades autoinmunes, como por ejemplo, el lupus eritematoso sistémico, la poliartritis crónica o anemia grave (Kawane et al., 2006; revisado por Nagata et al., 2010, revisado por Chekeni y Ravichandran, 2011). La eliminación de las células apoptóticas por las células dendríticas ha sido relacionada con el establecimiento del mecanismo de tolerancia del sistema inmune (Tanaka et al., 2010). Por tanto, la maduración de los fagosomas resulta esencial para una correcta homeostasis del sistema inmune, y para una respuesta adecuada del sistema inmune, tanto a la flora bacteriana del cuerpo humano, como a patógenos bacterianos externos. Además, algunos patógenos, como por ejemplo *Mycobacterium*, *Chlamydia* y *Legionella*, utilizan la vía fagocítica para penetrar en el hospedador y son capaces de modificar las proteínas requeridas para la maduración de los fagosomas. De manera que el estudio de los componentes de la ruta bioquímica que median este proceso, facilitará el desarrollo de nuevas dianas farmacológicas en un futuro (revisado por Briken, 2008; revisado por Kinchen y Ravichandran, 2008).

3.2. La fagocitosis de las células apoptóticas en *C. elegans*

La célula apoptótica presenta en su superficie factores que son reconocidos por las células fagocitarias (señales “eat-me”), promoviendo la fagocitosis de estas células (Fadok et al., 2001). La fagocitosis de las células apoptóticas es necesaria para que la muerte celular por apoptosis concluya, ya que como se describió anteriormente, el bloqueo de genes implicados en la fagocitosis de células apoptóticas en *C. elegans*, permite la supervivencia de células cuyo destino era la muerte por apoptosis (Hoepfner et al., 2001; Reddien et al., 2001). A diferencia de otros organismos, en los cuáles existen células específicas que llevan a cabo la fagocitosis, como los macrófagos o las células dendríticas, en *C. elegans* la fagocitosis es realizada normalmente por

las células vecinas a la célula apoptótica, células fagocitarias no específicas. Por ejemplo, como se describió anteriormente, las células apoptóticas que se producen en la línea germinal son fagocitadas por las células mioepiteliales somáticas de la vaina (*sheath cells*) presentes en la gónada del animal hermafrodita (revisado por Gumienny y Hengartner, 2001).

Los genes implicados en la fagocitosis de cuerpos apoptóticos en *C. elegans* están distribuidos en dos rutas bioquímicas que convergen en la GTPasa de la familia Rho CED-10, cuyo ortólogo en mamíferos es Rac1 (Kinchen et al., 2005). Una de las rutas está formada por los genes *ced-1*, *ced-6* y *ced-7*, cuyos ortólogos en mamíferos son el receptor transmembranal LRP1/MEGF-10, la proteína adaptadora GULP y un transportador de tipo ABC (con un dominio de unión a ATP), respectivamente (Wu y Horvitz, 1998a; Zhou et al., 2001; Su et al., 2002; Hamon et al., 2006; revisado por Kinchen y Ravichandran, 2007). La segunda ruta está formada por las proteínas CED-2, CED-5 y CED-12, las cuáles forman un complejo proteico, que activa la actividad GTPasa de CED-10 (Brugnera et al., 2002).

Estos genes están implicados en el proceso de fagocitosis de células apoptóticas y actúan únicamente en la célula fagocitaria, salvo la proteína CED-7 que es requerida tanto en la célula fagocitaria como en la célula apoptótica (Wu y Horvitz, 1998a). La proteína CED-7 es un transportador de tipo ABC, que presenta similitud a nivel de secuencia con los transportadores ABC de mamífero ABCA1 y ABCA7 (Jehle et al., 2006). Esta proteína podría actuar promoviendo la expresión de una señal en la superficie de la célula apoptótica y el reconocimiento por parte del receptor CED-1 de dicha señal, ya que la pérdida de función de *ced-7* provoca un fuerte defecto en la fagocitosis de los cuerpos apoptóticos y una disminución en el reclutamiento de CED-1 durante la embriogénesis (Wu y Horvitz, 1998a). Sin embargo, después de la embriogénesis la acumulación de los cuerpos apoptóticos disminuye, indicando que otra proteína podría estar sustituyendo a CED-7 (Wu y Horvitz, 1998a; Zhou et al., 2001). Asimismo, en la gónada del hermafrodita adulto, la proteína

CED-7 parece no ser indispensable para la correcta localización de CED-1 alrededor de las células apoptóticas (Kinchen et al., 2005).

La proteína CED-1 es un receptor transmembranal situado en la célula fagocitaria que reconoce la célula apoptótica y comienza la fagocitosis. Aún se desconoce el ligando que es reconocido por el receptor CED-1, aunque se ha hipotetizado que de forma similar a cómo ocurre en otros organismos, la exposición de fosfatidilserina en la membrana exterior de la célula apoptótica podría actuar como ligando para dicho receptor (Venegas y Zhou, 2007). Sin embargo, se ha observado que mutantes en el receptor de fosfatidilserina, PSR-1, no presentan importantes alteraciones en el proceso de la fagocitosis. Por tanto, la fosfatidilserina podría estar actuando como ligando para otro receptor que controlase la fagocitosis, como por ejemplo CED-1 (Venegas y Zhou, 2007). Se ha descubierto una proteína de *C. elegans* denominada TTR-52, que es capaz de reconocer la fosfatidilserina expuesta en las células apoptóticas y unirse al dominio extracelular de CED-1 in vitro. Por tanto, esta proteína podría estar actuando como intermediario en el reconocimiento de la fosfatidilserina de las células apoptóticas por parte del receptor CED-1 (Wang et al., 2010). Alternativamente, podría existir otra proteína, diferente a la fosfatidilserina, que estuviese actuando como señal “eat-me” en la célula apoptótica y que fuese reconocida por el receptor CED-1.

La proteína CED-1 interacciona físicamente con la proteína adaptadora CED-6, promoviendo la reorganización de actina alrededor de la célula apoptótica, mediada por la proteína CED-10 (Su et al., 2002; Kinchen et al., 2005). Se ha observado que en mamíferos, el receptor LRP1 interacciona con la proteína GULP, para potenciar la actividad de Rac1 (Gardai et al., 2005). Por tanto, la proteína LRP1 podría ser un ortólogo del receptor CED-1. Otro ortólogo posible para dicho receptor podría ser MEGF10, el cuál se ha visto que está implicado en la eliminación de cuerpos apoptóticos en mamíferos (Hamon et al., 2006). En *Drosophila*, los ortólogos de CED-1 y CED-6 son las proteínas Draper y Dced-6, respectivamente, las cuáles intervienen en la eliminación de células

apoptóticas del sistema nervioso central (Awasaki et al., 2006). En *Drosophila*, se ha identificado una proteína, denominada Pretaporter, que podría estar señalizando las células apoptóticas para poder ser reconocidas por el receptor Draper (Kuraishi et al., 2009).

La segunda ruta que controla la fagocitosis de las células apoptóticas está formada por las proteínas CED-2, CED-5 y CED-12. Además de esta función, esta ruta también regula la migración de las células distales de la gónada del hermafrodita, así como la migración de otras células y el desarrollo de diversas neuronas en varios organismos (Gumienny et al., 2001; Reddien y Horvitz, 2000; Wu et al., 2001). La proteína CED-2 es una proteína adaptadora, cuyo homólogo en mamíferos es CrkII, y contiene un dominio SH2 y dos dominios SH3 (Reddien y Horvitz, 2000). La proteína CED-5 presenta homología con la proteína Dock180 de mamíferos (Wu y Horvitz, 1998b). La proteína CED-12 contiene un dominio de homología con plecstrina y un motivo de unión a SH3 y tiene homología con la proteína ELMO de mamíferos (Gumienny et al., 2001; Wu et al., 2001). El complejo proteico formado por Dock180-ELMO actúa como un factor de intercambio de nucleótidos para la proteína Rac1 (Wu y Horvitz, 1998b; Gummienny et al., 2001). Sin embargo, aunque en *C. elegans* y en *Drosophila* únicamente existe una proteína CED-12, en mamíferos existen tres ortólogos diferentes de ELMO (ELMO1, ELMO2 y ELMO3) y numerosas proteínas de la familia Dock (revisado por Kinchen y Ravichandran, 2007). La familia de proteínas Dock han sido conservadas evolutivamente y participan en procesos biológicos de gran importancia, como por ejemplo: la fusión de mioblastos en *Drosophila*, la migración celular y la eliminación de cuerpos apoptóticos en *C. elegans*, la migración de linfocitos, la metástasis de tumores y el desarrollo de enfermedades neuronales degenerativas en mamíferos (Lu y Ravichandran, 2006). Diversos estudios bioquímicos sugieren que las proteínas CED-2, CED-5 y CED-12 forman un complejo ternario que activa la proteína CED-10, la cuál es la encargada de regular el citoesqueleto de actina durante la internalización de la célula apoptótica, permitiendo la emisión de pseudópodos para poder englobar la

célula apoptótica en un fagosoma (Brugnera et al., 2002; Lu et al., 2004; Kinchen et al., 2005). La Figura 1.16 representa las distintas rutas que intervienen en la fagocitosis de células apoptóticas en *C. elegans* y su convergencia en la activación de la proteína CED-10.

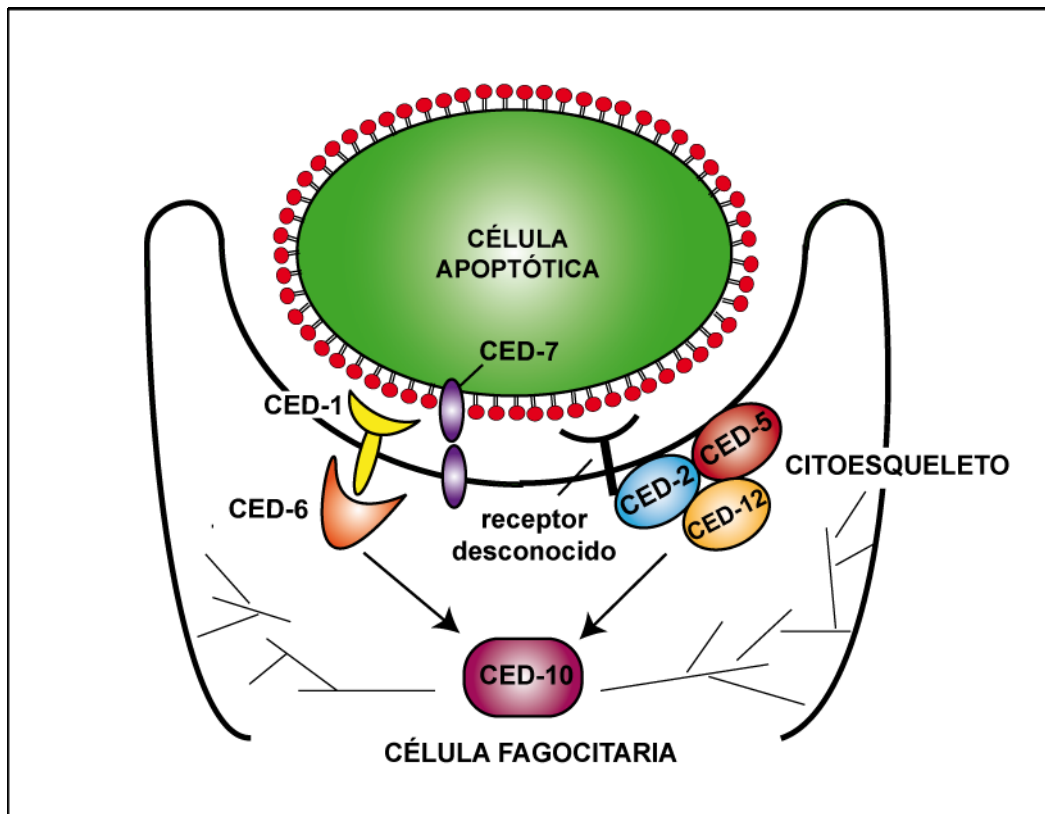


Figura 1.16. Rutas implicadas en la fagocitosis de las células apoptóticas. Se representa un esquema de las dos rutas implicadas en la fagocitosis de cuerpos apoptóticos: la formada por CED-1/CED-7/CED-6, y la formada por CED-2/CED-5/CED-12. Ambas rutas convergen en la GTPasa CED-10, la cuál interviene en la reorganización del citoesqueleto de la célula fagocitaria, necesaria para la fagocitosis de la célula apoptótica. Aún se desconoce el receptor que activa al complejo CED-2/CED-5/CED-12.

Aunque se desconoce el receptor que activa el complejo formado por CED-2/CED-5/CED-12, se han encontrado algunos receptores que podrían

actuar en esta ruta. El receptor de fosfatidilserina PSR-1 reconoce específicamente células apoptóticas que expresan fosfatidilserina en su superficie, como señal inductora de la fagocitosis (Fadok et al., 2001). En *C. elegans*, PSR-1 actúa promoviendo la formación del complejo CED-2/CED-5/CED-12, que media la activación de CED-10. Sin embargo, dado que los mutantes *psr-1* presentan un defecto de la fagocitosis de cuerpos apoptóticos menor que el de los mutantes *ced-2*, *ced-5*, *ced-10* y *ced-12*, se hipotetiza que otros receptores podrían también estar implicados en el reconocimiento de cuerpos apoptóticos (Wang et al., 2003). En mamíferos, ha sido identificado otro receptor que se une a fosfatidilserina en las células apoptóticas. Se trata del receptor BAI1 (inhibidor de la angiogénesis específica del cerebro), que está situado por encima de ELMO (Park et al., 2007).

Recientemente, se ha descubierto que el receptor MOM-5, de la familia Frizzled, componente de la ruta de señalización Wnt en *C. elegans* (Wingless en *Drosophila*), podría actuar reconociendo los cuerpos apoptóticos y activando la proteína CED-10, a través del complejo CED-2/CED-5/CED-12. Mediante estudios genéticos se ha observado que la ruta Wnt está implicada en la fagocitosis de cuerpos apoptóticos, y que el receptor CED-1 podría estar actuando como un correceptor para MOM-5 en el reconocimiento de las células apoptóticas, para poder reorganizar el citoesqueleto de la célula fagocitaria en torno a la célula apoptótica, mediante la activación de CED-10 (Cabello et al., 2010). Aparte de esta función, en *C. elegans* la ruta de señalización Wnt está implicada en numerosos procesos biológicos, tales como la migración celular, la polaridad, la proliferación celular, la diferenciación y especificación del destino celular durante la embriogénesis, el crecimiento de axones, etc (Eisenmann, 2005).

Existen diversas rutas de señalización mediadas por Wnt, tanto una ruta canónica como diversas rutas no canónicas. En vertebrados y *Drosophila*, la ruta canónica comienza con la interacción del ligando Wnt con un receptor de la familia Frizzled, lo cuál provoca la estabilización del factor de transcripción

β -catenina (denominada Armadillo en *Drosophila*), que se dirige al núcleo de la célula, dónde interacciona con factores de transcripción de la familia TCF/LEF (factor de transcripción / factor potenciador linfoide), activando la transcripción de diversos genes que generan una respuesta celular. La estabilización de la β -catenina se logra inhibiendo el complejo que, en ausencia de ligando Wnt, está fosforilando la β -catenina, para promover su destrucción (Komiya y Habas, 2008).

En *C. elegans* existe igualmente una ruta canónica Wnt, así como diversas rutas no canónicas. Varios de los genes implicados en la ruta Wnt en *C. elegans* son los siguientes: ligandos Wnt (*mom-2*, *egl-20*, *lin-44*...), receptores Wnt (*mom-5*, *mig-1*, *lin-17*...), tres proteínas diferentes de β -catenina (*bar-1*, *wrm-1* y *hmp-2*), un gen de la familia TCF/LEF (*pop-1*), etc. En la ruta canónica Wnt de *C. elegans* está implicada la β -catenina BAR-1, mientras que la β -catenina WRM-1 utiliza una ruta de señalización Wnt no canónica (Eisenmann, 2005). La ruta canónica Wnt interviene en diferentes procesos biológicos en *C. elegans*, como la migración de la progenie de los neuroblastos Q o la especificación del destino de las células precursoras de la vulva, entre otros (Whangbo y Kenyon, 1999; Gleason et al., 2006). Sin embargo, otros procesos son mediados por la ruta no canónica Wnt/ WRM-1, como por ejemplo: la inducción que ejerce la célula P₂ sobre la célula EMS para producir el endodermo, o la división asimétrica de las células precursoras de la gónada Z1 y Z4 (Rocheleau et al., 1997; Siegfried y Kimble, 2002).

3.3. La degradación de los cuerpos apoptóticos en *C. elegans*

Una vez fagocitada la célula apoptótica por la célula fagocitaria, se comenzará su degradación en el interior del fagosoma en el que se encuentra englobada. Se ha observado que el receptor CED-1, implicado en la fagocitosis de la célula apoptótica, activa a través de su ruta de señalización la GTPasa

DYN-1 (dinamina) (Yu et al., 2006; Yu et al., 2008). Igualmente, el complejo CED-2/CED-5/CED-12 también interviene en la activación de DYN-1, coordinándose entre sí ambas rutas de señalización, para promover el reclutamiento de DYN-1 sobre el fagosoma (Kinchen et al., 2008).

Algunos estudios realizados en *C. elegans* establecen que la proteína DYN-1 es necesaria para realizar una correcta internalización de los cuerpos apoptóticos, controlando la distribución de las vesículas intracelulares hasta las copas fagocíticas y los fagosomas (Yu et al., 2006). Sin embargo, en otros experimentos, realizados con el mutante *dyn-1(ky51)*, se observa que la internalización de los cuerpos apoptóticos es finalizada, sugiriendo que DYN-1 actúa en una etapa posterior a la de dicha internalización, controlando la maduración del fagosoma que contiene el cuerpo apoptótico y manteniendo el citoesqueleto de actina en la célula fagocitaria (Kinchen et al., 2008). La visualización de la proteína DYN-1 en células de *C. elegans*, ha permitido comprobar que DYN-1 debe oligomerizarse previamente para poder llevar a cabo su función (He et al., 2010).

Mediante observación de la proteína DYN-1 marcada con proteínas fluorescentes (YFP, CFP), se ha comprobado que el reclutamiento de DYN-1 sobre la membrana de los fagosomas es temporal, ya que no es encontrada posteriormente en los fagosomas tardíos. Este reclutamiento se produce durante la internalización de los cuerpos apoptóticos o inmediatamente después de ésta, ya que colocaliza con la red de actina que se forma alrededor de los cuerpos apoptóticos durante su internalización (Kinchen et al., 2008). En mutantes *dyn-1(ky51)*, el reclutamiento de RAB-5 y RAB-7 está disminuido con respecto al silvestre, indicando que la proteína DYN-1 actúa por encima de RAB-5 durante la maduración de los fagosomas (Kinchen et al., 2008).

En mamíferos existen tres dinaminas: la dinamina-1, que se expresa en el cerebro, la dinamina-2, que es expresada ubicuamente y la dinamina-3, que se

expresa en los testículos (Urrutia et al., 1997). La función de la dinamina ha sido conservada a lo largo de la evolución, de manera que en mamíferos esta proteína también está regulando la maduración de los fagosomas que contienen cuerpos apoptóticos (Kinchen et al., 2008).

La siguiente proteína de la ruta de maduración de los fagosomas es la quinasa específica de fosfatidilinositol VPS-34, que produce moléculas de fosfatidilinositol-3-fosfato sobre la membrana del fagosoma, a las cuáles se unen las proteínas efectoras de la GTPasa RAB-5 (Christoforidis et al., 1999; Vieira et al., 2001). En células de mamífero se observó que Dyn2 y Vps34 formaban un complejo que permitía el reclutamiento de Rab5-GDP sobre la membrana de los fagosomas. De manera similar, en *C. elegans*, se observó que DYN-1 y RAB-5 colocalizaban sobre las membranas de los fagosomas, y dicha colocalización era interrumpida al inactivar *vps-34*, sugiriendo que VPS-34 estaba implicada en la interacción entre ambas proteínas (Kinchen et al., 2008).

Al igual que se había observado previamente en estudios “in vitro”, se ha comprobado “in vivo” que la GTPasa RAB-5 también es capaz de regular la actividad de la quinasa VPS-34, ya que en animales deficientes en *rab-5*, la producción de fosfatidilinositol-3-fosfato en la membrana de los fagosomas se veía reducida (Vieira et al., 2001; Kinchen et al., 2008). Las moléculas de fosfatidilinositol-3-fosfato favorecen el reclutamiento de RAB-5 sobre la superficie de los endosomas tempranos y además sirven de punto de anclaje para los efectores de la GTPasa RAB-5, que generalmente poseen un dominio FYVE o PX (Vieira et al., 2001, Birkeland y Stenmark, 2004).

Los miembros de la familia Rab, en la que se incluyen RAB-5 o RAB-7, son pequeñas GTPasas pertenecientes a la superfamilia Ras GTPasas, que actúan como interruptores moleculares al ciclar entre la forma activa de la proteína, que es cuando la GTPasa está unida a GTP, y la forma inactiva, que es cuando se une a GDP (Milburn et al., 1990). La Rab GTPasa activa suele

encontrarse unida a membranas vesiculares dentro de la célula, mientras que cuando se inactiva, es liberada de estas membranas y se localiza fundamentalmente en el citosol (revisado por Pfeffer y Aivazian, 2004). La reacción de hidrólisis del GTP que convierte la GTPasa activa en su forma inactiva es catalizada por proteínas activadoras de GTPasas (*GTPase-activating proteins* o GAPs). Estas proteínas catalizan el ataque nucleofílico de una molécula de agua sobre el GTP, liberando un fosfato inorgánico, acelerando la reacción de hidrólisis del GTP. La conversión de la forma inactiva de la GTPasa en la forma activa, es llevada a cabo por factores de intercambio de nucleótidos de Guanina (*Guanine nucleotide exchange factors* o GEFs). Estos factores generan una disociación de la molécula de GDP de la GTPasa, la cual se une a una molécula de GTP, activándose nuevamente (Bos et al., 2007; Brett et al., 2008). Las Rab GTPasas, presentes en su forma inactiva en el citosol, son secuestradas principalmente por el inhibidor de la disociación de Rab-GDP (*Rab GDP dissociation inhibitor*, o GDI), y por tanto, es necesario que la GTPasa se disocie primero de este inhibidor antes de activarse (McCray et al., 2010). En la Figura 1.17, se ilustra un esquema del ciclo de activación e inactivación de la GTPasas.

Una proteína efectora aún desconocida podría estar actuando como factor intercambiador de nucleótidos de Guanina (GEF), activando la GTPasa RAB-5 en *C. elegans*. En mamíferos, se han encontrado varias proteínas que contienen un dominio VPS9 y que actúan como factores GEF para Rab5; sin embargo, ninguna de las tres proteínas que contienen el dominio VPS9 en *C. elegans* (RME-6, RABX-5 y TAG-333) son esenciales para la eliminación de cuerpos apoptóticos (Kinchen et al., 2008).

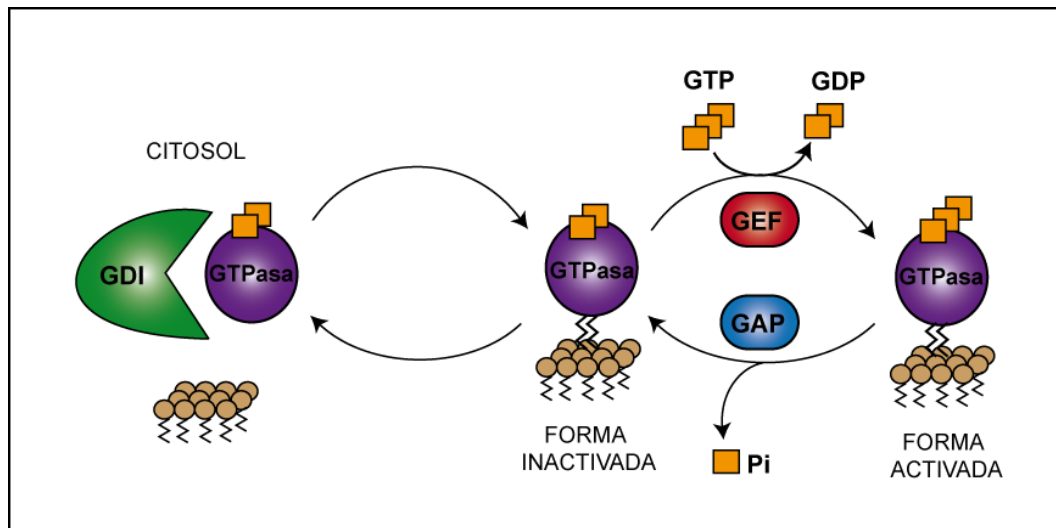


Figura 1.17. Ciclo de activación y desactivación de las GTPasas. Las GTPasas en su forma de unión a GDP están inactivadas y permanecen unidas al inhibidor de la disociación (GDI) en el citosol. La GTPasa se activa cuando se disocia del GDI y se une a una molécula de GTP, y esta activación es mediada por los factores de intercambio de nucleótidos de Guanina (GEF). La proteína activada se une entonces a la membrana y puede interactuar con otras proteínas. Su inactivación es catalizada por las proteínas activadoras de GTPasas (GAP) que hidrolizan el GTP, liberando fosfato inorgánico, y produciendo la forma inactiva de la GTPasa, que se encuentra unida a GDP.

En la maduración de los fagosomas es necesario que se produzca un intercambio progresivo entre la GTPasa RAB-5 y la GTPasa RAB-7, que va reclutándose sobre la membrana de los fagosomas, gracias a la acción de los efectores de RAB-5 (revisado por Kinchen y Ravichandran, 2008). Dichos efectores están implicados normalmente en la fusión de vesículas homotípicas durante la endocitosis, como es el caso del efector EEA1 (*early endosome antigen-1* o antígeno 1 de los endosomas tempranos) durante la fusión de vesículas positivas para Rab5 en cultivos celulares (Christoforidis et al., 1999). En la Figura 1.18 se representa cómo se produce el reclutamiento progresivo de las proteínas que intervienen en la maduración de los fagosomas, así como la activación de las GTPasas y el intercambio entre RAB-5 y RAB-7.

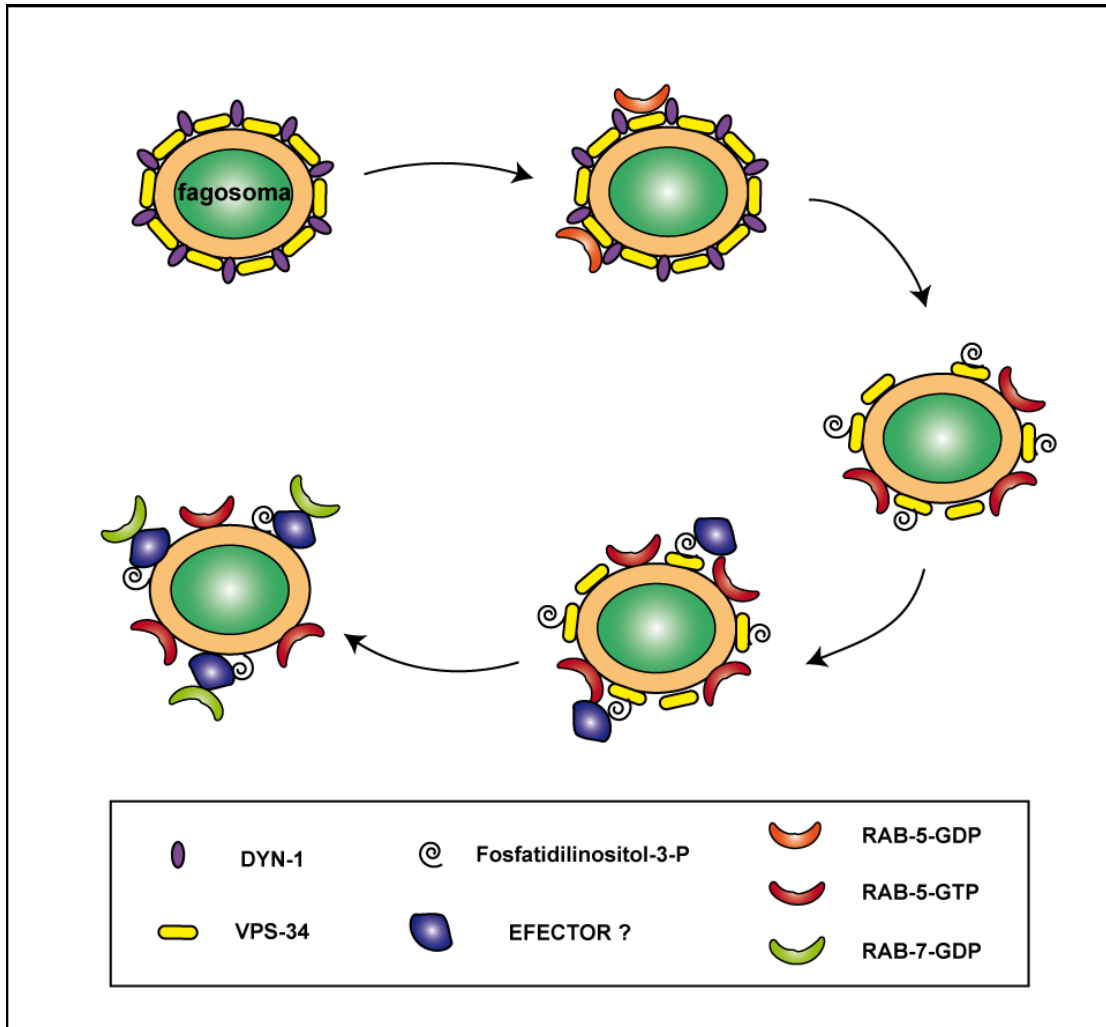


Figura 1.18. Reclutamiento de las proteínas que intervienen en la maduración de los fagosomas. Las primeras proteínas que se reclutan en la superficie de los fagosomas durante su maduración son la dinamina-1 (DYN-1) y la quinasa VPS-34, la cuál genera los fosfatidilinositol-3-P. Éstos permiten la unión de las proteínas activadoras de la GTPasa RAB-5, que se transforma de RAB-5-GDP inactivada a RAB-5-GTP activada. Posteriormente, el reclutamiento de otros efectores, aún no identificados, permite el intercambio entre RAB-5 y RAB-7 en la superficie del fagosoma.

En esta fase, la proteína TBC-2 actúa en varios procesos de la maduración de los fagosomas, entre los cuáles se incluyen: la inactivación de RAB-5, convirtiéndose de la forma activa RAB-5-GTP a su forma inactiva RAB-5-GDP, la liberación de RAB-5 de las membranas de los fagosomas, el reclutamiento de RAB-7, la acidificación del fagosoma o la dinámica de los

fosfatidilinositol-3-fosfato de la membrana del fagosoma (Li et al., 2009). Adicionalmente, existe un segundo regulador, la fosfatasa MTM-1, que actúa desfosforilando las moléculas de fosfatidilinositol-3-fosfato presentes en la membrana del fagosoma y que regula de forma negativa la fagocitosis de células apoptóticas. Los fosfatidilinositol-3-fosfato deben ser eliminados de la superficie del fagosoma, para que pueda producirse su maduración (Zou et al., 2009).

Progresivamente, los fagosomas van acidificándose durante la maduración, gracias a la actividad de las V-ATPasas vacuolares, que son reclutadas sobre la membrana de los fagosomas (revisado por Zhou y Yu, 2008). Durante el último estadio de maduración del fagosoma, éste se fusiona con el lisosoma, generándose un fagolisosoma, el cuál posee un pH bajo, capaz de activar las hidrolasas ácidas que contiene en su interior (Vieira et al., 2002; revisado por Zhou y Yu, 2008). Para que se produzca la fusión entre el fagosoma y el lisosoma, se requiere la actividad de RAB-7, la cuál genera la extensión de túbulos lipídicos desde los fagosomas para poder atraer a los lisosomas que facilitan la fusión (Yu et al., 2008). Por tanto, al igual que su homólogo en levaduras, Ypt7, la GTPasa RAB-7 interviene en la fusión de vesículas homotípicas, pero además estaría implicada en la fusión de diferentes tipos de orgánulos (revisado por Cai et al., 2007).

La GTPasa RAB-7 activa el complejo HOPS (*Homotypic fusion and vacuole protein sorting complex* o complejo regulador de la fusión de vesículas homotípicas y de la clasificación de proteínas vacuolares). Este complejo está conservado en levaduras, nematodos y mamíferos, sin embargo, la mayoría de los estudios han sido realizados en levaduras. En *Saccharomyces cerevisiae*, el complejo HOPS está formado por un complejo proteico denominado CORVET (*Class C core vacuole/endosome tethering*), que posee las proteínas: Vps11, Vps16, Vps18 y Vps33; y al cuál se unen dos subunidades accesorias: Vps39 y Vps41 (Nickerson et al., 2009). En *Saccharomyces cerevisiae*, la subunidad Vps39p del complejo HOPS actúa como un factor de intercambio de nucleótidos

(GEF) para la proteína Ypt7 (el homólogo de RAB-7 en levaduras), la cuál actúa manteniendo la asociación del complejo HOPS a la membrana de la vacuola (Hickey et al., 2009). La proteína Vps39 de levaduras actúa uniendo físicamente el complejo HOPS con la forma activada de Ypt7, unida a GTP, promoviendo de esta forma la fusión de las vesículas con las vacuolas (revisado por Nickerson et al., 2009).

La proteína Vps41 de *S. cerevisiae* se une a Ypt7 como un efector, uniendo físicamente el complejo HOPS con el estado activado de Ypt7, unido a GTP (Brett et al., 2008). Vps41 también es requerida para la biogénesis de las vesículas transportadoras de proteínas desde el aparato de Golgi hasta la vacuola en levaduras (Cabrera et al., 2009). La proteína Vps41 es fosforilada en la vacuola por la quinasa de caseína 1, Yck3, permitiendo que los sensores de lípidos anfipáticos que posee Vps41 se expongan y permitan reconocer membranas con gran curvatura, como las vesículas AP-3, promoviendo su fusión con la vacuola. Este mecanismo de regulación permite diferenciar entre la fusión de endosomas y la fusión de vesículas AP-3 con la vacuola (Cabrera et al., 2010). Las subunidades Vps11 y Vps18 del complejo HOPS contienen un dominio denominado RING en su extremo C-terminal (Cabrera et al., 2009). En *C. elegans*, la inactivación del gen *vps-18* provoca defectos importantes en la biogénesis de los endosomas y lisosomas, así como en la fusión entre fagosomas y lisosomas, afectando a la correcta degradación de los cuerpos apoptóticos (Xiao et al., 2009). El dominio RING presente en VPS-18 posee una actividad E3 ubiquitin ligasa, por lo tanto, VPS-18 podría estar regulando mediante ubiquitinación otros factores implicados en la fusión de membranas (Xiao et al., 2009). La proteína Vps33p presenta homología con las proteínas Sec-1/Munc18 y parece actuar promoviendo la apertura del poro de fusión entre las vacuolas de levaduras, mediante un aumento de la actividad fusogénica del complejo SNARE (Pieren et al., 2010).

El complejo HOPS actúa asociándose al complejo formado por las proteínas SNAREs (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors*) y a Ypt7p para mediar la asociación y fusión de las membranas durante la fusión del fagosoma con la vacuola (Sato et al., 2000). La fusión mediada por el complejo SNARE requiere cuatro dominios SNARE complementarios, los cuáles cuando se unen forman una estructura de cremallera, situándose en su conformación “trans”, promoviendo el acercamiento de las membranas que inician una mezcla de sus lípidos y su posterior fusión (revisado por Nickerson et al., 2009). El complejo SNARE es muy estable y está formado por cuatro α -hélices, una aportada por una proteína v-SNARE específica, situada en la membrana de la vesícula y las otras tres α -hélices aportadas por las proteínas t-SNARE, situadas en la membrana con la que se fusiona la vesícula (Sutton et al., 1998; revisado por Bonifacino y Glick, 2004). El complejo HOPS tiene afinidad por las proteínas SNAREs, y actúa corrigiendo la estructura del complejo proteico SNARE, cuando sus miembros están en conformación “trans” (Starai et al., 2008).

Por otra parte, la GTPasa RAB-2 es requerida durante la fusión entre lisosomas y fagosomas, la maduración de los lisosomas y la acidificación del fagolisosoma. Esta proteína colocaliza tanto con RAB-5, como con RAB-7, por lo que es posible que sea reclutada sobre la membrana del fagosoma durante su fusión con los endosomas tempranos y participe durante toda la maduración del fagosoma (Mangahas et al., 2008). Se desconoce aún cómo interacciona RAB-2 con las GTPasas RAB-5 y RAB-7; así como si su homólogo en mamíferos Rab2, que actúa durante el transporte retrógrado Golgi-Retículo endoplasmático, también está implicado en la maduración de los fagosomas.

Finalmente, se produce la fusión entre el fagosoma y el lisosoma, de forma que las enzimas del lisosoma contactan con el cuerpo apoptótico fagocitado e inician su degradación.

OBJETIVOS

1. Caracterizar fenotípicamente los mutantes de *C. elegans* *t2129*, *t2070* y *t2170*, que presentan defectos en la embriogénesis.
2. Mapear y clonar el gen afectado en los mutantes *t2129*, *t2070* y *t2170*.
3. Establecer la función bioquímica la proteína afectada.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cepas de *Caenorhabditis elegans*

En la siguiente Tabla 2.1. se recogen las cepas de *C. elegans* utilizadas en la realización de este trabajo. Para cada cepa se indica el nombre que le fue asignado al ser introducida en la colección de cepas del laboratorio, el nombre de la cepa original si procede, el genotipo de la cepa y su procedencia. Algunas de las cepas proceden del Centro Genético de *Caenorhabditis* (*Caenorhabditis* Genetics Center, CGC), ubicado en la Universidad de Minnesota desde 1992, y anteriormente, desde 1978, en la Universidad de Missouri. Dicho centro posee una colección que abarca la mayoría de cepas disponibles de *C. elegans* y las distribuye, bajo petición y cobro de un pequeño coste, a nivel mundial a todos los laboratorios que utilizan el nematodo como modelo experimental. Algunas cepas fueron solicitadas a diversos laboratorios que trabajan con *C. elegans*. Por último, otras cepas fueron generadas en el transcurso de la realización de este trabajo experimental. Varias de ellas se construyeron como dobles mutantes entre dos de las cepas de la colección. Mientras que otras se construyeron introduciendo el plásmido o cósmido deseado en la cepa seleccionada, mediante inyección o bien transformación con ayuda de un cañón de partículas.

| Tabla 2.1. Cepas de <i>C. elegans</i> . | | | |
|---|---------------|---|--|
| CEPA | CEPA ORIGINAL | GENOTIPO | PROCEDENCIA |
| SA0001 | N2 | <i>wild type</i> | CGC |
| SA0042 | GE2002 | <i>him-9(e1487) unc-24(e138)/ nT1(m345)(let) IV; dpy-11(e224) mat (t2129) V / nT1(m345)(let) (IV;V)</i> | Mutante <i>t2129</i> , generado por mutagénesis en el laboratorio del Dr. Ralf Schnabel, Universidad Técnica de Braunschweig, Alemania |

| Tabla 2.1. Cepas de <i>C. elegans</i> (Continuación). | | | |
|---|---------------|---|--|
| CEPA | CEPA ORIGINAL | GENOTIPO | PROCEDENCIA |
| SA0046 | CB4856 | <i>Hawaii</i> | CGC |
| SA0047 | MT5813 | <i>nDf42 V/nT1 [unc-? (n754) let-?] (IV;V)</i> | Dr. Robert Horvitz, Instituto de Tecnología de Massachussets, Cambridge |
| SA0048 | TY1470 | <i>yDf8 V/nT1 [unc-? (n754)let-?] (IV;V)</i> | Dra. Barbara Meyer, Universidad de California, Berkeley |
| SA0049 | BC1230 | <i>dpy-18(e364)eT1 III; sDf27 unc-46(e177) /eT1 V</i> | Dr. David Baillie, Dr. Simon Fraser Universidad de Burnaby (CGC) |
| SA0054 | DR188 | <i>daf-11(m47) unc-76(e911)V</i> | Dr. Donald Riddle, Universidad de Missouri, Columbia |
| SA0055 | WS2384 | <i>ced-10 (t1875) IV /nT1 qls51 (IV;V)</i> | Dr. Jason Kinchen, Universidad de Zürich, Suiza |
| SA0058 | GE24 | GE24 <i>pha-1(e2123)III</i> | Dr. Ralf Schnabel, Universidad Técnica de Braunschweig, Alemania |
| SA0059 (JCP53) | | <i>dpy-11(e224);mat(t2129) V/ nT1 qls51 (IV;V)</i> | Este trabajo: cepa SA0042 (t2129) balanceada con el balanceador fluorescente de la cepa SA0055 (nT1 qls51) (disponible en el CGC como JCP53) |
| SA0060 | | <i>dpy-11(e224);mat(t2129), unc-76(e911) V/nT1 qls51 (IV;V)</i> | Este trabajo: cepa construida a partir de la cepa SA0059 y la cepa SA0054 (<i>unc-76</i>). |
| SA0062 | NL2099 | <i>rrf-3 (pk1426) II</i> | Dra. Noemí Cabrera, Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols", Madrid |
| SA0068 | GE2001 | <i>him-9(e1487) unc-24(e138)/ nT1(m345)(let) IV; dpy-11(e224) mat (t2070) V / nT1(m345)(let) (IV;V)</i> | Mutante t2070, generado por mutagénesis en el laboratorio del Dr. Ralf Schnabel, Universidad Técnica de Braunschweig, Alemania |

Tabla 2.1. Cepas de *C. elegans* (Continuación).

| CEPA | CEPA ORIGINAL | GENOTIPO | PROCEDENCIA |
|--------|---------------|---|--|
| SA0072 | GE2516 | <i>him-9(e1487) II; unc-24(e138) IV/nT1(IV;V); dpy-11(e224) ccz-1(t2170) V/nT1(IV;V).</i> | Mutante <i>t2170</i> , generado por mutagénesis en el laboratorio del Dr. Ralf Schnabel, Universidad Técnica de Braunschweig, Alemania |
| SA0085 | | <i>cnEx0001; unc-24(e138) IV/nT1(m345)(let) (IV;V); dpy-11 (e224) t2129 V/nT1(m345)(let) (IV;V)</i> | Este trabajo: cepa SA0042 transformada mediante bombardeo del cósmido F53F4 con cañón de partículas. |
| SA0086 | WS5045 | <i>opEx1367; unc-24(e138) IV/nT1(m345)(let) (IV;V); dpy-11 (e224) t2129 V/nT1(m345)(let) (IV;V)</i> | Este trabajo: cepa SA0042 transformada mediante inyección del fósido H37A05 por el Dr. Stephan Gisy, Universidad de Zürich, Suiza |
| SA0087 | WS5046 | <i>opEx1368; unc-24(e138) IV/nT1(m345)(let) (IV;V); dpy-11 (e224) t2129 V/nT1(m345)(let) (IV;V)</i> | Este trabajo: cepa SA0042 transformada mediante inyección del fósido H37A05 por el Dr. Stephan Gisy, Universidad de Zürich, Suiza |
| SA0088 | WS5047 | <i>opEx1369; unc-24(e138) IV/nT1(m345)(let) (IV;V); dpy-11 (e224) t2129 V/nT1(m345)(let) (IV;V)</i> | Este trabajo: cepa SA0042 transformada mediante inyección del cósmido F53F4 por el Dr. Stephan Gisy, Universidad de Zürich, Suiza |
| SA0089 | WS5048 | <i>opEx1370; unc-24(e138) IV/nT1(m345)(let) (IV;V); dpy-11 (e224) t2129 V/nT1(m345)(let) (IV;V)</i> | Este trabajo: cepa SA0042 transformada mediante inyección del cósmido F53F4 por el Dr. Stephan Gisy, Universidad de Zürich, Suiza |
| | WS5187 | <i>opEx1398; unc-24(e138) IV/nT1(m345)(let) (IV;V); dpy-11 (e224) t2129 V/nT1(m345)(let) (IV;V)</i> | Este trabajo: cepa SA0042 transformada mediante inyección del cósmido F55B12 por el Dr. Stephan Gisy, Universidad de Zürich, Suiza. |

| Tabla 2.1. Cepas de <i>C. elegans</i> (Continuación). | | | |
|--|----------------------|---|--|
| CEPA | CEPA ORIGINAL | GENOTIPO | PROCEDENCIA |
| | WS5188 | <i>opEx1399; unc-24(e138) IV/ nT1(m345)(let) (IV;V); dpy-11 (e224) t2129 V/ nT1(m345)(let) (IV;V)</i> | Este trabajo: cepa SA0042 transformada mediante inyección del cósmido F58G11 por el Dr. Stephan Gisy, Universidad de Zürich, Suiza |
| | WS5189 | <i>opEx1400; unc-24(e138) IV/ nT1(m345)(let) (IV;V); dpy-11 (e224) t2129 V/ nT1(m345)(let) (IV;V)</i> | Este trabajo: cepa SA0042 transformada mediante inyección del cósmido T10G3 por el Dr. Stephan Gisy, Universidad de Zürich, Suiza |
| | WS5196 | <i>opEx1403; unc-24(e138) IV/ nT1(m345)(let) (IV;V); dpy-11 (e224) t2129 V/ nT1(m345)(let) (IV;V)</i> | Este trabajo: cepa SA0042 transformada mediante inyección del cósmido C56A3, Universidad de Zürich, Suiza |
| | WS5197 | <i>opEx1404; unc-24(e138) IV/ nT1(m345)(let) (IV;V); dpy-11 (e224) t2129 V/ nT1(m345)(let) (IV;V)</i> | Este trabajo: cepa SA0042 transformada mediante inyección del cósmido T01D3, Universidad de Zürich, Suiza. |
| | WS5198 | <i>opEx1405; unc-24(e138) IV/ nT1(m345)(let) (IV;V); dpy-11 (e224) t2129 V/ nT1(m345)(let) (IV;V)</i> | Este trabajo: cepa SA0042 transformada mediante inyección del cósmido WRM0617cG09, Universidad de Zürich, Suiza. |
| | WS5199 | <i>opEx1406; unc-24(e138) IV/ nT1(m345)(let) (IV;V); dpy-11 (e224) t2129 V/ nT1(m345)(let) (IV;V)</i> | Este trabajo: cepa SA0042 transformada mediante inyección del cósmido F55B12, Universidad de Zürich, Suiza. |
| | WS5200 | <i>opEx1407; unc-24(e138) IV/ nT1(m345)(let) (IV;V); dpy-11 (e224) t2129 V/ nT1(m345)(let) (IV;V)</i> | Este trabajo: cepa SA0042 transformada mediante inyección del cósmido WRM0633bB09, Universidad de Zürich, Suiza. |

Tabla 2.1. Cepas de *C. elegans* (Continuación).

| CEPA | CEPA ORIGINAL | GENOTIPO | PROCEDENCIA |
|--------|---------------|--|--|
| SA0118 | WS2170 | <i>unc-119(ed3) III; opIs110 [Plim-7::yfp::actin; unc-119(+)] IV</i> | Dr. Michael Hengartner, Universidad de Zürich, Suiza |
| SA0119 | WS4670 | <i>unc-119(ed3) III; opEX1303 [Pced-1::yfp::rab-7(genomic)::let-858_3'UTR; unc-119(+)]</i> | Dr. Michael Hengartner, Universidad de Zürich, Suiza |
| SA0120 | WS4671 | <i>unc-119(ed3) III; opIs282 [Pced-1::yfp::rab-5(genomic)::let-858_3'UTR; unc-119(+)]</i> | Dr. Michael Hengartner, Universidad de Zürich, Suiza |
| SA0121 | WS5016 | <i>unc-119(ed3) III; opIs334 [Pced-1::yfp::2xFYVE(EEA-1)::let-858_3'UTR; unc-119(+)]</i> | Dr. Michael Hengartner, Universidad de Zürich, Suiza |
| SA0122 | WS5235 | <i>mat t2129 V/nT1qls51 (IV;V)</i> | Este trabajo: cepa construida a partir de SA0059, eliminando el marcador <i>dpy-11</i> . |
| SA0123 | VC309 | <i>tag-65 (ok535) V/nT1 IV;V</i> | Dra. Anna Rankin (CGC) |
| SA0124 | RB1598 | <i>sand-1 (ok1963) IV</i> | OMRF Knockout Group (CGC) |
| SA0125 | | <i>nDf42 V/nT1 qls51 (IV;V)</i> | Este trabajo: cepa construida a partir de la cepa SA0047 (MT5813), balanceada con el balanceador fluorescente nT1qls51 |
| SA0126 | WS2972 | <i>gla-3(op216) I</i> | Dr. Michael Hengartner, Universidad de Zürich, Suiza |
| SA0127 | CB224 | <i>dpy-11(e224) V</i> | Dr. Michael Hengartner, Universidad de Zürich, Suiza |
| SA0131 | CX51 | <i>dyn-1(ky51) X</i> | Dr. Michael Hengartner, Universidad de Zürich, Suiza |
| SA0132 | VC308 | <i>rab-7 (ok511) II /mln-1 [dpy-10 (e128); mls14 [myo-2::gfp; pes-10::gfp]] II</i> | Dr. Michael Hengartner, Universidad de Zürich, Suiza |
| SA0133 | WS4373 | <i>rab-7 (ok511) II /mln-1 [dpy-10 (e128); mls14 [myo-2::gfp; pes-10::gfp]] II</i> | Dr. Michael Hengartner, Universidad de Zürich, Suiza |

| Tabla 2.1. Cepas de <i>C. elegans</i> (Continuación). | | | |
|--|----------------------|--|---|
| CEPA | CEPA ORIGINAL | GENOTIPO | PROCEDENCIA |
| SA0142 | VC548 | <i>v vps-16(ok719)III/hT2</i> | CGC |
| SA0144 | RT130 | <i>pwls23 (vit-2::gfp)</i> | CGC |
| SA0145 | | <i>unc-119 (ed3) III; jcpEx2 [Pced-1::F58G11.6(genomic)::yfp::let-858_3'UTR; unc-119(+)] + myo-2::gfp</i> | Este trabajo: cepa SA0148 (<i>unc-119</i>) transformada con el plásmido pCN1 |
| SA0146 | RB1457 | <i>R06F6.2 (ok1664) II</i> | CGC |
| SA0147 | VC2009 | <i>F58G11.6 (ok2182) V</i> | CGC |
| SA0148 | | <i>unc-119 (ed3) III</i> | Dr. Michael Hengartner, Universidad de Zürich, Suiza |
| SA0149 | | <i>opls334 [Pced-1::yfp::2xFYVE(EEA-1)::let-858_3'UTR; unc-119(+)] ; dpy-11, t2129 V/ nT1qls51 (IV;V)</i> | Este trabajo: doble mutante entre SA0059 y SA0121 (WS5016) |
| SA0150 | | <i>wild type (N2), jcpEx2 [Pced-1::F58G11.6(genomic)::yfp::let-858_3'UTR; unc-119(+)] + myo-2::gfp</i> | Este trabajo: cepa SA0001 (N2) transformada con el plásmido pCN1 |
| SA0152 (JCP152) | | <i>dpy-11 (e224), ccz-1(t2129) V jcpEx2 [Pced-1::F58G11.6 (genomic)::yfp::let-858_3'UTR; unc-119(+)] + myo-2::gfp</i> | Este trabajo: cepa SA0059 (t2129) transformada con el plásmido pCN1 (disponible en CGC como JCP152) |
| SA0154 | | <i>vfEx130 [Pced-1::cfp::rab-7, unc-69(+)]</i> | Dr. Michael Hengartner, Universidad de Zürich, Suiza |
| SA0156 | WS4389 | <i>unc-119 (ed3)III; opEx1279 [Peft-3::cfp::rab-5 (genomic)::let-858-UTR, unc-119(+)]</i> | Dr. Michael Hengartner, Universidad de Zürich, Suiza |
| SA0157 | WS4774 | <i>unc-119 (ed3)III; opEx1304 [Pced-1::yfp::rab-5(genomic)::let-858-UTR, unc-119(+)]</i> | Dr. Michael Hengartner, Universidad de Zürich, Suiza |

Tabla 2.1. Cepas de *C. elegans* (Continuación).

| CEPA | CEPA ORIGINAL | GENOTIPO | PROCEDENCIA |
|-----------------|---------------|--|---|
| SA0158 | | <i>unc-119 (ed3)III; opIs223 [Peft-3::yfp::rab-7(genomic)::let-858-UTR, unc-119(+)]</i> | Dr. Michael Hengartner, Universidad de Zürich, Suiza |
| SA0159 | | <i>pwIs23 (vit-2::gfp), dpy-11(e224), t2129 /nT1qls51</i> | Este trabajo: cepa construida a partir de la cepa SA0144 (RT130) |
| SA0160 | | <i>opEx1303 [Pced-1::yfp::rab-7 (genomic)::let-858_3'UTR; unc-119(+)], dpy-11 (e224), t2129 V/ nT1 (IV;V)</i> | Este trabajo: cepa construida a partir de la cepa SA0059 y cepa SA0119 (WS4670) |
| SA0161 | | <i>unc-119 (ed3) III; jcpEx3 [Promotor F58G11.6::F58G11.6 (genomic)::yfp::let-858_3'UTR; unc-119(+)] + myo-2::gfp</i> | Este trabajo: cepa SA0148 (<i>unc-119</i>) transformada con pCN2 |
| SA0162 | VC2199 | <i>rab-5 (ok2605) I/hT2 [bli-4(e937) let-? (q782) qls48] (I;III)</i> | CGC |
| SA0163 | | <i>opEx1304 [Pced-1::yfp::rab-5 (genomic)::let-858_3'UTR; unc-119(+)], dpy-11 (e224), t2129 V/ nT1 (IV;V)</i> | Este trabajo: cepa construida a partir de la cepa SA0059 y la cepa SA0157 (WS4774) |
| SA0167 | | <i>pha-1(e2123)III; jcpEx4 [Promotor F58G11.6:: F58G11.6(genomic):: yfp:: let-858_3'UTR; unc-119(+)] + pha-1(+)</i> | Este trabajo: cepa SA0058 (<i>pha-1</i>) transformada con el plásmido pCN2 y el plásmido que rescata <i>pha-1</i> como marcador de la transformación. |
| SA0168 | | <i>sand-1(or552); pmyo::55GFP</i> | Dra. Anne Spang, Universidad de Basel, Suiza |
| SA0169 (JCP169) | | <i>dpy-11 (e224), ccz1 (t2129) V; jcpEx0003 [Promotor F8G11.6:: F58G11.6(genomic)::yfp::let-858_3'UTR; unc-119(+)] + pha-1(+)]</i> | Este trabajo: cepa construida a partir de la cepa SA0059 (t2129) y cepa SA0167 (Disponible en el CGC como JCP169) |

2. Cepas de *Escherichia coli*

Las cepas de *E. coli* utilizadas para la producción de plásmidos en bacteria fueron DH5 α y DH10B (Genehogs, Invitrogen). Las células competentes de la cepa DH5 α se obtuvieron siguiendo el protocolo desarrollado por Inoue et al. (1990). La cepa de *E. coli* necesaria para el cultivo de las cepas de *C. elegans* es la cepa OP50 (CGC). Como se detallará posteriormente, la cepa XL10-Gold (Stratagene) fue la utilizada en el kit *QuickChange XL Site-Directed Mutagenesis* kit de Stratagene, para realizar la mutagénesis dirigida en el promotor del gen *ccz-1* durante la construcción del plásmido pCN2. En la tabla 2.2 se muestran los genotipos de dichas cepas.

| Tabla 2.2. Cepas de <i>Escherichia coli</i> | | |
|---|---|-------------|
| CEPA | GENOTIPO | PROCEDENCIA |
| DH5 α | <i>F- endA1 glnv44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ80dlacZΔM15Δ (lacZYA-argF) U169, hsdR17(rK- mK+), λ-</i> | IBMCC |
| DH10B | <i>F endA1 recA1 mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK λrpsL(Str^R) nupG</i> | Invitrogen |
| OP50 | <i>E. coli B, auxotrofa para uracilo</i> | CGC |
| XL10- Gold | <i>endA1 glnV44 recA1 thi-1 gyrA96 relA1 lac Hte Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 tet^R F'[proAB lacI^fZΔM15 Tn10(Tet^R Amy Cm^R)]</i> | Stratagene |

3. Medios y condiciones de cultivo

3.1. Cultivo de las cepas de *C. elegans*

Las cepas de *C. elegans* fueron mantenidas según el método descrito por Brenner (1974), basado en placas Petri que contienen NGM agar, sobre el cuál se siembra un césped de la cepa OP50 de *Escherichia coli*. El medio NGM agar fue preparado mezclando NaCl, agar, peptona y agua mili-Q. Este medio fue autoclavado y posteriormente fueron añadidos los nutrientes y sales necesarios para el correcto crecimiento de los nematodos: CaCl₂ (1M), MgSO₄ (1M), buffer KPO₄ (1M, pH=6.0) y colesterol. Para prevenir la contaminación procedente de hongos y bacterias, se añadió ampicilina (Roche) y nistatina (Sigma) al cultivo.

Las cepas de *C. elegans* se crecieron habitualmente a 20 °C en un incubador. Sin embargo, determinadas cepas se crecieron a una temperatura de 15 °C, bien por tratarse de cepas termosensibles, o bien para poder ralentizar su crecimiento durante el transcurso de ciertos experimentos. Con el objetivo de evitar la deshidratación de las placas y la condensación del agua, las placas fueron envueltas en parafilm y almacenadas en cajas de cartón dentro del incubador.

3.2. Cultivos de *E. coli*

Los cultivos de *E.coli* fueron realizados siguiendo los procedimientos descritos por Sambrook et al. (1989). Cuando fueron cultivados en líquido se utilizó el medio líquido LB (Luria-Bertani) con 100 µg/ml de ampicilina (Roche), incubándolos a 37 °C durante 12-16 horas con una agitación de 200 rpm. Para los cultivos en medio sólido se empleó medio LB agar con el antibiótico necesario.

3.3. Limpieza de las cepas

Cuando, a pesar del antifúngico y el antibiótico utilizados en el medio de cultivo, las cepas de *C. elegans* se contaminaron con hongos y/o bacterias, éstas se limpiaron lavando los nematodos dos veces seguidas con ácido hipocloroso al 12%, y posteriormente con medio M9 tres veces para eliminar los restos del ácido hipocloroso. Este tratamiento también se utilizó para sincronizar los animales en el estadio L1, ya que únicamente los embriones, al tener una pared que les confiere una protección mayor, son resistentes al ácido hipocloroso. El medio M9 contiene: 6 g de Na₂HPO₄, 3 g de KH₂PO₄, 5 g de NaCl, 1 ml de 1 M MgSO₄ y agua milli-Q estéril (cantidad suficiente para 1l), y es esterilizado previamente a su utilización.

3.4. Congelación de las cepas

Una de las ventajas de las cepas de *C. elegans* es que pueden ser congeladas y almacenadas indefinidamente. El estadio que mejor soporta la congelación es la fase larvaria L1, por tanto, las cepas deben ser congeladas en el momento en el que en la placa existe un número elevado de larvas L1. Las cepas fueron congeladas recogiendo los animales de las placas en medio M9 y añadiéndoles la solución de congelación en una proporción de 1:1. La solución de congelación contiene glicerol al 30%, de forma que la concentración final de glicerol será del 15%. Para cada cepa se congelaron tres tubos diferentes y un tubo control, que permitió comprobar la supervivencia de la cepa tras la congelación, al ser descongelado posteriormente. Las cepas fueron congeladas lentamente para favorecer su viabilidad, por ello se colocaron en una caja de corcho, dentro de un congelador a -80 °C. De esta forma, la temperatura fue descendiendo lentamente y los animales pudieron sobrevivir más fácilmente la congelación. Las cepas se mantuvieron a -80 °C o en N₂ líquido.

4. Mutagénesis con Etilmetanosulfonato (EMS)

C. elegans puede ser mutageneizado con diversos agentes químicos, como por ejemplo el Etilmetanosulfonato (EMS). La mutagénesis con el EMS provoca generalmente mutaciones de tipo puntual. La cepa GE2002 utilizada en la mutagénesis con EMS tenía el siguiente genotipo: *him-9(e1487) unc-24(e138)/ nT1(m345)(let) IV; dpy-11(e224) V/ nT1(m345)(let) (IV;V)*. El primer paso en la mutagénesis con EMS consistió en lavar los nematodos de aproximadamente 30 placas de cultivo con solución M9 y recogerlos en un tubo cónico de 15 ml. Se utilizaron placas que contienen un gran número de larvas L4 y jóvenes adultos, ya que en dichos estadios es cuando resulta más efectiva la mutagénesis. Se centrifugaron durante 30 segundos a 1000 rpm y se eliminó el exceso de la solución M9, permaneciendo los animales en aproximadamente 4 ml de dicha solución. Se resuspendieron en 10 ml de solución M9 y se volvieron a centrifugar. Se eliminó el exceso de solución M9 y los animales se dejaron suspendidos en 1 ml de solución M9. Los sucesivos lavados con la solución M9 permitieron eliminar las bacterias procedentes de la placa de cultivo.

Posteriormente, en una campana de extracción de gases se añadieron 3 ml de solución M9 en un tubo falcon de 25 ml y 20 µl de EMS (methanesulfonic acid, ethyl ester, Sigma), agitando la solución hasta la completa disolución del EMS. Al tubo que contenía la solución de EMS, se añadió 1 ml de la suspensión de los nematodos en la solución M9, siendo la concentración final de EMS 50 mM aproximadamente. Se mezclaron ambas soluciones y se dejaron incubar a temperatura ambiente durante 4h. Cada 30 minutos se agitó el tubo para favorecer la circulación de oxígeno en la solución. Después se centrifugaron los animales y se eliminó el sobrenadante que contenía el EMS, añadiéndolo a una solución de NaOH 2M para neutralizarlo. Se lavaron 3 veces con 10 ml de solución M9 cada vez, eliminando el sobrenadante y añadiéndolo a la solución de NaOH 2M para su neutralización.

Se recogieron los animales en un volumen mínimo de solución M9, aproximadamente 0,2 ml, y se transfirieron a una placa Petri con NGM agar cultivado con bacterias *E. coli* OP50. Una vez se hubo secado la placa, se transfirieron uno a uno los nematodos a placas nuevas, y se dejaron a 15 °C, para que pudieran recuperarse de la mutagénesis. Al día siguiente, se separaron aproximadamente 150 adultos mutageneizados que parecieran sanos, poniendo uno en cada placa. Se dejaron durante un día para que pusieran los huevos en la placa y al día siguiente, se transfirieron a otra placa distinta. Como la mayoría de las mutaciones son recesivas, no se observa su fenotipo hasta la segunda generación (F2), por ello se dejaron crecer los animales de la F1 y el escrutinio para la detección de los mutantes se realizó en la segunda generación (F2). Este experimento y el escrutinio siguiente, en el cuál se detectaron los mutantes *t2129*, *t2070* y *t2170* utilizados en este trabajo, fue realizado en el laboratorio del Dr. Schnabel en la Universidad Técnica de Braunschweig, Alemania.

5. Complementación de cepas

El test de complementación entre cepas permitió comprobar cuáles de los mutantes generados mediante la mutagénesis estaban afectando al mismo gen. Para realizarlo se llevaron acabo cruces genéticos entre las distintas cepas seleccionando entre 10 y 15 machos de una de las cepas y cruzándolos con 4 o 5 hermafroditas de la otra cepa. En el test de complementación del mutante *t2129* con cepas que contenían diferentes deficiencias, se seleccionaron machos de la cepa SA0042 (mutante *t2129*), ya que al poseer el alelo *him-9* (*e1487*), esta cepa produce una mayor cantidad de machos que una cepa silvestre. Los hermafroditas se seleccionaron de cada una de las cepas que contenían deficiencias en el cromosoma V, en la región balanceada por el balanceador nT1. En cada cruce genético, los machos y los hermafroditas se dejaron unas 24 h a 20 °C en la misma placa, para que los machos pudiesen fecundar a los hermafroditas.

Después, cada hermafrodita se aisló en una placa diferente. Se esperó a que la F1 de cada hermafrodita se desarrollara hasta un estadio larvario L3 aproximadamente, y se aislaron animales de la F1 en placas distintas. Se comprobó que los cruces habían funcionado, observando si en la F1 existía una proporción aproximada del 50% de machos y el 50% de hermafroditas.

Si la deficiencia presente en la cepa del cruce no abarcaba al gen afectado por la mutación *t2129*, los hermafroditas de la F1 del cruce tenían un fenotipo silvestre y además producían progenie viable. Sin embargo, cuando se realizó el cruce entre machos de la cepa SA0042 y hermafroditas de la cepa MT5813 (SA0047), aunque los hermafroditas de la F1 también tenían un fenotipo silvestre, una proporción de estos hermafroditas no generaba progenie viable, ya que la deficiencia *nDf42* presente en la cepa MT5813 estaba abarcando al gen afectado por la mutación *t2129* de la cepa SA0042.

La complementación de la cepa SA0059 (mutante *t2129*) con la cepa VC2009 (*knock out* del gen *ccz-1*) se realizó de igual forma, generando un cruce genético entre ambas cepas. Se utilizaron machos de la cepa SA0059 (con balanceador fluorescente) y se cruzaron con hermafroditas de la cepa VC2009. De la progenie del cruce se seleccionaron aquellos animales no fluorescentes, que tenían un genotipo: *F58G11.6 (ok2182) / t2129* V. Éstos fueron observados al microscopio Nomarski y el fenotipo observado en ellos resultó ser similar al del mutante *t2129* homocigótico, por lo tanto, no se había producido complementación entre ambas cepas, ya que ambas estaban afectando al gen *ccz-1*. La mayoría de las cepas generadas en este trabajo fueron obtenidas mediante un cruce genético similar a los anteriores entre dos cepas que contenían el genotipo adecuado.

6. Análisis de ácidos nucleicos

6.1. Métodos de extracción

6.1.1. Extracción de DNA genómico de *C. elegans*

Para realizar la extracción de DNA de los nematodos se les añadió la solución de lisis, en una proporción de 1 µl de solución por cada nematodo aproximadamente, y proteinasa K (20 mg/ml, Qiagen), en una proporción de 4 µl por cada 50 µl de solución de lisis. Posteriormente, se incubaron a 65°C durante 1 hora y a 90 °C durante 15 minutos para inactivar completamente la proteinasa K. La solución de lisis contenía: 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,3, 2,5 mM MgCl₂, 0,45% (v/v) Triton X-100 (Sigma) y 0,45% (v/v) Tween 20 (Sigma).

6.1.2. Extracción de RNA de *C. elegans*

La extracción de RNA fue realizada para analizar el RNA mensajero del gen *ccz-1* en los mutantes *t2129*, *t2070* y *t2170*, y poder comprobar cómo estaban afectando a la transcripción del gen las mutaciones. Asimismo, se analizó también el RNA mensajero de *ccz-1* en la cepa VC2009, que presentaba una delección en este gen. Se extrajo RNA a partir de animales homocigóticos para las mutaciones de las cepas: SA0059 (mutante *t2129*), SA0068 (mutante *t2070*) y SA0072 (mutante *t2170*), y animales de la cepa VC2009 (knock out del gen *ccz-1*) y de la cepa control N2 Bristol (*wild type*). Se recogieron los nematodos de cuatro placas de NGM agar, con solución M9 en un eppendorf. Para la extracción del RNA se utilizó el kit de extracción de RNA de Qiagen (*RNeasy Mini kit*). El procedimiento seguido para la extracción del RNA fue el recogido en el protocolo del kit. Para disolver los tejidos de los nematodos, se utilizó la solución de lisis RLT contenida en el kit, a la que previamente se le había añadido β-mercaptoetanol, y aproximadamente 400 µl de bolas de vidrio (4 mm, Sartorius). Las células se rompieron en una Fast-prep (Bio101) aplicándoles 3 pulsos de 15 segundos a potencia 5. Al sobrenadante se le añadió etanol al 70% y la mezcla fue añadida a las columnas con

membranas de silica gel que contiene el kit, que lograban retener el RNA. El RNA fue lavado varias veces con la solución RPE del kit para eliminar los restos de tejidos y el DNA. Por último, el RNA fue eluido en agua DEPC con inhibidores de RNasas y las muestras fueron guardadas para su conservación a -80 °C. Dada la purificación del RNA obtenido con el kit no fue necesario tratarlo con DNasa.

6.1.3. Extracción de plásmidos de *E. coli*

Para la extracción de plásmidos y cósmidos a partir de *E. coli* se utilizó el kit de extracción de DNA por columnas *Wizard Plus Miniprep* (Promega), siguiendo las instrucciones indicadas por el fabricante. Cuando fue necesario extraer DNA a mayor escala, se utilizaron los kits *Plasmid Midi kit* o *Plasmid Maxi kit* (Qiagen), según la cantidad de DNA necesaria.

6.2. Amplificación de DNA: Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

En la amplificación de DNA mediante PCR se utilizaron los termocicladores Minicycler PT150 (MJ Research), Minicycler PT100 y Mastercycler gradient (Eppendorf). A pesar de que las condiciones de la reacción fueron ajustadas según el fragmento de DNA que se iba a amplificar, en todas las reacciones se añadió a la mezcla: DNA molde (aproximadamente 100-200 ng de DNA genómico o 10-20 ng de DNA plasmídico), 20 pM de cada dNTP, 100 pM de cada oligonucleótido, 1 unidad de la enzima polimerasa adecuada, solución de tampón de la enzima y agua. Las polimerasas utilizadas fueron *EcoTaq* (Ecogen), *Expand Long Template PCR System* (Roche) y *Phusion High-Fidelity* (New England Biolabs), estas dos últimas con actividad correctora de errores.

6.2.1. Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo fueron sintetizados por Thermo. En la siguiente tabla 2.3 se recogen los oligonucleótidos que se necesitaron para realizar este trabajo, junto con su secuencia y una indicación del experimento para el cual se requirió.

| Tabla 2.3. Oligonucleótidos | | |
|------------------------------------|--|---|
| NOMBRE | SECUENCIA | EXPERIMENTO |
| CE0007 | CTATCCACCTCTAAACGGTCTC | Análisis por snip-SNP |
| CE0008 | ATAAACAGGTTCTCTCCTCCC | Análisis por snip-SNP |
| CE0042 | AACGCAATGTTCGAAACGC | Análisis por snip-SNP |
| CE0043 | TACGCGAGCATCACAACCTG | Análisis por snip-SNP |
| CE0044 | ATTGCAATTGGCTTTCTTGG | Análisis por snip-SNP |
| CE0045 | CGGATCTGTTTGGATTTATAG | Análisis por snip-SNP |
| CE0046 | TCGACTTTTGAAGTACACTGCC | Análisis por snip-SNP |
| CE0047 | AGGATTTTTGAGCAACCTAGC | Análisis por snip-SNP |
| CE0051 | CCAGCGGCGTGACATTTTCT | Análisis por snip-SNP |
| CE0052 | GGTGTCCCAATTGGTCATCTGCTC | Análisis por snip-SNP |
| CE0053 | ACAAGCGAGAAAAGAGCAGGAA | Análisis por snip-SNP |
| CE0054 | TCTTGGACGCTTTGCTGGTTC | Análisis por snip-SNP |
| CE0061 | GAGCTGAGCGACCAAAGATT | Análisis por snip-SNP |
| CE0062 | ATAAGCGCCATAACAAGTCG | Análisis por snip-SNP |
| CE0077 | AAGGCGCGCCACCATGGAGTCGATTGC AAATCCATTG | Construcción del plásmido pCN1 (inserción del gen <i>ccz-1</i>) |
| CE0078 | AATTAATTAATCAACTAAAAAATATGGC TTCGAAATG | Amplificación del gen <i>ccz-1</i> con codón de parada. |
| CE0079 | GATTTCCGAAGTGTGACGACGC | Secuenciación del gen <i>ccz-1</i> |
| CE0080 | GCGATCTTCCATCACTATTTCA | Secuenciación del gen <i>ccz-1</i> |
| CE0081 | CTAAAATCCACCCGTAGAACCGTG | Secuenciación del gen <i>ccz-1</i> |
| CE0082 | GGTGGATTTTTCTCATCTTTC | Secuenciación del gen <i>ccz-1</i> |
| CE0083 | GTGTCGGAAACTGAAGAATTTGG | Secuenciación del gen <i>ccz-1</i> |
| CE0084 | GATTATGTTCTTCGCCTTCT | Secuenciación del gen <i>ccz-1</i> |
| CE0085 | AACCTGCAGGCTGAAACCTCCTCCGCCG TATCCTCGCTGT | Construcción del plásmido pCN2 (inserción del promotor del gen <i>ccz-1</i>) |
| CE0086 | AAGGCGGCCTCTGAAAAAGCAAAATA TATGTTTTGTACCG | Construcción del plásmido pCN2 (inserción del promotor del gen <i>ccz-1</i>) |
| CE0087 | AAGGCCGGCCTCAACTAAAAAATATGGC TTCGAAATGGGATCGAAC | Amplificación del gen <i>ccz-1</i> con codón de parada |
| CE0088 | AAGGCCGGCCACTAAAAAATATGGCTTCG AAATGGGATCGAAC | Amplificación del gen <i>ccz-1</i> sin codón de parada |
| CE0089 | AAGGCCGGCCTAATATTCATATTTCCCATGC | Amplificación de la región 3'UTR del gen <i>ccz-1</i> |
| CE0090 | AAGGGCCCGAGGAATTGTCATGAAAGAAGGCG AGAGA | Amplificación de la región 3'UTR del gen <i>ccz-1</i> |

| Tabla 2.3. Oligonucleótidos (continuación) | | |
|---|---|--|
| NOMBRE | SECUENCIA | EXPERIMENTO |
| CE0088 | AAGGCCGGCCACTAAAAAATATGGCTTCG AAATGGGATCGAAC | Amplificación del gen <i>ccz-1</i> sin codón de parada |
| CE0089 | AAGGCCGGCCTAATATTCATATTTTCCCATGC | Amplificación de la región 3'UTR del gen <i>ccz-1</i> |
| CE0090 | AAGGGCCCGAGGAATTGTCATGAAAGAAGGCG AGAGA | Amplificación de la región 3'UTR del gen <i>ccz-1</i> |
| CE0091 | CCACCTCTCCAGCTAGAATTTTCATTAATG TCGTCTAAAAGTTATATG | Mutagénesis dirigida contra codón de inicio del gen F58G11.5 |
| CE0092 | ACATATAACTTTTAGACGACATTAATG AAAATTCTAGCTGGAGAGGTGG | Mutagénesis dirigida contra codón de inicio del gen F58G11.5 |
| CE0094 | TGGCCCATGACGAAACTCTG | Secuenciación del promotor del gen <i>ccz-1</i> |
| CE0095 | GAACGTATCGAGCCAGCATTTT | Secuenciación del promotor del gen <i>ccz-1</i> |
| CE0096 | ATTCCCAGCATATTCAAAGACAA | Secuenciación del promotor del gen <i>ccz-1</i> |
| CE0097 | AACTTTCGCTCGTGTCCTCAATGA | Secuenciación de la región 3'UTR del gen <i>ccz-1</i> |
| CE0098 | ATCACCATTCCCGCTTCTCCA | Secuenciación de la región 3' UTR del gen <i>ccz-1</i> |
| CE0107 | ATCCATTGTATTTCTTCTCCA | Secuenciación del cDNA del gen <i>ccz-1</i> |
| CE0108 | CCTTCTTTTCGTCTGATAATGG | Secuenciación del cDNA del gen <i>ccz-1</i> |
| CE0109 | TCGACGACTGACAACACCAT | Secuenciación del cDNA del gen <i>ccz-1</i> |

6.3. Reacción en cadena de la polimerasa en transcripción reversa (RT-PCR)

A partir del RNA extraído se sintetizó cDNA, utilizando un oligo dT y la enzima transcriptasa reversa y el resto de reactivos contenidos en el kit de síntesis de cDNA de Invitrogen (*SuperScript II Reverse Transcriptase*, Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante con respecto a las cantidades de reactivos necesarias para la reacción, así como el tiempo de incubación adecuado. El cDNA obtenido fue amplificado por PCR utilizando una enzima polimerasa de alta fidelidad, así como una pareja de oligos que amplificase la región afectada por la mutación en el gen *ccz-1*.

6.4. Procesamiento de fragmentos de DNA

6.4.1. Separación de DNA mediante electroforesis

Las moléculas de DNA fueron separadas según su tamaño mediante electroforesis en geles de agarosa. Para la preparación de los geles de agarosa se disolvió la agarosa (Seakem LE) en solución TAE (40 mM Tris-acetato pH 8, 1 mM EDTA) y se añadió bromuro de etidio a una concentración final de 0,5 µg/ml. La electroforesis fue realizada en cubetas de Ecogen conectadas a fuentes de Biorad que les suministraban un voltaje constante entre 50-100 V. Para estimar el tamaño de las moléculas de DNA, éstas se compararon con el marcador de tamaño molecular de 1Kb Plus DNA ladder (Invitrogen).

6.4.2. Purificación de moléculas de DNA

Para la purificación de los productos de PCR se utilizó el kit *Jet Quick PCR Product Purification Spin kit* (Genomed) y para la extracción de DNA a partir de los geles de agarosa, el kit *Jet Quick Gel Extraction Spin Kit* (Genomed) y el kit *QIAquick Gel Extraction kit* (Qiagen). Una vez purificadas, las moléculas de DNA fueron eluidas entre 30-50 µl de solución TE o agua miliQ a 70 °C.

6.4.3. Digestión de moléculas de DNA

La digestión de fragmentos de DNA fue realizada con endonucleasas de restricción de Fermentas, New England Biolabs, Promega y Roche, utilizando los tampones y las condiciones de incubación apropiadas para cada enzima según el fabricante. Los fragmentos de DNA resultantes de la digestión fueron separados en un gel de agarosa y purificados a partir de él.

6.4.4. Desfosforilación de moléculas de DNA

La desfosforilación de los plásmidos digeridos permitió evitar que los fragmentos se religaran. Los grupos fosfato del extremo 5' fueron eliminados con fosfatasa alcalina (CIAP, Roche), incubando el plásmido digerido con 1 unidad de la enzima durante 1 hora a 37 °C en el tampón aportado por el fabricante.

6.4.5. Ligación de fragmentos de DNA

Para la ligación entre el plásmido digerido y el inserto se utilizó la DNA ligasa del fago T4 (Fermentas), incubando los fragmentos de DNA en presencia de 1 unidad de la enzima durante 30 minutos a 37 °C o bien durante 12-16 horas a 16 °C. La reacción de ligación fue utilizada para transformar células competentes de *E.coli*, en las cuáles se amplificó el plásmido. Se comprobó si el plásmido había introducido el inserto realizando una digestión con diferentes enzimas de restricción.

6.4.6. Secuenciación de DNA

Las moléculas de DNA fueron secuenciadas en un secuenciador ABI Prism 3100 (Applied Biosystems), en el Servicio de Genómica del Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer. El volumen final de cada reacción de secuenciación fue de 8 µl, conteniendo 3 pM del oligonucleótido necesario, así como la cantidad adecuada de DNA: 50-150 ng de productos de PCR, 100-150 ng de DNA de cadena sencilla o bien 400-600 ng si se trataba de un plásmido.

6.5. Construcciones de los plásmidos pCN1 y pCN2

El plásmido pCN1 [Promotor de *ced-1*::gen *ccz-1*::YFP::let 858 3' UTR] fue construido a partir del plásmido pLN180 [Promotor de *ced-1*::gen *ced-12*::YFP::let 858 3' UTR], el cuál fue generado por el Dr. Lukas Neukomm, en el Instituto de Biología Molecular de la Universidad de Zürich. Como se mostró en la Figura 2.37, el plásmido pLN180 contenía sitios de restricción únicos para las enzimas PaeI, AclI, FseI y ApaI, un marcador de resistencia a Ampicilina y una copia silvestre del gen *unc-119*. Además, contenía el gen *ced-12* fusionado a la proteína fluorescente YFP y bajo la expresión del promotor del gen *ced-1*, así como una región 3' UTR genérica que procedía del gen *let-858*. Inicialmente, se amplificó por PCR una copia silvestre del gen *ccz-1* a partir de DNA genómico de la cepa N2 Bristol, utilizando la pareja de oligos adecuada: CE0077 (sitio de restricción AclI, secuencia ACC, inicio del gen *F58G11.6*) y CE0088 (sitio de restricción FseI, copia reversa del final del gen *F58G11.6* sin el codón de

Materiales y métodos

parada). En la PCR, se empleó la enzima polimerasa *Phusion High-Fidelity* (New England Biolabs), que copia el DNA con alta fidelidad, para minimizar los errores que pudieran producirse durante la copia. El producto de PCR amplificado se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 1% y se purificó la banda correspondiente al gen *ccz-1* con el kit de extracción de DNA a partir de gel de Qiagen.

Mediante ligación enzimática con la enzima ligasa T4, se unió la copia del gen *ccz-1*, amplificada por PCR y purificada previamente, al vector pJET utilizando un kit de clonación de fragmentos de PCR (*CloneJET PCR cloning kit*, Fermentas), incubándolos durante 1 hora a temperatura ambiente. Se transformaron las células competentes Genehogs (Invitrogen) con el producto de la ligación anterior, incubándolas 30 minutos en hielo y 45 segundos a 42 °C y 1 minuto de nuevo en hielo. Se añadió 1 ml de medio LB y se incubó durante 1 hora a 37 °C. Se sembraron 200 µl del cultivo en dos placas de LB agar con ampicilina y se incubaron durante una noche a 37 °C.

Al día siguiente se seleccionaron varias colonias diferentes y se realizó una PCR para comprobar que se había insertado el producto (gen *ccz-1*) en el vector pJET. Con las colonias que dieron positivo para la PCR se preparó un cultivo en 3 ml de medio LB con ampicilina, incubándolo durante una noche a 37 °C. Se purificaron con el kit de Miniprep de Qiagen (*QIAprep Spin Miniprep kit*) y se eluyeron en 30 µl de H₂O miliQ a 70 °C. Se cuantificó la cantidad de DNA utilizando un espectrofotómetro Nanodrop. Asimismo, para comprobar que efectivamente se había insertado el producto en el vector pJET, se realizaron dos digestiones enzimáticas con las enzimas *Ascl* y *FseI* (New England Biolabs). Se preparó un cultivo con aquellos clones que tenían insertado el gen *ccz-1*, en 100 ml de medio LB y ampicilina, incubándolo durante toda la noche a 37 °C. Al día siguiente se purificaron con el kit de Midiprep de Qiagen (*QIAGEN Plasmid Midi kit*), eluyendo el plásmido en 150 µl de H₂O a 70 °C.

Posteriormente, se cuantificó la cantidad de DNA y se realizó una digestión enzimática triple con las enzimas FseI, AseI y BglI de una cantidad de plásmido aproximada de 1-1.5 µg. Las enzimas FseI y AseI permitían cortar el gen *ccz-1* del plásmido, mientras que la enzima BglI tenía como finalidad cortar el vector pJET (de unos 3Kb) para evitar su confusión con el gen *ccz-1* (de unos 2,5 Kb). La mezcla se incubó a 37 °C durante dos horas y media y después se separaron las bandas mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1%.

Las bandas de 2,5 Kb correspondientes al gen *ccz-1* fueron purificadas a partir del gel utilizando el kit de Quiagen (Quiagen Gel Extraction kit) y eluidas en 30 µl de H₂O miliQ a 70 °C. Se cuantificó la cantidad de DNA purificada y se secuenció el gen *ccz-1* purificado para comprobar que estaba correctamente copiado. Se realizó una ligación enzimática entre el gen *ccz-1* y el plásmido pLN180 previamente digerido con las enzimas FseI y AseI para eliminar el gen *ced-12*, de forma que tuvieran bordes complementarios para proceder a la ligación. Se transformaron células competentes GeneHogs con 5 µl del producto de la ligación, siguiendo el protocolo de transformación anterior. Las placas de agar LB y ampicilina, en las que se habían sembrado 200 µl del medio con las células transformadas, fueron incubadas a 37 °C durante la noche. Al día siguiente, se seleccionaron varios clones de las placas para preparar cultivos en medio LB y ampicilina. Se incubaron a 37 °C durante toda la noche y fueron purificados con el kit de Miniprep de Qiagen. Al igual que antes, se comprobó mediante PCR y digestión enzimática que se había insertado el gen *ccz-1* en el plásmido PLN180. Con aquellos clones que tenían insertado el gen *ccz-1* se preparó un cultivo de mayor cantidad para poderlo purificar mediante el kit de Maxiprep de Quiagen y obtener así el plásmido pCN1. Esta construcción (Figura 2.1) contenía el gen *ccz-1* fusionado en su extremo C-terminal a la proteína fluorescente YFP y bajo la expresión del promotor del gen *ced-1*. Mediante secuenciación se comprobó que la copia del gen *ccz-1* insertada no estaba alterada.

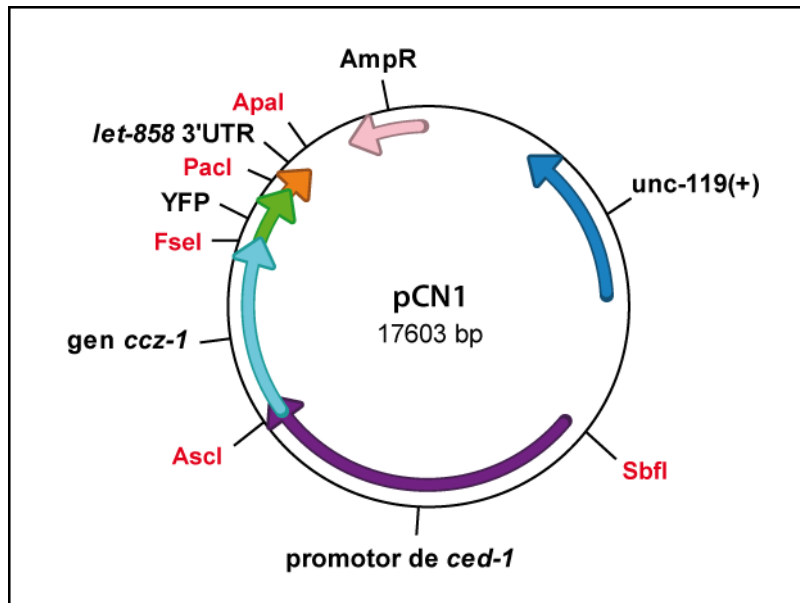


Figura 2.1. Mapa de la construcción pCN1.

La construcción del plásmido pCN2 [Promotor del gen *ccz-1*::gen *ccz-1*::YFP::let 858 3' UTR] se realizó utilizando el plásmido pCN1 construido previamente. Se sustituyó el promotor del gen *ced-1* por el promotor del gen *ccz-1*, utilizando para ello las mismas técnicas moleculares que en la inserción del gen *ccz-1*. Para amplificar por PCR el promotor del gen *ccz-1* se utilizaron los oligos: CE0085 (sitio de restricción de la enzima *SbfI* e inicio del promotor del gen *F58G11.6*) y CE0086 (sitio de restricción de la enzima *Ascl* y copia reversa del final del promotor del gen *F58G11.6*). El promotor fue insertado en el vector pJET.

La presencia del codón de inicio de lectura del gen *F58G11.5* dentro de la región del promotor del gen *ccz-1*, obligó a realizar una mutagénesis dirigida en ese punto. Para ello se utilizaron los oligos CE0091 y CE0092 y el kit apropiado (*QuickChange XL Site-Directed Mutagenesis kit*, de Stratagene). Se realizó la mutagénesis siguiendo las instrucciones del fabricante, digiriendo el producto de la PCR con la enzima de restricción *DpnI* durante 1 h a 37 °C y

transformando las células Ultracompetentes XL10-Gold aportadas en el kit con este producto digerido. Se seleccionaron mediante secuenciación aquellos clones en los cuales la mutagénesis había tenido éxito. Una vez mutageneizado, se realizó una digestión del plásmido con las enzimas SbfI y AclI y el promotor del gen *ccz-1* fue insertado en el plásmido pCN1, al cuál se le había eliminado previamente mediante digestión enzimática el promotor del gen *ccz-1*, obteniendo de esta forma el plásmido pCN2 (Figura 2.2).

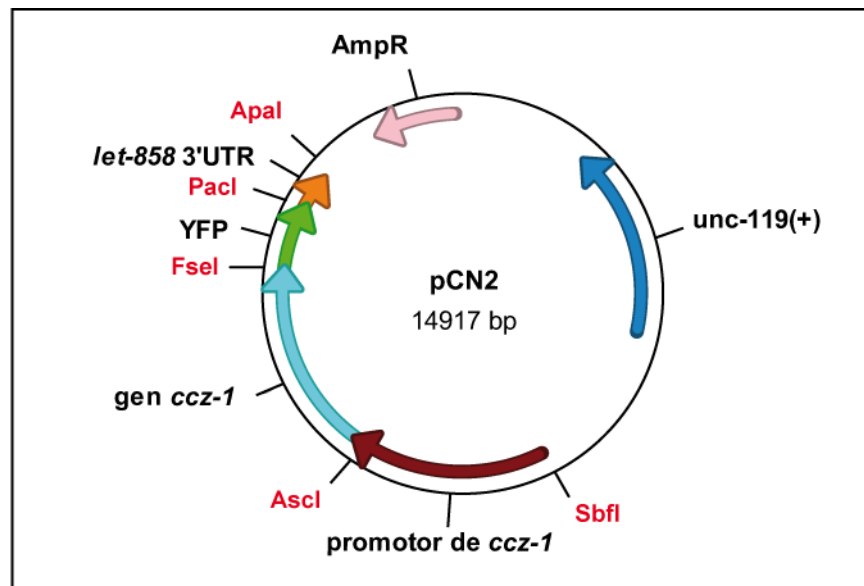


Figura 2.2. Mapa de la construcción pCN2.

7. Técnicas de microscopía

7.1. Microscopía de contraste interferencial (Nomarski) y fluorescencia

Todas las manipulaciones de los nematodos llevadas a cabo durante este trabajo, incluidas las preparaciones de las muestras del microscopio, fueron realizadas mediante la visualización de los animales en una lupa binocular Leica (modelo MZ16FA). Para la visualización de los nematodos en un microscopio de óptica Nomarski, los animales fueron colocados sobre una película de agar colocada sobre un portaobjetos. El agar utilizado fue disuelto en agua a una concentración de 4,5%. Los animales fueron inmovilizados añadiéndole Tetramisol (Sigma) a una concentración 1 mM en solución M9. Posteriormente, se cubrió el agar con un portaobjetos.

La mayoría de las veces, se utilizó un microscopio de fluorescencia motorizado Zeiss Axioplan 2, equipado con una cámara Hamamatsu Orca-ER C4742-95 y objetivos de inmersión Plan-Apochromat Zeiss 63x y Plan-Apochromat Zeiss 100x. Las imágenes fueron capturadas con el programa Openlab v.4.0.2 (Improvision) y procesadas con los programas Adobe Photoshop CS3 e ImageJ (NIH).

En aquellos experimentos en los cuales fue necesaria la luz ultravioleta para visualizar la fluorescencia de la muestra, por ejemplo, la de la proteína GFP, se utilizaron los filtros apropiados del microscopio.

7.2. Microscopía en 4D

En la realización de la microscopía en 4D de embriones de *C. elegans* se utilizó igualmente el microscopio de fluorescencia motorizado Zeiss Axioplan 2 utilizado para la microscopía Nomarski, asociado a una cámara que permitía la captura de las imágenes y un ordenador para su posterior almacenamiento y procesamiento. Los embriones fueron preparados en la lupa binocular para su observación al microscopio en un portaobjetos, para ello se realizó una incisión

con un bisturí en los animales hermafroditas adultos, de forma que los embriones que estaban en el interior de la gónada pudiesen salir y flotar en el medio M9 que los rodeaba. Con la ayuda de una pipeta de vidrio de punta muy fina se traspasaron los embriones del medio M9 a la película de agar situada en el portaobjetos. Se colocó un cubreobjetos sobre el agar y las tres cuartas partes del espacio entre ambos se rellenó con medio M9. Después los bordes del cubreobjetos fueron sellados con vaselina para evitar la deshidratación del embrión durante el experimento.

Una vez preparada la muestra, ésta se observó al microscopio con el objetivo 40x para localizar el embrión que se deseaba grabar mediante microscopía en 4D, posteriormente se enfocó con el objetivo 100x y se fijaron los parámetros de los ejes X e Y del microscopio. Se intentaron grabar los embriones desde el inicio de la embriogénesis, por ello se seleccionaron aquellos embriones que se encontraban en la fase de 2 células, o en su defecto en la fase de 4 células. La velocidad de la embriogénesis estaba controlada manteniendo constante la temperatura de la muestra a 25 °C. Este control se consiguió acoplado al objetivo del microscopio un anillo metálico a través del cuál circulaba agua con la temperatura deseada, manteniendo la temperatura del agua mediante el uso de un baño térmico.

El movimiento de la platina del microscopio en el eje Z se encontraba automatizado gracias a un programa informático, con lo cual el objetivo era capaz de captar imágenes en planos diferentes del embrión de forma secuencial. De cada embrión, se capturaron imágenes en 25 planos diferentes a lo largo del eje Z, por cada intervalo de un minuto. Al finalizar, se recuperaba la posición inicial y se proseguía capturando las imágenes del siguiente intervalo.

Las imágenes capturadas mediante el programa informático Openlab y fueron almacenadas en formato PICT en el equipo informático asociado al microscopio. Para cada embrión grabado, la captura de imágenes se realizó durante 8 horas, por tanto, la embriogénesis se encontraba aproximadamente en

el estadio de 3 pliegues al finalizar la grabación. Tras la grabación del embrión, se realizó el análisis de las imágenes capturadas por el microscopio. El primer paso, fue convertir las imágenes del formato inicial PICT al formato TIFF y posteriormente, se convirtieron del formato TIFF al formato LURAWAVE, utilizando el programa informático ACDSee 7.0. Las imágenes en formato LURAWAVE fueron analizadas con el programa informático Simi Biocell Software, uniéndolo todas las imágenes del embrión para conseguir un vídeo secuencial de la embriogénesis en cada uno de los planos del eje Z del embrión.

Se realizaron grabaciones en microscopía 4D de tres embriones diferentes para cada genotipo, y los genotipos analizados fueron: el silvestre (N2), y mutantes homocigotos para las mutaciones *t2129*, *t2070* y *t2170*, así como mutantes *sand-1 (ok1963)*. De este último genotipo, fueron grabados 18 embriones. Con la ayuda del programa Simi Biocell Software, se realizó un análisis de la orientación del huso mitótico de los blastómeros EMS y Abar en cada uno de los embriones grabados. Esto permitió detectar defectos en la orientación de dicho huso mitótico en algunos embriones mutantes.

Asimismo, con este programa, se realizó un seguimiento de los cuerpos apoptóticos en cada uno de los embriones grabados para comprobar cuántos de estos cuerpos apoptóticos persistían en el embrión. Del genotipo *sand-1 (ok1963)* fueron analizadas las apoptosis en 3 de los 18 embriones grabados.

7.3. Cuantificación de los cuerpos apoptóticos en la gónada del hermafrodita adulto

La cuantificación de los cuerpos apoptóticos en la gónada de los hermafroditas adultos, se realizó sincronizando los animales mediante una selección de aproximadamente unos 60 hermafroditas de cada cepa en el estadio larvario L4, en la fase en la que la vulva del hermafrodita tiene una apariencia similar a un árbol de Navidad (*Christmas tree vulva*). Se incubaron durante estadios de 24h, 36h y 48h a 20 °C, y se realizó la cuantificación de los

cuerpos apoptóticos, mediante microscopia Nomarski, a las 24h, 36h y 48h, respectivamente. La cuantificación de los cuerpos apoptóticos se realizó en las siguientes cepas:

- Controles: *N2 (wt)*
- Control con el marcador *dpy-11*: cepa SA0127 (CB224), con el genotipo *dpy-11(e224) V*.
- cepa SA0059: *dpy-11(e224);mat(t2129) V / nT1 qls51 (IV;V)*
- cepa SA0068: *him-9(e1487) unc-24(e138)/ nT1(m345)(let) IV; dpy-11(e224) mat (t2070) V / nT1(m345)(let) (IV;V)*
- cepa SA0072: *him-9(e1487) unc-24(e138)/ nT1(m345)(let) IV; dpy-11(e224) mat (t2170) V / nT1(m345)(let) (IV;V)*
- cepa SA0124 (RB1598): *sand-1(ok1963) IV*
- cepa SA0147 (VC2009): *F58G11.6 (ok2182) V*

7.4. Migración de la gónada

Se comprobó que no existía ningún defecto en la migración de la gónada mediante la observación de entre 20-25 hermafroditas adultos en el microscopio Nomarski. Se observaron las siguientes cepas:

- Control: *N2 (wt)*
- cepa SA0068: *him-9(e1487) unc-24(e138)/ nT1(m345)(let) IV; dpy-11(e224) mat (t2070) V / nT1(m345)(let) (IV;V)*
- cepa SA0072: *him-9(e1487) unc-24(e138)/ nT1(m345)(let) IV; dpy-11(e224) mat (t2170) V / nT1(m345)(let) (IV;V)*
- cepa SA0122: *mat t2129 V / nT1qls51 (IV;V)*

7.5. Tinción con naranja de acridina

La tinción con naranja de acridina se realizó utilizando una solución de naranja de acridina (Molecular Probes), diluyéndola a una concentración de 0,14 mg/ml, en solución M9. Se añadieron 700 µl de esta solución a cada placa que contenía aproximadamente unos 20-25 hermafroditas. Los animales habían sido previamente sincronizados, seleccionándolos en el estadio larvario L4 e incubándolos durante 24h a 20 °C. Una vez añadida la naranja de acridina, se incubaron durante 1h en la oscuridad, ya que la naranja de acridina es sensible a la luz. Posteriormente, los animales se visualizaron al microscopio Nomarski bajo la luz ultravioleta, utilizando un filtro para GFP, para poder observar si los cuerpos apoptóticos presentes en la gónada se teñían o no con la naranja de acridina. Los animales se prepararon para su visualización de cinco en cinco, para evitar exponer lo mínimo posible a la luz la naranja de acridina. Esta tinción también fue utilizada para la detección de defectos en la biogénesis de los lisosomas.

La tinción con naranja de acridina se realizó en las cepas:

- cepa SA0042: *him-9(e1487) unc-24(e138)/ nT1(m345)(let) IV; dpy-11(e224) mat (t2129) V / nT1(m345)(let) (IV;V)*
- cepa SA0059: *dpy-11(e224) mat (t2129) V / nT1(m345)(let) (IV;V)*
- cepa SA0126: (WS2972) *gla-3 (op216) I*
- Controles: N2 (*wt*) y cepa SA0127 (CB224): *dpy-11(e224) V* (control con el marcador *dpy*).
- Control negativo en la observación de la biogénesis de los lisosomas: cepa SA0132: (VC308) *rab-7 (ok511) II /mln-1 [dpy-10 (e128); mls14 [myo 2::*gfp*; pes-10::*gfp*]] II*

7.6. Microscopía electrónica

Para la realización de la microscopía electrónica de la gónada de los hermafroditas adultos, se seleccionaron animales no fluorescentes de la cepa SA0122, cuyo genotipo es *mat t2129 V/ nT1qls51 (IV;V)*. Dichos animales contenían por tanto la mutación *t2129* en homocigosis. Se sincronizaron seleccionándolos en el estadio larvario L4 e incubándolos a 20 °C durante 24h.

En la preparación de las muestras para su observación mediante microscopía electrónica se utilizó el protocolo desarrollado en el Centro de Microscopía de la Universidad de Zürich (A. Kaech et al.). Siguiendo este protocolo, los nematodos fueron congelados a alta presión utilizando el equipo EM Pact2 (Leica Microsystems, Vienna, Austria). Para congelar los nematodos se utilizaron unos recipientes de oro que contenían una cavidad de 1,5 mm x 0,2 mm, la cuál se rellenó con una gota de solución PBS. Los animales se transfirieron de la placa de agar a la solución de PBS del recipiente y se retiró el exceso de la solución utilizando papel de filtro. El resto del recipiente se rellenó con 1-hexadecano y se introdujo en el equipo EM Pact2 para congelar los animales a alta presión.

Posteriormente, se fue sustituyendo el medio en los nematodos congelados manteniendo la temperatura de congelación, de forma que se sustituyó la solución de 1-hexadecano por una solución de tetróxido de Osmio al 2% en acetona anhidra. Esta sustitución de medios se realizó en un equipo Leica EM AFS2 (Leica Microsystems) utilizado para dicho fin. Los animales se mantuvieron a -90 °C, a -60 °C y finalmente a -30 °C durante periodos de tiempo de 8 horas para cada temperatura. Las temperaturas fueron modificadas a un ritmo de 30 °C por hora, hasta alcanzar la temperatura ambiente, y a dicha temperatura se mantuvieron durante 1 hora. Durante este proceso, denominado sustitución en congelación, la acetona anhidra capta el agua de los cristales de hielo formados en la congelación y el Osmio fija químicamente los tejidos de los nematodos. Finalizado dicho proceso, la solución de tetróxido de Osmio fue

retirada lavando los animales con acetona anhidra dos veces. Una vez retirada, los animales se colocaron uno a uno en cada uno de los espacios del molde utilizado para realizar los bloques de parafina. Estos bloques se hicieron embebiendo los animales progresivamente en una mezcla de Epon/Araldita (Sigma-Aldrich, Buchs, Suiza) al 33% en acetona anhidra durante una noche a 4 °C, al 66% en acetona anhidra durante 6 horas a 4 °C y finalmente en una mezcla de Epon/Araldita al 100% durante una hora a temperatura ambiente. La mezcla fue polimerizada manteniéndola a 60 °C durante 48 horas hasta obtener los bloques sólidos conteniendo los nematodos fijados.

Los bloques de parafina obtenidos tras la polimerización fueron seccionados con ayuda de un microtomo. Inicialmente, se cortó el bloque con una cuchilla para formar una pirámide en el extremo en el que se situaba el nematodo, y después se realizaron secciones de 1 μm hasta llegar al lugar donde se situaba el extremo posterior del nematodo. Cuando se llegó a dicho punto, se realizaron secciones hasta alcanzar la región dónde estaba situada la curvatura de la gónada del animal que es donde se situaban principalmente los cuerpos apoptóticos acumulados en el mutante. A partir de ese momento, se realizaron secciones ultrafinas, de aproximadamente 70 nm, que serían las que posteriormente se visualizarían en el microscopio electrónico.

Estas secciones ultrafinas fueron colocadas sobre gradillas y teñidas con una solución acuosa que contenía acetato de uranilo al 2% y citrato de plomo Reynolds. Las secciones teñidas fueron visualizadas mediante microscopía electrónica de transmisión en un microscopio Phillips CM 100 (FEI, Eindhoven, Holanda) utilizando para la captura de las imágenes una cámara Gatan Orius CCD y un programa informático de adquisición de imágenes digitales (Gatan GmbH, Munich, Alemania). Las imágenes fueron procesadas posteriormente utilizando el programa ImageJ.

7.7. Análisis de las proteínas de la ruta de maduración de los fagosomas

Las cepas transgénicas SA0119 (WS4670), SA0120 (WS4671) y SA0121 (WS5016), expresaban las proteínas YFP::RAB-7, YFP::RAB-5 y YFP::2XFYVE, respectivamente. Estas cepas fueron cruzadas genéticamente con el mutante *t2129* para obtener las cepas SA0160, SA0163 y SA0149, las cuales también expresaban las proteínas YFP::RAB-7, YFP::RAB-5 Y YFP::2XFYVE, respectivamente. Las primeras fueron utilizadas como controles de la expresión de las proteínas correspondientes, mientras que las otras cepas reflejaban la influencia que la mutación *t2129* tenía sobre la localización de las proteínas RAB-7, RAB-5 y VPS-34.

De cada cepa se seleccionaron animales en el estadio larvario L4 y se incubaron 24 horas a 20 °C. Posteriormente fueron visualizados mediante microscopia Nomarski de fluorescencia en el equipo Zeiss Axioplan 2, cuantificando los cuerpos apoptóticos y los halos fluorescentes que eran visualizados en la gónada de cada animal.

8. Análisis mediante snip-SNP

Este análisis utilizando snip-SNP fue llevado a cabo siguiendo los procedimientos descritos por Wicks et al. (2001). Inicialmente, se construyó la cepa de tres factores SA0060, con el genotipo: *dpy-11(e224); mat(t2129), unc-76(e911) V/nT1 qIs51 (IV;V)*, mediante el cruce de la cepas SA0059 (*dpy-11 (e224); mat(t2129) V/ nT1 qIs51 (IV;V)*) y la cepa SA0054 (cepa original DR188, con genotipo: *daf-11(m47) unc-76(e911)V*).

La cepa de tres factores poseía dos marcadores genéticos (*dpy-11(e224)* y *unc-76(e911)*) que acotaban la mutación *t2129* y que producían un fenotipo visible. Dicha cepa fue utilizada en la realización del análisis mediante snip-SNPs.

Materiales y métodos

Como se explico anteriormente, un snip-SNP es un polimorfismo de un único nucleótido entre la cepa N2 Bristol y la cepa Hawaiiana CB4856 que afecta a la diana de una enzima de restricción. Los hermafroditas de esta cepa de tres factores fueron cruzados con machos de la cepa de Hawaii, consiguiendo obtener en la progenie animales que tenían en heterocigosis tanto el fondo genético de N2 Bristol, como el de la cepa de Hawaii, así como la mutación *t2129* y los dos marcadores genéticos.

De la progenie de estos animales se seleccionaron aquellos que poseían el marcador *dpy-11 (e224)* en homocigosis, y el marcador *unc-76 (e911)* en heterocigosis, ya que habían sufrido recombinación. Se separaron por una parte aquellos recombinantes en los cuáles la recombinación se había producido antes de la mutación *t2129* y por tanto, eran heterocigotos para dicha mutación y producían progenie viable. Por otra parte, se separaron aquellos animales en los cuáles la recombinación se había producido posteriormente a la mutación *t2129*, con lo cuál tenían la mutación en homocigosis y la progenie no era viable. Esta separación se realizó observando si la progenie era o no viable. Se seleccionaron 137 recombinantes heterocigotos para *t2129* y 42 recombinantes homocigotos para *t2129*.

La extracción del DNA de los recombinantes se realizó añadiéndole:

- a cada recombinante con la mutación *t2129* en heterocigosis, junto con animales de su progenie: 50 µl de la solución de lisis 1x y 4 µl de proteinasa K (20 mg/ml, Qiagen).
- a cada animal recombinante con la mutación *t2129* en homocigosis: 10 µl de la solución de lisis 1x y 1 µl de proteinasa K.

Posteriormente, se incubaron a 65 °C durante 1 hora y a 90 °C durante 15 minutos para inactivar completamente la proteinasa K.

Se seleccionaron cuatro snip-SNPs diferentes:

- primer snip-SNP: con la posición genética V: 5.115 (pkP5069), que afecta a la diana de la enzima de restricción Apol.
- segundo snip-SNP: con la posición genética V: 5.352 (pkP5123), que altera la diana de la enzima de restricción NspV.
- tercer snip-SNP: con la posición genética V: 5.589 (pkP5124), que afecta a la diana de la enzima de restricción Dral.
- cuarto snip-SNP: con la posición genética V: 5.833 (pkP5125), que altera igualmente la diana de la enzima de restricción Dral.

Inicialmente, el DNA extraído de los recombinantes heterocigotos para la mutación *t2129* fue amplificado por PCR con la pareja de oligos correspondientes al primer snip-SNP seleccionado. Los productos de PCR obtenidos fueron digeridos con la enzima Apol (Xapl, Fermentas) a una temperatura de 37 °C durante 2 horas y media, e inactivada la enzima a 80 °C durante 10 minutos, siguiendo las instrucciones del fabricante. Los productos de la digestión fueron visualizados mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1,5 %.

Para la cepa N2 Bristol, se observaba como producto de digestión con la enzima Apol una banda de 737 pares de bases (bp), mientras que el producto de digestión de la cepa de Hawaii eran dos bandas con un tamaño de 426 bp y 311 bp. En el caso de aquellos recombinantes en los cuáles en la región amplificada se encuentran los dos fondos genéticos en heterocigosis, ya que la recombinación se produjo en una región anterior al primer snip-SNP, en el producto de digestión se observan las tres bandas. En cambio, en aquellos recombinantes en los cuáles la recombinación se produjo en la región posterior al primer snip-SNP, en el producto de digestión únicamente se observa la banda de 737 bp correspondiente al fondo genético de N2 Bristol.

Materiales y métodos

De los 137 nematodos analizados con el primer snip-SNP, solamente se encontraron 8 animales que habían sufrido recombinación entre la mutación *t2129* y el primer snip-SNP.

El análisis con el segundo snip-SNP se realizó con estos 8 recombinantes, amplificando el DNA extraído previamente mediante PCR con la pareja de oligos correspondientes al segundo snip-SNP. El producto de la PCR fue digerido con la enzima de restricción NspV (Bsp119I, Fermentas), incubando a 37 °C durante 2 horas y media. Se visualizaron los productos de digestión mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2%. El producto de digestión esperado para la cepa N2 Bristol consistía en tres bandas con un tamaño de 192 bp, 29 bp y 12 bp, sin embargo, en el gel se visualizaba principalmente la banda de mayor tamaño. El producto de digestión de la cepa de Hawaii únicamente tenía dos bandas de 221 bp y 12 bp, pero en el gel de agarosa se podía observar con mayor nitidez sólo la banda mayor.

De los 8 recombinantes analizados con el segundo snip-SNP, el producto de la digestión en 4 de ellos contenía las dos bandas de mayor tamaño correspondientes a los dos fondos genéticos. En dichos recombinantes, la recombinación se había producido antes del segundo snip-SNP. En cambio, en los otros 4 recombinantes, el producto de digestión solamente presentaba la banda correspondiente al fondo genético N2 Bristol, y por tanto la recombinación se había producido después del segundo snip-SNP, entre el segundo snip-SNP y la mutación *t2129*.

Posteriormente, estos 4 últimos recombinantes fueron analizados con el tercer snip-SNP. Se amplificó por PCR la región que lo contenía utilizando los oligos correspondientes a dicho snip-SNP. Se realizó una digestión de los productos de PCR con la enzima de restricción DraI (Fermentas), incubando a 37 °C durante 2 horas y media e inactivando la enzima a 65 °C durante 20 minutos.

Los productos de la digestión fueron visualizados mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2%. En la digestión de la cepa N2 Bristol, se obtuvieron dos bandas de 303 bp y 59 bp. Mientras que en la digestión de la cepa de Hawaii se obtuvieron tres bandas de 231 bp, 72 bp y 59 bp. Todos los productos de digestión obtenidos para los 4 recombinantes analizados contenían las bandas correspondientes a ambos fondos genéticos, visualizándose principalmente en el gel las dos bandas de mayor tamaño, de 303 bp y de 231 bp. Esto indicaba que la recombinación se había producido siempre antes del tercer snip-SNP.

Seguidamente, se realizó un análisis de los 42 recombinantes homocigotos para la mutación *t2129* seleccionados y a los cuales se les había extraído el DNA previamente. El análisis de estos recombinantes con el tercer snip-SNP se realizó bajo las mismas condiciones que los recombinantes heterocigotos analizados previamente con dicho snip-SNP. Los productos de digestión obtenidos contenían únicamente las bandas correspondientes a la digestión de la cepa N2 Bristol (303 bp y 59 bp), por lo tanto, la recombinación se produjo en todos los casos a la derecha del tercer snip-SNP.

Después se analizaron estos recombinantes con el cuarto snip-SNP, para ello se amplificó mediante PCR la región correspondiente a este snip-SNP con la pareja de oligos adecuada. Los productos de PCR obtenidos fueron digeridos con la enzima de restricción Dral (Fermentas), incubando a 37 °C durante 2 horas y media e inactivando la enzima a 65 °C durante 20 minutos. Los productos de la digestión fueron visualizados mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2%.

En la cepa N2 Bristol, el producto de digestión contenía dos bandas de 480 bp y de 57 bp, aunque en el gel se observaba principalmente la de mayor tamaño. En la cepa de Hawaii, el producto de digestión estaba compuesto por tres bandas de 297 bp, 183 bp y 57 bp, siendo las dos bandas de mayor tamaño las que mejor se distinguían en el gel. En la mayoría de los

recombinantes analizados, el producto de digestión obtenido contenía sólo las bandas correspondientes a la cepa N2 Bristol, por lo que la recombinación se había producido después del cuarto snip-SNP. Únicamente se encontraron dos recombinantes en los cuales la recombinación se había producido entre la mutación *t2129* y el cuarto snip-SNP, con lo que el producto de digestión contenía las bandas correspondientes a ambos fondos genéticos.

9. Inactivación genética mediante RNA de interferencia

La colección de bacterias empleada para la realización de los ensayos de RNA de interferencia (RNAi) fue la colección creada en el laboratorio de la Dra. Julie Ahringer, del Instituto Gurdon de Investigación del Cáncer, de la Universidad de Cambridge (Fraser et al., 2000; Kamath et al. 2003). Esta colección fue creada clonando fragmentos genómicos obtenidos mediante PCR en el vector L4440, que cubrían un 86% de los genes del genoma de *C. elegans*. El vector poseía un promotor T7 en cada cadena de DNA. Dichos vectores fueron transformados en una cepa de *E. coli*, deficiente en actividad RNasa III y con actividad polimerasa T7 inducible por IPTG. El genotipo de esta cepa es: *F-, mcrA, mcrB, IN(rrnD-rrnE)1, lambda-, rnc14::Tn10 (DE3 lysogen:lavUV5 promotor-T7 polimerasa) (polimerasa T7 inducible por IPTG) (Rnasa III deficiente)*. La cepa crece en placas de LB o 2xYT, y es resistente a la tetraciclina. Sin embargo, la utilización de tetraciclina durante su cultivo puede disminuir el efecto del RNAi, por lo que se sustituye por ampicilina.

El procedimiento utilizado para realizar los ensayos de RNAi en este trabajo fue el descrito por Kamath et al. (2001). Los clones de RNAi de la colección que se requirieron para este trabajo fueron crecidos en placas de LB agar con 100 µg/ml de Ampicilina durante una noche a 37 °C. Al día siguiente, se aislaron las colonias con el asa de siembra y se dejaron crecer nuevamente durante una noche a 37 °C. Una vez aisladas las colonias, se inocularon los

clones de RNAi en medio LB líquido con una concentración de 50 µg/ml de ampicilina, incubando a 37 °C durante 6-12 h. Las placas utilizadas para realizar el ensayo de RNAi se realizaron añadiendo al NGM agar, además de las sales y el colesterol habituales, una concentración 1 mM de IPTG y una concentración de 100 µg/ml de Ampicilina. Las placas se hicieron con una semana de antelación aproximadamente.

Estas placas fueron sembradas con 600 µl del cultivo de bacterias con el clon de RNAi de interés incubado previamente, se dejaron secar durante 10 min en la campana de extracción y fueron inducidas toda la noche a temperatura ambiente. Al siguiente día, se transfirieron los hermafroditas en el estadio deseado a estas placas, disminuyendo en lo posible transferir las bacterias OP50 de la placa de NGM agar. Como controles para los experimentos de RNAi se usaron un clon del vector, como control negativo, que no alteraba el fenotipo silvestre de los animales crecidos en él y como control positivo, un clon de RNAi del gen *unc-22*, el cuál producía un fenotipo de movimiento incoordinado en los animales que se crecían en este clon.

En el experimento en el que se realizó la inactivación mediante RNAi de los genes *eea-1*, *bir-2*, *F53F4.10*, *letm-1*, *lpin-1* y *ceh-24*, los nematodos de fenotipo silvestre (N2) fueron sincronizados al estadio de L1, tratándolos con ácido hipoclorídico. Posteriormente, se colocaron unos 100 animales en el estadio de L1 en cada placa en la cuál previamente se había sembrado e inducido el clon de RNAi deseado. Se crecieron a 20 °C y en el estadio de L3-L4 se traspasaron algunos animales a nuevas placas de RNAi. Se crecieron a 20 °C hasta que producen progenie y los embriones de la progenie fueron observados al microscopio Nomarski para comprobar si tenían un fenotipo similar al de los mutantes *t2129*, *t2070* y *t2170*. En este experimento, se probó también la cepa hipersensible a RNAi, la cepa SA0062, con genotipo *rrf-3(pk1426) II*, pero los animales se volvían estériles y por tanto no se podía analizar el fenotipo de la progenie.

Materiales y métodos

En la inactivación del gen *ccz-1* mediante RNAi, se utilizaron hermafroditas de la cepa hipersensible a RNAi SA0062 (*rrf-3*), que se colocaron en las placas que tenían el clon de RNAi del gen *ccz-1* inducido en el estadio de L4. Se crecieron a 20 °C y en el estadio de adultos fueron transferidos a placas nuevas con el mismo clon de RNAi. Posteriormente, se observó la progenie de estos nematodos al microscopio Nomarski cuando se habían convertido en adultos. Se pudo observar acumulación de cuerpos apoptóticos en la gónada del hermafrodita adulto y gránulos en los embriones de estos animales. Este gen presentó una fuerte resistencia a la inactivación mediante RNAi, ya que cuando se probó a realizar la inactivación con la cepa silvestre no se pudo observar ningún fenotipo apreciable, y fue necesaria la utilización de la cepa hipersensible a RNAi para poder observar el fenotipo descrito.

En el experimento en el cual se observó la influencia que tenían los distintos genes de la ruta de maduración de los fagosomas sobre la localización de la proteína CCZ-1::YFP, se realizó mediante RNAi la inactivación de los genes de la ruta: *dyn-1*, *vps-34*, *rab-5*, *rab-7*, *sand-1*, *vps-18*, *vps-11* y *vps-16*. Se utilizaron animales de la cepa SA0150, con el genotipo *N2, jcpEx2 [Pced-1::F58G11.6::yfp::let-858_3'UTR; unc-119 (+)] + myo-2::gfp*, los cuales expresaban la proteína CCZ-1::YFP bajo el promotor *ced-1*. Los animales fueron sincronizados al estadio de L1 y seleccionados utilizando el marcador *myo-2::gfp*. Se crecieron a 20 °C en las placas con el clon de RNAi de cada uno de los genes de la ruta mencionados anteriormente y en el estadio de L4 fueron transferidos a nuevas placas de RNAi. A las 24 h posteriores al estadio de L4 fueron observados en un microscopio Nomarski equipado con un filtro de luz UV apropiado para la observación de la fluorescencia emitida por la YFP.

10. Técnicas de transformación

10.1. Transformación de *E. coli*

En la transformación de *E. coli* se siguió el procedimiento descrito por Kushner (1978). Las células competentes fueron descongeladas en hielo e incubadas junto con el DNA (1-10 ng) en hielo durante 30 minutos. Se les aplicó un pulso de calor de 2 minutos a 42 °C. Posteriormente, se añadieron 3 volúmenes de medio LB y se incubó la mezcla durante 1 hora a 37°C con agitación fuerte (200 rpm). Tras la incubación, se sembraron las células en placas de LB agar con el antibiótico adecuado para realizar la selección del plásmido introducido, generalmente ampicilina.

10.2. Transformación de *C. elegans* mediante microinyección

La técnica utilizada para comprobar cuál de los cósmidos conseguía rescatar la mutación fue la microinyección. Se siguió el protocolo de microinyección de nematodos recogido en el libro *Cold Spring Harbor Laboratory Worm Course Handbook*, basado en un protocolo de los Dres. Michael Stern y Michael Koelle, de la Universidad de Yale.

Esta técnica permite generar líneas transgénicas al microinyectar DNA foráneo en el sincitio de la línea germinal del hermafrodita. Parte de la progenie del animal incorporará el DNA inyectado generándose una línea transgénica. Junto con este DNA se inyecta un marcador de co-inyección, que se utiliza para seleccionar las líneas transgénicas, y diferenciarlas de la progenie que no ha incorporado el DNA inyectado.

Existen dos tipos diferentes de marcadores de co-inyección, que pueden ser utilizados en la microinyección:

a) marcadores dominantes, como por ejemplo:

- una construcción en la cuál una proteína fluorescente, como la proteína GFP, se expresa bajo el control de un promotor de un gen de *C. elegans*. Los animales transgénicos expresarán la GFP y podrán ser seleccionados utilizando una lupa equipada con fluorescencia.

- marcadores que provocan mutaciones que generan un fenotipo visible, por ejemplo: el plásmido pRF4 que contiene un alelo dominante (*su1006*) del gen del colágeno *rol-6*. Esta mutación provoca un fenotipo denominado Roller, según el cual los animales en vez de moverse de forma ondulada en línea recta, se mueven describiendo círculos.

b) fragmentos genómicos que contienen un gen que, al ser inyectado en un mutante para ese gen, consiguen rescatar el fenotipo del mutante. Los animales transgénicos serán identificados porque tendrán un fenotipo silvestre en vez del fenotipo mutante. Algunos marcadores de este tipo son:

- *lin-15*: los mutantes del alelo *lin-15 (n765ts)* tienen un fenotipo multivulva y son termosensibles. Por tanto, los animales antes de ser inyectados se deben crecer a 15°C y una vez microinyectados se crecen a 22°C aproximadamente. Los animales rescatados crecen a esa temperatura, mientras que los que no son rescatados no sobreviven. Los homocigotos para el alelo *lin-15 (n765)* de la progenie rescatada pueden ser identificados por su fenotipo multivulva en el estadio de adultos.

- *unc-119*: los animales que contienen una mutación en el gen *unc-119* tienen una movilidad muy reducida. En cambio, los animales transgénicos se mueven con normalidad y pueden ser identificados fácilmente.

En la microinyección realizada se utilizó como marcador de co-inyección el plásmido pPD118.33, el cuál expresa la proteína GFP bajo el promotor del gen *myo-2*, de forma que las líneas transgénicas son fácilmente identificadas por poseer fluorescencia en la faringe.

El DNA inyectado debe estar limpio, sin trazas de fenol o RNAasas, generalmente se realiza una *miniprep* para extraer el DNA y acondicionarlo antes de su uso. La concentración final del DNA inyectado debe ser entre 100 y 200 ng/μl. Una vez inyectado en el sincitio de la línea germinal del hermafrodita, el DNA que se ha inyectado se concatemeriza, generándose una molécula de DNA circular que se mantiene como array extracromosomal. Rara vez el DNA se integra en uno de los seis cromosomas del genoma del nematodo. El array extracromosomal se comporta como un minicromosoma, replicándose y segregándose en cada división celular. La fidelidad de transmisión del array extracromosomal a las siguientes generaciones es inferior a la transmisión de los cromosomas endógenos, alcanzándose como máximo un 50% de transmisión aproximadamente.

Para realizar la microinyección, se necesitaron los siguientes materiales:

a) almohadillas de agarosa: se prepararon pipeteando agarosa al 2% en H₂O sobre un cubreobjetos y presionando otro cubreobjetos encima de esta gota de agarosa, para obtener una almohadilla de agar lisa. Después de unos segundos, cuando la agarosa se endureció un poco se retiró el cubreobjetos superior y se dejó secar la agarosa a temperatura ambiente durante toda la noche. Estas almohadillas de agarosa fueron utilizadas para situar encima el aceite de microinyección en el cual se fijaron los animales cuando se iban a inyectar.

Materiales y métodos

b) mezcla de inyección: se preparó un volumen final de 20 μl mezclando:

- X μl del DNA (la concentración final del cósmido que se quiere inyectar debe ser de 20 ng/ μl)
- X μl del marcador de la inyección (en este caso el marcador de co-inyección utilizado fue el plásmido pPD118.33, que expresa la proteína GFP bajo el promotor del gen *myo-2*, a una concentración final de 2.5 ng/ μl)
- X μl del plásmido pGEM vacío a una concentración final de 100 ng/ μl
- y se completó hasta 20 μl con agua mili-Q.

Se debe homogeneizar bien la mezcla y debe ser filtrada antes de llenar la aguja para evitar que ésta se obstruya. Esta mezcla de inyección se puede almacenar durante meses a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

c) solución de recuperación: esta solución permitía la rehidratación de los nematodos después de ser inyectados, se utilizó medio M9 para este fin.

d) Aguja para microinyección: Las agujas utilizadas se prepararon a partir de capilares de vidrio con borosilicato. Estos capilares fueron sujetos en ambos extremos por una máquina que los fundía en la mitad y separaba los extremos, generando dos agujas muy finas a partir de cada capilar. En este trabajo se utilizó un modelo de este tipo de máquinas denominado *Narishige needle puller* PN-3.

e) Aceite de microinyección: se utilizó aceite de Halocarbono. Este aceite se usó para fijar los animales a la almohadilla de agarosa y poderlos microinyectar.

En la microinyección se utilizó un microscopio Zeiss Axiovert S100TV, que poseía un objetivo de menor aumento (5x) que permitía localizar los

nematodos, y otro de mayor aumento (40x) equipado con Nomarski, que fue el utilizado para realizar la microinyección. Este microscopio estaba unido a un micromanipulador, del modelo Narishige MMN-1, al cuál se fijaba la aguja y permitía moverla con mayor precisión. Para conseguir la presión adecuada para inyectar, la pieza que sujetaba la aguja se encontraba conectada a una bomba de presión del modelo Eppendorf Femtojet.

Para realizar la microinyección, inicialmente se encendía el microscopio y la bomba de presión, y se esperaba un tiempo hasta que la bomba alcanzaba la presión adecuada. Se llenaba la aguja nueva con la mezcla de inyección previamente filtrada, utilizando una micropipeta con una punta fina y larga (0,5-10 μ l), procurando que no existieran burbujas de aire en el interior de la aguja. Se levantaba hacia atrás la parte móvil superior del microscopio, se colocaban unos cubres nuevos pegados con el aceite de inyección, sobre los cuales se ponía una gota del aceite de inyección, y se retiraba la aguja antigua. Para evitar que la aguja antigua fuese empujada por la presión, se situaba la bomba de presión en la posición de reposo. Se colocaba la aguja nueva y se movía hacia delante la parte móvil del microscopio hasta su posición inicial. Con ayuda del micromanipulador se introducía la aguja en el aceite de inyección.

Utilizando el objetivo de menor aumento, se colocaba el extremo del cubre superior en el medio del objetivo, de forma que se observara una línea recta. Posteriormente, se situaba la aguja muy cerca de esa línea que formaba el cubre, preferiblemente formando un ángulo de unos 20-30°. Se activaba la bomba de presión y utilizando el objetivo de mayor aumento del microscopio, se observaba que la posición de la punta de la aguja fuese la correcta. Con el micromanipulador se procedía a mover hacia delante la aguja para que chocara delicadamente contra el extremo del cubre, provocando la ruptura física de la punta de la aguja. Se comprobaba que la punta de la aguja se había roto si, al accionar la posición de inyección en la bomba de presión, se observaba que salía la mezcla de inyección a través de la aguja.

Se echaba una gota de aceite de inyección sobre la almohadilla de agarosa que estaba sobre el cubreobjetos y se colocaban los animales sobre el aceite utilizando una microespátula metálica. Se debían limpiar los restos de bacterias que pudiesen tener los nematodos en la cutícula, agitándolos suavemente en el aceite. Posteriormente, se debían fijar los animales sobre la agarosa empujándolos suavemente con la microespátula. Los hermafroditas que eran inyectados debían situarse a ser posible formando una línea recta de arriba abajo, de manera que la vulva de los animales estuviese orientada hacia la izquierda, del lado contrario al que estaba la aguja de microinyección. Así, los sincitios de ambos brazos de la gónada estarían situados a la derecha, lo más cerca posible de la aguja. Se solían colocar aproximadamente unos 4 o 5 animales cada vez que se inyectaba, aunque el número dependía sobre todo de la velocidad a la cuál se realizaba el proceso; ya que si los animales estaban demasiado tiempo en el aceite de inyección se morían por deshidratación.

Se colocaba el cubreobjetos con los animales en el microscopio y con el objetivo de menor aumento se localizaban los nematodos y se comprobaba que estaban en la posición correcta. Se situaba la punta de la aguja en el mismo plano que los nematodos, formando un pequeño ángulo con el animal (entre 15° y 45°). Se pasaba al objetivo de mayor aumento (40x) y se enfocaba la punta de la aguja. Entonces se movía la aguja presionando contra la cutícula del animal, hasta que la aguja penetraba la cutícula y se encontraba dentro del sincitio de la gónada del hermafrodita. Entonces se inyectaba accionando la bomba de presión, de forma que entrara en la gónada un flujo de DNA a través de la aguja. La gónada se debía llenar lo máximo posible del DNA, para que éste recorriera todo el brazo de la gónada. Una vez se había llenado la gónada con el flujo de DNA, la aguja debía retirarse hacia atrás para que saliera del nematodo. Normalmente, se procedía a inyectar el otro brazo de la gónada del mismo animal, y después se inyectaban el resto de los animales que se habían fijado.

Una vez inyectados, los animales no debían permanecer más tiempo en el aceite de inyección para evitar su deshidratación. Por ello, se colocaba una gota de solución de recuperación sobre el cubre, el aceite flotaba, de forma que la solución de recuperación envolvía a los animales, rehidratándolos. Una vez rehidratados, los animales debían ser transferidos a una placa de agar. Para ello se absorbían del cubre con un capilar y se expulsaban sobre la placa de agar.

Al tercer día después de la microinyección, se buscaba en la progenie de los nematodos inyectados aquellos animales de la F1 que tuviesen el marcador de co-inyección, en este caso, aquellos que expresaban la GFP en la faringe. Cada animal transgénico de la F1 fue considerado un transformante independiente, aunque algunos de ellos pudiesen proceder del mismo animal inyectado. Los nematodos transgénicos fueron separados cada uno en una placa diferente para poder obtener una línea transgénica estable.

En este trabajo se microinyectaron los cósmidos y fósidos: H37A05, F53F4, F58G11, T01D3, F55B12, T10G3, C56A3, WRM0633bB09 y WRM0617cG09. También se microinyectaron los cósmidos F09F3 y C50B8, pero no se encontró ninguna línea transgénica estable para estos cósmidos. La cepa utilizada para la microinyección fue la cepa SA0042, el mutante *t2129* y los nematodos fueron inyectados en el estadio de jóvenes adultos para que el resultado de la microinyección fuese el óptimo.

10.3. Transformación de *C. elegans* con cañón de partículas

El protocolo seguido para la transformación de nematodos mediante bombardeo con un cañón de partículas de oro, fue una adaptación del protocolo descrito en Wilm et al. (1999), realizada por Dr. Ralf Schnabel y Cathrin Struck en 2005.

Materiales y métodos

Mediante este método se construyeron a lo largo de este proyecto las siguientes cepas:

- **SA0085**, con genotipo: *cnEx0001; unc-24(e138) IV/ nT1(m345)(let) (IV;V); dpy-11 (e224) t2129 V/nT1(m345)(let) (IV;V) + myo-2::gfp*; construida bombardeando la cepa SA0042 (mutante *t2129*) con el cósmido F53F4 y el plásmido pPD118.33 (*Pmyo-2::GFP*), como marcador de la transformación.
- **SA0145**, cuyo genotipo es: *unc-119 (ed3) III; jcpEx2 [Pced-1::F58G11.6(genomic)::yfp:: let-858_3'UTR; unc-119(+)] + myo-2::gfp*; construida mediante bombardeo de la cepa SA0148 (*unc-119*) con el plásmido pCN1 y el plásmido pPD118.33.
- **SA0150**, con genotipo: *wild type (N2), jcpEx2 [Pced-1::F58G11.6(genomic):: yfp:: let-858_3'UTR; unc-119(+)] + myo-2::gfp*; construida bombardeando la cepa SA0001 (N2 Bristol) con el plásmido pCN1 y el plásmido pPD118.33
- **SA0152**, con genotipo: *dpy-11 (e224), t2129 homocigoto jcpEx2 [Pced-1::F58G11.6 (genomic)::yfp::let-858_3'UTR; unc-119(+)] + myo-2::gfp*; construida mediante bombardeo de la cepa SA0059 (mutante *t2129*) con el plásmido pCN1 y el plásmido pPD118.33.
- **SA0161**, cuyo genotipo es: *unc-119 (ed3) III; jcpEx3 [Promotor F58G11.6::F58G11.6 (genomic):: yfp::let-858_3'UTR; unc-119(+)] + myo-2::gfp*; construida bombardeando la cepa SA0148 (*unc-119*) con el plásmido pCN2 y el plásmido pPD118.33.
- **SA0167**, con el genotipo: *pha-1(e2123)III; jcpEx4 [Promotor F58G11.6:: F58G11.6(genomic)::yfp::let-858_3'UTR;unc-119(+)]*; construida mediante bombardeo de la cepa SA0058 (*pha-1*) con el plásmido pCN2 y el plásmido que rescata la mutación *pha-1(e2123) III*.

El primer paso en la transformación fue la preparación de las placas de agar utilizadas en el bombardeo. Se usaron placas pequeñas (4 cm aproximadamente) de NGM agar que estuvieran un poco secas, y se sembraron con 25 µl de un cultivo de bacterias OP50. Fueron incubadas a temperatura ambiente durante toda la noche, o a 37 °C durante 4 horas. Para la transformación, las placas fueron enfriadas con hielo, para favorecer la inmovilidad de los animales durante el bombardeo.

Los animales fueron previamente sincronizados a larvas en el estadio de L1 y crecidos hasta jóvenes adultos, ya que este estadio es en el cual se obtiene un mayor rendimiento en la transformación. Los animales fueron recogidos con solución M9 de las placas, dejándolos depositarse en el fondo de un tubo por gravedad y quitando el exceso de sobrenadante.

Se preparó la solución de DNA precipitado sobre partículas de oro, pesando inicialmente 1 mg de partículas de oro (Chempur, polvo de oro 0,3-3,0 micron/99,9%) en un vial Eppendorf de 1,5 ml. La cantidad preparada servía aproximadamente para la realización de unos 7-8 disparos con el cañón de partículas. Se añadieron al vial 100 µl de una solución de espermidina 50 mM (Sigma), se agitó utilizando un vortex y se sonicó durante 15 segundos. Posteriormente, se añadió el DNA con el cuál se deseaba transformar la cepa. La cantidad total óptima de DNA para la transformación son 16 µg, por lo que normalmente se añadieron 8 µg del plásmido o cósmido deseado, y 8 µg del plásmido utilizado como marcador de la transformación. Habitualmente, se utilizó como marcador el plásmido pPD118.33, que posee la construcción *Pmyo-2::gfp*, y confiere fluorescencia verde a la faringe cuando la transformación ha tenido éxito. Sin embargo, otras veces se utilizaron como marcadores otros plásmidos que rescataban la mutación presente en la cepa que se bombardeaba, por ejemplo, el caso de la mutación *pha-1 (e2123) III*.

Materiales y métodos

Para facilitar la precipitación del DNA sobre las partículas de oro se dejó incubar la mezcla durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después se rellenó la diferencia de volumen hasta 360 μl de agua miliQ y se dejó incubando de nuevo 10 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 100 μl de una solución CaCl_2 1 M goteándolo poco a poco sobre la mezcla, se agitó y se dejó incubar 10 minutos a temperatura ambiente para generar la precipitación del DNA. Posteriormente se centrifugó el vial durante 15 segundos a 12000 rpm, se quitó el sobrenadante y se lavó la mezcla 3 veces con etanol al 100%. Justo antes de bombardear se resuspendió esta mezcla en 200 μl de una solución de polivinilpirrolidona (PVP) a una concentración 0,1 mg/ml en etanol absoluto (Sigma, solución de PVP a 20 mg/ml), agitándola vigorosamente.

Mientras tanto, se colocaron unos 20 μl de la solución M9 que contenía los nematodos en cada placa pequeña enfriada en el hielo. La capa de nematodos se colocó sobre la delgada capa bacteriana, situada justo en el medio de la placa. Gracias al enfriamiento de las placas, los animales permanecían en su mayoría inmóviles sobre esta capa.

El cañón de partículas se encontraba conectado a una bombona de Helio a presión. La presión del Helio que salía de la bombona se regulaba mediante una válvula a 10 bares, y además otra válvula situada antes del cañón conseguía calibrar la presión a 8 bares para efectuar los disparos. Para cada transformación, se abrió la bombona y se comprobó que la presión se encontraba regulada por ambas válvulas. Previamente a cada disparo, se colocaron 20 μl de la mezcla de DNA preparada con anterioridad en la rejilla metálica del cañón y se colocó de nuevo en su lugar. Se colocó una placa de agar con los animales y sin la tapa justo en el centro de la cámara de vacío en la cuál se efectúa el disparo. Se cerró la cámara de vacío y se comenzó a generar el vacío en ella. En el momento en el que el vacío alcanzó una presión de entre -0,4 y -0,5 bares, es cuando se efectuó el disparo del cañón de partículas sobre la placa con los nematodos. Al disparar, el Helio arrastraba las partículas de oro que tenían el DNA precipitado a alta velocidad, contra los

animales. De esta forma, algunas de las partículas conseguían atravesar la cutícula de los nematodos entrando dentro de su organismo y consiguiendo la transformación.

Inmediatamente después al disparo, se disminuyó el vacío generado en la cámara y se colocó la placa con los animales de nuevo sobre el hielo. Se repitió la operación hasta finalizar todos los disparos. La mezcla de DNA preparada, según las cantidades indicadas antes, alcanzaba para efectuar alrededor de 7 disparos. Una vez finalizados todos los disparos, se limpió la rejilla del cañón de partículas con ácido hipoclorínico durante toda la noche para eliminar los restos de DNA. Después se limpiaron bien los restos del ácido hipoclorínico con agua y se dejó en etanol al 100% para su conservación hasta efectuar la siguiente transformación.

Las placas pequeñas que contienen los animales sobre los que se disparó se cortaron en 6 sectores, poniendo cada uno de ellos en una placa de agar nueva de tamaño normal (de 9 cm de diámetro). Se deslizó el trozo de agar sobre la placa nueva para poder arrastrar los nematodos sobre la superficie de la placa. Entre 10 y 20 minutos después los animales se comenzaron a mover sobre la placa nueva. Habitualmente, el 50% de los animales se mueren después del disparo. Se incubaron las placas con los nematodos a la temperatura adecuada, dependiendo del marcador de selección utilizado. Si el marcador de selección utilizado fue el plásmido que rescata la mutación *pha-1*, se dejaron incubando a 25 °C, para que se murieran todos los animales que tenían la mutación *pha-1*, y sobrevivieran únicamente aquellos que habían sido rescatados por el plásmido en la transformación.

En los animales en los que tuvo éxito la transformación, el DNA que se introdujo en ellos al dispararles, formó un array extracromosomal, de manera que se pudo transpasar a la descendencia. Algunas de las líneas no eran estables y perdían el array extracromosomal. Sin embargo, otras líneas sí eran estables y el array extracromosomal no se perdía, y se traspasaba a la descendencia en un porcentaje variable. Sólo en determinados casos, el DNA

era integrado en el genoma del nematodo y se transmitía a toda la descendencia, manteniéndose una línea integrada.

Se seleccionaron aquellas líneas estables para la transformación, utilizando el método adecuado al marcador de selección. Si como marcador de selección se había utilizado el plásmido pPD118.33, se seleccionaron los nematodos que tenían la faringe fluorescente, visualizándolos mediante la lupa de fluorescencia. La selección se realizó en la F1 y cada animal fluorescente fue separado en una placa aparte, comprobando cuáles de ellos mantenían la línea estable en la F2. Con este método se conseguía que las líneas seleccionadas fuesen independientes, ya que provenían de diferentes animales hermafroditas.

11. Tratamiento informático de los datos

Las secuencias de DNA y proteína fueron obtenidas principalmente de la base de datos wormbase (<http://www.wormbase.org/>), utilizándose también las bases de datos Sanger (<http://www.sanger.ac.uk/>), Swissprot (<http://www.expasy.org/>), EMBLEBI (<http://www.ebi.ac.uk/embl/index.html>) y UniProt (<http://www.uniprot.org/>). Las secuencias fueron analizadas utilizando los programas *EditSeq* (DNASTAR Inc.), *SeqMan* (DNASTAR Inc.) y *MapDraw* (DNASTAR Inc.). Para el diseño de oligonucleótidos se usó el programa *Oligo 4.0* (National Biosciences Inc). Las construcciones fueron dibujadas con los programas *Vector NTI v10.0* y *ApE v1.17*. Las imágenes de microscopía Nomarski fueron procesadas con los programas *Adobe Photoshop CS3* e *ImageJ* (NIH). Para el procesamiento de las imágenes de microscopía en 4D y montaje de las películas se utilizaron los programas *ACDSee 7.0* y *Simi Biocell Software*. Las representaciones gráficas fueron creadas con los programas *Adobe Illustrator CS3* y *Power Point* (Microsoft). Como procesador de textos se utilizó *Microsoft Word*. Las búsquedas bibliográficas fueron realizadas a través de NCBI-PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>).

RESULTADOS

1. Escrutinio de mutantes con letalidad embrionaria

Los mutantes *t2129*, *t2070* y *t2170* fueron descubiertos al realizar un escrutinio que tenía como objetivo encontrar mutantes embrionarios letales de efecto maternal, y que por tanto, tuviesen defectos en rutas implicadas en el proceso de embriogénesis. Dicho escrutinio fue realizado en el laboratorio del Dr. Ralf Schnabel (Instituto de Genética, TU Braunschweig, Alemania), y consistió en mutageneizar con etilmetanosulfonato la cepa de *C. elegans*, que aparece esquematizada en la Figura 3.1 y cuyo genotipo era:

*him-9 (e1487) II; unc-24 (e138) IV; dpy-11 (e224) V/
nT1 (m345) (let) (IV;V)*

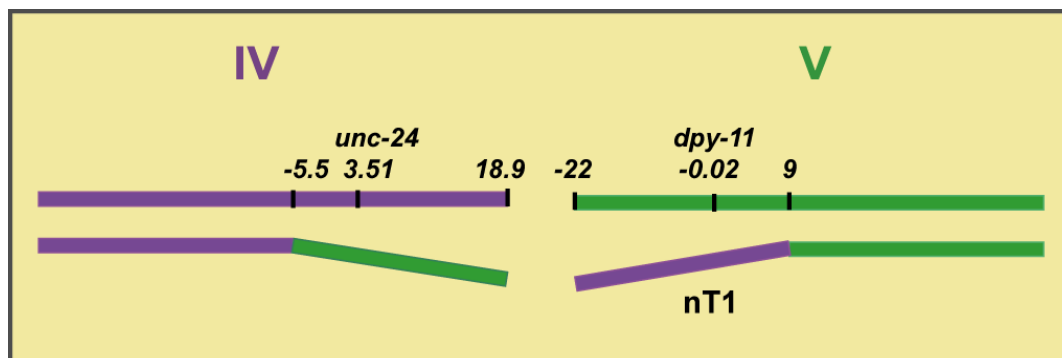


Figura 3.1. Cepa mutageneizada en el escrutinio. En el escrutinio fue mutageneizada con etilmetanosulfonato dicha cepa, la cual contenía dos marcadores genéticos en la región balanceada por el balanceador *nT1*, uno en el cromosoma IV y otro en el cromosoma V: *unc-24* (*e138*) y *dpy-11* (*e224*), respectivamente.

El etilmetanosulfonato es un agente mutagénico que suele inducir mutaciones de tipo puntual, modificando un nucleótido por otro. Esto puede generar diferentes alteraciones genéticas, por ejemplo: la conversión de un aminoácido en otro de forma que se modifique la estructura proteica, o bien la generación de un codón sin sentido o de un codón de parada prematuro, que interrumpa la traducción del mRNA.

Resultados

Posteriormente a la mutagénesis, se realizó un escrutinio de los mutantes generados, seleccionando aquellos en los que se observó letalidad embrionaria de efecto maternal. La cepa utilizada en el escrutinio anterior contiene el balanceador *nT1 (m345) (let)*, en el cual se encuentran intercambiadas entre sí una región del cromosoma IV y otra del cromosoma V. Los balanceadores genéticos son reorganizaciones cromosomales o construcciones genéticas que permiten mantener en heterocigosis aquellas mutaciones que son letales o que producen esterilidad maternal. Existen diferentes tipos de balanceadores genéticos: translocaciones, duplicaciones, transgenes, inversiones, etc. Por tanto, en *C. elegans* se usan cepas balanceadas para permitir que una cepa con una mutación que es letal en homocigosis, pueda ser viable y ser mantenida a lo largo del tiempo, ya que la copia del gen silvestre es aportada por la copia del gen presente en el balanceador, que no se encontrará mutada. Dado que el escrutinio fue llevado a cabo en una cepa balanceada, fueron seleccionados únicamente los mutantes generados en la región balanceada, ya que aunque eran letales embrionarios en homocigosis, al estar balanceados eran viables. Por el contrario, aquellos mutantes cuya mutación se encontraba en la región no balanceada por *nT1 (m345) (let)*, al no estar balanceada la mutación, no producían una cepa viable.

En la cepa elegida para realizar el escrutinio existían dos marcadores genéticos: *unc-24 (e138)* en el cromosoma IV y *dpy-11 (e224)* en el cromosoma V. Estos marcadores genéticos producen un fenotipo característico, observable al visualizar los animales mediante una lupa binocular. En el caso del marcador *unc-24 (e138)*, se observa que los animales se mueven de forma descoordinada, mientras que el marcador *dpy-11 (e224)* produce animales más gruesos y de menor longitud que la cepa silvestre. La utilización de marcadores genéticos permite poder asociar un gen mutado a un marcador por proximidad genética, observando si la mutación se encuentra ligada o no en la segregación genética. De esta manera se puede deducir en qué cromosoma se halla la mutación.

Una vez seleccionados fenotípicamente aquellos candidatos que presentaban una alta letalidad embrionaria en homocigosis, se observaron al microscopio varios embriones de cada mutante seleccionado. Se intentó deducir qué ruta génica podría estar afectada por la mutación, según el defecto observado en el proceso de embriogénesis: incorrecta orientación de los husos mitóticos, errores en el linaje celular, acumulación de cuerpos apoptóticos en el embrión, etc. Para comprobar si los mutantes presentaban diferentes alelos del mismo gen, se realizaron experimentos de complementación génica entre todos los mutantes. De esta forma, aquellos mutantes que, presentando un fenotipo similar, eran incapaces de complementarse entre sí, era muy probable que tuviesen una mutación en el mismo gen.

2. Caracterización fenotípica de los mutantes *t2129*, *t2070* y *t2170*

Mediante el experimento de complementación realizado tras el escrutinio, se comprobó que los mutantes *t2129*, *t2070* y *t2170* son tres alelos del mismo gen, ya que cada mutación no conseguía rescatar a las otras cuando se combinaban entre sí. Este gen se encuentra ligado al marcador *dpy-11 (e224)*, y por lo tanto, se halla en la región balanceada del cromosoma V. Los animales homocigóticos para cada una de estas tres mutaciones son viables, ya que son rescatados por el aporte materno de la proteína, sin embargo la progenie de estos homocigóticos presenta una alta letalidad embrionaria, de casi el 100%.

2.1. Caracterización fenotípica embrionaria

Los embriones de los homocigóticos para cada una de las tres mutaciones: *t2129*, *t2070* y *t2170* fueron observados mediante microscopía Nomarski. Inicialmente, el fenotipo observado en estos embriones fue una

Resultados

acumulación de vesículas grandes que, como se muestra en la figura 3.2, eran más numerosas en la célula anterior (célula AB) del embrión en el estadio de dos células y en los descendientes de esta célula, que en la célula posterior (P1) del embrión.

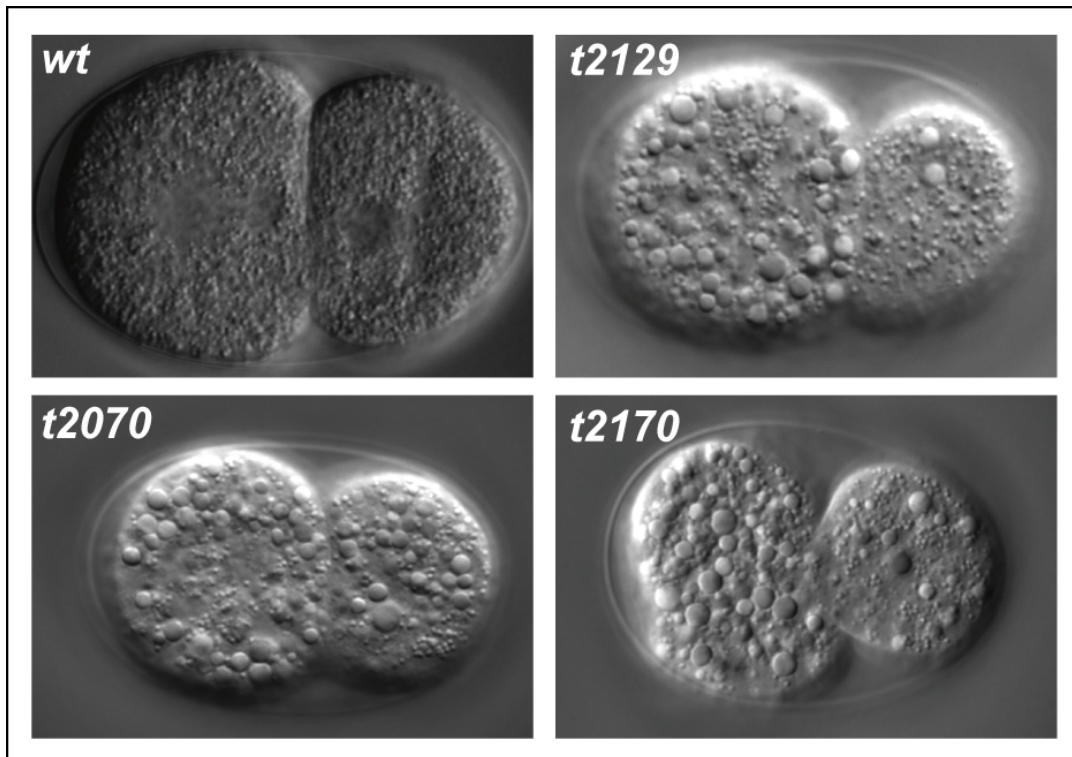


Figura 3.2. Fenotipo embrionario de los mutantes. En el estadio de dos células de los embriones homocigóticos de los mutantes *t2129*, *t2070* y *t2170* se observa una acumulación de vesículas, principalmente en la célula anterior AB.

La técnica utilizada para analizar en detalle el fenotipo embrionario de los mutantes fue la microscopía en 4D. Para cada alelo, se realizó la grabación en microscopía 4D de varios embriones de la progenie de animales homocigóticos para la mutación. La microscopía en 4D utiliza un microscopio equipado con Nomarski asociado a una cámara fotográfica que captura las imágenes y a un ordenador que almacena los datos, como puede observarse en la Figura 3.3.

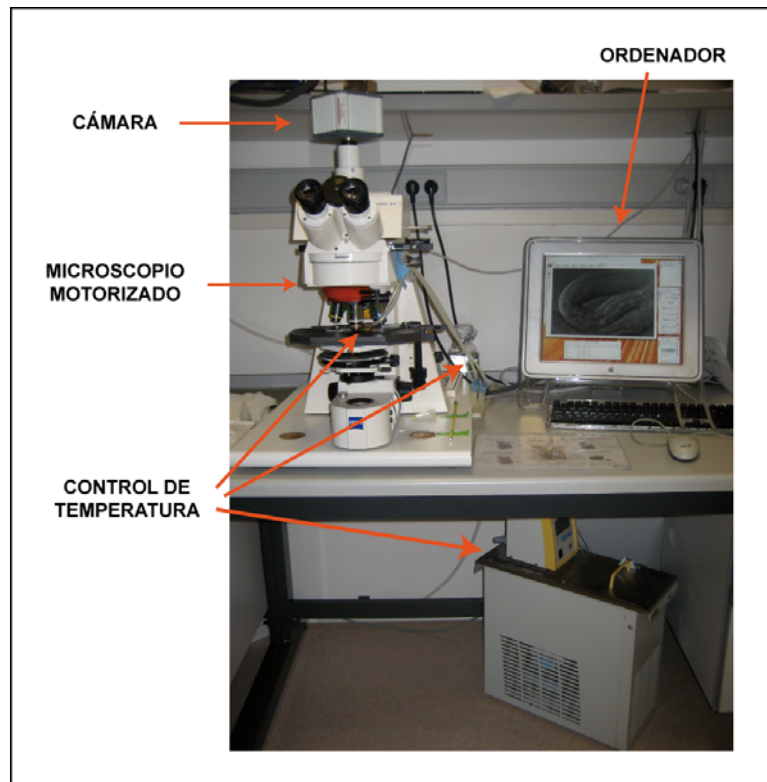


Figura 3.3. Dispositivo utilizado en la microscopía en 4D. En esta técnica es necesario un microscopio equipado con Nomarski, asociado a una cámara fotográfica y un equipo informático que permiten la captura y almacenamiento de fotografías de la muestra.

La muestra se coloca en un portaobjetos y observándola al microscopio, se fijan los parámetros de los ejes X e Y en los cuales se encuentra dicha muestra. El microscopio enfoca automáticamente en el eje Z entre unos valores determinados, de forma que permite captar imágenes en diferentes planos secuenciales de la muestra, en este caso del embrión, a lo largo del tiempo. Se capturan imágenes en 25 planos distintos del embrión por cada intervalo de un minuto. Al finalizar el intervalo, el objetivo recupera su posición inicial en el eje Z, y comienza de nuevo a bajar para realizar una nueva captura de imágenes (Figura 3.4). Este proceso se encuentra automatizado mediante un programa informático. Las imágenes tomadas son almacenadas en el equipo informático asociado al microscopio. El microscopio que realiza la microscopía en 4D está dotado de un sistema de control de la temperatura en la muestra, basado en un

Resultados

anillo metálico que se sitúa en contacto con el cubreobjetos bajo el cual se encuentra la muestra y a través del cual circula una corriente de agua con temperatura controlada. Este sistema permite mantener constante la temperatura, de forma que se pueda controlar la velocidad de desarrollo de la embriogénesis.

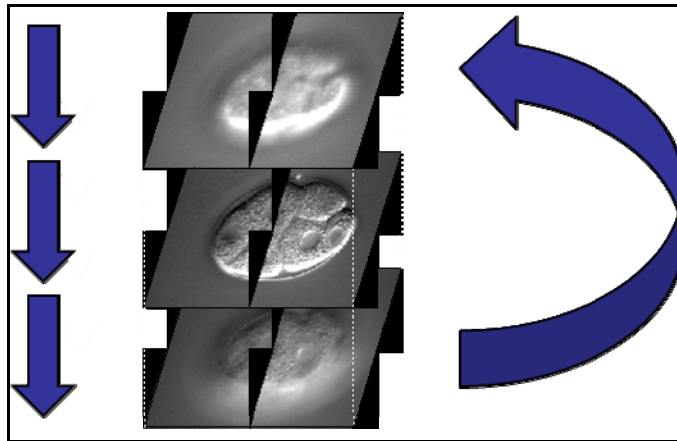
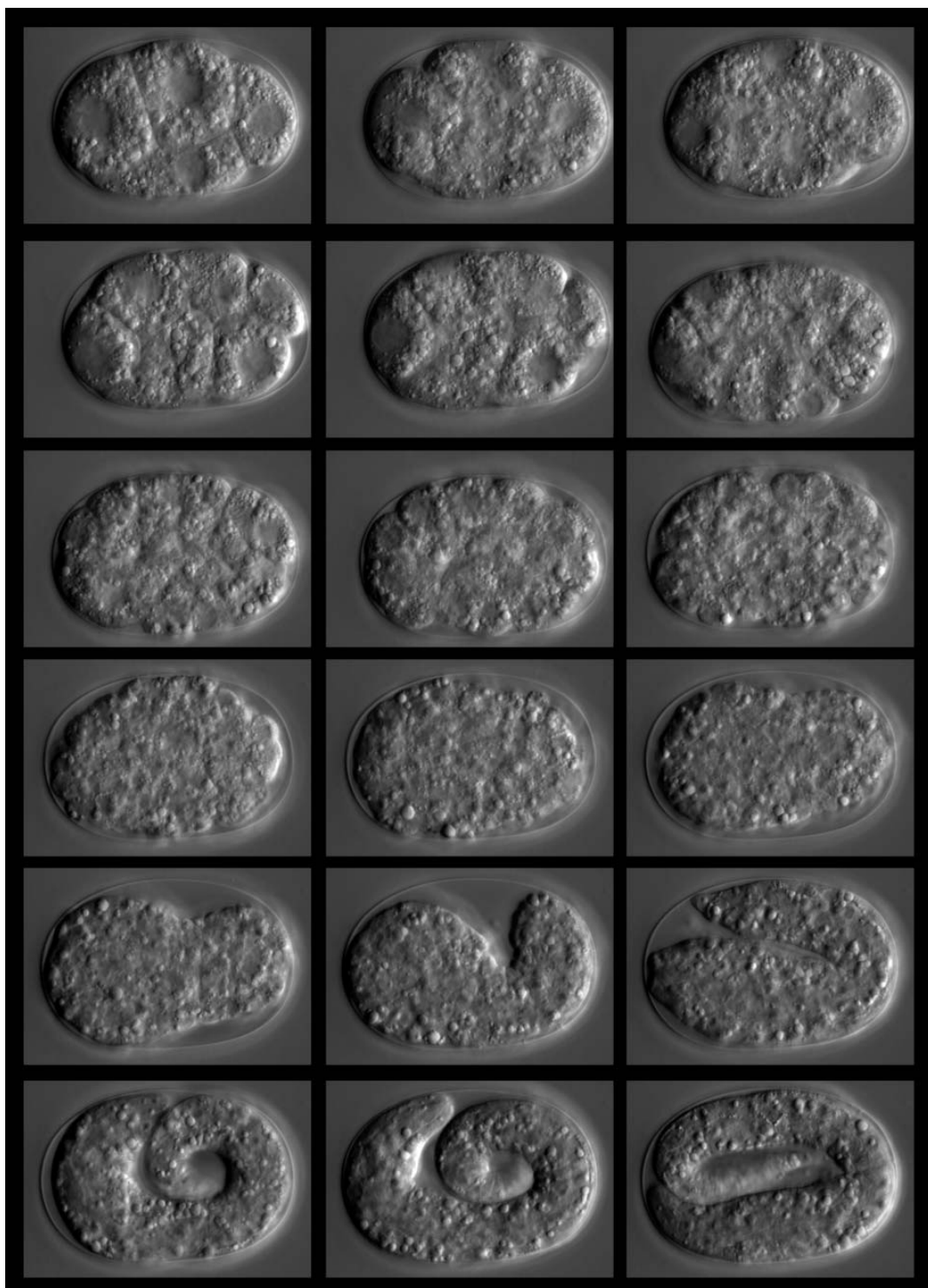


Figura 3.4. Captura secuencial de imágenes de un embrión. En la microscopía en 4D se realiza una captura secuencial de fotografías a distintos planos de la muestra, a lo largo del tiempo.

El programa informático usado para captar las imágenes es el programa *Openlab*, el cuál almacena las imágenes en un formato denominado PICT. Posteriormente, utilizando otro programa informático, estas imágenes serán convertidas del formato inicial PICT al formato TIFF y secuencialmente del formato TIFF a otro formato denominado LURAWAVE, ya que este último formato es el que reconoce el programa informático *Simi Biocell Software* (SIMI GmbH, Alemania). Este programa permite ensamblar las imágenes capturadas, generándose un video secuencial del embrión. De esta manera se puede observar, en cada uno de los planos del eje Z del embrión, el proceso de embriogénesis, desde el estadio de dos células hasta la eclosión del embrión. Esto se puede apreciar en el Vídeo 3.1, en el cual se grabó mediante microscopía en 4D un embrión de la progenie de un mutante *t2129* homocigótico.



Vídeo 3.1. Vídeo de microscopía en 4D de un embrión del mutante *t2129*.

Resultados

La importancia de esta técnica reside en que utilizando este programa informático (*Simi Biocell Software* u otro similar) es posible seguir el destino de cada célula del embrión y determinar su linaje celular, comprobando si los patrones de división celular y la orientación de los ejes de división celular son correctos.

En la Figura 3.5, se representa un esquema de cómo se realiza el seguimiento de un vídeo de microscopía en 4D utilizando el programa *SimiBiocell*, determinando las divisiones celulares que se producen en la embriogénesis y trazando el linaje celular de un embrión. Mediante la técnica de microscopía en 4D y el análisis con el programa informático *SimiBiocell*, también se pueden seguir las células apoptóticas generadas en el embrión, observando si el patrón de las apoptosis se corresponde con el de un tipo silvestre o si existe alguna alteración, y si las células apoptóticas son correctamente fagocitadas y eliminadas, o por el contrario sufren acumulación. En el caso de los mutantes *t2129*, *t2070* y *t2170*, al realizar la microscopía en 4D se observó que los embriones de la progenie de animales homocigóticos para la mutación presentaban una acumulación anómala de cuerpos apoptóticos. Asimismo, los embriones también contienen una gran cantidad de cuerpos vesiculares, con un posible origen endocítico, que no provienen de células apoptóticas.

En la observación de los embriones en el microscopio Nomarski, los cuerpos apoptóticos se pueden confundir con las vesículas de tipo endocítico que se acumulan en el embrión, ya que ambos se presentan como corpúsculos refráctiles. Por el contrario, al seguir en la grabación de microscopía en 4D cada división celular por separado, se puede observar cómo la célula sufre apoptosis y se convierte en el cuerpo apoptótico, y comprobar si posteriormente éste es eliminado o persiste en el embrión. Por lo tanto, los cuerpos apoptóticos del embrión pueden ser diferenciados claramente de las vesículas acumuladas en el embrión.

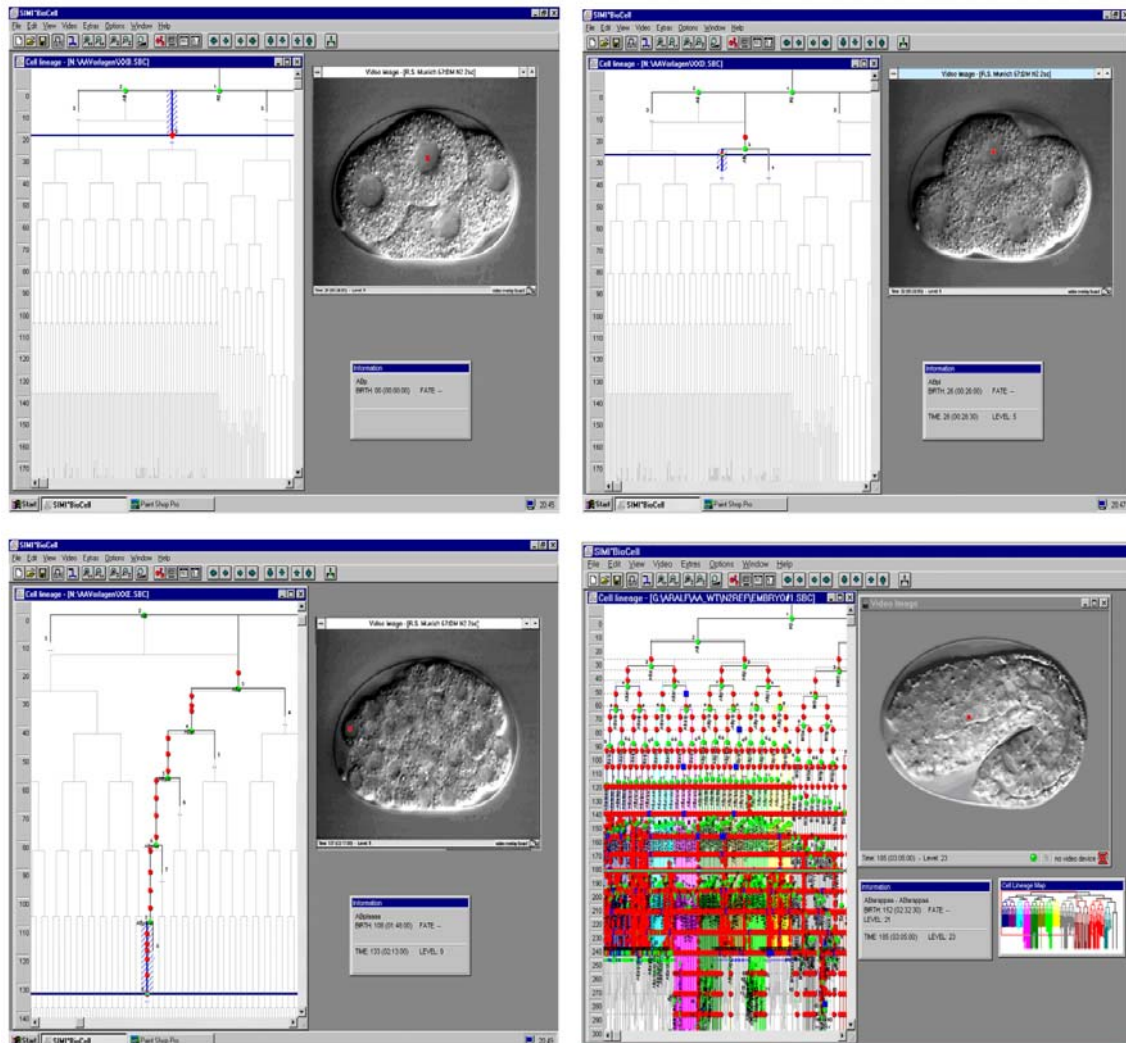
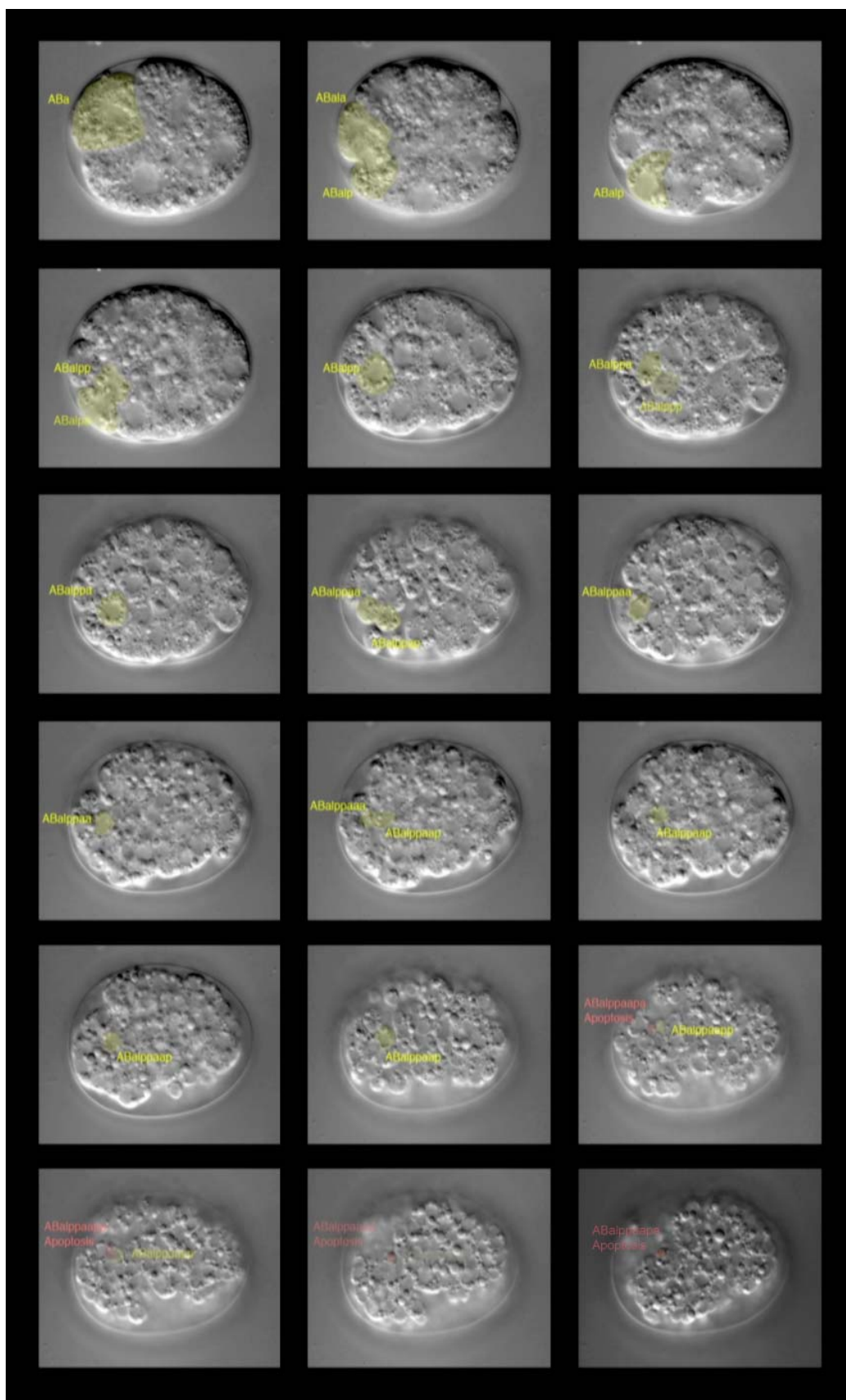


Figura 3.5. Programa informático *SimiBioCell*. En la figura se observa cómo se realiza, mediante el uso del programa informático *SimiBioCell*, el seguimiento de las imágenes tomadas mediante microscopía en 4D de un embrión de *C. elegans*. Se pueden caracterizar las divisiones celulares que se producen y de esta forma, es posible reconstruir el linaje celular completo del embrión.

Esto puede ser apreciado en el Vídeo 3.2, en el cual se representa el desarrollo de un embrión de la progenie de un mutante *t2129* homocigótico y se aprecia cómo una de las células apoptóticas que se producen en el embrión no desaparece, sino que se convierte en un cuerpo apoptótico persistente. Mediante la técnica de la microscopía en 4D es posible localizar la célula apoptótica y seguirla a lo largo del tiempo, evitando confundirla con las vesículas que se acumulan en el embrión del mutante.

Resultados



Vídeo 3.2. Seguimiento de una célula apoptótica mediante microscopía en 4D.

Mediante el uso del programa informático *SimiBiocell*, se realizó un seguimiento de cada una de las células apoptóticas formadas en la primera fase apoptótica del linaje celular del embrión. Se comprobó que en los mutantes *t2129*, *t2070* y *t2170* el destino celular de estas células no se hallaba alterado, siendo el número de células apoptóticas generadas igual al observado en un embrión silvestre, de forma que no existía una apoptosis excesiva. Sin embargo, las células apoptóticas formadas no eran correctamente eliminadas y se acumulaban en el embrión. Este hecho sugería que los mutantes poseían un defecto en la fagocitosis o degradación de cuerpos apoptóticos, mientras que la ruta de generación de células apoptóticas no se hallaba afectada. Los datos de la cuantificación de este fenotipo se encuentran recogidos en la Tabla 3.1, y se aprecia que en los embriones de los mutantes *t2129*, *t2070* y *t2170* existe una clara acumulación de cuerpos apoptóticos persistentes, con respecto al silvestre.

| GENOTIPO | CUERPOS APOPTÓTICOS PERSISTENTES EN EL EMBRIÓN | DEFECTO EN LA ORIENTACIÓN DEL HUSO MITÓTICO |
|----------------------|--|---|
| wt | 0 (n=39) | 0 (n= 3) |
| <i>ccz-1 (t2129)</i> | 23 (n=24) | 1 (n=3) |
| <i>ccz-1 (t2070)</i> | 12 (n=18) | 2 (n=3) |
| <i>ccz-1 (t2170)</i> | 12 (n=12) | 0 (n=3) |

Tabla 3.1. Cuantificación de los cuerpos apoptóticos persistentes en el embrión y del defecto en la orientación del huso mitótico. En un embrión silvestre los cuerpos apoptóticos producidos en la embriogénesis son totalmente fagocitados y eliminados. Sin embargo, en los embriones de los mutantes *t2129*, *t2070* y *t2170* existe una acumulación de cuerpos apoptóticos persistentes que pueden ser seguidos mediante microscopía 4D. Los datos recogen el número de cuerpos apoptóticos persistentes, siendo n el número de cuerpos apoptóticos observados. En algunos de los embriones de los mutantes también se observa un defecto en la orientación del huso mitótico de los blastómeros EMS y Abar. Los datos significan el número de embriones en los cuales se produce el defecto en la orientación del huso mitótico, siendo n igual al número de embriones observados.

Resultados

El tercer fenotipo que se observó en algunos de los embriones grabados, como se aprecia en la Figura 3.6, fue que la rotación del huso mitótico de los blastómeros EMS y ABar era incorrecta, provocando un patrón anormal entre los contactos celulares. Esto originaba errores en el linaje celular, como por ejemplo una alteración de las posiciones de las apoptosis en el linaje, y los embriones podían sufrir una morfogénesis anómala que les provocase la muerte. En el resto de embriones, el huso mitótico de los blastómeros EMS y Abar rotaba correctamente, por tanto, el linaje celular era normal y la morfogénesis del embrión proseguía sin alteraciones con respecto a un embrión silvestre, hasta llegar al estadio embrionario de dos o tres pliegues, momento en el cuál la morfogénesis se paraba y el embrión moría. Mediante la utilización de la microscopía en 4D, se realizó una cuantificación de este fenotipo. Los datos obtenidos se recogen en la Tabla 3.1 anterior.

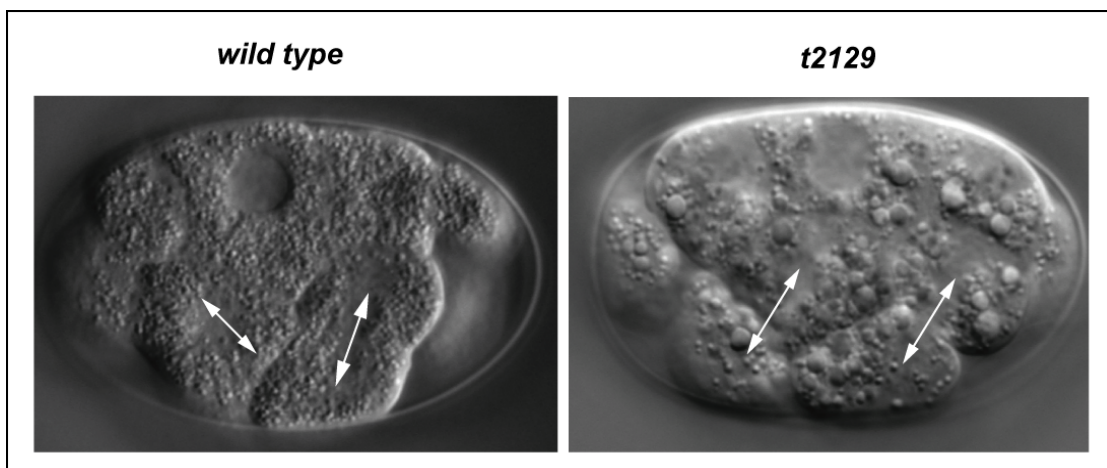


Figura 3.6. Alteración en la rotación del huso mitótico en el mutante *t2129*.

En la figura se observa cómo en un embrión del mutante *t2129*, la rotación del huso mitótico de los blastómeros EMS y Abar no es correcta, de manera que ambos husos mitóticos se sitúan de forma paralela, mientras que en un embrión de tipo silvestre estos husos mitóticos se encuentran de forma perpendicular entre sí. Esta rotación incorrecta conlleva una alteración de los contactos celulares y del linaje celular del embrión del mutante.

2.2. Caracterización fenotípica del mutante hermafrodita adulto

2.2.1. Cuantificación de la acumulación de los cuerpos apoptóticos de la línea germinal

En la gónada del hermafrodita adulto silvestre es posible visualizar mediante microscopía Nomarski un número pequeño de corpúsculos uniformes y altamente refráctiles, que se corresponden con los cuerpos apoptóticos que se generan en la gónada. En la Figura 3.7 se observa un esquema de la gónada del hermafrodita adulto. Los cuerpos apoptóticos se sitúan en la región meiótica de la gónada, siendo posible observarlos durante aproximadamente 20 minutos al microscopio, desde que las células sufren apoptosis hasta que finalmente son eliminadas por las células de la vaina de la gónada.

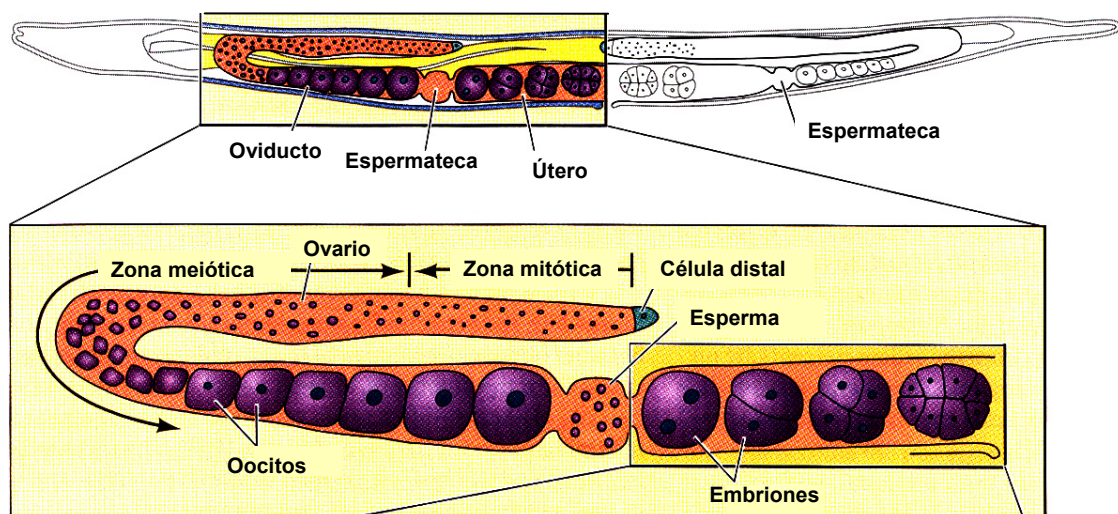


Figura 3.7. Esquema de la gónada de un animal hermafrodita adulto. La gónada del hermafrodita adulto tiene una forma de U con dos brazos, en los que se diferencian diferentes partes: una célula distal, una zona mitótica, el ovario, una zona meiótica, una zona en la que crecen los oocitos, la espermateca y el útero, en el cual se producen las primeras fases de la embriogénesis. En la zona meiótica del brazo de la gónada es donde se pueden visualizar mediante Nomarski los cuerpos apoptóticos (imagen adaptada del original, *Developmental Biology*, 2000).

Resultados

En un silvestre, la fagocitosis de los cuerpos apoptóticos de la línea germinal por parte de las células de la vaina se produce de forma muy rápida y mediante microscopía Nomarski normalmente se pueden observar sólo uno o dos cuerpos apoptóticos en la gónada del hermafrodita adulto. Las células de la vaina son una capa sencilla de células somáticas que envuelven el sincitio de la línea germinal y que están especializadas en la fagocitosis y degradación de los cuerpos apoptóticos producidos en la línea germinal (Gumienny et al., 1999). Los mutantes que afectan a la ruta de fagocitosis y degradación de cuerpos apoptóticos sufren una acumulación de cuerpos apoptóticos en la gónada del hermafrodita adulto, visible y cuantificable con ayuda de la microscopía Nomarski (Gumienny et al., 1999; Kinchen et al., 2008).

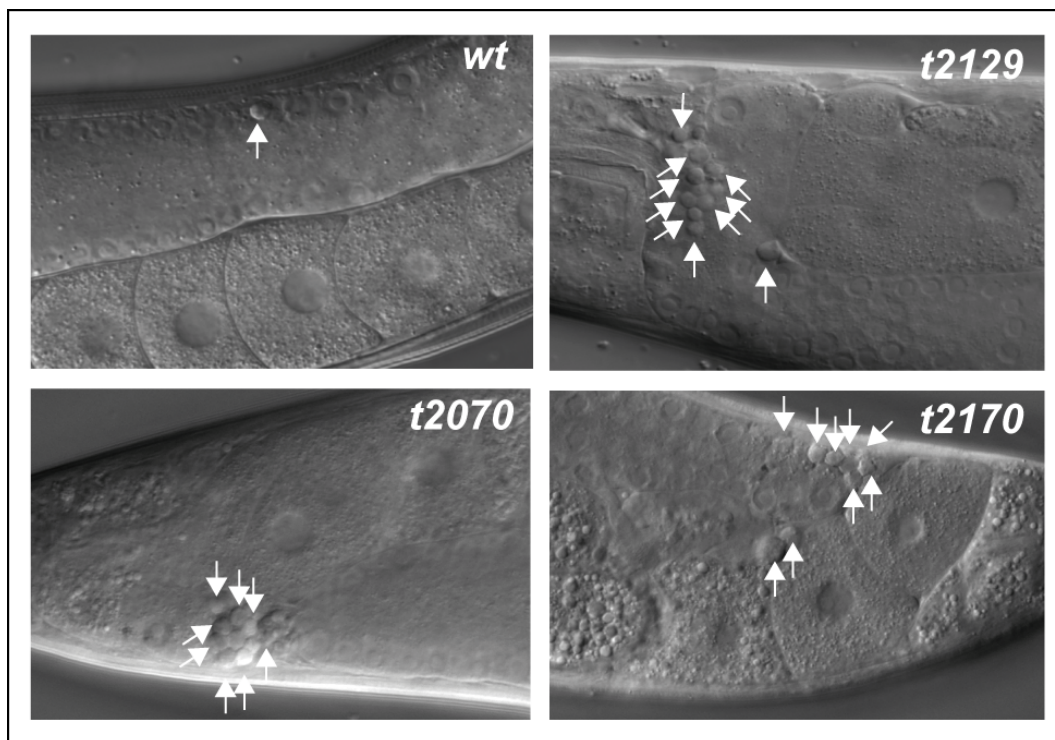


Figura 3.8. Acumulación de cuerpos apoptóticos en la gónada de los hermafroditas adultos. Con respecto a un silvestre, en los homocigóticos para las mutaciones *t2129*, *t2070* y *t2170* se observa una acumulación significativa de cuerpos apoptóticos de la línea germinal (señalados con flechas en la figura).

Mediante microscopía Nomarski, se observó que en los mutantes *t2129*, *t2070* y *t2170* también se produce esta acumulación de cuerpos apoptóticos de la línea germinal, tal y como se puede apreciar en la Figura 3.8 (página anterior). Por lo tanto, inicialmente se realizó, para caracterizar su fenotipo en el nematodo adulto, una cuantificación de los cuerpos apoptóticos presentes en la gónada del hermafrodita adulto en estadíos de 24h, 36h y 48h posteriores al estado larvario de L4. Los datos obtenidos en la cuantificación, mostrados en la Tabla 3.2 y en la Figura 3.9, corroboraron que la acumulación de cuerpos apoptóticos que se producía en la gónada de los hermafroditas mutantes se veía incrementada a lo largo del tiempo, siendo una acumulación superior a las 48h posteriores al estadio de L4, que a las 24h posteriores a este estadio. Se realizó asimismo la cuantificación de los cuerpos apoptóticos presentes en la cepa CB224, cuyo genotipo era *dpy-11(e224)* V, para verificar que el marcador *dpy-11* no influía en la acumulación de cuerpos apoptóticos en la gónada del hermafrodita adulto. Los resultados de la cuantificación obtenidos para esta cepa fueron: 0.5 ± 1.1 (n=13) a las 24h posteriores al estadio de L4; que son similares a los obtenidos para una cepa silvestre.

| Genotipo | Número de cuerpos apoptóticos (DIC) en la gónada del hermafrodita adulto | | |
|----------------------|---|-----------------------|-----------------------|
| | 24h post L4 | 36h post L4 | 48h post L4 |
| wt | 0.5 ± 0.5 (n=12) | 1.8 ± 5.1 (n=14) | 1.8 ± 2.2 (n=12) |
| <i>ccz-1 (t2129)</i> | 11.3 ± 4.0 (n=23) | 13.0 ± 3.9 (n=25) | 22.9 ± 6.3 (n=24) |
| <i>ccz-1 (t2070)</i> | 12.3 ± 4.9 (n=12) | 23.3 ± 6.3 (n=15) | 26.7 ± 5.3 (n=6) |
| <i>ccz-1 (t2170)</i> | 6.7 ± 2.8 (n=14) | 16.4 ± 4.2 (n=22) | 20.4 ± 5.2 (n=14) |

Tabla 3.2. Cuantificación de los cuerpos apoptóticos presentes en la gónada del hermafrodita adulto. La cuantificación de los cuerpos apoptóticos de la línea germinal mediante microscopía Normarski, realizada a distintos periodos posteriores al estadio larvario L4, permite apreciar, con respecto al genotipo silvestre, que en los mutantes *t2129*, *t2070* y *t2170* se produce una acumulación de cuerpos apoptóticos en la gónada del hermafrodita adulto, que se incrementa gradualmente a lo largo del tiempo.

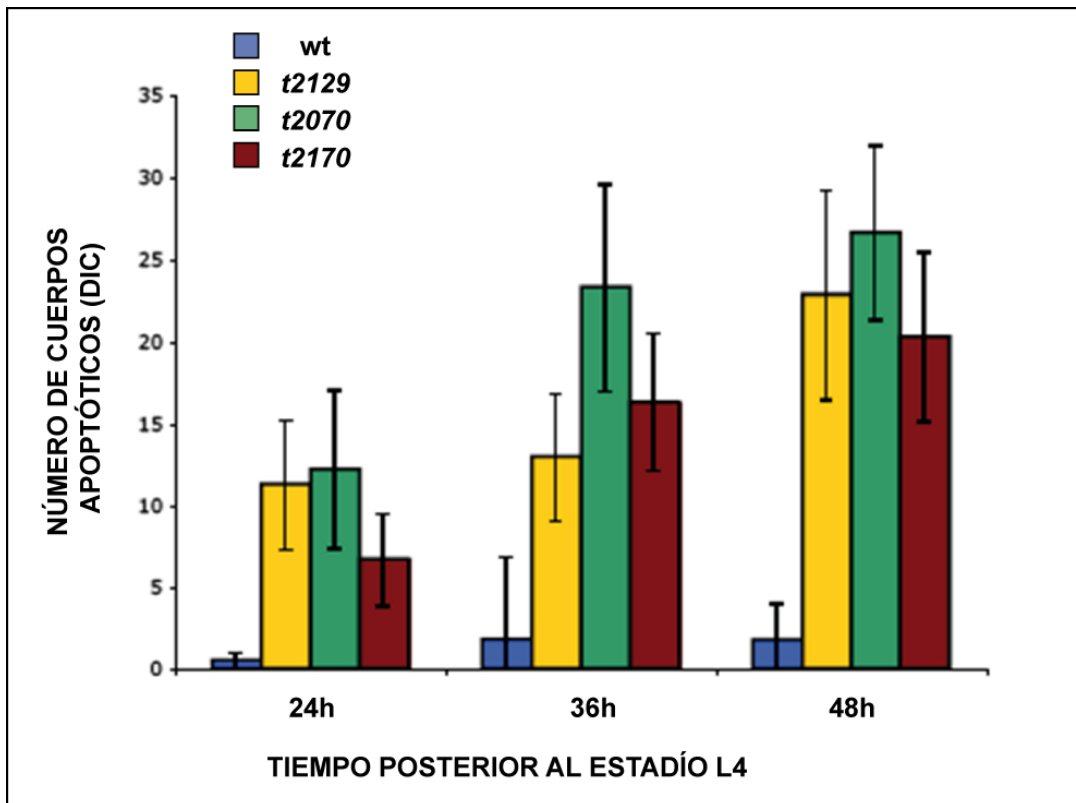


Figura 3.9. Cuantificación de los cuerpos apoptóticos observados en la gónada de los hermafroditas adultos mediante Nomarski. Representación gráfica de los datos contenidos en la Tabla 3.2.

2.2.2. Migración de la gónada

Algunos mutantes con defectos en la fagocitosis de cuerpos apoptóticos, como por ejemplo mutantes en los genes *ced-2*, *ced-5* y *ced-10*, presentan una alteración en la migración de las células distales de la gónada, de manera que la estructura de la gónada es anormal (Reddien y Horvitz, 2000). Sin embargo, de la observación de la gónada en el caso de los mutantes *t2129*, *t2070* y *t2170*, se deduce que la migración de la gónada parece normal, ya que las gónadas de los mutantes tienen la típica estructura en forma de U de un nematodo silvestre (Figura 3.10).

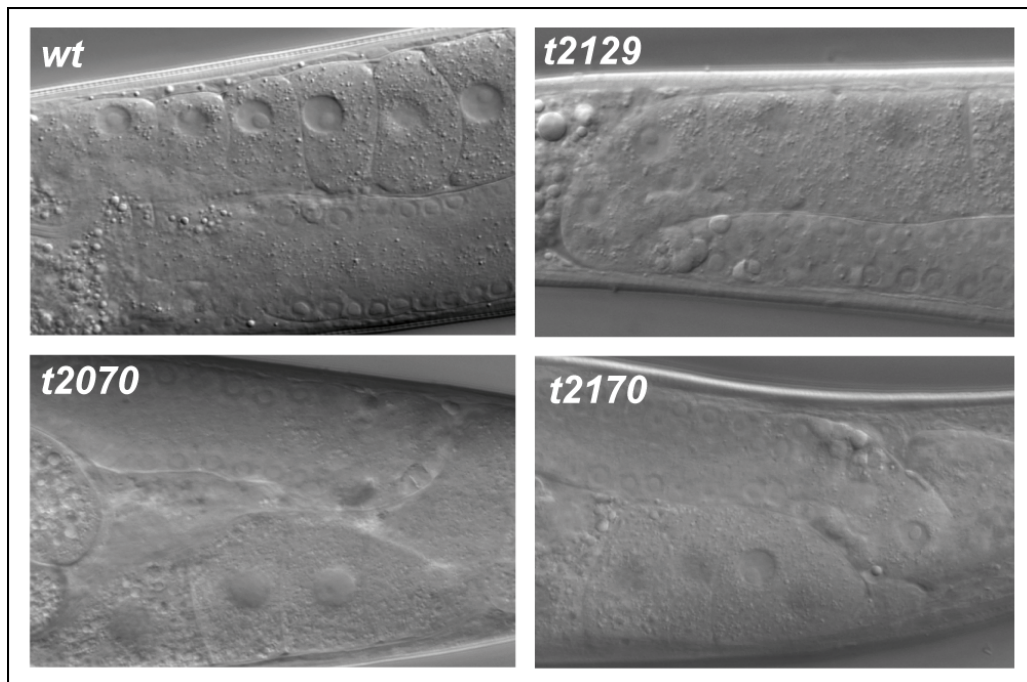


Figura 3.10. Los mutantes *t2129*, *t2070* y *t2170* no presentan defectos en la migración de la gónada.

2.2.3. Tinción con naranja de acridina

El naranja de acridina se ha utilizado para teñir específicamente células apoptóticas en animales vivos, tanto en *C. elegans* como en *Drosophila*, visualizando los cuerpos apoptóticos teñidos de verde fluorescente en un microscopio Nomarski equipado con lámpara de luz UV (Gumienny et al., 1999). Esta tinción marca selectivamente aquellas células apoptóticas que han sido internalizadas dentro de orgánulos acidificados, de manera que mutantes que afectan a los genes de la ruta de fagocitosis de cuerpos apoptóticos (*ced-1*, *dyn-1*, *vps-34*) acumulan cuerpos apoptóticos en la gónada del hermafrodita adulto, pero éstos no se tiñen con la naranja de acridina, mientras que cuando se ve afectada la ruta de degradación de cuerpos apoptóticos, por ejemplo al inactivar el gen *rab-7* mediante RNAi, los cuerpos apoptóticos de la gónada se tiñen positivamente con el naranja de acridina (Kinchen et al., 2008).

Resultados

La tinción con naranja de acridina de los mutantes *t2129*, *t2070* y *t2170* fue positiva, indicando que el defecto genético en estos mutantes se encuentra en la ruta de degradación de cuerpos apoptóticos en vez de en la fagocitosis de los mismos. En la Figura 3.11 se puede apreciar cómo los cuerpos apoptóticos presentes en la gónada del mutante homocigótico para *t2129* se tiñen con naranja de acridina, observándose su fluorescencia mediante microscopía Nomarski equipada con luz ultravioleta.

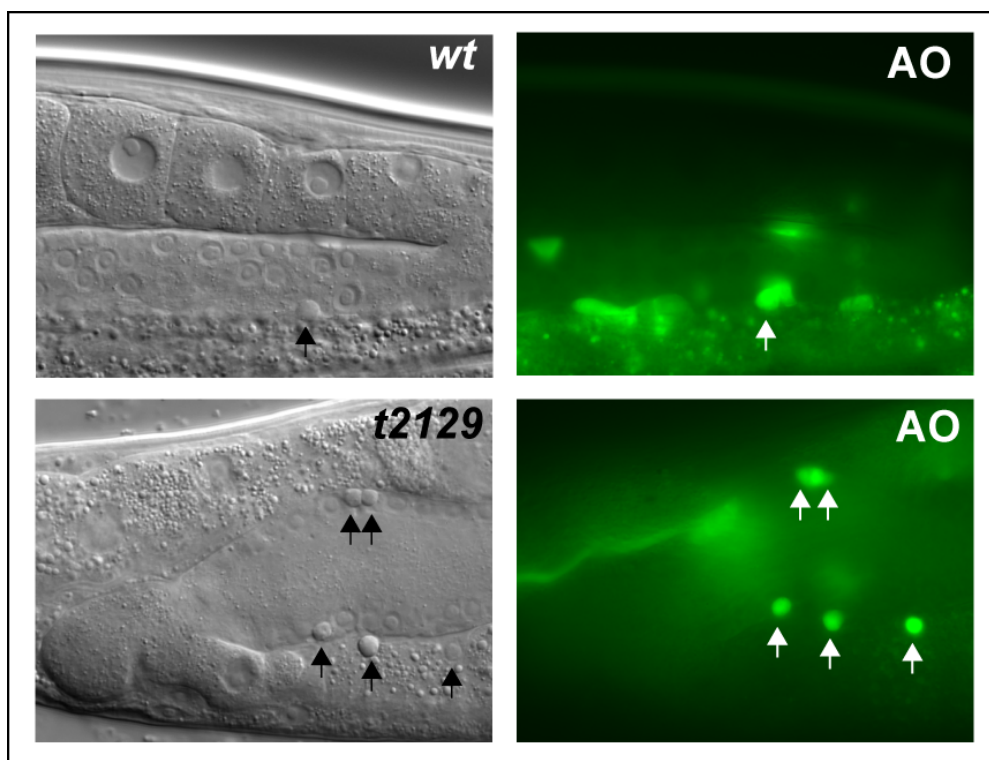


Figura 3.11. La tinción con naranja de acridina es positiva en los mutantes *t2129*, *t2070* y *t2170*. Los cuerpos apoptóticos de la línea germinal se tiñen positivamente en los mutantes, indicando que el defecto no está en la fagocitosis de los cuerpos apoptóticos, sino en su degradación.

2.2.4. Microscopía electrónica del hermafrodita adulto

La microscopía electrónica de transmisión (TEM) realizada en secciones de la gónada del hermafrodita adulto permite visualizar si un cuerpo apoptótico de la línea germinal se encuentra internalizado dentro de la célula de la vaina o

no (Gumienny et al., 1999). En la Figura 3.12 se observa una imagen de microscopía TEM de una sección del hermafrodita adulto a la altura de la gónada. Esta técnica es muy útil para determinar si un mutante tiene un defecto en la fagocitosis de los cuerpos apoptóticos, y en ese caso la célula de la vaina no tendría internalizado al cuerpo apoptótico, o bien un defecto en la degradación de los cuerpos apoptóticos, con lo cual éstos se hallarían internalizados dentro de la célula de la vaina. En un mutante *rab-7 (ok511)*, mediante la microscopía electrónica de transmisión, se puede observar cómo los cuerpos apoptóticos que se acumulan en la gónada están internalizados en la célula de la vaina, indicando que el defecto se encuentra en la degradación de los cuerpos apoptóticos y no en la fagocitosis de los mismos (Yu et al., 2008).

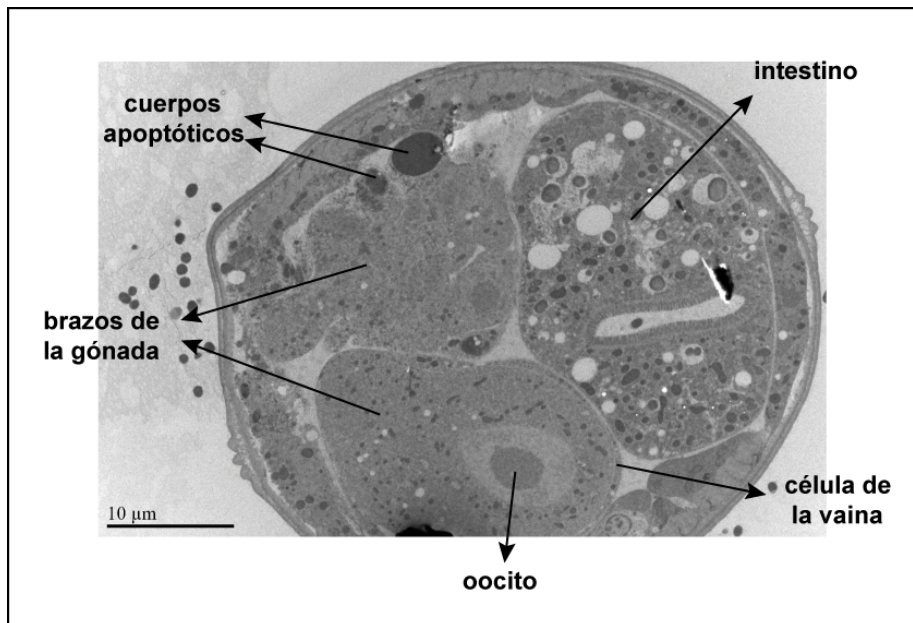


Figura 3.12. Sección de la gónada de un hermafrodita adulto mediante microscopía electrónica de transmisión.

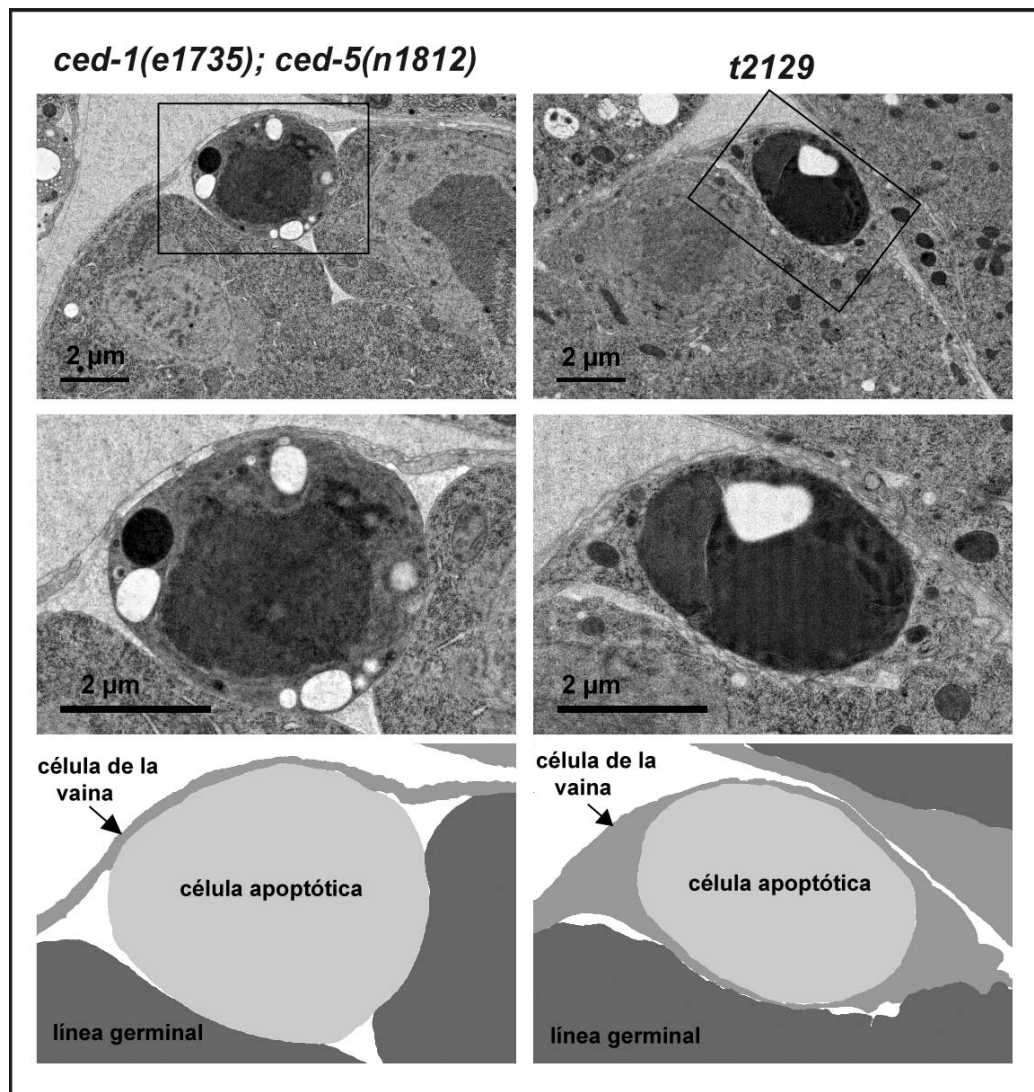


Figura 3.13. Microscopía electrónica de transmisión de la gónada del hermafrodita adulto. El control *ced-1(e1735); ced-5(n1812)*, es un doble mutante que afecta a ambas rutas de fagocitosis de los cuerpos apoptóticos y por tanto, éstos se acumulan en la gónada del hermafrodita adulto sin ser internalizados por la célula de la vaina. En cambio, en el mutante homocigótico *t2129* se aprecia cómo los cuerpos apoptóticos de la gónada sí que están internalizados dentro de la célula de la vaina.

La microscopía electrónica de transmisión fue realizada en colaboración con el equipo técnico del Centro de Microscopía y Análisis de Imagen de la Universidad de Zürich. Al realizar la microscopía electrónica de transmisión del mutante homocigótico *t2129* se pudo observar que varios cuerpos apoptóticos

de la línea germinal se hallaban envueltos por la célula de la vaina, y por tanto, el defecto del mutante se localizaba en la degradación del cuerpo apoptótico, mientras que la fagocitosis del mismo se desarrollaba correctamente. A pesar de no poder realizar microscopía electrónica del resto de los mutantes (*t2070* y *t2170*) por dificultades técnicas, dado que los tres mutantes afectan al mismo gen, por extensión, se supone que en los otros dos mutantes, el fenotipo será similar al del mutante *t2129*. El control utilizado para este experimento fue realizado por Johann Almendinger, del Instituto de Biología Molecular de la Universidad de Zürich, y se trata de un doble mutante *ced-1 (e1735); ced-5 (n1812)*, en el cual no existe fagocitosis de los cuerpos apoptóticos y éstos no son internalizados por la célula fagocitaria de la gónada. En la Figura 3.13 (página anterior) se compara mediante microscopía electrónica la fagocitosis de los cuerpos apoptóticos que se produce en el mutante *t2129*, con el doble mutante del control.

3. Mapeo del gen afectado en los mutantes *t2129*, *t2070* y *t2170*

3.1. Complementación con deleciones

Tras comprobar que los tres mutantes *t2129*, *t2070* y *t2170*, obtenidos en el escrutinio inicial, no complementaban entre sí y por tanto correspondían a tres alelos del mismo gen, se observó que las mutaciones estaban ligadas al marcador *dpy-11(e224)*, presente en la región balanceada del cromosoma V. Para poder clonar el gen afectado en dichos mutantes, inicialmente se realizó la complementación de estos mutantes con varias deleciones presentes en la región balanceada por nT1 en el cromosoma V (Figura 3.14).

Resultados

En concreto se utilizaron las siguientes deleciones:

- **sDf28** (V: -19.32, -5.97)
- **sDf27** (V: -14.15, -4.17)
- **nDf32** (V: -6.22, 0.49)
- **sDf35** (V: 0.93, 2.71)
- **ctDf1** (V: 3.41, 4.26)
- **arDf1** (V: 3.64, 5.16)
- **nDf42** (V: 3.50, 6.73)
- **itDf2** (V: 5.82, 6.67)
- **yDf8** (V: 6.16, 10.32)

Todas las deleciones probadas consiguieron complementar a los mutantes y rescatar la letalidad embrionaria de los mismos al aportar la copia silvestre del gen, excepto en el caso de la deleción nDf42. Esta deleción, contenida en la cepa MT5813, debe carecer del gen afectado en los mutantes ya que no consiguió rescatar la letalidad embrionaria de los mismos. En conclusión, las mutaciones *t2129*, *t2070* y *t2170*, debían hallarse en el intervalo genético V: (5.16, 5.82) del cromosoma V, ya que es el único intervalo de la deleción nDf42 que no coincide con el resto de las deleciones probadas. Este intervalo abarca aproximadamente unas 600 Kb.

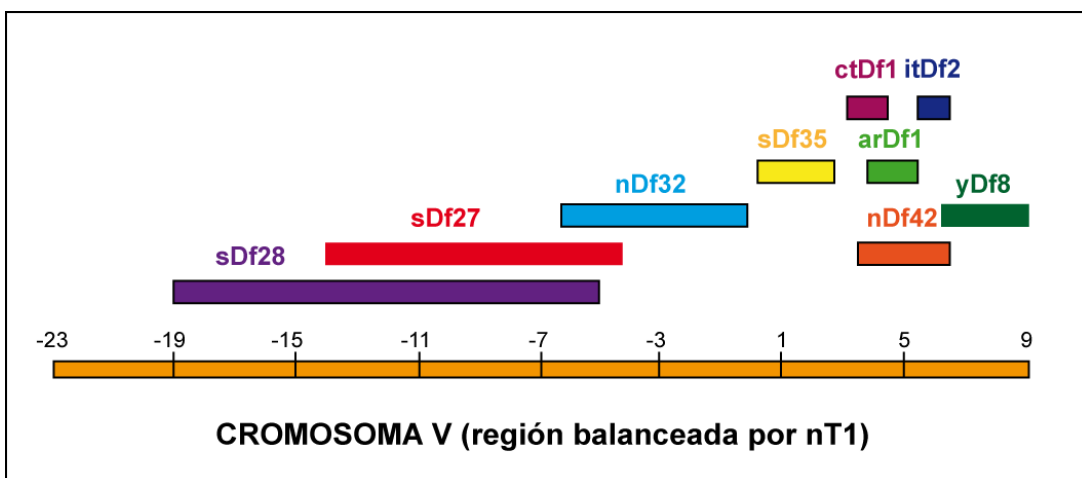


Figura 3.14. Deleciones utilizadas presentes en la región balanceada por nT1 en el cromosoma V. De las deleciones probadas en la complementación con las mutaciones, la única que no consiguió complementarlas fue la deleción nDf42.

3.2. Mapeo del gen mutado utilizando snip-SNP

3.2.1. Análisis mediante snip-SNP

La cepa silvestre de *C. elegans* utilizada comúnmente en el laboratorio se denomina N2 Bristol, y se diferencia en determinados polimorfismos que afectan a un único nucleótido (SNPs) de una cepa estrechamente relacionada, la cepa Hawaii CB4856. Algunos de estos polimorfismos de un único nucleótido afectan a la diana de una enzima de restricción, de forma que la digestión con esa enzima de restricción en la misma región genética, dará lugar a diferentes productos de digestión según la cepa de la cual se trate. Estos polimorfismos que afectan a un sitio de restricción se denominan snip-SNPs (Wicks et al., 2001). En *C. elegans* se utiliza la técnica del mapeo mediante snip-SNPs para clonar de forma más sencilla genes afectados en mutantes, acotando el intervalo genético en el cual se encuentra el gen que se quiere clonar. La técnica del mapeo mediante polimorfismos de un único nucleótido (SNP) fue utilizada por primera vez en *C. elegans* en 2001 (Wicks et al., 2001).

Normalmente, el mapeo consta de dos fases: en la primera se realiza un mapeo general usando diversos snip-SNPs, para comprobar en qué cromosoma se encuentra el gen mutado; en la segunda, se hace un mapeo más detallado que trata de acotar un intervalo genético definido de ese cromosoma elegido, en el cual se encontrará el gen afectado en el mutante (Davis et al., 2005).

En el caso de los mutantes *t2129*, *t2070* y *t2170*, la primera parte del mapeo no fue necesaria realizarla, puesto que ya se había comprobado que las mutaciones se encontraban en el cromosoma V, ya que su segregación estaba ligada al marcador *dpy-11* (*e224*). En cambio, se realizó la segunda parte del mapeo para poder acotar un intervalo genético más reducido, en el cuál se hallaría el gen afectado en los mutantes.

El primer paso previo al mapeo consistió en la construcción de una cepa de tres factores en un fondo genético N2 Bristol, en la cual la mutación se

Resultados

hallaba flanqueada por dos marcadores genéticos que proporcionasen un fenotipo visible (Figura 3.15). En este caso, se eligieron los marcadores *dpy-11* (*e224*) (V:0.00) y *unc-76* (*e911*) (V:7.31), los cuales proporcionan un fenotipo que consiste en animales más gruesos y pequeños que el silvestre, y animales con movimiento incoordinado, respectivamente.

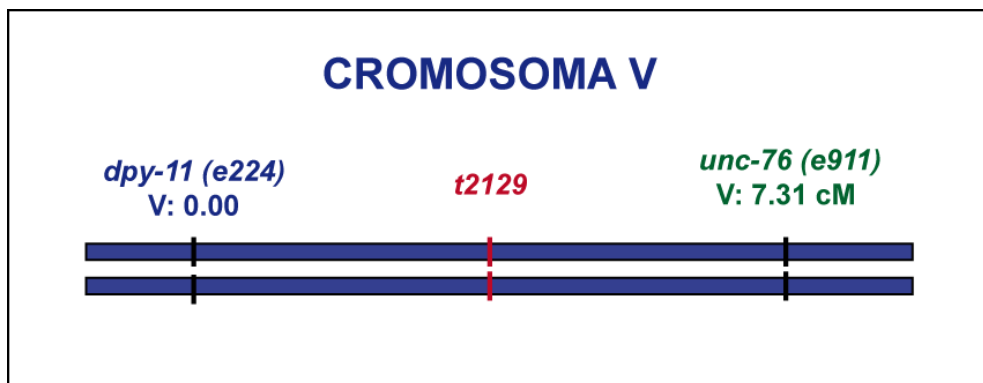


Figura 3.15. Cepa de tres factores utilizada para realizar el mapeo del gen mutado. Se construyó una cepa de tres factores en la cuál la mutación *t2129* se hallaba flanqueada por dos marcadores genéticos diferentes: *dpy-11* (*e224*) y *unc-76* (*e911*), que proporcionaban fenotipos visibles que permitían determinar su presencia en la progenie.

Esta cepa de tres factores fue cruzada con la cepa Hawaii CB4856, para poder tener en heterocigosis tanto el fondo genético de N2 Bristol, como el de la cepa de Hawaii, así como la mutación *t2129* (Figura 3.16). Únicamente se construyó la cepa de tres factores utilizando el mutante *t2129*, ya que el intervalo acotado tras el mapeo utilizando snip-SNPs para dicha mutación sería equivalente para las mutaciones *t2070* y *t2170*, al tratarse de tres alelos diferentes del mismo gen.

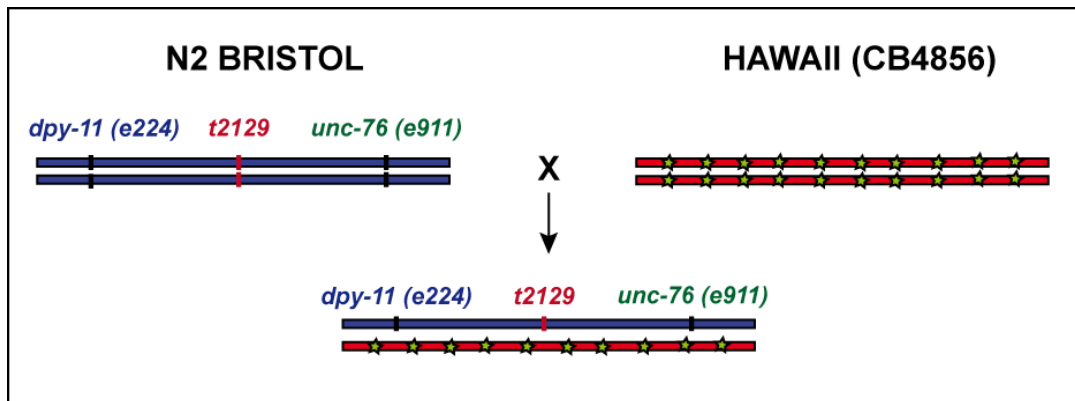


Figura 3.16. Cruce entre la cepa de tres factores y la cepa de Hawaii CB4856. Se realizó el cruce de ambas cepas consiguiendo tener en heterocigosis ambos fondos genéticos (N2 Bristol y Hawaii), así como los dos marcadores genéticos y la mutación *t2129*.

La progenie de este animal heterocigótico proporcionó animales homocigóticos tanto para el marcador *dpy-11 (e224)*, como para el marcador *unc-76 (e911)*. Algunos de éstos habían sufrido recombinación, de forma que eran homocigóticos para uno de los marcadores, pero heterocigóticos para el otro marcador (Figura 3.17). En este caso, se seleccionaron aquellos con el marcador *dpy-11 (e224)* en homocigosis, pero con la mutación *t2129* y el marcador *unc-76 (e911)* en heterocigosis.

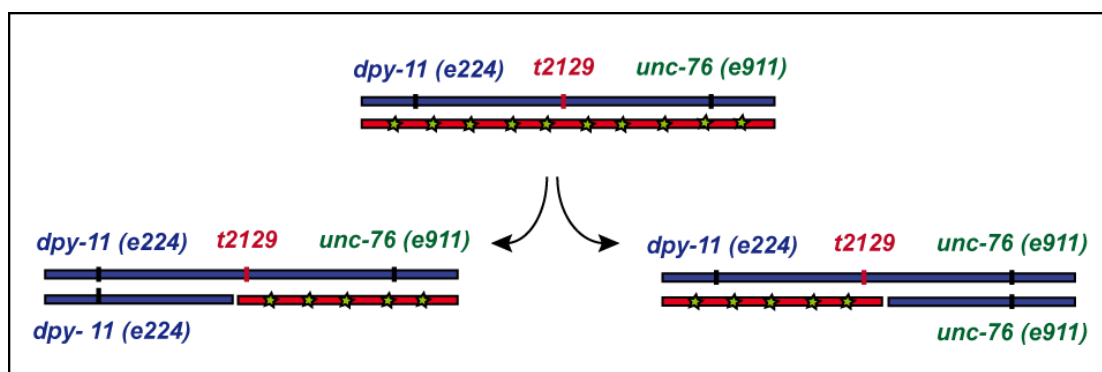


Figura 3.17. Progenie recombinante de la cepa en heterocigosis. La cepa con ambos fondos genéticos en heterocigosis produjo varios recombinantes, en los cuáles uno de los marcadores genéticos se encontraba en homocigosis, mientras que el otro marcador genético se encontraba en heterocigosis, debido a la recombinación.

Resultados

De la progenie de los animales recombinantes con el marcador *dpy-11* (*e224*) en homocigosis y *unc-76* (*e911*) en heterocigosis, se seleccionaron aquellos *dpy-11* (*e224*) homocigóticos, pero carentes del marcador *unc-76* (*e911*) por haber sufrido recombinación con la cepa Hawaii. Estos animales podían haber eliminado en la recombinación la mutación *t2129* o bien la tenían en heterocigosis y por tanto producían progenie viable; o sin embargo, poseían la mutación *t2129* en homocigosis, y con lo cuál la progenie de estos animales no era viable (Figura 3.18). Se separaron por una parte aquellos con la mutación *t2129* en homocigosis, y por otra parte, los animales que producían progenie viable, y se procedió al análisis de snip-SNP con los nematodos de ambos grupos.

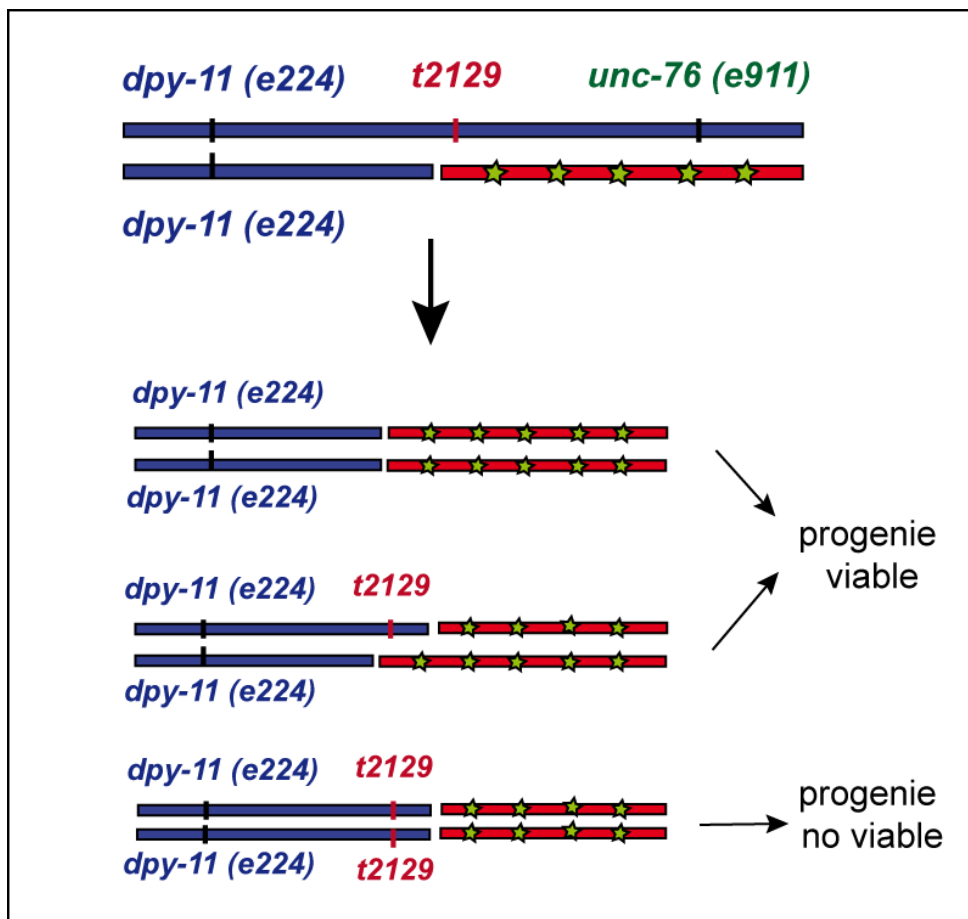


Figura 3.18. Selección de animales recombinantes que mantienen el marcador *dpy-11* (*e224*) en homocigosis. La progenie recombinante puede haber perdido la mutación *t2129* o mantenerla en heterocigosis, y producir progenie viable. O por el contrario, puede mantener la mutación *t2129* en homocigosis y no producir progenie viable.

Para realizar el análisis de snip-SNP, inicialmente se extrajo DNA de cada nematodo seleccionado anteriormente (*t2129* homocigótico o *t2129* heterocigótico). Se eligieron cuatro snip-SNP diferentes en el intervalo deseado: (V: 5.1, 5.8). Cada snip-SNP puede ser amplificado por PCR con una pareja de oligos y según tenga un fondo genético N2 Bristol o Hawaii, tendrá una modificación de un sitio de restricción, de forma que se generarán bandas distintas al digerir el producto de PCR con el enzima de restricción adecuado.

En la Tabla 3.3 se recogen las características que poseen los cuatro snip-SNP seleccionados, indicando su localización genética, la pareja de oligos utilizados para su amplificación por PCR, así como el enzima de restricción utilizado para diferenciar los productos de digestión procedentes del fondo genético N2 Bristol de los procedentes del fondo genético de Hawaii.

| snip-SNP | Localización genética | Clon | Oligos para amplificación por PCR | Enzima de restricción | Productos de digestión N2 Bristol | Productos de digestión Hawaii |
|----------|-----------------------|---------|---|-----------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| 1° | V: 5.115 | pKP5069 | ATAAACAGGTTCTCTCCTCCC CTATCCACCTCTAAACGGTCTC | ApoI | [737] | [426, 311] |
| 2° | V:5.352 | pkP5123 | AACGCAATGTTTCGAAACGC TACGCGAGCATCACAACCTG | NspV | [192,29,12] | [221,12] |
| 3° | V:5.590 | pkP5124 | ATTGCAATTGGCTTTCTTGG CGGGATCTGTTTGGATTTATAG | DraI | [303, 59] | [231, 72, 59] |
| 4° | V:5.833 | pkP5125 | TCGACTTTTGAAGTACTGACC AGGATTTTGTAGCAACCTAGC | DraI | [480, 57] | [297, 183, 57] |

Tabla 3.3. Características de los snip-SNP seleccionados para realizar el mapeo genético de la mutación *t2129*.

Resultados

En la Figura 3.19 se ilustra cómo los productos de digestión varían, siendo una banda única en el caso de que el fondo genético del snip-SNP sea N2 Bristol, o dos bandas de menor tamaño si el fondo genético es la cepa de Hawaii. Si estuviesen ambos fondos genéticos en heterocigosis, tras la digestión enzimática se observarían las tres bandas, es decir, la suma de los dos productos de digestión.

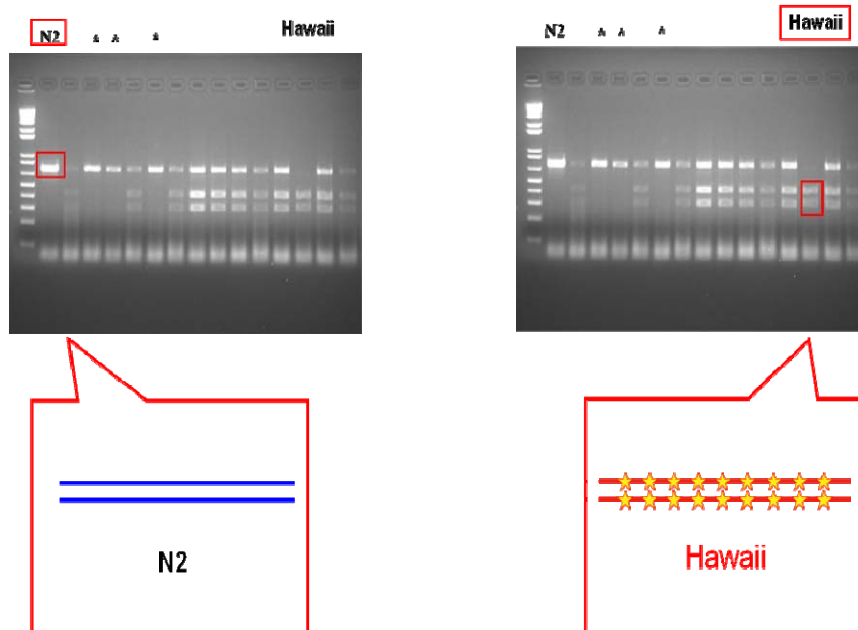


Figura 3.19. Productos de digestión obtenidos dependiendo del fondo genético de la cepa.

El DNA extraído de cada animal se amplificó por PCR usando los oligos correspondientes a cada snip-SNP elegido y después se digirió con la enzima de restricción adecuada, visualizando los productos de digestión en un gel de agarosa de electroforesis. Para el caso de los animales con la mutación *t2129* en heterocigosis, se observó únicamente la banda del producto de digestión de la cepa N2 Bristol, si la recombinación con la cepa Hawaii se había producido entre el snip-SNP seleccionado y la mutación *t2129* (Figura 3.20).

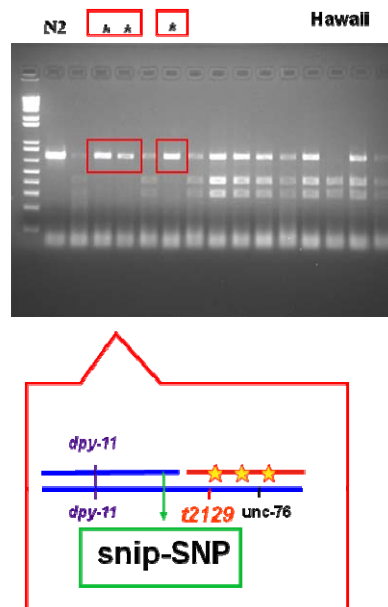


Figura 3.20. Productos de digestión obtenidos cuando la mutación *t2129* se halla en heterocigosis en un fondo genético N2 Bristol. Si la recombinación con la cepa Hawaii se había producido entre el snip-SNP seleccionado y la mutación *t2129*, se obtenía únicamente el producto de digestión del fondo genético N2 Bristol.

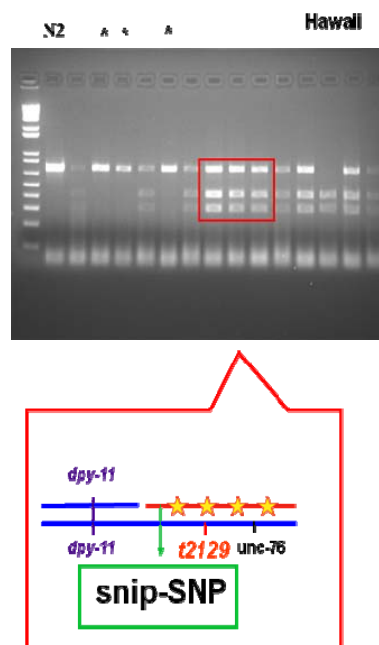


Figura 3.21. Productos de digestión obtenidos cuando la mutación *t2129* se encuentra en heterocigosis, si existen ambos fondos genéticos. Si la recombinación con la cepa de Hawaii se había producido antes del snip-SNP, se obtendrían ambos productos de digestión, el procedente del fondo genético N2 Bristol y el procedente del fondo genético de Hawaii.

Resultados

En cambio, se observaron ambos productos de digestión (N2 Bristol y Hawaii) si la recombinación se había producido antes del snip-SNP y por tanto el snip-SNP tenían ambos fondos genéticos en heterocigosis (Figura 3.21, página anterior). Cuando la mutación *t2129* se encuentra en homocigosis, el mapeo con snip-SNP se realizó en el sentido contrario, empezando por la derecha de la mutación *t2129*. De esta forma, si existía recombinación entre la mutación *t2129* y el snip-SNP, se observaban ambos productos de digestión (fondo N2 Bristol y Hawaii), en cambio si la recombinación había surgido anterior al snip-SNP, sólo se observaba la banda correspondiente al fondo genético N2 Bristol (Figura 3.22). Una vez analizados todos los productos de digestión se contó el número de recombinantes que hay entre la mutación *t2129* y los distintos snip-SNPs que se habían elegido. Según la frecuencia de recombinación existente entre la mutación y cada uno de los snip-SNPs se puede determinar aproximadamente en qué región genética se encuentra la mutación.

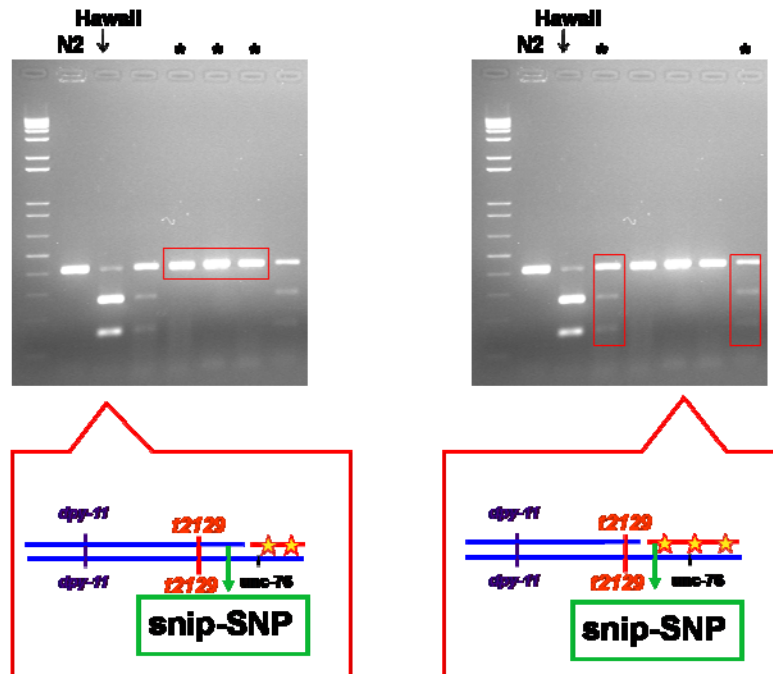


Figura 3.22. Productos de digestión obtenidos cuando la mutación *t2129* se encuentra en homocigosis. Si la recombinación con la cepa de Hawaii se produjo posteriormente al snip-SNP, únicamente se obtendrán los productos del fondo genético N2 Bristol. Por el contrario, si la recombinación se produjo antes del snip-SNP, entonces se obtendrán los productos de digestión procedentes de ambos fondos genéticos.

3.2.2. Análisis de heterocigotos para *t2129* con el primer snip-SNP

Primero se comenzó analizando los animales que producían progenie viable, con la mutación *t2129* en heterocigosis. Se analizaron 137 nematodos, de los cuales se extrajo su DNA y se realizó una PCR con la pareja de oligos que amplificaba el primer snip-SNP y una digestión de los productos de PCR con el enzima de restricción Apol. Se encontraron 8 recombinantes en los cuáles la recombinación con la cepa Hawaii se había producido entre el snip-SNP y la mutación *t2129*, y por tanto en la zona del snip-SNP el fondo genético era únicamente N2 Bristol, con lo que se obtenía solamente la banda del producto de digestión correspondiente a ese fondo genético. En la Figura 3.23, aparecen marcados dichos recombinantes con una estrella. Este resultado indica que la mutación *t2129* se encuentra situada a la derecha del primer snip-SNP. En los 129 animales restantes la recombinación estaba situada anteriormente al snip-SNP, con lo cual en la digestión se podían observar los productos de digestión del fondo N2 Bristol, así como del fondo genético Hawaii.

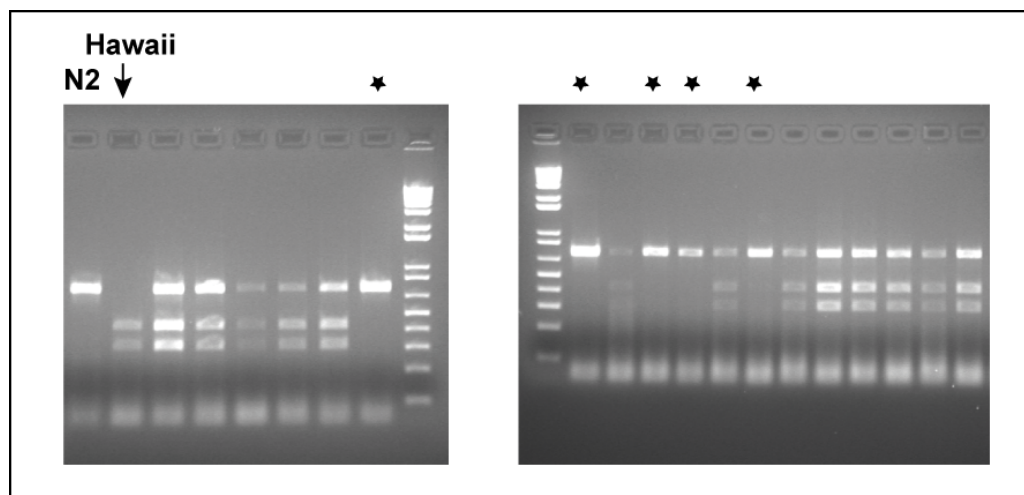


Figura 3.23. Productos de digestión del análisis con el primer snip-SNP de los heterocigotos para la mutación *t2129*. Los recombinantes entre el snip-SNP y la mutación *t2129* están marcados con una estrella y en ellos sólo se observó el producto de digestión del fondo genético N2 Bristol (1 banda en el gel). En cambio en el resto de los recombinantes, la recombinación se produjo antes del primer snip-SNP, y por tanto se obtuvo la suma de los productos de digestión de ambos fondos genéticos, N2 Bristol y Hawaii (3 bandas en el gel)

3.2.3. Análisis de heterocigotos para *t2129* con el segundo snip-SNP

Posteriormente, se realizó el análisis con el segundo snip-SNP de los ocho recombinantes encontrados anteriormente en el análisis con el primer snip-SNP. Se realizó una amplificación por PCR con la pareja de oligos correspondientes al segundo snip-SNP y una digestión de los productos de PCR con la enzima de restricción NspV. Se encontraron cuatro recombinantes en los cuáles la recombinación se había producido entre el segundo snip-SNP y la mutación *t2129*, y en ellos se observaba únicamente el producto de la digestión correspondiente al fondo genético N2 Bristol. Por tanto, la mutación *t2129* está situada a la derecha del primer snip-SNP. En la Figura 3.24 se puede observar un recombinante de este tipo, que está marcado con una estrella. En cambio, en los otros cuatro recombinantes, la recombinación se había producido anteriormente al segundo snip-SNP, y se obtuvieron los productos de digestión tanto del fondo genético N2 Bristol como Hawaii.

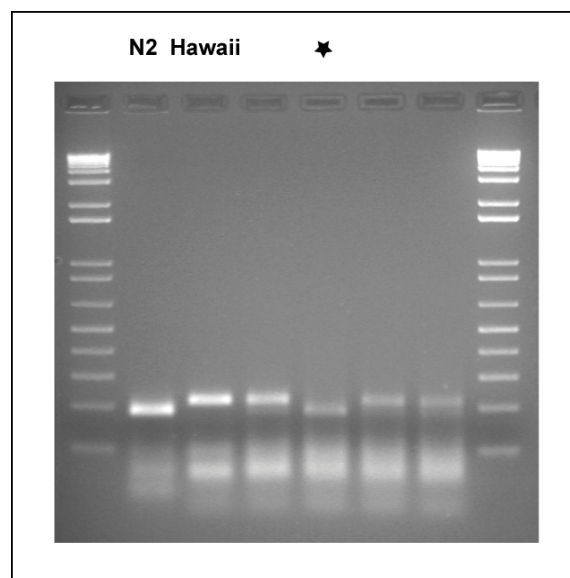


Figura 3.24. Productos de digestión del análisis con el segundo snip-SNP de heterocigotos para *t2129*. En el análisis con el segundo snip-SNP de los recombinantes del primer snip-SNP se encontraron cuatro recombinantes entre el segundo snip-SNP y la mutación *t2129* (en la figura se observa uno de ellos, marcado con una estrella), en los cuales sólo se obtuvo el producto de digestión del fondo genético N2 Bristol. En cambio en el resto de los recombinantes, la recombinación se produjo antes del segundo snip-SNP, y se obtuvo la suma de los productos de digestión de ambos fondos genéticos, N2 Bristol y Hawaii.

3.2.4. Análisis de heterocigotos para *t2129* con el tercer snip-SNP

A continuación se realizó el análisis con el tercer snip-SNP de los cuatro recombinantes obtenidos en el análisis con el segundo snip-SNP. En todos ellos, la recombinación con la cepa Hawaii se había producido antes del tercer snip-SNP, y por tanto se obtuvieron los productos de digestión tanto del fondo genético N2 Bristol como de Hawaii. En la Figura 3.25 se observa cómo en todos los recombinantes se obtuvieron dos bandas de la digestión del tercer snip-SNP. Con este resultado no se puede concluir si la mutación *t2129* se encuentra situada antes o después del tercer snip-SNP, pero debe encontrarse muy próxima a éste, ya que en ningún caso la recombinación se ha producido entre la mutación *t2129* y el tercer snip-SNP.

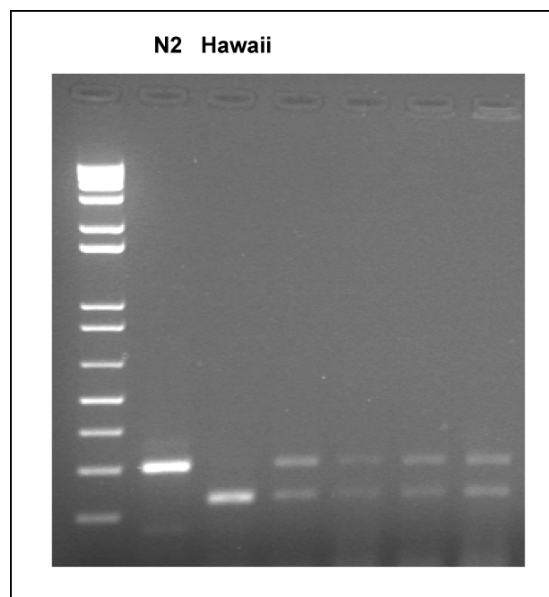


Figura 3.25. Productos de digestión del análisis con el tercer snip-SNP de heterocigotos para *t2129*. Al analizar los cuatro recombinantes obtenidos a la derecha del segundo snip-SNP, se observó que la recombinación con la cepa Hawaii se había producido en todos ellos a la izquierda del tercer snip-SNP.

3.2.5. Análisis de homocigotos para *t2129* con el tercer snip-SNP

De los recombinantes que tenían la mutación *t2129* en homocigosis y por tanto no producían progenie viable, se aislaron y analizaron 42 animales diferentes. Se extrajo el DNA de cada uno de ellos y se realizó una PCR con la pareja de oligos correspondientes al tercer snip-SNP. Posteriormente, se realizó la digestión de los productos de la PCR con el enzima de restricción DraI. En todos los casos, se obtuvo únicamente el producto de digestión correspondiente al fondo genético N2 Bristol (Figura 3.26).

Esto indicaba que la recombinación se había producido a la derecha del tercer snip-SNP y en ningún caso, la recombinación se había producido entre la mutación *t2129* y el tercer snip-SNP. Por tanto, la mutación *t2129* debe encontrarse muy próxima al tercer snip-SNP. Sin embargo, con este dato no fue posible concluir que la mutación esté situada antes del tercer snip-SNP.

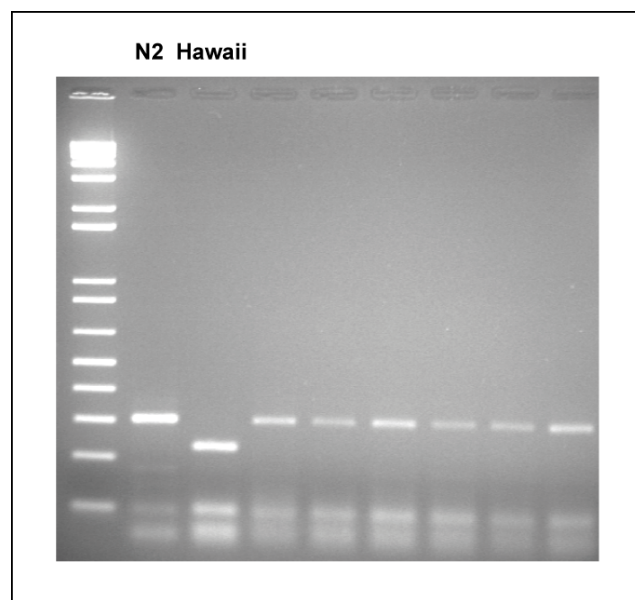


Figura 3.26. Productos de digestión del análisis con el tercer snip-SNP de los homocigotos para *t2129*. En todos los casos la recombinación con la cepa de Hawaii se produjo a la derecha del tercer snip-SNP, ya que solamente se obtuvo el producto de digestión correspondiente al fondo N2 Bristol.

3.2.6. Análisis de homocigotos para *t2129* con el cuarto snip-SNP

En el análisis de los animales homocigotos para *t2129* con el cuarto snip-SNP se encontraron dos de ellos en los cuales la recombinación se había producido entre la mutación *t2129* y el cuarto snip-SNP; ya que al realizar la digestión se obtuvieron los productos de digestión correspondientes a ambos fondos genéticos, N2 Bristol y Hawaii (Figura 3.27). Este hecho implicaba que la mutación *t2129* debe hallarse situada a la izquierda del cuarto snip-SNP.

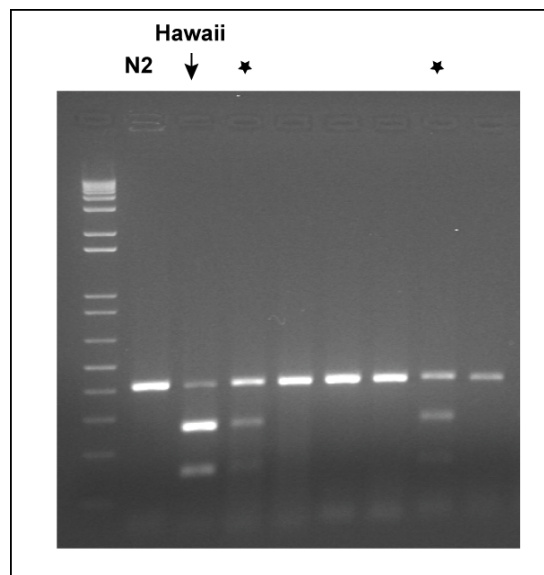


Figura 3.27. Productos de digestión del análisis con el cuarto snip-SNP de los homocigotos para *t2129*. En el análisis con el cuarto snip-SNP de los homocigotos para *t2129* se encontraron dos animales en los cuales la recombinación se había producido entre la mutación *t2129* y el cuarto snip-SNP (en la figura aparecen marcados con una estrella), ya que en la digestión se observaban los productos de digestión correspondientes tanto al fondo genético N2 Bristol como a Hawaii. Por lo tanto, dicha mutación debía estar situada a la izquierda de este snip-SNP.

Los resultados obtenidos en el análisis mediante snip-SNP se recogen en la Tabla 3.4 y en la Figura 3.28.

Resultados

| snip-SNP | No recombinantes en el snip-SNP | Heterocigóticos para <i>t2129</i> (recombinantes) | Homocigóticos para <i>t2129</i> (recombinantes) |
|----------------|---------------------------------|---|---|
| 1° V: 5.115 cM | 129 | 8 | 0 |
| 2° V: 5.352 cM | 4 | 4 | 0 |
| 3° V: 5.590 cM | 4 | 0 | 0 |
| 4° V: 5.833 cM | 40 | 0 | 2 |

Tabla 3.4. Resultados del análisis mediante snip-SNP. De los 137 nematodos heterocigotos para *t2129* analizados, sólo 8 habían sufrido recombinación entre la mutación *t2129* y el primer snip-SNP. En 4 de estos 8 animales, la recombinación se había producido entre la mutación *t2129* y el segundo snip-SNP. Sin embargo, en ninguno de estos 4 recombinantes la recombinación se había producido entre la mutación *t2129* y el tercer snip-SNP. De los 42 animales homocigotos para *t2129* analizados, únicamente en 2 de ellos la recombinación se había producido entre la mutación *t2129* y el cuarto snip-SNP y en ninguno de ellos la recombinación se había producido entre la mutación *t2129* y el tercer snip-SNP.

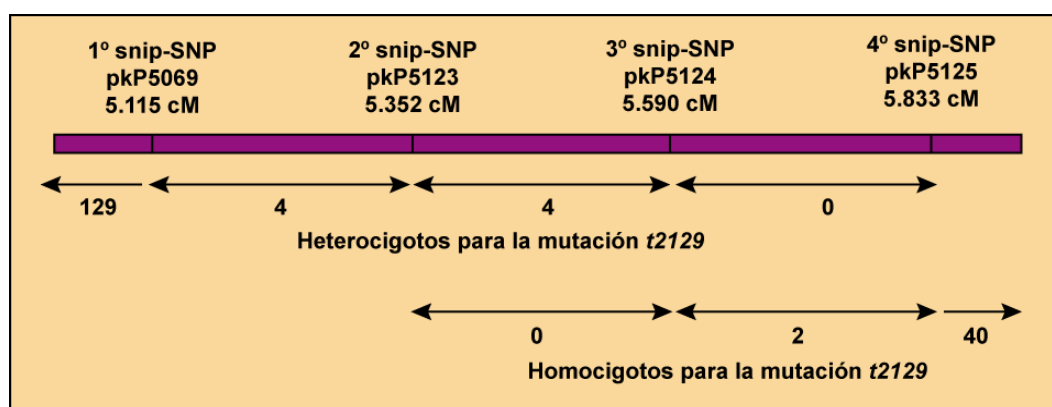


Figura 3.28. Recombinantes encontrados en el análisis mediante snip-SNP.

De esta forma, el análisis mediante snip-SNP permitió concluir que la mutación *t2129*, así como las mutaciones *t2070* y *t2170*, debían estar situadas entre el segundo snip-SNP y el cuarto, es decir, en el intervalo V: (5.35, 5.83). La explicación es que se encontraron recombinantes a la derecha del segundo snip-SNP para los heterocigotos para *t2129*, y por lo tanto, la mutación *t2129* debía estar situada a la derecha de este snip-SNP, sin

embargo no se encontraron recombinantes a la derecha del tercer snip-SNP, con lo cual no se puede concluir que la mutación se encuentre a la derecha de éste. Para el caso de los homocigotos para la mutación *t2129*, se encontraron recombinantes a la izquierda del cuarto snip-SNP, y por tanto, la mutación *t2129* debía hallarse situada en una posición anterior a este snip-SNP, pero no se encontraron recombinantes a la izquierda del tercer snip-SNP, con lo que no se puede concluir que la mutación se encuentre a la izquierda de dicho snip-SNP.

3.3. Comprobación de genes letales embrionarios mediante RNA de interferencia

El intervalo acotado por el análisis mediante snip-SNP comprende una región de aproximadamente unas 500 Kb y unos 150 genes. De estos genes, trece de ellos son predichos por la base de datos de *Caenorhabditis elegans* (<http://www.wormbase.org/>) como genes cuyo silenciamiento genera un fenotipo letal embrionario. Estos trece genes son: T10G3.1, T10G3.5 (*eea-1*), T10G3.6 (*gut-2*), C56A3.9, C50B8.2 (*blr-2*), F53F4.10, F53F3.11, F53F4.14, H37A05.1 (*lpin-1*), F58G11.1 (*letm-1*), T01D3.7, F55B12.1 (*ceh-24*) y F09F3.5. En la Figura 3.29 se recogen los genes que según la base de datos han presentado un fenotipo letal embrionario tras su inactivación mediante RNAi.

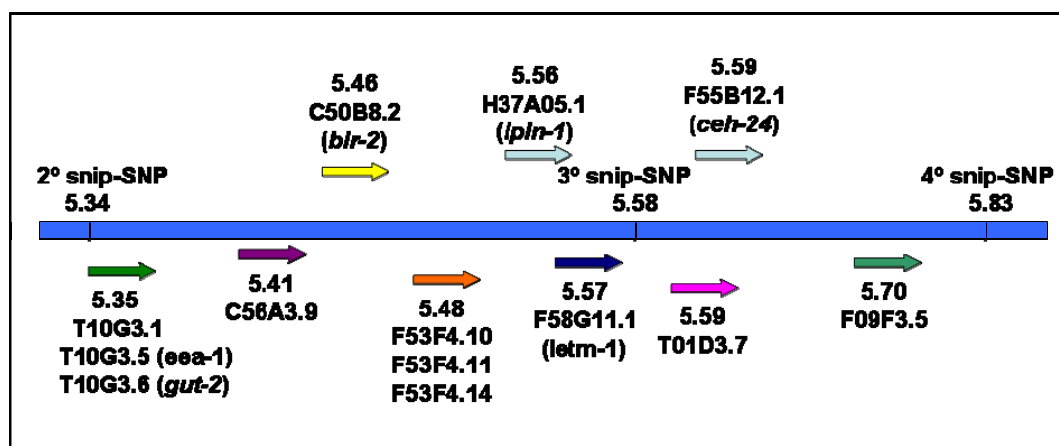


Figura 3.29. Genes con fenotipo letal embrionario tras inactivación por RNAi según la base de datos de *C. elegans* (wormbase).

Resultados

Para comprobar si alguno de estos genes podría tratarse del gen mutado en los mutantes *t2129*, *t2070* y *t2170* se llevó a cabo una inactivación mediante RNAi de los genes para observar si su fenotipo se asemejaba al de los mutantes. Se seleccionaron aquellos genes que estaban presentes en la colección de RNAi disponible y que podían estar relacionados con el defecto en la acumulación de cuerpos apoptóticos observado en los mutantes. Se seleccionaron los siguientes genes: T10G3.5 (*eea-1*), C50B8.2 (*bir-2*), F53F4.10, H37A05.1 (*lpin-1*), F58G11.1 (*letm-1*), F55B12.1 (*ceh-24*). En la Figura 3.30 se observa cómo ninguno de los genes inactivados por RNAi presentó un fenotipo similar al de los mutantes *t2129*, *t2070* y *t2170*.

Podría ser que aunque los mutantes *t2129*, *t2070* y *t2170* tuviesen un fenotipo letal embrionario, al inactivar el gen afectado mediante RNAi no se observe un fenotipo letal embrionario debido a que la inactivación mediante RNAi no sea completa, y por tanto, no esté descrito en la base de datos wormbase como letal embrionario.

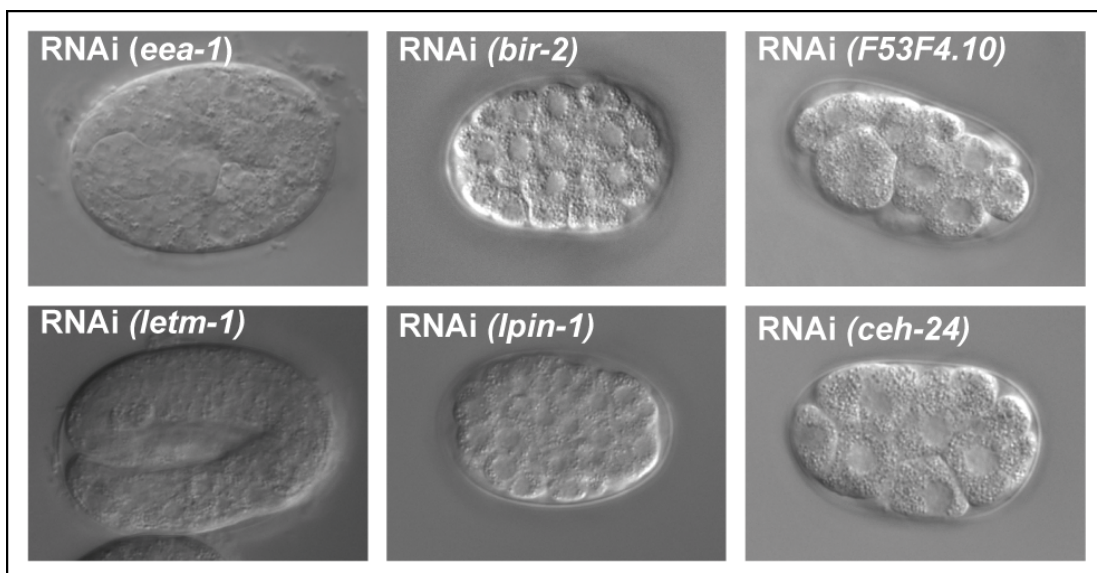


Figura 3.30. Fenotipo observado en los genes inactivados mediante RNA de interferencia (RNAi). Ninguno de los genes inactivados mediante RNAi presenta un fenotipo que se asemeje al de los mutantes *t2129*, *t2070* y *t2170*.

3.4. Inyección de cósmidos del intervalo genético

A continuación, para tratar de mapear el gen mutado, se procedió a inyectar algunos de los cósmidos que contenían los genes que según la base de datos de *C. elegans* habían sido detectados como genes embrionarios letales tras su inactivación mediante RNAi. Los cósmidos inyectados en el mutante *t2129*, con la finalidad de ver si se producía un rescate de la letalidad embrionaria del mutante, fueron los siguientes: H37A05, F53F4, F58G11, T01D3, F55B12, T10G3, C56A3. Los resultados del recuento de la progenie tras la inyección de los cósmidos se recogen en la Tabla 3.5.

| Cósmido inyectado | Nematodos aislados | Progenie (nº nematodos F1) |
|--------------------------------------|--------------------|---------------------------------|
| Control <i>t2129</i> sin inyectar | 25 1 | 0 F1 5 F1 |
| H37A05 (2 líneas) | 21 9 | 0 F1 0-10 F1 |
| F53F4 (2 líneas) | 22 5 | 0 F1 0-10 F1 |
| F58G11 (1 línea) | 13 | Tóxico, no crecen hasta adultos |
| T01D3 (1 línea) | 14 11 | 0 F1 0-10 F1 |
| F55B12 (2 líneas) | 22 6 | 0 F1 0-10 F1 |
| T10G3 (1 línea) | 14 8 | 0 F1 0-10 F1 |
| C56A3 (1 línea) | 11 9 | 0 F1 0-10 F1 |

Tabla 3.5. Cuantificación de la viabilidad observada tras la inyección de los cósmidos al mutante *t2129*. Se realizó un recuento de la progenie observada tras haber inyectado cada cósmido al mutante *t2129*. Se representa por separado, para cada uno de los cósmidos inyectados, los animales aislados que no produjeron progenie viable (0 F1) y los animales aislados que produjeron progenie viable, que en todos los casos fue inferior a 10 nematodos (0-10 F1). La inyección del cósmido F58G11 provocó una toxicidad en la cepa, de forma que los animales aislados no crecieron hasta adultos.

Como se observa en la Tabla 3.5, ninguno de estos cósmidos, al ser inyectados, consiguió rescatar la letalidad embrionaria del mutante *t2129*. Incluso en alguno de los casos, como por ejemplo, al inyectar el cósmido F58G11, se observó toxicidad del cósmido, de manera que los animales inyectados no se desarrollaban hasta adultos, sino que permanecían como larvas y acababan muriéndose.

3.5. Revisión bibliográfica de los genes del intervalo

Debido a los resultados negativos que se obtuvieron tanto en la realización del experimento de RNAi como tras la inyección de algunos de los cósmidos del intervalo, se realizó una revisión de los genes presentes en el intervalo que había sido acotado previamente en el análisis mediante snip-SNP. Con ayuda de los datos presentes en la base de datos wormbase, se realizó una revisión bibliográfica, con el objetivo de encontrar genes relacionados con el mecanismo de degradación de cuerpos apoptóticos, que era el defecto observado en la caracterización fenotípica de los mutantes.

Esta búsqueda bibliográfica permitió encontrar un gen cuyo mutante presentaba un fenotipo similar al de los mutantes *t2129*, *t2070* y *t2170*. Se trataba del mutante *sand-1 (or552)*, el cual es un mutante termosensible, con una letalidad embrionaria del 30-50% a la temperatura permisiva y del 89-99%, a la temperatura restrictiva. Los embriones de este mutante acumulan, al igual que los embriones de los mutantes *t2129*, *t2070* y *t2170*, vesículas que son más numerosos en la célula anterior (célula AB) del embrión en el estadio de 2 células (Poteryaev et al., 2007). En la Figura 3.31 se puede observar la similitud existente entre un embrión del mutante *sand-1(or552)* y un embrión del mutante *t2129*.

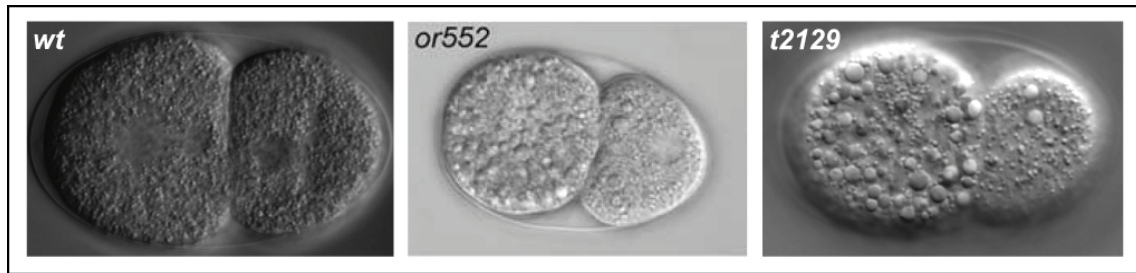


Figura 3.31. Similitud entre los fenotipos de los embriones del mutante *sand-1* (*or552*) y del mutante *t2129*. Los embriones del mutante *sand-1* (*or552*) en el estadio de dos células presentan un fenotipo muy similar al observado en los embriones de los mutantes *t2129*, *t2070* y *t2170* en el mismo estadio, ya que acumulan gran cantidad de vesículas, predominantemente en la célula anterior (AB) del embrión.

La proteína SAND-1 de *C. elegans* es el homólogo de la proteína MON1A Y MON1B en humanos y de la proteína Mon1p en *Saccharomyces cerevisiae*, y se requiere para una correcta asociación de la GTPasa RAB-7 a la membrana y en el tráfico de vesículas entre los endosomas tempranos y tardíos (Poteryaev et al., 2007). En levaduras la proteína Mon1p forma un complejo proteico con la proteína Ccz1p, y regulan la interacción del complejo HOPS con la proteína Rab Ypt7p (homóloga de RAB-7), y la fusión de membranas con la vacuola (Wang C.W. et al., 2003). Mediante un análisis de 2-híbridos se ha demostrado que en *C. elegans* la proteína SAND-1 y el homólogo de Ccz1p forman igualmente un complejo proteico (Poteryaev et al., 2007).

Se descartó que el gen mutado en los mutantes *t2129*, *t2070* y *t2170* fuese *sand-1*, ya que el gen *sand-1* (F41H10.11) se localiza en el cuarto cromosoma (IV: 1.60 cM) de *C. elegans*, y por lo tanto, no se encontraba en el mismo cromosoma que la mutación presente en los mutantes. Sin embargo, el gen *ccz-1* (F58G11.6) de *C. elegans* se localiza en la región genética V: 5.59 cM del quinto cromosoma, por lo tanto, este gen estaba incluido en el intervalo que previamente se había acotado en el análisis mediante snip-SNP.

Dada la similitud fenotípica entre el mutante *sand-1(or552)* y los mutantes *t2129*, *t2070* y *t2170*; se estableció la hipótesis de que el gen mutado podría ser el gen *ccz-1*. Dado que CCZ-1 y SAND-1 forman un complejo proteico, era lógico suponer que los mutantes que afectasen a uno de los dos genes tuviesen un fenotipo similar.

3.6. Experimento de RNAi con el gen candidato

Posteriormente, para corroborar si esta hipótesis era correcta, se realizaron una serie de experimentos. El primer experimento fue inactivar el gen candidato, *ccz-1*, en un nematodo silvestre mediante la técnica de RNA de interferencia (RNAi), para comprobar si el fenotipo observado era similar al de los mutantes *t2129*, *t2070* y *t2170*.

Al realizar el RNAi se obtuvo un fenotipo similar al de los mutantes, aunque más débil que en estos. Como se aprecia en la Figura 3.32, se observó una acumulación de vesículas en los embriones, así como con una ligera acumulación de cuerpos apoptóticos en la gónada de los hermafroditas adultos. A pesar de no ser concluyente, este hecho indicaba que *ccz-1* sí podría tratarse del gen afectado en los mutantes *t2129*, *t2070* y *t2170*. La explicación de que el fenotipo observado fuese más débil podría ser debido a que determinados genes que son más resistentes a la inactivación mediante RNAi, y ésta no es del 100%, si no que puede quedar parte de la proteína silvestre sin inactivar, llevando a cabo parcialmente su función.

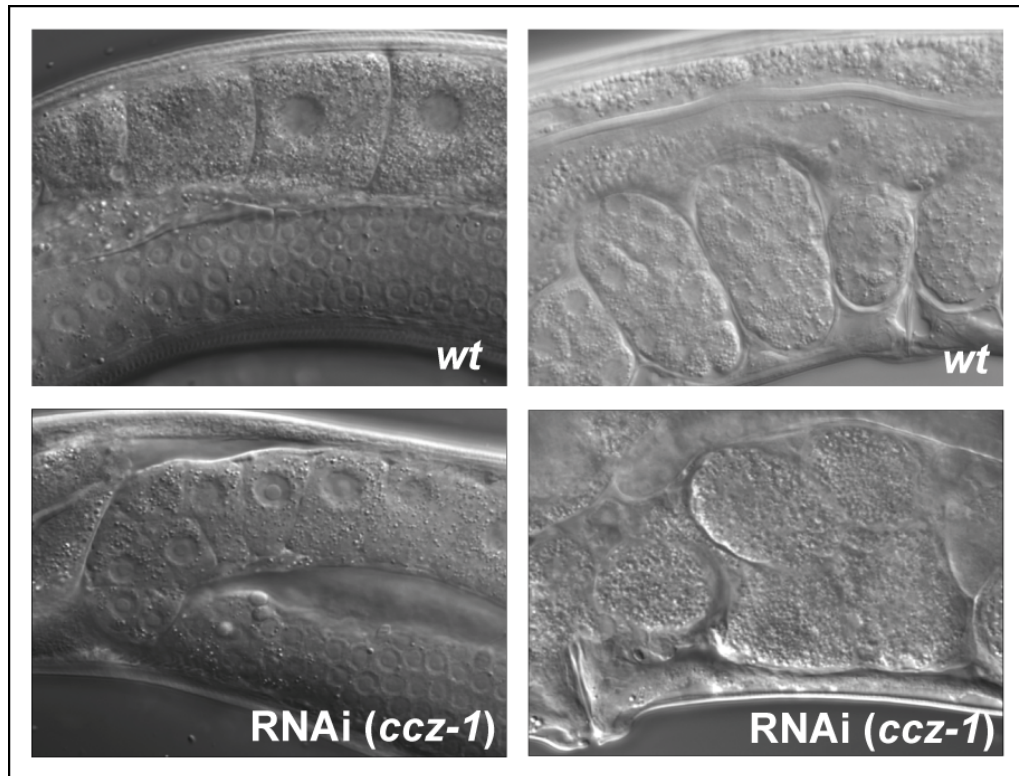


Figura 3.32. Fenotipo observado al realizar la inactivación del gen *ccz-1* mediante RNA de interferencia. Al inactivar mediante RNAi el gen *ccz-1* se produce un fenotipo similar al de los mutantes *t2129*, *t2070* y *t2170* aunque más débil. En comparación con un silvestre, se observa una ligera acumulación de cuerpos apoptóticos en la gónada y pequeños gránulos en los embriones.

3.7. Secuenciación del gen *ccz-1* en los mutantes *t2129*, *t2070* y *t2170*

Posteriormente, se secuenció el gen *ccz-1* en los mutantes homocigóticos *t2129*, *t2070* y *t2170*, para comprobar que efectivamente, las mutaciones de estos mutantes se hallaban situadas en el gen *ccz-1*. Para ello se amplificó por PCR el gen *ccz-1* tanto en el silvestre como en cada uno de los tres mutantes, y el producto de PCR purificado fue secuenciado. El resultado de la secuenciación fue el hallazgo de una mutación puntual de un nucleótido en cada mutante. En el mutante *t2070*, la mutación puntual generada por el etilmetanosulfonato produjo un cambio de una Guanina (G) por una

Resultados

Adenina (A), que afectaba a la primera base del primer intrón del gen F58G11.6 (Figura 3.33 y 3.34). Posteriormente se comprobó que esta mutación provocaba una alteración en el procesamiento (*splicing*) del RNA mensajero, al no eliminar correctamente el primer intrón, generando una proteína no funcional.

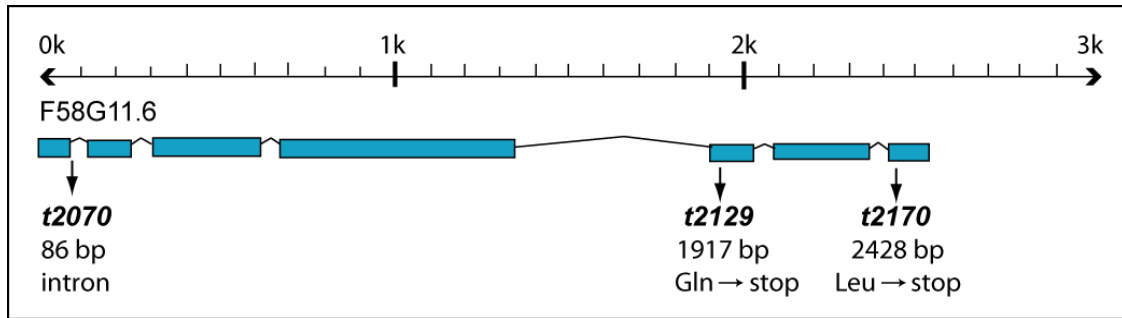


Figura 3.33. Secuenciación de las mutaciones puntuales presentes en los mutantes t2070, t2129 y t2170. La mutagénesis con etilmetanosulfonato generó tres mutantes diferentes que afectaban al mismo gen *ccz-1* (F58G11.6). Cada uno de ellos contenía una mutación puntual en una región diferente del gen *ccz-1*, que provocaba una alteración en la funcionalidad de la proteína.

| | | |
|---------------|---------------------|--|
| | | 86 bp |
| wt | TGGTCAGATT | CATTG g t a a t t g a a t t t a a |
| ccz-1 (t2070) | TGGTCAGATT | CATTG a t a a t t g a a t t t a a |
| | | 1917 bp |
| wt | t t t t c c a g A A | T C A T C T C A A T C A T C T C G C G C |
| ccz-1 (t2129) | t t t t c c a g A A | T C A T C T T A A T C A T C T C G C G C |
| | | 2428 bp |
| wt | TTCTCGCCTC | CTTGTCT T A A T C A T T C C T C C |
| ccz-1 (t2170) | TTCTCGCCTC | CTTGTCT A A A T C A T T C C T C C |

Figura 3.34. Mutaciones puntuales encontradas en los mutantes t2070, t2129 y t2170.

La mutación *t2129* consistía en un cambio de una Citosina (C) por una Timina (T) en el exón quinto del gen F58G11.6, lo cual provocaba que se alterara un aminoácido glutamina en la proteína y se convirtiera en un codón de parada prematuro, alterando la funcionalidad de la proteína. La mutación *t2170* se trataba de una transformación de una Timina (T) en una Adenina (A) en el último exón del gen F58G11.6, y por tanto, el aminoácido leucina presente en esta región de la proteína también era convertido en un codón de parada prematuro (Figuras 3.33, 3.34 y 3.35).

```

MESIANPLYF FSNLSLNPPS CSNVVRFIDV LEFFFVAHPL SGRKEGEEHN
RVMYFHPKGE QLERQTEITG FAEAVVNFTE NFLSTSRREI SERISENEDG
FDFRTVTTQR TEHVYIRTED DQFILGVSIS KQLSLVSDYP LFQPAIRSIL
SDAYKMFRMF FGTFSFIKN VPDDIPKFE RLDDFFSKYI PLLKVHKMPL
LDHLGGVEFL RMSGPLYLNV VSLSELREE FQVIEKIMFL YQDKLLYYQL
SKRDLP SLFH YLTHNLLPTT LAPELEHSGR NASKGRYLRG PTDLTTDAPL
LGDESLSVVH LHS DQGTEFQ EELIGYQMIV YRCLNATVCM FVRNCPANGG
LEIRR DSESS QSSRATPSQN GVVSRLLRN IDQFLETELS QVASKIGDEI
t2129
GDEKFPEAPD FHYIYFNPSS LSMTSSLSTS PKLPVAASGS NSTLKVPLPP
VDVNR LVC DT MSNFVSETEE FGECFVKSSS DWWIVIKKVN SLLVLIIPP
t2170
SNYTSSLADV QSKTATIVRS HFEAIFFS*

```

Figura 3.35. Conversión de aminoácidos de la proteína en codones de parada provocada por las mutaciones *t2129* y *t2170*.

3.8. Complementación con la cepa *ccz-1 (ok2182)*

La cepa VC2009, es el knock out *ccz-1 (ok2182)*, y se encuentra disponible en el Consorcio Internacional de knockout de genes de *Caenorhabditis elegans (International C. elegans Gene Knockout Consortium)*. Contiene una deleción de 1047 pares de bases. Esta cepa apareció disponible después de que se hubiese mapeado el gen afectado en los mutantes *t2129*, *t2070* y *t2170*.

Resultados

Con el objetivo de corroborar si el gen afectado en dichos mutantes era el gen *ccz-1*, se utilizó la cepa VC2009 para realizar un cruce genético con el mutante *t2129*. Se observó que el knock out *ccz-1(ok2182)* no conseguía complementar al mutante, ya que, al no aportar ninguna copia silvestre del gen, no se conseguía rescatar la letalidad embrionaria del mutante.

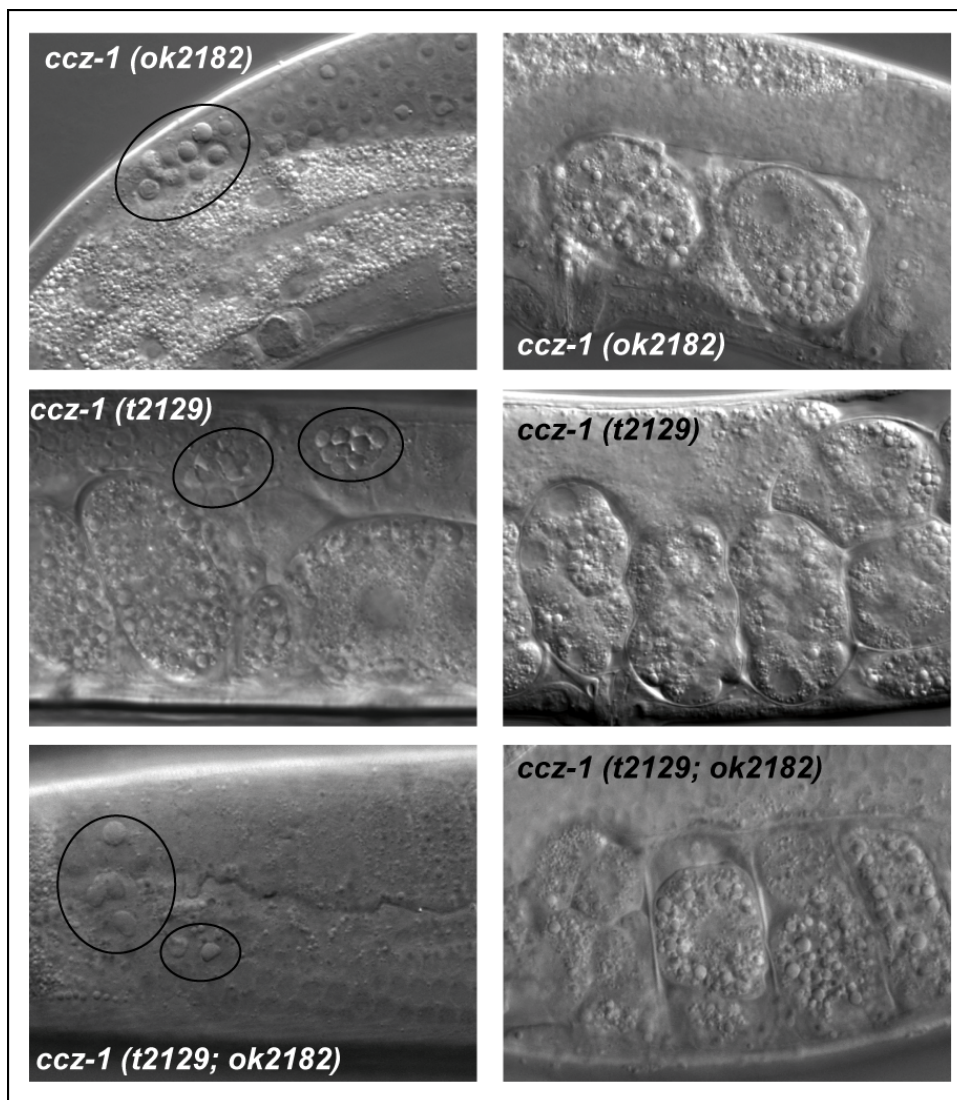


Figura 3.36. Complementación del mutante *t2129* con el knock out *ccz-1 (ok2182)*. La complementación del mutante *t2129* con la cepa VC2009, que contiene una delección en el gen *ccz-1*, no logró rescatar la letalidad embrionaria del mutante. De igual forma, tampoco consiguió rescatar el fenotipo observado en el mutante, seguían acumulándose cuerpos apoptóticos en la gónada del hermafrodita (englobados en elipses en las imágenes de la izquierda de la Figura) y vesículas en los embriones (imágenes de la derecha de la Figura).

En la Figura 3.36 (página anterior) se puede apreciar cómo la complementación del mutante *t2129* con el knock out *ccz-1(ok2182)* tampoco consiguió rescatar el fenotipo del mutante, observándose una acumulación de cuerpos apoptóticos en la gónada del hermafrodita y de vesículas en los embriones similar a la observada en el mutante *t2129* y en la cepa VC2009. Este resultado indicaba que el gen afectado en los mutantes era el gen *ccz-1*.

3.9. Rescate del mutante *t2129* con el gen *ccz-1*

Con el objetivo de confirmar de manera definitiva que la alteración del gen *ccz-1* era la responsable del fenotipo observado en los mutantes *t2129*, *t2070* y *t2170*, se llevó a cabo un rescate de la mutación *t2129* con el gen *ccz-1*. Para conseguirlo, se clonó una copia silvestre de dicho gen en el plásmido pLN180 [Promotor de *ced-1*::gen *ced-12*::YFP::*let 858* 3'UTR], aportado por el Dr. Lukas Neukomm, del Instituto de Biología Molecular de la Universidad de Zürich. En la Figura 3.37 se representa un esquema del plásmido pLN180.

Con una digestión enzimática, se eliminó el gen *ced-12* presente en el plásmido pLN180 y posteriormente, mediante una ligación enzimática, se insertó la copia silvestre del gen *ccz-1* amplificada por PCR. La construcción obtenida se denominó pCN1 (Figura 3.38), y contenía el gen *ccz-1* silvestre fusionado en su extremo C-terminal a la proteína YFP bajo el promotor del gen *ced-1* y con una 3'UTR genérica (*let 858*). La proteína YFP, un derivado de la proteína verde fluorescente GFP, permite la visualización al microscopio de la proteína a la cuál se encuentra fusionada.

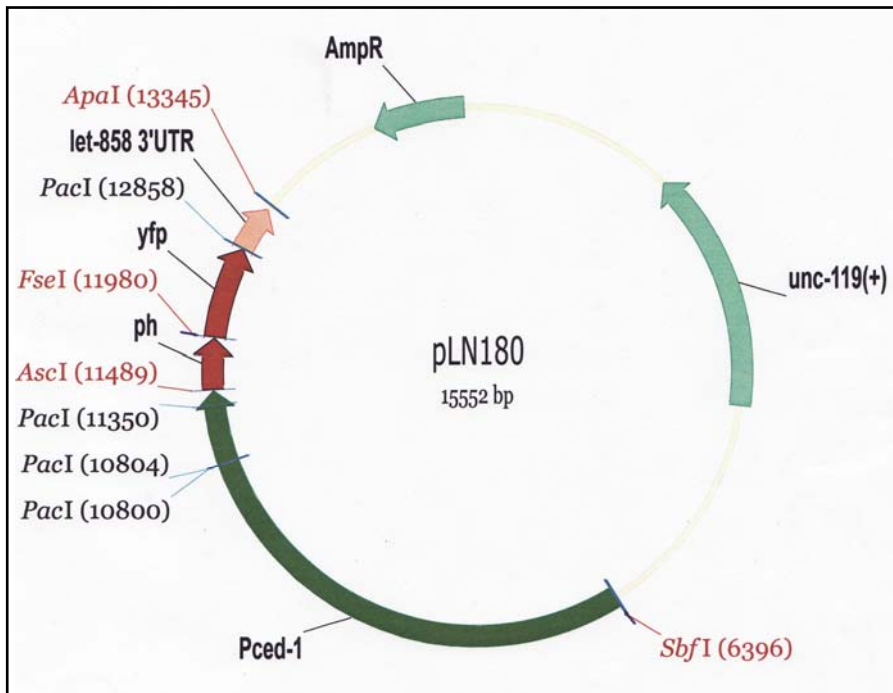


Figura 3.37. Mapa del plásmido pLN180 utilizado en la construcción del plásmido pCN1. El plásmido pLN180 contiene el gen *ced-12* bajo la expresión del promotor del gen *ced-1* y fusionado a la proteína fluorescente YFP y con una región 3'UTR genérica procedente del gen *let-858*. Además contiene sitios de restricción para las enzimas PacI, AscI, FseI y ApaI, un marcador de resistencia a Ampicilina y una copia silvestre del gen *unc-119*, que puede ser utilizado como marcador de selección de los nematodos que contienen el plásmido.

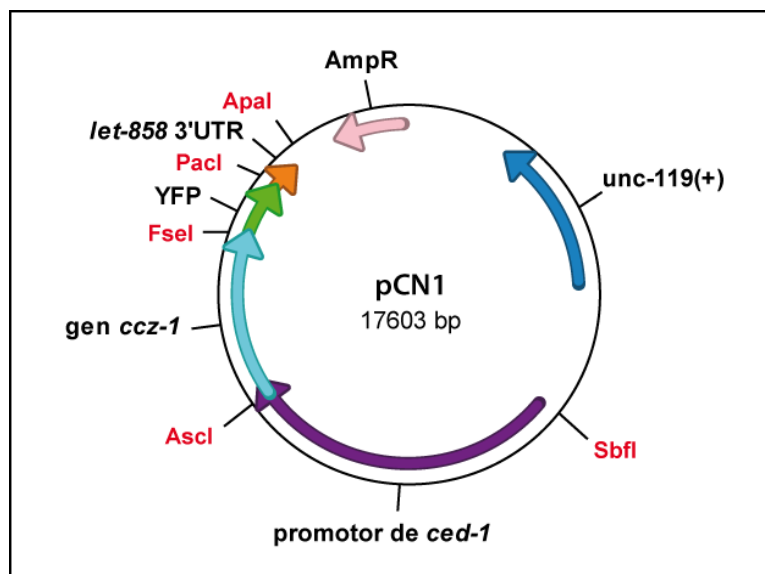


Figura 3.38. Mapa del plásmido pCN1 construido a partir del plásmido pLN180. El plásmido pCN1 contiene una copia silvestre del gen *ccz-1* expresada bajo el promotor del gen *ced-1* y fusionada a la proteína fluorescente YFP.

La proteína CED-1 actúa como receptor en la ruta de fagocitosis de cuerpos apoptóticos y por tanto su expresión se encuentra significativamente elevada en las células que actúan como células fagocitarias. En los hermafroditas adultos, la expresión más elevada de *ced-1* se localiza en las células de la vaina presentes en los brazos de la gónada (Zhou et al., 2001; Yu et al., 2008). Por tanto, en la construcción pCN1, al encontrarse el gen *ccz-1* bajo el promotor de *ced-1*, el gen *ccz-1* será principalmente expresado en las células fagocitarias y la visualización de CCZ-1::YFP, se centrará primordialmente, en la gónada del hermafrodita adulto.

El plásmido pCN1 fue introducido en el mutante *t2129* utilizando un cañón de partículas. Para ello, el plásmido fue precipitado sobre partículas de oro, que fueron impactadas sobre los nematodos mediante una corriente de gas helio, con ayuda de un cañón de partículas. Algunas de estas partículas de oro, junto con el plásmido precipitado en ellas, llegaron hasta la gónada de los mutantes y permitieron que el plásmido formase un *array* extracromosomal que fue segregado a la progenie de estos animales. Como marcador de selección de los animales que contenían el *array* extracromosomal, se empleó el plásmido pPD118.33, con el gen *myo-2* fusionado a GFP, que produce fluorescencia en la región de la faringe del nematodo, como se puede observar en la Figura 3.39. Este plásmido pPD118.33 fue precipitado conjuntamente con el plásmido pCN1 sobre las partículas de oro.

Adicionalmente, se realizó una construcción nueva denominada pCN2, en la cual se sustituía el promotor de *ced-1* por el promotor del propio gen *ccz-1*, manteniendo el gen *ccz-1* fusionado a la proteína YFP y la 3'UTR genérica presente en el plásmido pCN1. En la Figura 3.40 se muestra un esquema del plásmido pCN2.



Figura 3.39. Expresión de la GFP expresada bajo el promotor del gen *myo-2* observada en el plásmido pPD118.33.

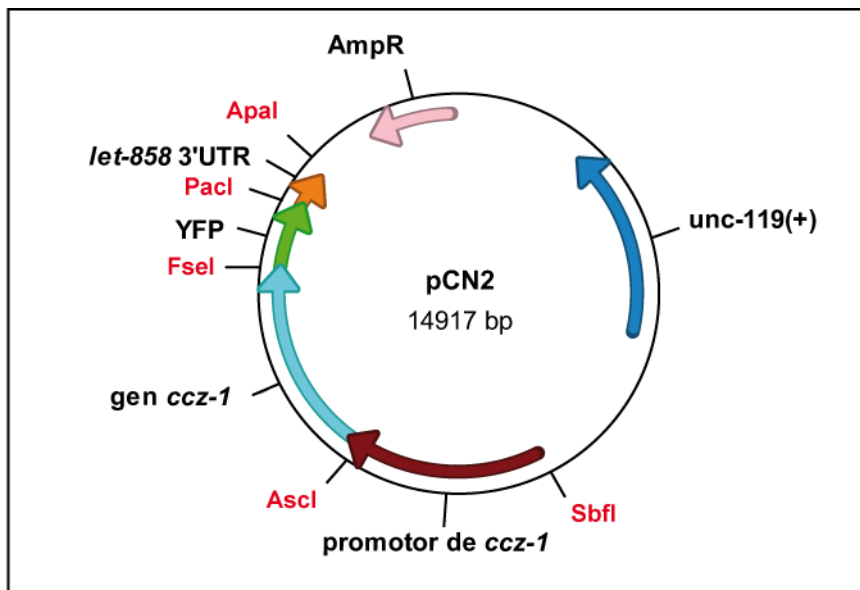


Figura 3.40. Mapa del plásmido pCN2. El plásmido pCN2 contiene una copia silvestre del gen *ccz-1* expresada bajo el promotor del gen *ccz-1* y fusionada a la proteína fluorescente YFP.

En la Figura 3.41 se muestra como en la progenie de los mutantes *t2129* que sí contenía el *array* extracromosomal del plásmido pCN1, el cuál aportaba una copia silvestre del gen *ccz-1*, se consiguió rescatar el fenotipo de la mutación: la letalidad embrionaria, así como la acumulación de cuerpos apoptóticos en la gónada del hermafrodita adulto.

Únicamente el fenotipo de acumulación de vesículas en los embriones permanecía sin ser rescatado por la construcción pCN1. Este hecho podría deberse a que el promotor de *ced-1* estuviese limitando la expresión del gen *ccz-1* a las células fagocitarias y que ese fenotipo se debiese a la falta del gen en otras células del animal. Por otra parte, la inserción del plásmido pCN2 en el mutante *t2129*, con la ayuda del cañón de partículas, permitió rescatar totalmente el fenotipo del mutante: la letalidad embrionaria, la acumulación de vesículas en los embriones y de cuerpos apoptóticos en la gónada del hermafrodita adulto (Figura 3.41). Se concluía por tanto que, efectivamente, era el gen *ccz-1* el que estaba afectado en los mutantes *t2129*, *t2070* y *t2170*, y el responsable del fenotipo observado en dichos mutantes.

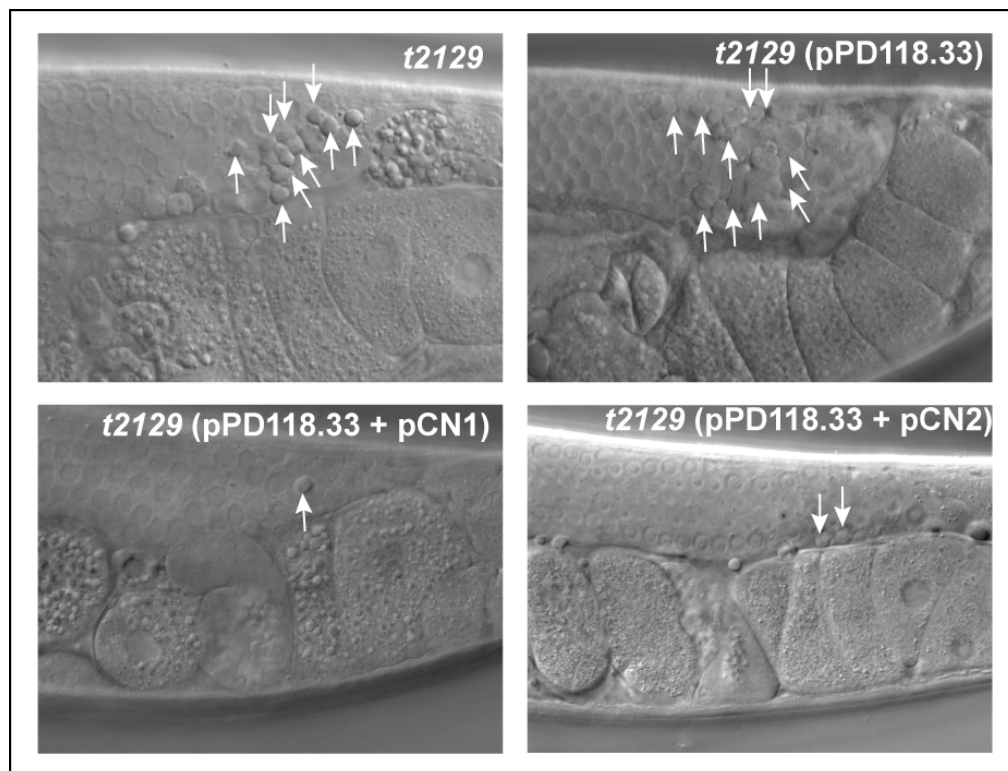


Figura 3.41. Rescate del mutante *t2129* con los plásmidos pCN1 y pCN2. La transformación del mutante *t2129* con el plásmido pCN1 consiguió rescatar el fenotipo de acumulación de cuerpos apoptóticos en la gónada del mutante. Sin embargo, este plásmido, en el cual se expresa el gen *ccz-1* bajo el promotor de *ced-1*, no consiguió rescatar el fenotipo de acumulación de vesículas en los embriones del mutante. El plásmido pCN2, en el cuál el gen *ccz-1* se expresa bajo su propio promotor, consiguió rescatar ambos fenotipos del mutante.

3.10. Análisis del RNA mensajero de los mutantes *t2129*, *t2070* y *t2170* y de la cepa *ccz-1(ok2182)*

Una vez secuenciadas las mutaciones puntuales que contenían los mutantes *t2129*, *t2070* y *t2170* en el gen *ccz-1* se realizó un análisis del RNA mensajero (mRNA) de dicho gen, que permitiese comprobar cuáles eran las alteraciones presentes en el RNA mensajero provocadas por estas mutaciones. En los mutantes *t2129* y *t2170*, el RNA mensajero únicamente se diferenciaba del silvestre en las mutaciones puntuales que existían en ambos mutantes. Como se explicó anteriormente, estas mutaciones provocaban un codón de parada prematuro en la lectura del RNA mensajero, generando una proteína defectuosa. Por el contrario, el mutante *t2070* contenía una mutación puntual que afectaba a la primera base del primer intrón del gen *ccz-1*, transformando la guanina (G) en adenina (A). Esta transición provocaba una alteración del procesamiento (*splicing*) del RNA mensajero, de forma que el primer intrón no era eliminado y su secuencia aparecía en el RNA mensajero maduro del gen *ccz-1* producido en el mutante *t2070*, como se puede observar en la Figura 3.42. Este procesamiento anómalo del RNA provocaba una alteración en la fase de lectura de la proteína, generando un codón de parada prematuro en las primeras bases del primer intrón presente en el RNA mensajero (Figura 3.43). Por lo tanto, la proteína CCZ-1 del mutante *t2070* se veía completamente alterada, perdiendo su funcionalidad.

Posteriormente, se analizó cómo afectaba la delección presente en el gen *ccz-1* en el knock out *ccz-1(ok2182)*, al RNA mensajero de dicho gen. La delección afectaba a gran parte del segundo y del cuarto exon del gen *ccz-1*, así como al tercer exon completo. Casi siempre se producía un *splicing* normal y el RNA mensajero generado contenía un microexon que contenía las secuencias del segundo y del cuarto exon del gen *ccz-1* no eliminadas por la delección en el knock out. La fase de lectura de la proteína CCZ-1 se ve alterada por la delección, de forma que se origina un codón de parada prematuro y por tanto, la proteína perderá su funcionalidad (Figura 3.44).

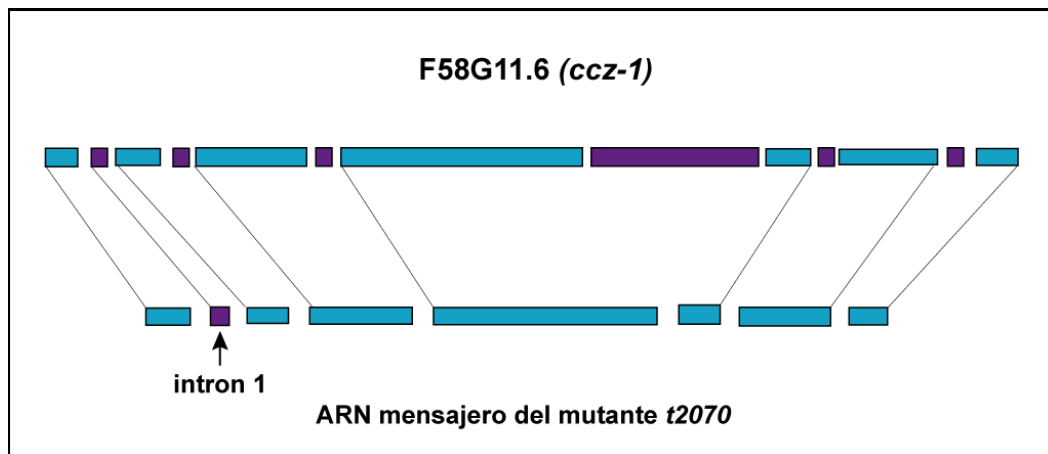


Figura 3.42. Splicing anómalo observado en el RNA mensajero del mutante *t2070*. La mutación puntual en la primera base del primer intrón del gen *ccz-1*, presente en el mutante *t2070*, genera una alteración en el *splicing*, de manera que el primer intrón no es eliminado.

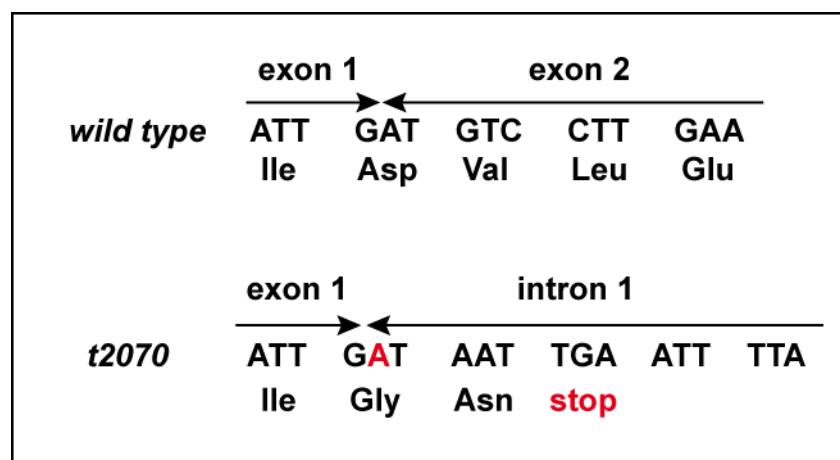


Figura 3.43. Alteración de la fase de lectura de la proteína CCZ-1 en el mutante *t2070*. La introducción del primer intrón en el RNA mensajero del gen *ccz-1*, como consecuencia de la modificación de su *splicing* en el mutante *t2070*, provoca una alteración de la fase de lectura de la proteína CCZ-1 originándose un codón de parada prematuro. Esto genera una proteína defectuosa y no funcional.

Sin embargo, en algunos casos, se producía un procesamiento alternativo y el microexon era eliminado. En este caso el RNA mensajero en el knock out únicamente contenía los exones primero, quinto, sexto y séptimo, y

Resultados

no se alteraba la fase de lectura de la proteína CCZ-1 a pesar de la delección de los otros tres exones. De esta forma, la proteína no perdía completamente su funcionalidad, aunque su tamaño fuese menor que el de la proteína silvestre. Este procesamiento alternativo permitía una funcionalidad parcial de la proteína CCZ-1 en el knock out *ccz-1(ok2182)*. De forma que, aunque en él se observaban fenotipos similares a los presentes en los mutantes *t2129*, *t2070* y *t2170*, la letalidad embrionaria de esta cepa era menor que en dichos mutantes y por tanto, la cepa sí era viable (Figura 3.44).

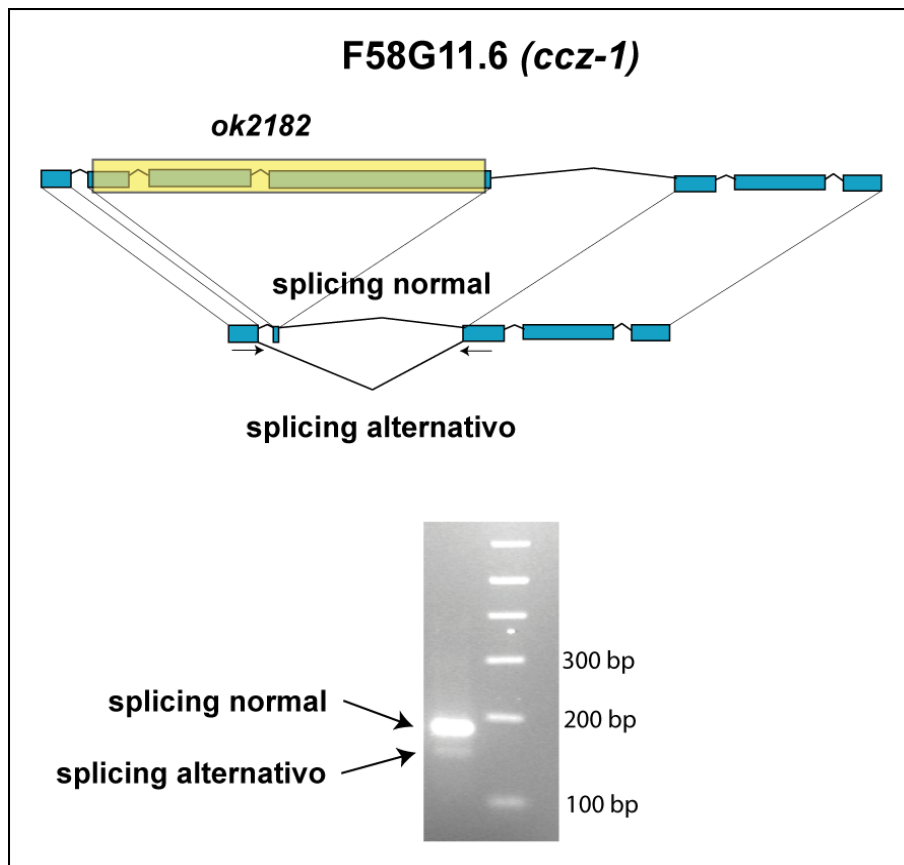


Figura 3.44. En el knock out *ccz-1 (ok2182)* se producen dos tipos diferentes del RNA mensajero del gen *ccz-1*. Normalmente, en el *splicing* la delección del *knock out* genera un microexón en el RNA mensajero del gen *ccz-1*, que altera la fase de lectura de la proteína CCZ-1, generando una pérdida de su funcionalidad. Minoritariamente, se produce un *splicing* alternativo en el cual dicho microexón es eliminado y no se altera la fase de lectura de la proteína CCZ-1, a pesar de existir una delección, con lo cual la proteína mantiene parcialmente su funcionalidad, permitiendo la viabilidad de esta cepa.

En la Figura 3.44 se puede apreciar la diferencia existente entre el *splicing* normal y el alternativo existentes en el knock out *ccz-1(ok2182)*. En la imagen del gel de electroforesis se observan las dos bandas correspondientes a los dos *splicing* diferentes. La banda del *splicing* normal es de un tamaño ligeramente superior y mucho más abundante. Sin embargo, la banda correspondiente al *splicing* alternativo es de un tamaño menor y mucho más escasa.

4. Caracterización de la función de la proteína CCZ-1 en la ruta de maduración de fagosomas

Una vez se hubo comprobado que el gen *ccz-1* era el gen afectado en los mutantes, se realizaron una serie de experimentos con el objetivo de caracterizar cuál es el papel que desempeña la proteína CCZ-1 en la ruta de maduración de los fagosomas, implicados en la digestión de cuerpos apoptóticos en *C. elegans*. Como se describió en la introducción, la fagocitosis de los cuerpos apoptóticos en *C. elegans* está mediada por dos rutas parcialmente redundantes que convergen en la GTPasa de la Familia Rho: CED-10, cuyo ortólogo en mamíferos es Rac1. Una de las rutas genéticas que controlan la fagocitosis de los cuerpos apoptóticos está compuesta por las proteínas CED-1, CED-6 y CED-7, cuyos ortólogos en mamíferos son respectivamente, el receptor transmembranal LRP1/MEGF-10, la proteína adaptora GULP y un transportador ABC (Hamon y col., 2006; Liu y Hengartner, 1998; Su y col., 2002; Wu y Horvitz, 1998a; Zhou y col., 2001; Yu y col., 2008).

La otra ruta contiene al complejo formado por las proteínas CED-2, CED-5 y CED-12. La proteína CED-2 es un adaptador de tipo CrkII con dominios SH2 y SH3 (Reddien y Horvitz, 2000), CED-5, cuyo ortólogo en mamíferos es Dock180, interactúa físicamente con CrkII (Wu y Horvitz, 1998a).

Resultados

La última proteína del complejo es CED-12, la cual posee tres ortólogos en mamíferos: ELMO1, ELMO2 y ELMO3, y contiene un dominio PH (de homología con pleckstrina) y un dominio de unión a SH3 (Gumienny et al., 2001; Wu et al., 2001, Zhou et al., 2001). Las tres proteínas forman un complejo que actúa activando la GTPasa CED-10 (Wu et al., 2001; Brugnera et al., 2002; Lu et al., 2004, Lu y Ravichandran, 2006). Ambas rutas convergen en la GTPasa CED-10 (Rac1). Esta proteína es la encargada de regular el citoesqueleto de actina durante la internalización de la célula apoptótica (Kinchen et al., 2005). En la Figura 3.45 se recoge un esquema con las proteínas de la ruta bioquímica que controla la fagocitosis de cuerpos apoptóticos, así como la degradación de los mismos en los fagosomas.

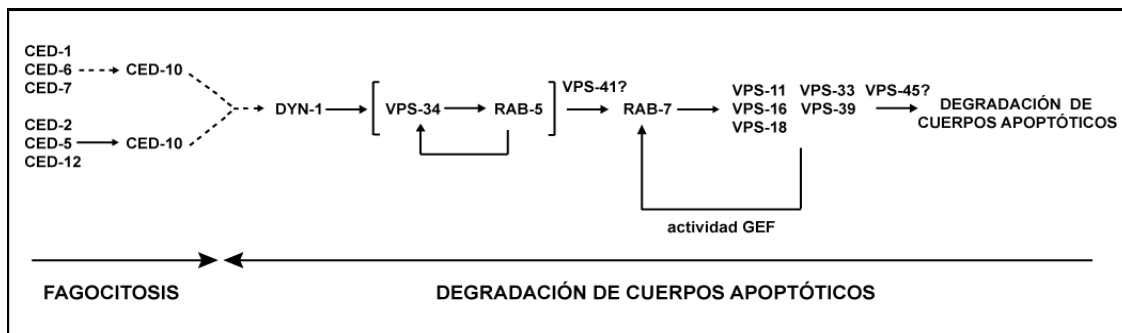


Figura 3.45. Ruta bioquímica de fagocitosis y degradación de los cuerpos apoptóticos. La fagocitosis de las células apoptóticas está mediada por dos rutas parcialmente redundantes que convergen en la GTPasa CED-10, una de ellas formada por las proteínas CED-1, CED-6 y CED-7 y la otra ruta compuesta por el complejo CED-2/CED-5/CED-12. Posteriormente se activa la proteína DYN-1, que inicia la degradación de los cuerpos apoptóticos fagocitados previamente. Esta ruta está compuesta por la quinasa VPS-34, las GTPasas RAB-5 y RAB-7, el complejo HOPS (VPS-11, VPS-16, VPS-18, VPS-33 y VPS-39), y otras proteínas activadoras como VPS-41 y VPS-45.

Las siguientes proteínas de la ruta controlan la degradación de la célula apoptótica previamente fagocitada. La primera proteína de esta segunda fase, la proteína DYN-1 (dinamina) promueve el reclutamiento y la fusión de endosomas a las membranas fagocíticas, facilitando el aporte lipídico y

proteico necesario para la extensión de pseudópodos y la maduración de los fagosomas (Yu et al., 2006). La proteína DYN-1 es dependiente de la ruta formada por las proteínas CED-1, CED-6 y CED-7 para ser reclutada sobre la superficie de los fagosomas (Yu et al., 2008). Posteriormente, la proteína DYN-1 activa a la proteína VPS-34, que es una quinasa específica de fosfatidilinositol, que genera fosfatidilinositol-3-fosfato sobre la superficie de los fagosomas. Las proteínas efectoras posteriores en la ruta se unen a los fosfatidilinositol-3-fosfato surgidos de la actividad de la quinasa VPS-34, reclutándose sobre los fagosomas y permitiendo la activación de otras proteínas de la ruta, como por ejemplo la GTPasa RAB-5 (Kinchen et al., 2008).

En la maduración de los fagosomas se produce un intercambio entre la GTPasa RAB-5 y la GTPasa RAB-7, que va reclutándose sobre la membrana de éstos (Kinchen y Ravichandran, 2008). La GTPasa RAB-7 interaccionará posteriormente con el complejo HOPS, favoreciéndose la fusión entre el fagosoma y el lisosoma, y permitiendo la degradación de los cuerpos apoptóticos (Kinchen et al., 2008).

4.1. Análisis de la localización de las proteínas de la ruta en el silvestre y en el mutante *ccz-1*

Inicialmente, se analizó el reclutamiento de varias de las proteínas implicadas en la ruta de maduración de fagosomas sobre la superficie de éstos, cuando el gen *ccz-1* se hallaba mutado. El objetivo de este análisis consistía en poder determinar el papel de la proteína CCZ-1 en dicha ruta bioquímica. La ausencia del gen *ccz-1* no alteraría la localización de las proteínas de la ruta que funcionan antes que CCZ-1, ya que su reclutamiento sobre la superficie de los fagosomas no sería dependiente de la acción de CCZ-1. Sin embargo, en el caso de las proteínas de la ruta que actúan posteriormente a la proteína CCZ-1, cabría esperar que se alterase su localización si ésta dependiera de la correcta funcionalidad de CCZ-1.

4.1.1. Estudio de la actividad de la quinasa VPS-34

El análisis se inició observando la localización de la proteína VPS-34. En el estudio se utilizó la construcción YFP::2xFYVE para analizar la actividad de la proteína VPS-34. El dominio FYVE es un dominio en forma de dedo que une dos iones de zinc, el cual interacciona específicamente con los fosfatidilinositol-3-fosfato, que son generados por la actividad de la quinasa VPS-34 sobre la superficie de los fagosomas. La mayoría de los efectores de RAB-5 poseen un dominio FYVE o PX, que se une a los fosfatidilinositol-3-fosfato (Kinchen et al., 2008). Se construyó una cepa de *C. elegans* transgénica que expresaba la construcción YFP::2xFYVE sobre un fondo mutante *ccz-1 (t2129)*. Como control en el experimento, se utilizó la cepa transgénica que expresaba YFP::2xFYVE sobre un fondo silvestre N2 Bristol.

Posteriormente, se observó en un microscopio equipado con Nomarski y filtros de fluorescencia adecuados, la localización de la construcción YFP::2xFYVE, tanto en el fondo silvestre como en el fondo mutante. En un fondo silvestre, se observaron halos fluorescentes que se sitúan sobre la superficie de los fagosomas que contienen células apoptóticas, situados en la gónada del hermafrodita adulto. Estos halos fluorescentes se correspondían con el reclutamiento de la construcción YFP::2xFYVE sobre la superficie de los fagosomas. Se indicaba que la actividad de la quinasa VPS-34 se desarrollaba de forma normal, puesto que se estaban generando los fosfatidilinositol-3-fosfato y el dominio FYVE se estaba uniendo a ellos.

De igual forma, en un fondo mutante *ccz-1(t2129)* se pudo observar que la localización de los halos fluorescentes correspondientes a la expresión de YFP::2xFYVE no se veía alterada, ni tampoco disminuía aparentemente la intensidad de la fluorescencia de los halos, como se observa en la Figura 3.46. Al cuantificar el porcentaje de reclutamiento de la construcción YFP::2xFYVE sobre la superficie de los fagosomas, se pudo observar que en el fondo mutante existía un porcentaje ligeramente mayor que en el fondo silvestre. Que el porcentaje de reclutamiento fuera superior indicaba que en el mutante, o bien

existía una mayor actividad de VPS-34 o bien que los fosfatidilinositol-3-fosfato, generados por la actividad de la quinasa, estaban siendo retenidos durante más tiempo sobre la superficie de los fagosomas. En la Figura 2.49 se recoge la cuantificación del porcentaje de reclutamiento de las proteínas YFP::FYVE, YFP::RAB-5 y YFP::RAB-7 sobre la superficie de los fagosomas, tanto para un fondo genético silvestre como para uno mutante *t2129*.

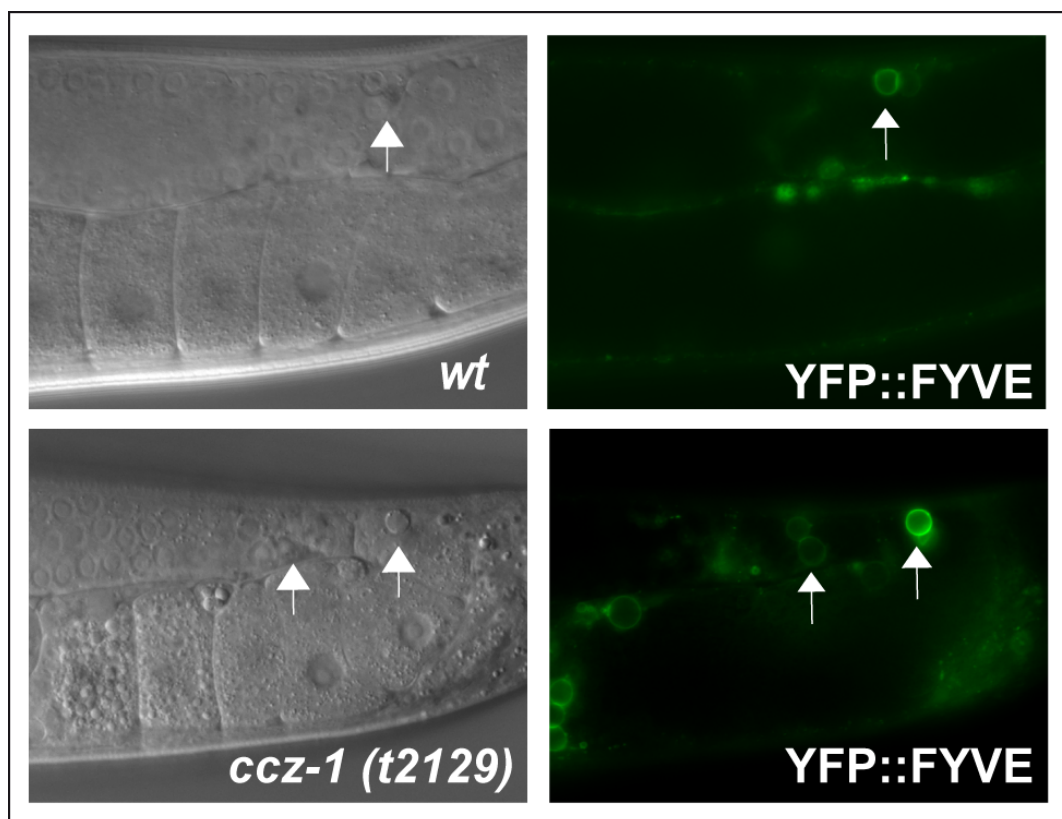


Figura 3.46. Localización de la proteína YFP::FYVE en un fondo silvestre y en el mutante *t2129*. Se puede observar que en un mutante *t2129* el reclutamiento de YFP::FYVE sobre la membrana de los fagosomas que contienen los cuerpos apoptóticos (visualizado como halos fluorescentes señalizados mediante flechas) no aparece alterado con respecto al silvestre.

El hecho de que la actividad de la proteína VPS-34 no se viese alterada en ausencia de la proteína CCZ-1 en el mutante indicaba que VPS-34 estaba situada por encima de la proteína CCZ-1 en la ruta de maduración de

los fagosomas. El mayor acúmulo de fosfatidilinositol-3-fosfato, sobre la superficie de los fagosomas en el mutante, podría explicarse si las proteínas posteriores de la ruta no estuviesen reemplazando tan rápidamente a éstos. Esto podría suceder si la proteína CCZ-1 estuviese implicada en ese reemplazo, de forma que en el mutante se estuviese realizando a una velocidad menor que en un silvestre.

4.1.2. Análisis del reclutamiento de la GTPasa RAB-5

En el estudio realizado, se utilizó una cepa transgénica de *C. elegans* que expresaba YFP::RAB-5. En un fondo silvestre N2 Bristol, la proteína YFP::RAB-5 se localizaba en la superficie de los fagosomas, de forma que en el microscopio Nomarski se observaban unos halos fluorescentes sobre los fagosomas que contenían cuerpos apoptóticos. La localización de YFP::RAB-5 no se veía alterada en ausencia de la proteína CCZ-1, ya que en el fondo mutante *ccz-1(t2129)*, YFP::RAB-5 se continuaba localizando de forma normal sobre la superficie de los fagosomas con células apoptóticas. Asimismo, los halos fluorescentes observados parecían de igual intensidad en la cepa con fondo mutante que en la cepa con fondo silvestre, como se aprecia en la Figura 3.47. Por lo tanto, CCZ-1 debía actuar después de RAB-5 en la ruta de maduración de los fagosomas.

Como recoge la Figura 3.49, la cuantificación del porcentaje de reclutamiento de la proteína YFP::RAB-5 permitió observar un mayor porcentaje en el mutante que en el silvestre, lo cual indicaba que la proteína RAB-5 se estaba acumulando sobre la superficie de los fagosomas en el mutante. Esto podía deberse a que la proteína CCZ-1 ayudara a reemplazar RAB-5 por otra proteína de la ruta en la superficie de los fagosomas, y al estar ausente CCZ-1 en el mutante, este reemplazo se estuviese produciendo más lentamente en el mutante que en el silvestre.

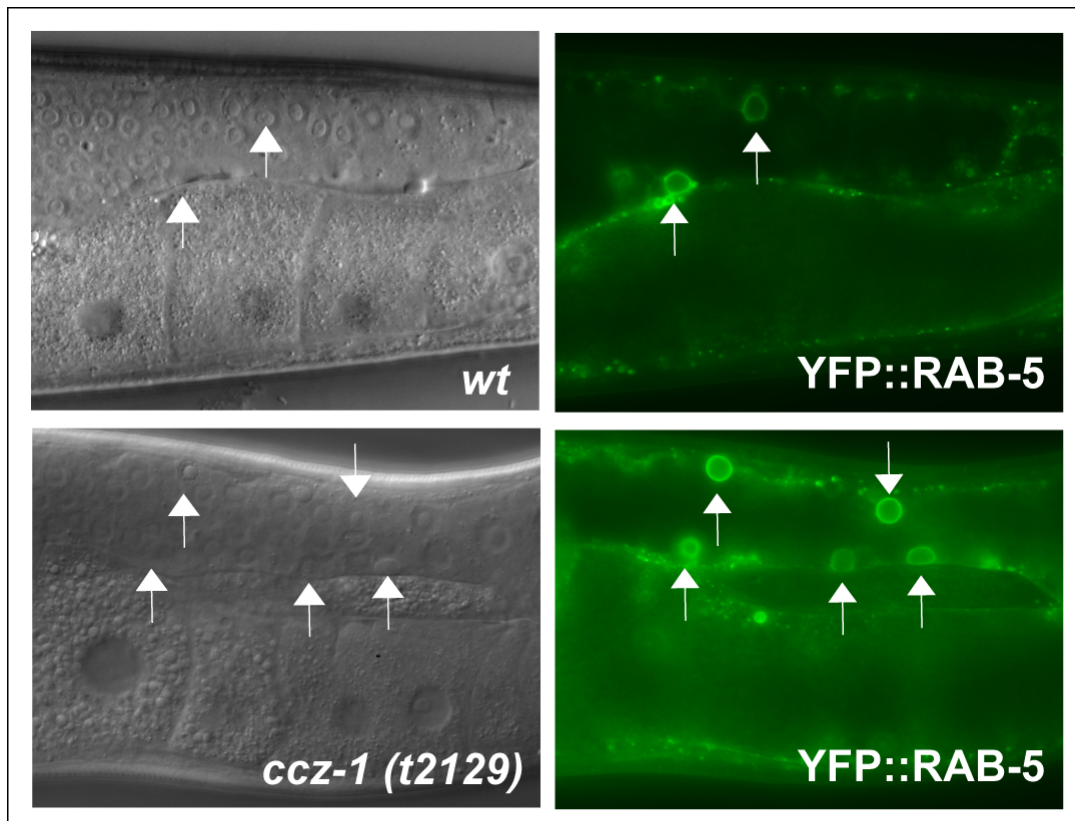


Figura 3.47. Localización de la proteína YFP::RAB-5 en el mutante *t2129*, en comparación con el silvestre. Se puede apreciar que en un mutante *t2129* no se ve alterada la localización de YFP::RAB-5 sobre la membrana de los fagosomas que contienen los cuerpos apoptóticos (halos fluorescentes marcados con flechas).

4.1.3. Análisis del reclutamiento de la GTPasa RAB-7

La GTPasa RAB-7 también pertenece a la familia de las proteínas Rab. RAB-7 se localiza sobre todo en orgánulos acidificados y con una función de degradación, como por ejemplo: endosomas tardíos, lisosomas, fagosomas, autofagosomas... Esta proteína está implicada en la regulación del tráfico, la maduración y la fusión de vesículas endocíticas. Asimismo, controla específicamente la transición entre endosomas tempranos, endosomas tardíos y lisosomas, encargándose de la degradación del contenido de estas vesículas.

Resultados

Por lo tanto, en los fagosomas presentes en la gónada del hermafrodita adulto, RAB-7 está regulando la degradación de los cuerpos apoptóticos dentro de estos fagosomas (Yu et al., 2008; Kinchen et al., 2008).

En el análisis de la localización de RAB-7 se utilizó una cepa transgénica de *C. elegans* que expresaba YFP::RAB-7. Al igual que en los casos anteriores, la expresión de YFP::RAB-7 era observable en un microscopio equipado con Nomarski. En la gónada de un hermafrodita silvestre se podían visualizar unos halos fluorescentes en la superficie de los fagosomas que estaban digiriendo células apoptóticas. Como se aprecia en la Figura 3.48, en un mutante *ccz-1(t2129)*, la proteína YFP::RAB-7 formaba igualmente halos fluorescentes sobre los fagosomas, sin embargo, la intensidad de la fluorescencia de estos halos parecía más débil que en un fondo silvestre. Además, el porcentaje de reclutamiento de la proteína YFP::RAB-7 era menor en un mutante que en un silvestre (Figura 3.49).

A partir de estos datos, se puede concluir que la proteína CCZ-1 funciona antes que la GTPasa RAB-7 y por tanto, la ausencia de CCZ-1 en el mutante, dificulta el reclutamiento de RAB-7 sobre los fagosomas. Sin embargo, el reclutamiento de RAB-7 no debe depender exclusivamente de la funcionalidad de la proteína CCZ-1, ya que en el mutante se seguían observando halos fluorescentes debido a su correcta localización, aunque fuesen de menor intensidad y en menor proporción que en un silvestre.

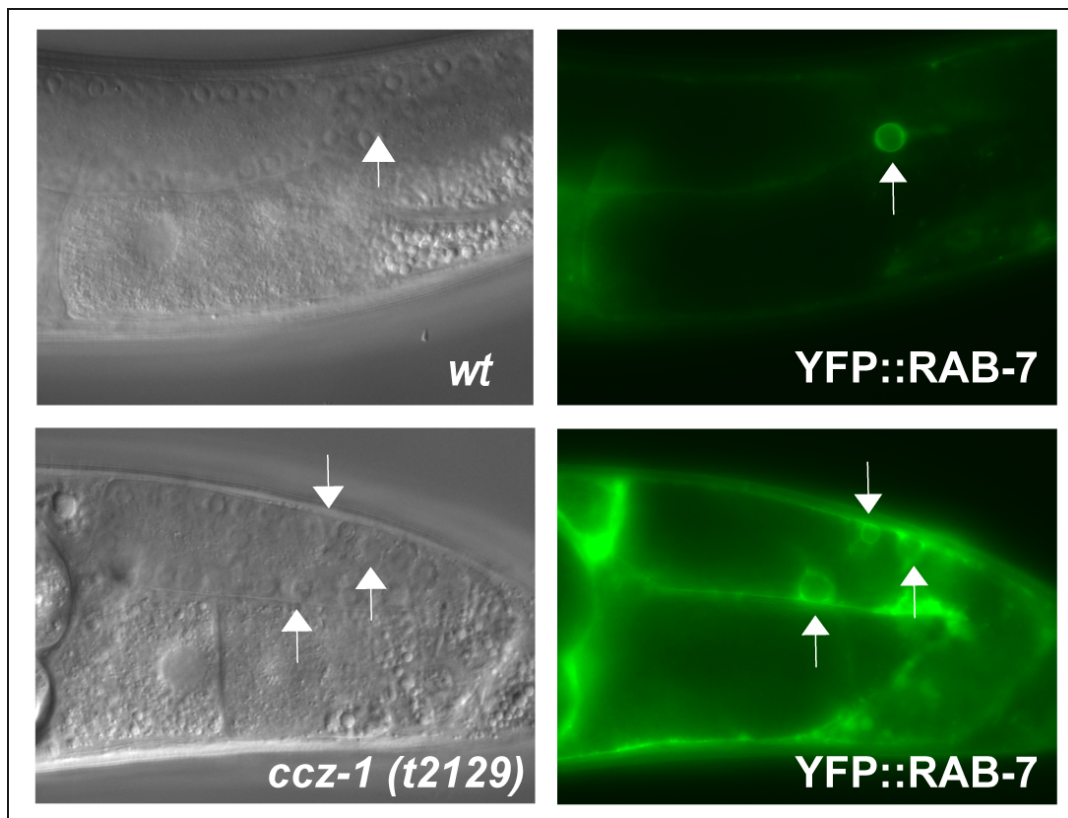


Figura 3.48. Localización de la proteína YFP::RAB-7 tanto en un fondo genético silvestre como en un fondo mutante *t2129*.

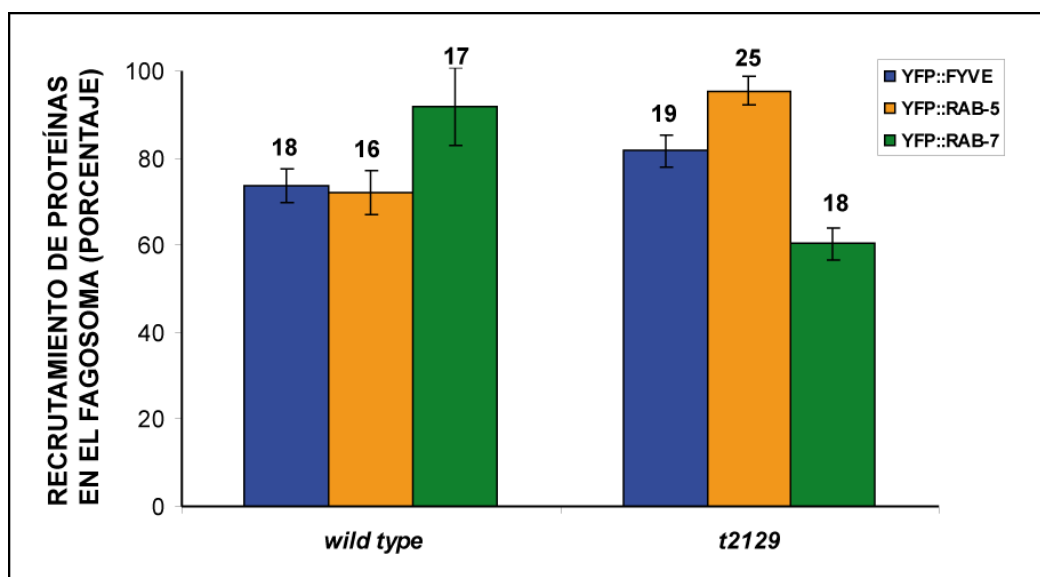


Figura 3.49. Representación del porcentaje de reclutamiento de la proteínas YFP::FYVE, YFP::RAB-5 y YFP::RAB-7 sobre la superficie del fagosoma, en un fondo genético silvestre y en un fondo genético mutante *t2129*.

5. Análisis de la influencia de los genes de la ruta de maduración de los fagosomas sobre la localización de CCZ-1::YFP

La observación de cuál era la influencia que tenían los distintos genes de la ruta de maduración de los fagosomas que contenían cuerpos apoptóticos sobre la expresión de CCZ-1::YFP, permitía hallar cuál era la posición de la proteína CCZ-1 en dicha ruta. Las proteínas que se situaban en una posición superior a CCZ-1 en la ruta deberían controlar la localización de esta proteína, de manera que si uno de esos genes no era funcional, debería alterarse la expresión y correcta localización de CCZ-1::YFP. Sin embargo, si se disminuía la funcionalidad de una proteína situada en una posición inferior a CCZ-1, la expresión de CCZ-1::YFP no debería verse alterada. En un fondo silvestre N2 Bristol, la expresión de CCZ-1::YFP se visualizaba formando halos fluorescentes alrededor de la superficie de los fagosomas que contenían cuerpos apoptóticos.

5.1. Influencia del gen *dyn-1* sobre la localización de CCZ-1::YFP

Inicialmente, se analizó la influencia del gen *dyn-1* sobre la localización de la proteína CCZ-1::YFP. Se llevó a cabo una disminución de la funcionalidad del gen *dyn-1* utilizando la técnica del RNA de interferencia (RNAi). La expresión de CCZ-1::YFP al realizar el RNAi de *dyn-1* se vio alterada, de manera que el reclutamiento de CCZ-1::YFP sobre los fagosomas disminuyó drásticamente, en comparación al reclutamiento de CCZ-1::YFP en un fondo silvestre, como se puede apreciar en la Figura 2.56, en la cuál se representa el porcentaje de reclutamiento de CCZ-1::YFP, tras la inactivación de los diferentes genes de la ruta. Además, la intensidad de fluorescencia de los halos correspondientes a CCZ-1::YFP era mucho más débil que en el silvestre, como se observa en la Figura 3.50. Este hecho sitúa la proteína DYN-1 en una posición superior a CCZ-1 en la ruta de maduración de los fagosomas.

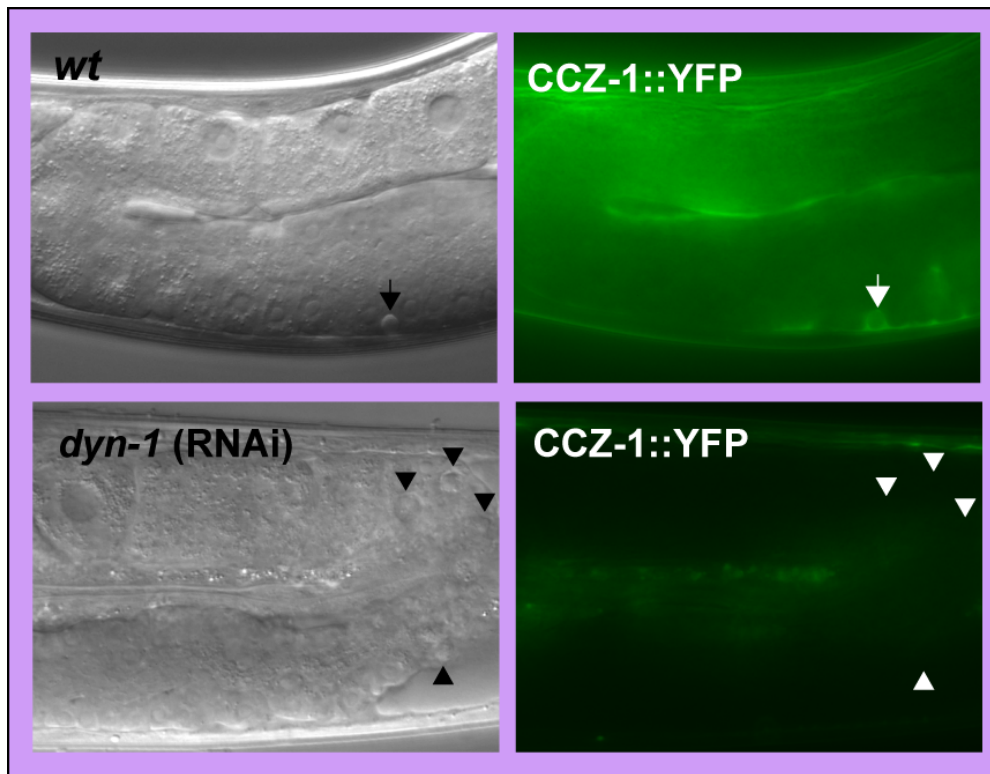


Figura 3.50. Localización de la proteína CCZ-1::YFP en un fondo silvestre y al inactivar el gen *dyn-1* mediante RNAi. La inactivación del gen *dyn-1* impide el reclutamiento de la proteína CCZ-1::YFP, de forma que los halos fluorescentes, correspondientes a la localización de dicha proteína en los fagosomas que contienen los cuerpos apoptóticos, observables en el silvestre (marcados mediante flechas en la imagen), no son visibles bajo luz UV al inactivar *dyn-1* (señalizados con cabezas de flechas en la Figura).

5.2. Influencia del gen *vps-34* sobre la localización de CCZ-1::YFP

El siguiente gen en la ruta de maduración de fagosomas es el gen *vps-34*. Al inactivar mediante RNAi el gen *vps-34*, se observó al igual que en el caso anterior, una disminución muy importante en la expresión de la proteína CCZ-1::YFP, tanto en el reclutamiento de la proteína como en la intensidad de la fluorescencia de los halos. Por tanto, la proteína VPS-34 debe actuar antes que CCZ-1 en la ruta de maduración de los fagosomas (Figura 3.51).

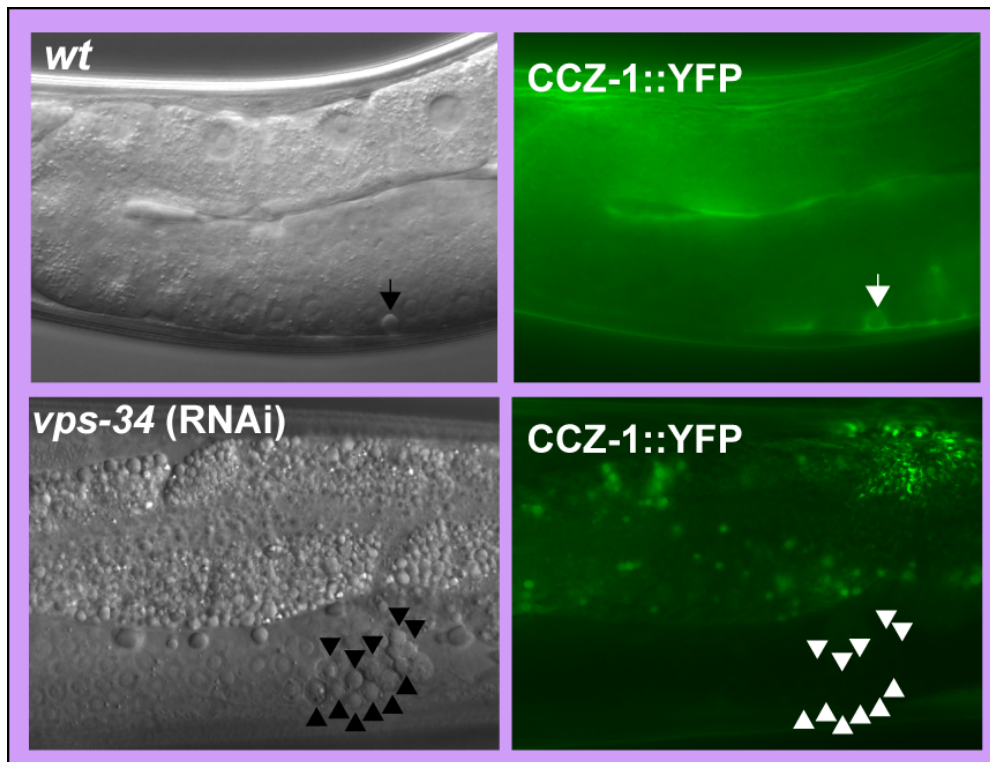


Figura 3.51. Localización de la proteína CCZ-1::YFP en un fondo silvestre y al inactivar el gen *vps-34* mediante RNAi. La inactivación del gen *vps-34* impide el reclutamiento de la proteína CCZ-1::YFP, de forma que los halos fluorescentes que indican la localización de esta proteína y que son observados en el silvestre (marcados mediante flechas en la imagen), no son visibles al inactivar *vps-34* (señalizados con cabezas de flechas).

5.3. Influencia del gen *rab-5* sobre la localización de CCZ-1::YFP

Posteriormente, se analizó cuál era la posición de CCZ-1 con respecto a la GTPasa RAB-5. En la Figura 3.52 se puede apreciar como la inactivación del gen *rab-5* mediante RNAi provocó una significativa caída del nivel de reclutamiento de la proteína CCZ-1::YFP sobre la superficie de los fagosomas y de la intensidad de la fluorescencia de los halos. Este hecho indica que la proteína CCZ-1 actúa después de la proteína RAB-5 en la ruta, de forma que RAB-5 controla la localización de CCZ-1::YFP.

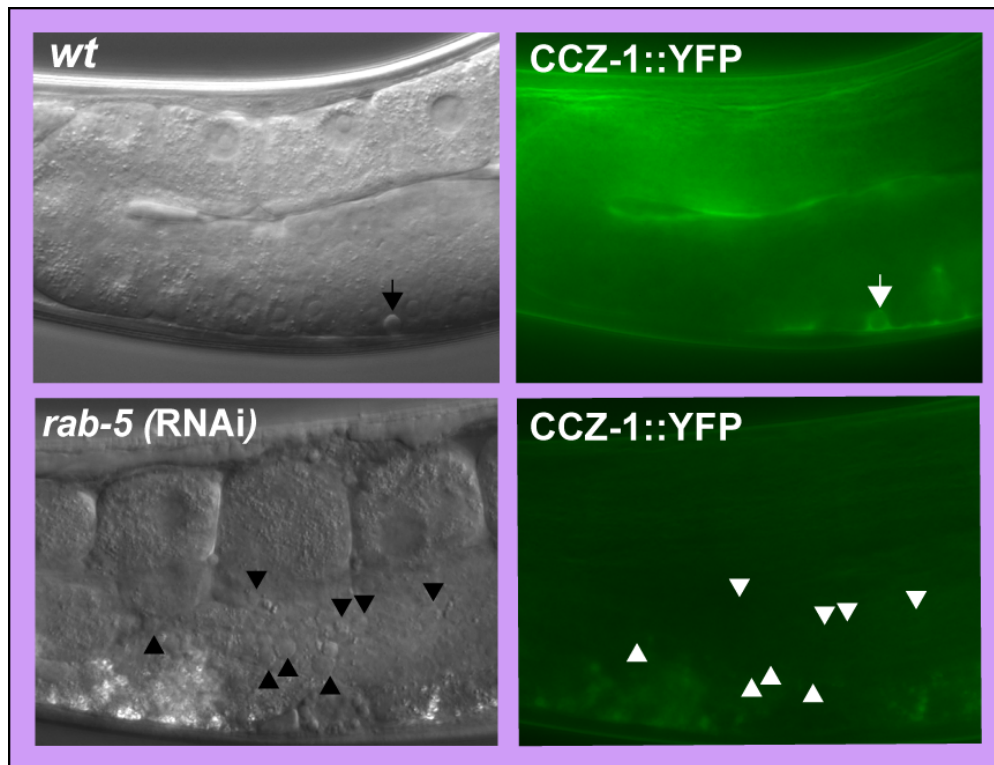


Figura 3.52. Localización de la proteína CCZ-1::YFP en un fondo silvestre y al inactivar el gen *rab-5* mediante RNAi. La inactivación del gen *rab-5* provoca una disminución brusca del reclutamiento de la proteína CCZ-1::YFP, de forma que los halos fluorescentes que indican la localización de esta proteína y que son observados en el silvestre (marcados mediante flechas en la imagen), no son visibles al inactivar *rab-5* (señalizados con cabezas de flechas).

5.4. Influencia del gen *sand-1* sobre la localización de CCZ-1::YFP

Como se explicó anteriormente, en levaduras las proteínas Mon1p (homólogo de SAND-1) y Ccz1p (homólogo de CCZ-1) forman un complejo proteico que regula la función de la GTPasa RAB-7 (Wang et al. 2002). En *C. elegans*, se ha demostrado mediante un análisis de dos-híbridos, que existe una interacción entre SAND-1 y CCZ-1, de manera que seguramente ambas proteínas estén formando, al igual que en levaduras, un complejo proteico (Poteryaev et al., 2007).

Resultados

Por esta razón, cabía suponer que la función de CCZ-1 pudiese estar controlada por la proteína SAND-1. Efectivamente, se comprobó que al inactivar SAND-1 mediante RNAi, la expresión de CCZ-1::YFP desaparecía casi en su totalidad, observándose tan sólo una pequeña cantidad de halos fluorescentes de intensidad muy débil que se correspondían a la localización de CCZ-1::YFP. En la Figura 3.53, se muestra como al inactivar mediante RNAi el gen *sand-1*, en la mayoría de los casos, la expresión de CCZ-1::YFP desaparece.

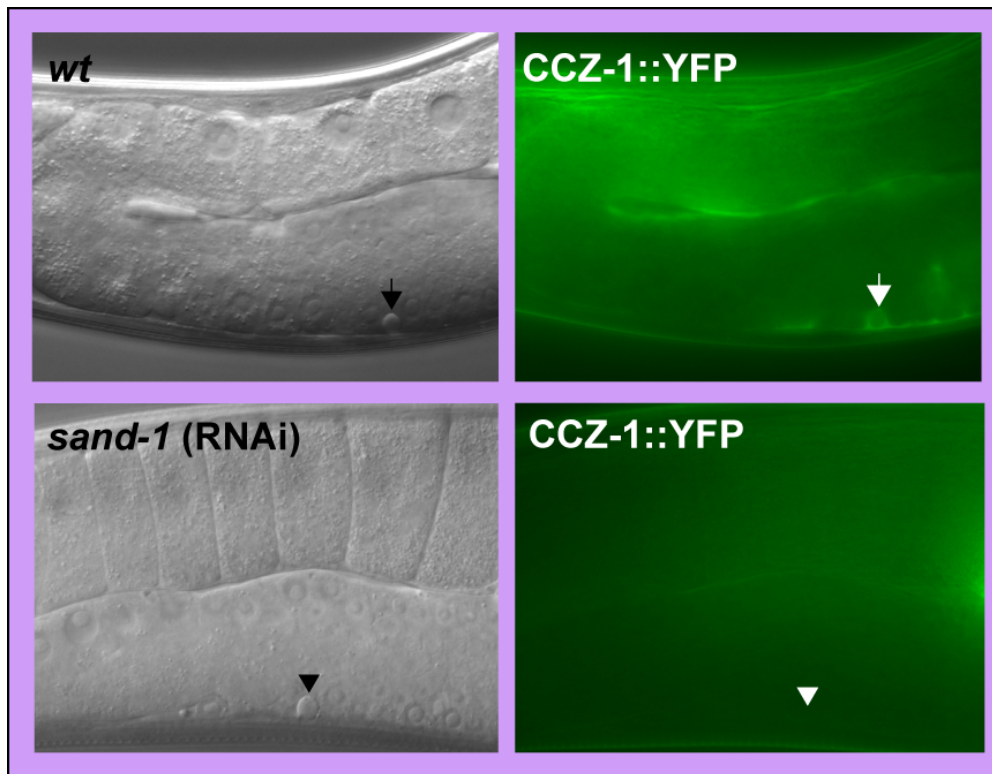


Figura 3.53. Localización de la proteína CCZ-1::YFP en un silvestre y al realizar la inactivación del gen *sand-1* mediante RNAi. La inactivación del gen *sand-1* impide el reclutamiento de la proteína CCZ-1::YFP, de forma que los halos fluorescentes que indican la localización de esta proteína y que son observados en el silvestre (marcados mediante flechas en la imagen), no son visibles al inactivar *sand-1* (señalizados con cabezas de flechas).

5.5. Influencia del gen *rab-7* sobre la localización de CCZ-1::YFP

Al contrario que en los casos anteriores, la inactivación de la GTPasa RAB-7 no provocó una alteración significativa de la señal de la proteína CCZ-1::YFP, aunque el reclutamiento de esta proteína sobre la superficie de los fagosomas sí disminuyó ligeramente con respecto al silvestre. Los halos fluorescentes correspondientes a CCZ-1::YFP seguían manteniendo una intensidad similar a la del fondo silvestre, como se puede observar en la Figura 3.54.

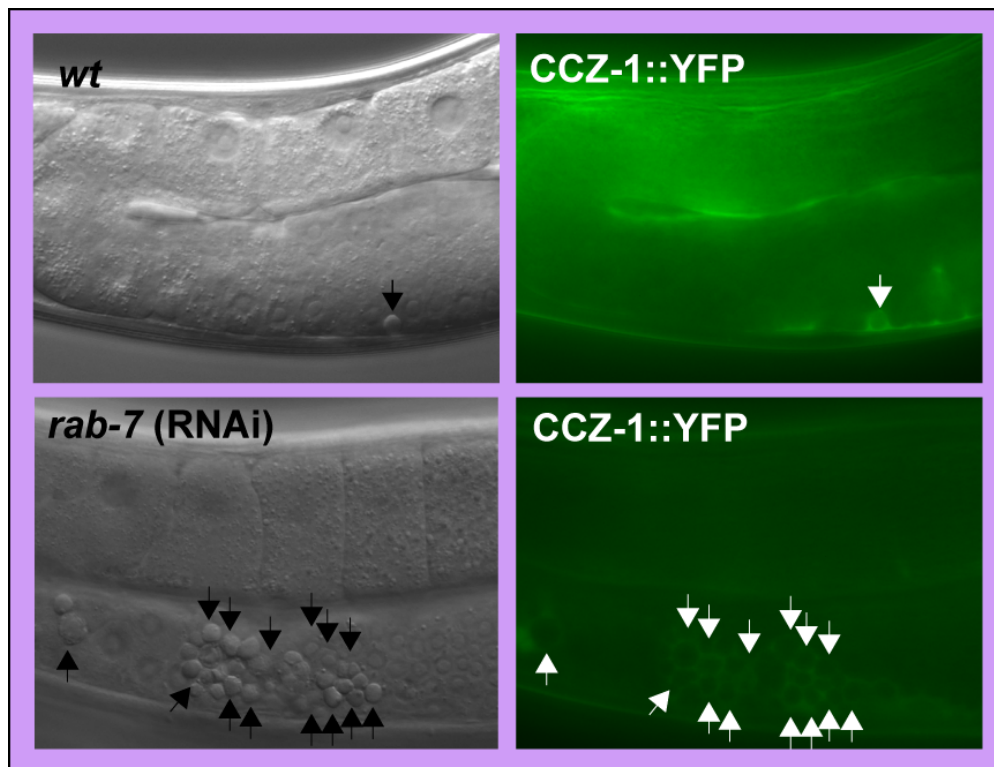


Figura 3.54. Localización de la proteína CCZ-1::YFP en un silvestre y tras realizar la inactivación del gen *rab-7* mediante RNAi. La inactivación del gen *rab-7* provoca una ligera disminución del reclutamiento de la proteína CCZ-1::YFP sobre la superficie de los fagosomas que engloban los cuerpos apoptóticos, con respecto al fenotipo silvestre, ya que disminuye la intensidad de los halos fluorescentes correspondientes a la localización de esta proteína (marcados mediante flechas en la imagen).

Estos hechos indicaban que RAB-7 estaba situada por debajo de CCZ-1 en la ruta de maduración de los fagosomas, de forma que la localización de CCZ-1 no depende de RAB-7. Sin embargo, la ligera disminución del reclutamiento de CCZ-1::YFP sugería que podría existir un bucle de retroalimentación, mediante el cual la proteína RAB-7 podría controlar parcialmente la localización de CCZ-1 (Figura 3.56).

5.6. Influencia de varios genes del complejo HOPS (*vps-16*, *vps-18* y *vps-11*) sobre la localización de CCZ-1::YFP

La inactivación de algunos genes formadores del complejo HOPS, como *vps-16*, *vps-18* y *vps-11*, permitía la localización de CCZ-1::YFP sobre la superficie de los fagosomas que contenían cuerpos apoptóticos, aunque este reclutamiento se veía ligeramente disminuido con respecto al silvestre. En la Figura 3.55 se muestra cómo los halos fluorescentes correspondientes al reclutamiento de CCZ-1::YFP sobre los fagosomas son ligeramente más débiles que en un fondo silvestre, al inactivar los genes del complejo HOPS. En la Figura 3.56 se puede observar la diferencia en el reclutamiento de CCZ-1::YFP tras inactivar estos genes del complejo HOPS, con respecto al silvestre.

Este resultado refuerza la hipótesis de que la proteína CCZ-1 se encuentra situada en la ruta de maduración de los fagosomas en una posición anterior a la de RAB-7 y el complejo HOPS. Sin embargo, el complejo HOPS, a pesar de estar situado posteriormente en la ruta, podría estar contribuyendo al reclutamiento de CCZ-1 mediante una estabilización de su localización.

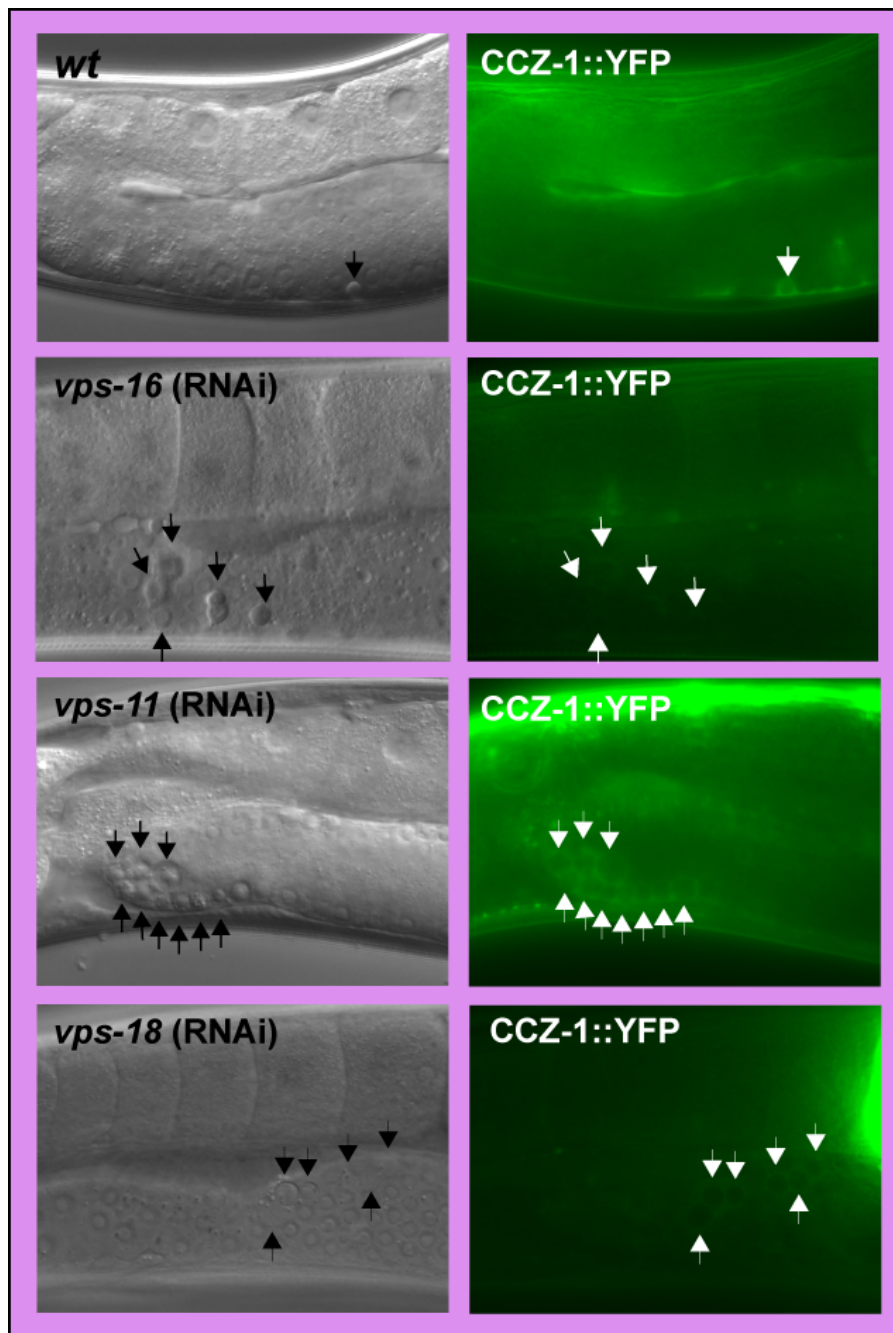


Figura 3.55. Influencia de la inactivación mediante RNAi de los genes *vps-16*, *vps-11* y *vps-18* del complejo HOPS sobre la localización de la proteína **CCZ-1::YFP**. La inactivación de los genes *vps-16*, *vps-11* y *vps-18* permite el reclutamiento de la proteína **CCZ-1::YFP** sobre la superficie de los fagosomas, sin embargo, provoca una ligera disminución de la intensidad de la fluorescencia emitida por la localización de dicha proteína, con respecto al fenotipo silvestre (señalizada mediante flechas en la imagen).

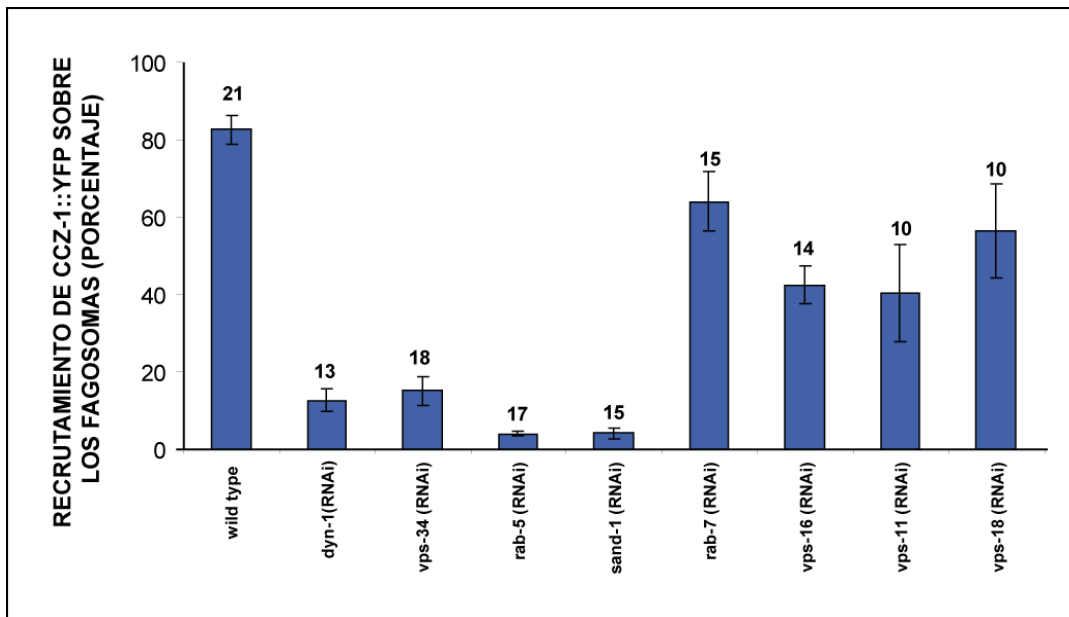


Figura 3.56. Representación del porcentaje de reclutamiento de la proteína CCZ-1::YFP sobre la superficie de los fagosomas. En la gráfica se observa la drástica disminución que se produce en el reclutamiento de CCZ-1::YFP al inactivar mediante RNAi los genes *dyn-1*, *vps-34*, *rab-5* y *sand-1*. Estos genes deben situarse en una posición superior al gen *ccz-1* en la ruta de maduración de los fagosomas. Sin embargo, al inactivar el gen *rab-7* y algunos genes del complejo HOPS (*vps-11*, *vps-16* y *vps-18*) la proteína CCZ-1::YFP sí se recluta, aunque en menor medida que en el silvestre, sobre los fagosomas, lo que indica que estos genes están situados por debajo de *ccz-1* en la ruta.

6. Cuantificación de los cuerpos apoptóticos embrionarios y de la línea geminal en diferentes mutantes de la ruta de maduración de fagosomas

En un mutante *sand-1* (*ok1963*) existe el defecto en la acumulación de cuerpos apoptóticos tanto en la gónada como en los embriones, aunque es menor que el observado en los mutantes *ccz-1*(*t2129*), *ccz-1*(*t2070*), *ccz-1*(*t2170*) y en el knock out *ccz-1*(*ok2182*). Sin embargo, al igual que en los mutantes del gen *ccz-1*, en algunos embriones del mutante *sand-1* (*ok1963*), también existe un defecto en la orientación del huso mitótico de los blastómeros EMS y Abar.

Según los resultados obtenidos en el análisis de la localización de CCZ-1::YFP, el complejo SAND-1/CCZ-1 actúa antes que la GTPasa RAB-7 en la ruta de maduración de los fagosomas y, posteriormente a VPS-34 y RAB-5. Para intentar corroborar esta hipótesis se llevó a cabo una cuantificación de los cuerpos apoptóticos de la gónada tras la inactivación de genes de la ruta de maduración de los fagosomas, bien mediante una mutación, si existía el *knock out* disponible, o bien mediante RNA de interferencia. Al realizar la inactivación del gen *vps-34* mediante RNAi en un mutante *ccz-1(t2129)* se observó una acumulación de cuerpos apoptóticos en la gónada del hermafrodita similar a la cuantificada en un mutante *ccz-1(t2129)* con el gen *vps-34* silvestre. Además, cuando se inactivó el gen *rab-7* mediante RNAi en un mutante *ccz-1(t2129)* y en un silvestre y se cuantificó el número de cuerpos apoptóticos de la gónada, se observó que la acumulación de cuerpos apoptóticos en el mutante *ccz-1(t2129)*, con el gen *rab-7* inactivado por RNAi, era similar a la producida en un animal en el cual únicamente se hubiese inactivado *rab-7* mediante RNAi (Tabla 3.6). Por tanto, la inactivación de estos genes no conllevaba un efecto aditivo, sugiriendo que las proteínas VPS-34, RAB-7 y CCZ-1 estaban todas situadas en una ruta lineal que controla la maduración de los fagosomas que contienen cuerpos apoptóticos (Figura 3.57).

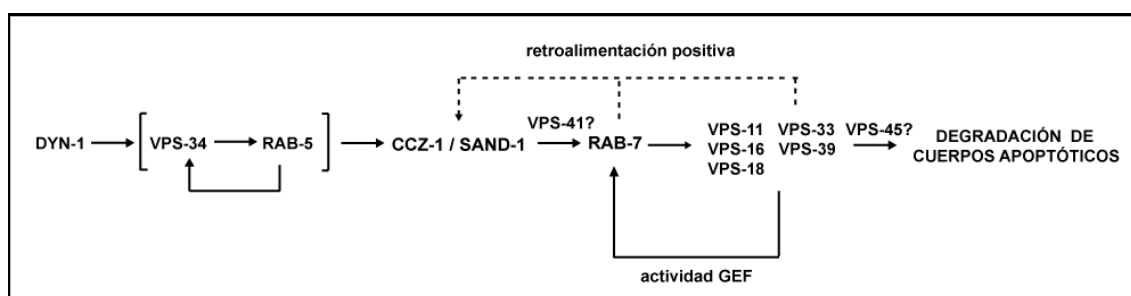


Figura 3.57. Localización del complejo SAND-1/ CCZ-1 en la ruta de maduración de los fagosomas para la degradación de cuerpos apoptóticos. Según los resultados obtenidos previamente, la posición del complejo SAND-1/ CCZ-1 debería situarse por debajo de la proteína RAB-5 y anterior a RAB-7 y el complejo HOPS, con una posible retroalimentación de estas proteínas sobre el complejo.

Resultados

| Genotipo | Cuerpos apoptóticos persistentes en el embrión | Defecto en la orientación del huso mitótico | Número de cuerpos apoptóticos (DIC) en la gónada del hermafrodita adulto | | |
|-------------------------------------|---|---|--|-------------------|-------------------|
| | | | 24h post L4 | 36h post L4 | 48h post L4 |
| wt | 0 (n=39) | 0 (n= 50) | 0.5 ± 0.5 (n=12) | 1.8 ± 5.1 (n=14) | 1.8 ± 2.2 (n=12) |
| <i>ccz-1 (t2129)</i> | 23 (n=24) | 10 (n=24) | 11.3 ± 4.0 (n=23) | 13.0 ± 3.9 (n=25) | 22.9 ± 6.3 (n=24) |
| <i>ccz-1 (t2070)</i> | 12 (n=18) | 2 (n=3) | 12.3 ± 4.9 (n=12) | 23.3 ± 6.3 (n=15) | 26.7 ± 5.3 (n=6) |
| <i>ccz-1 (t2170)</i> | 12 (n=12) | 0 (n=2) | 6.7 ± 2.8 (n=14) | 16.4 ± 4.2 (n=22) | 20.4 ± 5.2 (n=14) |
| <i>ccz-1 (ok2182)</i> | | | 6.3 ± 2.9 (n=15) | 19.9 ± 4.4 (n=14) | 26.4 ± 4.1 (n=10) |
| <i>sand-1 (ok1963)</i> | 8 (n=17) | 8 (n=18) | 4.6 ± 1.9 (n=10) | 4.7 ± 1.5 (n=12) | 5.9 ± 1.2 (n=11) |
| <i>rab-7 (RNAi)</i> | embriones enfermos, mueren antes de la apoptosis (n=10) | 5 (n=10) | 22.8 ± 4.2 (n=16) | | |
| <i>rab-7 (RNAi); ccz-1(t2129)</i> | | | 18.2 ± 3.6 (n=21) | | |
| <i>vps-34 (RNAi)</i> | | | 8.1 ± 2.2 (n=12) | | |
| <i>vps-34 (RNAi); ccz-1 (t2129)</i> | | | 12.4 ± 1.8 (n=9) | | |

Tabla 3.6. Cuantificación de la acumulación de cuerpos apoptóticos en el embrión y en la gónada del hermafrodita adulto, así como del defecto en la orientación del huso mitótico embrionario, en distintos genotipos de la ruta de maduración de los fagosomas.

7. Identificación de células supervivientes en un doble mutante *ced-3 (n717); ccz-1 (t2129)*

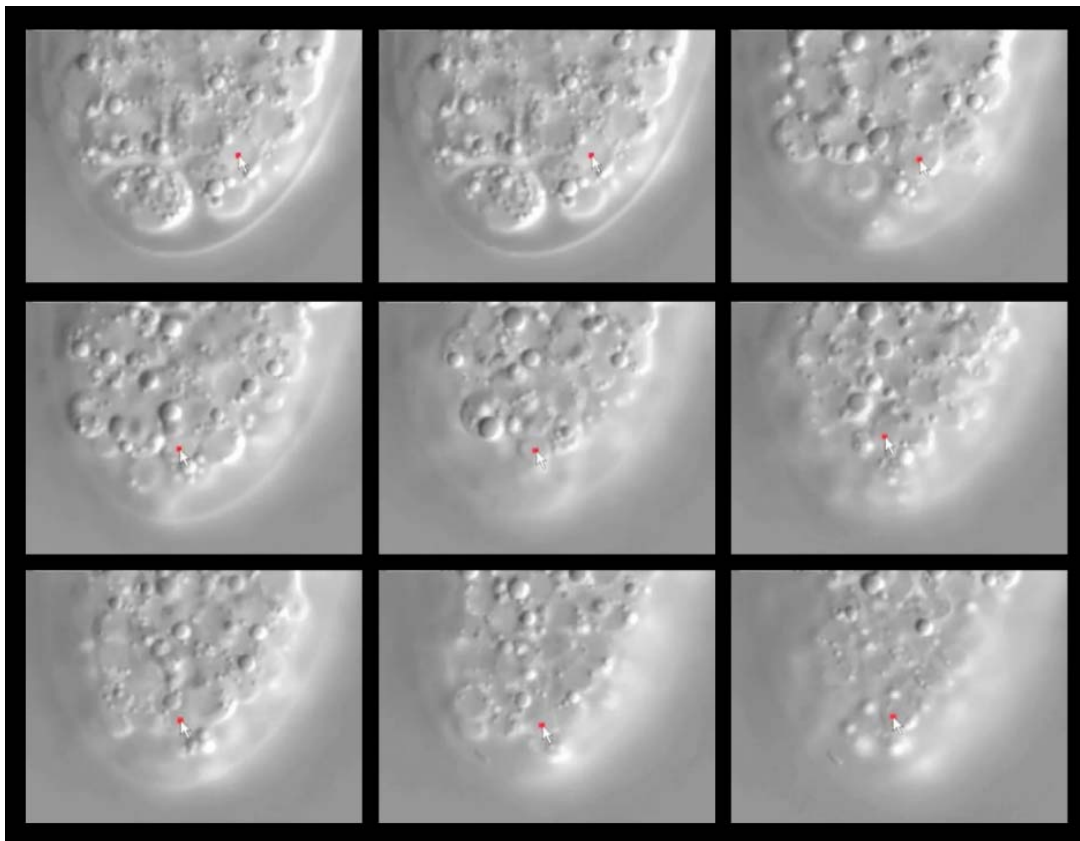
En el mutante *ced-3 (n717)* de *C. elegans* se ve afectada la funcionalidad del gen que codifica la única caspasa presente en su genoma, CED-3. Por tanto, en los embriones de este mutante no se produce ningún cuerpo apoptótico, ya que no se puede iniciar la ruta de la apoptosis. Para poder confirmar que los corpúsculos que se acumulan de manera persistente en los embriones de los mutantes del gen *ccz-1* son en realidad cuerpos apoptóticos, se llevó a cabo la construcción de un doble mutante *ced-3 (n717); ccz-1 (t2129)*. A continuación, se siguieron, mediante microscopía en 4D en embriones del doble mutante, las células situadas en las posiciones del linaje que en un embrión silvestre deberían sufrir apoptosis. Estas células, en lugar de comenzar la apoptosis y convertirse en cuerpos apoptóticos, como ocurre en un embrión silvestre, en el doble mutante permanecían vivas. Por tanto, en los embriones del doble mutante no se observaba ningún corpúsculo. Este dato refutaba que estos corpúsculos persistentes observados en embriones mutantes para el gen *ccz-1*, eran efectivamente células apoptóticas. Las imágenes del Vídeo 3.3 corresponden a una grabación mediante microscopía en 4D de un embrión del doble mutante, en el cuál se ha marcado con un punto rojo la célula ABplpppap, la cuál al dividirse produce la célula hija ABplpppapp, que a diferencia de comenzar la apoptosis como ocurriría en un embrión silvestre, permanece viva durante 3 horas.

Posteriormente, se realizó un análisis del defecto en la orientación del huso mitótico tanto en los embriones del mutante *ced-3 (n717)*, como en el doble mutante *ced-3 (n717); ccz-1 (t2129)*. En el primero, no se observó ningún defecto en la orientación del huso mitótico, mientras que en el doble mutante sí que se observó un porcentaje de mutantes que presentaban alteraciones en la orientación del huso. En la Tabla 3.7 se recogen los resultados de la cuantificación de cuerpos apoptóticos y del defecto en la orientación del huso mitótico en embriones de ambos genotipos.

Resultados

| Genotipo | Cuerpos apoptóticos persistentes en el embrión | Defecto en la orientación del huso mitótico |
|------------------------------------|--|---|
| <i>ced-3 (n717)</i> | No hay cuerpos apoptóticos (n= 10) | 0 (n=10) |
| <i>ced-3 (n717); ccz-1 (t2129)</i> | No hay cuerpos apoptóticos (n= 17) | 6 (n=19) |

Tabla 3.7. Cuantificación de los cuerpos apoptóticos y del defecto en la orientación del huso mitótico, tanto en un mutante *ced-3 (n717)*, como en un doble mutante *ced-3 (n717); ccz-1 (t2129)*.



Vídeo 3.3. Microscopia en 4D de un doble mutante *ced-3 (n717); ccz-1 (t2129)*. En las imágenes del embrión del doble mutante se ha marcado con un punto rojo la célula que se sigue, la célula ABplpppap, la cuál al dividirse produce la célula hija ABplpppap, que a diferencia de comenzar la apoptosis como en un embrión silvestre, permanece viva durante 3 horas.

8. Análisis de la sobreexpresión de RAB-7 en un mutante *ccz-1 (t2129)*

Posteriormente, se realizó un análisis funcional para observar cómo afectaba a un mutante del gen *ccz-1* la sobreexpresión de la GTPasa RAB-7. Para ello se llevó a cabo la expresión del gen *rab-7*, bajo el promotor de *ced-1*, en un fondo mutante *ccz-1 (t2129)*. Después se realizó, mediante microscopía Nomarski, la cuantificación del número de cuerpos apoptóticos presentes en la gónada del hermafrodita adulto a las 24 horas posteriores al estadio larvario L4. En la Tabla 3.8 se recogen los datos obtenidos de dicha cuantificación, así como la de los dos controles, tanto el silvestre con la sobreexpresión del gen *rab-7*, como el mutante *ccz-1 (t2129)*. Se puede apreciar que la sobreexpresión de *rab-7* en un fondo mutante *ccz-1 (t2129)* conduce a una disminución parcial del número de cuerpos apoptóticos en la gónada del hermafrodita adulto, en comparación con el mutante *ccz-1 (t2129)*.

| Genotipo | Número de cuerpos apoptóticos (DIC) en la gónada del hermafrodita adulto (24 h post L4) |
|---|---|
| <i>wt; Pced-1::yfp::rab-7</i> | 2.12 + 1.65 (n=17) |
| <i>ccz-1 (t2129)</i> | 11.3 ± 4.0 (n=23) |
| <i>ccz-1(t2129); pced-1::yfp::rab-7</i> | 7.64 + 3.52 (n=25) |

Tabla 3.8. Cuantificación de los cuerpos apoptóticos de la gónada del hermafrodita adulto en un mutante *ccz-1 (t2129)* tras la sobreexpresión de RAB-7 bajo el promotor de *ced-1*.

9. Estudio del origen de las vesículas presentes en los embriones de los mutantes *t2129*, *t2070* y *t2170*

En los embriones del mutante *sand-1 (or552)* existen defectos en las últimas etapas de la ruta endocítica, sin embargo los primeros pasos en la endocitosis mediada por receptor son normales. En un cruce entre el mutante *sand-1 (or552)* y la proteína del vitelo VIT-2 fusionada a la proteína GFP (VIT-2::GFP), la endocitosis de VIT-2::GFP es normal. Sin embargo la proteína del vitelo, que sirve para nutrir al embrión, se acumula en las vesículas presentes en los embriones del mutante. Este hecho corrobora el origen endocítico de las vesículas acumuladas en los embriones (Poteryaev et al., 2007).

Se comprobó si, al igual que en el mutante *sand-1 (or552)*, las vesículas presentes en los mutantes *t2129*, *t2070* y *t2170* también eran de origen endocítico y acumulaban las proteínas del vitelo. Se realizó un cruce entre la fusión VIT-2::GFP y el mutante *t2129*. El vitelo aparecía endocitado de forma normal en los oocitos del mutante, sin embargo, permanecía acumulado en las vesículas presentes en los embriones del mutante, como se puede comparar en la Figura 3.58. Por tanto, de forma similar a lo observado en ausencia de SAND-1, la inactivación de la proteína CCZ-1 conduce a un defecto en las etapas posteriores de la endocitosis, mientras que la internalización de solutos en las membranas se conserva de manera normal. La incapacidad de metabolizar correctamente las proteínas del vitelo, que permiten la nutrición del embrión durante la embriogénesis, podría ser una de las principales causas de la alta letalidad embrionaria observada en los mutantes *t2129*, *t2070* y *t2170*.

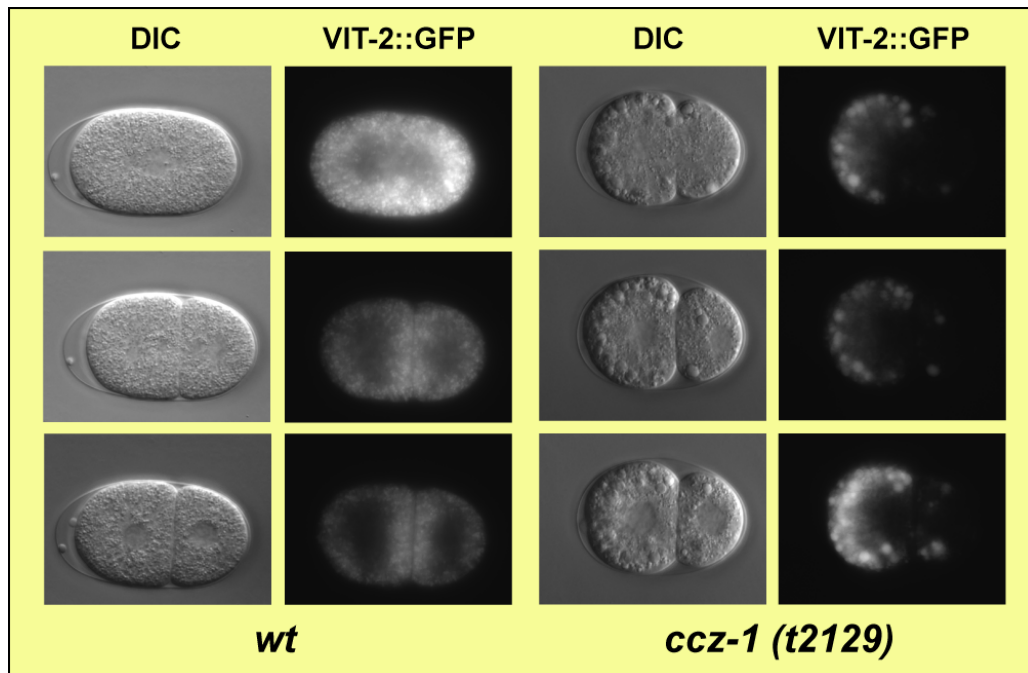


Figura 3.58. Acumulación de la proteína del vitelo VIT-2::GFP en las vesículas de tipo endocítico del mutante *t2129*. En un silvestre, la proteína del vitelo se reparte de forma uniforme en el citoplasma del embrión. Sin embargo, en un mutante *t2129*, la proteína VIT-2::GFP es acumulada en las vesículas endocíticas presentes en el embrión, lo que indica un defecto en las etapas posteriores de la ruta de endocitosis.

10. Observación de la biogénesis de los lisosomas mediante tinción con naranja de acridina

La tinción con naranja de acridina permite teñir selectivamente aquellos orgánulos acidificados, como por ejemplo, los lisosomas; de forma que dichos orgánulos adquieren fluorescencia verde al observarlos bajo la luz UV en el microscopio. En un adulto silvestre, los lisosomas aparecen fluorescentes tras la tinción con naranja de acridina. En cambio, en un mutante *rab-7 (ok511)* existen defectos en la biogénesis de los lisosomas, ya que la tinción con naranja de acridina es negativa, indicando que los lisosomas no están correctamente formados en el mutante.

Resultados

Se comprobó que en un mutante *t2129* también existían defectos en la biogénesis de los lisosomas, ya que al igual que en el mutante *rab-7 (ok511)*, la tinción con naranja de acridina de los lisosomas era negativa (Figura 3.59).

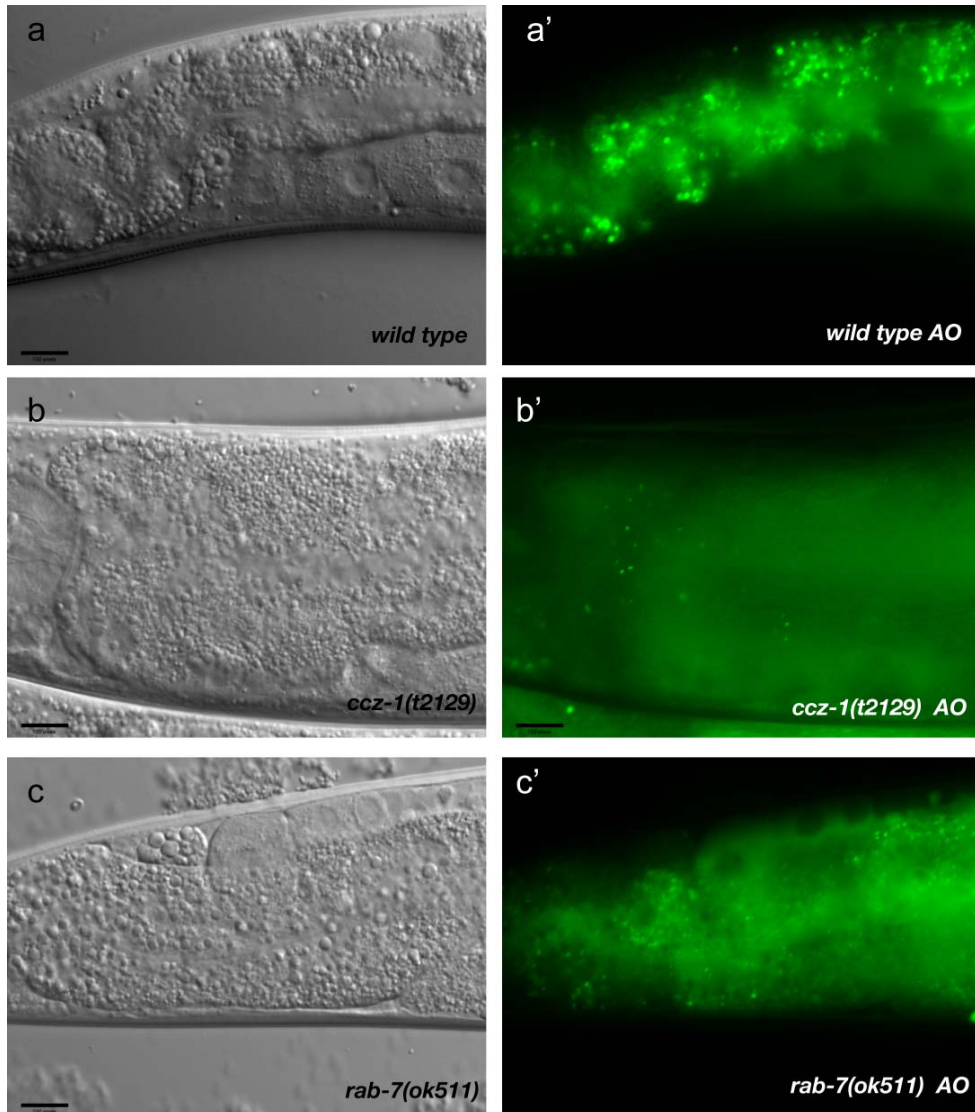


Figura 3.59. Defectos en la biogénesis de los lisosomas observados mediante tinción con naranja de acridina. En un nematodo silvestre la tinción con naranja de acridina marca los lisosomas con fluorescencia verde (a,a'). En cambio, en un mutante *ccz-1(t2129)* (b,b'), así como en un mutante *rab-7(ok511)* (c,c'), la tinción con naranja de acridina resulta negativa para los lisosomas, indicando que existen defectos en la biogénesis de los lisosomas.

11. Análisis del patrón de expresión de CCZ-1::YFP

Posteriormente, con el objetivo de comprender más profundamente la función de la proteína CCZ-1, se realizó la observación mediante microscopía Nomarski del patrón de expresión de la proteína CCZ-1::YFP. Como se puede observar en la Figura 3.60, la proteína CCZ-1::YFP tiene un patrón de expresión amplio. En la microscopía Nomarski sí se puede apreciar su expresión en la faringe y en los núcleos de las células de la hipodermis, en la parte posterior del animal.

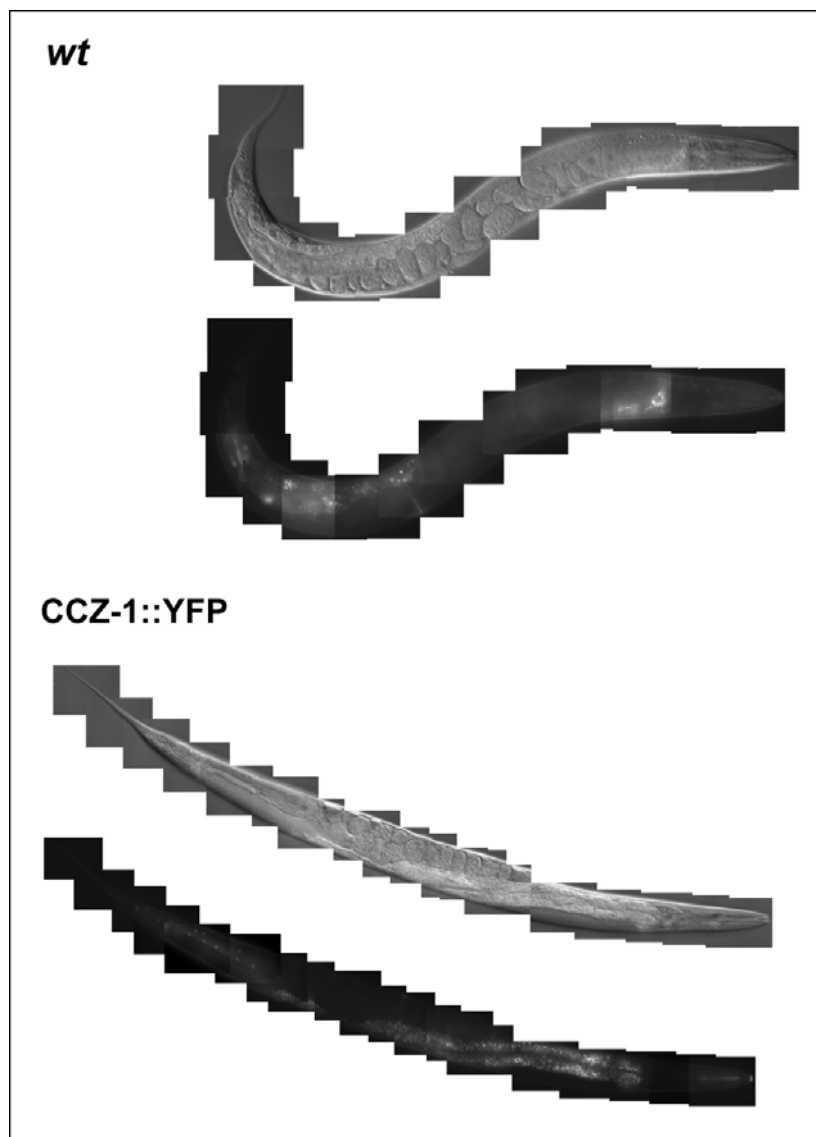


Figura 3.60. Patrón de expresión de la proteína CCZ-1::YFP.

DISCUSIÓN

En el trabajo expuesto en esta memoria se ha realizado fundamentalmente una caracterización genética y fenotípica de tres mutantes de *Caenorhabditis elegans*, que constituyen una serie alélica que afecta al gen *ccz-1*: *ccz-1 (t2070)*, *ccz-1 (t2129)* y *ccz-1 (t2170)*. A través de esta caracterización se ha podido identificar al gen *ccz-1* como uno de los genes implicados en la ruta de degradación de los cuerpos apoptóticos.

1. Los mutantes *t2129*, *t2070* y *t2170* de *C. elegans* tienen mutado el gen *ccz-1*

La caracterización fenotípica y genética de los mutantes *t2129*, *t2070* y *t2170* de *C. elegans* permitió descubrir que estas tres mutaciones estaban afectando al gen *ccz-1*. Tanto en los embriones homocigóticos de los mutantes, como en la gónada del hermafrodita adulto de animales homocigóticos maternalmente rescatados, existía una acumulación de cuerpos apoptóticos. Se corroboró que, efectivamente, los corpúsculos que se acumulaban eran células apoptóticas, mediante la construcción del doble mutante en el que además de estar mutado el gen *ccz-1*, estaba mutado el gen que codifica para la única caspasa de *C. elegans* (*ced-3*): *ced-3 (n717)*; *ccz-1 (t2129)*. En los embriones de este doble mutante no se iniciaba la ruta de la apoptosis, debido a la deficiencia del gen *ced-3*, y por tanto, las células que en un embrión *ccz-1 (t2129)* sufrían apoptosis y se acumulaban como cuerpos apoptóticos, en los embriones del doble mutante, conseguían sobrevivir, sin convertirse en células apoptóticas, de forma que en el doble mutante no existía una acumulación de cuerpos apoptóticos.

Inicialmente, se realizaron varios experimentos que permitieron establecer que los mutantes que afectaban al gen *ccz-1* presentaban un defecto en la degradación de los cuerpos apoptóticos, y no en la fagocitosis de éstos. Por ejemplo, la tinción con naranja de acridina era positiva para los cuerpos apoptóticos de los mutantes, indicando por tanto que estos cuerpos apoptóticos

Discusión

debían estar fagocitados y englobados en endosomas que ya habían comenzado su maduración, acidificándose. De igual forma, la realización de la microscopía electrónica de varias secciones de la gónada de los hermafroditas de estos mutantes, permitió corroborar que los cuerpos apoptóticos acumulados se encontraban fagocitados por las células de la vaina (*sheath cells*) presentes en la gónada. Además, estos cuerpos apoptóticos ya habían comenzado su degradación, ya que eran bastante oscuros al ser visualizados en el microscopio electrónico, debido a la alta densidad electrónica que poseían (Nieto et al., 2010).

Por tanto, el gen *ccz-1* está implicado en la ruta de degradación de cuerpos apoptóticos en *C. elegans*. Este gen codifica una proteína de 528 aminoácidos, la cual, al igual que la proteína SAND-1, está altamente conservada a lo largo de la evolución, encontrándose en todos los eucariotas, desde levaduras e invertebrados, hasta plantas y vertebrados (Cottage y col., 2004; Kinch y Grishin, 2006; Poteryaev y Spang, 2005). Al igual que ocurre en levaduras, en *C. elegans* las proteínas CCZ-1 y SAND-1, homólogas de Ccz1 y Mon1, respectivamente, forman también un complejo proteico, habiendo sido comprobada dicha interacción mediante un ensayo de dos-híbridos (Poteryaev y col., 2007). La proteína SAND-1 de *C. elegans* tiene dos homólogos en humanos, las proteínas MON1A y MON1B. En el extremo N-terminal de la proteína CCZ-1, se ha identificado el dominio CHiPS, conservado en la mayoría de las especies eucariotas y también presente en el gen humano *HPS-4*, el homólogo en humanos de *ccz-1* (Kinch y Grishin, 2006, Hoffman-Sommer y col., 2005).

Este gen humano está implicado en el Síndrome de Hermansky-Pudlak, un conjunto de enfermedades autosómicas recesivas en las cuáles se observa un desorden tanto en el tráfico intracelular de vesículas, como en el transporte de proteínas hasta orgánulos relacionados con los lisosomas. Los síntomas clínicos de este síndrome incluyen una hipopigmentación de la piel y del pelo,

provocada por una alteración de los melanosomas, así como hemorragias producidas por una deficiencia de la función plaquetaria. Algunos tipos de este desorden pueden llegar a desarrollar fibrosis pulmonar y colitis granulomatosa (Hoffman-Sommer et al., 2005). Este dominio CHiPS presente en CCZ-1, podría facilitar la interacción de CCZ-1 con las GTPasas y es estructuralmente similar al extremo N-terminal de la proteína SAND-1, y al dominio μ -adaptina encontrado en los complejos de proteínas adaptadoras de clatrina, involucrados en el transporte de proteínas a diferentes orgánulos (Kinch y Grishin, 2006).

En levaduras, una deficiencia en Ccz1p provoca un fenotipo típico de mutantes de las proteínas *vps* de clase B, que se caracteriza por una morfología vacuolar anormal, con vacuolas altamente fragmentadas, y además genera marcados defectos en la ruta endocítica y en el transporte vacuolar (Kucharczyk et al., 2000). Adicionalmente, las cepas deficientes en esta proteína presentan defectos en la autofagia y en la degradación de peroxisomas o pexofagia (Wang C.W. et al., 2002). Durante el proceso de fusión del cuerpo multivesicular con la vacuola, la proteína Ccz1p forma un complejo con Ypt7p. Aunque ambos genes no son esenciales para el crecimiento vegetativo, su delección provoca un bloqueo en la formación de esporas. De manera que aquellas células deficientes en Ccz1p inician la meiosis, pero se quedan detenidas durante la profase I, incapaces de proseguir la primera división meiótica. Además, estas células presentan defectos en la formación del huso mitótico y en la separación de los cuerpos polares del huso mitótico (*Spindle Pole Bodies*) (Piekarska et al., 2010).

De manera general, la fusión de membranas requiere un acercamiento de ambas membranas lipídicas, su interacción y la formación de un estado de hemifusión, seguido de la generación de un poro de fusión. Todos estos estados son realizados de forma que se minimice la exposición de las partes no polares de las membranas al espacio acuoso que les rodea (Jahn et al., 2003). En levaduras, la fusión de vesículas con la vacuola, que es un proceso similar a la fusión del fagosoma con el lisosoma que se produce en otros organismos, como

Discusión

por ejemplo en *C. elegans*, conlleva cuatro fases diferenciadas: la de iniciación, la de contacto, la de anclaje y por último, la de fusión. En la Figura 4.1 se recoge un esquema que resume las cuatro fases que se llevan a cabo durante la fusión de membranas. Como se puede apreciar, durante la primera fase de iniciación, se realiza el reclutamiento de diferentes proteínas sobre la membrana de las vesículas que van a fusionarse, las cuáles permiten que la fusión se realice de forma específica con aquéllas vesículas que han sido marcadas previamente. Durante esta fase se requiere la hidrólisis de ATP, mediada por las proteínas SM (Sec-1/Munc-18), las cuáles activan a las proteínas SNARE. La proteína Vps33p del complejo HOPS pertenece a la familia de las proteínas SM que activan a las proteínas SNARE. Éstas últimas, tras su activación, formarán unos complejos trans-SNARE, los cuáles son tan estables que permiten superar la barrera energética que conlleva la fusión de las membranas (Jahn et al., 2003; Brett et al., 2008). Posteriormente, se establece el contacto entre varias moléculas de las dos membranas de los orgánulos que participan en la fusión, estando este contacto promovido por la GTPasa Ypt7, homóloga de la proteína Rab-7 de *C. elegans* (Wang C.W. et al., 2003). Durante la fase de anclaje, se producen varios cambios conformacionales mediados por la proteína activada Ypt7-GTP, así como por el complejo Vps-C/HOPS (Wang C.W. et al., 2002; Wang et al., 2003). Uno de estos cambios conformacionales es la transformación del complejo trans-SNARE en el complejo cis-SNARE, el cuál permite la formación del poro de fusión y por último, la fusión entre las membranas. Finalmente, el complejo cis-SNARE deberá ser desensamblado para poderse activar nuevamente en una futura fusión entre membranas (Jahn et al., 2003; Nickerson et al., 2009).

En levaduras, se ha comprobado que el complejo Mon1/Ccz1 también es requerido en las fases de contacto y anclaje de las vesículas, durante su fusión con la vacuola, mediando posiblemente la asociación de las proteínas SNARE, ya que se observó que en ausencia de Ccz1 o Mon1, el complejo cis-SNARE no se formaba correctamente (Wang C.W. et al., 2003). El complejo Ccz1/Mon1

estaría estabilizando la interacción entre las proteínas C-Vps del complejo HOPS y la proteína SNARE Vam3 (Wang C.W. et al., 2003). El complejo HOPS actúa como una chaperona, corrigiendo la estructura del complejo trans-SNARE, por tanto, si existe una deficiencia del complejo Ccz1/Mon1, la actividad del complejo HOPS podría no ser eficiente, no permitiéndose una correcta fusión entre membranas (Starai et al., 2008).

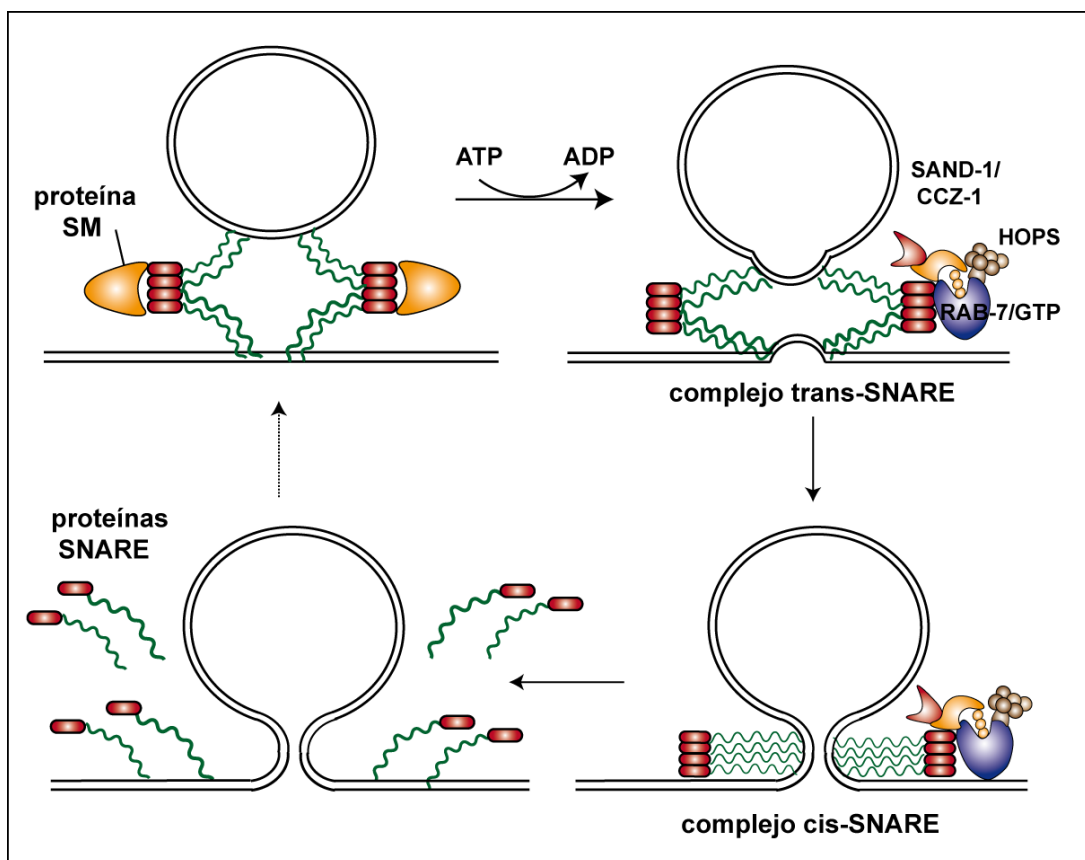


Figura 4.1. Esquema de las distintas fases de la fusión de membranas. Durante la primera fase de marcaje, se produce la activación de las proteínas SNARE mediada por las proteínas SM (Sec-1/Munc-18), a través de la hidrólisis de ATP. Se forman un complejo trans-SNARE muy estable, para superar la barrera energética de la fusión. La proteína RAB-7/GTP, el complejo HOPS y el complejo SAND-1/CCZ-1 participan en la formación del complejo cis-SNARE, que permite la fusión de las membranas. Por último se lleva a cabo el desensamblaje del complejo cis-SNARE, para que se pueda iniciar posteriormente una nueva fusión entre membranas.

2. Localización y función del complejo SAND-1/CCZ-1 en la ruta de degradación de los cuerpos apoptóticos

Los resultados obtenidos en este trabajo permiten situar al complejo SAND-1/CCZ-1 en la ruta de degradación de cuerpos apoptóticos de *C. elegans*. Otros estudios realizados previamente habían permitido la identificación de varios de los componentes de dicha ruta bioquímica. El primer componente de la ruta de maduración de los fagosomas, que permite la degradación de los cuerpos apoptóticos, es la GTPasa DYN-1 (Yu et al., 2006; Yu et al., 2008). Posteriormente, se sitúa en dicha ruta la quinasa específica de fosfatidilinositol, VPS-34, la cuál favorece el reclutamiento de la GTPasa RAB-5, mediante la producción sobre la superficie de los fagosomas de moléculas de fosfatidilinositol-3-fosfato, que atraen a las proteínas efectoras de RAB-5. Dichas proteínas efectoras normalmente poseen un dominio FYVE o PX, el cuál se une a los fosfatidilinositol-3-fosfato generados por VPS-34. La proteína RAB-5 es activada al producirse la sustitución del GDP por GTP (Kinchen et al., 2008).

Durante la progresión en la ruta se produce un intercambio progresivo de moléculas de RAB-5 por RAB-7 sobre la superficie de los fagosomas que contienen los cuerpos apoptóticos (revisado por Kinchen y Ravichandran, 2008). Los resultados obtenidos en este proyecto, corroborados por investigaciones realizadas por otros grupos de investigación, permiten situar al complejo formado por las proteínas CCZ-1 y SAND-1, en este punto de la ruta de degradación de cuerpos apoptóticos, interviniendo en el intercambio que se produce entre ambas GTPasas, RAB-5 y RAB-7 (Kinchen y Ravichandran, 2010; Nieto et al., 2010; Nordmann et al., 2010; Poteryaev et al., 2010).

Con objeto de intentar averiguar la posición de la proteína CCZ-1 en la ruta bioquímica de la degradación de cuerpos apoptóticos, se realizó inicialmente una comparación de la localización de las proteínas VPS-34,

RAB-5 y RAB-7, entre un fondo mutante *ccz-1(t2129)* y un fondo silvestre, mediante la observación al microscopio de construcciones fluorescentes derivadas de estas proteínas, o relacionadas con su actividad. Como fue descrito con anterioridad en esta memoria, se observó que la localización de la quinasa VPS-34, visualizada mediante el reclutamiento de la construcción YFP::2XFYVE sobre la superficie de los fagosomas, no se veía alterada en el mutante *ccz-1 (t2129)*. Esto indicaba que la quinasa VPS-34 estaba situada por encima de la proteína CCZ-1 en la ruta bioquímica. Además, en la cuantificación realizada del porcentaje de reclutamiento de YFP::2XFYVE sobre los fagosomas se constató que este porcentaje era superior al obtenido en un fondo silvestre. Este dato podría indicar que, en el mutante del gen *ccz-1*, la actividad de VPS-34 es superior a la del silvestre, o que los fosfatidilinositol-3-fosfato, que son generados por la quinasa, se mantienen en la superficie del fagosoma de manera más prolongada. La proteína CCZ-1 podría estar afectando bien directamente, o bien indirectamente, a través de otras proteínas de la ruta, al recambio de los fosfatidilinositol-3-fosfato situados en la superficie de los fagosomas. De manera que la ausencia de CCZ-1 en el mutante, provocase una disminución en la velocidad de este recambio, en comparación con el silvestre, y por tanto, una acumulación ligeramente mayor de los fosfatidilinositol-3-fosfato en la membrana de los fagosomas.

A continuación, se comprobó que la localización de la proteína YFP::RAB-5 no se modificaba en el mutante, produciéndose un aumento en el porcentaje de su reclutamiento sobre los fagosomas, en comparación con el silvestre. Este resultado indicaba que la GTPasa RAB-5 se encontraba situada por encima de CCZ-1 en la ruta bioquímica. Sin embargo, la proteína CCZ-1 podría estar implicada en el intercambio de RAB-5 por RAB-7 u otras proteínas localizadas en la membrana de los fagosomas, explicándose así el acúmulo de RAB-5 en la superficie de los fagosomas, que era observado en el mutante. Por último, aunque la proteína YFP::RAB-7 sí se localizaba correctamente en un mutante *ccz-1 (t2129)*, la intensidad de la fluorescencia de los halos que formaba esta proteína sobre los fagosomas era mucho menor en el mutante

Discusión

que en un silvestre. Asimismo, el porcentaje de reclutamiento de esta proteína también era significativamente menor en el mutante. Estos resultados sugieren que la proteína CCZ-1 actúa por encima de la proteína RAB-7 en la ruta, ya que una deficiencia de su función estaba dificultando el reclutamiento de RAB-7. No obstante, el reclutamiento de RAB-7 no parecía depender exclusivamente de la funcionalidad de CCZ-1, ya que en el mutante se seguía observando una localización parcial de dicha proteína sobre los fagosomas.

Seguidamente, se realizó una cuantificación de los cuerpos apoptóticos presentes en la gónada de los mutantes *ccz-1 (t2129)* adultos, tras la inactivación de diferentes genes de la ruta de maduración de los fagosomas. La inactivación del gen *vps-34* mediante RNAi en un fondo mutante *ccz-1 (t2129)* no conllevó un incremento en el número de cuerpos apoptóticos que eran acumulados en la gónada, con respecto al mutante *ccz-1 (t2129)*. De igual forma, la acumulación de cuerpos apoptóticos observada en un mutante *ccz-1 (t2129)*, en el cuál se había realizado la inactivación del gen *rab-7*, no era superior a la provocada únicamente por la deficiencia del gen *rab-7* en un fondo silvestre. Estos datos permitían hipotetizar que las tres proteínas, VPS-34, RAB-7 y CCZ-1, estaban situadas en una ruta bioquímica lineal, ya que el efecto de su inactivación no era aditivo.

Posteriormente, se realizó el análisis de la localización de la proteína CCZ-1::YFP, y se pudo reafirmar que CCZ-1 estaba situada por debajo de RAB-5 y por encima de RAB-7 en la ruta bioquímica de degradación de los cuerpos apoptóticos. De forma que la inactivación, mediante RNAi, de aquellos componentes situados por encima en la ruta (genes *dyn-1*, *vps-34*, *rab-5*), provocaba una anulación de la localización de CCZ-1::YFP sobre la superficie de los fagosomas. Asimismo, la inactivación por RNAi del gen *sand-1* también alteraba la localización de la proteína CCZ-1::YFP en los fagosomas. Al estar formando un complejo proteico CCZ-1 y SAND-1, es lógico suponer que ambas proteínas se requieran la una a la otra para poder localizarse de manera correcta (Poteryaev et al., 2007).

Por el contrario, la inactivación de *rab-7* mediante RNAi permitía un reclutamiento correcto de CCZ-1::YFP sobre los fagosomas, lo cuál indicaba que RAB-7 se encontraba situada por debajo de CCZ-1 en la ruta bioquímica. Por otra parte, la inactivación mediante RNAi de algunos de los genes que conforman el complejo HOPS, en concreto los genes *vps-11*, *vps-16* y *vps-18*, permitían la localización de CCZ-1::YFP sobre los fagosomas, sin embargo, el reclutamiento de dicha proteína se veía parcialmente alterado. Este resultado permite hipotetizar que, a pesar de que el complejo HOPS está situado por debajo de RAB-7 y del complejo CCZ-1/SAND-1 en la ruta, podría también tener una función retroactiva sobre CCZ-1, por ejemplo, facilitando la estabilización de la proteína sobre la superficie de los fagosomas. Esta estabilización podría ser a nivel estructural, facilitando la unión de CCZ-1 a RAB-7, permitiendo el anclaje de CCZ-1 a la membrana del fagosoma, etc.

Adicionalmente, fue realizado un análisis funcional en el cuál se sobreexpresó la GTPasa RAB-7 en las células que fagocitan los cuerpos apoptóticos, expresándola bajo el promotor *ced-1*, en un fondo mutante *ccz-1 (t2129)*. Previamente se había descrito en otros estudios que, mediante la sobreexpresión del gen *ced-10*, se podía generar una ganancia de función para la GTPasa CED-10, de forma que se pudiesen suplir a nivel funcional la deficiencia de genes que estuviesen situados por encima de *ced-10* en la ruta de fagocitosis de los cuerpos apoptóticos (Reddien y Horvitz, 2000; Cabello et al., 2010). Por tanto, si RAB-7 se encontraba situada en una posición posterior a la de CCZ-1 en la ruta de degradación de cuerpos apoptóticos, era lógico suponer que una sobreexpresión del gen *rab-7*, podría suplir parcialmente a nivel funcional la deficiencia del gen *ccz-1* que existía en el mutante *ccz-1 (t2129)*. Como se había hipotetizado, al realizar la cuantificación de cuerpos apoptóticos presentes en la gónada del hermafrodita adulto, se observó que la sobreexpresión de *rab-7* generaba una disminución significativa en este número de cuerpos apoptóticos del mutante *ccz-1 (t2129)*. Este dato permitía confirmar que la proteína RAB-7 se encontraba por debajo de la proteína CCZ-1 en la ruta de degradación de los cuerpos apoptóticos (Nieto et al., 2010).

Discusión

De igual modo a lo que ocurre en *C. elegans*, en levaduras se había observado que una sobreexpresión de *YPT7* provocaba una supresión parcial del fenotipo ocasionado por la delección de *CCZ1* (Kucharczyk et al., 2001).

En levaduras, se había comprobado que ambos complejos, Ccz1/Mon1 y HOPS interaccionan en ensayos de dos-híbridos y que la localización vacuolar del complejo Ccz1/Mon1 se veía alterada en aquellas cepas que tenían deleccionado algunos de los siguientes genes incluidos en el complejo HOPS (Vps11, Vps16 y Vps18), mientras que si se eliminaban las proteínas Vps39 o Vps41 del complejo HOPS, la asociación de Ccz1/Mon1 con la vacuola se veía incrementada. Por tanto, parecía existir una regulación a dos niveles diferentes del complejo HOPS sobre el complejo Ccz1/Mon1 (Wang C.W. et al., 2003).

Otros estudios han permitido establecer que la proteína SAND-1, forma un complejo proteico junto con CCZ-1 y actúa como un interruptor en la transición entre endosomas tempranos y tardíos (Poteryaev et al., 2010). En los endosomas situados en los coelomocitos de *C. elegans*, el mecanismo que impulsa dicha transición es la conversión entre proteínas Rab, es decir el intercambio entre las GTPasas RAB-5 y RAB-7 en la superficie del endosoma (Poteryaev et al., 2010). La proteína SAND-1 posee una función dual en este mecanismo de intercambio. Por una parte permite la interrupción de la retroalimentación positiva que participa en la activación de RAB-5, mediante un desplazamiento de la proteína Rabex5 desde las membranas endosomales. Se hipotetiza que Rabex5 podría estar actuando como un factor activador GEF de RAB-5, por tanto SAND-1, al promover su desplazamiento estaría participando en la desactivación de RAB-5. Por otra parte, SAND-1 estaría implicada en el reclutamiento y activación de RAB-7. Dado que en levaduras, Mon1, el homólogo de SAND-1, interacciona específicamente con miembros del complejo CORVET, pero no interacciona directamente con la subunidad Vps39, presente en el complejo HOPS, se cree que Mon1 podría estar favoreciendo la conversión del complejo CORVET en el complejo HOPS (Poteryaev et al., 2010).

El complejo CORVET de levaduras está formado por cuatro proteínas VPS que conforman su núcleo: Vps11, Vps16, Vps18 y Vps33, así como otras dos subunidades accesorias, las proteínas Vps3 y Vps8. Es posible que el complejo CORVET también exista en *C. elegans* y en mamíferos, ya que la mayoría de estas proteínas han sido conservadas altamente a lo largo de la evolución. El complejo HOPS a su vez está formado igualmente por las mismas cuatro proteínas VPS del núcleo del complejo CORVET, pero substituye las subunidades accesorias por otras dos proteínas diferentes, Vps39 y Vps41 (Peplowska et al., 2007). El complejo CORVET interacciona con Vps21, homólogo de RAB-5, para regular la biogénesis de los endosomas tempranos; mientras que el complejo HOPS interacciona con Ypt7, homólogo de RAB-7, para controlar la fusión de membranas entre los endosomas tardíos y los lisosomas (Peplowska et al., 2007). El complejo HOPS se encuentra regulado mediante fosforilación, ya que la quinasa vacuolar Yck3 fosforila a la proteína Vps41, modulando la fusión vacuolar (Cabrera et al., 2009). Además, la quinasa Yck3 controla la fosforilación de otra diana de Rab7/Ypt7, la proteína SNARE Vam3. Por otra parte, la proteína Gyp7 de levaduras, cuyo homólogo en mamíferos es el producto del gen TBC1D15, está actuando como el factor inactivador GAP de Rab7, pero también es capaz de estimular la fosforilación de Vps41 mediada por Yck3 (Zhang et al., 2005; Brett et al., 2008; Wang et al., 2011).

El complejo SAND-1/CCZ-1 podría estar activando al complejo HOPS, y éste podría estar actuando como factor activador GEF de RAB-7 (Poteryaev et al., 2010). Adicionalmente, el complejo SAND-1/CCZ-1 estaría implicado también en la conversión de proteínas Rab sobre la superficie de los fagosomas, permitiendo la maduración de éstos. Dicho complejo podría actuar como un interruptor en la ruta bioquímica, siendo capaz de controlar la localización de los factores activadores GEF de RAB-5 y RAB-7 (Poteryaev et al., 2010). Por otra parte, otros estudios sugieren que el complejo Mon1/Ccz1 actúa en levaduras directamente como el factor activador GEF de Rab7/Ypt7, promoviendo el intercambio de nucleótidos en Ypt7, de manera independiente al complejo HOPS/Vps39 (Nordmann et al., 2010).

Discusión

Sin embargo, parece que el complejo HOPS podría estar mediando la correcta localización del complejo Mon1/Ccz1 en levaduras, hecho que concuerda con la disminución del porcentaje de reclutamiento de CCZ-1::YFP sobre los fagosomas en *C. elegans*, observada tras realizar la inactivación de varios genes del complejo HOPS mediante RNAi (Nordmann et al., 2010, Nieto et al., 2010). Los ensayos de dos-híbridos y de tres-híbridos entre las proteínas Mon1a, Ccz1, Ypt7 y Rab5, los homólogos en levadura de SAND-1, CCZ-1, RAB-7 y RAB-5, respectivamente, permitieron elucidar las interacciones que se producían entre dichas proteínas y establecer un modelo hipotético (Kinchen y Ravichandran, 2010). En estos ensayos, se observó que Mon1 podría estar asociándose simultáneamente a Ccz1 y a Rab5-GTP, la forma activada de Rab5, de forma que Rab5 se uniría al extremo C-terminal de Mon1, y Ccz1 a la región N-terminal de Mon1. Se comprobó que la proteína Ccz1 de forma individual no interacciona directamente con Rab5, ni tampoco con Ypt7. Se hipotetizó por tanto, la posibilidad de que el complejo Mon1/Ccz1 fuese capaz de generar un sitio de interacción a Ypt7, actuando de esta forma como un puente de unión entre la proteína Rab5 activada y el reclutamiento de Ypt7 (Kinchen y Ravichandran, 2010). Adicionalmente, la expresión de Mon1 y Ccz1 podría estar facilitando la disociación entre Ypt7 y su inhibidor RabGDI. Este inhibidor es capaz de mantener inactiva la proteína Ypt7, impidiendo el intercambio de nucleótidos y la activación de Ypt7 al unirse a GTP. De esta manera, el complejo Mon-1/Ccz1 sería capaz de regular tanto la activación de Ypt7, como su reclutamiento sobre los fagosomas (Nordmann et al., 2010; Kinchen y Ravichandran, 2010). En la Figura 4.2 se puede observar un esquema que representa la interacción que podría existir entre el complejo SAND-1/CCZ-1 y las GTPasas RAB-5 y RAB-7, junto con sus activadores GEF y sus inhibidores, así como con el complejo HOPS.

Aparte de su función en la maduración de fagosomas, mediante su interacción con el complejo Mon-1/Ccz-1 y el complejo HOPS, Ypt7 interviene en numerosos procesos celulares, constituyéndose como un regulador central del tráfico de membranas endo-lisosomales (revisado por Wang et al., 2011).

Por ejemplo, Rab7/Ypt7 interacciona con las proteínas RILP (*Rab7-interacting lysosomal protein*) y ORP1L, para formar el complejo Rab7/RILP/ORP1L, el cuál interacciona con moléculas de dinactina y dineína. Esta interacción proteica permite el control del transporte dirigido de vesículas endosomales, hacia los extremos negativos de los microtúbulos o hacia el retículo endoplasmático, dependiendo de los niveles celulares de colesterol (Jordens et al., 2001; revisado por Wang et al., 2011). Adicionalmente, la proteína Rab7 interacciona con la cascada de señalización FYCO1, implicándose en el movimiento dirigido de vesículas endosomales hacia los extremos positivos de los microtúbulos (Pankiv et al., 2010). Por otra parte, el complejo Rab7/RILP/ORP1L, también es capaz de interactuar con la proteína VAP del retículo endoplasmático, regulando el contacto entre la membrana endosomal y el retículo endoplasmático (Rocha et al., 2009).

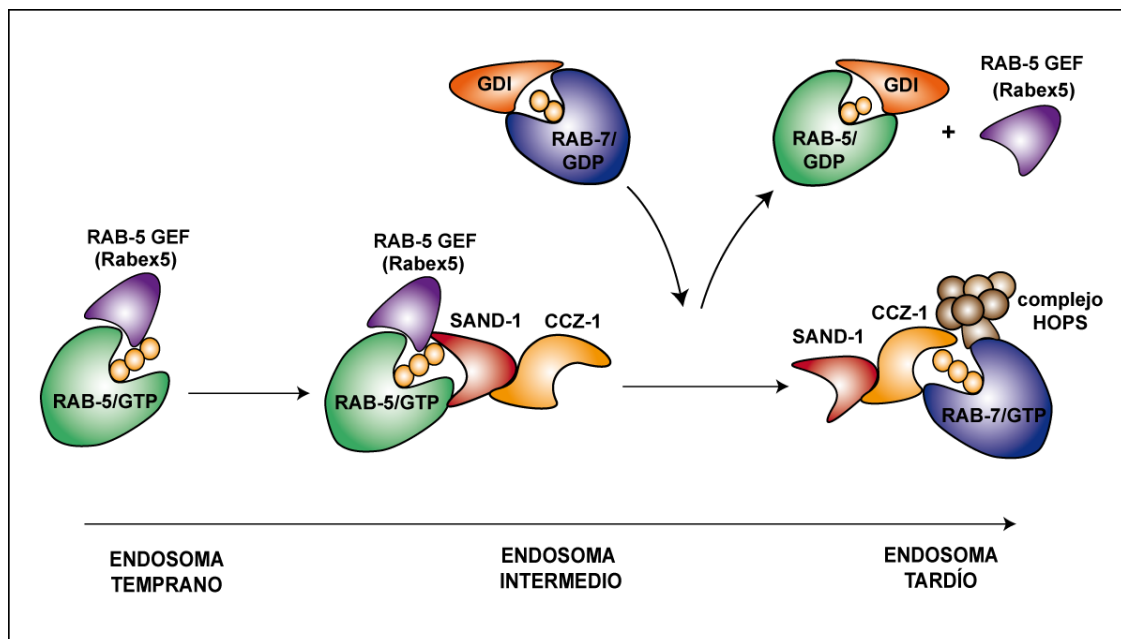


Figura 4.2. Modelo de interacción proteica entre RAB-5, RAB-7, el complejo SAND-1/CCZ-1 y el complejo HOPS en la ruta de maduración de los fagosomas. El complejo SAND-1/CCZ-1, en colaboración con el complejo HOPS, está facilitando el intercambio de la GTPasa RAB-5-GTP por RAB-7-GTP en la membrana de los endosomas, permitiendo su maduración. El complejo SAND-1/CCZ-1 también favorece la inactivación de RAB-5, mediante un desplazamiento de la proteína activadora GEF de RAB-5 (posiblemente Rabex5), así como la activación de RAB-7, provocando la disociación entre RAB-7-GDP inactivada y su inhibidor GDI.

Recientemente, se ha descubierto que diversas mutaciones en el gen *rab-7* de humanos podrían conducir al desarrollo de la enfermedad Charcot-Marie-Tooth de tipo 2B, la cuál se trata de una neuropatía axonal, que es autosómica dominante. Los síntomas clínicos de esta enfermedad son: debilidad muscular, pérdida sensorial y úlceras en los pies, las cuáles pueden sufrir infecciones, hasta el punto que a veces estos enfermos deben sufrir la amputación de algunos dedos de sus pies. Aunque aún se desconoce el mecanismo exacto por el cuál las mutaciones en el gen *rab-7* están implicadas en la etiología de esta enfermedad, diversos estudios han permitido sugerir que estas mutaciones podrían estar alterando a las rutas de señalización TrkA y Erk1/2 o bien al transporte retrógrado axonal en las neuronas (Cogli et al., 2009; BasuRay et al., 2010).

3. Implicación del gen *ccz-1* en la ruta endocítica y en la biogénesis de los lisosomas

Para poder comprender el origen de las vesículas presentes en los embriones de los mutantes *ccz-1 (t2129)*, *ccz-1 (t2070)* y *ccz-1 (t2170)*, se llevó a cabo un análisis de la endocitosis de la proteína del vitelo VIT-2::GFP. Se observó que en un mutante *ccz-1 (t2129)*, la endocitosis de VIT-2::GFP era normal, ya que se acumulaba en las vesículas del embrión del mutante. Este resultado, similar al observado en embriones del mutante *sand-1 (or552)*, indica que las vesículas que se acumulan en los embriones de estos mutantes son de origen endocítico, ya que las primeras etapas de la endocitosis mediada por receptor no se ven alteradas al existir una deficiencia en ambos genes, *ccz-1* o *sand-1*. Por el contrario, en estos mutantes se ve alterada la fase posterior de la ruta endocítica, ya que tras una correcta internalización de los solutos, éstos son acumulados en vesículas endocíticas, que no son capaces de progresar en la ruta (Poteryaev et al., 2007; Nieto et al., 2010).

La acumulación de las proteínas nutritivas del vitelo no permite la correcta metabolización de éstas y podría ser la causa principal de la alta letalidad embrionaria observada en los mutantes *t2129*, *t2070* y *t2170*, ya que los embriones podrían estar muriendo por falta de nutrientes. Sin embargo, algunos de estos embriones podrían morir por otras razones, como por ejemplo, el defecto en la orientación del huso mitótico de los blastómeros EMS y Abar observado en algunos embriones de estos mutantes.

Por otra parte, el gen *ccz-1* también está implicado en la biogénesis de los lisosomas, de forma similar a los genes *rab-7* y *vps-18*, pero a diferencia del gen *sand-1* (Poteryaev et al., 2007; Yu et al., 2008; Xiao et al., 2009). Los lisosomas se tiñen selectivamente con naranja de acridina, ya que éste tiñe específicamente aquellos orgánulos acidificados. Mientras que en un animal silvestre, los lisosomas adquieren fluorescencia al teñirlos con el naranja de acridina, en mutantes *rab-7 (ok511)* y *vps-18 (tm1125)*, los lisosomas no son capaces de teñirse con esta tinción, ya que la formación de los lisosomas está alterada en dichos mutantes. Al realizar una tinción con naranja de acridina de los lisosomas del mutante *ccz-1 (t2129)* se observó que era igualmente negativa, indicando por tanto que el gen *ccz-1* también está implicado en la ruta de biogénesis de los lisosomas (Yu et al., 2008; Xiao et al., 2009; Nieto et al., 2010).

4. Relación entre el complejo SAND-1/CCZ-1 y la ruta de señalización Wnt

Las glicoproteínas de la familia Wnt actúan como ligandos extracelulares que son capaces de regular diversos procesos biológicos, entre los que se incluyen la proliferación celular, la diferenciación o la migración celular. Esta ruta de señalización ha sido conservada a lo largo de la evolución, encontrándose homólogos de sus proteínas en diferentes especies, desde *C. elegans* hasta humanos (Coudreuse y Korswagen, 2007).

Discusión

De manera que la alteración de esta ruta de señalización ha sido asociada a numerosas patologías, como por ejemplo el cáncer de colon (Logan y Nusse, 2004; Coudreuse y Korswagen, 2007). En *C. elegans*, la ruta Wnt interviene en numerosos procesos, tales como el control de la orientación del huso mitótico en los blastómeros EMS y ABar, la inducción del endodermo, la diferenciación celular durante la embriogénesis, la polaridad de las células durante el desarrollo de la vulva, la migración de la gónada o la fagocitosis de cuerpos apoptóticos (Eisenmann, 2005; Thorpe et al., 1997; Hardin y King, 2008; Cabello et al., 2010).

Previamente a su secreción, los ligandos Wnt, los cuáles tienen un tamaño de aproximadamente 40 kDa y contienen un gran número de residuos de cisteína, deben seguir un proceso de maduración. Esta maduración incluye importantes modificaciones post-transcripcionales dentro del retículo endoplasmático, como por ejemplo, la N-glicosilación o modificaciones lipídicas, como la palmitoilación (Coudreuse y Korswagen, 2007). Las modificaciones lipídicas son llevadas a cabo fundamentalmente en el retículo endoplasmático, mediante la intervención de la O-acetiltransferasa Porcupina, cuyo homólogo en *C. elegans* es MOM-1, de manera que actúen como una señal de secreción, que permite dirigir a los ligandos Wnt hacia microdominios especializados de la membrana, denominados balsas lipídicas (Yang et al., 2008; Hardin y King, 2008). Posteriormente, los ligandos Wnt son transferidos desde el retículo endoplasmático a la red del trans-Golgi, y a otros compartimentos subcelulares contenidos dentro de la célula secretora (Coudreuse y Korswagen, 2007).

Durante su secreción, los ligandos Wnt, se asocian a lipoproteínas, que permiten el transporte de estos ligandos a través del medio acuoso, para poder ejercer una acción de larga distancia (Panáková et al., 2005). Previamente a su secreción, los ligandos Wnt deben asociarse a una proteína cargo-receptora, que permita su transporte a través del compartimento endosomal y la red trans-Golgi.

La proteína de *Drosophila* Wntless (WTL), cuyo homólogo en *C. elegans* es MIG-14, es una proteína transmembranal multipaso que ha sido conservada a lo largo de la evolución, y fue identificada como posible candidato de proteína cargo-receptora, implicada en la secreción de los ligandos Wnt (Bänziger et al., 2006; Hausmann et al., 2007). Tanto en *C. elegans*, como en *Drosophila*, se observó que la localización y el correcto reciclaje de MIG-14/WTL dependen de la actividad del retrómero, un complejo multiproteico que está mediando el transporte de proteínas desde el endosoma al Golgi. La proteína MIG-14/WTL se encuentra ciclando entre la membrana plasmática y el Golgi, de manera que si existe una alteración del retrómero, se genera una acumulación de la proteína MIG-14/WTL en el endosoma y su posterior degradación en los lisosomas, impidiéndose la correcta secreción de los ligandos Wnt (Coudreuse et al., 2006; Yang et al., 2008; Port et al., 2008).

Hasta el momento, se han identificado cinco ligandos Wnt diferentes en *C. elegans* que actúan sobre el receptor Frizzled MOM-5 de la ruta Wnt, y son los siguientes: MOM-2, EGL-20, LIN-44, CWN-1 y CWN-2 (Korswagen, 2002). Se observó que un defecto en el ligando MOM-2 provocaba una alteración en la orientación del huso mitótico del blastómero ABar, el cuál no se orienta de forma perpendicular al huso mitótico del blastómero EMS como en un embrión silvestre, sino paralelamente. Sin embargo una deficiencia en MOM-2 no implicaba defectos en la fagocitosis de los cuerpos apoptóticos, ni en la migración de la gónada (Cabello et al., 2010). De los cinco ligandos WNT anteriores, solamente aquellos mutantes que afectaban al ligando EGL-20 presentaban defectos en la migración de la gónada. La deficiencia de los otros ligandos no generaba ninguno de los fenotipos anteriormente descritos (Cabello et al., 2010). Por el contrario, en los mutantes del receptor MOM-5, así como en mutantes de la GTPasa CED-10, se observaban defectos tanto en la orientación del huso mitótico del blastómero ABar, como en la fagocitosis de cuerpos apoptóticos o en la migración de la célula distal de la gónada del hermafrodita adulto (Cabello et al., 2010). Se ha hipotetizado que el receptor CED-1 podría estar actuando como un correceptor específico para MOM-5

Discusión

durante la fagocitosis de cuerpos apoptóticos, funcionando MOM-5 como el receptor que activaría la ruta CED-2/CED-5/CED-12 y posteriormente a CED-10, generando una reorganización del citoesqueleto en la célula fagocitaria (Cabello et al., 2010).

En los embriones de los mutantes de *C. elegans* que afectan al gen *ccz-1* (*ccz-1* (t2129), *ccz-1* (t2070) y *ccz-1* (t2170)), y al gen *sand-1*, *sand-1* (ok1963), así como tras la inactivación por RNAi del gen *rab-7*, se pueden apreciar defectos en la orientación del huso mitótico del blastómero ABar similares a los observados en los mutantes de la ruta Wnt o en los mutantes que afectan a CED-10 (Rocheleau et al., 1997; Thorpe et al., 1997, Cabello et al., 2010 Nieto et al., 2010). Por otra parte, se ha comprobado en levaduras que la GTPasa Ypt7, homóloga de RAB-7, interacciona en su forma activada de unión a GTP con el retrómero para intervenir en el reciclaje de proteínas (Balderhaar et al., 2010). Por tanto, una deficiencia en los genes *rab-7*, *ccz-1* o *sand-1*, presentes en la ruta de maduración de los fagosomas, podría impedir el correcto reciclaje de proteínas a través de la vía del retrómero, pudiendo afectar a diversas rutas que dependan de este reciclaje. Una de las rutas que pueden verse afectadas en este caso, es la ruta de señalización Wnt, la cuál depende del retrómero para el reciclaje de la proteína MIG-14/WTL, implicada en la secreción de los ligandos Wnt. Esto explicaría el hecho de que en los mutantes de los genes anteriores (*ccz-1*, *sand-1*, *rab-7*) se puedan observar defectos relacionados con la ruta Wnt, como por ejemplo el defecto en la orientación del huso mitótico del blastómero ABar. En la Figura 4.3 se puede apreciar la posible interacción que podría existir entre el complejo SAND-1/CCZ-1, la GTPasa RAB-7 y el retrómero para facilitar el reciclaje de la proteína MIG-14/WTL.

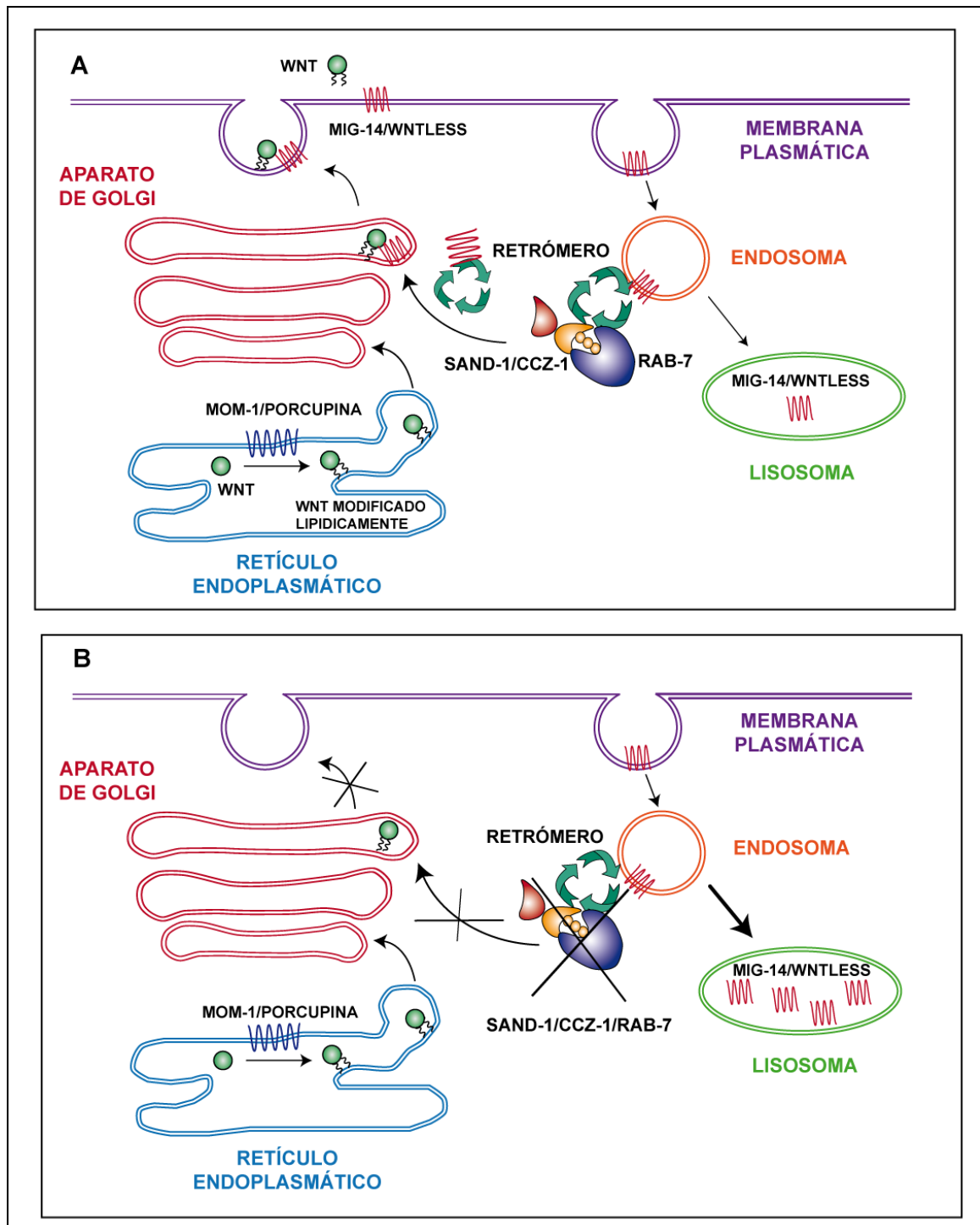


Figura 4.3. Posible interacción entre la ruta Wnt y el complejo SAND-1/ CCZ-1 y RAB-7. En la parte A de la figura se observa cómo se produce la secreción de los ligandos Wnt en un silvestre, de forma que la proteína MOM-1/PORCUPINA interviene en la modificación lipídica de los ligandos Wnt y la proteína MIG-14/Wntless (WTL) permite su correcta secreción. El retrómero, interaccionando con el complejo SAND-1/CCZ-1 y con RAB-7/Ypt7, interviene en el reciclaje de la proteína MIG-14/WTL. En la parte B, se observa, que en el caso de los mutantes que afectan a los genes *ccz-1*, *sand-1* y *rab-7*, se podría estar alterando la función del retrómero en el reciclaje de

Discusión

MIG-14/WTL, de manera que dicha proteína en lugar de reciclarse se estaría degradando en el lisosoma. La falta de reciclaje de MIG-14/WTL estaría provocando entonces una alteración en la secreción de los ligandos Wnt, viéndose afectadas algunas de las funciones que llevan a cabo éstos, como por ejemplo, la orientación del huso mitótico del blastómero ABar, con respecto al del blastómero EMS.

En *C. elegans*, se ha descrito que existen dos tipos diferentes de señales Wnt, las de corta distancia y las de larga distancia. Las señales de corta distancia regulan diferentes procesos, en los cuáles se incluyen la rotación del huso mitótico de los blastómeros EMS y ABar, la diferenciación de los precursores del endodermo o la formación de sinapsis. Las señales de larga distancia controlan entre otros procesos, la migración neuronal, el desarrollo de la vulva o la migración de la gónada (Hardin y King, 2008).

El hecho de que la inactivación de los genes *ccz-1*, *sand-1* y *rab-7*, provoque un defecto en la orientación del huso mitótico durante la embriogénesis, pero por el contrario, no conlleve un defecto en la migración de la célula distal de la gónada, implica que el defecto en la ruta de señalización Wnt observado en los mutantes de *ccz-1*, sólo afectaría a las señales de corta distancia. Es posible, por tanto, que un defecto en el retrómero afecte fundamentalmente a las señales de corta distancia de Wnt. O bien que los genes *ccz-1*, *sand-1* y *rab-7* estén afectando a la ruta Wnt a través de otro mecanismo, independiente del retrómero, y que esta alteración sea específica de las señales de corta distancia, y no afecten a las de larga distancia.

Por otra parte, podría ser que los genes *ccz-1*, *sand-1* y *rab-7* estuviesen afectando, a través del retrómero, a la ruta de reciclaje de algún otro ligando desconocido, diferente a los establecidos en la actualidad. Este ligando podría estar activando al receptor MOM-5, de manera que se iniciara una ruta de señalización específicamente implicada en *C. elegans* tanto en la fagocitosis de cuerpos apoptóticos como en la orientación del huso mitótico del blastómero ABar, pero por el contrario no estuviese afectando a la migración de la célula distal de la gónada del hermafrodita adulto.

En conclusión, en este trabajo se ha realizado una caracterización de la proteína CCZ-1 de *C. elegans*, a través de un estudio en profundidad de los mutantes *t2129*, *t2070* y *t2170*, los cuales están afectados en el gen *ccz-1*. La proteína CCZ-1, conservada a lo largo de la evolución, está implicada en numerosos procesos clave para el correcto desarrollo del organismo. En *C. elegans*, se ha comprobado que la proteína CCZ-1, mediante la formación de un complejo junto con la proteína SAND-1, interviene en la ruta de degradación de cuerpos apoptóticos. Por tanto, en los mutantes del gen *ccz-1*, se produce una acumulación de los cuerpos apoptóticos, que no pueden ser degradados correctamente. Adicionalmente, una deficiencia en esta proteína conlleva defectos en el metabolismo de las proteínas del vitelo, una alta letalidad embrionaria, una alteración en la biogénesis de los lisosomas y posiblemente una afectación de la señalización Wnt, provocándose una incorrecta orientación del huso mitótico del blastómero ABar con respecto al del blastómero EMS, durante la embriogénesis de *C. elegans*.

Por todo ello, esta proteína CCZ-1 juega un papel relevante en importantes procesos biológicos, de manera que su estudio permite descubrir en mayor detalle cómo se producen a nivel bioquímico estos procesos. Dado que las proteínas que conforman la ruta de señalización de la maduración de fagosomas están altamente conservadas a lo largo de la evolución, los estudios realizados en organismos más sencillos, como levaduras, *C. elegans* o *Drosophila*, pueden ser trasladados posteriormente a humanos u otros mamíferos.

Cómo se describió anteriormente, una alteración en la degradación de las células apoptóticas puede producir diversas enfermedades, fundamentalmente enfermedades autoinmunes, entre las que se incluyen el lupus eritematoso sistémico, la anemia grave o la poliartritis crónica. Por lo tanto, un estudio en profundidad de las proteínas implicadas en esta ruta podría permitir en un futuro establecer nuevas dianas farmacológicas y el desarrollo de nuevos fármacos que pudiesen tratar estas enfermedades.

CONCLUSIONES

1. Se ha llevado a cabo la caracterización genética y fenotípica de los mutantes *t2129*, *t2070* y *t2170* de *C. elegans*, descubriendo que el gen afectado en dichos mutantes es el gen *ccz-1*.
2. La proteína CCZ-1 se encuentra conservada a lo largo de la evolución, desde levaduras hasta humanos. En *C. elegans* dicha proteína está implicada en la ruta de degradación de los cuerpos apoptóticos, mediante la formación del complejo SAND-1/CCZ-1.
3. La proteína CCZ-1, al igual que RAB-7 y VPS-18, está involucrada en la biogénesis de los lisosomas, de manera que en los mutantes *t2129*, *t2070* y *t2170* está alterada la formación de los lisosomas.
4. De forma similar a lo observado en los mutantes del gen *sand-1*, en los embriones de los mutantes del gen *ccz-1* existe una acumulación de vesículas de origen endocítico, en las cuales se almacenan las proteínas del vitelo. La incorrecta metabolización de estas proteínas podría ser la causa de la alta letalidad observada en dichos mutantes.
5. La proteína CCZ-1 podría estar relacionada con la ruta de señalización Wnt, ya que en los mutantes *t2129*, *t2070* y *t2170*, se han observado defectos similares a los encontrados en mutantes de la ruta Wnt.

BIBLIOGRAFÍA

- Adams, J.M., and Cory, S. (2001). Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends in Biochemical Sciences* 26, 61–66.
- Adams, J.M. (2003). Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. *Genes and Development* 17, 2481–2495.
- Albertson, D.G., and Thomson, J.N. (1976). The pharynx of *Caenorhabditis elegans*. *Philosophical Transactions of the Royal Society London B. Biological Sciences* 275, 299–325.
- Albertson, D.G. (1984). Formation of the first cleavage spindle in nematode embryos. *Developmental Biology* 101, 61-72.
- Alves da Costa, C., Checler, F. (2011). Apoptosis in Parkinson's disease: Is p53 the missing link between genetic and sporadic Parkinsonism? *Cellular Signaling* 23, 963-8.
- Ankeny, R. (2001). The natural history of *Caenorhabditis elegans* research. *Nature Reviews Genetics* 2, 474-9.
- Awasaki, T., Tatsumi, R., Takahashi, K., Arai, K., Nakanishi, Y., Ueda, R., Ito, K. (2006) Essential role of the apoptotic cell engulfment genes draper and ced-6 in programmed axon pruning during *Drosophila* metamorphosis. *Neuron* 50, 855-67.
- Balderhaar, H.J., Arlt, H., Ostrowicz, C., Bröcker, C., Sündermann, F., Brandt, R., Babst, M., Ungermann, C. (2010). The Rab GTPase Ypt7 is linked to retromer-mediated receptor recycling and fusion at the yeast late endosome. *Journal of Cell Science* 123, 4085-94.
- BasuRay, S., Mukherjee, S., Romero, E., Wilson, M.C., Wandinger-Ness, A. (2010). Rab7 mutants associated with Charcot-Marie-Tooth disease exhibit enhanced NGF-stimulated signaling. *PLoS One* 5, 15351.
- Bänziger, C., Soldini, D., Schütt, C., Zipperlen, P., Hausmann, G., Basler, K. (2006). Wntless, a conserved membrane protein dedicated to the secretion of Wnt proteins from signaling cells. *Cell* 125, 509-22.
- Bei, Y., Hogan, J., Berkowitz, L.A., Soto, M., Rocheleau, C.E., Pang, K.M., Collins, J., Mello, C.C. (2002). SRC-1 and Wnt signaling act together to specify endoderm and to control cleavage orientation in early *C. elegans* embryos. *Developmental Cell* 3, 113-25.
- Bergmann, A., Steller, H. (2010). Apoptosis, stem cells, and tissue regeneration. *Science Signaling* 3, re8.
- Berkowitz, L.A., Strome, S. (2000). MES-1, a protein required for unequal divisions of the germline in early *C. elegans* embryos, resembles receptor tyrosine kinases and is localized to the boundary between the germline and gut cells. *Development* 127, 4419-31.
- Birkeland, H.C. and Stenmark, H. (2004) Protein targeting to endosomes and phagosomes via FYVE and PX domains. *Current topics in microbiology and immunology* 282, 89–115.
- Bonifacino, J.S., Glick B.S. (2004). The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell* 116, 153-66.
- Bos, J.L., Rehmann, H., Wittinghofer, A. (2007). GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell* 129, 865-77.

Bibliografía

- Bouillet, P., Strasser, A. (2002). BH3-only proteins, evolutionarily conserved proapoptotic Bcl-2 family members essential for initiating programmed cell death. *Journal of Cell Science* **115**, 1567–1574.
- Brenner, S. (1974). The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **77**, 71-94.
- Brett, C.L., Plemel, R.L., Lobinger, B.T., Vignali, M., Fields, S., Merz, A.J. (2008). Efficient termination of vacuolar Rab GTPase signaling requires coordinated action by a GAP and a protein kinase. *The Journal of Cell Biology* **182**, 1141-51.
- Briken, V. (2008). Molecular mechanisms of host-pathogen interactions and their potential for the discovery of new drug targets. *Current Drug Targets* **9**, 150-7.
- Brugnera, E., Haney, L., Grimsley, C., Lu, M., Walk, S.F., Tosello-Trampont, A.C., Macara, I.G., Madhani, H., Fink, G.R., and Ravichandran, K.S. (2002). Unconventional Rac-GEF activity is mediated through the Dock180-ELMO complex. *Nature Cell Biology* **4**, 574–582.
- Budihardjo, I., Oliver, H., Lutter, M., Luo, X., Wang, X. (1999). Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **15**, 269-90.
- Cabello, J., Neukomm, L.J., Günesdogan, U., Burkart, K., Charette, S.J., Lochnit, G., Hengartner, M.O., Schnabel, R. (2010). The Wnt Pathway Controls Cell Death Engulfment, Spindle Orientation, and Migration through CED-10/Rac. *PLoS Biology* **8**, e1000297.
- Cabrera, M., Ostrowicz, C.W., Mari, M., LaGrassa, T.J., Reggiori, F., Ungermann, C. (2009). Vps41 phosphorylation and the Rab Ypt7 control the targeting of the HOPS complex to endosome-vacuole fusion sites. *Molecular Biology of the Cell* **20**, 1937-48.
- Cabrera, M., Langemeyer, L., Mari, M., Rethmeier, R., Orban, I., Perz, A., Bröcker, C., Griffith, J., Klose, D., Steinhoff, H.J., Reggiori, F., Engelbrecht-Vandré, S., Ungermann, C. (2010). Phosphorylation of a membrane curvature-sensing motif switches function of the HOPS subunit Vps41 in membrane tethering. *Journal of Cell Biology* **191**, 845-59.
- Cai, H., Reinisch, K., Ferro-Novick, S. (2007). Coats, tethers, Rabs, and SNAREs work together to mediate the intracellular destination of a transport vesicle. *Developmental Cell* **12**, 671-82.
- C. elegans* II. Riddle D.L., Blumenthal T., Meyer B.J., Priess J.R. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997.
- Chekeni, F.B., Ravichandran, K.S. (2011). The role of nucleotides in apoptotic cell clearance: implications for disease pathogenesis. *Journal of Molecular Medicine* **89**, 13-22.
- Chen, F., Hersh, B.M., Conradt, B., Zhou, Z., Riemer, D., Gruenbaum, Y., Horvitz, H.R. (2000). Translocation of *C. elegans* CED-4 to nuclear membranes during programmed cell death. *Science* **287**, 1485–1489.
- Cheng, N.N., Kirby, C.M., Kemphues, K.J. (1995). Control of cleavage spindle orientation in *Caenorhabditis elegans*: the role of the genes *par-2* and *par-3*. *Genetics* **139**, 549-59.
- Chinnaiyan, A.M., O'Rourke, K., Lane, B.R., and Dixit, V.M. (1997). Interaction of CED-4 with CED-3 and CED-9: a molecular framework for cell death. *Science* **275**, 1122–1126.
- Christoforidis, S., Miaczynska, M., Ashman, K., Wilm, M., Zhao, L., Yip, S.C., Waterfield, M.D., Backer, J.M., Zerial, M. (1999). Phosphatidylinositol-3-OH kinases are Rab5 effectors. *Nature Cell Biology* **1**, 249-52.

- Christoforidis, S., McBride, H.M., Burgoyne, R.D., Zerial, M. (1999). The Rab5 effector EEA1 is a core component of endosome docking. *Nature* 397, 621-5.
- Cogli, L., Piro, F., Bucci, C. (2009). Rab7 and the CMT2B disease. *Biochemical Society Transactions* 37, 1027-31.
- Cohen, G.M. (1997). Caspases: the executioners of apoptosis. *The Biochemical Journal* 326, 1-16.
- Cold Spring Harbor Laboratory Worm Course Handbook*. Hengartner M.O. et al., 2000.
- Conradt, B., Horvitz, H.R. (1998). The *C. elegans* protein EGL-1 is required for programmed cell death and interacts with the Bcl-2-like protein CED-9. *Cell* 93, 519-529.
- Conradt, B., Horvitz, H.R. (1999). The TRA-1A sex determination protein of *C. elegans* regulates sexually dimorphic cell deaths by repressing the *egl-1* cell death activator gene. *Cell* 98, 317-327.
- Cory, S., Adams, J.M. (2002). The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature Reviews Cancer* 2, 647-56.
- Cory, S., Huang, D.C., Adams, J.M. (2003) The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene* 22, 8590-607.
- Cottage, A., Mullan, L., Portela, M.B., Hellen, E., Carver, T., Patel, S., Vavouri, T., Elgar, G., Edwards, Y.J. (2004). Molecular characterisation of the SAND protein family: a study based on comparative genomics, structural bioinformatics and phylogeny. *Cellular and Molecular Biology Letters* 9, 739-53.
- Coudreuse, D.Y., Roel, G., Betist, M.C., Destree, O., Korswagen, H.C. (2006) Wnt gradient formation requires retromer function in Wnt-producing cells. *Science* 312, 921-924.
- Coudreuse, D., Korswagen, H.C. (2007). The making of Wnt: new insights into Wnt maturation, sorting and secretion. *Development* 134, 3-12.
- Cowan, C.R., Hyman, A.A. (2004). Centrosomes direct cell polarity independently of microtubule assembly in *C. elegans* embryos. *Nature* 431, 92-6.
- Crawford, A.M., Kerr, J.F.R., Currie, A.R. (1972). The relationship of acute mesodermal cell death to the teratogenic effects of 7-OHM-12-MBA in the foetal rat. *British Journal of Cancer* 26, 498-503.
- Davis, M.W., Hammarlund, M., Harrach, T., Hullett, P., Olsen, S., Jorgensen, E.M. (2005). Rapid single nucleotide polymorphism mapping in *C. elegans*. *BMC Genomics* 12, 118.
- del Peso, L., González, V.M., Núñez, G. (1998) *Caenorhabditis elegans* EGL-1 disrupts the interaction of CED-9 with CED-4 and promotes CED-3 activation. *The Journal of Biological Chemistry* 273, 33495-500.
- Degterev, A., Boyce, M., Yuan, J. (2003). A decade of caspases. *Oncogene* 22, 8543-67.
- Dianzani, U., Bensi, T., Savarino, A., Sametti, S., Indelicato, M., Mesturini, R., Chiocchetti, A. (2003). Role of FAS in HIV infection. *Current HIV Research* 1, 405-17.

Bibliografía

- Diez-Roux, G., Lang, R.A. (1997). Macrophages induce apoptosis in normal cells in vivo. *Development* 124, 3633-8.
- Dubreix-Daloz, L., Dupoux, A., Cartier, J. (2008) IAPs: more than just inhibitors of apoptosis proteins. *Cell Cycle* 7, 1036-46.
- Eisenmann, D.M. (2005). Wnt signaling, The *C. elegans* Research Community, Wormbook.
- Ellis, H.M., Horvitz, H.R. (1986). Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell* 44, 817-829.
- Ellis, R.E., Jacobson, D.M., Horvitz, H.R. (1991). Genes required for the engulfment of cell corpses during programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 129, 79-94.
- Ethell, D.W., Buhler, L.A. (2003). Fas ligand-mediated apoptosis in degenerative disorders of the brain. *Journal of Clinical Immunology* 23, 439-46.
- Fadok, V.A., Xue, D., Henson, P. (2001). If phosphatidylserine is the death knell, a new phosphatidylserine-specific receptor is the bellringer. *Cell Death and Differentiation* 8, 582-587.
- Fraser, A.G., Kamath, R.S., Zipperlen, P., Martinez-Campos, M., Sohrmann, M., Ahringer, J. (2000). Functional genomic analysis of *C. elegans* chromosome I by systematic RNA interference. *Nature* 408, 325-30.
- Fujio, Y., Nguyen, T., Wencker, D., Kitsis, R.N., Walsh, K. (2000). Akt promotes survival of cardiomyocytes in vitro and protects against ischemia-reperfusion injury in mouse heart. *Circulation* 101, 660-7.
- Gardai, S.J., McPhillips, K.A., Frasch, S.C., Janssen, W.J., Starefeldt, A., Murphy-Ullrich, J.E., Bratton, D.L., Oldenborg, P.A., Michalak, M., Henson, P.M. (2005). Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte. *Cell* 123, 321-34.
- Galluzzi, L., Joza, N., Tasdemir, E., Maiuri, M.C., Hengartner, M., Abrams, J.M., Tavernarakis, N., Penninger, J., Madeo, F., Kroemer, G. (2008). No death without life: vital functions of apoptotic effectors. *Cell Death Differentiation* 15, 1113-1123.
- Geske, F.J., Lieberman, R., Strange, R., Gerschenson, L.E. (2001). Early stages of p53-induced apoptosis are reversible. *Cell Death Differentiation* 8, 182-91.
- Gleason, J.E., Szyleyko, E.A., Eisenmann, D.M. (2006). Multiple redundant Wnt signaling components function in two processes during *C. elegans* vulval development. *Developmental Biology* 298, 442-57.
- Developmental Biology, 6th edition. Gilbert, S.F. Sunderland (MA), Sinauer Associates, 2000.
- Greenhalgh, D.G. (1998). The role of apoptosis in wound healing. *International Journal of Biochemical Cell Biology* 30, 1019-30.
- Gu, J., Kawai, H., Wiederschain, D., Yuan, Z.M. (2001). Mechanism of functional inactivation of a Li-Fraumeni syndrome p53 that has a mutation outside of the DNA-binding domain. *Cancer Research* 61, 1741-6.

- Gumienny, T.L., Lambie, E., Hartweg, E., Horvitz, H.R., Hengartner, M.O. (1999). Genetic control of programmed cell death in the *Caenorhabditis elegans* hermaphrodite germline. *Development* 126, 1011-22.
- Gumienny, T.L., Brugnera, E., Tosello-Trampont, A.C., Kinchen, J.M., Haney, L.B., Nishiwaki, K., Walk, S.F., Nemergut, M.E., Macara, I.G., Francis, R., Schedl, T., Qin, Y., Van Aelst, L., Hengartner, O., Ravichandran, K.S. (2001). CED-12/ELMO, a novel member of the CrkII/Dock180/Rac pathway, is required for phagocytosis and cell migration. *Cell* 107, 27-41.
- Gumienny, T.L., Hengartner, M.O. (2001). How the worm removes corpses: the nematode *C. elegans* as a model system to study engulfment. *Cell Death and Differentiation* 8, 564-568.
- Hamon, Y., Trompier, D., Ma, Z., Venegas, V., Pophillat, M., Mignotte, V., Zhou, Z., Chimini, G. (2006). Cooperation between engulfment receptors: the case of ABCA1 and MEGF10. *PLoS One* 1, 120.
- Hardin, J., King, R.S. (2008) The long and the short of Wnt signaling in *C. elegans*. *Current Opinion in Genetics and Development* 18, 362-7.
- Hausmann, G., Bänziger, C., Basler, K. (2007) Helping Wingless take flight: how WNT proteins are secreted. *Nature Reviews, Molecular Cell Biology* 8, 331-6.
- He, B., Yu, X., Margolis, M., Liu, X., Leng, X., Etzion, Y., Zheng, F., Lu, N., Quioco, F.A., Danino, D., Zhou, Z. (2010). Live-Cell Imaging in *Caenorhabditis elegans* Reveals the Distinct Roles of Dynamin Self-Assembly and Guanosine Triphosphate Hydrolysis in the Removal of Apoptotic Cells. *Molecular Biology of the Cell* 21, 610–629.
- Hedgecock, E.M., Sulston, J.E., Thomson, J.N. (1983). Mutations affecting programmed cell deaths in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Science* 220, 1277-9.
- Hengartner, M.O., Ellis, R.E., Horvitz, H.R. (1992) *C. elegans* gene *ced-9* protects cells from programmed cell death. *Nature* 356, 494-499.
- Hengartner, M.O., Horvitz, H.R. (1994a) Activation of *C. elegans* cell death protein CED-9 by an amino-acid substitution in a domain conserved in Bcl-2. *Nature* 369, 318-320.
- Hengartner, M.O., Horvitz, H.R. (1994b). *C. elegans* cell survival gene *ced-9* encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene *bcl-2*. *Cell* 76, 665-676.
- Hengartner, M.O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407, 770-6.
- Hickey, C.M., Stroupe, C., Wickner, W. (2009). The major role of the Rab Ypt7p in vacuole fusion is supporting HOPS membrane association. *The Journal of Biological Chemistry* 284, 16118-25.
- Hill, M.M., Adrain, C., Duriez, P.J., Creagh, E.M., Martin, S.J. (2004). Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf-1 apoptosomes. *Embo Journal* 23, 2134-45.
- Hird, S.N., Paulsen, J.E., Strome, S. (1996). Segregation of germ granules in living *Caenorhabditis elegans* embryos: cell-type-specific mechanisms for cytoplasmic localisation. *Development* 122, 1303-12.

Bibliografía

- Hochhauser, E., Kivity, S., Offen, D., Maulik, N., Otani, H., Barhum, Y., Pannet, H., Shneyvays, V., Shainberg, A., Goldshtaub, V., Tobar, A., Vidne, B.A. (2003). Bax ablation protects against myocardial ischemia-reperfusion injury in transgenic mice. *American Journal of Physiology, Heart and Circulatory Physiology* 284, H2351–9.
- Hodgkin, J. (2005). Karyotype, ploidy, and gene dosage. *WormBook* 25, 1-9.
- Hoepfner, D.J., Hengartner, M.O., Schnabel, R. (2001). Engulfment genes cooperate with *ced-3* to promote cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 412, 202-6.
- Hoffman-Sommer, M., Grynberg, M., Kucharczyk, R., Rytka, J. (2005). The CHiPS Domain—ancient traces for the Hermansky-Pudlak syndrome. *Traffic* 6, 534-8.
- Horvitz, H.R. (1999). Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cancer Research* 59, 1701–1706.
- Hubbard, E.J., and Greenstein, D. (2000). The *Caenorhabditis elegans* gonad: a test tube for cell and developmental biology. *Developmental Dynamics* 218, 2-22.
- Hutter, H., Schnabel, R. (1995). Establishment of left-right asymmetry in the *Caenorhabditis elegans* embryo: a multistep process involving a series of inductive events. *Development* 121, 3417-24.
- Inoue, H., Nojima, H., Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96, 23-28.
- Ito, S., Greiss, S., Gartner, A., Derry, W.B. (2010). Cell-nonautonomous regulation of *C. elegans* germ cell death by *kri-1*. *Current Biology* 20, 333-8.
- Jahn, R., Lang, T., Südhof, T.C. (2003) Membrane fusion. *Cell* 112, 519-33.
- Jehle, A.W., Gardai, S.J., Li, S., Linsel-Nitschke, P., Morimoto, K., Janssen, W.J., Vandivier, R.W., Wang, N., Greenberg, S., Dale, B.M., Qin, C., Henson, P.M. (2006). Tall AR ATP-binding cassette transporter A7 enhances phagocytosis of apoptotic cells and associated ERK signaling in macrophages. *The Journal of Cell Biology* 174, 547-56.
- Johnston, W.L., Krizus, A., Dennis, J.W. (2006). The eggshell is required for meiotic fidelity, polar-body extrusion and polarization of the *C. elegans* embryo. *BMC Biology* 4, 35.
- Jordens, I., Fernandez-Borja, M., Marsman, M., Dusseljee, S., Janssen, L., Calafat, J., Janssen, H., Wubbolts, R., Neefjes, J. (2001) The Rab7 effector protein RILP controls lysosomal transport by inducing the recruitment of dynein-dynactin motors. *Current Biology* 11, 1680-5.
- Kaletta, T., Hengartner, M.O. (2006). Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. *Nature Reviews Drug Discovery* 5, 387-98.
- Kamath, R.S., Martinez-Campos, M., Zipperlen, P., Fraser, A.G., Ahringer, J. (2001). Effectiveness of specific RNA-mediated interference through ingested double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Genome Biology* 2, research0002.1.
- Kamath, R.S., Fraser, A.G., Dong, Y., Poulin, G., Durbin, R., Gotta, M., Kanapin, A., Le Bot, N., Moreno, S., Sohrmann, M., Welchman, D.P., Zipperlen, P., Ahringer, J. (2003). Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi. *Nature* 421, 231-7.

- Kawane, K., Ohtani, M., Miwa, K., Kizawa, T., Kanbara, Y., Yoshioka, Y., Yoshikawa, H., Nagata, S. (2006). Chronic polyarthritis caused by mammalian DNA that escapes from degradation in macrophages. *Nature* 443, 998-1002.
- Kemphues, K.J., Priess, J.R., Morton, D.G., Cheng, N.S. (1988). Identification of genes required for cytoplasmic localization in early *C. elegans* embryos. *Cell* 52, 311-20.
- Kerr, J.F.R. (1965). A histochemical study of hypertrophy and ischaemic injury of rat liver with special reference to changes in lysosomes. *The Journal of Pathology and Bacteriology* 90, 419-435.
- Kerr, J.F.R. (1971). Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death. *The Journal of Pathology* 105, 13-20.
- Kerr, J.F.R., Searle, J. (1972b). The digestion of cellular fragments within phagolysosomes in carcinoma cells. *The Journal of Pathology* 108, 55-58.
- Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H., Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer* 26, 239-257.
- Kerr, J.F.R. (2002). History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. *Toxicology* 181-182, 471-474.
- Kimble, J., Hirsh, D. (1979). The postembryonic cell lineages of the hermaphrodite and male gonads in *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology* 70, 396-417.
- Kimble, J.E., White, J.G. (1981). On the control of germ cell development in *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology* 81, 208-19.
- Kimble, J., Sharrock, W.J. (1983). Tissue-specific synthesis of yolk proteins in *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology* 96, 189-96.
- Kinch, L.N., Grishin, N.V. (2006). Longin-like folds identified in CHiPS and DUF254 proteins: vesicle trafficking complexes conserved in eukaryotic evolution. *Protein Science* 15, 2669-74.
- Kinchen, J.M., Cabello, J., Klingele, D., Wong, K., Feichtinger, R., Schnabel, H., Schnabel, R., Hengartner, M.O. (2005). Two pathways converge at CED-10 to mediate actin rearrangement and corpse removal in *C. elegans*. *Nature* 434, 93-9
- Kinchen, J.M., Ravichandran, K.S. (2007). Journey to the grave: signaling events regulating removal of apoptotic cells. *The Journal of Cell Science* 120, 2143-9.
- Kinchen, J.M., Ravichandran, K.S. (2008) Phagosome maturation: going through the acid test. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 9, 781-795.
- Kinchen, J.M., Doukometzidis, K., Almendinger, J., Stergiou, L., Tosello-Tramont, A., Sifri, C.D., Hengartner, M.O., Ravichandran, K.S. (2008) A pathway for phagosome maturation during engulfment of apoptotic cells. *Nature Cell Biology* 10, 556-66.
- Kinchen, J.M., Ravichandran, K.S. (2010). Identification of two evolutionarily conserved genes regulating processing of engulfed apoptotic cells. *Nature* 464, 778-82.
- Komiya, Y., Habas, R. (2008). Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis* 4, 68-75.

Bibliografía

- Kornfeld, K. (1997). Vulval development in *Caenorhabditis elegans*. *Trends in Genetics* 13, 55-61.
- Kothakota, S., Azuma, T., Reinhard, C., Klippel, A., Tang, J., Chu, K., McGarry, T.J., Kirschner, M.W., Kohts, K., Kwiatkowski, D.J., Williams, L.T. (1997). Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science* 278, 294-8.
- Kramer, J.M. (1994). Structures and functions of collagens in *Caenorhabditis elegans*. *FASEB Journal* 8, 329-336
- Kuraishi, T., Nakagawa, Y., Nagaosa, K., Hashimoto, Y., Ishimoto, T., Moki, T., Fujita, Y., Nakayama, H., Dohmae, N., Shiratsuchi, A., Yamamoto, N., Ueda, K., Yamaguchi, M., Awasaki, T., Nakanishi, Y. (2009). Pretaporter, a *Drosophila* protein serving as a ligand for Draper in the phagocytosis of apoptotic cells. *EMBO Journal* 28, 3868-78.
- Kucharczyk, R., Dupre, S., Avaro, S., Haguenaer-Tsapis, R., Slonimski, P.P., Rytka, J. (2000). The novel protein Ccz1p required for vacuolar assembly in *Saccharomyces cerevisiae* functions in the same transport pathway as Ypt7p. *The Journal of Cell Science* 113, 4301-11.
- Kucharczyk, R., Kierzek, A.M., Slonimski, P.P., Rytka, J. (2001) The Ccz1 protein interacts with Ypt7 GTPase during fusion of multiple transport intermediates with the vacuole in *S. cerevisiae*. *The Journal of Cell Science* 114, 3137-45.
- Labouesse, M., Mango, S.E. (1999). Patterning the *C. elegans* embryo: moving beyond the cell lineage. *Trends in Genetics* 15, 307-13.
- Le, G.T., Abbenante, G. (2005). Inhibitors of TACE and Caspase-1 as anti-inflammatory drugs. *Current Medical Chemistry* 12, 2963-77.
- Le Gall, J.Y., Ardaillou, R. (2009). The biology of aging, *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine* 193, 365-402
- Lee, J.Y., Goldstein, B. (2003). Mechanisms of cell positioning during *C. elegans* gastrulation. *Development* 130, 307-20.
- L'Hernault, S.W. (2009). The genetics and cell biology of spermatogenesis in the nematode *C. elegans*. *Molecular Cell Endocrinology* 306, 59-65.
- Li, L.Y., Luo, X., Wang, X. (2001). Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* 412, 95-9.
- Li, W., Zou, W., Zhao, D., Yan, J., Zhu, Z., Lu, J., Wang, X. (2009). *C. elegans* Rab GTPase activating protein TBC-2 promotes cell corpse degradation by regulating the small GTPase RAB-5. *Development* 136, 2445-55.
- Liu, Q.A., Hengartner, M.O. (1998). Candidate adaptor protein CED-6 promotes the engulfment of apoptotic cells in *C. elegans*. *Cell* 93, 961-72.
- Logan, C.Y., Nusse, R. (2004) The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 20, 781-810.
- Lu, M., Ravichandran, K.S. (2006). Dock180-ELMO cooperation in Rac activation. *Methods in Enzymology* 406, 388-402.

Lu, M., Kinchen, J.M., Rossman, K.L., Grimsley, C., DeBakker, C., Brugnera, E., Tosello-Tramont, A.C., Haney, L.B., Klingele, D., Sondek, J. (2004). PH domain of ELMO functions in trans to regulate Rac activation via Dock180. *Nature Structural and Molecular Biology* 11, 756-762.

Lund, L.R., Romer, J., Thomasset, N., Solberg, H., Pyke, C., Bissell, M.J., Dano, K., Werb, Z. (1996). Two distinct phases of apoptosis in mammary gland involution: proteinase-independent and -dependent pathways. *Development* 122, 181-93.

Luzio, J.P., Rous, B.A., Bright, N.A., Pryor, P.R., Mullock, B.M., Piper, R.C. (2000). Lysosome-endosome fusion and lysosome biogenesis. *The Journal of Cell Science* 113, 1515-24.

Majno, G., Joris, I. (1995). Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *American Journal of Pathology* 146, 3-15.

Mangahas, P.M., Yu, X., Miller, K.G., Zhou, Z. (2008) The small GTPase Rab2 functions in the removal of apoptotic cells in *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of Cell Biology* 180, 357-73.

Mango, S.E. (2007). The *C. elegans* pharynx: a model for organogenesis. *WormBook* 22, 1-26.

Marcello, M.R., Singson, A. (2010). Fertilization and the oocyte-to-embryo transition in *C. elegans*. *BMB Reports* 43, 389-99.

Markaki, M., Tavernarakis, N. (2010). Modeling human diseases in *Caenorhabditis elegans*. *Biotechnology Journal* 5, 1261-1276.

Martinvalet, D., Zhu, P., Lieberman, J. (2005). Granzyme A induces caspase-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis. *Immunity* 22, 355-70.

Maxfield, F.R., McGraw, T.E. (2004). Endocytic recycling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5, 121-32.

McCray, B.A., Skordalakes, E., Taylor, J.P. (2010). Disease mutations in Rab7 result in unregulated nucleotide exchange and inappropriate activation. *Human Molecular Genetics* 19, 1033-47.

McGhee, J.D. (2007). The *C. elegans* intestine. *WormBook* 27, 1-36.

Mello, C.C., Draper, B.W., Priess, J.R. (1994). The maternal genes *apx-1* and *glp-1* and establishment of dorsal-ventral polarity in the early *C. elegans* embryo. *Cell* 77, 95-106.

Metzstein, M.M., Stanfield, G.M., Horvitz, H.R. (1998). Genetics of programmed cell death in *C. elegans*: past, present and future. *Trends in Genetics* 14, 410-416.

Milburn, M.V., Tong, L., deVos, A.M., Brünger, A., Yamaizumi, Z., Nishimura, S., Kim, S.H. (1990). Molecular switch for signal transduction: structural differences between active and inactive forms of protooncogenic ras proteins. *Science* 247, 939-45.

Miyashita, T., Krajewski, S., Krajewska, M., Wang, H.G., Lin, H.K., Liebermann, D.A., Hoffman, B., Reed, J.C. (1994). Tumor suppressor *p53* is a regulator of *bcl-2* and *bax* gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene* 9, 1799-805.

Bibliografía

- Moerman, D.G., Fire, A. (1997). Muscle: Structure, function and development. *C. elegans* II. Riddle D.L., Blumenthal T., Meyer B.J., Priess J.R. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 417-470.
- Muzio, M., Stockwell, B.R., Stennicke, H.R., Salvesen, G.S., Dixit, V.M. (1998). An induced proximity model for caspase-8 activation. *The Journal of Biological Chemistry* 273, 2926-2930.
- Nagata, S. (2000). Apoptotic DNA fragmentation. *Experimental Cell Research* 256, 12-18.
- Nagata, S. (2010). Apoptosis and autoimmune diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1209, 10-6.
- Nagata, S., Hanayama, R., Kawane, K. (2010). Autoimmunity and the clearance of dead cells. *Cell* 140, 619-30.
- Nakae, J., Biggs, W.H., Kitamura, T., Cavenee, W.K., Wright, C.V., Arden, K.C., Accili, D. (2002). Regulation of insulin action and pancreatic beta-cell function by mutated alleles of the gene encoding forkhead transcription factor Foxo1. *Nature Genetics* 32, 245-253.
- Nance, J., Priess, J.R. (2002). Cell polarity and gastrulation in *C. elegans*. *Development* 129, 387-97.
- Nance, J. (2005). PAR proteins and the establishment of cell polarity during *C. elegans* development. *Bioessays* 27, 126-35.
- Nelson, F.K., Riddle, DL. (1984). Functional study of the *Caenorhabditis elegans* secretory-excretory system using laser microsurgery. *The Journal of Experimental Zoology* 231, 45-56.
- Nicholson, D.W. (2000). From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents. *Nature* 407, 810-6.
- Nickerson, D.P., Brett, C.L., Merz, A.J. (2009). Vps-C complexes: gatekeepers of endolysosomal traffic. *Current Opinion in Cell Biology* 21, 543-51.
- Nieto, C., Almendinger, J., Gysi, S., Gómez-Orte, E., Kaech, A., Hengartner, M.O., Schnabel, R., Moreno, S., Cabello, J. (2010). *ccz-1* mediates the digestion of apoptotic corpses in *C. elegans*. *The Journal of Cell Science* 123, 12, 2001-7.
- Nigon, V. (1949). Les modalités de la reproduction et le déterminisme du sexe chez quelques nématodes libres. *Annales de Sciences Naturelles – Zoologie et Biologie Animale* 11, 1-132.
- Nijhawan, D., Honarpour, N., Wang, X. (2000). Apoptosis in neural development and disease. *Annals of Review of Neuroscience* 23, 73-87.
- Nordmann, M., Cabrera, M., Perz, A., Bröcker, C., Ostrowicz, C., Engelbrecht-Vandré, S., Ungermann, C. (2010). The Mon1-Ccz1 complex is the GEF of the late endosomal Rab7 homolog Ypt7. *Current Biology* 20, 1654-9.
- Ogg, S., Paradis, S., Gottlieb, S., Patterson, G.I., Lee, L., Tissenbaum, H.A., Ruvkun, G. (1997). The Fork head transcription factor DAF-16 transduces insulin-like metabolic and longevity signals in *C. elegans*. *Nature* 389, 994–999.
- Opferman, J.T., Korsmeyer, S.J. (2003). Apoptosis in the development and maintenance of the immune system. *Nature Immunology* 4, 410–5.

- Ozawa, T. (1995). Mechanism of somatic mitochondrial DNA mutations associated with age and diseases. *Biochimica et Biophysica Acta* 1271, 177–89.
- Panáková, D., Sprong, H., Marois, E., Thiele, C., Eaton, S. (2005). Lipoprotein particles are required for Hedgehog and Wingless signalling. *Nature* 435, 58-65.
- Pankiv, S., Alemu, E.A., Brech, A., Bruun, J.A., Lamark, T., Overvatn, A., Bjørkøy, G., Johansen, T. (2010). FYCO1 is a Rab7 effector that binds to LC3 and PI3P to mediate microtubule plus end-directed vesicle transport. *The Journal of Cell Biology* 188, 253-69.
- Park, D., Tosello-Trampont, A.C., Elliott, M.R., Lu, M., Haney, L.B., Ma, Z., Klibanov, A.L., Mandell, J.W., Ravichandran, K.S. (2007). BAI1 is an engulfment receptor for apoptotic cells upstream of the ELMO/Dock180/Rac module. *Nature* 450, 430-4.
- Parrish, J.Z., Xue, D. (2003). Functional genomic analysis of apoptotic DNA degradation in *C. elegans*. *Molecular Cell* 11, 987-996.
- Peplowska, K., Markgraf, D.F., Ostrowicz, C.W., Bange, G., Ungermann, C. (2007). The CORVET tethering complex interacts with the yeast Rab5 homolog Vps21 and is involved in endo-lysosomal biogenesis. *Developmental Cell* 12, 739-50.
- Pfeffer, S., Aivazian, D. (2004). Targeting Rab GTPases to distinct membrane compartments. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5, 886-96.
- Piekarska, I., Kucharczyk, R., Mickowska, B., Rytka, J., Rempola, B. (2010) Mutants of the *Saccharomyces cerevisiae* VPS genes CCZ1 and YPT7 are blocked in different stages of sporulation. *European Journal of Cell Biology* 89, 780-7.
- Pieren, M., Schmidt, A., Mayer, A. (2010). The SM protein Vps33 and the t-SNARE H (abc) domain promote fusion pore opening. *Nature Structural and Molecular Biology* 17, 710-7.
- Pietenpol, J.A., Stewart, Z.A. (2002). Cell cycle checkpoint signaling: cell cycle arrest versus apoptosis. *Toxicology* 181–182, 475–81.
- Pilon, M., Mörck, C. (2005). Development of *Caenorhabditis elegans* pharynx, with emphasis on its nervous system. *Acta Pharmacologica Sinica* 26, 396-404.
- Port, F., Kuster, M., Herr, P., Furger, E., Bänziger, C., Hausmann, G., Basler, K. (2008). Wingless secretion promotes and requires retromer-dependent cycling of Wntless. *Nature Cell Biology* 10, 178-85.
- Poteryaev, D., Spang, A. (2005). A role of SAND-family proteins in endocytosis. *Biochemical Society Transactions* 33, 606-8.
- Poteryaev, D., Fares, H., Bowerman, B., Spang, A. (2007). *Caenorhabditis elegans* SAND-1 is essential for RAB-7 function in endosomal traffic. *The EMBO Journal* 26, 301-12.
- Poteryaev, D., Datta, S., Ackema, K., Zerial M, Spang A. (2010). Identification of the switch in early-to-late endosome transition. *Cell* 141, 497-508.
- Rai, N.K., Tripathi, K., Sharma, D., Shukla, V.K. (2005). Apoptosis: a basic physiologic process in wound healing. *The International Journal of Lower Extremity Wounds* 4, 138-44.

Bibliografía

- Ranganathan, R., Sawin, E.R., Trent, C., Horvitz, H. R. (2001). Mutations in the *Caenorhabditis elegans* serotonin reuptake transporter MOD-5 reveal serotonin-dependent and -independent activities of fluoxetine. *The Journal of Neuroscience* 21, 5871–5884.
- Reddien, P.W., Horvitz, H.R. (2000). CED-2/CrkII and CED-10/Rac control phagocytosis and cell migration in *Caenorhabditis elegans*. *Nature Cell Biology* 2, 131-6.
- Reddien, P.W., Cameron, S., Horvitz, H.R. (2001). Phagocytosis promotes programmed cell death in *C. elegans*. *Nature* 412, 198-202.
- Reed, J.C. (1994). Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *Journal of Cell Biology* 124, 1-6.
- Robertson, A., Thomson, N. (1982). Morphology of programmed cell death in the ventral nerve cord of *Caenorhabditis elegans* larvae. *Journal of embryology and experimental morphology* 67, 89-100.
- Rocha, N., Kuijl, C., van der Kant, R., Janssen, L., Houben, D., Janssen, H., Zwart, W., Neefjes, J. (2009) Cholesterol sensor ORP1L contacts the ER protein VAP to control Rab7-RILP-p150 Glued and late endosome positioning. *The Journal of Cell Biology* 185, 1209-25.
- Rocheleau, C.E., Downs, W.D., Lin, R., Wittmann, C., Bei, Y., Cha, Y.H., Ali, M., Priess, J.R., Mello, C.C. (1997). Wnt signaling and an APC-related gene specify endoderm in early *C. elegans* embryos. *Cell* 90, 707-16.
- Saelens, X., Festjens, N., Vande Walle, L., van Gurp, M., van Loo, G., Vandenabeele, P. (2004). Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene* 23, 2861-74.
- Sakahira, H., Enari, M., Nagata, S. (1998). Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 391, 96-99.
- Salvesen, G.S., Riedl, S.J. (2009). Structure of the Fas/FADD complex: a conditional death domain complex mediating signaling by receptor clustering. *Cell Cycle* 8, 2723-7.
- Sambrook, J. (1989). *Molecular Cloning. A laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sato, T.K., Rehling, P., Peterson, M.R., Emr, S.D. (2000). Class C Vps protein complex regulates vacuolar SNARE pairing and is required for vesicle docking/fusion. *Molecular Cell* 6, 661-71.
- Schimmer, A.D. (2004). Inhibitor of apoptosis proteins: translating basic knowledge into clinical practice. *Cancer Research* 64, 7183-90.
- Schwartz, L.M., Osborne, B.A. (1994) Ced-3/ICE: evolutionarily conserved regulation of cell death. *Bioessays* 16, 387-9.
- Shaham, S., Horvitz, H.R. (1996). Developing *Caenorhabditis elegans* neurons may contain both cell-death protective and killer activities. *Genes Development* 10, 578-91.
- Sherrington, R. et al. (1995). Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* 375, 754–760.
- Siegfried, K.R., Kimble, J. (2002). POP-1 controls axis formation during early gonadogenesis in *C. elegans*. *Development* 129, 443-53.

- Slee, E.A., Adrain, C., Martin, S.J. (2001). Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry* 276, 7320-6.
- Smyth, M.J., Godfrey, D.I., Trapani, J.A. (2001). A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nature Immunology* 2, 293-9.
- Spieth, J., Blumenthal, T. (1985). The *Caenorhabditis elegans* vitellogenin gene family includes a gene encoding a distantly related protein. *Molecular and Cellular Biology* 5, 2495-2501.
- Starai, V.J., Hickey, C.M., Wickner, W. (2008). HOPS proofreads the trans-SNARE complex for yeast vacuole fusion. *Molecular Biology of the Cell* 19, 2500-8.
- Strome, S. (2005). Specification of the germ line. *WormBook*, 1-10.
- Su, H.P., Nakada-Tsukui, K., Tosello-Trampont, A.C., Li, Y., Bu, G., Henson, P.M., Ravichandran, K.S. (2002). Interaction of CED-6/GULP, an adapter protein involved in engulfment of apoptotic cells with CED-1 and CD91/low density lipoprotein receptor-related protein (LRP). *Journal of Biological Chemistry* 277, 11772-11779.
- Sulston, J.E., Schierenberg, E., White, J.G., Thomson, J.N. (1983). The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology* 100, 64-119.
- Sulston, J.E., Horvitz, H.R. (1977). Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology* 56, 110-56.
- Sulston, J.E., White, J.G. (1980). Regulation and cell autonomy during postembryonic development of *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology* 78, 577-597.
- Sundaram, M. & Greenwald, I. (1993). Suppressors of a *lin-12* hypomorph define genes that interact with both *lin-12* and *glp-1* in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 135, 765-783.
- Sutton, R.B., Fasshauer, D., Jahn, R., Brunger, A.T. (1998). Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature* 395, 347-353.
- Tanaka M, Asano K, Qiu CH. (2010). Immune regulation by apoptotic cell clearance. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1209, 37-42.
- The *C. elegans* Sequencing Consortium. (1998) Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science* 282, 2012-2018.
- The nematode *Caenorhabditis elegans*. Wood W.B. y colaboradores. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988.
- Thorpe, C.J., Schlesinger, A., Carter, J.C., Bowerman, B. (1997) Wnt signaling polarizes an early *C. elegans* blastomere to distinguish endoderm from mesoderm. *Cell* 90, 695-705.
- Trapani, J.A., Smyth, M.J. (2002). Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nature Reviews Immunology* 2, 735-47.
- Tsou, M.F., Ku, W., Hayashi, A., Rose, L.S. (2003). PAR-dependent and geometry-dependent mechanisms of spindle positioning. *The Journal of Cell Biology* 160, 845-55.

Bibliografía

- Urrutia, R., Henley, J.R., Cook, T., McNiven, M.A. (1997). The dynamins: redundant or distinct functions for an expanding family of related GTPases? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 377-84.
- Vaux, D.L., Cory, S., Adams, J.M. (1988). Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with cmyc to immortalize pre-B cells. *Nature* **335**, 440-2.
- Venegas, V., Zhou, Z. (2007). Two Alternative Mechanisms That Regulate the Presentation of Apoptotic Cell Engulfment Signal in *Caenorhabditis elegans*. *The Molecular Biology of the Cell* **18**, 3180–3192.
- Vieira, O.V., Botelho, R.J., Rameh, L., Brachmann, S.M., Matsuo, T., Davidson, H.W., Schreiber, A., Backer, J.M., Cantley, L.C., Grinstein, S. (2001). Distinct roles of class I and class III phosphatidylinositol 3-kinases in phagosome formation and maturation. *The Journal of Cell Biology* **155**, 19-25.
- Vieira, O.V., Botelho, R.J., Grinstein, S. (2002). Phagosome maturation: aging gracefully. *The Biochemical Journal* **366**, 689-704.
- Wang, L., Miura, M., Bergeron, L., Zhu, H., Yuan, J. (1994). Ich-1, an Ice/ced-3-related gene, encodes both positive and negative regulators of programmed cell death. *Cell* **78**, 739-50.
- Wang, X., Yang, C., Chai, J., Shi, Y., and Xue, D. (2002). Mechanisms of AIF-mediated apoptotic DNA degradation in *Caenorhabditis elegans*. *Science* **298**, 1587-1592.
- Wang, X., Wu, Y.C., Fadok, V.A., Lee, M.C., Gengyo-Ando, K., Cheng, L.C., Ledwich, D., Hsu, P.K., Chen, J.Y., Chou, B.K., Henson, P., Mitani, S., Xue, D. (2003). Cell corpse engulfment mediated by *C. elegans* phosphatidylserine receptor through CED-5 and CED-12. *Science* **302**, 1563-6.
- Wang, C.W., Stromhaug, P.E., Shima, J., Klionsky, D.J. (2002). The Ccz1-Mon1 protein complex is required for the late step of multiple vacuole delivery pathways. *The Journal of Biological Chemistry* **277**, 47917-27.
- Wang, C.W., Stromhaug, P.E., Kauffman, E.J., Weisman, L.S., Klionsky, D.J. (2003). Yeast homotypic vacuole fusion requires the Ccz1-Mon1 complex during the tethering/docking stage. *The Journal of Cell Biology* **163**, 973-85.
- Wang, X., Li, W., Zhao, D., Liu, B., Shi, Y., Chen, B., Yang, H., Guo, P., Geng, X., Shang, Z., Peden, E., Kage-Nakadai, E., Mitani, S., Xue, D. (2010). *Caenorhabditis elegans* transthyretin-like protein TTR-52 mediates recognition of apoptotic cells by the CED-1 phagocyte receptor. *Nature Cell Biology* **12**, 655-64.
- Wang, T., Ming, Z., Xiaochun, W., Hong, W. (2011) Rab7: role of its protein interaction cascades in endo-lysosomal traffic. *Cellular Signalling* **23**, 516-21.
- Whangbo, J., Kenyon, C. (1999). A Wnt signaling system that specifies two patterns of cell migration in *C. elegans*. *Molecular Cell* **4**, 851-8.
- White, J.G., Southgate, E., Thomson, J.N. and Brenner, S. (1986). The structure of the nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans*: the mind of a worm. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B. Biological Sciences* **314**, 1-340.
- Wicks, S.R., Yeh, R.T., Gish, W.R., Waterston, R.H., Plasterk, R.H. (2001) Rapid gene mapping in *Caenorhabditis elegans* using a high density polymorphism map. *Nature Genetics* **28**, 160-4.

- Widlak, P., Garrard, W.T. (2005). Discovery, regulation, and action of the major apoptotic nucleases DFF40/CAD and endonuclease G. *The Journal of Cellular Biochemistry* **94**, 1078-87.
- Wilm, T., Demel, P., Koop, H.U., Schnabel, H., Schnabel, R. (1999). Ballistic transformation of *Caenorhabditis elegans*. *Gene* **229**, 31-5.
- Wu, Y.C., and Horvitz, H.R. (1998a). The *C. elegans* cell corpse engulfment gene *ced-7* encodes a protein similar to ABC transporters. *Cell* **93**, 951-960.
- Wu, Y.C., Horvitz, H.R. (1998b). *C. elegans* phagocytosis and cell-migration protein CED-5 is similar to human DOCK180. *Nature* **392**, 501-4.
- Wu, Y.C., Stanfield, G.M., Horvitz, H.R. (2000). NUC-1, a *Caenorhabditis elegans* DNase II homolog, functions in an intermediate step of DNA degradation during apoptosis. *Genes Development* **14**, 536-548.
- Wu, Y.C., Tsai, M.C., Cheng, L.C., Chou, C.J., Weng, N.Y. (2001). *C. elegans* CED-12 acts in the conserved crkII/DOCK180/Rac pathway to control cell migration and cell corpse engulfment. *Developmental Cell* **1**, 491-502.
- Wyllie, A.H., Kerr, J.F.R., Currie, A.R., (1973). Cell death in the normal neonatal rat adrenal cortex. *Journal of Pathology* **111**, 255-261.
- Wyllie, A. H. (1980). Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* **284**, 555-556.
- Xiao, H., Chen, D., Fang, Z., Xu, J., Sun, X., Song, S., Liu, J., Yang, C. (2009). Lysosome biogenesis mediated by *vps-18* affects apoptotic cell degradation in *Caenorhabditis elegans*. *Molecular Biology of the Cell* **20**, 21-32.
- Xue, D., Horvitz, H.R. (1995). Inhibition of the *Caenorhabditis elegans* cell-death protease CED-3 by a CED-3 cleavage site in baculovirus p35 protein. *Nature* **377**, 248-51.
- Xue, D., Shaham, S., and Horvitz, H.R. (1996). The *Caenorhabditis elegans* cell-death protein CED-3 is a cysteine protease with substrate specificities similar to those of the human CPP32 protease. *Genes Development* **10**, 1073-1083.
- Xue, D., and Horvitz, H.R. (1997). *Caenorhabditis elegans* CED-9 protein is a bifunctional cell-death inhibitor. *Nature* **390**, 305-308.
- Yan, N., Gu, L., Kokel, D., Chai, J., Li, W., Han, A., Chen, L., Xue, D., and Shi, Y. (2004). Structural, biochemical, and functional analyses of CED-9 recognition by the proapoptotic proteins EGL-1 and CED-4. *Molecular Cell* **15**, 999-1006.
- Yang, X., Chang, H.Y., Baltimore, D. (1998). Essential role of CED-4 oligomerization in CED-3 activation and apoptosis. *Science* **281**, 1355-1357.
- Yu, X., Odera, S., Chuang, C.H., Lu, N., Zhou, Z. (2006). *C. elegans* Dynamin mediates the signaling of phagocytic receptor CED-1 for the engulfment and degradation of apoptotic cells. *Developmental Cell* **10**, 743-57.
- Yu, X., Lu, N., Zhou, Z. (2008). Phagocytic receptor CED-1 initiates a signaling pathway for degrading engulfed apoptotic cells. *PLoS Biology* **6**, e61.

Bibliografía

Yuan, J.Y., Horvitz, H.R. (1990). The *Caenorhabditis elegans* genes *ced-3* and *ced-4* act cell autonomously to cause programmed cell death. *Developmental Biology* 138, 33-41.

Yuan, J., Horvitz, H.R. (1992). The *Caenorhabditis elegans* cell death gene *ced-4* encodes a novel protein and is expressed during the period of extensive programmed cell death. *Development* 116, 309-320.

Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H.M., Horvitz, H.R. (1993). The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell* 75, 641-52.

Yuan, J., Horvitz, H.R. (2004). A first insight into the molecular mechanisms of apoptosis. *Cell*, 116, S53-6.

Zeiss, C.J. (2003). The apoptosis-necrosis continuum: insights from genetically altered mice. *Veterinary Pathology* 40, 481–95.

Zhang, X.M., Walsh, B., Mitchell, C.A., Rowe, T. (2005). TBC domain family, member 15 is a novel mammalian Rab GTPase-activating protein with substrate preference for Rab7. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 335, 154-61.

Zhou, Z., Hartweg, E., and Horvitz, H.R. (2001). CED-1 is a transmembrane receptor that mediates cell corpse engulfment in *C. elegans*. *Cell* 104, 43–56.

Zhou, Z., Yu, X. (2008) Phagosome maturation during the removal of apoptotic cells: receptors lead the way. *Trends in Cell Biology* 18, 474-85.

Zou, H., Henzel, W.J., Liu, X., Lutschg, A., and Wang, X. (1997). Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 90, 405-413.

Zou, H., Li, Y., Liu, X., Wang, X. (1999). An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *The Journal of Biological Chemistry* 274, 11549–11556.

Zou, W., Lu, Q., Zhao, D. (2009) *Caenorhabditis elegans* myotubularin MTM-1 negatively regulates the engulfment of apoptotic cells. *PLoS Genetics* 5, e1000679.

ABREVIATURAS

Abreviaturas utilizadas

| | |
|--------|--|
| ATP | <i>ATP-binding cassette</i> (transportador con dominio de unión a ATP) |
| AIF | <i>Apoptosis inducing factor</i> (factor inductor de apoptosis) |
| APAF | <i>Apoptosis protease-activating factor</i> (factor activador de proteasas en apoptosis) |
| APP | <i>Amyloid precursor protein</i> (proteína precursora amiloide) |
| ATP | Adenosina trifosfato |
| BAI | <i>Brain angiogenesis inhibitor</i> (inhibidor de la angiogénesis específica del cerebro) |
| bar | <i>Beta-catenin/armadillo related</i> |
| CAD | <i>Caspase-activated DNase</i> (DNasa activada por caspasa) |
| CARD | <i>Caspase activation and recruitment domain</i> (dominio de reclutamiento y activación de caspasas) |
| ccz | <i>Caffeine, calcium, zinc sensitive</i> (sensible a cafeína, calcio y zinc) |
| CD4+ T | Linfocitos T CD4 positivos |
| cDNA | DNA complementario |
| ced | <i>Cell death abnormality</i> (muerte celular anormal) |
| CGC | <i>Caenorhabditis Genetics Center</i> |
| CIAP | <i>Calf intestine alkaline phosphatase</i> (fosfatasa alcalina) |
| cM | Centimorgan (unidad de mapa genético) |
| CORVET | <i>Class C core vacuole/endosome tethering</i> (núcleo de unión entre vacuola y endosoma de tipo C) |
| 4D | Microscopía en cuatro dimensiones |
| DIC | Microscopía de contraste interferencial |
| CFP | <i>Cyan fluorescence protein</i> (proteína azul fluorescente) |
| daf | <i>abnormal dauer formation</i> (formación anormal de dauer) |
| DED | <i>Death domain</i> (dominio de muerte) |
| DEPC | Dietilpirocarbonato |
| DISC | <i>Death-inducing signaling complex</i> (complejo señalizador inductor de muerte) |
| DNA | Ácido desoxiribonucleico |
| DNasa | Desoxirribonucleasa |
| dNTPs | Desoxinucleótidos trifosfato |
| DOCK | <i>Dedicator of cytokinesis</i> (proteína implicada en la citoquinesis) |
| dpy | <i>Dumpy</i> (más corto que el fenotipo silvestre) |
| dyn | <i>dynamine related</i> (similar a dinamina) |
| EDTA | Etilendiaminotetraacetato |
| eea | <i>Early endosome antigen</i> (antígeno de los endosomas tempranos) |
| egl | <i>Egg laying defective</i> (defectivo en la eliminación de embriones) |
| ELMO | <i>Engulfment and cell motility</i> (proteína implicada en fagocitosis y movilidad celular) |
| EMS | Etilmetanosulfonato |
| FADD | <i>Fas-Associated protein with Death Domain</i> (proteína asociada a Fas con receptor de muerte) |
| F1 | Generación primera de <i>C. elegans</i> |
| F2 | Generación segunda de <i>C. elegans</i> |
| FYVE | Dominio de dedo de zinc FYVE (Fab1, YOTB, Vac1 y EEA1) |
| g | Gramo |
| GAP | <i>GTPase-Activating Protein</i> (proteína activadora de GTPasa) |
| GEF | <i>Guanine nucleotide Exchange Factor</i> (factor intercambiador de nucleótidos de guanina) |
| GDI | <i>Rab GDP dissociation Inhibitor</i> (inhibidor de la disociación de GDP en Rab) |
| GDP | Guanosina difosfato |

Abreviaturas

| | |
|---------------|--|
| GFP | <i>Green fluorescence protein</i> (proteína verde fluorescente) |
| <i>gl</i> | <i>Germ line apoptosis abnormal</i> (apoptosis de la línea germinal anormal) |
| GLP | <i>Abnormal germ line proliferation</i> (proliferación de la línea germinal anormal) |
| GTP | Guanosina trifosfato |
| GTPasa | Guanosina trifosfatasa |
| <i>him</i> | <i>High incidence of males</i> (alta incidencia de machos) |
| HOPS | <i>Homotypic fusion and vacuole protein sorting complex</i> (complejo regulador de la fusión de vesículas homotípicas y de la clasificación de proteínas vacuolares) |
| HPS | <i>Hermansky-Pudlak syndrome</i> |
| <i>hyp</i> | Sincitio de la hipodermis (<i>hypodermis</i>) |
| IAP | <i>Inhibitor apoptosis protein</i> (proteína inhibidora de apoptosis) |
| ICAD | <i>Inhibitor caspase-activated DNase</i> (Inhibidor de la DNasa activada por caspasa) |
| ICE | <i>Interleukin-1β-Converting Enzyme</i> (enzima convertidora de Interleukina-1 β) |
| IGF | <i>Insulin-like growth factor</i> (factor de crecimiento similar a insulina) |
| Kb | Kilobase |
| l | Litro |
| L1,L2, L3, L4 | Estadios larvarios de <i>C. elegans</i> 1º, 2º, 3º y 4º |
| <i>lag</i> | <i>Lin-12 and glp-1 phenotype</i> (fenotipo de ambos genes, <i>lin-12</i> y <i>glp-1</i>) |
| LB | Medio Luria-Bertani |
| <i>let</i> | <i>lethal</i> |
| LRP | <i>Low-density lipoprotein receptor related</i> (receptor relacionado con lipoproteína de baja densidad) |
| M | Molar |
| mA | Miliamperio |
| MAPK | <i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i> (proteín quinasa activadas por mitógeno) |
| <i>mat</i> | <i>Maternal</i> |
| mg | Miligramo |
| MEGF | <i>Multiple Epidermal Growth Factor</i> (factor de crecimiento epidermal múltiple) |
| MES | <i>Maternal effect sterile</i> (efecto estéril maternal) |
| MIG | <i>abnormal cell migration</i> (migración celular anormal) |
| ml | Mililitro |
| mM | Milimolar |
| mm | Milímetro |
| <i>mom</i> | <i>More of MS (E transformed to MS)</i> (mayor transformación de la célula E en la célula MS) |
| mRNA | RNA mensajero |
| <i>myo</i> | <i>Myosin heavy chain structural gene</i> (gen estructural de la cadena pesada de la miosina) |
| N | Nitrógeno |
| ng | Nanogramo |
| NGM | <i>Nematode Growth Medium</i> (Medio de crecimiento para nematodos) |
| ORF | <i>open reading frame</i> (fase de lectura abierta) |
| PAR | <i>Abnormal embryonic PARTitioning of cytoplasm</i> (partición anormal del citoplasma embrionario) |
| pb | Pares de bases |
| PBS | Tampón fosfato salino |
| PCR | <i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reacción en cadena de la polimerasa) |
| <i>pha</i> | <i>Defective PHArynx development</i> (defectivo en el desarrollo de la faringe) |

| | |
|------------|---|
| <i>pie</i> | <i>Pharynx and intestine in excess</i> (exceso de faringe e intestino) |
| pM | Picomolar |
| <i>pop</i> | <i>Posterior pharynx defect</i> (defecto en la faringe posterior) |
| PSR | <i>Phosphatidylserine receptor</i> (receptor de fosfatidilserina) |
| PVP | Polivinilpirrolidona |
| RNasa | Ribonucleasa |
| RNAi | RNA de interferencia |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| rol | Fenotipo <i>roller</i> (movimiento en círculo) |
| RT-PCR | Reacción en cadena de la polimerasa en transcripción reversa |
| SAGE | <i>Serial analysis of gene expression</i> (análisis en serie de expresión génica) |
| SNARE | <i>Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor</i> (receptor de proteína de anclaje al factor soluble sensible a N-etilmaleimida) |
| SNP | <i>Single Nucleotide Polymorphism</i> (polimorfismo de nucleótido simple) |
| snip-SNP | SNP que afecta a la diana de una enzima de restricción |
| <i>src</i> | Oncogén identificado como agente transformante del virus del sarcoma de Rous |
| TCF/LEF | Factor de transcripción / factor potenciador linfoide |
| TE | Solución de Tris con EDTA |
| TEM | Microscopía electrónica de transmisión |
| TNF | Factor de necrosis tumoral |
| Tris | Hidroximetil aminometano |
| TTR | <i>Transthyretin</i> (Transtiretina) |
| µg | Microgramo |
| µl | Microlitro |
| <i>unc</i> | <i>uncoordinated</i> (movimiento incoordinado) |
| UV | ultravioleta |
| v/v | Concentración en porcentaje volumen/volumen |
| <i>vit</i> | <i>Vitellogenin structural genes</i> (genes de las proteínas del vitelo) |
| <i>vps</i> | <i>vacuolar protein sorting factor</i> (factor de clasificación de proteínas vacuolares) |
| <i>wrm</i> | <i>Worm armadillo</i> |
| <i>wt</i> | wild type (fenotipo silvestre) |
| WTL | proteína <i>Wntless</i> de <i>Drosophila</i> |
| YFP | <i>Yellow fluorescence protein</i> (proteína amarilla fluorescente) |
| YT | <i>Yeast extract and Tryptone</i> (Medio de crecimiento para bacterias) |