



**UNIVERSIDAD PABLO DE OLAVIDE, DEPARTAMENTO DE
BIOLOGIA MOLECULAR E INGENIERIA BIOQUIMICA**

**Implicaciones en el desarrollo y la longevidad del gen gale-1 en
Caenorhabditis elegans: Un modelo animal de galactosemia tipo III**

TESIS DOCTORAL

Ana María Brokate Llanos, 2011

El **Dr. Manuel Jesús Muñoz Ruíz**, profesor titular del Área de Genética de la Universidad Pablo de Olavide,

CERTIFICA:

Que el trabajo presentado por la licenciada **Ana María Brokate Llanos** titulado **“Implicaciones en el desarrollo y la longevidad del gen gale-1 en *Caenorhabditis elegans*: Un modelo animal de galactosemia tipo III”** ha sido realizado íntegramente por ella bajo mi dirección y supervisión, y reúne las condiciones de originalidad y calidad científica necesarias para constituir una Tesis Doctoral y optar al grado de Doctor por la Universidad Pablo de Olavide de Sevilla.

Y para que así conste, expido el presente certificado

Manuel Jesús Muñoz Ruíz

A Elena y Brokate, mis padres.

In Memoriam

1. Introducción	1
1.1 C. elegans como organismo modelo	3
1.2 Galactosa: Metabolismo, galactosemia y galactosa-4-epimerasa (gale-1)	9
1.2.1. EL metabolismo de la galactosa	9
1.2.2. Galactosemia tipo III	10
1.2.3. Galactosa 4 epimerasa (gale-1)	12
1.3 La Glicosilacion	13
1.3.1. La glicosilacion y Desarrollo de la vulva	14
1.3.2. La glicosilación y Desarrollo de las gónadas	15
1.3.3. La glicosilacion y Resistencia a Patógenos	17
1.4 Envejecimiento y Longevidad	19
1.4.1. Definición y teorías	19
+ Aspectos evolutivos del envejecimiento	20
1.4.2. Las Condiciones y rutas que regulan longevidad en <i>C. elegans</i>	21
1.4.2.1. Sistema reproductivo	22
1.4.2.2. Reducción de la tasa de Respiración	22
1.4.2.3. Reducción de la tasa de traducción	23
1.4.2.4. Detección de las condiciones ambientales y longevidad	23
1.4.2.5. La ruta de la Insulina	25
* Receptor de la Ruta de la Insulina. daf-2	27
* Factor de Transcripción de la Ruta de la Insulina. daf-16	27
1.4.2.6. La ruta de la Restricción dietaría	28
* Restricción dietaría crónica y severa	30
* Restricción dietaría crónica moderada	31
* Restricción dietaría en mitad de la vida	31
* Restricción dietaría por ayuno intermitente	32
1.4.2.7. La ruta de la Unfolded Protein Response (UPR)	32
2. Objetivos	37

3. Resultados	39
3.1. Clonación y Caracterización de <i>liv-8(pv18)</i>	44
3.1.1. Retrocruzamiento de limpieza	44
3.1.2. Termotolerancia y Longevidad	45
3.1.3. Retraso en el crecimiento	46
3.1.4. Identificación del gen afectado en <i>liv-8(pv18)</i>	48
3.1.4.1. Mapeo por genética clásica	48
3.1.4.2. Mapeo por polimorfismo de Sequence-Tagged Sites (STS)	51
3.1.4.3. Mapeo por Single Nucleotide Polimorphism (SNP)	51
3.1.5. Complementación y Secuenciación de <i>gale-1(pv18)</i>	59
3.1.6. Deleción de GALE-1	62
3.1.7. Hipersensibilidad a D-Galactosa	63
3.1.8. Perfil de UDP-azúcares en <i>gale-1(pv18)</i>	64
3.1.9. Hipersensibilidad a la Infección	65
3.1.10. Expresión de GALE-1	66
3.2. GALE-1 y fenotipos relacionados con desarrollo	68
3.2.1. Fenotipo de Letalidad embrionaria	68
3.2.2. Fenotipo de vulva protuberante	69
3.2.3. Tamaño de puesta de huevos y progenie tardía	70
3.2.4. Fenotipo de malformación de gónadas	71
3.2.5. Fenotipo mig y glicosilación	72
3.3 Longevidad	76
3.3.1. El fenotipo de longevidad de GALE-1	76
3.3.2. Rescate de los fenotipos de la mutación en <i>gale-1</i> mediante Modificación de la dieta	77
3.3.3. Fenotipo de longevidad y glicosilación	78
2.3.4. La ruta de la Unfolded Protein Response y longevidad	81
3.3.5. Fenotipo de longevidad y restricción dietaría	89
3.3.6. Fenotipo de Longevidad y ruta de la insulina	90

4. Discusión	97
4.1. La naturaleza de la mutación de <i>gale-1(pv18)</i>	99
4.2 Mutaciones en <i>gale-1</i> como modelo de galactosemia tipo III	100
4.3. GALE-1 es sensible a Galactosa	102
4.4. GALE-1 y resistencia a patógenos	103
4.5. GALE-1 y problemas de morfogénesis	104
4.5.1. GALE-1 y morfogénesis de vulva y letalidad embrionaria	104
4.5.2. GALE-1 y morfogénesis de las gónadas	105
4.6. Longevidad y termotolerancia	107
5. Conclusiones	113
6. Materiales y Métodos	117
6.1 Medios de Cultivo y Tampones	119
6.1.1. Medios de gusanos. Medios de gusanos	119
6.1.2. Medio de bacterias	120
6.1.3 Soluciones y Tampones	121
6.2 Estirpes y condiciones generales de crecimiento	122.
6.2.1 Cepas de <i>C. elegans</i>	122
6.2.2. Cepas de Bacterias	125
6.3 Métodos	
6.3.1. Preparación de huevos	126
6.3.2. Retrocruzamiento o cruce de limpieza	127
6.3.3. Termotolerancia	127
6.3.4. Curvas de longevidad	128
6.3.5. Interferencia de RNA (RNAi) por ingestión	129
6.3.6. Letalidad Embrionaria y Parada en L1	130
6.3.7. Perfil de desarrollo	130
6.3.8. Tamaño de la puesta de huevo	130
6.3.9. Microscopia	130
6.3.10. Cuantificación de fluorescencia	132
6.3.11. Mapeo por Single polymorphism Nucleotide (SNP)	133

6.3.12. Transformación con biobalística	134
6.3.13. Amplificación de gale-1	135
6.3.14. Secuenciación	136
6.3.15. Deleción	136
6.3.16. Sensibilidad a galactosa	136
6.3.17. HPLC	137
6.3.18. Preparación pad de agarosa	137
6.3.19. Congelación	137
7. Anexos	139
Anexo I Curvas de longevidad	141
Anexo II Lista de Oligonucleotidos de SNP	143
Anexo III Lista de Oligonucleotidos de secuenciación de gale-1	143
8. Bibliografía	145

1. INTRODUCCION

1.1 *C. elegans* como organismo modelo

“Los seres vivos nacen, crecen, se reproducen y mueren” es la primera lección de biología que aprendemos y recordamos. Mas tarde, la definición de los organismos modelos como una especie animal que reproduce funciones, procesos, enfermedades, etc. de manera similar a otros seres vivos, es la que sorprende y queda registrada en la memoria. Partiendo de estas dos definiciones elementales de biología, el nematodo *Caenorhabditis elegans* realiza, a su manera, todas las funciones básicas de un ser vivo: eclosiona, se desarrolla, se reproduce y muere, y también, reproduce procesos, enfermedades, etc. de manera similar a otros seres vivos, incluyendo el hombre, constituyéndose en un organismo modelo útil para el abordaje de las bases genéticas de las funciones que caracterizan a un ser vivo.

Dentro de los metazoos, el filo de los nematodos es uno de los mas extensos encontrados en la naturaleza con un numero aproximado de 25.000 especies. Las características que agrupan a los nematodos se resumen en ser asegmentados; fusiformes de cuerpo cilíndrico y alargado; pseudocelomados; eutelicos; tener simetría bilateral; carecer de sistema circulatorio y poseer sistema nervioso. Sin embargo, en el gran número de especies se pueden encontrar una enorme gama de variedades en cuanto a tamaño, formas de vida acuática o terrestre, parásitos o de vida libre, entre otras características. Dentro de este filo, en la familia Rhabditidae se encuentra el género *Caenorhabditis* y dentro de este género la especie *elegans*, el cual forma parte del selecto grupo de organismos modelo utilizados para el avance de la biología. La historia de *C. elegans* data de 1956 cuando fue aislada de detritos de hongos por Warwick Nicholas en Bristol-Inglaterra y como animal modelo desde 1965 cuando Sydney Brenner lo escoge para iniciar sus investigaciones sobre diferenciación celular, muerte programada de las células y genética del desarrollo de los órganos (Brenner, 1974).

En la selección de los modelos animales prima unos requerimientos vitales poco exigentes, un ciclo de vida corto, y la posibilidad de manipularlos genéticamente, características que *C. elegans* cumple a la perfección. Las ventajas que ofrece *C. elegans* como organismo modelo comprenden la economía de su mantenimiento en el laboratorio: puede crecer en medio líquido y sólido, se alimenta de *Escherichia coli*, crece a temperaturas que oscilan entre 16 y 25°C y requiere pocos equipos para su

conservación. Además, alcanza 1mm. de longitud en el estadio adulto y es transparente siendo suficiente una lupa estereoscópica para la manipulación rutinaria y para la visualización in vivo de cada una de sus divisiones celulares y órganos sin necesidad de tinciones. Es el único animal pluricelular que puede ser congelado y mantenerse con vida por lo que es posible mantener una colección de cepas sin requerir un mantenimiento continuo (Brenner, 1974).

C. elegans tiene un ciclo de vida de 3 días en los cuales pasa por la fase de huevo en aproximadamente 14 a 16 horas, en 48 horas pasa por 4 estadios larvarios (L1-L4), claramente delimitada por mudas de cutícula, antes de llegar al estado adulto con madurez sexual. Una vez adulto pone huevos durante 3 días, sobrevive otros 12 días y finalmente muere. Además, posee un estado larvario alternativo de desarrollo, llamado dauer, cuya función es la de resistir condiciones adversas, (falta de comida, sobrepoblación, altas temperaturas, etc.) (Figura 1.1). En el estadio dauer, el nematodo realiza una serie de cambios morfológicos reversibles que le permiten resistir hasta tres meses en la condición adversa en que se encuentre, pero es capaz de reiniciar su desarrollo hacia el estadio L4 cuando las condiciones mejoran. Este corto y a la vez complejo ciclo de vida permite el estudio del desarrollo en las diferentes fases, facilita el estudio de la longevidad y resulta cómodo para la realización de escrutinios genéticos y el estudio de nuevas estrategias terapéuticas.

Eliminado: una fase de resistencia cuando

Eliminado: las condiciones para continuar su desarrollo en el estadio L2 son adversas

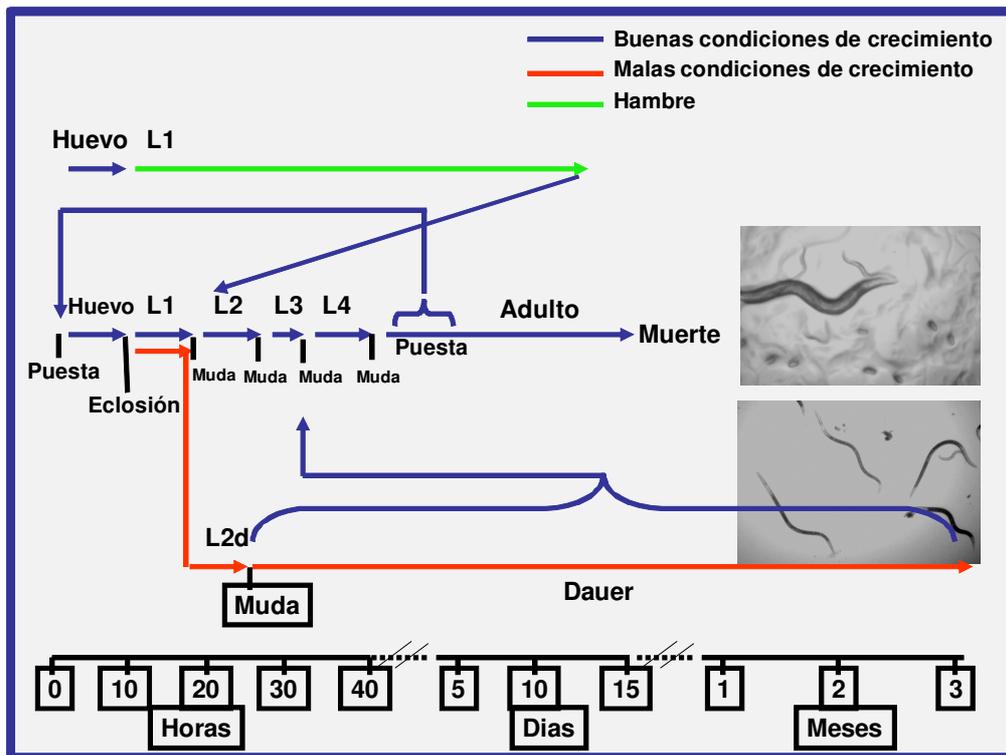


Figura 1.1. Ciclo de vida de *C. elegans*.

La anatomía de *C. elegans* está conformada por un estoma (boca), faringe, intestinos, gónadas y una cutícula de colágeno (Figura 1.2). En la naturaleza se encuentra dos formas sexuales determinada por el cromosoma X, siendo las hermafroditas XX y los machos XØ. Las hermafroditas se encuentran en mayor número, con capacidad de autofecundarse, para lo cual tienen un sistema reproductor formado por dos brazos gonadales que parten de la vulva, situada en la zona central, y se extienden hacia los extremos anteriores y posteriores del gusano. El aparato reproductor además cuenta con úteros, ovarios, oviductos y espermatotecas, donde se acumulan gametos masculinos producidos en la primera fase de reproducción (etapa masculina) para fecundar los óvulos producidos en una segunda fase (etapa femenina). Una vez fecundados, los óvulos pasan por los úteros realizando las primeras divisiones celulares hasta salir por la vulva. Los machos, en cambio, aparecen en una proporción del 1% por no-disyunción del cromosoma X y su aparato reproductor consiste en un solo brazo gonadal que se extiende hacia la parte anterior del gusano y regresa hacia la parte posterior para terminar en una espícula u órgano reproductor utilizada para la cópula.

Comentario [MM1]: Faltan órganos

Eliminado: un problema de

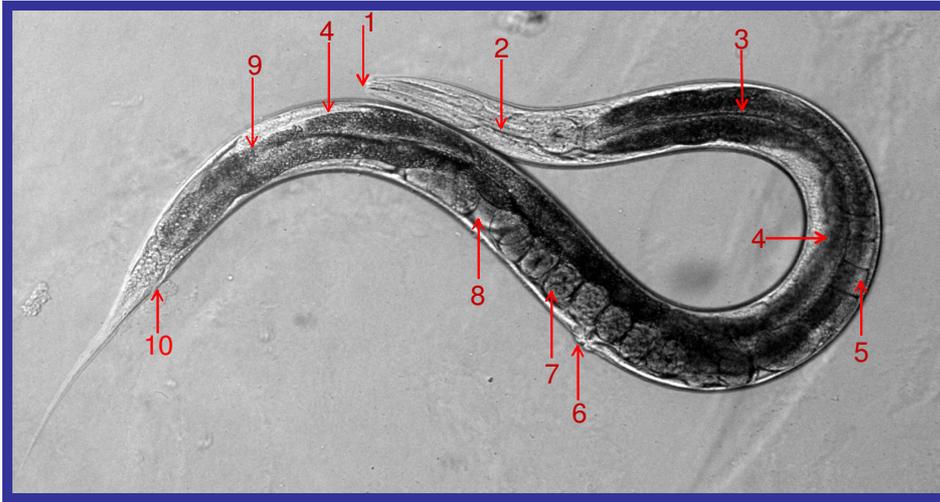


Figura 1.2. Anatomía de *C. elegans* hermafrodita. 1. Boca, 2. Faringe, 3. Intestino, 4. Ovarios, 5. Oocitos, 6. Vulva, 7. Huevos en útero, 8. Espermatoteca, 9. Gónada posterior, 10. Ano.

C. elegans es un organismo donde hacer experimentos genéticos es relativamente fácil, debido a que el número de descendientes de un solo gusano es muy alto (del orden de 250 a 350 individuos), el hecho de ser hermafrodita permite conservar fácilmente líneas puras, y al mismo tiempo, la posibilidad de ser fecundados con machos hace posible los cruces genéticos entre estirpes, los cuales son útiles para determinar epistasias, interacciones genéticas, conformar rutas y confirmar modelos.

A las condiciones primarias en la selección de un organismo modelo, *C. elegans* suma el ser el primer organismo pluricelular secuenciado en su totalidad, lo cual se consiguió en el 2002, con 97 millones de pares de bases, y más de 19000 genes, distribuidos en cinco pares de cromosomas autosómicos y un par de cromosomas sexuales. Posteriormente, con la secuenciación del genoma humano en 2008 se ha podido establecer que existe una homología génica del 40% (Hodgkin and Herman, 1998), y también rutas metabólicas conservadas como la Ruta de la Insulina y la Ruta Leloir (metabolismo de la galactosa) y rutas de estrés como la Unfolded Protein Response (UPR), entre otras.

La secuenciación del genoma junto con la facilidad en la manipulación genética han permitido la creación de un gran número de nuevas herramientas técnicas y de biología molecular y hoy se dispone de numerosos recursos como una colección de cepas que

llevan deleciones de la mayoría de genes, colección de cepas que expresan GFP dirigida por la mayoría de los promotores, genotecas ordenadas de todo el genoma de cósmidos, fásmidos y YAC, genotecas de interferencia de RNA (RNAi) capaces de hacer mutantes funcionales transitorios y otros recursos. Existen numerosos protocolos técnicos específicos de *C. elegans* como son protocolos para realizar transgénico, o técnicas de RNAi, separación de nematodos completos mediante la tecnología COPAS, separación de células, cultivos de neuronas y otros. Además, se han implementado técnicas para facilitar las mediciones en *C. elegans* de grasas, azúcares y prácticamente de todos los compuestos que rigen las funciones vitales (<http://www.wormbook.org>).

Comentario [MM2]: Creo que es mejor la referencia a wormmethod

Por otra parte, la característica de eutelico (todos las cepas isogénicas tienen el mismo número de células) ha permitido conocer todas las divisiones celulares y el linaje de cada una de sus 1090 células, de las cuales 131 sufren apoptosis de forma invariable en todos los individuos (Sulston and Horvitz, 1977). De las 959 células que lo componen, 302 son neuronas que forman un sistema nervioso sencillo pero responsable tanto de los procesos necesarios en el mantenimiento de los sistemas vitales como de elaboraciones de comportamientos más complejos relacionadas con procesos como la termotaxis, la quimiotaxis o el aprendizaje.

Cuando Sydney Brenner “cultiva” el primer *C. elegans*, en el laboratorio dio origen a una fructífera línea de investigación esparcida a muchos laboratorios en forma de *C. elegans* estirpe N2, su aporte científico fue mas allá cuando en 1974 comprueba que el tratamiento de los gusanos con EMS (etil-metano-sulfonato) inducía mutaciones que podían estar relacionadas con genes específicos y con alteraciones precisas del desarrollo (Brenner, 1974), método que se sigue utilizando en la búsqueda de nuevas funciones en los genes. Desde entonces, en su haber como organismo modelo y prueba de la relevancia de los resultados obtenidos, *C. elegans* ha sido galardonado con 3 premios Nobel de Medicina y Fisiología: El primero concedido en el 2002 a Sydney Brenner, John E. Sulston y Robert Horvitz por sus descubrimientos en la muerte celular programada, el segundo, cuatro años mas tarde, a Andrew Fire y Craig C. Mello por el desarrollo de la técnica de RNAi y en el 2008 a Shimomura, Chalfie y Tsien por el descubrimiento y desarrollo de la proteína verde fluorescente, GFP. Estudios de tal relevancia que han pasado a convertirse en nuevas ventajas técnicas de *C. elegans* como organismo modelo.

Eliminado: nematodo terrestre de vida libre,

Eliminado: , especialmente en desarrollo. ¶

Con 46 años de estudio es mucho lo que se conoce de *C. elegans* en cuanto a morfología, desarrollo, células, procesos, genoma, ciclo de vida etc. Cada investigación abordada y cada resultado reportado constituyen las bases de prometedoras investigaciones, no obstante, no todo está escrito sobre *C. elegans* ni todo lo que puede aportar está descrito. Lejos de cerrar su ciclo de estudio se han abierto nuevos campos de investigación en enfermedades metabólicas, neurológicas, comportamiento, respuesta a patógenos, envejecimiento así como nuevas alternativas terapéuticas y un largo etcétera.

1.2. Galactosa: Metabolismo, galactosemia y galactosa-4-epimerasa (GALE)

1.2.1. El Metabolismo de la Galactosa

La galactosa es un monosacárido que junto con la glucosa dan lugar a la lactosa, primer alimento de todos los mamíferos. La galactosa está presente en ciertas frutas (nispero, dátiles, papaya, higos), legumbres (garbanzos, habichuelas, lentejas) y verduras (espinacas), es uno de los 8 monosacáridos esenciales de la dieta y su metabolismo está destinado a convertirse en glucosa-1 fosfato, el metabolito más utilizado como recurso energético, y en la producción de UDP-galactosa como donador de azúcares en los procesos de glicosilación.

Eliminado: En la vida adulta, la

La ruta encargada del metabolismo de la galactosa se conoce como la ruta Leloir, descrita en 1947 por el premio Nobel de química en 1970, Luis Federico Leloir. En su metabolismo intervienen 4 enzimas, de las cuales la galactoquinasa, la galactosa 1P uridiltransferas y la galactosa 4 epimerasa están conservadas desde bacterias hasta mamíferos (Fridovich-Keil, 2006) (Figura 1.3).

Eliminado: E. coli

Con formato: Fuente: Sin
Cursiva

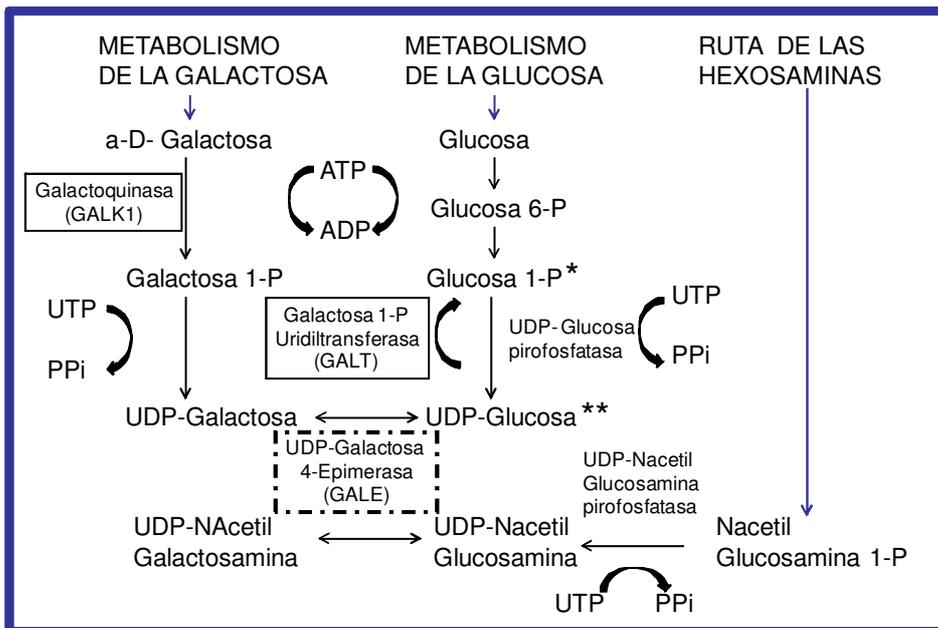


Figura 1.3. Ruta Leloir. En el primer paso β -D-galactosa es epimerizada a α -D-galactosa por la galactosa mutarotasa (GALM, EC 5.1.3.3), el siguiente paso involucra una fosforilación dependiente de ATP de la α -D-galactosa por la galactoquinasa (GALK1, EC2.7.1.6) para convertirla en galactosa-1-fosfato. En el tercer paso, la enzima galactosa-1-fosfato uridiltransferasa (GALT, EC 2.7.1.6) cataliza la transferencia de un grupo UMP, de la UDP-glucosa, a la galactosa-1-fosfato generando glucosa 1 fosfato y UDP-galactosa y por último la UDP-galactosa es convertida a UDP-glucosa por acción de la UDP-galactosa-4-epimerasa (GALE, EC 5.1.3.2) (Holden et al., 2003; Timson, 2006). GALE también realiza la conversión de UDP-glucosa a UDP-galactosa y la interconversión de UDP-Nacetilglucosamina a UDP-Nacetilgalactosamina, * Entrada en glicolisis. ** Formación de glucógeno. Las enzimas en recuadros son de la ruta Leloir.

Las mutaciones en alguna de las tres enzimas en humanos dan origen a los desordenes metabólicos hereditarios conocidos como galactosemia. Según la enzima deficiente la galactosemia ha sido clasificada como tipo II si está afectada la galactoquinasa (OMIM 230200), tipo I si corresponde a galactosa-1-fosfato uridiltransferasa (OMIM 230400) y tipo III cuando es debido a fallos en la enzima UDP-galactosa-4-epimerasa (OMIM 230200).

1.2.2 Galactosemia tipo III

La galactosemia tipo III es una enfermedad rara que se caracteriza por la imposibilidad de metabolizar galactosa generando la acumulación anormal de UDP-gal y galactosa 1-fosfato y otros metabolitos derivados de la galactosa como galactitol, inositol y galactonato, cuya acumulación resulta ser tóxica. Los síntomas pueden incluir cataratas

tempranas, daño hepático, daño renal, sordera, retardo mental y en el desarrollo (Walter et al., 1999) y otras anormalidades específicas **de defectos** en glicosilación (Tyfield and Walter, 2002). Tradicionalmente, se han reconocido dos formas de galactosemia tipo III: a) Una forma benigna o periférica, en la cual la deficiencia esta restringida a eritrocitos y leucocitos circulantes (Gitzelmann, 1972; Holton JB, 2000; Kalckar, 1965) con una frecuencia de 1/6200 a $\leq 1/64800$ dependiendo del grupo racial afroamericanos o caucásicos respectivamente (Alano et al., 1998) y b) Una forma severa o generalizada con actividad epimerasa casi nula en eritrocitos y linfoblastos (Holton et al., 1981) con una frecuencia muy baja. Posteriormente, **esta** condición binaria de la deficiencia de epimerasa se ha **puesto en duda y se** descrito **como un desorden continuo**, en la cual en algunos pacientes se combinan signos y síntomas de la forma benigna y de la forma severa (Openo et al., 2006).

Eliminado: la

Eliminado: en

Eliminado: términos bioquímicos

El diagnóstico de las galactosemias está basado en **la detección de** niveles elevados de galactosa en sangre y orina. Para el caso de la galactosemia tipo III se debe corresponder un nivel elevado de galactosa-1-fosfato (gal 1-P) con niveles normales de actividad de la enzima galactosa-1-fosfato uridiltransferasa (GALT).

Los estudios realizados del gen GALE en pacientes con galactosemia tipo III muestran que estos enfermos portan mutaciones puntuales a lo largo de todo el gen **y no** deleciones o reorganizaciones del mismo. La naturaleza de las mutaciones específicas en diferentes puntos del gen afectan de manera diversa a la actividad de la proteína GALE, pudiendo afectar de forma independiente a cada una de las cuatro reacciones que lleva a cabo esta enzima (Wohlens et al., 1999).

Eliminado: e

El tratamiento en general para todas las galactosemias es la restricción de galactosa y su precursor lactosa de la dieta, no obstante, en galactosemia tipo III no se elimina completamente ya que es necesario para la biosíntesis de UDP-galactosa (UDP-gal), además se recomienda complementar la dieta con UDP-glucosa (UDP-glu), UDP-NAgalactosamina (UDP-NAgal) y UDP-NAglicosamina (UDP-NAglu), ya que estos compuestos son necesarios para la síntesis de glicoproteínas y glicolípidos, cuyo desequilibrio puede ser un factor de patogénesis (Timson, 2006).

1.2.3 Galactosa-4-epimerasa (GALE-1)

La UDP-galactosa-4-epimerasa (GALE) fue descrita en un principio como la última enzima de la Ruta Leloir encargada de convertir la UDP-gal a UDP-glu, mas adelante, se describe la capacidad de realizar la reacción en dirección inversa, UDP-glu a UDP-gal (Holden et al., 2003). Otra función descrita para GALE en humanos esta en la Ruta de las Hexosaminas realizando la interconversión de UDP-NAglu a UDP-NAgal, compuesto que proviene de otra ruta metabólica (Kingsley et al., 1986; Maley and Maley, 1959; Piller et al., 1983; Wohlers et al., 1999; Wohlers and Fridovich-Keil, 2000) (Figura 1.3). En la actualidad, se le reconoce a GALE no sólo su papel como enzima metabólica de la galactosa sino también un papel esencial en la síntesis y control de los niveles de UDP-glu, UDP-gal, UDP-NAglu y UDP-NAgal (Schulz et al., 2005), los cuales son necesarios para el proceso de glicosilación de proteínas, lípidos y hormonas.

Eliminado: el paso final de

Eliminado: s

Eliminado: n

Eliminado: s

Eliminado: s

Eliminado: s

A nivel estructural, GALE es la enzima de la ruta Leloir mas estudiada, las pruebas de cristalografía realizadas sobre la enzima de *E. coli* demuestran que en su arquitectura molecular es una enzima dimérica que pertenece a la super-familia de proteínas de cadena corta dehidrogenasa/reductasa (Thoden and Holden, 1998) implicadas en muchos procesos biológicos, y que se caracterizan por contener un residuo conservado de Tyr-X-X-X-Lys localizado en el sitio catalítico. Además del sitio catalítico están localizados en la proteína los sitios de interacción de cada uno de los azúcares y del cofactor NADH (Thoden et al., 2001).

Eliminado: en

GALE está muy conservado en la evolución, se encuentra presente en procariontas y eucariotas, manteniendo un alto grado de similitud. Si bien, la actividad sobre UDP-gal y UDP-glu está presente en todos los organismos no es así para la actividad de interconversión de UDP-NAgal y UDP-NAglu, que se ha descrito ausente en algunos organismos unicelulares (Schulz et al., 2004).

1.3 Glicosilacion de proteínas

La glicosilación es el proceso por el cual se unen covalentemente a las proteínas oligosacáridos y polisacáridos en los grupos amidas de los residuos asparagina (N-glicosilación), en los grupos hidroxilos de los residuos de serina y treonina (O-glicosilación), o mediante la unión de glucosaminoglicanos (GAG) a un residuo de serina. Este proceso ocurre en más de la mitad de todas las proteínas en organismos eucariotas y cerca del 90% de éstas son glicosilación tipo N (Apweiler et al., 1999).

Comentario [MM3]: Tiene nombre este tipo de glicosilación

Los glicanos tipo N son cadenas de azúcares complejas y diversas unidas a una asparagina dentro de una secuencia consenso de Asn-X-Ser/Thr (donde X puede ser cualquier aminoácido, excepto prolina), en un péptido naciente de 12-14 aminoácidos.

Comentario [MM4]: No lo entiendo

La estructura inicial está conformada por 14 azúcares, 3 glucosas, 9 manosas y 2 NAcetil glucosamina (Glc3Man9GlcNA2) y es transferida en bloque al core proteico en el lumen del Retículo endoplasmático, donde un residuo terminal de manosa y 3 de glucosa son eliminadas y ciclos repetidos de adición y eliminación de glucosa ayudan al correcto plegamiento de la glicoproteína, una vez la glicoproteína está adecuadamente plegada y oligomerizada se transporta al Aparato de Golgi, sitio en el cual nuevas eliminaciones y adiciones de azúcares ocurren hasta conformar las glicoproteínas maduras. La función de las glicoproteínas tipo N son diversas y se han relacionado con multitud de procesos de reconocimiento entre los que se encuentran: Estabilizar la proteínas contra la denaturalización y proteólisis, potenciar la solubilidad, modular la respuesta inmune, facilitar la orientación de proteínas relativa a la membrana, conferir rigidez estructural, regular el recambio (turnover) proteico, ajustar la carga y punto isoeléctrico de las proteínas y mediar interacciones con patógenos (Helenius and Aebi, 2004).

La glicosilación tipo O, a diferencia de la glicosilación tipo N, ocurre exclusivamente en el Aparato de Golgi, se realiza directamente sobre la proteína una vez sintetizada y la adición es de un único azúcar que puede ser Nacetil glucosamina (NAglu) o Nacetil galactosamina (Nagal) unidas al grupo hidroxilo de la serina o treonina. La adición de Nagal ha sido considerada un marcador de la glicosilación O tipo mucina y es realizada por polipeptidos N-acetilgalactosaminiltransferasas (ppGalNAcT), mientras que, la

adición de NAGlu es conducida en parte por los niveles de UDP-GluNAc, derivada de la ruta de las hexosaminas (Figura 1.3), y es realizada por la transferasa GluNAc (OGT) que junto con la β -N-acetilglucosamina (OGA) regulan de forma cíclica esta modificación post-traducional en factores de transcripción, enzimas metabólicas y quinasas (Hart et al., 2007; Lazarus et al., 2009), por lo cual es considerada un regulador clave de la actividad proteica citoplasmática y nuclear (Commer and Hart, 2001). La adición O-GluNAc ha sido implicada en mamíferos en resistencia a insulina y diabetes tipo II (Akimoto et al., 2005), enfermedades neurodegenerativas y cardíacas (Clark et al., 2003; Dias and Hart, 2007; Liu et al., 2007), en envejecimiento (Fulop et al., 2008), remodelación de histonas, proliferación, apoptosis y degradación proteosomal (Berninsone, 2006).

Comentario [MM5]: No se que quieres decir

Eliminado: respuesta a

Los GAG son cadenas lineales de polisacáridos compuestos por unidades repetidas de un amino-azúcar (UDP-NAGal ó UDP-NAGlu) intercaladas por un ácido urónico (ácido glucurónico ó ácido iudorónico) con un tetrasacárido base compuesto por una xilosa, dos galactosas y un ácido glucurónico. Según el amino-azúcar que conforme el GAG se le atribuye un nombre, siendo Heparan Sulfato (HS) cuando el amino-azúcar intercalado es la UDP-NAGlu y Condroitin si el azúcar intercalado es UDP-NAGal. La función de algunos GAG ha sido relacionada con la señalización intercelular.

Eliminado: ,

Eliminado: l

Comentario [MM6]: NO tengo clara esta frase

La importancia de los carbohidratos en la interacción entre célula-célula o para la interacción con el ambiente, ha sido reportada en humanos y en diversos animales modelos de investigación. En este sentido, la glicosilación esta implicada en varios procesos del desarrollo de órganos en *C. elegans* como la vulva y las gónadas, y en otros procesos como la defensa contra las infecciones microbianas.

1.3.1 Glicosilación y Desarrollo de la vulva

En *C. elegans* se describe la vulva como un tubo epitelial que conecta el útero de la hermafrodita al epitelio externo permitiendo el paso de los huevos al exterior y del esperma del macho hacia el interior. Desde esta definición, los genes denominados sqv (squashed vulva) son el resultado de un escrutinio para mutantes defectivos en la morfogénesis de la vulva (Herman et al., 1999), mutantes en estos genes tienen reducida

a la mitad la separación entre la pared posterior y anterior en el estadio L4 (Hwang and Horvitz, 2002) (Figura 1.4).

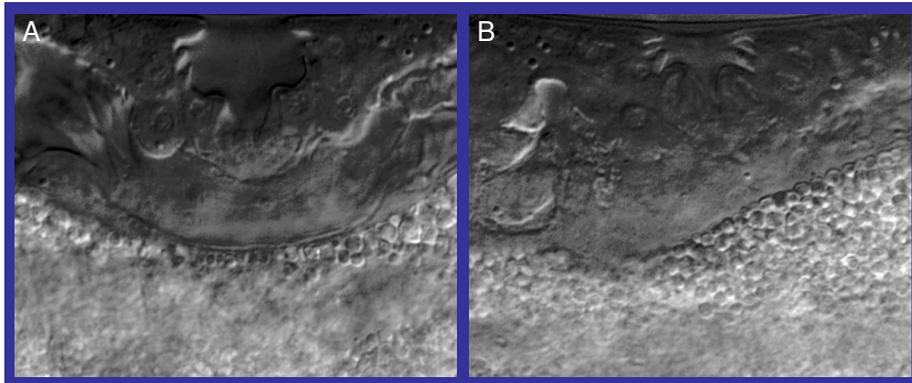


Figura 1.4. Estructura de la vulva en el cuarto estadio larval. A. Cepa silvestre. Puede observarse el espacio de invaginación característico formado por células vulvales que se han separado de la cutícula y migrado al interior. B. Cepa de un mutante *sqv*. En mutantes *sqv* el espacio de invaginación está colapsado y no alcanza a la mitad de la dimensión observada en el silvestre. Fotos tomadas con Nomanski a 40X.

Comentario [MM7]: Pienso que te debes señalar la vulva

Todos los genes identificados como *sqv* (*sqv*-1-8) participan de alguna manera en la síntesis del condroitín. En el citosol, *sqv*-4 sintetiza UDP-ácido glucoronico, *sqv*-7 realiza el transporte de los UDP- azúcares necesarios al Aparato de Golgi, donde *sqv*-1 cataliza la síntesis de UDP-xilosa, y *sqv*-6, *sqv*-3, *sqv*-2 y *sqv*-8 realizan la síntesis del tetrasacarido base de unión al core proteico de todos los GAG, por último, *sqv*-5 realiza la adición de ácido glucorónico y N-acetil-galactosamina para la síntesis específica del GAG condroitín. El condroitin es un GAG extracelular que interactúa con el agua generando un incremento de la presión osmótica, del cual se ha postulado que puede estar implicada en la expansión de espacios extracelulares en general y en particular en la expansión de la vulva, lo que explicaría el fenotipo de estos mutantes (Hwang et al., 2003).

1.3.2 Glicosilación y Desarrollo de las gónadas

En *C. elegans*, la estructura de las gónadas está formada por dos brazos simétricos con forma de U, uno localizado en la región anterior y otro en la posterior. En relación al intestino, el brazo anterior de la gónada está sobre el lado derecho de la cavidad corporal y el brazo posterior está sobre el lado izquierdo (Antebi et al., 1997). La

simetría de los brazos de las gónadas se genera por la migración de 2 células denominadas DTC (de distal tip cell), las cuales se localizan en el final anterior y posterior del primordium gonadal y dirigen la migración. La DTC anterior migra sobre la lámina basal de la superficie basal-anterior derecha de la pared corporal, mientras que la DTC posterior migra en dirección contraria sobre la superficie posterior-izquierda (Nishiwaki, 1999) (Figura 1.5).

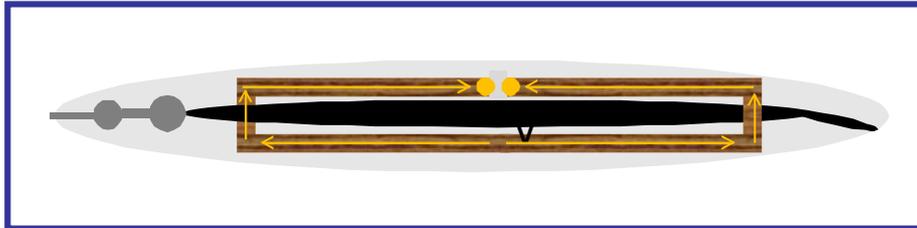


Figura 1.5. Migración de las gónadas en *C. elegans*. La correcta migración de las gónadas se realiza en tres fases: 1 Migración sobre el lado ventral, 2. Migración del lado ventral al dorsal y 3. Migración dorsal. Las gónadas están representadas en marrón, las flechas amarillas representan la dirección de las fases de migración y los círculos amarillos las DTCs. El intestino está coloreado en negro y puede observarse la disposición de las gónadas con relación al intestino.

Muchos genes contribuyen a la correcta migración de las DTCs para formar los dos brazos gonadales simétricos, mutaciones en ellos alteran la migración de la DTC anterior, posterior o de ambas. Uno de los genes esenciales es mig-17, cuya mutación produce una migración normal a lo largo del músculo ventral pero la migración se desvía de la ruta normal después del primer cruce, MIG-17 codifica para una proteína de la familia metaloproteasa-desintegrina (ADAM) con nueve putativos sitios de N-glicosilación en toda la secuencia, 6 de ellos en un Pre-dominio (Nishiwaki et al., 2000), la inhibición de la glicosilación en 5 de los 6 sitios afectan la localización de mig-17 en las gónadas, lo cual evidencia la necesidad de que el Prodominio esté N-glicosilado (Ihara and Nishiwaki, 2007). Así mismo, mutaciones que afectan la correcta N-glicosilación de mig-17 causan migración defectiva de las DTCs, como es el caso de mutaciones en mig-23 cuya actividad difosfatasa nucleótido es indispensable en el Aparato de Golgi para evitar la acumulación de difosfatos nucleosidos que inhiben la actividad de las glicosiltransferasas (Nishiwaki et al., 2004), encargadas de transferir los azúcares de los UDP-azúcares al aceptor correspondiente.

Comentario [MM8]: Reescribir para simplificar

Mutaciones en cualquier de los 8 genes del Complejo Oligomérico de Golgi (COG) encargados de regular el transporte entre el Aparato de Golgi y Retículo endoplasmático de proteínas secretadas y glicosiladas, presentan defectos en la migración de las gónadas y al menos dos de ellos, *cogc-1* y *3*, han sido descritos como necesarios para la localización y N-glicosilación de MIG-17 (Kubota et al., 2006). Además, el transporte de los UDP-azúcares desde el citosol al Aparato de Golgi es realizado por varios transportadores multisustratos y una deficiencia en el transporte puede afectar la glicosilación. *srf-3* y *CO3H5.2* participan en el transporte de UDP-NAglu y la inactivación de ambos simultáneamente produce morfología de gónadas anormales y acumulación de oocitos en el brazo gonadal proximal (Caffaro et al., 2007).

Además de la N-glicosilación, la síntesis de los GAG también participan en la correcta migración de las gónadas, así *sqv-5* y su cofactor *mig-22*, responsables de la síntesis y polimerización de Condroitin (mencionado anteriormente por su importancia para el correcto desarrollo de la vulva) presentan fenotipo *mig*, este fenotipo *mig* en *sqv-5* y *mig-22* es atribuido a que el Condroitin afecta la ruta de señalización del netrin (*unc-6* y sus receptores *unc-5* y *unc-40*), los cuales son críticos en la migración dorsal de ambas DTC (Suzuki et al., 2006).

Comentario [MM9]: Mandamos este párrafo al carajo?

Todos los datos anteriores muestran que para la correcta migración de las DTCs son necesarios varios factores relacionados con la glicosilación como la N-glicosilación de MIG-17 y otros genes que participan en su correcta glicosilación como son las glicosiltransferasas, los transportadores de UDP-azúcares, los transportadores de elementos necesarios entre Aparato de Golgi y Retículo Endoplasmático (COG) como también la síntesis de glicosaminoglicanos.

1.3.3. Glicosilación y Resistencia a Patógenos

C. elegans en su hábitat natural se enfrenta a una enorme variedad de bacterias muchas de las cuales son patógenas. Para responder a estas agresiones, *C. elegans* presenta un sistema de defensa complejo en el que al menos la inmunidad innata está conservado en moscas y mamíferos (Troemel et al., 2006) y por ello se está utilizando como modelo para estudiar esta inmunidad y para examinar interacciones bacteria-huesped (Aballay et al., 2000; Millet and Ewbank, 2004; Nicholas and Hodgkin, 2004).

Eliminado: en

Eliminado: a

Para entender los procesos moleculares que rigen la relación patógeno-huesped se han aislado multitud de mutantes, algunos de ellos afectados en el proceso de glicosilación. Entre ellos nos encontramos a la familia de genes *srf*, resistentes a la toxina Cry de *Bacillus Thuringiensis*, cuatro de los cuales codifican para glicosiltransferasas que actúan en la construcción de cadenas de carbohidratos (Griffitts et al., 2003; Griffitts et al., 2001; Marroquin et al., 2000). Mutantes afectados en las propiedades de la superficie de la cutícula conocidos como *srf* (SuRFace antigenicity abnormal) también presentan problemas de glicosilación y resistencia a otros patógenos, el más estudiado de ellos es *srf-3*, un transportador de UDP-gal y UDP-NAglu, cuya mutación presenta un perfil reducido en un 65% de glicoconjugados tipo O (conteniendo ácido glucoronico y galactosa) y de los glicoconjugados tipo N (conteniendo galactosa y fucosa) (Cipollo et al., 2004), el cual es resistente a *Micobacterium nematophilum* y *Yersinia spp* (Darby et al., 2002; Joshua et al., 2003).

Comentario [MM10]: Me lo explicas???

En el mismo orden, los escrutinios en busca de mutantes resistentes a *Micobacterium nematophilum* han conformado una familia de genes llamados *bus*, (bacterially unswollen), 4 codifican para glicosiltransferasas y uno para un transportador de UDP-azucres (Gravato-Nobre et al., 2010). Otro gen implicado en glicosilación es *glf-1* el cual codifica a una UDP-galactopironosa mutasa, y también es resistente a *Micobacterium nematophilum* (Novelli et al., 2009). Todos estos trabajos en conjunto muestran la importancia de la integridad y el control de la glicosilación para la vida normal del gusano y como un factor principal en determinar la susceptibilidad a patógenos.

Por otra parte, de entre los mutantes resistentes a patógenos se encuentran algunos que forman parte de la ruta de control de la longevidad como *daf-2* y *age-1*, los cuales son elementos de la ruta de la insulina/IGF (Garsin et al., 2003), lo que sugiere una intrigante relación entre longevidad y resistencia a patógenos.

1.4 Envejecimiento y Longevidad:

1.4.1 Definición y teorías

El concepto de envejecimiento resulta difícil definir y de hecho, no existe una definición universal consensuada sino múltiples fórmulas para describir este proceso (Medvedev en 1990 recoge un total de 300 definiciones) (Medvedev, 1990). No obstante, la mayoría de las definiciones hablan de acumulación progresiva de cambios con el tiempo, deterioro y pérdida de eficacia de estructuras (como en el sistema músculo esquelético o sistema neuronal) y funciones fisiológicas (flujo sanguíneo, ventilación, etc.) que alcanzaron su máxima eficiencia en algún momento del desarrollo. Todos estos efectos traen por consecuencia un descenso en la fertilidad, una mayor vulnerabilidad a los cambios ambientales (por ejemplo intolerancia a temperaturas extremas), mas susceptibilidad a infecciones y un incremento en la probabilidad de padecer enfermedades inmunológicas (amiloidosis, enfermedades autoinmunes), neurodegenerativas (Alzheimer, Parkinson), metabólicas (intolerancia a la glucosa), lo cual conllevan a una pérdida de la calidad de vida y un riesgo mayor de muerte.

La vida media de la especie humana ha ido en aumento directamente proporcional a adelantos médicos, epidemiológicos y científicos, lo que ha supuesto un incremento de la población longeva (grupo vulnerable a enfermedades y cambios ambientales), siendo hoy el envejecimiento una circunstancia biológica y social que amerita el estudio de las teorías existentes en cuanto a las causas que lo producen sean celulares, orgánicas, moleculares, genéticas ó ambientales.

Tanto desde el punto de vista biológico como a nivel social, el proceso del envejecimiento ha suscitado el interés de numerosos pensadores y científicos que han tratado de explicar este fenómeno mediante distintos mecanismo. Si bien existe un sinfín de teorías para definir este proceso, no es menos cierto que también existen un número equivalente para tratar de dar una explicación molecular a este fenómeno: Limitación en el número de divisiones celulares por acortamiento de telómero, acumulación de proteínas y lípidos dañados por oxidación, acumulación de agregados proteicos insolubles, acumulación de xenobióticos, acumulación de metales pesados,

aparición de mutaciones somáticas que producirían enzimas erróneas y de mutaciones en el DNA mitocondrial que afectarían a la cadena respiratoria, entre otras. Es cierto que todas ellas están apoyadas por observaciones y experimentos en diferentes organismos, lo que podría indicar que no todos los organismos envejecen de la misma manera o que al menos no hay una sola causa universal que de lugar al proceso del envejecimiento.

- Aspectos evolutivos del envejecimiento:

El hecho de que dentro de una misma especie exista una relativa constancia en la longevidad y que especies diferentes tengan vida media diferente ha sugerido a algunos investigadores la existencia de un control genético en este proceso. En este sentido, el genoma sería un “reloj programado” responsable de todos los cambios presentados en el desarrollo de un individuo (Flodin, 1984) y que de forma activa determinadas funciones de ciertos genes provocarían el envejecimiento. Aunque esta teoría es muy atractiva, pocos investigadores la apoyan ya que existen muchos argumentos en contra, como por ejemplo, que los caracteres post-reproductivos no son seleccionables, o que en muchos animales, en su medio natural, la etapa de vejez no existe porque son depredados, por lo cual no necesitan de ningún proceso activo para envejecer y morir. De hecho, el envejecimiento ocurre también en estructuras abióticas como un ordenador o un coche con la misma dinámica como demostró **J. Vapel (Vaupel, 1997)**, sin necesidad de que existan genes que active ese proceso.

Comentario [MM11]: O Vapel o Vaupel

La teoría del soma desechable “disposable soma theory” propuesta por Kirkwood (Kirkwood and Rose, 1991) expone que la limitación de los recursos energéticos establece un sutil balance entre la reproducción o el mantenimiento del individuo. La propagación de la especie (reproducción) requiere un gran gasto energético en el mantenimiento de la línea germinal que se prioriza cuando las condiciones son favorables para el crecimiento, abandonando el mantenimiento o reparación del soma y por lo tanto haciendo que el individuo tenga una longevidad corta. Sin embargo, en condiciones adversas, donde el éxito de la reproducción no está garantizada, se prioriza el mantenimiento (reparación del soma) y como resultado aparecerá un incremento de longevidad. Esta circunstancia sucede cuando se somete a los organismos a lo que se denomina restricción calórica (reducción de la alimentación sin malnutrición), dicha

restricción calórica genera un incremento de longevidad en prácticamente la totalidad de organismos ensayados (Mair and Dillin, 2008; Masaro, 2005; Weinbruch and Walford, 1988).

Con esta capacidad de responder a las condiciones ambientales, dedicando los recursos energéticos a la reproducción o al mantenimiento y reparación, la longevidad resulta ser una consecuencia controlable a través de la regulación de genes encargados de esa reparación y mantenimiento de las células somáticas. Entonces, si bien no existen genes diseñados para envejecer, si existen genes afectando la tasa de envejecimiento (Kirkwood et al., 2003), en este sentido, se han identificado múltiples genes que regulan este proceso en numerosos organismos modelo estando algunos conservados desde levadura hasta metazoos (Guarente and Kenyon, 2000).

1.4.2 Las condiciones y rutas que regulan longevidad en *C. elegans*.

Los estudios de longevidad en *C. elegans* empiezan con Klass en 1977 al identificar la influencia de algunos factores ambientales y biológicos en la vida media del nematodo y proponerlo como “an excellent experimental system for the study of aging” y para análisis bioquímicos y genéticos más detallados (Braeckman and Vanfleteren, 2007; Klass, 1977). El mismo Klass inicia los estudios genéticos con un método para el aislamiento de mutantes longevos en *C. elegans* (Klass, 1983), de esta serie de cepas se obtuvo el primer mutante longevo en *C. elegans* (probablemente el primer mutante longevo aislado en cualquier organismo) descrito por Friedman and Johnson, llamado age-1 (Friedman and Johnson, 1988). Cinco años después, la descripción de otro mutante longevo en *C. elegans*, daf-2, (Kenyon et al., 1993) abre paso al campo inexplorado de un control genético de la longevidad.

Comentario [MM12]: No se a que te refieres

En la actualidad, el envejecimiento es considerado un proceso biológico más dentro de los muchos existentes y de igual forma sujeto a regulación por rutas clásicas de señalización y factores de transcripción. Los estudios realizados en esta dirección indican que existen diferentes señales que afectan a la longevidad, las cuales proceden del medio exterior o del propio individuo, posiblemente como respuesta a condiciones ambientales. A continuación se enumeran algunas de las más estudiadas.

1.4.2.1 Sistema reproductivo

Si la reproducción es básica para el mantenimiento de la especie y se requiere un alto grado de energía en el mantenimiento de la línea germinal, es lógico suponer que las gónadas reciban y envíen señales para promover o disminuir la vida media. La señalización que afecta longevidad desde las gónadas ha sido demostrada en *C. elegans* con la ablación de los precursores celulares de la línea germinal (Z2-Z3). La eliminación de estas células provoca que el animal sea completamente estéril y longevo (Hsin and Kenyon, 1999), el incremento de la longevidad no se explica por la falta de oocitos, ni de espermas, ni de células precursoras meioticas. Estos animales además de ser longevos son resistentes a estrés térmico y estrés oxidativo, similar a otros mutantes longevos (Arantes-Oliveira et al., 2002).

Comentario [MM13]: No se que a te refieres

1.4.2.2 Reducción de la tasa de Respiración

En *C. elegans*, mutantes de los componentes de la cadena de transporte de electrones, *isp-1*, *nou-1*, *atp-2* y *frh-1*, mutantes de proteínas mitocondriales, *gro-1* y *lrs-2*, y particularmente *clk-1*, que codifica para una proteína mitocondrial implicada en la síntesis de ubiquinona con un papel fundamental en la respiración, son capaces de incrementar la vida media (Artal-Sanz and Tavernarakis, 2008).

Comentario [MM14]: Ademas otras referencias

La razón por la que se produce este incremento de longevidad no está muy clara. Recientemente, se ha propuesto que ante una inhibición de la respiración en levaduras, gusanos y células mamíferas, se activa una respuesta de expresión conservada llamada “Respuesta retrograda” que activa rutas alternativas de generación de energía y rutas de protección celular que serían las responsables del incremento de longevidad, de hecho, la inhibición de esta respuesta reduce el incremento de longevidad de los mutantes afectados en la cadena respiratoria (Cristina et al., 2009).

En el mismo sentido, *phb-1* y *phb-2*, genes del complejo prohibitina (PHB) que ensambla la membrana interna mitocondrial, son requeridos para el desarrollo embrionario y la depleción en el desarrollo post-embrionario resulta en defectos de la línea germinal, ambos tejidos caracterizados por la proliferación celular y por requerir

un alto grado de energía (Artal-Sanz et al., 2003). El knockdown por RNAi de *phb-1* y *phb-2* en el periodo post-embionario acorta la vida media de *C. elegans*, por lo cual se propone que la eliminación de *phb-1* y *phb-2* podría activar la respuesta retrograda, en contraste, el knockdown de *phb-1* y *phb-2* produce un incremento de longevidad en mutantes longevos pertenecientes a diferentes rutas de señalización de estrés capaces de incrementar la longevidad (Artal-Sanz and Tavernarakis, 2009). (Justificar por qué? Mou)

Comentario [MM15]: No llego a entender la moraleja de este párrafo pero ahora que no viene Marta pues ya sabes

1.4.2.3. Reducción de la tasa de traducción

El proceso de síntesis de proteína y su regulación llega a consumir alrededor del 50% de la energía que utiliza una célula, un costo realmente elevado cuando el organismo debe responder a diferentes tipos de estrés (Artal-Sanz and Tavernarakis, 2008; Hay and Sonenberg, 2004; Syntichaki et al., 2007). Para evitar ese sobre gasto en condiciones de falta de alimento, la síntesis de proteínas está finamente regulada por señales que detectan energía y niveles nutricionales. De hecho, cuando se produce un estrés por falta de alimento se genera una reducción global de la traducción de RNAm, el cual está mediado en parte por la quinasa TOR (target of rapamycin) y akt (perteneciente a la ruta de la insulina y que fosforila a la quinasa ribosomal S6). Esta respuesta está conservada en organismos tan filogenéticamente alejados como levaduras y mamíferos (Hansen et al., 2007; Vellai et al., 2003). En *C. elegans*, la reducción de cualquiera de ellos, *tor* o *akt*, extienden la vida media.

Este incremento de longevidad no sólo se observa en mutantes relacionados con la transducción de señal del estado nutricional a la síntesis de proteínas sino también en mutaciones de genes que participan directamente en la traducción del RNAm (proteínas ribosomales y factores de iniciación de la traducción), mostrando que el proceso de síntesis de proteínas en si mismo influye en la longevidad de *C. elegans*.

Eliminado: estos mutantes presentan una esperada inhibición de la tasa de traducción pero además presentan un incremento de longevidad,

1.4.2.4. Detección de las condiciones ambientales y longevidad

Las 302 neuronas que constituyen el sistema nervioso de *C. elegans* de una hermafrodita, (Alcedo and Kenyon, 2004; White et al., 1986) no sólo se encargan del mantenimiento de los sistemas vitales sino también de detectar en el medio externo condiciones tales como temperatura, compuestos volátiles, solubles y señales que indican la presencia de alimento. Esto último lo hace por medio de 60 neuronas con cilia al exterior.

La temperatura es el condicionante ambiental mas utilizado para el estudio de longevidad por su papel en la regulación de la vida media en la mayoría de los poiquilotermos. Desde 1977 los estudios de Klass demuestran las diferencias en la vida media de un silvestre sometido a 12, 18,5 y 25°C, siendo la longevidad inversamente proporcional al aumento en la temperatura de crecimiento (Hosono et al., 1982; Klass, 1977). Nuevos estudios realizados por Olsen et al. en 2006 y Galbadage T and Hartman P en 2008 muestran que repeticiones de estrés térmico a lo largo de la vida del gusano produce una extensión de la vida superior a cuando es sometido a una sola temperatura (Galbadage and Hartman, 2008; Olsen et al., 2006) e incluyen al calor como un factor estresante que puede promover la hormesis (Extensión de la vida media que resulta de exposiciones bajas ó transitorias a condiciones estresantes). supuestamente debido a la inducción de proteínas de choque térmico (HSP), hsp-4 y hsp-16, (Galbadage and Hartman, 2008).

Eliminado: Las fluctuaciones de temperatura en un intervalo de 12-25°C cada 10 minutos durante la vida de *C. elegans* resultan en un incremento de longevidad cercano al observado cuando es crecido a 12°C (Galbadage and Hartman, 2008)

Eliminado: .

Comentario [MM16]: Mirael cambio por si he metido la tercera pata

Además de la influencia de la temperatura, sin duda, la respuesta más elaborada que implica un gran número de genes y rutas de señalización, está dada por la detección de carencia de nutrientes. El incremento de longevidad que se produce en condiciones de escasez de nutrientes está conservada en la evolución en un gran rango de organismos (Mair and Dillin, 2008; Masaro, 2005; Weinbruch and Walford, 1988).

La alimentación de *C. elegans* comienza con la capacidad de detectar y calificar los recursos energéticos (habitualmente bacterias) presente en el medio a través de las neuronas olfativas y gustativas, para después ingerirlas. Alteraciones en neuronas olfativas y gustativas, así como en receptores específicos de compuestos, generan un incremento de longevidad (Alcedo and Kenyon, 2004; Apfeld and Kenyon, 1999). Los

Comentario [MM17]: Se definen así?

efectos de longevidad provenientes de la detección de alimento parecen que se derivan por la regulación que éstos tienen sobre la ruta de la insulina/IGF.

1.4.2.5. La Ruta de la Insulina

La Ruta de la Insulina (INS/IGF) es la ruta mas longeva del estudio de longevidad en *C. elegans*. La historia de esta ruta data de 1988, cuando age-1, un gen de esta ruta, fue aislado como el primer gen relacionado con longevidad (Friedman and Johnson, 1988), después en 1993 al descubrirse que mutaciones en el receptor de la insulina (daf-2) duplica la vida media de un silvestre N2 y que esta longevidad es dependiente del gen daf-16 (Kenyon, 2011; Kenyon et al., 1993) pasa a conformarse en la primera ruta descrita para la regulación de longevidad y el eje de nuevos estudios. Tres décadas después es mucha la información que se tiene de la ruta y de la alta conservación existente de los genes que la componen y su función en nematodos, moscas y mamíferos (Tatar et al., 2003).

Eliminado: o

Eliminado: produce un incremento del doble de

La Ruta de la insulina esta implicada en la decisión entre supervivencia o reproducción, en respuesta a las condiciones ambientales (Fielenbach and Antebi, 2008), de hecho es una ruta de respuesta a estreses ambientales como calor, estrés oxidativo, luz ultravioleta, escasez de alimentos y muchos otros (Kenyon et al., 1993; Lithgow and Walker, 2002), estando implicada en la decisión de entrada en dauer, (estructura de resistencia a estrés) y longevidad. De forma breve, la activación de daf-2 (el receptor de la insulina/IGF) desencadena una serie de reacciones quinasas que mantiene a daf-16, factor de transcripción tipo FOXO, fosforilado en el citoplasma y con ello reprimido (FIG).

DAF-2 es el único receptor de insulina reportado en *C. elegans* que debe interactuar con cerca de 40 moléculas tipo insulina, alguna de las cuales pueden actuar como agonistas y otras como antagonistas (Garsin et al., 2003; Kawano et al., 2000; Landis and Murphy, 2010; Murphy et al., 2007; Pierce et al., 2001). En condiciones optimas para el crecimiento de *C. elegans*, DAF-2 es activado y una vez activado fosforila a la fosfoinositol 3 kinasa, AGE-1, generando fosfoinositol 3 fosfato (PIP3), el cual a su vez recluta a otras kinasas, AKT-1, AKT-2, SGK-1 y PDK-1 a la membrana plasmática donde PDK-1 fosforila a AKT-1, AKT-2 y SGK-1 activándolas (Hertweck et al., 2004;

Paradis et al., 1999). Para que DAF-16 permanezca en el citoplasma y de esta forma evitar la activación ó represión de sus genes dianas en el núcleo, el complejo conformado por AKT-1, AKT-2 y SGK-1 actúan fosforilando DAF-16 (Hertweck et al., 2004; Paradis and Ruvkun, 1998). Si las señales sensoriales o estas kinasas están inactivas DAF-16 es desfosforilado y entra al núcleo promoviendo los programas de longevidad y resistencia a varios estreses (Berninsone et al., 2001; Henderson and Johnson, 2001; Lee et al., 2001) (Figura 1.6.).

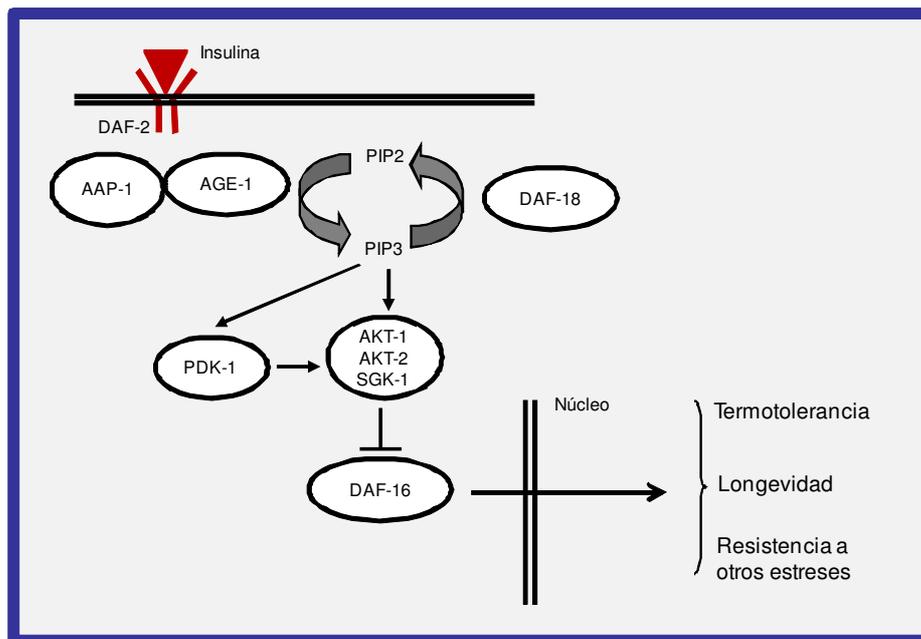


Figura 1.6. Ruta de la Insulina. El receptor de la ruta de la insulina/IGF, daf-2, regula de forma negativa al factor de transcripción daf-16/FOXO por fosforilación a través de una cascada quinasa, inhibiendo la longevidad y la resistencia a algunos estreses.

En la secuencia de fosforilación, otros genes pertenecientes a la ruta pueden actuar favoreciéndola o inhibiéndola, aap-1 es un promotor de la activación de age-1 (Wolkow et al., 2002) y juntos controlan la producción de PIP3, sin embargo, DAF-18 antagoniza con age-1 al desfosforilar a PIP3 (Ogg and Ruvkun, 1998). En general, la totalidad de los genes de la Ruta de la Insulina han sido estudiados en detalle, mutaciones en cualquiera de estos genes, (a excepción de DAF-18 y DAF-16), producen un incremento de longevidad, formación de dauer y resistencia a condiciones adversas, no obstante, por los papeles fundamentales en la recepción de señales y regulación genética son el

receptor DAF-2 y factor de transcripción DAF-16 donde se han centrado la mayoría de los estudios.

- Receptor de la Ruta de la Insulina. *daf-2*.

El receptor de la ruta de la insulina, DAF-2, es un gen de cerca de 35kb que genera una proteína de 1843 aminoácidos (Kimura et al., 1997). Aunque existen unos 40 alelos de *daf-2* que guardan relación en cuanto a ser longevos, termotolerantes, formadores de dauer constitutivos (*daf-c*) y dependientes de *daf-16*, es *daf-2(e1370)* el alelo clásico utilizado en la mayoría de los estudios. El estudio de este gen indica que es multifuncional y los diferentes alelos presentan diferencias fenotípicas en cuanto a dependencia de temperatura para longevidad y formación de dauer y otros fenotipos alelo-específicos (letalidad embrionaria, parada en L1, defectos del movimiento) (Gems et al., 1998). Es de anotar, que además de *daf-16*, otros factores de transcripción tales como el factor de choque térmico, HSF-1, el factor de respuesta a xenobioticos, SKN-1/NRF y el regulador de la Unfolded Protein Response (UPR) del Retículo Endoplasmático (RE), XBP-1 son necesarios para el incremento de longevidad de los mutantes *daf-2* (Kenyon, 2011).

Comentario [MM18]: Necesita a reescritura

- Factor de Transcripción de la Ruta de la Insulina. *daf-16*.

DAF-16 es uno de los 14 factores de transcripción tipo FOXO presente en *C. elegans*, es un elemento crucial en importantes procesos que incluyen desarrollo, resistencia a estreses como termotolerancia, resistencia a patógenos, metabolismo y autofagia (Landis and Murphy, 2010) y es el factor clave para la extensión de longevidad y la formación de dauer por la vía insulina/IGF-1 (Kimura et al., 1997; Ogg et al., 1997). Mutantes en *daf-16* tienen una vida media mas corta en comparación con el silvestre N2, son defectivos en la formación de dauer (*daf-d*) y son capaces de suprimir la longevidad, termotolerancia y otros fenotipos presentes en los mutantes de la ruta de la insulina. Recientemente, se han descrito 3 isoformas de *daf-16*, cada una con funciones biológicas específicas (Berninsone et al., 2001; Kwon et al., 2010) regulando genes de respuesta a estrés (chaperonas), antimicrobianos, y genes metabólicos, entre otros (Lee et al., 2003; McElwee et al., 2003; Murphy et al., 2003).

En un fondo genético silvestre y en condiciones favorables de crecimiento y reproducción, daf-16 se expresa en un gran número de tejidos diferentes (músculo, hipodermis, intestino y neuronas) observándose distribuido en el núcleo y el citoplasma, durante todo el desarrollo hasta adulto joven sin observarse cambios a las diferentes temperaturas habituales de cultivo 15, 20 y 25°C. Sin embargo, en mutantes de la ruta de la insulina y en cepas que llevan ablaciones en neuronas sensoriales, la expresión está presente exclusivamente en el núcleo donde ejerce su función como factor de transcripción. Curiosamente, en gusanos con la línea germinal eliminada la localización en el núcleo está focalizada en células intestinales y sólo durante adulto joven, indicando que este tejido tiene una función importante en la regulación de la señal que promueve longevidad desde las gónadas.

Eliminado: a lo largo d

Eliminado: del

Los sitios de fosforilación de daf-16 son claves en su proceso regulatorio, mientras el complejo AKT-1, AKT-2, SGK-1, de la ruta de la insulina, mantiene fosforilado a DAF-16 para evitar su entrada al núcleo, la quinasa c-Jun N-terminal, JNK-1, lo fosforila para que entre al núcleo como respuesta a choque térmico o estrés oxidativo. Una vez en el núcleo y dependiendo del estímulo que activó su entrada, DAF-16 interactúa con proteínas específicas como SMK-1, SKN-1, SIR-2 y HSF-1, entre otras (Landis and Murphy, 2010). Todas estas proteínas están afectando la longevidad por mecanismos diferentes y de hecho no sólo la longevidad de los mutantes de la ruta de la insulina son dependientes de DAF-16, sino que también es esencial para el incremento de longevidad por señales provenientes de sir-2 y jnk-1 (proteínas que también participan en la resistencia a estrés oxidativo), de la proteína de estrés térmico HSF-1, de la señal proveniente de la línea germinal (en la que está implicada TCER-1), y de restricción dietaria que comienza en la mitad de la vida (la cual es dependiente también de AAK-2) (Kenyon, 2010), indicando que daf-16 es un gen central en los diferentes mecanismos de regulación de la longevidad.

Eliminado: por precursores

Eliminado: por

1.4.2.6. La Ruta de la Restricción Dietaria (RD)

Antes hemos mencionado que levaduras, gusanos, moscas, ratas, y probablemente primates, si son sometidos a una reducción calórica sin carencia de los nutrientes esenciales extienden la vida media. En gusanos, mediante RD se puede extender la vida

Eliminado: con niveles óptimos de

Eliminado: n

entre un 20-50% mas que los gusanos alimentados Ad limitum, Independiente del método de RD utilizado (mutantes, diluciones de bacterias, medios sintéticos etc.) el efecto es el mismo (Artal-Sanz and Tavernarakis, 2008), pero las rutas de señalización y las respuestas genéticas son diferentes dependiendo del tipo de alimento que se limita (bacterias o químicos), el tiempo en el cual se aplica (estadios larvarios ó adulto) y por el tipo de medio utilizado (sólido o líquido). Las diferentes respuestas pueden ser debidas a que nutrientes específicos estén más limitados en un método que en otro ó que la detección de nutrientes esta determinada por tejidos diferentes: neuronas e intestino (Greer et al., 2009).

Eliminado: libitum

Eliminado: ,

Eliminado: i

Greer EL and Brunet A en el 2009 detallan 9 métodos diferentes para conseguir RD, cada uno de ellos presenta variación en cuanto a la ausencia o presencia de bacterias, las cuales pueden estar vivas, muertas o tratadas con antibióticos y la RD puede iniciarse desde el nacimiento, en adulto joven o a los 4 días de adulto y en todos se produce un incremento de la vida media, algunos de los cuales son aditivos entre si (por ejemplo la longevidad de *eat-2(ad1116)* es mayor si se hace en concentraciones bajas de bacterias y en medio solido) lo que sugieren que diferente métodos de restricción calórica están afectando a rutas distintas y de hecho se han descritos elementos que son específicos de un solo método (HSF-1 se activa y es esencial exclusivamente para el incremento de longevidad por privación de comida). Por otro lado, métodos diferentes pueden afectar a un mismo elemento, es el caso de la privación de peptona y diluciones bacterianas en medio sólido, ambos activan AAK-2, otro caso es el factor de transcripción PHA-4, el cual es esencial para el incremento de longevidad de algunos mutantes *eat-2* y para el incremento de longevidad que se produce por diluciones de bacterias en medio líquido. Además, dentro de un mismo método se activan varios detectores, por ejemplo, *eat-2* activa a *let-363*, *sir-2.1* y *clk-1* (Greer and Brunet, 2009).

Comentario [MM19]: Esto ya te lo pregunté, detallan o revisan

Comentario [MM20]: Esto no es lo mismo que muertas

daf-16 además de ser necesario para el incremento de longevidad que se produce por la inactivación de la ruta de la insulina, también se requiere para la longevidad que se genera por al menos dos métodos distintos de RD: el primero, llamado ayuno intermitente, en el cual cada dos días los gusanos son sometidos a ayuno (Honjoh et al., 2009) y el segundo, la restricción dietaría iniciada en mitad de la vida (Greer et al., 2007). Sin embargo, no es necesario para la extensión de la vida bajo otras condiciones de RD.

Actualmente, en un intento de clarificar todos estos resultados, los diferentes métodos validados para inducir RD han sido clasificados según la forma de disminuir los nutrientes y la energía: i) de forma crónica severa (eat-2 alelos fuertes), ii) crónica moderada (eat-2 alelos débiles), iii) se inicie en mitad de la vida (día 4 adulto) y iv) ayuno intermitente (Kenyon, 2010), activándose en cada uno de ellos un sensor diferente: TOR (let-163), sirtuinas (sir-2.1), AMP kinasa (aak-2) y ruta de la insulina respectivamente.

Comentario [MM21]: Tiene un contrasentido con el párrafo anterior

- Restricción dietaria crónica severa

Eliminado: y

Cuando la RD es permanente en la vida y de una forma severa (mutantes eat-2 fuertes), la ruta de señalización de nutrientes activada es la quinasa TOR, el cual es sensor de nutrientes y aminoácidos. TOR (let-363) y la proteína asociada a la regulación de TOR, raptor (daf-15) son requeridos para la morfogénesis y formación de dauer y mutantes en cualquiera de ellos extiende la vida media (Jia et al., 2004; Vellai et al., 2003), la inhibición de TOR mimetiza los efectos fisiológicos de la restricción dietaria y su longevidad no se incrementa cuando es sometido a RD crónica ni es dependiente de DAF-16 (Hansen et al., 2007).

En organismos multicelulares el crecimiento celular en respuesta a nutrientes es controlado por TOR y regula varios procesos celulares incluyendo la iniciación de la traducción del RNAm, respiración mitocondrial, síntesis de ribosomas, expresión de genes relacionados con metabolismo y autofagia (Schmelzle and Hall, 2000).

De forma similar a daf-16 en la ruta de la insulina, otro factor de transcripción tipo FOXO, PHA-4, es esencial para el incremento de longevidad observado en determinadas situaciones de restricción calórica crónica severa, y no lo es para la longevidad de mutantes daf-2, ni la de mitocondria. Es interesante que Panowaski et al encuentran que los sitios de unión a DAF-16 (DBE), T(A/G)TTTAC, solapan con los presentados por PHA-4, T(AG)TT(T/G)(A/G)(T/C) y que ambos están presentes en los 5 genes superóxido dismutasa (sod) pero las regulaciones son diferentes siendo sod-2 y sod-4 específicas de DR, sod-3 específica de la ruta de la insulina y sod-1 y sod-5 comunes a ambas rutas, datos indicativos de que PHA-4 actúa independiente de daf-16

pero con un mecanismo paralelo en la regulación del proceso de envejecimiento por RD (Panowski et al., 2007).

- Restricción dietaria crónica moderada

Sólo en la RD crónica de forma moderada (eat-2 alelos débiles), la respuesta se debe a las proteínas deacetilasas dependientes de NAD⁺, sirtuinas (sir-2.1), porque los otros tipos de RD son capaces de incrementar longevidad en mutaciones de sir-2.1 (Greer and Brunet, 2009; Hansen et al., 2007; Honjoh et al., 2009). Las sirtuinas son sensores de nutrientes que responden a cambios metabólicos en el ambiente celular incluyendo la disponibilidad de nutrientes/energía y estrés celular (Viswanathan et al., 2005). La sobreexpresión de sir2.1 incrementa la vida media en levaduras y en *C. elegans*, en este último de forma dependiente de DAF-16 (Tissenbaum and Guarente, 2001). El resveratrol, un compuesto capaz de activar a las sirtuinas, extiende la vida media de numerosos organismos entre ellos *C. elegans*, aunque el mecanismo no está del todo claro ya que en este caso es independiente de DAF-16, y dependiente de abu-11, un gen que participa en la respuesta a estrés del retículo endoplasmático, implicando a esta ruta en la regulación de la longevidad (Viswanathan et al., 2005).

Eliminado: esta dada

Eliminado: por

- Restricción dietaria en mitad de la vida

Si la RD se inicia con una dilución bacteriana de 5×10^8 bacterias/ml. en medio sólido el día 4 de adulto (Greer et al., 2007), se produce una extensión de la vida media que esta mediada por AMPK, (AMP activated protein kinase). La activación de AMPK, a su vez, produce la activación de rutas catabólicas y rutas anabólicas reprimidas, además regula el metabolismo de lípidos y síntesis de proteína en respuesta a un alto ratio AMP/ATP producido por niveles bajos de glucosa, energía, y la administración de droga antidiabéticas como la metformina (Greer et al., 2009). La sobreexpresión de AMPK produce un incremento de longevidad en *C. elegans* (Apfeld et al., 2004) y la subunidad de AMPK, aak-2, y daf-16 son requeridos para el incremento de longevidad por este método (Greer et al., 2007), sin embargo, ninguno de los dos son necesarios en métodos de limitaciones crónicas de alimento, al mismo tiempo, factores de transcripción como pha-4 y skn-1 necesarios en limitaciones crónicas de alimento no son requeridos para el

Comentario [MM22]: Creo que necesita un poco de reescritura

Eliminado: continuas

incremento de longevidad por este método. En este punto, cabe resaltar que la longevidad y la resistencia a estrés por sobreexpresión de AMPK es dependiente de DAF-16, factor dispensable para la longevidad inducida por otros métodos de RD (Greer and Brunet, 2009).

Comentario [MM23]: La pregunta aquí es obvia. Por que no utilizamos este método

Di Chen et al. modifica este método de generar restricción calórica con una concentración bacteriana de 5×10^9 , la adición de antibióticos y la eliminación de peptona del medio, consiguiendo un incremento de longevidad en un silvestre pero en este caso independiente de DAF-16, contrario a lo observado en el método diseñado por Greer et al, además es necesario un nuevo factor para incrementar esta longevidad, ire-1 (Chen et al., 2009), una de las proteína transmembranas del retículo endoplasmático encargada de detectar proteínas mal plegadas en la respuesta a la Unfolded Protein Response (UPR) del retículo (Braeckman and Vanfleteren, 2007).

- Restricción dietaria por ayuno intermitente.

Por último, en la RD generada por ayuno intermitente (realizado cada dos días), la ruta de señalización que parece participar en el incremento de longevidad es la ruta de la insulina. El método consiste en crecer los gusanos en placas de 5×10^{10} bacterias/ml (ad litum) hasta el día 4 de adulto y cambiarlos de forma intermitente a placas de 5×10^8 y 5×10^{10} bacterias/ml durante el resto de vida. En esta RD, la longevidad es parcialmente dependiente de daf-16 y mutantes de la ruta de la insulina no tienen efecto aditivo, algo no conseguido con ningún otro método de RD validado. En este sentido, en las primeras 48 horas de ayuno, daf-16 es traslocado al núcleo pero se relocaliza al citoplasma si el ayuno es prolongado (Weinkove et al., 2006). Para la translocación al núcleo de DAF-16 es necesario RHEB-1, una GTPase de bajo peso molecular, que activa a TOR, lo cual implica un sistema de adaptación mediado por la ruta de la insulina sólo cuando la privación es intermitente (Honjoh et al., 2009).

El hecho de que existan un gran número de elementos involucrados en la regulación de la longevidad con un compromiso de dialogo cruzado entre ellos se entiende como un mecanismo que da robustez a la respuesta de los organismo frente a las condiciones desfavorables para resistir y sobrevivir.

1.4.2.7. La ruta de la Unfolded protein response (UPR)

El Retículo Endoplasmático (RE) es el compartimento celular donde se realiza la síntesis, plegamiento, tráfico, control de calidad y degradación de proteínas. La acumulación de proteínas dañadas por plegamientos erróneos en las proteínas recién sintetizadas y otras perturbaciones como: una demanda alta en el plegamiento de proteínas secretoras, el estado redox, hipoxia, patógenos o componentes asociados a patógenos y toxinas, ciertos lípidos, disrupción de la homeostasis de calcio, falta de energía y la falta de nutrientes/glucosa producen un estrés en el RE que conlleva a la activación de una respuesta adaptativa y elaborada conocida como Unfolded Protein Response (UPR), en esta respuesta intervienen tres proteínas, asociadas a la membrana del RE, conservadas en todos los metazoos (Bernaes et al., 2006; Braeckman and Vanfleteren, 2007; Malhotra and Kaufman, 2007; Schroder and Kaufman, 2005b)

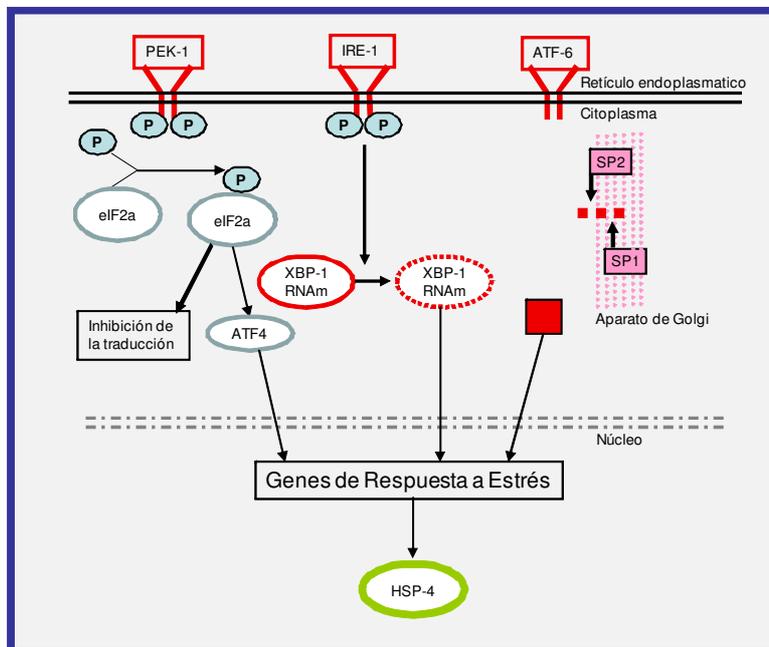


Figura 1.7. Ruta de la Unfolded Protein Response (UPR). La activación de los tres proteínas transmembrana por proteínas dañadas y otras condiciones genera una respuesta compleja que implica expresión de diferentes chaperonas, expresión y represión de algunos genes y degradación de proteínas.

Las tres proteínas asociadas a la membrana del RE son: La proteína quinas PERK, el factor de transcripción ATF-6 y la endoribonucleasa IRE-1, activador del factor de transcripción XBP-1, las cuales en condiciones libres de estrés están unidas a

chaperonas en su dominio intralumenal en estado inactivo, pero ante un incremento en la carga de síntesis de proteínas en el RE se activan por fosforilación IRE-1 y PERK-1 y por traslocación al Aparato de Golgi ATF-6 donde es procesada por la serina proteasa (SP1) y la metaloproteasa (S2P). La activación de estas tres proteínas compromete una compleja respuesta de reducción de la síntesis de proteínas, degradación de proteínas, represión de expresión de ciertos genes y aumento de otros, entre los cuales se encuentran chaperonas tipo hsp-4, que ayudan al correcto plegamiento de las proteínas en el lumen del RE (Helenius and Aebi, 2001; Hotamisligil, 2010; Lee, 1992; Schroder and Kaufman, 2005a; Schroder and Kaufman, 2005b). (Figura 1.7.).

La reducción de la síntesis de proteínas tiene por objetivo disminuir la carga de trabajo del RE, ésta se realiza a través de PERK, cuya activación resulta en la fosforilación del factor de iniciación de la traducción eIF2a, el cual reduce la tasa de formación de complejos terciarios resultando en una inhibición de la traducción, al mismo tiempo, el eIF2a fosforilado es requerido para la inducción transcripcional de un tercio de los genes de respuesta de la UPR a través del factor de transcripción bZIP, ATF-4, cuyo RNAm no es traducido en ausencia de eIF2a fosforilado. De esta forma, PERK contribuye en el mantenimiento del RE vía ATF-4 con el incremento selectivo de un grupo de proteínas como thioredoxin reductase 1 y las transferasas glutathione para reparar los daños producidos por especies oxígeno reactivas (ROS) resultantes del estrés del RE y al mismo tiempo actúa como un feedback negativo en la fosforilación de eIF2a además, regula genes del metabolismo de la glucosa como fructosa 1,6 bifosfatasa y glucoquinasa (Hotamisligil, 2010; Kaufman et al., 2002).

La mayor respuesta transcripcional de la UPR es producida por XBP-1 y ATF-6, mientras el factor de transcripción ATF-6 es activado por proteasas, XBP-1 es activado a través de la actividad ribonucleasa IRE-1 con la eliminación de un segmento de 26pb del RNA mensajero produciéndose un RNAm alternativo que es activo. Estos genes, juntos o por separado se encargan de aumentar la expresión de determinados genes, cuya función es resolver el estrés del RE con la reparación de las proteínas mal plegadas ó la degradación y eliminación de las proteínas no reparadas y el restablecimiento de la homeostasis en el RE, si no es posible la recuperación, en mamíferos, la célula funcionalmente comprometida llega a producir apoptosis.

Eliminado: , una vez activos,

Utilizando tunicamicina en *C. elegans* (droga inhibidora de la glicosilación y que genera estrés en el retículo endoplásmico) se ha observado que además de la inducción de genes con funciones relacionadas con el plegamiento, tráfico y degradación de proteínas, existe una inducción de genes relacionados con el metabolismo de lípidos y fosfolípidos y síntesis y modificaciones de azúcares, sugiriendo que el RE conecta su estado de plegamiento de proteínas con la biogénesis de membrana y el suministro y consumo de energía (Shen et al., 2005), debido a esto, varios autores han propuesto que el retículo endoplásmico puede ser considerado como un sitio esencial en la integración entre nutrientes y respuestas metabólicas a través de su habilidad para controlar las rutas de síntesis y catabolismo de nutrientes (Banhegyi et al., 2007; Hotamisligil, 2010).

Según las necesidades celulares en determinados momentos el RE requiere grandes cantidades de energía para la síntesis y correcto plegamiento de las proteínas. La privación de glucosa reduce la cantidad de energía disponible para tales funciones, además puede alterar reacciones de reconocimiento y modificación de estructuras oligosacáridas afectando el plegamiento polipeptídico y por consiguiente afectando la UPR (Kaufman et al., 2002). De hecho, entre las proteínas encargadas del correcto plegamiento se encuentran las proteínas de choque térmico, HSP, algunas de ellas reguladas por glucosa, GRP78/HSP70/hsp-4, que aumenta su expresión en privación de glucosa (Shiu et al., 1977).

En el estudio con la RD producido por ausencia total de bacterias se incrementa la vida media por un mecanismo dependiente del factor de choque térmico HSF-1 (Steinkraus et al., 2008), el cual regula la respuesta a choque térmico con pequeñas proteínas de choque térmico (shsp), hsp-12.6, hsp-16.1 hsp-16.49, las cuales son conocidas por formar grandes oligómeros que ligan a las proteínas mal plegadas y previenen la agregación (Horwitz, 1992). La sobreexpresión de hsf-1 incrementa la vida media, y al igual que daf-16 este gen o sus dianas se requieren para la extensión de la vida media de daf-2 (Cohen et al., 2006; Hsu et al., 2003), específicamente, hsf-1 reduce la agregación proteica y es requerido para incrementar la longevidad en restricción dietaria por ausencia de bacterias (Steinkraus et al., 2008) y para el incremento de longevidad de daf-2 producido por ayuno intermitente (Honjoh et al., 2009). Entonces, HSF-1, con sus shsp, juegan un papel importante en el plegamiento de las proteínas confiriendo resistencia a proteotoxicidad y longevidad, lo cual apunta a una intervención indirecta

de la Unfolded Protein Response con el control de la vida media (ya que esta ruta también participa en el plegamiento correcto de las proteínas).

Comentario [MM24]: Lo quitamos??

La relación más directa de la UPR en el control de la longevidad es reciente y pertenecen a dos estudios independientes, donde demuestran que los mutantes en ire-1 tienen una vida media reducida y su actividad es necesaria para el incremento de longevidad que se produce por la inactivación de la ruta de la insulina (Henis-Korenblit et al., 2010) y también por la que se produce en el mutante del factor inductor de hipoxia hif-1, el cual extiende la vida media por un tipo de restricción calórica (Chen et al., 2009). Es posible que la relación entre diferentes rutas de respuesta a estrés, UPR, insulina y RD, puedan estar interrelacionadas para permitir la supervivencia en condiciones desfavorables.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Objetivo General:

Identificación y caracterización del gen afectado en el mutante longevo *liv-8(pv18)* de *Caenorhabditis elegans*.

Objetivos específicos:

1. Caracterizar el efecto en longevidad y desarrollo de *gale-1(pv18)*

2. Evaluar *C. elegans* como modelo de galactosemia tipo III

Eliminado: <#>Evaluar *C. elegans* como modelo de galactosemia tipo III¶

Con formato: Numeración y viñetas

Con formato: Sangría:
Izquierda: 0,63 cm

3. RESULTADOS

Con el objetivo de buscar nuevos genes implicados en longevidad, y conociendo la relación que existía entre longevidad y termotolerancia (Lithgow and Walker, 2002), nuestro grupo de investigación diseñó un protocolo de selección de mutantes termotolerantes en el estadio L1 (Monje, 2010; Munoz and Riddle, 2003). De entre los aislamientos termotolerantes se seleccionó aquellos que fueron longevos que resultaron ser el 70%, sin embargo, tanto la longevidad como la termotolerancia son fenotipos de difícil seguimiento por el tiempo y el esfuerzo que supone, por lo cual se decidió empezar a trabajar con aquellos aislamientos termotolerantes que además de ser longevos presentaran un fenotipo fácil de seguir como formación de dauer, parada en L1 y otros de fenotipos relacionados con el desarrollo.

El inicio de esta tesis parte de cuatro aislamientos longevos (Figura 2.1.A-D), termotolerantes con fenotipos de desarrollo considerados fácilmente identificables y seguibles. Dos aislamientos, *m884* y *pv16* son dauer constitutivo a 25°C, el aislamiento *pv19* presentaba un retraso en el desarrollo a 27°C y *pv18* letalidad embrionaria a 25°C.

Eliminado: *liv-5*(

Eliminado:)

m884 y *pv16* por ser formadores de dauer, termotolerantes y longevos recordaban a los mutantes de la ruta de la insulina y se les realizó ensayos de complementación con mutantes s en *daf-2*, *age-1* y *aap-1*. En las pruebas de complementación, *m884* no complementó a *age-1* indicando que es un alelo de *age-1* y fue descartado para la realización de posteriores estudios, mientras que el aislamiento *pv16* complementó a *age-1*, *daf-2* y *aap-1*.

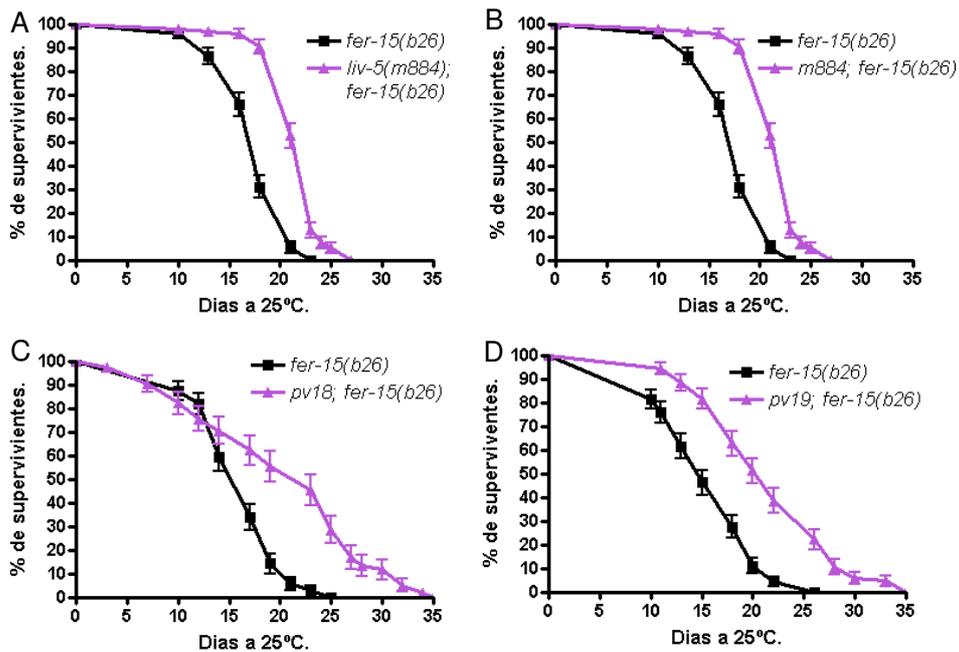


Figura 2.1. Curvas de longevidad de aislamientos termotolerantes, longevos y fenotipos de desarrollo fáciles de identificar. Los aislamientos *m884* (A), *pv16* (B), *pv18* (C) y *pv19* (D) son longevos con un $P < 0.0001$. Barran de error SEM. N=100.

Comentario [MM25]: Describir qué es *fer-15*

En el mapeo de una mutación recesiva, una forma rápida de conocer si está localizado en el cromosoma X es mediante un cruce utilizando las hermafroditas (XX) del mutante para ser fecundadas por machos (XO) de N2. Si la mutación está ubicada en el cromosoma X, los machos productos del cruce presentan el fenotipo de la mutación, por el contrario, las hermafroditas producto del cruce al ser heterocigotas se desarrollan de forma normal. Este cruce fue realizado con *pv16* y la F1 producto del cruce fue expuesta a 25°C por 48 horas, observándose que todos los machos productos del cruce se desarrollaron a dauer como le ocurre a la hermafrodita homocigota *pv16*, lo que indica que la mutación se encuentra en el cromosoma X donde también se encuentra *pdk-1*, otro gen de la ruta de la insulina conocido porque la mutación incrementa longevidad, termotolerancia y además forma dauer de forma constitutiva (*daf-c*). Debido a esto se realizó un test de complementación con el mutante *pdk-1(mg142)*. El resultado fue que *pv16* no complementó a *pdk-1(mg142)* por lo que es posiblemente un alelo de este gen, siendo también descartado de los estudios posteriores. Los aislamientos *m884* y *pv16* forman parte de la colección del laboratorio como posibles nuevos alelos de *age-1* y *pdk-1*.

El aislamiento *pv19* presentaba un retraso transitorio visible a 27°C. En primer lugar y para poder trabajar con él se estableció un tiempo en el cual el fenotipo de ese mutante es fácilmente distinguible del silvestre, que resultó ser entre 40 y 48 horas, en ese momento se podía observar que en el mutante solo del 60 a 50%, se habían desarrollado a adulto mientras que todos los individuos silvestres eran adultos en ese tiempo, pasadas las 48h los gusanos mutantes continuaban su desarrollo a adulto y lo hacía indistinguible del silvestre. Para identificar el gen inicialmente se pensó en realizar un mapeo por genética clásica con cruces de *pv19* por marcadores genéticos *dpy-unc* comúnmente utilizados para el cromosoma I, II y III. Sin embargo, tras comprobar el fenotipo a 27°C de estos marcadores, esta estrategia se descartó ya que también presentaban un retardo a esa temperatura (27°C) lo que hacía previsible que no se pudiera distinguir la presencia de la mutación *pv19* en esos fondos genéticos, debido a esto y a que el aislamiento *pv18* tenía un fenotipo fácilmente seguible la identificación del gen afectado en *pv19* fue suspendida. No obstante, durante este proceso se observó una interacción con *rol-1(e91)*, un marcador genético utilizado en los cruces de mapeo, que potencia el retraso en el crecimiento casi al 100% y podría servir como fenotipo de seguimiento en un próximo intento de mapeo.

Por último, el aislamiento *pv18* cumplía las tres condiciones requeridas para continuar su caracterización: era longevo, tenía un fenotipo de letalidad embrionaria a 25°C lo cual lo hacía fácilmente seguible y no complementaba ninguno de los mutantes conocidos probados (*daf-2*, *age-1*, *aap-1* y *pdk-1*), por lo que fue el principal objeto de estudio de esta tesis.

2.1. CLONACION Y CARACTERIZACION DE *liv-8(pv18)*.

2.1.1. RETROCRUZAMIENTOS DE LIMPIEZA

El trabajo con *liv-8(pv18)* empieza con los retrocruces de limpieza para asegurar que una única mutación es la responsable de los tres fenotipos observados, longevidad, termotolerancia y parada en el desarrollo.

La mutagénesis para la obtención de los mutantes descritos se realizó en un fondo genético *fer-15(b26)*, esta mutación genera esterilidad a 25°C, lo que facilita los experimentos de longevidad. Debido a esto, los cruces de limpieza se hicieron en este fondo genético hasta un total de 4 veces. Para tener la mutación *liv-8(pv18)* sin la mutación *fer-15(b26)*, se realizó un quinto cruce de limpieza con N2. A partir de entonces, todos los experimentos fueron realizados con *liv-8(pv18); fer-15(b26)(4X)* y *liv-8(pv18)(5X)*. Durante estos cruces se observó el carácter recesivo de la mutación.

Eliminado: siguieron haciendo

Para poder seguir la mutación en los cruces de limpieza decidimos utilizar el fenotipo de letalidad embrionaria a 25°C, para ello colocamos huevos de *liv-8(pv18); fer-15(b26)* y hermafroditas grávidas de *liv-8(pv18)* a 25°C, en el primer caso un 50% de los huevos alcanzaban la eclosión pero su desarrollo no progresaba más allá del estadio L1 (Figura 2.2.), en el segundo caso el 90% de los huevos no eclosionaba. Durante estos cruces de limpieza observamos que la mutación *pv18* presentaba rescate materno (homocigotos mutantes descendientes de heterocigotos no presentan el fenotipo mutante debido al rescate que se produce por la aportación de RNA silvestre materno). Esto implicaba que siempre hemos necesitado llegar a la generación F3 para poder identificar los mutantes homocigotos.

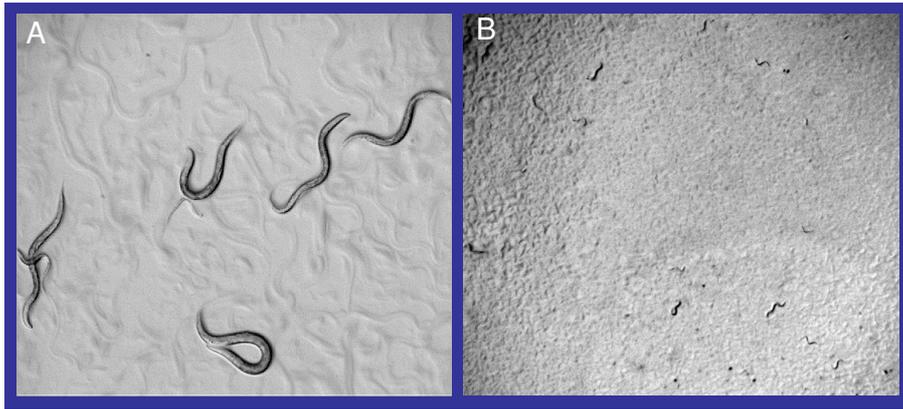


Figura 2.2. Letalidad embrionaria de *liv-8(pv18); fer-15(b26)* desde huevos a 25°C por 48H. A. Control *fer-15(b26)* todos en estadio L4. B. Pueden observarse huevos sin eclosionar y L1. Fotos tomadas con lupa estereoscópica.

2.1.2. TERMOTOLERANCIA Y LONGEVIDAD.

Una vez realizados los cruces de limpieza siguiendo el fenotipo de parada de desarrollo, comprobamos que este cosegregaba con la termotolerancia. Para ello se sometió una población sincronizada de L1 a 30°C, en estas condiciones *C. elegans* no se desarrolla y permanece en este estadio, continuando el desarrollo cuando se baja la temperatura. El control *fer-15(b26)* después de 3 días a 30°C sólo sobrevive el 1%, mientras que *liv-8(pv18); fer-15(b26)* y *daf-2(e1370); fer-15(b26)* sobreviven el 30% y 45% respectivamente. Con los datos recogidos se confirma que *liv-8(pv18); fer-15(b26)* es un mutante termotolerante en el estadio L1 y que este fenotipo cosegrega con la parada en el desarrollo (Figura 2.3.).

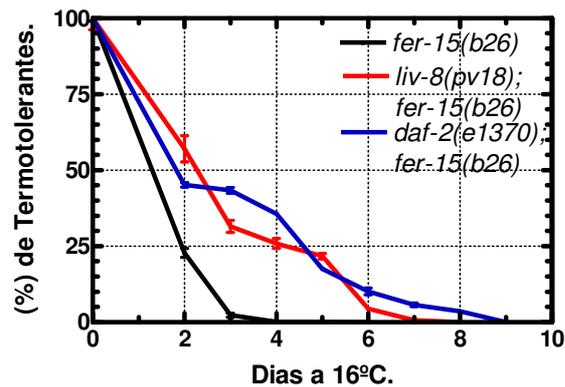


Figura 2.3. Termotolerancia de *liv-8(pv18); fer-15(b26)*, *fer-15(b26)* y *daf-2(e1370); fer-15(b26)* realizada en L1 a 30°C por 8 días y recuperados a 16°C.

De la misma manera, recomprobamos el fenotipo de longevidad de la cepa retrocruzada repitiéndolo con una población de aproximadamente 100 gusanos de la cepa *liv-8(pv18); fer-15(b26)(4X)* utilizando como control igual número de gusanos *fer-15(b26)*, el análisis estadístico muestra que su curva de longevidad son diferentes con un $P=0.0002$ (Figura 2.4).

Eliminado:

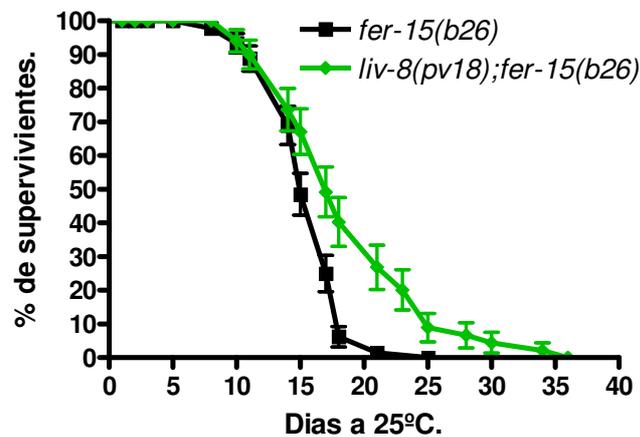


Figura 2.4. Curva de longevidad de *liv-8(pv18); fer-15(b26)* y *fer-15(b26)* a 25°C. *liv-8(pv18); fer-15(pv18)* fueron crecidos a 16°C y transferidos en el estadio L4 a 25°C. Barra de error SEM. Logrank test: las curvas son diferentes $P=0.0002$. $N=100$

Estos datos muestran a la mutación de *liv-8(pv18)* como responsable de los tres fenotipos, siendo la letalidad embrionaria a 25°C un fenotipo muy útil para el seguimiento de la mutación en todos los procesos necesarios para la construcción de dobles mutantes, interacción con otros genes, clonación, complementación etc. Posteriormente, estudios de microscopía mostraron defectos en la formación del huevo que serán tratados mas adelante, al igual que otros fenotipos relacionados con el desarrollo que se hicieron evidentes con la observación detallada de *liv-8(pv18)* como son: Retraso en el crecimiento, problemas de desarrollo en la vulva y malformación de gónadas, los dos últimos serán analizados junto con otros datos relativos a la longevidad e interacciones con otras rutas.

2.1.3. RETRASO EN EL CRECIMIENTO

En el manejo diario de *liv-8(pv18)* se hizo evidente la dificultad de sincronizar el crecimiento con la cepa silvestre. Nos preguntamos, entonces, si el tiempo de desarrollo de *liv-8(pv18); fer-15(b26)* difería con relación a la cepa silvestre *fer-15(b26)*. Durante el desarrollo, una cepa silvestre alcanza el estadio adulto joven a los 4, 3 y 2 días de incubación a 15°C, 20°C y 25°C respectivamente (Byerly et al., 1976; Szewczyk et al., 2006). Como era de esperar, *liv-8(pv18); fer-15(b26)* a 25 y 27°C por la letalidad embrionaria y la parada en L1, ningún gusano llegó al estadio joven adulto. A 20°C en el día 3 el 60-80% se paran en estadios L1 y L2 y sólo un 20% alcanzaba el estadio joven adulto a los 5 días, en tanto, *fer-15(b26)* en el día 3 la población era joven adulto y adultos (100%) y empezaba la siguiente generación. La temperatura de 16°C, mostró un mejor crecimiento para *liv-8(pv18); fer-15(b26)* porque en el día 3 el 100% crecen en estadio L2 y L3 y un 80% alcanza el estadio adulto joven entre los días 5-6 (Tabla 2.1.).

Eliminado: el perfil

Eliminado: E

Comentario [MM26]: Seguro que estos datos son buenos. 4 para 15 me parece poco y 2 para 25 muy rápido

Eliminado: perfil de

Eliminado: para

Eliminado:

Comentario [MM27]: Me genera la duda de si los que no llegan a adulto se mueren o se desarrollan más tarde

Cepas	Días	16°C	20°C	25°C	27°C
<i>liv-8(pv18); fer-15(b26)</i>	3 Días	100% L2 y L3	60-80% L1	50% L1	10% L1
	5 Días	80% Adulto joven	20% Adulto	0% Adulto	0% Adulto
<i>fer-15(b26)</i>	3 Días	90% Adulto joven	100% Adulto	98% Adulto	97% Adulto

Tabla 2.1. Tasa de crecimiento de *liv-8(pv18); fer-15(b26)* y *fer-15(b26)* a 16, 20, 25 y 27°C.

Una vez confirmada la diferencia en el perfil de crecimiento se estableció 16°C como la temperatura de crecimiento ideal de *liv-8(pv18); fer-15(b26)* y una variabilidad en el crecimiento de 2 días con relación a *fer-15(b26)*. En todos los experimentos se crecieron simultáneamente *liv-8(pv18); fer-15(b26)* y *fer-15(b26)* a 16°C. Es de anotar que este retraso en el crecimiento no se tiene en cuenta para las curvas de longevidad, puesto que se considera día cero cuando una población de 100 L4 de ambas cepas son transferidas a 25°C.

Comentario [MM28]: DEBE SER COHERENTE CON LA FIGURA 2.15

Eliminado: . En los experimentos de expresión fue necesario crecer todas las cepas a 20°C para una mejor visualización de la GFP.

2.1.4 IDENTIFICACIÓN DEL GEN AFECTADO EN *liv-8(pv28)*

La identificación del gen afectado es esencial para poder entender como esta mutación afecta a los fenotipos observados y poder determinar en qué procesos o rutas puede estar implicado. Con esta finalidad se inicio la clonación de *liv-8(pv18)* mediante mapeo genético.

La identificación del gen fue una tarea lenta ya que las condiciones propias del mutante *liv-8(pv18)* enlentecieron y complicaron el mapeo e hizo necesario probar tres estrategias diferentes. El hecho de tener rescate materno hacía necesario esperar a la F3 de un cruce para obtener los putativos candidatos a llevar la mutación *pv18*, esto sumado a un tamaño de puesta de huevos disminuida (fenotipo tratado mas adelante), un retraso en el crecimiento de casi 48 horas con relación a un silvestre y la imposibilidad de utilizar temperaturas altas (el crecimiento óptimo se producía a 16°C) hacía que los experimentos se demoraran. Por otro lado, este mutante presentó numerosas interacciones con mutaciones que se utilizan habitualmente como marcadores visibles cromosómicos, lo que complicaba la identificación de los dobles mutantes. A continuación se detallan los resultados obtenidos por las tres estrategias.

Con formato: Fuente: Cursiva

2.1.4.1 Mapeo con marcadores genéticos visibles

Eliminado: por

Eliminado: genética clásica

La estrategia del mapeo por genética clásica de cruces con marcadores visibles de los diferentes cromosomas fue la primera opción a probar y el fenotipo de letalidad embrionaria a 25°C de *liv-8(pv18)*, por ser el más evidente y rápido de definir, fue elegido para hacer el seguimiento de *pv18* en las estrategias de mapeo.

Comentario [MM29]: Repasa que pv18 debe estar en cursiva como el resto de los alelos

Con formato: Fuente: Cursiva

El cromosoma X fue el primero en descartar con la realización del cruce explicado anteriormente (hermafroditas *liv-8(pv18)* por machos N2). La F1 producto del cruce fue expuesta a 25°C por 48 horas y no se observó fenotipo de letalidad embrionaria ni en hermafroditas ni en machos, desarrollándose todos de forma normal hasta llegar a adulto, de esta manera se confirma que la mutación se encuentra en un cromosoma diferente al cromosoma X (Figura 2.5).

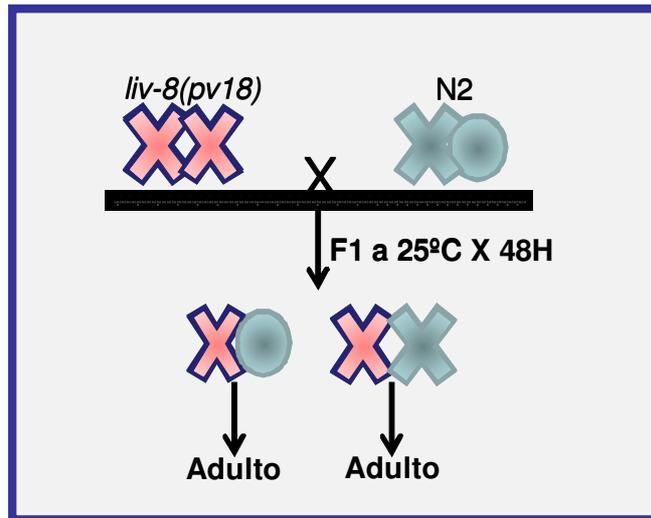


Figura 2.5. Cruce de mapeo del cromosoma X. *liv-8(pv18)*(XX) es cruzada con N2(XO). El 100% de la F1 se desarrolla a adulto a 25°C.

Comentario [MM30]: Al 0 de la gráfica puedes ponerle el símbolo de conjunto vacío?

Para el cromosoma II el estudio de mapeo se realizó con *mln1[dpy-10(e128)mls14]* (DR2078), una cepa en la cual es homocigota para una inversión en el cromosoma II, además lleva un marcador de GFP semidominante con expresión en faringe. Con estas características, si *liv-8(pv18)* está en el cromosoma II, es de suponer que todos los gusanos no fluorescentes de la F2 sean homocigotos para *liv-8(pv18)* y por consiguientes letales embrionarios a 25°C. De los 20 F2 no fluorescentes seleccionados ninguno presentó el fenotipo de letalidad embrionaria a 25°C, descartando la mayor parte del cromosoma II para la localización de *liv-8(pv18)*.

Eliminado: En

Eliminado: /bli-2(e768)-unc-4(e120)II

Comentario [MM31]: Podemos decir que usamos la cepa homocigota para la inversión

Eliminado: gran parte de una copia del

Eliminado: está invertido de forma que no se permite la recombinación en esa región

Eliminado: , intestino y células embrionarias

Eliminado: la mutación

Los cromosomas I, III, IV, y V se estudiaron con cruces de *liv-8(pv18)* con dobles mutantes *dpy-unc* de cada cromosoma y en la F2 se seleccionaban de nuevo homocigotos para los marcadores *dpy-unc*. La F3 de estos individuos se sometía a 25°C para observar el fenotipo de letalidad embrionaria. Para definir en que cromosoma se encuentra la mutación *liv-8(pv18)* por este método, la cepa que presente un menor número de homocigotos para *liv-8(pv18)* es el candidato a llevar el gen *liv-8* ligado (Tabla 2.2). Después de estudiar los cuatro cromosomas, la ausencia ó el bajo número de *dpy-unc* con letalidad embrionaria a 25°C dejaba en igualdad de probabilidad a los cromosomas I, III y IV sin descartar totalmente al cromosoma V. En un nuevo intento de mapear la mutación por este método, se repitieron los cruces para seleccionar

Eliminado: dobles mutantes, cuya

Eliminado: a la prueba

Eliminado: de

Eliminado: a 25°C

Eliminado:

Eliminado: cuales llevaban

Eliminado: ,

Eliminado: el cromosoma

Eliminado: *dpy-unc*

Eliminado: la mutación

recombinantes dpy o recombinantes unc de los cromosomas I, III y IV (Tabla 2.3.) que pudieran determinar la posición de *liv-8(pv18)*, sin embargo, de nuevo los marcadores presentan un bajo número de recombinantes que llevaran *liv-8(pv18)*. El bajo número de dpy-unc y de recombinantes dpy y unc en todos los cromosomas es llamativo y puede deberse al retraso en el crecimiento de *liv-8(pv18)* con relación al silvestre y a su tamaño de puesta de huevo disminuida, que hiciese que estuviesen contra seleccionados en la población. Con estos resultados se decide continuar con el mapeo utilizando otras estrategias.

Eliminado: cromosomas

Eliminado: por otra parte, algunos marcadores dpy-unc a 25°C presentaron dificultad en el crecimiento, por lo cual fueron descartados del estudio

Cromosoma	Marcadores dpy-unc	Homocigotos para <i>liv-8(pv18)</i>	Total de dobles dpy-unc
I	dpy-5-unc-29	0	50
III	dpy-1-unc-32	0	47
IV	dpy-13-unc-22	1	25
IV	dpy-9-unc-17	0	17
V	dpy-11-unc-23	3	20

Tabla 2.2. Estudio de homocigosis para *liv-8(pv18)* de dpy-unc obtenidos de cruces con marcadores dpy-unc de los cromosomas I, III, IV y V.

Cromosoma	Marcadores dpy-unc	Recombinantes	Homocigotos para <i>liv-8(pv18)</i>	Total de recombinantes
I	dpy-5-unc-54	dpy-5	4	19
I	dpy-5-unc-54	unc-54	0	17
III	dpy-1-unc-32	dpy-1	1	10
III	dpy-1-unc-32	unc-32	1	15
IV	dpy-9-unc-17	dpy-9	0	13
IV	dpy-9-unc-17	unc-17	2	17

Tabla 2.3. Estudio de recombinantes dpy y unc de los cruces de *liv-8(pv18)* con marcadores dpy-unc de los cromosomas I, III y IV.

2.1.4.2 Mapeo por polimorfismo de Sequence-Tagged Sites (STS)

El mapeo genético por polimorfismo de Sequence-Tagged Sites (STS) fue descrito por Williams BD et al. en 1992 (Williams et al., 1992) y consiste en el cruce de la cepa RW7000 que tiene distribuido en su genoma unas 500 copias de elementos transponibles (Tcl) contra unas 30 Tcl de las cepas provenientes de N2. En el artículo los autores reportan la presencia de 3-10 Tcl por cromosoma con los oligonucleotidos necesarios para su amplificación y el peso específico de cada Tcl que oscila entre 112 y 290pb. Al realizar el cruce RW7000 con *liv-8(pv18)*, se aislaron un total de 100 F2 de los que sólo 8 eran homocigotos *liv-8(pv18)* en F3. No se entiende por qué aparece un número tan reducido de homocigotos, pero puede ser debido a una letalidad intrínseca o retraso de crecimiento de *liv-8(pv18)* en este fondo genético. El número obtenido es insuficiente para realizar el análisis y por ello se descartó esta estrategia.

Eliminado: Bristol

Eliminado:

Eliminado: En nuestras manos, la cepa RW7000 creció con dificultad y a

2.1.4.3. Mapeo por Single Nucleotide Polimorphism (SNP)

Los SNPs son cambios de un nucleótido o pequeñas deleciones/inserciones habitualmente localizadas en regiones no codificantes encontradas en poblaciones divergentes. Con la secuenciación del genoma de la cepa N2, aislada en Bristol, y la cepa CB4856, aislada en Hawaii, se han predicho y confirmado un alto número de SNPs en todos los cromosomas de *C. elegans*. Desde entonces, los SNP fueron considerados como posibles marcadores para el mapeo de genes.

En el 2001, Wicks SR et al. (Wicks et al., 2001) predice 6,222 SNP en 5.4Mbp, de los cuales 3,457 tienen sitios de reconocimiento de enzimas de restricción (snip-SNP) fácilmente reconocidos por RFLP (restriction fragment length polymorphisms). Estos autores proponen mapear mutaciones mediante el uso de 18 snip-SNP distribuidos en el centro y los extremos derechos e izquierdos de cada cromosoma. El proceso consiste en cruzar la cepa CB4856, cepa hawaiana, con el mutante a mapear proveniente de la cepa N2 inglesa y en la F2 seleccionar gusanos que lleven el fenotipo de seguimiento de la mutación, éstos son sometidos a 18 RFLP para determinar si el polimorfismo pertenece a la cepa N2 inglesa o a la hawaiana. La ligación a un cromosoma queda establecida por la ausencia ó un muy bajo número de los alelos hawaianos en homocigosis en los tres

Eliminado: el mapeo

Eliminado: de una

Eliminado: ó

Eliminado: con

snip-SNP de un cromosoma. A continuación se exponen los cruces y el análisis de los snip-SNP y SNP utilizados para el mapeo de *liv-8(pv18)*, las técnicas de PCR, digestión, electroforesis y secuenciación se describen en materiales y métodos (5.3.11.), los oligonucleótidos para fijar la mutación en un cromosoma son los referenciados en Wicks SR et al. y una lista de los oligonucleótidos de los snip-SNP y SNPs utilizados para el estudio de los recombinantes de *liv-8(pv18)* se encuentra en el Anexo II.

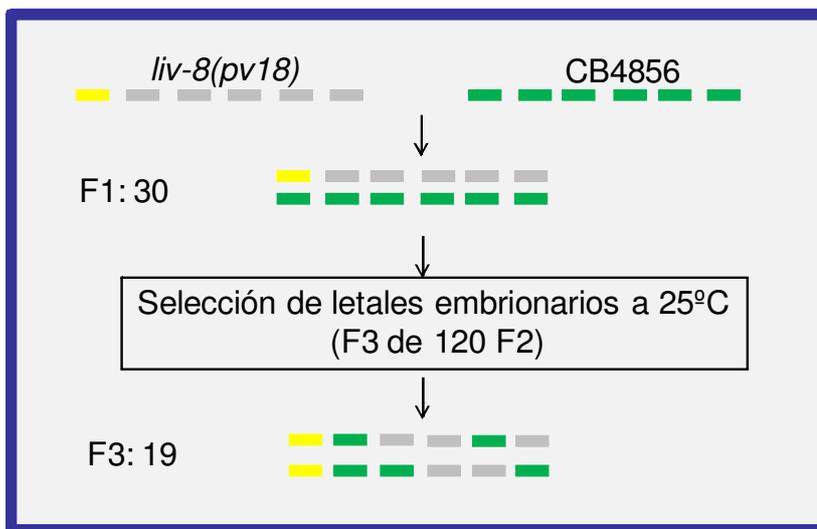
El mapeo se inicia con el cruce de *liv-8(pv18)* por CB4856 (cepa hawaiana) y la selección de 30 F1 (3 por 10 placas), continúa con la clonación de 120 hermafroditas de la F2 y la incubación de la F3 a 25°C para determinar la letalidad embrionaria a 25°C, fenotipo utilizado para el seguimiento de la mutación *liv-8(pv18)*. De los 120 aislamientos de F2 probados, únicamente 19 resultaron llevar la mutación *liv-8(pv18)* en homocigosis. Como se explicó anteriormente, el bajo número obtenido puede explicarse por la letalidad intrínseca o retraso propios de *liv-8(pv18)* (Esquema 2.1.).

Eliminado: u

Eliminado: terminar con la determinación de

Eliminado:

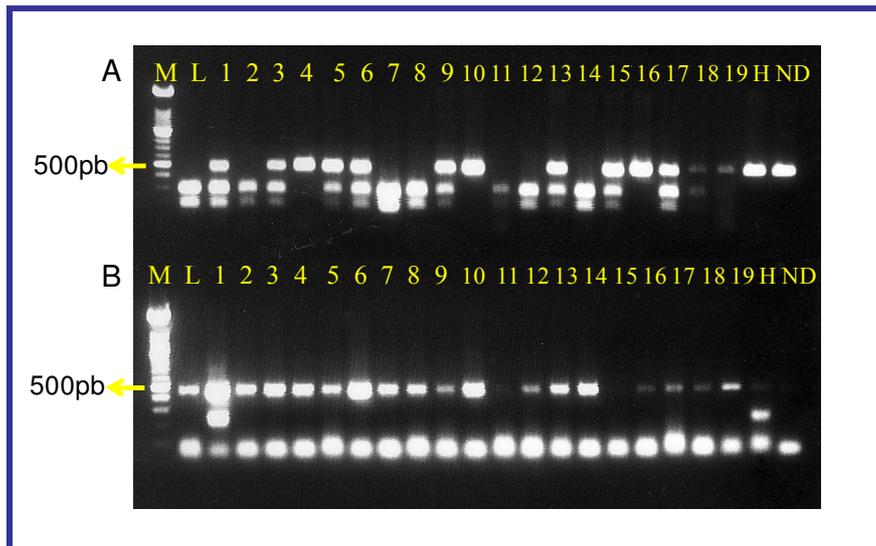
Esquema 2.1. Cruce de *liv-8(pv18)* por CB4856. Cada segmento representa un cromosoma. El color gris es de la cepa inglesa, el amarillo el cromosoma que lleva la mutación y el verde la cepa hawaiana. En la



F1 todos son heterocigotos y en la F3 el cromosoma que lleva la mutación es homocigoto para la cepa inglesa, mientras el resto de los cromosomas pueden ser heterocigotos u homocigotos para la cepa inglesa o hawaiana.

A los 19 candidatos se les determinó 14 de los 18 snip-SNP propuestos por Wicks et al. A los cromosomas I, III, IV y V se hizo el estudio de los 3 snip-SNP (izquierda, centro y derecha), en tanto que a los cromosomas II y X, con datos de mapeo previos que los descartaban, sólo se le realizó el snip-SNP del centro del cromosoma. Un ejemplo de no ligación lo muestra el snip-SNP del centro del cromosoma III, pkP3076, donde la

enzima *AvaIII* corta en la secuencia presente en N2 pero no el hawaiano, como se observa en la Figura 2.6.A, en este snip-SNP se encuentran 6 homocigotos para la versión N2, 3 homocigotos para la versión hawaiana y 9 presentan el snip-SNP en heterocigosis representado por una combinación de bandas electroforéticas de la cepa inglesa y hawaiana. Por el contrario, el snip-SNP pkP1071 del brazo derecho del cromosoma I es el ejemplo típico de ligamiento en el cual, la enzima *HindIII* corta la cepa hawaiana pero no la inglesa y la única evidencia del alelo hawaiano la constituye la determinación de un heterocigoto (Figura 2.6.B.).



2.6. A. snip-SNP del centro del cromosoma III. La enzima *AvaIII* corta la cepa inglesa pero no la hawaiana. B. snip-SNP del brazo derecho del cromosoma I. La enzima *HindIII* corta la cepa hawaiana pero no la inglesa. M: Marcador, L: fondo genético N2 *liv-8(pv18)*, H:Cepa hawaiana, ND: DNA sin digerir, pb: Pares de bases.

Después de realizar el análisis de los snip-SNP, los resultados mostraron al cromosoma I como el candidato a contener la mutación *liv-8(pv18)*, donde en el extremo izquierdo sólo un mutante *liv-8* homocigoto era también homocigoto para el alelo hawaiano (las bandas electroforéticas eran típicas de la cepa CB4856), mientras en el snip-SNP central y en el snip-SNP del brazo derecho ninguno presentaba esta característica, de manera diferente, el número de homocigotos para el alelo hawaiano oscila entre 3 y 14 en cualquiera de los once snip-SNP realizados en los 5 cromosomas restantes (Figura 2.7.A.).

Eliminado: único

Con formato: Fuente: Cursiva

Otra forma de determinar la ligación de la mutación a un cromosoma es contar el número de cromosomas con el alelo hawaiano teniendo en cuenta que para cada posición en un cromosoma hemos estudiado 38 snip-SNP (19 *liv-8(pv18)* homocigotos). En la Figura 2.7.B. puede observarse que en el cromosoma I el mayor número de cromosomas con el alelo hawaiano equivale a 11 (extremo izquierdo), seguidos de dos y uno (centro y extremo derecho respectivamente), mientras que en el resto de los snip-SNP realizados en los otros cromosomas, sin distinción de la posición, todos superan los 15. En total, reuniendo todos los datos del cromosoma I sólo alcanza a tener 14 cromosomas con el alelo hawaiano, un número inferior al observado en el resto de los cromosomas, donde todos los snip-SNP por separado oscilan entre 15 y 30 cromosomas con el alelo hawaiano de los 36 posibles.

Eliminado: . Cada

Eliminado: realizado a los

Eliminado:

Con formato: Fuente: Sin Cursiva

Eliminado: candidatos estudiados equivale a 38 cromosomas,

Eliminado: e

Con referencia a los heterocigotos para el polimorfismo, el número de heterocigotos en los once snip-SNP distribuidos en los cromosomas II, III, IV, V y X varía entre 4 y 9 sin distinción del sitio donde estuviera ubicado, pero el estudio de los heterocigotos en el cromosoma I muestra en el brazo izquierdo 9, en el centro 2 y en el brazo derecho 1. El alto número de heterocigotos para el polimorfismo en el brazo izquierdo es indicativo de la localización en el extremo derecho del cromosoma I, donde sólo existe un heterocigoto y ningún homocigoto (Figura 2.7.C.).

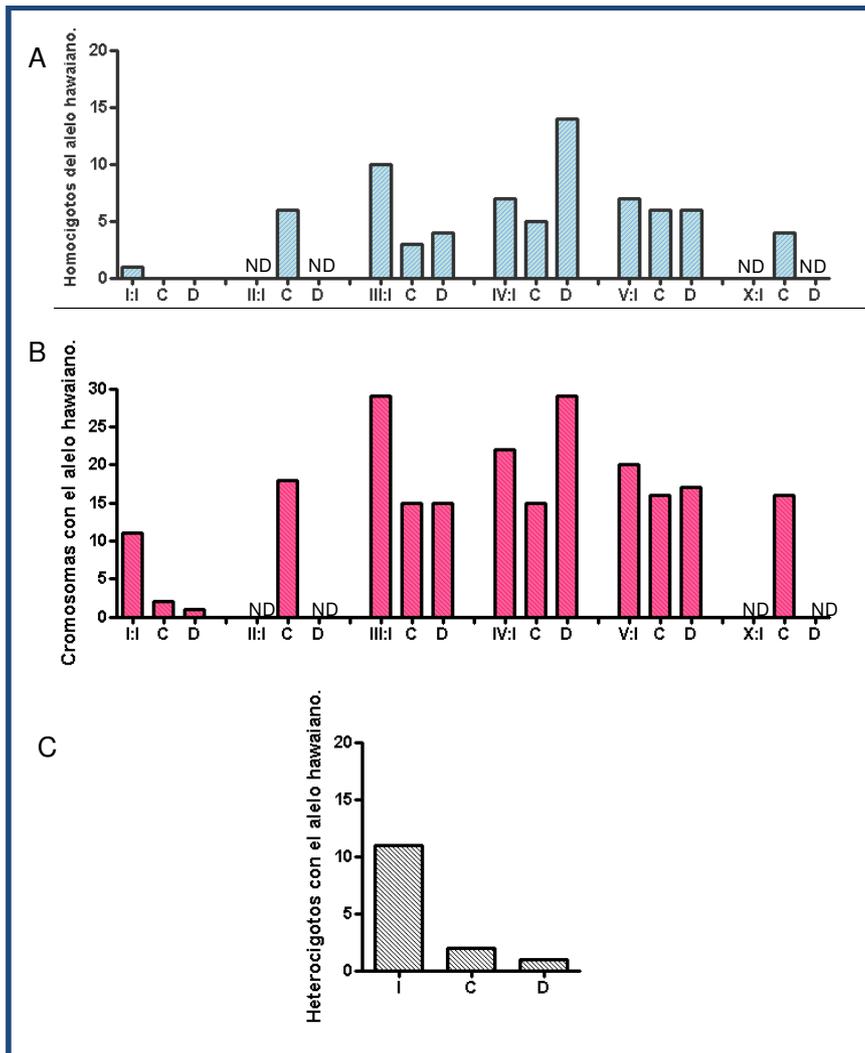


Figura 2.7. Ligación de *liv-8(pv18)* al Cromosoma I. A. Número de homocigotos para el alelo hawaiano en el brazo izquierdo, derecho y centro de los 6 cromosomas. B. Número de cromosomas con el alelo hawaiano. C. Número de heterocigotos con el alelo hawaiano en el cromosoma I. I-X: Número de cromosoma. I: Brazo izquierdo, C: Centro del cromosoma, D: Brazo derecho. ND: snip-SNP no determinados. Los datos representados en las gráficas equivalen a las 14 PCR realizadas a los 19 candidatos del cruce *liv-8(pv18)* por CB4856.

A los 9 heterocigotos para el SNP del brazo izquierdo del cromosoma I se les siguió individualmente para localizar el lugar de recombinación, observándose que en el centro del cromosoma, 7 eran homocigotos para la versión de la cepa inglesa pero 2 continuaban siendo heterocigotos en el centro, este carácter desaparecía en el SNP del brazo derecho. Por otro lado, el único heterocigoto del brazo derecho se comportaba como homocigoto para el cromosoma inglés, tanto en el centro como en el brazo izquierdo. Con estos resultados se situaba a *liv-8(pv18)* en la zona comprendida entre -

Eliminado: Continuando con el mapeo, a

Eliminado: polimorfismo en

Eliminado: conservando el polimorfismo en

Eliminado: sis

Eliminado: el cual

Eliminado: la cepa

Eliminado: inglesa

1.03um y +22.89um, sitio de los 2 snip-SNP pkP1097 (centro) y pkP1071 (Derecha) estudiados (Figura 2.8.A.).

Eliminado:

En el seguimiento de los 3 recombinantes cuyos eventos de recombinación ocurren entre los dos snip-SNPs anteriores (dos del brazo izquierdo y 1 del derecho) se realizaron pruebas de snip-SNP ubicados en esa región del cromosoma I: pkP1059 (I:3.01um), F59C6 (I:5.05um), pKp1128 (I:12.87um), Y26D4A. (I:15.24). De los 2 recombinantes del brazo izquierdo, uno siguió siendo heterocigoto hasta el snip-SNP pkP1128 (I:12.87um) y no llevaba cromosoma hawaiano en el snip-SNP Y26D4A (I:15.24) fijando el límite de la recombinación en 12.87um (Figura 2.8.B.), ahora, al recombinante del brazo derecho en el snip-SNP Y26D4A (I:15.24) se convertía en homocigoto para la cepa inglesa, por lo cual la recombinación se había producido entre el snip-SNP pkP1071 (22.89um) y el snip-SNP Y26D4A (I:15.24) (Figura 2.8.B.).

Eliminado: el brazo derecho

Eliminado: lo

Eliminado: lo fueron

Eliminado: el único dato que sugería un evento de recombinación lo establecía

En resumen, con el cruce *liv-8(pv18)* por CB4856 y tras el análisis de 14 snip-SNP realizados a los 6 cromosomas de *C. elegans* es posible confirmar la ligación de *liv-8(pv18)* al brazo derecho del cromosoma I y el estudio de 4 snip-SNP adicionales en esa región a los 3 recombinantes encontrados delimita la posición de *liv-8(pv18)* entre los snip-SNP pkP1128 (I:12.87um) y pkP1071 (I:22.89um), separados por una distancia de 10.02um, equivalente a una distancia física de aproximadamente 2.300.000 kb. (Figura 2.8.C).

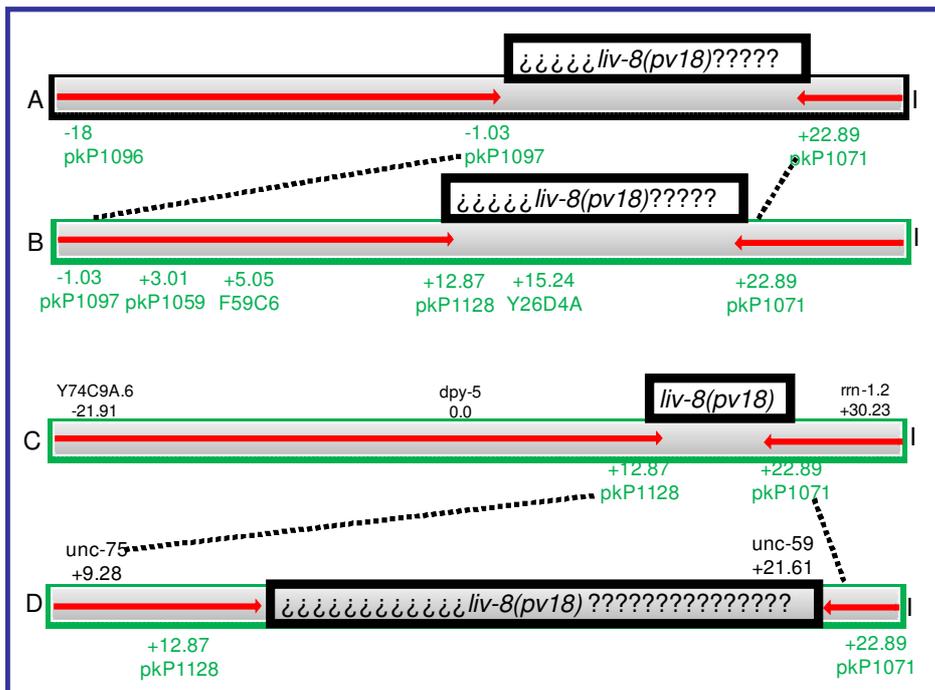


Figura 2.8. Representación del mapeo de *liv-8(pv18)* por snip-SNP. A. Ligación de *liv-8(pv18)* al cromosoma I en el brazo derecho. B. Estudio de 3 recombinantes del cruce *liv-8(pv18)* por CB4856. C. Zona de estudio de *liv-8(pv18)* en el cromosoma I delimitada por el cruce de *liv-8(pv18)* por CB4856. D. Marcadores seleccionados para continuar el mapeo por SNP. En la parte inferior están los snip-SNP utilizados y la posición que ocupan y en la superior los genes referenciados y su posición en el cromosoma. I: Cromosoma I.

En este punto del estudio se hacía necesario seleccionar recombinantes en esta zona, para lo cual, la mejor estrategia es utilizar un triple mutante tipo MarcadorA-*liv-8(pv18)*-MarcadorB, pero la zona resultó ser pobre en marcadores visibles y los existentes eran tipo uncoordinated (*unc*) los cuales tienen un fenotipo muy similar siendo difícil distinguir los dobles mutantes de los simples, todo lo anterior unido a los inconvenientes explicados en los cruces para el mapeo por marcadores visibles hicieron descartar la idea de construir el triple mutante. La opción utilizada fue buscar marcadores a cada lado de la zona en estudio para crear dos dobles mutantes: MarcadorA-*liv-8(pv18)* y *liv-8(pv18)*-MarcadorB. Los marcadores escogidos fueron *unc-75(e950)*, cuya ubicación es I:9.28um y *unc-59(e1005)* a I:21.61 (Zona de estudio I:12.87-I:22.89) (Figura 2.8.D.).

Una vez construidos los dos dobles mutantes *unc-75(e950)-liv-8(pv18)* y *liv-8(pv18)-unc-59(e1005)* se procedió a la realización de los cruces respectivos con la cepa

hawaiana CB4856. En total, se consiguieron 94 recombinantes unc-75 liv-8+ y 82 recombinantes liv-8+ unc-59 que se mantuvieron en homocigosis.

Los datos previos de mapeo ubicaban la mutación entre I:12.87 y I:22.89, por lo cual el primer snip-SNP seleccionado para el estudio de los recombinantes fue pkP1073 situado en un punto intermedio de la zona, 17.18um, en este punto todos los recombinantes unc-75 tenían el alelo hawaiano y los datos sugerían que *liv-8* se encontraba en la zona entre 12.87um a 17.18um. El análisis se continuó con el snip-SNP dbP-1 ubicado en 14um, punto en el cual, 69 recombinantes de unc-75 eran hawaianos y 25 todavía eran ingleses, datos que indicaba que el gen *liv-8* estaba en la zona entre 14um y 17.18um. Se prosiguió con el estudio de los 25 recombinantes unc-75 que eran ingleses en 14um con un SNP Y18D10A.8 situado en 14.13um, el resultado mostraba que la mitad (13) seguían siendo ingleses, se continuó en sucesivo con los SNPs uCE-1(1388), uCE-1(1390) y el snip-SNP pkP1132 ubicados en 14.16, 14.24 y 14.36 respectivamente. En el snip-SNP pkP1132 un recombinante seguía teniendo el alelo inglés, ese recombinante llevaba la versión hawaiana en el SNP uCE-1(1392) localizado a 16.8um. Este resultado ubicaba a la mutación *liv-8(pv18)* a la derecha de 14.36um (Figura 2.9.).

Eliminado: para el polimorfismo

Eliminado: (*pv18*)

Eliminado: de

Eliminado: ,

Eliminado: el análisis

Eliminado: apoyaban la idea

Eliminado: la mutación

Eliminado: (*pv18*)

Eliminado: y ubicado

Eliminado: e

En el otro sentido, los recombinantes unc-59, como los unc-75, fueron estudiados empezando por el punto intermedio de la zona en el snip-SNP pkP1073 (17.18um). En este punto 15 recombinantes unc-59 conservaban el alelo inglés. Este dato junto con los obtenidos de los recombinantes unc-75 evidenciaba que *liv-8(pv18)* se encontraba entre 14.36um y 17.18um. El seguimiento de los 15 recombinantes con alelo inglés se hizo con el SNP W05B5.1 ubicado a 17.1um, SNP uCE-1(1394) ubicado a 16.84um y SNP uCE-1(1392) a 16.8um siendo el resultado para cada uno de 11, 2 y 0 para el alelo inglés indicando la posición de *liv-8(pv18)* a la izquierda de 16.84um. (Figura 2.9.).

Eliminado: A diferencia de los recombinantes unc-75, e

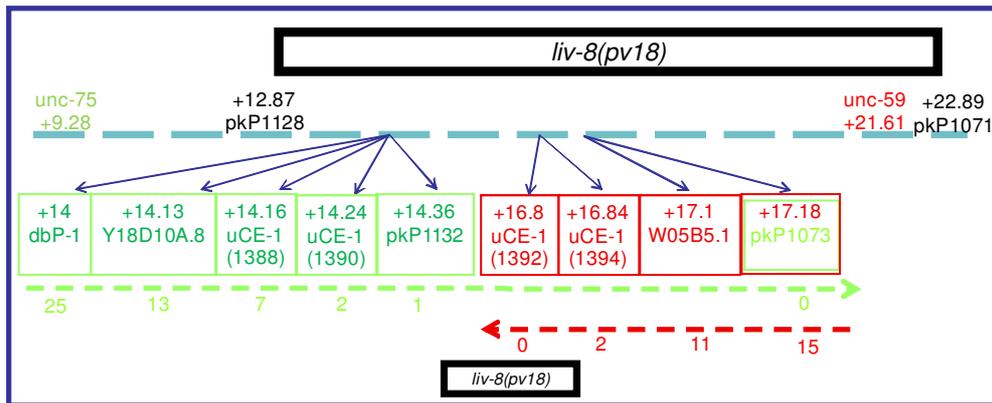


Figura 2.9. Representación del estudio de los recombinantes *unc-75* y *unc-59* de los cruces *unc-75(e950)-liv-8(pv18)* y *liv-8(pv18)-unc-59(e1005)* por CB4856. La línea intercalada azul representa los datos de mapeo previo a los cruces, la flecha roja y la flecha verde representan la trayectoria de los recombinantes *unc-75* y *unc-59* respectivamente. Los SNP verdes fueron realizados a recombinantes *unc-75*, los rojos a los recombinantes *unc-59* y verde/rojo a ambos. Los números equivalen a los recombinantes con alelo inglés.

Comentario [MM32]: Poner 0 en verde 16.8 y decirlo en el texto

En conclusión, antes de los cruces de *liv-8(pv18)* por los marcadores visibles *unc-75* y *unc-59*, la zona delimitada estaba entre 12.87um y 22.89um. Ahora, tras el análisis de 6 SNP realizados a 94 recombinantes *unc-75* obtenidos del cruce *unc-75(e950)-liv-8(pv18)* por la cepa hawaiana CB4856 junto con los 4 SNP realizados a los 82 recombinantes del cruce *liv-8(pv18)-unc-59(e1005)* por CB4856, el mapeo por SNP permite la localización de *liv-8(pv18)* en el cromosoma I en un espacio comprendido entre 14.36um y 16.84um, equivalente a una distancia física de 60 kb.

Eliminado: 24um

2.1.5. COMPLEMENTACION Y SECUENCIACION DE *gale-1(pv18)*

El abordaje de la complementación de *liv-8(pv18)* fue una tarea fácil en el sentido que la zona de 60kb delimitada con el mapeo por SNP esta cubierta en su totalidad con dos cosmidos: El cósmido F08A8 cubre las primeras 30kb y el cósmido C47B2 cubre las últimas 40kb solapando las 10 kb primeras de C47B2 con las 10 ultimas de F08A8. En este sentido, solo era necesaria la realización de dos transgénicos, uno con F08A8 y otro con C47B2, para seguir delimitando la zona.

De nuevo, la letalidad embrionaria a 25°C fue el fenotipo utilizado como prueba del seguimiento de la mutación *liv-8(pv18)*, el rescate de este fenotipo por los

transformantes constituiría la primera señal de una posible complementación. Con el cosmido F08A8 ningún transformante suprimió el fenotipo de letalidad embrionaria a 25°C, en contraste, todos los transformantes del cosmido C47B2 ~~si lo consiguieron~~ y fueron capaces de crecer hasta llegar a adulto a esta temperatura. Además, tanto a 25°C como a 20°C y 16°C los gusanos transformados con el cosmido C47B2 crecieron como una cepa silvestre sin malformación de gónadas, vulva protuberante, **puesta de huevos normal** (fenotipos que se detallarán a continuación) y sin retraso en el crecimiento, lo cual evidencia no sólo la supresión y complementación de la letalidad embrionaria sino de todos los fenotipos presentes en *liv-8(pv18)*.

Eliminado: i

Comentario [MM33]: Seguro??

El dato aportado por el cosmido C47B2 aseguraba la presencia de *liv-8(pv18)* en las 40kb finales que cubre el cosmido en la zona de 60kb delimitada por los SNPs pkP1132 y uCE1-1394. Sin embargo, la circunstancia destacable de compartir en la parte central 10kb con F08A8, (incapaz de complementar), eliminaba las 10kb solapantes. De esta forma, los dos cosmidos verifican la presencia de *liv-8(pv18)* en las 30kb finales de las 60kb (Figura 2.10.).

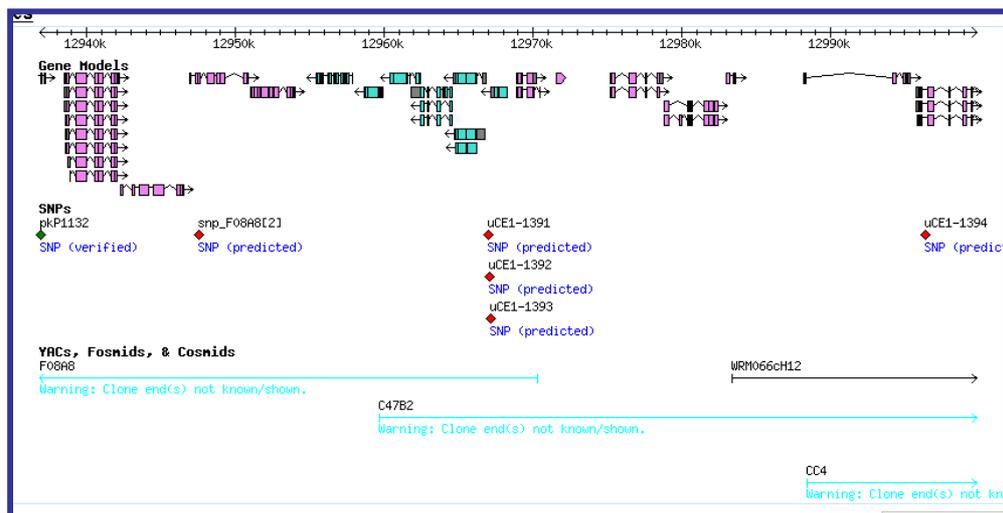


Figura 2.10. Zona de 60kb delimitada por los SNP pkP1132 y uCE1-1394. El cosmido F08A8 va desde I:12.933.046 hasta 12.959.805 y no complementa. El cosmido C47B2 si complementa y se extiende desde I:12.959.703 hasta 12.988.573. El resultado de los dos cosmidos elimina las primeras 30kb y dejan las 30kb finales como el sitio para ubicar a *liv-8(pv18)*. Las flechas azules indican la trayectoria de los cosmidos.

Las 30kb se reduce a la presencia del operon C0P1786 formado por los genes C47B2.6, C47B2.7 y C47B2.9 de 3.7, 4.2 y 1.2kb respectivamente, ocupando las 11kb de la parte inicial y el gen nlp-15 que se encuentra muy cerca del SNP uCE-1394, SNP en el que se encontraron 2 recombinantes unc-59 con la versión de N2, esta situación hacía poco probable que se hubiesen producido dos eventos de recombinación en tan corto espacio. Por consiguiente, el estudio se centro en los 3 genes del operon, empezando por el primero llamado C47B2.6. (Figura 2.11.).

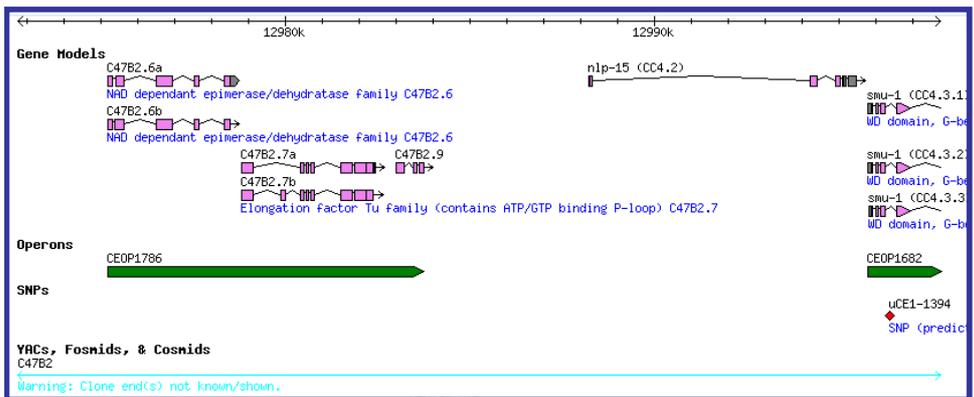


Figura 2.11. Zona de 30 kb complementada por el cosmido C47B2.

El primer gen del operon, el gen C47B2.6, fue amplificado y clonado en pGEM-t y se procedió a la complementación por el método de biobalística y los transformantes fueron capaces de suprimir la letalidad embrionaria a 25°C de *liv-8(pv18)*. Durante el tiempo en el que se realizaba este trabajo Jacobo Novelty y Cleotilde Carlow identificaron al gen C47B2.6 como *gale-1* (epimerasa-4-de la galactosa), la enzima encargada de interconvertir UDP-galactosa (UDP-gal) a UDP-glucosa (UDP-glu) y UDP-NAcetil galactosamina (UDP-NAgal) a UDP-NAcetilglucosamina (UDP-NAglu) (REF). Todos estos UDP-azúcares se requieren para la correcta glicosilación de proteínas y lípidos. A partir de este momento la referencia de *liv-8(pv18)* pasa a ser *gale-1(pv18)* (Figura 2.12.).

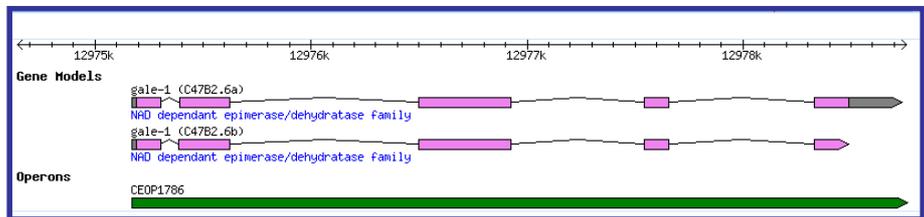


Figura 2.12. Gen *gale-1*.

La secuenciación de los 5 exones del gen *gale-1* en el silvestre y en el mutante *pv18* (Anexo III) evidenció en la posición 47 del quinto exón un cambio de citosina por timina, dentro de un triplete constituido por CCC, ahora sustituido por un triplete CUC (Figura 2.13.A.), que en la proteína equivale al cambio de una Prolina por una Leucina (P312L), esta prolina conservada en la mayoría de las especies incluyendo al hombre (Figura 2.13.B.).

Eliminado: un

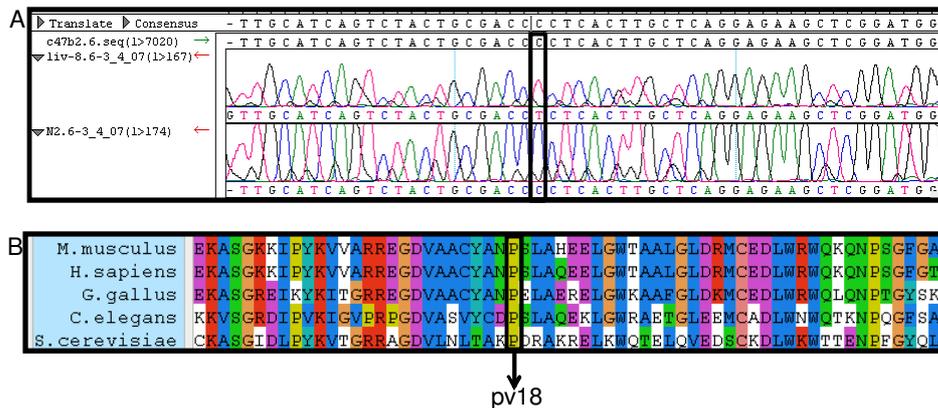


Figura 2.13. Mutación puntual en *gale-1(pv18)* y conservación de la prolina 312 en la escala evolutiva. A. En la secuencia puede observarse el cambio de citosina por timina. B. Alineamiento de parte de la proteína GALE-1. Marcada con un recuadro está el aminoácido donde se encuentra la mutación del alelo *pv18*, produciendo un cambio de Prolina por Leucina. La prolina esta conservada desde levaduras hasta humanos.

2.1.6. DELECIÓN DE GALE-1

En el hombre, mutaciones puntuales del *gale* produce la enfermedad conocida como galactosemia tipo III (OMIM 230350), una enfermedad rara que se caracteriza por la imposibilidad de metabolizar galactosa (Fridovich-Keil, 2006; Timson, 2006). La falta total de función de *gale* en humanos ha sido hipotetizada como letal debido a su función esencial en la fabricación de los diferentes UDP-azúcares (Kalckar, 1965) y recientemente una deleción de *gale* en *D. melanogaster* también ha sido reportado como letal embrionario (Sanders et al., 2010).

En *C. elegans*, el alelo *gale-1(tm3267)* carece de 649 pares de base y tiene una inserción de 6 pares de base eliminando todo el tercer exón con alguna zona flanqueante intragenica a ambos lados, esta deleción afecta aminoacidos claves en el posicionamiento del azúcar en el interior del sitio activo (Thoden et al., 2001) (ver

Eliminado: (ver discusión)

también discusión). Los animales heterocigotos de *gale-1(tm3267)* crecen y se desarrollan igual que un animal silvestre, aunque en sus descendientes por autofecundación fue posible distinguir algunos animales que detienen su desarrollo en el estadio L1/L2 con fenotipo letárgico y cuerpo pálido (Figura 2.14.). PCR individuales de animales con este fenotipo confirmaron, que estos animales llevan la delección en homocigosis. Este resultado indica que la falta total de función de GALE-1 en *C. elegans* es letal, al igual que en *D. melanogaster*.

- Eliminado:** colocando 20 animales, un animal por placa, fue
- Eliminado:** en la descendencia de
- Eliminado:** de ellos
- Eliminado:** fueron realizadas
- Eliminado:** ndo por electroforesis

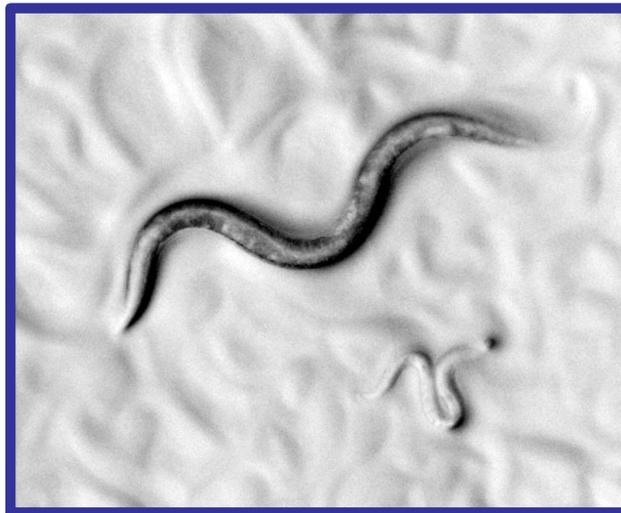


Figura 2.14. Delección de *gale-1*. La foto muestra un gusano *gale-1(tm3267)/+* o *gale-1(tm3267)/+* y otro *gale-1(tm3267)*, homocigoto que han detenido su desarrollo en L1/L2. Foto tomada en lupa estereoscópica.

- Eliminado:** En la cepa *gale-1(tm3267)* se observan gusanos ¶ parados en L1/L2.
- Eliminado:** ¶
- Con formato:** Fuente: Sin Cursiva

2.1.7. HIPERSENSIBILIDAD A D-GALACTOSA

Los pacientes que sufren de galactosemia son sensibles a galactosa ya que no pueden metabolizarla y acumulan metabolitos derivados que afectan a su salud (Fridovich-Keil, 2006; Timson, 2006; Walter et al., 1999). De igual manera, los mutantes de GALE conocidos en *S. cerevisiae* y *D. melanogaster* son sensibles a D-galactosa (Ross et al., 2004; Sanders et al., 2010). La exposición de *gale-1(pv18)* a concentraciones de D-galactosa que oscilaron de 0 a 3mg/ml evidenció un desarrollo mas lento para alcanzar el estadio adulto en comparación a la cepa silvestre (Figura 2.15.A). Interesantemente, se observó la presencia de animales parados en el estadio L1, augmentando la proporción de forma directa con las concentraciones de D-galactosa (Figura 2.15.B-C). El resultado confirma la sensibilidad de *gale-1(pv18)* a D-galactosa, igual a lo reportado en levadura y mosca heterocigotas para la delección.

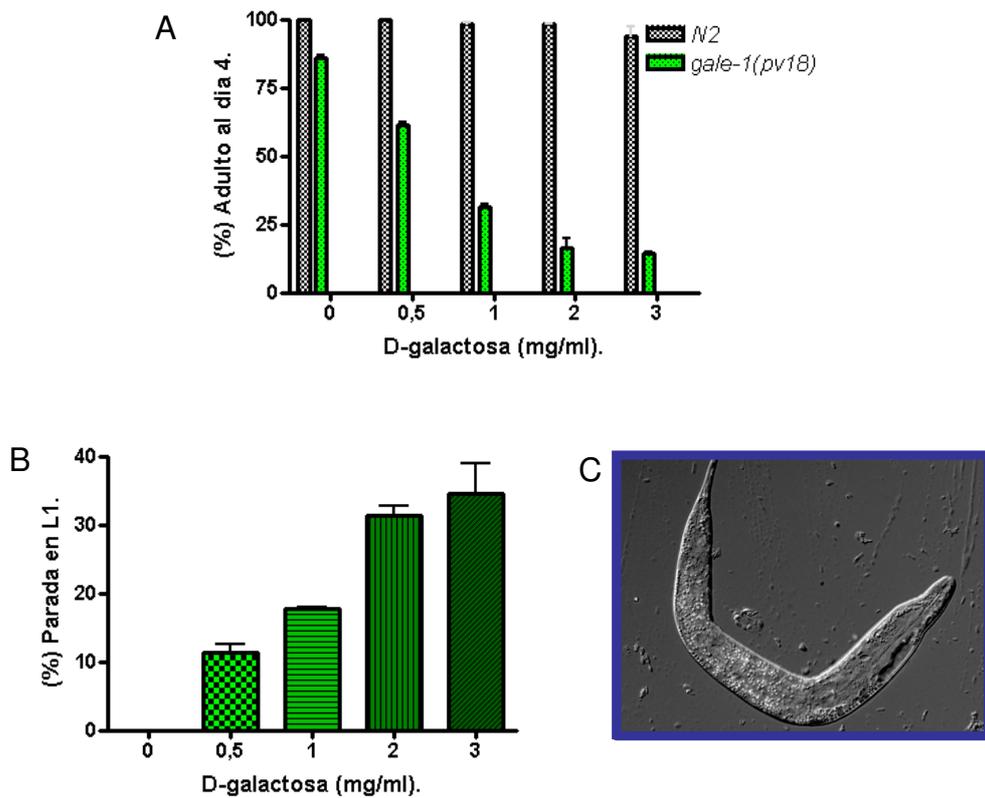


Figura 2.15. Prueba de sensibilidad a la D-galactosa. A. Porcentaje de adultos que al día 4 llegan a adulto a diferentes concentraciones. B. Porcentaje de animales arrestados en L1/l2 a diferentes concentraciones de D-galactosa. C. Imagen de animales parados en L1 cuando son crecidos en presencia de D-galactosa.

2.1.8. PERFIL DE UDP-AZUCARES EN *gale-1(pv18)*

La determinación de los 4 UDP-azúcares por HPLC demuestra que en el mutante *gale-1(pv18)* existe un incremento de UDP-gal en contraposición con una marcada disminución del azúcar UDP-NAgal comparado con la cepa silvestre. Además aparecen valores muy similares de UDP-glu y UDP-NAglu (Figura 2.16), azúcares que son sintetizados por otras rutas metabólicas como la glicolisis y la ruta de las hexosaminas respectivamente (Figura 1.3).

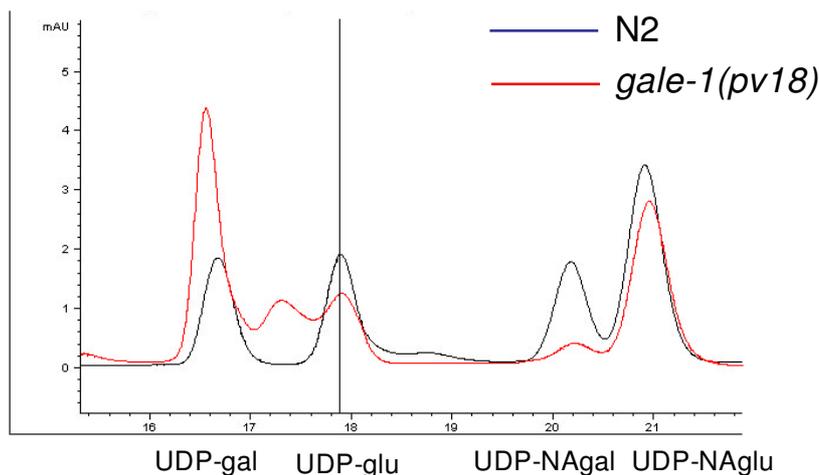


Figura 2.16. HPLC de *gale-1(pv18)* y N2. La UDP-NAGal es casi indetectable en *gale-1(pv18)* mientras la UDP-gal presenta niveles superiores al silvestre. *gale-1(pv18)* está representado en rojo y N2 en azul.

Los cuatro UDP-azúcares sintetizados por GALE actúan como donadores de azúcares en las reacciones de glicosilación tipo N y O [y en la glicosilación de lípidos \(REF\)](#) (Schulz et al., 2005). Todas las proteínas glicosiladas juegan papeles importantes en múltiples procesos biológicos como embriogénesis, desarrollo, localización celular, plegamiento y control de calidad de proteínas, respuesta inmune e interacciones huésped-patógeno, entre otros (Berninson, 2006; Cipollo et al., 2005), por lo tanto, a GALE además de su papel en el metabolismo de la galactosa para generar energía se le reconoce la función de regular los niveles de UDP-gal, UDP-glu, UDP-NAGal y UDP-NAGlu. Con relación a los pacientes galactosemicos tipo III, el incremento de la UDP-gal es una constante utilizada como criterio diagnóstico (Walter et al., 1999).

2.1.9. HIPERSENSIBILIDAD A LA INFECCION

En las interacciones huésped-patógeno intervienen factores de reconocimiento, muchos de los cuales son glicocojugados y mutantes afectados en glicosilación han sido reportados como resistentes a determinadas infecciones (Cipollo et al., 2004; Karlsson, 2001). *C. elegans* es infectado por *E. coli* OP50, utilizada como alimento en el laboratorio (Garigan et al., 2002), y una gran cantidad de bacterias patógenas para el hombre como *Pseudomona Aereginosa*, *Enterococcus faecalis* y *Staphilococcus aures*, entre otros [se sabe que infectan a C. elegans](#) (Garsin et al., 2001).

Para saber si las alteraciones de UDP-azúcares presentes en *gale-1(pv18)* le confería resistencia a patógenos humanos se cambió la *E. coli* OP50 como recurso alimenticio por *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus* y se utilizó como control a *daf-2(e1370)* reportado como resistente a la infección por estas bacterias (Garsin et al., 2003). Los gusanos fueron crecidos en placas de NGM con OP50 y en el estadio L4 transferidos a las bacterias patógenas a 25°C y contados todos los días. Sorprendentemente, el resultado es una mayor sensibilidad a los patógenos *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus* en comparación a la cepa silvestre (Figura 2.17.A-B).

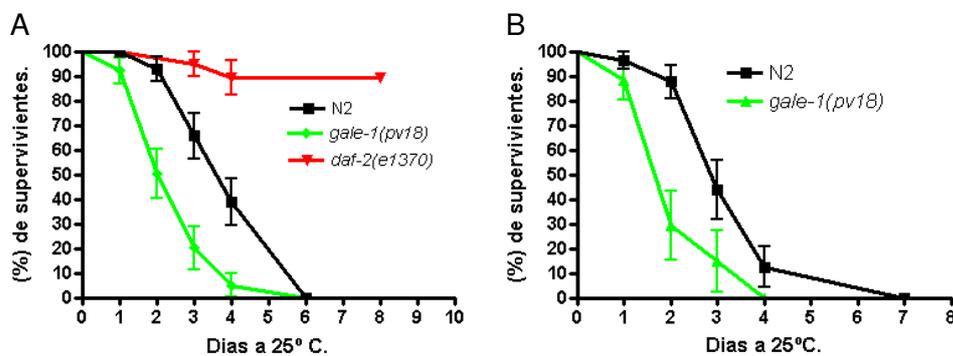


Figura 2.17. Sensibilidad de *gale-1(pv18)* a patógenos. A. *Enterococcus faecalis*. La mortalidad en el día 2 de N2 es del 10% y del 50% para *gale-1(pv18)*, el 90% de *daf-2(e1370)* continúa vivo al día 8. Logrank test: las curvas son diferentes $P < 0.0001$. B. *Staphylococcus aureus*. La mortalidad en el día 2 de N2 es del 12% y del 70% para *gale-1(pv18)*. Logrank test: las curvas son diferentes $P = 0.0029$. Barra de error SEM. $N = 30$ para A y B.

2.1.10 EXPRESION DE GALE-1

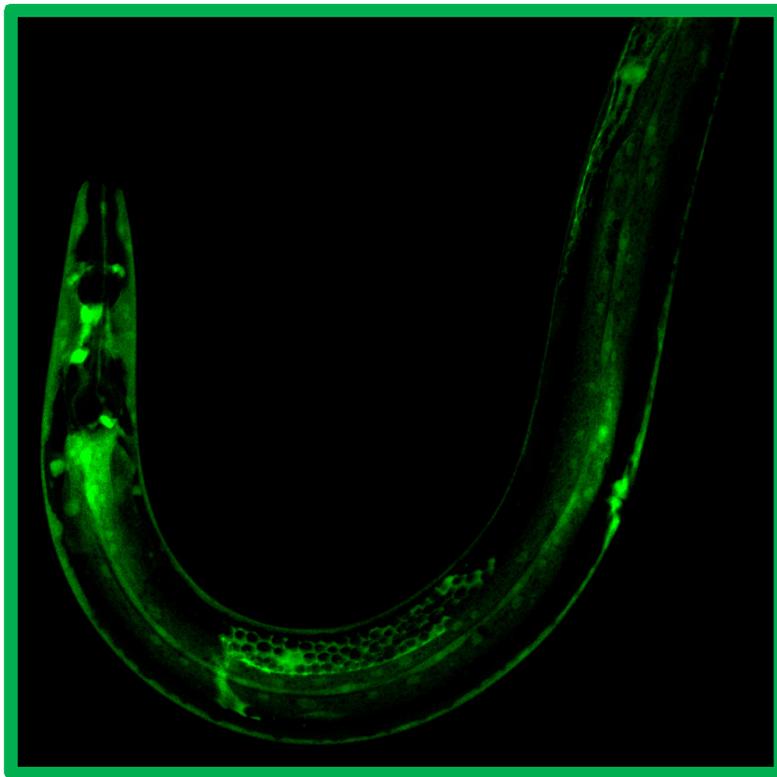
La expresión de GALE-1 se estudió con la cepa dpy-5(e907)/dpy-5(e907); sls 11076 [rCes C47b2.6:: GFP + pCeh361], BC11076, la cual lleva 2927 pb por encima del ATG de *gale-1* seguido por el gen de la GFP. Esta cepa está construida por el BC *C. elegans* Gene Expression Consortium (http://elegans.bcgsc.bc.ca/home/ge_consortium.html), en el wormbase describen la expresión GALE-1 en L4/adulto principalmente en las gónadas, el intestino, la vulva, el sistema nervioso y la hipodermis. La marcada expresión en las gónadas y la vulva guardan una relación tejido-específica con los fenotipos de vulva protuberante y malformación de gónadas observados en *gale-1(pv18)*, el intestino se ha reportado como un órgano importante en la longevidad y la expresión observada puede estar relacionada con el fenotipo de longevidad de *gale-*

Eliminado:

Eliminado:

Eliminado: la proteína

Con formato: Fuente: Cursiva



1(pv18).

Figura 2.18. Expresión de *gale-1*. Gónadas, vulva e intestino presentan una expresión mayor consistente con los fenotipos de malformación de gónadas, vulva protuberante y longevidad del mutante *gale-1(pv18)*. Foto de confocal Ex laser line 488. Proyección de 30Z cada 1 μ .

Además de confirmar lo reportado en Wormbase (Figura 2.18.), se hizo el estudio de expresión en los primeros estadios del desarrollo evidenciándose una alta expresión de GALE-1 en estos estadios (huevos y L1) en comparación con un gusano en un estadio de desarrollo más tardío como L4 o adulto joven, lo cual permite establecer una relación con el fenotipo de letalidad embrionaria (Figura 2.19.A-B). Por último, el estudio detallado de la expresión nos permitió concluir que también se expresa en el músculo a lo largo de todo el nematodo (Figura 2.19.C)

Eliminado: la proteína mig-17 necesita ser glicosilada en el músculo para posteriormente ser secretada y localizada en las gónadas, aunque en la descripción realizada por Hunt-Newbury R. et al. en el 2007 (Hunt-Newbury et al., 2007) no se describe en ese tejido,

Eliminado:

Eliminado: este tejido

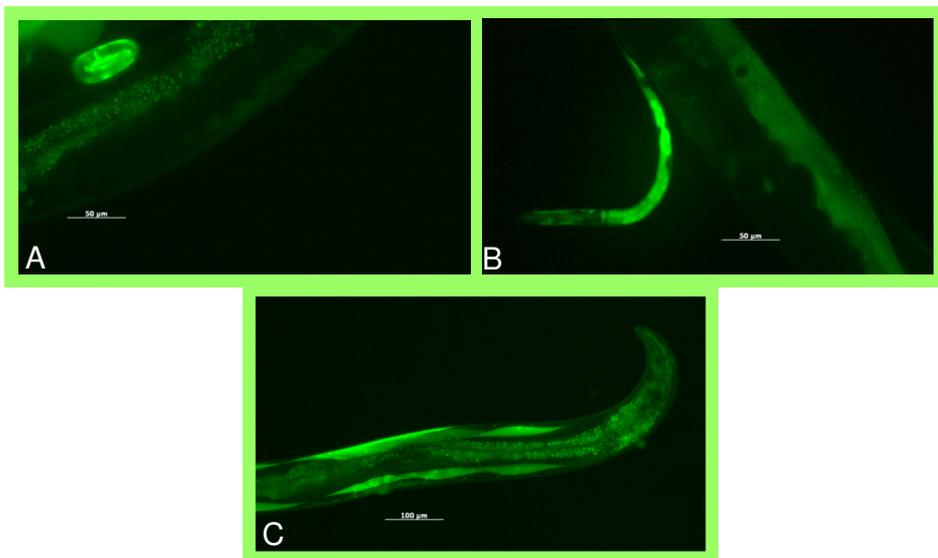


Figura 2.19. Expresión de gale-1. A y B. puede observarse la alta expresión en huevos y L1 en comparación con gusanos adultos. C. Expresión de gale-1 en células musculares a lo largo del gusano. Las fotos fueron tomadas con objetivo 10X e igual excitación de luz ultravioleta.

2.2. GALE-1 Y FENOTIPOS RELACIONADOS CON DESARROLLO.

Los resultados descritos anteriormente indican que la mutación *gale-1(pv18)* genera una alteración en los niveles de UDP-gal y UDP-Nagal. Estos cambios pueden ser responsables de fenotipos de desarrollo relacionados con glicosilación, como letalidad embrionaria a 25°C, malformación de gónadas y vulva protuberante.

2.2.1. FENOTIPO DE LETALIDAD EMBRIONARIA

El fenotipo de letalidad embrionaria a 25°C ha sido utilizado para el seguimiento de la mutación en todos los procesos necesarios para la construcción de dobles mutantes, clonación, complementación etc. La observación detallada de los huevos en el microscopio evidencia vacuolas y células sueltas a lo largo de todo el desarrollo embrionario que podría explicarse debido a una mala adhesión entre las células. El huevo termina desintegrándose en estados avanzados del desarrollo (Figura 2.20.).

Eliminado:

Eliminado: ,

Eliminado: e

Comentario [MM34]: Introducimos aquí que no hemos encontrado fenotipos similares en la bibliografía

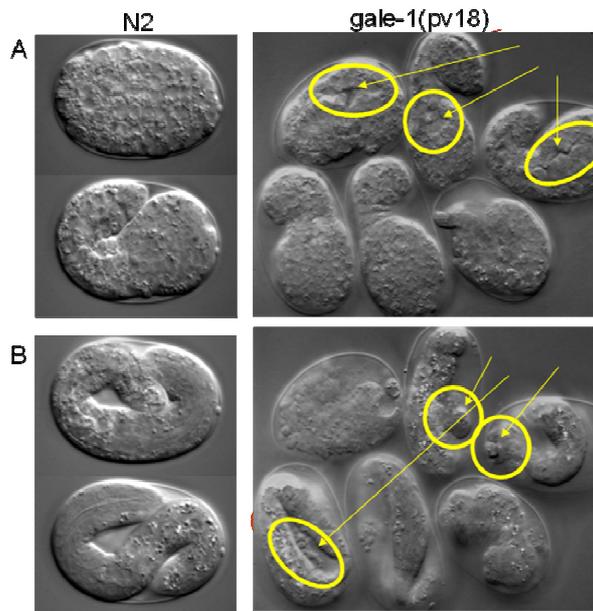


Figura 2.20. Fenotipo de Letalidad embrionaria a 25°C. A. Fotos de los primeros estadios del desarrollo del huevo de N2 y *gale-1(pv18)*, en los círculos pueden observarse la formación de vacuolas. B. Fotos de los estadios finales del desarrollo del huevo de N2 y *gale-1(pv18)*, en los círculos pueden observarse desprendimientos de células. Las fotos fueron tomadas con objetivo 40X con Nomaski.

2.2.2 FENOTIPO DE VULVA PROTUBERANTE (*sqv*)

Mutaciones en los genes involucrados en la formación del proteoglicano condroitin, se han identificado por malformaciones en la vulva consistentes en un menor tamaño en el estadio L4 y la propulsión de los músculos vulvales durante la puesta de huevos (Hwang and Horvitz, 2002). El estudio de *gale-1(pv18)* en el estadio L4 hizo evidente que existían cambios en la estructura de la vulva (Figura 2.21.A) y una considerable disminución de su área en comparación al silvestre (Figura 2.21.B) de forma similar a los mutantes denominados *sqv* (squashed vulve). Es interesante destacar que el condroitin está formado por ácido glucoronico y N acetil galactosamina y es este el azúcar disminuido en el mutante *gale-1(pv18)*.

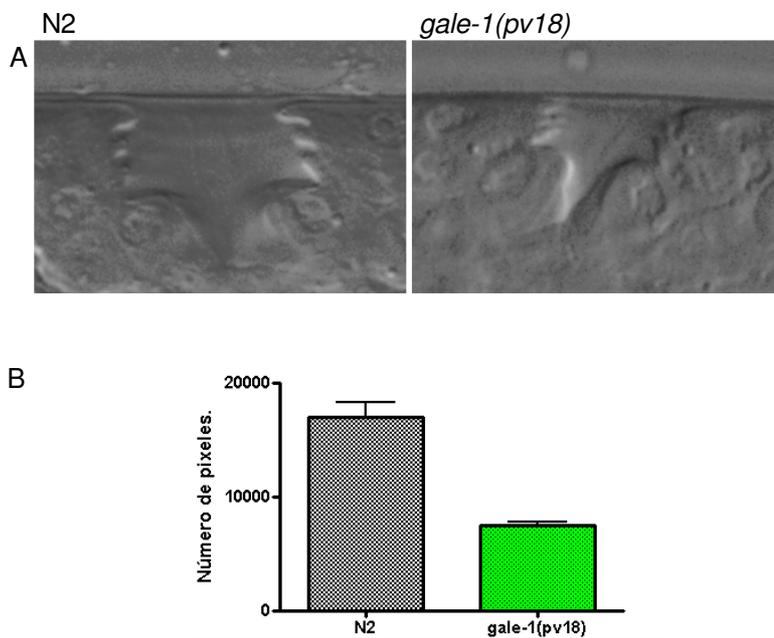


Figura 2.21. Fenotipo vulva protuberante de *gale-1(pv18)*. A. Estructura de la vulva. En *gale-1(pv18)* se puede observar la disminución del área de la vulva. Las fotos fueron tomadas con objetivo 40X con Nomaski. B. Cuantificación del área vulval. La disminución del área es menor a la mitad del área de N2. N=30

2.2.3. TAMAÑO DE PUESTA DE HUEVOS Y PROGENIE TARDIA.

Además del fenotipo sqv, en algunos alelos de los 8 genes sqv también se ha descrito una puesta de huevos disminuida (Herman et al., 1999), para saber si *gale-1(pv18)* presentaba también este fenotipo hicimos el estudio de la puesta de huevos. Con la idea de descartar que la posible disminución de la puesta de huevo fuera debido a *fer-15(b26)*, estéril a 25°C, el experimento se hizo a 16°C con la cepa *gale-1(pv18)*, sin la mutación *fer-15(b26)*, y N2 como control. La puesta de huevo para un silvestre N2 crecido a 16°C oscila entre 254±52 en un periodo de 4-8 días (Byerly et al., 1976; Szewczyk et al., 2006). En nuestro experimento la puesta de N2 fue de 313±30, mientras *gale-1(pv18)* osciló entre 105±25 huevos (Figura 2.22.A).

Este fenotipo puede deberse al fenotipo sqv, sin embargo, la reducción en el tamaño de puesta de huevo y el hecho de que aparezca progenie muy tarde, son fenotipos que se han relacionado con estados que extienden la longevidad (Houthoofd et al., 2002a; Houthoofd et al., 2002b). De los 12 gusanos estudiados de la cepa silvestre N2 sólo 3 pusieron huevos el día 8, sin embargo, de los ocho gusanos de la cepa *gale-1(pv18)* todos pusieron huevos el día 8 y 4 continuaron la puesta de huevos en el día 10 y uno al día 12. (Figura 2.22.B). Entonces, junto con la termotolerancia, *gale-1(pv18)* suma los fenotipos de tamaño de puesta de huevos disminuida y el fenotipo de progenie tardía, tres fenotipos característicos en algunos mutantes longevos.

Eliminado: el

Eliminado: tardía

Eliminado: s

Eliminado: Este mismo experimento permitía conocer si *gale-1(pv18)* tiene progenie tardía, capacidad de poner huevos tiempo después de los días establecidos para un silvestre incubado a 16°C.

Eliminado:

Eliminado:

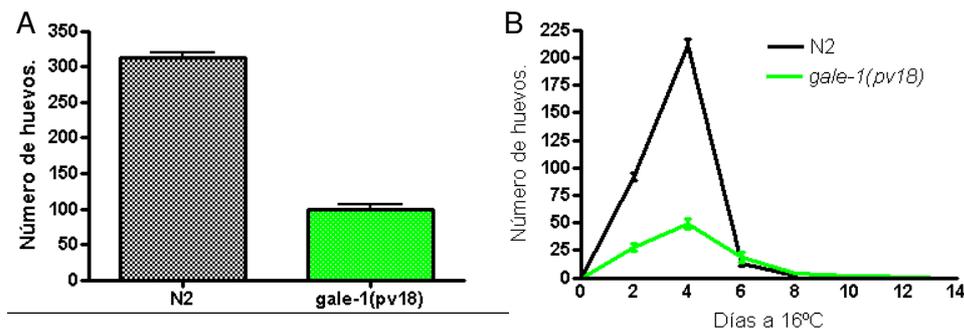


Figura 2.22. Puesta de huevos y progenie tardía de *gale-1(pv18)*. A. Tamaño de puesta de huevos. La media para N2 es 307 y para *gale-1(pv18)* de 97. B. Progenie tardía. El mayor número de puesta de huevos fue el día 4 para N2 y *gale-1(pv18)*. El último día de puesta de huevos para N2 fue el día 8 y para *gale-1(pv18)* el día 12. Barra de Error SEM. N=12

2.2.4. FENOTIPO DE MALFORMACION DE GONADAS (mig):

En *C. elegans*, la estructura de las gónadas esta formada por dos brazos, anterior y posterior, que tienen forma de U que la hace simétrica rotacionalmente alrededor del axis dorso-ventral en el centro del cuerpo (Antebi et al., 1997).

Eliminado:

En el mutante *gale-1(pv18)* se observa que la mayoría de las gónadas no tienen esa forma debido posiblemente a una migración incorrecta de éstas durante el desarrollo. Estas malformaciones son más comunes en las gónadas posteriores 86,7% que en las anteriores 33% (Figura 2.23.A). Los defectos en la migración de las gónadas han sido clasificados por Nishiwaki en 4 tipos (Nishiwaki, 1999): el tipo I se caracteriza por hacer correctamente el cruce en U para después hacer un tercer cruce y migrar en dirección opuesta, el tipo II es similar al primero pero los ángulos de rotación son rectos, en el tercer tipo la migración cesa prematuramente en el músculo dorsal después del segundo cruce y el tipo IV las DTCs parecen desviarse de su correcta vía de migración después del primer cruce. Según esta clasificación, los defectos en la migración de *gale-1(pv18)* pertenecen al tipo IV (Figura 2.23.B).

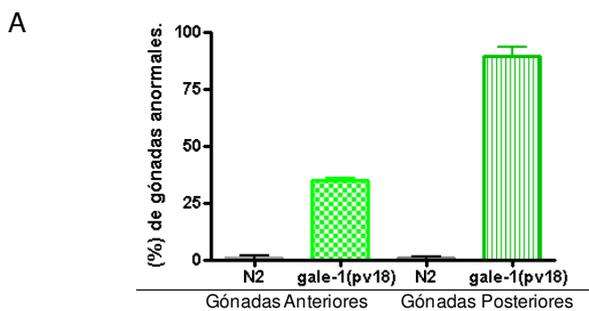


Figura 2.23. Malformación de gónadas de *gale-1(pv18)*. A. Porcentaje de gónadas anteriores y posteriores afectadas en *gale-1(pv18)*. B. En el silvestre se observa la correcta migración de la gónada posterior mientras en el mutante *gale-1(pv18)* hace el primer cruce y se desvía del músculo dorsal plegándose sobre si misma. L4 de *gale-1(pv18)* y N2 fueron observados al microscopio con Nomaski, objetivo 40X. *gale-1(pv18)* N=83. N2 N= 85

Eliminado:

Eliminado: y se pliega

Este fenotipo es similar al descrito en otros mutantes *mig*, entre ellos la falta de función de MIG-17, una metaloproteasa glicosilada necesaria para el correcto retorno de las gónadas (Nishiwaki et al., 2000).

Eliminado: <sp>

Con formato: Fuente: Cursiva

Eliminado: Otros mutantes como *vab-3* presentan un porcentaje mayor de gónadas anteriores malformadas, sugiriendo que los mecanismos moleculares que controlan la migración de la DTCs no son siempre idénticos (Nishiwaki, 1999) siendo posible la participación de varios procesos, entre ellos la glicosilación.

2.2.5. FENOTIPO MIG Y GLICOSILACION.

La implicación de los UDP-azúcares es relevante en la formación de gónadas, por ejemplo, *srf-3* y *C03H5.2* participan de forma redundante en el transporte de UDP-Naglu al aparato de Golgi, además cada uno de forma independiente realizan el transporte de UDP-gal y UDP-NAgal respectivamente. La inactivación de éstos transportadores por separado no presentan defectos morfológicos, sin embargo, el knockdown de *C03H5.2* por RNAi en mutantes *srf-3(e2689)* produce morfología de gónadas anormales (Caffaro et al., 2007) implicando a los UDP-azúcares en los fenotipos de malformación de gónadas, presumiblemente por su papel en la glicosilación.

Con formato: Fuente: Cursiva

Con formato: Fuente: Cursiva

Otro transportador de UDP-azúcares es *sqv-7*, el cual transporta UDP-acido glucoronico, UDP-gal y UDP-NAgal, dos de los UDP-azúcares que *gale-1(pv18)* tiene alterado, UDP-gal aumentado y UDP-NAgal disminuido, con esta relación era posible que *sqv-7*, además de su conocido fenotipo *sqv*, tuviera también defectos en la formación de gónadas debidos a la disminución de UDP-NAgal.

Eliminado: Con la idea de ver si un mayor desequilibrio de UDP-azúcares en *gale-1(pv18)* incrementaba la malformación de gónadas, se construyó el doble mutante *gale-1(pv18); srf-3(e2689)* y se sometió a *gale-1(pv18)* a RNAi de *C03H5.2*. Contrario a lo esperado, en la observación al microscopio no se hizo evidente ni en el doble mutante *gale-1(pv18); srf-3(e2689)* ni *gale-1(pv18)* tratado con RNAi de *C03H5.2* un mayor daño al observado en *gale-1(pv18)*.

Con formato: Fuente: Cursiva

Con formato: Fuente: Cursiva

Eliminado: ¶

El estudio de las gónadas de *sqv-7(n2839)* muestra defectos en la migración de ambas gónadas en un porcentaje del 35% para las anteriores y 66% en las posteriores, con alteraciones morfológicas similares a las observadas en *gale-1(pv18)* (Figura 2.23.A-B). El menor porcentaje de gónadas posteriores afectadas en *sqv-7(n2839)* y el hecho de que los defectos sean menos severos puede ser debido a que otros transportadores al Golgi de UDP-NAgal suplan en parte la función de *sqv-7*, mientras que en *gale-1(pv18)* tiene una reducción general de este azúcar.

Con formato: Fuente: Cursiva

Eliminado:

Con formato: Fuente: 12 pt, Español (España - alfab. internacional)

Comentario [MM35]: ¿Qué es este?

Otro mutante que presenta un fenotipo similar es *mig-23*, éste gen es necesario para la síntesis de nuevos UDP-azúcares, lo que establece una relación directa con *gale-1(pv18)* que tiene disminuido la UDP-NAgal, y *sqv-7* que es un transportador de algunos de estos azúcares (UDP-NAgal, UDP-gal y UDP-Acido glucoronico) (REF).

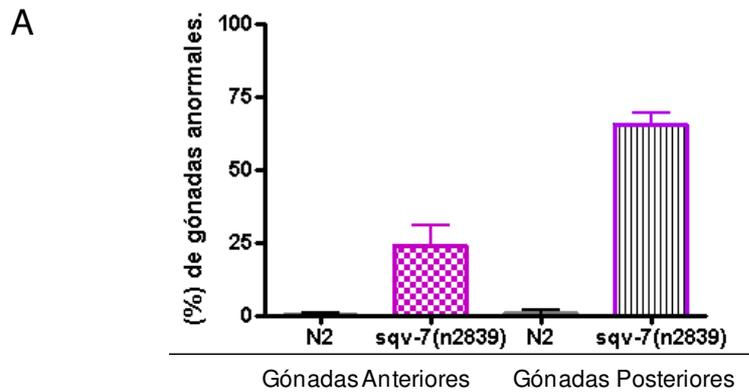


Figura 2.23. Malformación de gónadas de *sqv-7(n2839)*. A Porcentaje de gónadas anteriores y posteriores afectadas en *sqv-7(n2839)*. B. En el silvestre se observa la correcta migración de la gónada posterior, mientras en el mutante *sqv-7(n2839)* hace el primer giro pero no el segundo plegándose sobre sí misma para después migrar hacia la zona anterior. L4 de *sqv-7(n2839)* y N2 fueron observados al microscopio con Nomaski, objetivo 40X. *sqv-7(n2839)* N=91. N2 N= 85.

Los datos anteriores indican que los UDP-azúcares son necesarios para la correcta migración de las gónadas, posiblemente por su implicación en la glicosilación de proteínas importantes para el desarrollo de este órgano.

Mig-17 es una metaloproteasa que se sintetiza en el músculo, es secretada y se localiza en la membrana basal de la gónada donde ejerce su función. Para su correcta localización y función necesita ser glicosilada, así, mutaciones en mig-17 como en los 5 de los 6 putativos sitios de N-glicosilación en el pre-dominio de mig-17, afectan tanto la localización de mig-17 como su función, presentando éstos malformación de gónadas similares a las observadas en *gale-1(pv18)* y *sqv-7(n2839)* (Ihara and Nishiwaki, 2007).

Mig-23, que participa en la síntesis de UDP-azúcares, también es necesario para la localización de mig-17 en la membrana de la gónada. Para saber si *gale-1(pv18)* y *sqv-7(n2839)* afectan a la localización de esta metaloproteasa, utilizamos una cepa que lleva una fusión traduccional de mig-17 y GFP (la cepa unc-119 Ex[mig-17GFP(100) + pUnc119(50)] en un fondo *gale-1(pv18)* y *sqv-7(n2839)* junto con los controles wt y

- Eliminado: ¶
- Eliminado:
- Eliminado:
- Eliminado: cruce
- Eliminado: de forma correcta sobre el músculo dorsal
- Eliminado:
- Eliminado: ¶
- Eliminado: ¶
- Eliminado: para su correcta localización en la gónada donde ejerce su función
- Eliminado: .
- Eliminado: M
- Eliminado: (Ihara and Nishiwaki, 2007),
- Eliminado:
- Comentario [MM36]: ¿Qué es este?
- Eliminado: ¶
- Otro mutante que presenta fenotipo similar es mig-23, éste gen es necesario para la síntesis de nuevos UDP-azúcares, lo que establece una relación directa con *gale-1(pv18)* que tiene disminuido la UDP-NAgal, y *sqv-7* que es un transportador de algunos de estos azúcares (UDP-NAgal, UDP-gal y UDP-Acido glucorónico).¶
- Eliminado: ,
- Eliminado: p
- Eliminado: afectaba

mig-23(k180). Como se observa en la Figura 2.24, hay una disminución de localización de mig-17::GFP en la membrana basal de la gónada en un fondo *gale-1(pv18)* y también en un fondo *sqv-7(n2839)* en comparación a la observada en la cepa silvestre y de forma similar a la reportada para *mig-23(k180)* que en este caso se ha utilizado como control.

Eliminado: .

Eliminado: a

Estos datos indican que *gale-1(pv18)* y *sqv-7(n2839)* son factores importantes para la correcta localización de MIG-17 en la gónada, posiblemente porque se afecta la glicosilación de éste, y sugiere que el azúcar UDP-NAGal, es clave en estos procesos ya que este azúcar está supuestamente disminuido en el Aparato de Golgi en ambos mutantes.

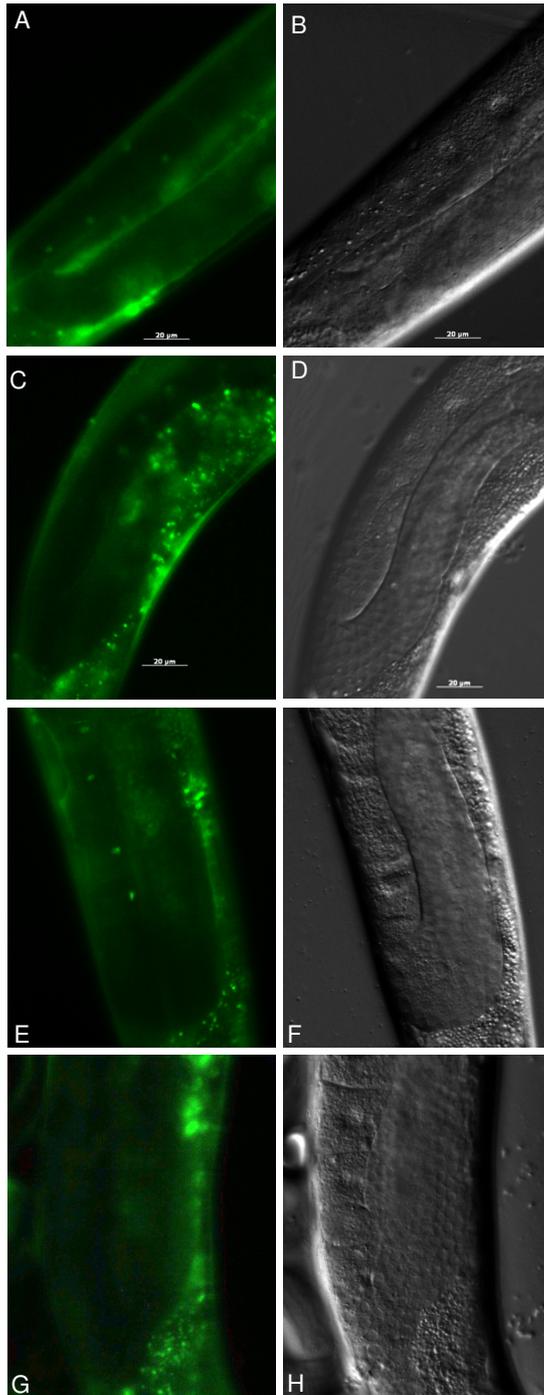


Figura 2.24. Expresión de mig-17::GFP. A. En el wt se observa la expresión de mig-17::GFP en la línea de unión de las gónadas en la parte central. C y E. Expresión de mig-17::GFP en *gale-1(pv18)* y *sqv-7(n2839)*. No se observa expresión en la línea de unión. B. Correcta migración de las gónadas en N2, D y F. Fallos en la correcta migración de las gónadas en *gale-1(pv18)* (D) y en *sqv-7(n2839)* (F). G-H. Control *mig-23(k180)*. Se observa malformación de gónadas y disminución de la expresión de mig-17::GFP reportado por Nishiwaki (Nishiwaki et al., 2004). Fotos tomadas en 40X con Nomanski (B-D-F-H) y GFP (A-C-E-G) a igual rango de excitación.

Comentario [MM37]: En las fotos de gónadas no estoy seguro de que la gente la vea y no se si merece la pena ponerle un punteadito o algo que lo indique

2.3 LONGEVIDAD

2.3.1. EL FENOTIPO DE LONGEVIDAD DE GALE-1

gale-1(pv18) es un aislamiento que proviene de una selección de mutantes termotolerantes que se realizó con la intención de identificar nuevos genes que regulen longevidad. El estudio de longevidad de *gale-1(pv18)* ha sido realizado en múltiple ocasiones a 25°C (Figura 2.25.A. Anexo I. a-b) y también 20°C (Figura 2.25.B.) utilizando como recurso alimenticio *E. coli* OP50, universalmente estandarizada para el crecimiento de *C. elegans* en el laboratorio.

Eliminado: os

Eliminado: La

Eliminado: repetida

Eliminado: varias

Eliminado: confirmada

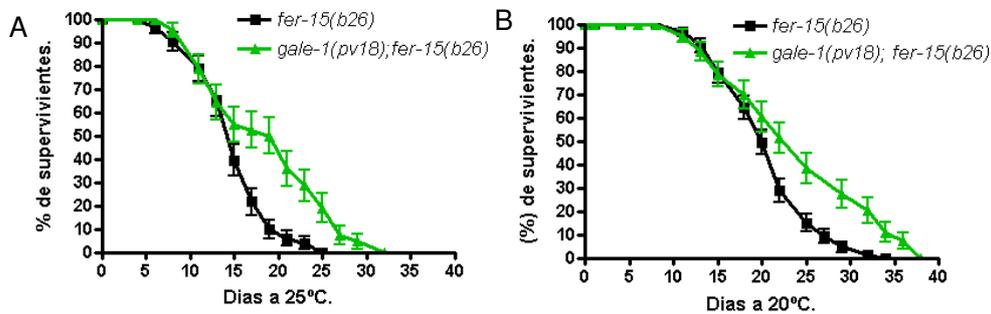


Figura 2.25. Curvas de longevidad de *gale-1(pv18)* a 25 y 20°C. A-B *gale-1(pv18)* y *fer-15(b26)* crecidos a 16°C y transferidos en el estadio L4 a 25°C y 20°C. A. $N \geq 60$. Barra de error SEM. Logrank test: las curvas son diferentes $P = 0.0005$. B. $N \geq 80$. Barra de error SEM. Logrank test: las curvas son diferentes $P = 0.0002$.

Algunos mutantes afectados en glicosilación son resistentes a infecciones bacterianas y *E. coli* infecta eventualmente a *C. elegans* (Garigan et al., 2002; Gravato-Nobre et al., 2010). Una duda que nos surgió fue si el incremento de longevidad se producía porque *gale-1(pv18)* fuese resistente a *E. coli*, para ello probamos diferentes bacterias y observamos que *gale-1(pv18)* no tiene resistencia a las bacterias patógenas *Enterococcus faecalis* y *Stafilococcus aureus* (Figura 2.17. A-B), contrario a lo observado en mutantes con fallos en glicosilación (Gravato-Nobre et al., 2010) y mutantes longevos como *daf-2* y *age-1* (Garsin et al., 2003). Sin embargo, similar a *daf-2* y *age-1* su longevidad se incrementa si es crecido en *Bacillus subtilis*, una cepa considerada inocua que no altera el tiempo de desarrollo ni la fertilidad de *C. elegans* (Garsin et al., 2003) (Figura 2.26). El resultado demuestra que la longevidad de *gale-1(pv18)* en OP50 no es debida a una resistencia de la infección.

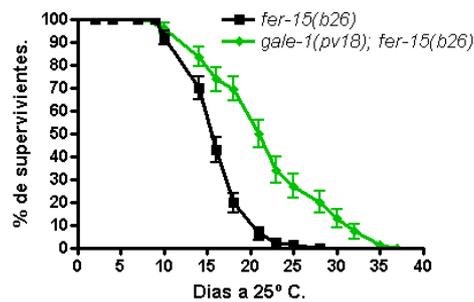


Figura 2.26. Curva de longevidad de *gale-1(pv18)* en *Bacillus subtilis*. Barra de error SEM. Logrank test: las curvas son diferentes $P < 0.0001$. $N=100$.

2.3.2. RESCATE DE LOS FENOTIPOS DE LA MUTACIÓN EN GALE-1 MEDIANTE MODIFICACION DE LA DIETA.

En la técnica de RNAi la *E. coli* OP50 es reemplazada por *E. coli* HT115, la cual ha sido modificada genéticamente para conseguir mayor cantidad de RNAi de doble cadena (Ahringer, 2006) (materiales y métodos 5.2.2.). Un hallazgo sorprendente de la longevidad de *gale-1(pv18)* fue encontrado cuando se realizaron experimentos de RNAi en las condiciones estandarizadas, en las cuales *gale-1(pv18)* no es longevo con relación a *fer-15(b26)* cuando es crecido en el plásmido vacío (pL4440), por esta particular circunstancia se decidió realizar una curva de longevidad utilizando a la *E. coli* HT115 como recurso alimenticio y tampoco se observó un incremento de longevidad en *gale-1(pv18); fer-15(b26)* con relación a *fer-15(b26)* crecido en las mismas condiciones (Figura 2.27. Anexo I.c-d.).

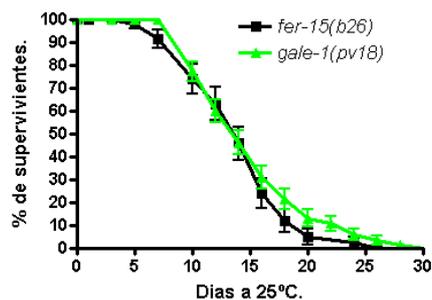


Figura 2.27. Curva de longevidad de *gale-1(pv18)* en *E. coli* HT115. *gale-1(pv18)* no es longevo en *E. coli* HT115. Barra de error SEM. Logrank test: las curvas no son diferentes. $P=0.2542$. *fer-15(b26)*. $N=60$ *gale-1(pv18)* $N=100$.

Las cepas de *E. coli* OP50 y de *E. coli* HT115 tienen orígenes diferentes, cepa B y cepa K12 respectivamente, cada una con una constitución de lipopolisacáridos de pared diferentes (Maier et al., 2010; Prehm et al., 1976; Prehm et al., 1975). El core externo de la cepa HT115 tiene en sus lipopolisacáridos unas ramificaciones de azúcares que incluyen una glucosa, una galactosa y una UDP-NAglu, que no están presentes en la cepa OP50, de esta forma, es posible que produzca cambios suficientes en el perfil de UDP-azúcares de *gale-1(pv18)* para suprimir el fenotipo de longevidad.

Eliminado: provienen de parentales

Eliminado:

Eliminado: u

Eliminado:

Comentario [MM38]: Pensar si esto debe ir a discusión

Además del fenotipo de longevidad hemos observado que tanto la letalidad a 25°C como el retraso en el crecimiento a 22.5°C que se observan en el mutante *gale-1(pv18)* mejoran sustancialmente cuando se alimenta con la cepa de *E. coli* HT115 (Tabla 2.4) indicando que la dieta afecta dramáticamente los fenotipos que tiene este mutante.

Eliminado: , indicando que la longevidad de *gale-1(pv18)* no es debida a resistencia de infección pero si podría ser debida al desequilibrio de UDP-azúcares

Eliminado: Tras estos datos se inicio el estudio de la longevidad con relación a glicosilación y otras rutas de estrés y señalización conocidas que afectan a la longevidad como la ruta de la insulina, la ruta de restricción calórica y la ruta de la Unfolded Protein Response.

Cepas	<i>E. coli</i>	22.5°C	25°C
<i>liv-8(pv18); fer-15(b26)</i>	OP50	23% Adulto	0% Adulto
	HT115	50% Adulto	33% Adulto
<i>fer-15(b26)</i>	OP50	97.5% Adulto	96.4% Adulto
	HT115	99.6% Adulto	97.4% Adulto

Tabla 2.4. Tasa de crecimiento de *gale-1(pv18); fer-15(b26)* y *fer-15(b26)* en *E. coli* OP50 y *E. coli* HT115 a 22.5 y 25°C.

Comentario [MM39]: Explica como se ha hecho el experimento, días.

2.3.3. FENOTIPO DE LONGEVIDAD Y GLICOSILACION

gale-1(pv18) presenta una diversidad de fenotipos (letalidad embrionaria, vulva protuberante, defectos en el desarrollo de gónadas) que se pueden explicar por su implicación en los procesos de glicosilación. Es muy atractivo pensar que quizás un regulador negativo de la longevidad necesite ser glicosilado para su correcta función y por ello se produzca un incremento de longevidad en este mutante. Con esta idea estudiamos la longevidad de diferentes mutantes afectados en distintos procesos de glicosilación ya que si esto fuese así otros mutantes relacionados con este proceso deben ser también longevos.

Para ello realizamos estudios de longevidad a mutantes que están afectados en la N-glicosilación como son, *mig-23(k180)* que está afectado en una NDPasa esencial para la

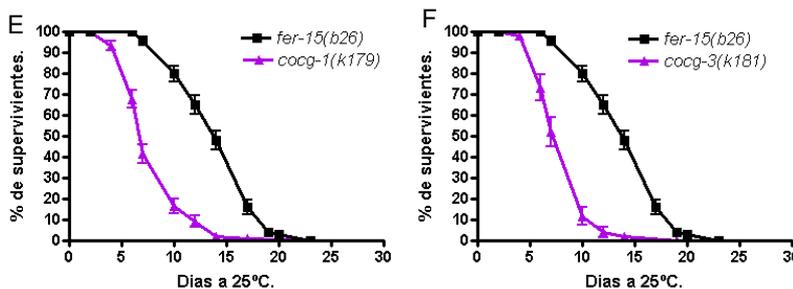
Con formato: Fuente: Cursiva

síntesis de azúcares nucleósidos en el Golgi, los mutante en transportadores de UDP-azúcares *sqv-7(n2839)*, *sqv-7(n3789)*, así como son *srf-3(e2689)* y C03H5.2 (este último mediante RNAi), *cog-1(k179)*, *cog-3(k181)* implicados en el transporte de glicosiltransferasas. Todos ellos presentan malformación de gónadas al igual que *gale-1(pv18)* posiblemente por afectar a la glicosilación de mig-17, entre otras dianas. Como se puede observar en la figura XXX, ninguno de ellos es longevo, como tampoco lo es la mutación en *mig-17(k113)*. Mutantes afectados en la síntesis de GAG tampoco son longevos aunque presentan características comunes con *iv-8(pv18)* como es el fenotipo de vulva protuberante, *sqv-2(n2826)*, *sqv-3(n2842)* y *sqv-5(k172)*, letalidad embrionaria *rib-2(gk318)*, o defectos en el desarrollo de gónadas, mig-22 (cofactor con *sqv-5* en la síntesis y polimerización del condroitin) Figura XXX. De hecho, en la mayoría de los casos se observó una vida media inferior a la del silvestre, quizás debido a que los gusanos tengan un desarrollo y crecimiento mas deteriorado.

Estos resultados sugieren que el incremento de longevidad de *gale-1(pv18)* no es debido a un problema en N-glicosilación o en la síntesis de GAG y podría ser debido a que la alteración en el perfil de UDP-azúcares pueda estar comprometiendo procesos generales del metabolismo y respuesta a estrés.

La enzima glucosamina 6-fosfato Nacetiltransferasa, codificada por *gna-2*, forma parte de la ruta de las hexosaminas para la síntesis de UDP-NAGlu, el cual es necesario para la formación de UDP-NAgal a través de GALE-1. El perfil de UDP-azúcares de *gna-2(qa705)* muestra niveles de UDP-NAGlu no detectables y una disminución del 19% de UDP-NAgal con niveles normales de UDP-gal y UDP-glu (Johnston et al., 2006), mientras *gale-1(pv18)* tiene niveles bajos de UDP-NAgal, alto de UDP-gal y niveles normales de UDP-NAGlu y UDP-glu. Este mutante tampoco tiene un incremento de longevidad lo que sugiere que el incremento de longevidad del mutante *gale-1* se debe a los cambios específicos que se producen en *gale-1(pv18)* y no de cualquier cambio en los perfiles de UDP-azúcares necesarios para la glicosilación.

82



Comentario [MM40]: Hay Golgi mayúsculo y minúsculo miraló. No se como es más correcto

Comentario [MM41]: Esto no lo entiendo

Eliminado: Si

Con formato: Fuente: Cursiva

Con formato: Fuente: Cursiva

Comentario [MM42]: No lo entiendo

Comentario [MM43]: Agrupar en síntesis de GAG y N-glicosilación

Comentario [MM44]: Esto no lo entiendo

Comentario [MM45]:

Eliminado: presenta fenotipos de letalidad embrionaria a 25°C, vulva protuberante y malformación de gónadas similar a mutaciones comprometidas con diferentes procesos de glicosilación, era sugerente pensar que mutaciones en algunos de estos genes pudieran ser longevos, igual a *gale-1(pv18)*. Sorprendentemente, de los mutantes implicados en la síntesis de los GAG y fenotipo de letalidad embrionaria, *rib-2(gk318)* (Figura 2.28A) y vulva protuberante *sqv-2(n2826)*, *sqv-3(n2842)* y *sqv-5(k172)* (Figura 2.28B-C-D); transporte de glicosiltransferasas con malformación de gónadas *cog-1(k179)*, *cog-3(k181)* (Figura 2.28 E-F); transporte de elementos necesarios para una correcta glicosilación *sqv-7(n2839)*, *sqv-7(n3789)*, *srf-3(e2689)* y C03H5.2 RNAi (Figura 2.28 G-H-I-J) probados para longevidad, ninguno presento incremento de longevidad y al contrario de lo esperado

Eliminado: presentó

Eliminado: Tampoco se observó un incremento de longevidad en mutantes con malformación de gónadas como mig-17 (proteína N-glicosilada), ni en mig-23 (NDPasa cuya actividad es indispensable para la fabricación de nuevos azúcares nucleósidos en el [... [1]

Eliminado: e

Eliminado: de

Eliminado: de una o pocas <sp>proteínas dianas

Eliminado: que puede

Comentario [MM46]: Disminución o presencia

Con formato: Fuente: Cursiva

Con formato: Fuente: Sin Negrita

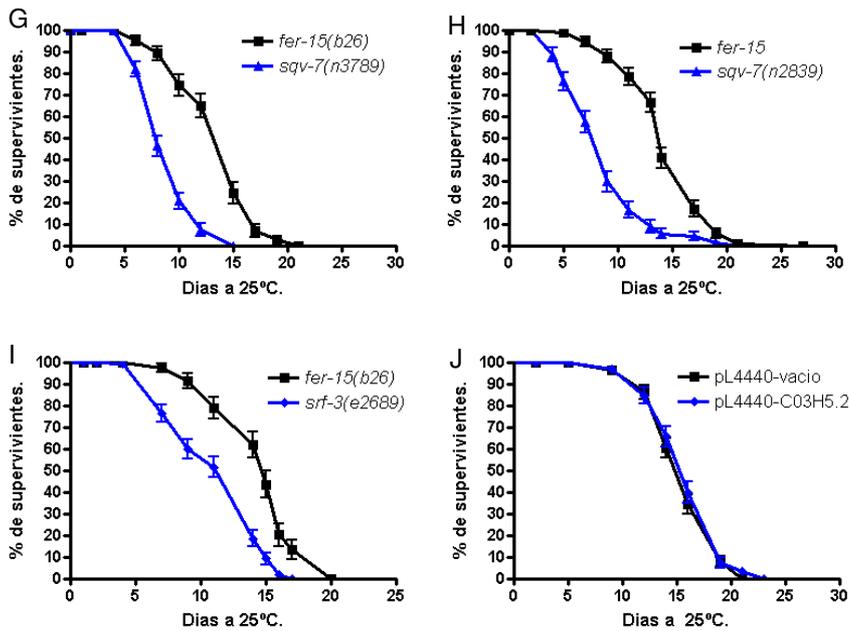


Figura 2.28. Curvas de longevidad de mutantes relacionados con glicosilación y que tienen algún fenotipo similar a *gale-1(pv18)*. A-J. N=100. Barra de error SEM. A-I. Logrank test: las curvas son diferentes. $P < 0.0001$. J. *fer-15(b26)* en RNAi de *pL4440* vacío y RNAi C03H5.2. Logrank test: las curvas no son diferentes $P = 0.3923$.

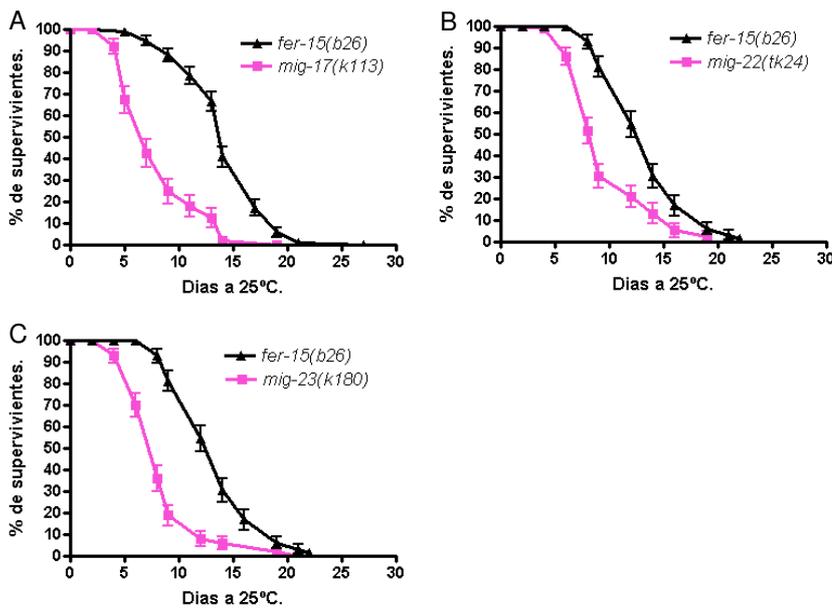


Figura 2.29. Curvas de longevidad de mutantes *mig* relacionados con glicosilación tipo N. A-C. N=100. Barra de error SEM. A-C. Logrank test: las curvas son diferentes. $P < 0.0001$.

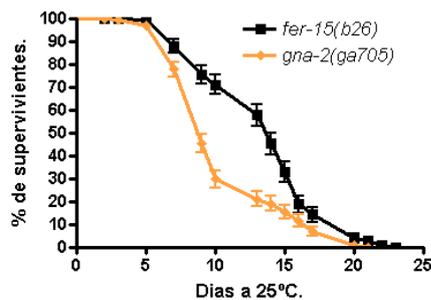


Figura 2.30. Curvas de longevidad del mutante *gna-2(qa705)* con niveles alterados de UDP-azúcares. N=100. Barra de error SEM. Logrank test: las curvas son diferentes. P<0.0001.

2.3.4. LA RUTA DE LA UNFOLDED PROTEIN RESPONSE Y LONGEVIDAD

La acumulación de proteínas con problemas en glicosilación produce una saturación en el Retículo Endoplasmático (RE) que desencadena una respuesta adaptativa conocida con Unfolded Protein Response (UPR). La chaperona *hsp-4*, entre otros muchos genes, está sobreexpresada en la UPR de forma dependiente de *ire-1/xpb-1* y su expresión es utilizada habitualmente para medir el grado de estrés del RE (Calfon et al., 2002). La UPR ha sido recientemente relacionada con la ruta de la insulina porque mutantes del receptor *daf-2* tienen disminuida la expresión de *hsp-4* y son resistentes a estreses en el retículo endoplásmico (Henis-Korenblit et al., 2010). Teniendo en cuenta que *gale-1* regula la síntesis de los UDP-azúcares necesarios para la correcta glicosilación de proteínas y *gale-1(pv18)* tiene fenotipos relacionados con problemas de glicosilación y es longevo se exploró la posibilidad de la deficiencia de *gale-1* como desencadenante de la activación de la UPR.

Hemos utilizado *hsp-4* para saber si *gale-1(pv18)* produce estrés en el RE. La cepa *hsp-4::gfp* tiene una expresión de fluorescencia basal relativamente baja en toda la anatomía del gusano menos en las espermatotecas donde la expresión es más alta, pero se induce fuertemente en intestino e hipodermis cuando se activa la UPR, por ejemplo después del tratamiento con tunicamicina, un inhibidor de la glicosilación (Calfon et al., 2002). El doble mutante *gale-1(pv18); hsp-4::gfp* crecido a 20°C muestra un evidente incremento en la expresión de *hsp-4*, la cual desaparece cuando *gale-1(pv18); hsp-4::gfp* es crecido en iguales condiciones sobre RNAi de *xpb-1* (Figura 2.31.A). Este resultado sugiere que *gale-1(pv18)* es capaz de activar a los sensores *ire-1/xpb-1* y por consiguiente la UPR, esta activación podría deberse a que el desequilibrio de azúcares de *gale-1(pv18)* conlleva a una acumulación de proteínas mal plegadas por defectos en glicosilación en el RE y por lo tanto la activación de la UPR por estrés.

El incremento de la expresión de *hsp-4* en un fondo *gale-1(pv18)* fue cuantificado midiendo la intensidad de fluorescencia en el intestino, observando un incremento del

Comentario [MM47]: Disminución o presencia

Eliminado: Por otra parte, la enzima glucosamina 6-fosfato Nacetiltransferasa, *gna-2*, forma parte de la ruta de las hexosaminas para la síntesis de UDP-NAglu, el cual es necesario para la formación de UDP-NAgal a través de *gale-1*. El perfil de UDP-azúcares de *gna-2(qa705)* muestra niveles de UDP-NAglu no detectables y una disminución del 19% de UDP-NAgal con niveles normales de UDP-gal y UDP-glu (Johnston et al., 2006), mientras *gale-1(pv18)* tiene niveles bajos de UDP-NAgal, alto de UDP-gal y niveles normales de UDP-NAglu y UDP-glu, por esta razón se determinó la longevidad para ver si por un desequilibrio en los UDP-azúcares era posible incrementar la longevidad. La curva de longevidad realizada al mutante *gna-2(qa705)* muestra que no es longevo (Figura 2.30.), un dato más para sugerir que la longevidad es una circunstancia específica [... [2]

Eliminado: s

Eliminado: n

Eliminado: de proteínas r [... [3]

Eliminado: activada

Eliminado: ,

Eliminado: *hsp-4*

Con formato: Fuente: Cursiva

Con formato: Fuente: Cursiva

Eliminado: de la UPR

Eliminado:

Eliminado: o

Eliminado: a

Eliminado: su expresión [... [4]

Eliminado: inducida

Eliminado: que induce es [... [5]

Eliminado: , esta cepa es [... [6]

Eliminado:

Eliminado: llegando a ser [... [7]

Eliminado: l

Eliminado: indica

Eliminado: uede

Eliminado: u

Eliminado: glicosiladas

Eliminado: plegadas

Con formato: Fuente: Cursiva

Comentario [MM48]: [... [8]

Eliminado: por la

Eliminado: medición de

doble de expresión en *gale-1(pv18); hsp-4::gfp* en comparación con *hsp-4::gfp*. (Figura 2.31.B)

Eliminado: ,

Eliminado:

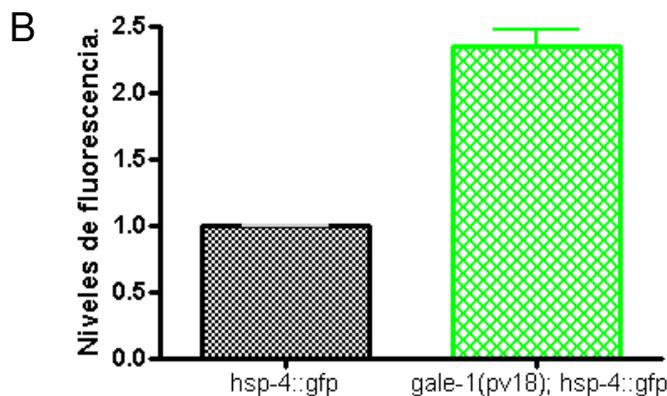
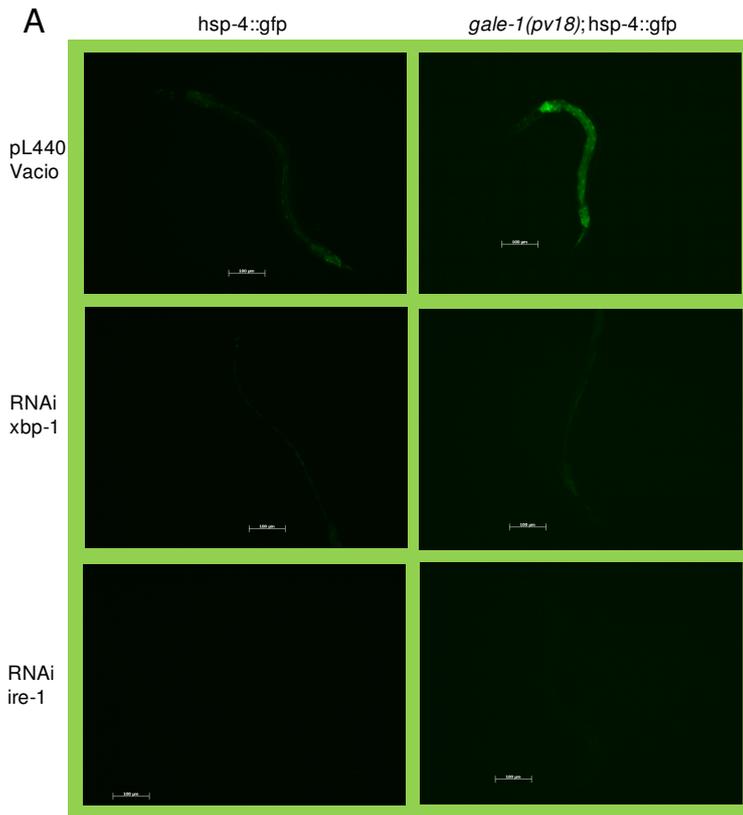


Figura 2.31. *gale-1(pv18)* induce la expresión de *hsp-4* de forma dependiente de *ire-1/xbp-1*. A. La expresión de *hsp-4::gfp* en *gale-1(pv18)* es alta en todo intestino e hipodermis y disminuye cuando es tratado con RNAi de *ire-1/xbp-1*. Fotos tomadas con objetivo 10X a igual excitación de luz ultravioleta. B. Medición de fluorescencia de *gale-1(pv18); hsp-4::gfp*. El incremento de la intensidad de fluorescencia es el doble en *gale-1(pv18); hsp-4::gfp* en comparación a la cepa *hsp-4::gfp*. *hsp-4::gfp* N: 77, *gale-1(pv18); hsp-4::gfp* N: 82.

La UPR está finamente regulada y se ha observado que la expresión de *hsp-4* se induce cuando se eliminan otros genes implicados en la UPR, por ejemplo *dnj-7* o *hsp-3*. (Oyadomari et al., 2006). Sin embargo, no existen datos previos sobre cómo se afecta cuando se elimina *atf-6*, una proteína sensora central en la activación de la UPR que

Eliminado:

Eliminado: La

Comentario [MM49]: Falta referencia

Eliminado: con

Eliminado: ha sido reportada en otros estudios, en los cuales se evidencia que algunos incrementan la expresión,

Eliminado: , y en otros no se altera, *pek-1*

Eliminado: de

Eliminado: de

necesita ser glicosilada (Guan et al., 2009; Hong et al., 2004). **Nosotros hemos observado que cuando se elimina *atf-6* mediante RNAi se produce un incremento considerable de la expresión de *hsp-4::gfp*.** Para confirmar este hallazgo y ver si la expresión era dependiente de *xbp-1* se construyó el doble mutante *atf-6(ok551); hsp-4::gfp* y se sometió a RNAi de *xbp-1* y de pL4440 vacío (Figura 2.32). Los resultados obtenidos con *atf-6(ok551)* fueron iguales a los encontrados en *gale-1(pv18)* tanto en la sobreexpresión de *hsp-4* como en la dependencia de *xbp-1* e *ire-1*.

Comentario [MM50]: Pensar si eliminar con su referencia

Eliminado: por lo cual se decidió estudiar la expresión de *hsp-4::gfp* en

Eliminado: de *atf-6*. En este experimento

Eliminado: observó

Eliminado: ,

Eliminado: p

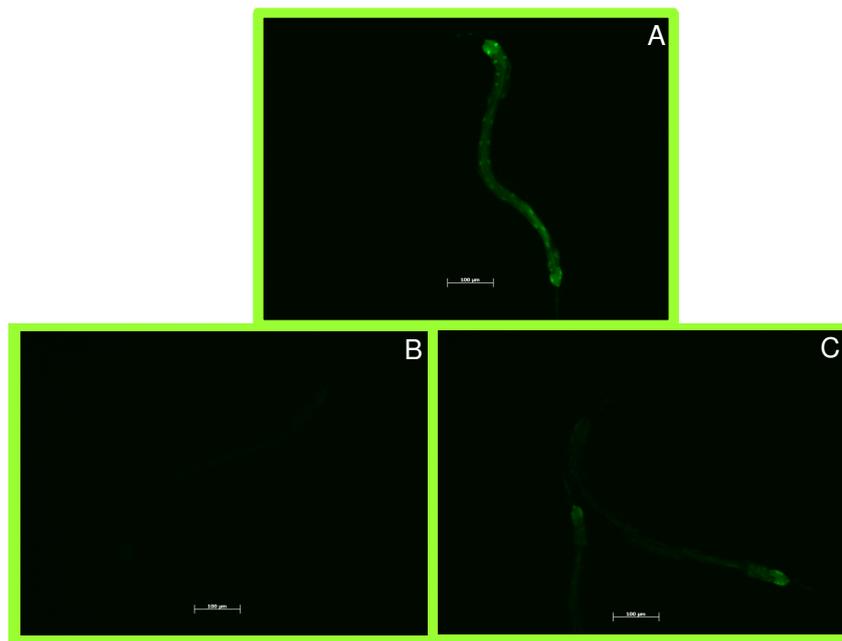


Figura 2.32. *atf-6(ok551)* induce la expresión de *hsp-4* de forma dependiente de *ire-1/xbp-1*. A. La expresión de *hsp-4::gfp* en *atf-6(ok551)* es alta en todo intestino e hipodermis. B-C. La expresión disminuye cuando es tratado con RNAi de *xbp-1* e *ire-1*. Fotos tomadas con objetivo 10X a igual excitación de luz ultravioleta.

atf-6 e *ire-1/xbp-1* participan juntos en la regulación del desarrollo, de hecho está descrito que el doble mutante *atf-6(ok551); ire-1(v33)* crece muy lentamente, con aspecto enfermizo sufriendo una parada en el desarrollo en el estadio L2 y muriendo poco después (Shen et al., 2001; Shen et al., 2005). **Debido a la similitud que presentaba**

Eliminado: Figura 2.32. *atf-6(ok551)* induce la expresión de *hsp-4* de forma dependiente de *ire-1/xbp-1*. A. La expresión de *hsp-4::gfp* en *atf-6(ok551)* es alta en todo intestino e hipodermis. B-C. La expresión disminuye cuando es tratado con RNAi de *xbp-1* e *ire-1*. Fotos tomadas con objetivo 10X a igual excitación de luz ultravioleta.

Eliminado: ¶

atf-6 y gale-1 decidimos ensayar si el efecto era similar en la reducción de actividad de gale-1 en un fondo donde falta xbp-1 o ire-1.

gale-1(pv18) incubado en RNAi de ire-1 y xbp-1 mostró de la misma manera una parada en el desarrollo, siendo más fuerte en el RNAi de xbp-1 indicando que ambos genes de forma directo o indirecta colaboran en la progresión del desarrollo. En contraste, *gale-1(pv18)* crece sin dificultad hasta el estadio de adulto cuando es crecido en RNAi de atf-6 (Figura 2.33).

Eliminado: La repetición de este experimento junto con

Eliminado: sometido a

Eliminado: ,

Eliminado: sugiriendo que gale-1 y atf-6 trabajan en la misma ruta genética en relación al desarrollo

Eliminado: ¶
 Figura 2.33. *gale-1* y atf-6 participan en la misma ruta del desarrollo. *gale-1(pv18)* crece bien en pL4440 vacío y en RNAi de atf-6 pero su desarrollo se atasca en L1/L2 cuando crece en RNAi de xbp-1, igual a *atf-6(ok551)*. Fotos tomadas en lupa estereoscópica al mismo aumento. ¶

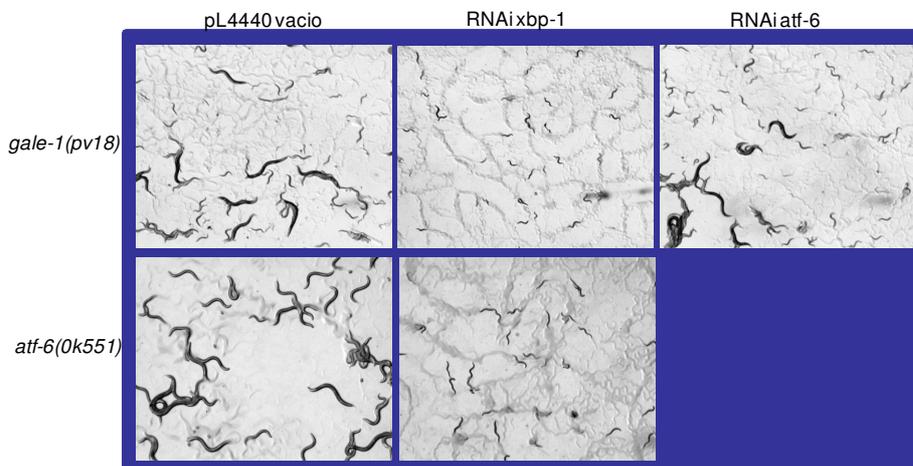


Figura 2.33. *gale-1* y atf-6 participan en la misma ruta del desarrollo. *gale-1(pv18)* crece bien en pL4440 vacío y en RNAi de atf-6 pero su desarrollo se atasca en L1/L2 cuando crece en RNAi de xbp-1, igual a *atf-6(ok551)*. Fotos tomadas en lupa estereoscópica al mismo aumento.

La UPR se ha relacionado recientemente con la regulación de la longevidad. Se ha descrito que ire-1 es necesario para el incremento de longevidad que se produce por un tipo de restricción calórica (cultivo a partir del estadio joven adulto en una concentración bacteriana reducida y sin peptona) (Chen et al., 2009), posteriormente otro estudio ha mostrado que ire y xbp-1 son necesarios para el incremento de longevidad observado en mutantes daf-2, mientras que tiene poco efecto en un fondo silvestre (Henis-Korenblit et al., 2010). Nuestros resultados anteriores muestran que *gale-1* e *ire-1/xbp-1* cooperan en la progresión del desarrollo y que *ire-1/xbp-1* suprimen la expresión de *hsp-4::gfp* en un fondo *gale-1*, por lo cual estudiamos si *ire-1/xbp-1* suprime la longevidad de *gale-1(pv18)*.

Eliminado: Di Chen et al, describieron que *ire-1* es necesario para el incremento de longevidad que se produce por restricción calórica a partir del estadio joven adulto (utilizando para ello una concentración bacteriana de 5×10^9 , tratadas con antibiótico y sin peptona en el

Comentario [MM51]: Qué dice Di Chen de *xbp-1*?

Eliminado: Medio

Eliminado: recientemente

Eliminado: es

Eliminado: también

Eliminado: *ire-1* es la endoribonucleasa cuya función es realizar un splicing alternativo en *xbp-1* para que éste se active.

Eliminado:

Eliminado: ¶
 ¶

La realización de este experimento presentó varios inconvenientes ya que los animales *gale-1(pv18)* en ausencia de *ire-1* o *xbp-1* paran el desarrollo en L1. Este problema se intento solventar creciendo *gale-1(pv18)* hasta el estadio L4 en las condiciones normales de crecimiento en la cepa de *E. coli* habitual OP50 (sin tratamiento de *ire* ni de *xbp*) y en este estadio se incubó en RNAi de *ire-1* y *xbp-1*. La cepa de *E. coli* que se usa habitualmente para los ensayos de RNAi es la bacteria HT115, en la cual, como hemos anotado anteriormente, *gale-1(pv18)* no es longevo (Figura 2.27.). No obstante, el experimento fue realizado en estas condiciones y según se muestra en la gráfica, el tratamiento de *gale-1* con RNAi de *xbp-1* genera una reducción de la longevidad de un 20.4%, que es mayor que la reducción que sufre *fer-15(b26)* crecido en RNAi *xbp-1* (un 9.5%) (Figura 2.34. A) lo que sugiere que *xbp-1* es importante para el mantenimiento de la vida media en un fondo *gale-1(pv18)*, similar a lo descrito para *daf-2*. Este mismo experimento se repitió con RNAi de *ire-1* observandose que para este caso no hay diferencias (Figura 2.34. B. Anexo I. g-h).

Eliminado: de

Eliminado: pasarlo

Eliminado: a

Eliminado: , pero

Eliminado: en la bacteria HT115, utilizada en la técnica de RNAi,

Eliminado: disminuye la vida media en

Eliminado: comparado con el control del plásmido vacío, con un P=0.0156

Eliminado: , en contraste, la reducción de la vida media de *gale-1(pv18)* es de 20.4% cuando es crecida en RNAi Xbp-1 comparado con el control del plásmido vacío y un P<0.0001

Eliminado: Igual experimento se realizó con RNAi de *ire-1*, sin embargo, la reducción de longevidad en *gale-1(pv18)* no es superior a la observada en *fer-15(b26)* (Figura 2.34. C-D), obteniendo en ambos un P y una reducción de la vida media similares (reducción de vida media para *fer-15(b26)* de 8.58% y para *gale-1(pv18)* de 8.38%). La diferencia de reducción de vida media en *fer-15(b26)* y en *gale-1(pv18)* sugiere que *xbp-1* es necesario para la longevidad de *gale-1(pv18)*.

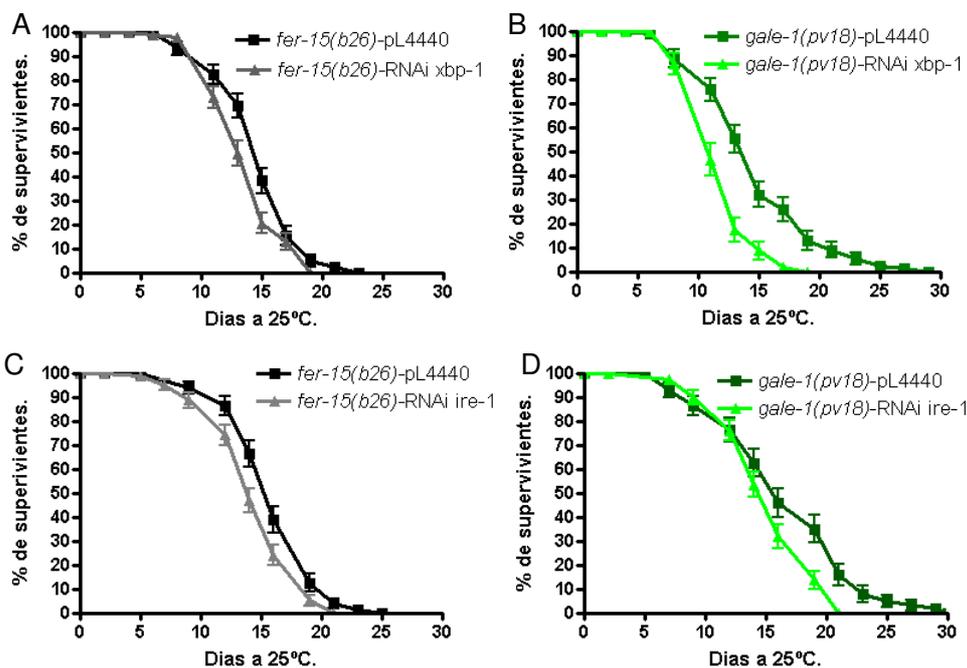


Figura 2.34 Supresión de la vida media de *gale-1(pv18)* por *xbp-1* e *ire-1*. A. P=0.0156 y B. P=P<0.0001. C. P= 0.0035 y D. P= 0.0039. En todas las curvas el N fue aproximado a 100 gusanos. Barra de error SEM.

La relación de *gale-1* con elementos de la UPR nos animaron a realizar experimentos de longevidad con otros elementos de esta ruta. Los genes seleccionados fueron los otros sensores de la UPR, *atf-6* y *pek-1*; dos genes del RE encargados específicamente del control de calidad de las proteínas glicosiladas, calnexin y calreticulín; una diana de *atf-6* que activa *hsp-4*, *dnj-7*; y una E3 ubiquitin ligases, *hrd-1*, un gen que forma parte del sistema de degradación del RE (ERAD) que también activa *hsp-4*.

Las curvas de longevidad se realizaron con mutantes de calnexin, calreticulín, *hrd1* y *dnj-7* y mediante mutantes y con RNAi para *atf-6* y *pek-1*. En los mutantes calnexin, calreticulín, *hrd1-1* y *dnj-7* y *pek-1* por delección y por RNAi no se observó incremento en la longevidad ni en la vida media ni en la extensión de la vida (Figura 2.35. A-F).

Eliminado: para
 Eliminado: por mutantes
 Eliminado: por mutantes y por RNAi

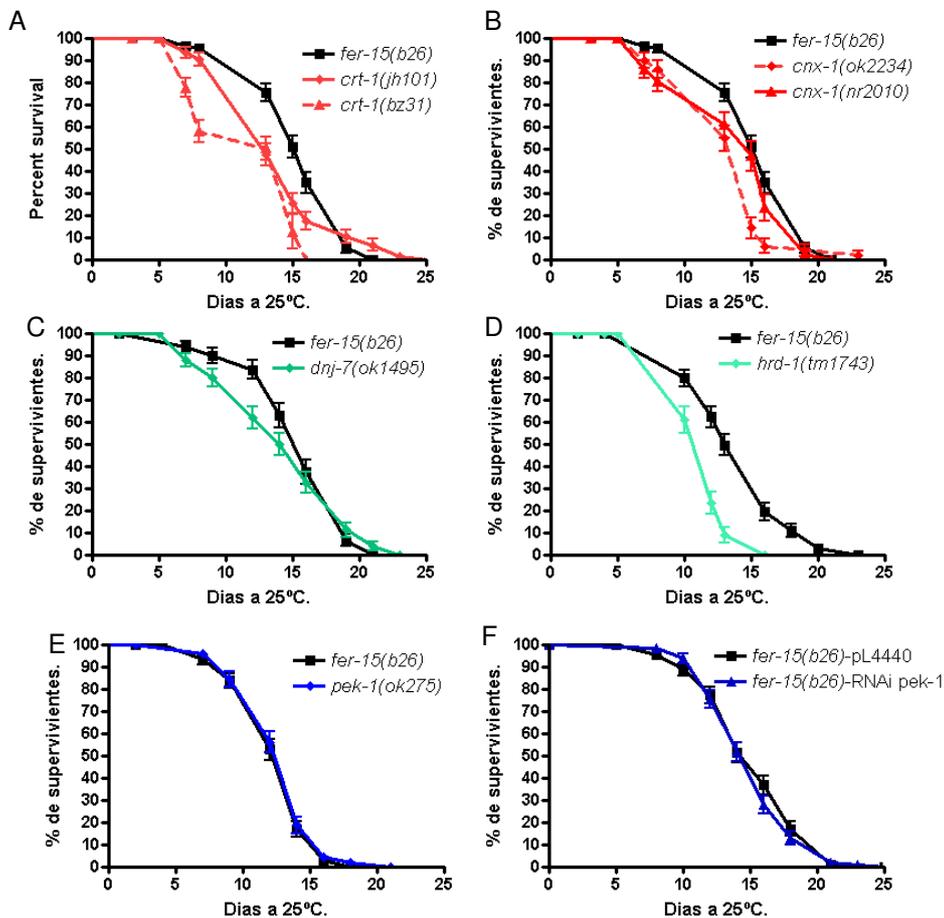
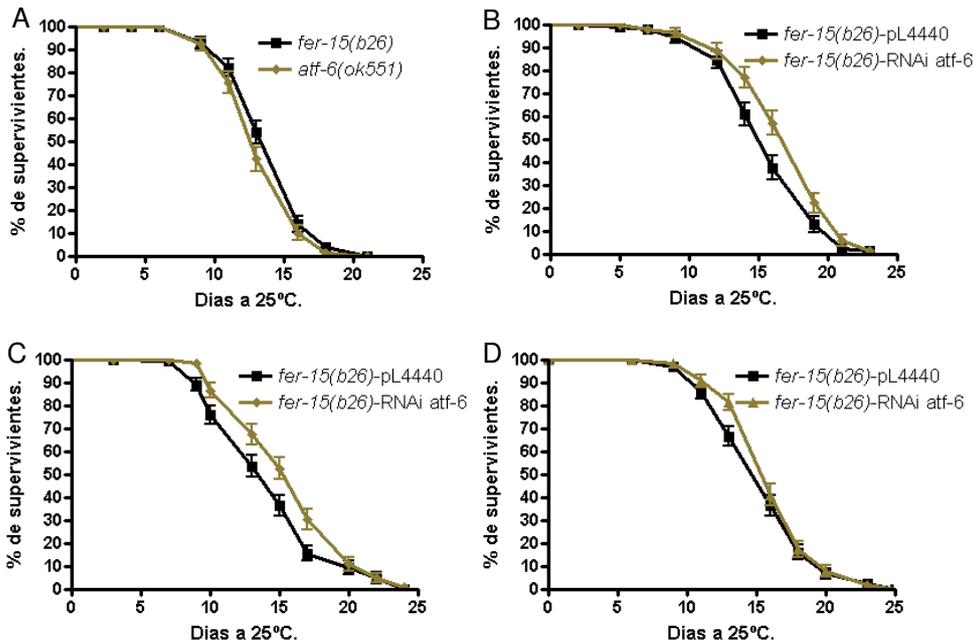


Figura 2.35. Curvas de longevidad de mutantes de la UPR. A. Dos alelos de calreticulín (*jh101* y *bz31*). B. Dos alelos de calnexin (*ok2234* y *nr2010*). C. *dnj-7(ok1495)*. D. *hrd-1(tm1743)*, A-D. Todos los alelos presentan una vida media inferior a *fer-15(b26)*. E. *pek-1(ok275)*. F. *fer-15(b26)* en RNAi de *pek-1* y

pL4440 vacío. E-F. Ni el mutante *pek-1(ok275)* ni el RNAi de *pek-1* presentan un incremento de longevidad. En todas las curvas el N es aproximado a 100 gusanos. Barra de error SEM.

En el caso de *atf-6*, la delección *atf-6(ok551)* no tiene incremento de longevidad a 25°C (Figura 2.36.A), mientras *fer-15(b26)* tratado con RNAi de *atf-6* a 25°C mostró un ligero aumento en la longevidad (Figura 2.36.B). Aunque se observa esa tendencia que no aparece en otros ensayos, desafortunadamente, este incremento no fue reproducible en todas las repeticiones realizadas en las mismas condiciones (Figura 2.36.C-D).

Eliminado: D



Resultados similares han sido descritos por (REF de Kenyon) donde 3 de 4 experimentos observan incremento de longevidad para la falta de función de *atf-6*.

Eliminado:

Figura 2.36. Curvas de longevidad del mutante *atf-6(ok551)* y por RNAi de *atf-6* a 25°C. A. Logrank test: las curvas no son diferentes. P=0.1095. B. Logrank test: las curvas son diferentes. P<0.0109. C. Logrank test: las curvas son diferentes. P=0.0091. D. Logrank test: las curvas no son diferentes. 0,2479. A-D. N=100. Barra de error SEM.

Con el conjunto de resultados podemos establecer que existe una relación entre *gale-1* y la Unfolded Protein Response, una ruta de estrés relacionada con la longevidad por RD y con la ruta de la insulina aunque el mecanismo por el cual *gale-1* podría regular la longevidad no queda claro.

Eliminado: está

2.3.5. FENOTIPO DE LONGEVIDAD Y RESTRICCIÓN CALÓRICA

Es muy atractivo pensar que la alteración de los UDP-azúcares que se observan en *gale-1(pv18)* imita algún tipo de restricción calórica. Para intentar aclarar esta circunstancia estudiamos como se comporta este mutante frente a RD.

Uno de los métodos más utilizados de RD es el mutante *eat-2*, un mutante con una reducida tasa de bombeo faríngeo que limita la ingesta normal de bacterias produciendo una restricción dietaria crónica. El doble mutante *gale-1(pv18); eat-2(ad456)* resultó estar muy enfermo, con crecimiento muy lento y presenta una puesta de huevos disminuida, lo que no ha permitido realizar la curva de longevidad. Previamente, se ha relacionado el gen de la UPR, *ire-1*, con la longevidad debida a restricción calórica generada por reducción en la concentración de bacterias a partir del cuarto día de vida del nematodo (Chen et al., 2009). El método consiste en crecer a los gusanos hasta L4 en condiciones normales de comida para ser luego transferidos a placas con medio NGM sin peptona, carbenicilina a 50µg/ml y una dilución bacteriana de 5×10^9 . Utilizando este método se ha descrito que la longevidad es dependiente del factor de transcripción *daf-16* y de *ire-1*, uno de los sensores de la UPR (Chen et al., 2009). Al realizar la curva de longevidad con este método de RD, *gale-1(pv18)* incrementa la longevidad cuando es crecido en 5×10^9 en comparación con el silvestre (Figura 2.39. Anexo I. g-h), indicando que su longevidad no es por falta de nutrientes, al menos con la RD producida por esta metodología.

Comentario [MM52]:
Seguro?. Esto no estaba corregido antes?

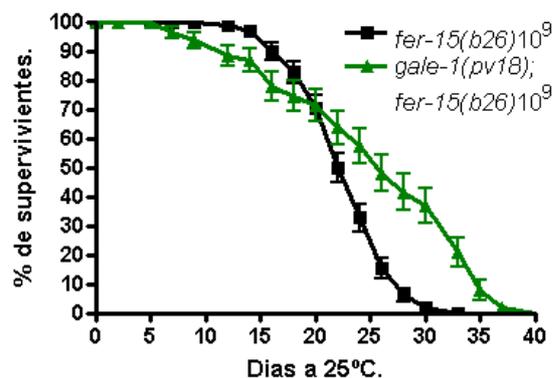


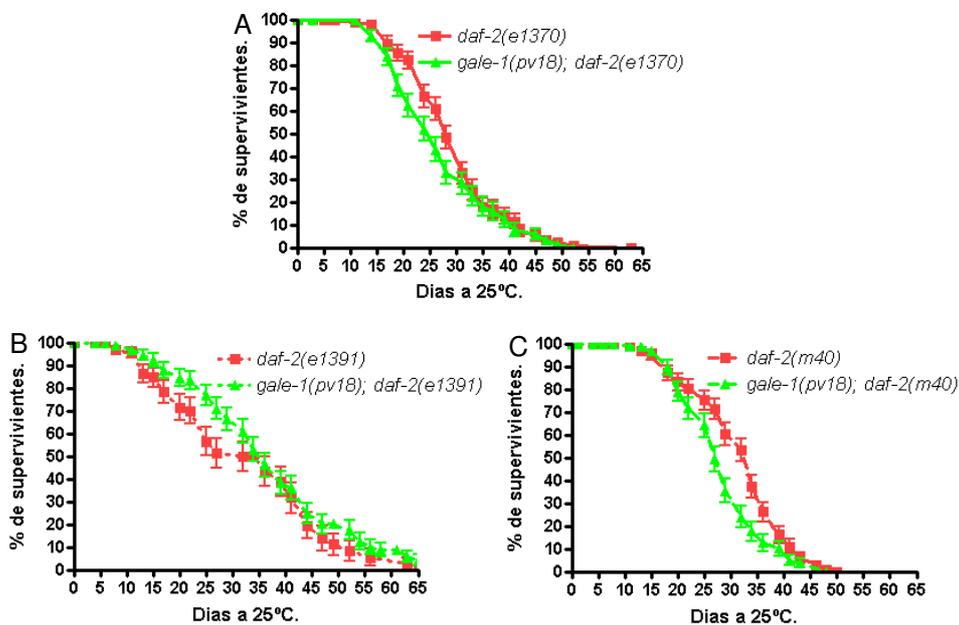
Figura 2.39. Curvas de longevidad de *gale-1(pv18)* en restricción dietaria. Puede observarse el incremento de longevidad de *gale-1(pv18); fer-15(b26)* en comparación con *fer-15(b26)* crecido en una dilución bacteriana de 10^9 . $P < 0.0001$. Barra de error SEM. Logrank test: las curvas son diferentes. N=100.

Comentario [MM53]: Debería mos poner una curva con mas baterias para que se vea en el fer-15 que estamos haciendo una restricción dietaria

2.3.6. FENOTIPO DE LONGEVIDAD Y LA RUTA DE LA INSULINA

La ruta de regulación de longevidad mejor conocida y mejor conservada en la evolución es sin duda la ruta de la insulina/IGF. Para estudiar la relación de *gale-1* con esta ruta generamos dobles mutantes con elementos claves de esta ruta (*daf-2* y *daf-16*). Observamos que el doble mutante *gale-1(pv18); daf-2(e1370)* no muestra un incremento de longevidad adicional (Figura 2.40.A.), lo cual sugiere que la longevidad de *gale-1(pv18)* se encuentra en la misma ruta genética. El mismo resultado se obtiene con otro alelo fuerte de *daf-2(e1391)* y con un alelo débil, *daf-2(m40)* (Figura 2.40-B-

Eliminado: mas



C).

Figura 2.40. Curvas de longevidad *gale-1(pv18)* con alelos de *daf-2*. A-B. No se observa incremento de longevidad de *gale-1(pv18)* con alelos fuertes de *daf-2*. A. *gale-1(pv18); daf-2(e1370)*. $P=0.1304$. B. *gale-1(pv18); daf-2(e1391)* $P=0.1358$ C. El alelo débil de *daf-2(m40)* vive mas que el doble *gale-1(pv18); daf-2(m40)* $P=0.0056$. Barra de error SEM. N=110

El factor de transcripción tipo FOXO, DAF-16, es requerido para el incremento de longevidad de todos los mutantes de la ruta de la insulina (Ogg et al., 1997; Wolkow et al., 2000) y también para el incremento de longevidad que se produce por la eliminación de la línea germinal, pero no es requerido en el incremento de longevidad por RD en

todos los métodos utilizados (excepto la RD por ayuno intermitente). Nosotros hemos observado que la reducción de actividad de *daf-16* suprime totalmente la longevidad de *gale-1(pv18)* (Figura 2.42. Anexo I. i), un dato mas que relaciona a *gale-1* con la ruta de la insulina.

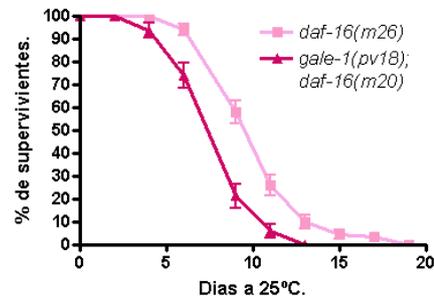


Figura 2.42. Curva de longevidad del doble mutante *gale-1(pv18); daf-16(m20)*. La longevidad de *gale-1(pv18)* es dependiente de *daf-16*. Barra de error SEM. Logrank test: las curvas son diferentes. $P < 0.0001$. $N = 100$.

La reducción de actividad de la ruta de la insulina genera la relocalización de *daf-16* en el núcleo (Berninsone et al., 2001). Utilizando la cepa TJ356 que lleva la proteína GFP fusionada a DAF-16 dirigida por 6kb de su promotor (Henderson and Johnson, 2001) hemos estudiado el efecto de *gale-1(pv18)* sobre *daf-16*. Como se observa en la Figura 2.43, no existe diferencia en la localización de la GFP en un fondo *gale-1(pv18)* con respecto a un fondo silvestre indicando que no es traslocado al núcleo de forma constitutiva como lo hacen la mayoría de los mutantes de la ruta de la insulina. Los resultados con *daf-16* demuestran que la longevidad de *gale-1(pv18)* es dependiente de *daf-16* pero estos datos sugieren que su relación con este gen es distinta a la que tienen los genes de la ruta de la insulina.

Sin embargo, aparentemente se observa un aumento en la intensidad en la cepa *gale-1(pv18); DAF-16::GFP* con respecto a *DAF-16::GFP* en un fondo silvestre.



Figura 2.43. Expresión de DAF-16::GFP en *gale-1(pv18)* a 20°C. *gale-1(pv18)* no trasloca a DAF-16::GFP al núcleo. A. En la cepa DAF-16::GFP la expresión está en la mayoría de células sin localización específica. En *gale-1(pv18); DAF-16::GFP* el patrón de expresión no se altera a nivel nuclear. En el control, *aap-1(m889); DAF-16::GFP*, mutante de la ruta de la insulina, la localización es nuclear. Las fotos fueron tomadas con objetivo 10X a igual rango de excitación de luz ultravioleta.

Si bien en el doble mutante *daf-2(e1370); gale-1(pv18)* no se hizo evidente un efecto aditivo de longevidad ni en condiciones de crecimiento ad libitum ni en RD (Anexo I.j.), el fenotipo de migración de gónadas anormal de *gale-1(pv18)* se ve potenciado en un fondo mutante *daf-2(e1370)*. La malformación de gónadas anteriores en el doble mutante *daf-2(e1370); gale-1(pv18)* alcanza un 63%, es decir el doble del presentado en el simple *gale-1(pv18)* (Figura 2.44.A), mientras las gónadas posteriores presentan una severidad mayor en la malformación con un aumento de los bucles que se forman (Figura 2.44.B). Este dato indica que de alguna manera *daf-2* y *gale-1* colaboran en el desarrollo de las gónadas.

Comentario [MM54]: Las figuras están al revés la A es la B y viceversa

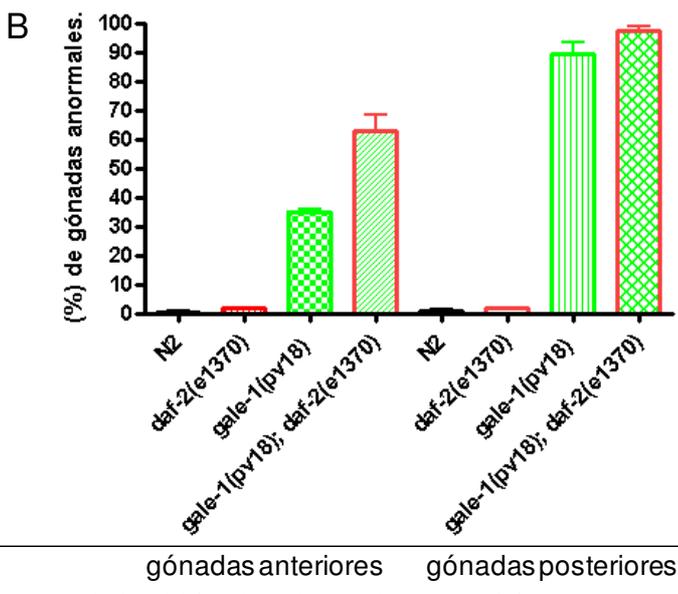


Figura 2.44. Potenciación del fenotipo mig en *gale-1(pv18); daf-2(e1370)*. A. Las gónadas posteriores de *gale-1(pv18); daf-2(e1370)* presentan varios cruces. Fotos con objetivo 40X con Nomanski. B. Porcentaje de fenotipo mig en el doble mutante *gale-1(pv18); daf-2(e1370)*. La malformación de las gónadas anteriores en *gale-1(pv18); daf-2(e1370)* alcanza a ser el doble de lo observado en *gale-1(pv18)*. L4 de N2, *gale-1(pv18)*, *daf-2(e1370)* y *gale-1(pv18); daf-2(e1370)* fueron observados al microscopio con Nomaski. *gale-1(pv18)* N=83. *gale-1(pv18); daf-2(e1370)* N= 73. *daf-2(e1370)* N=70. N2 N= 85. Barra de error SEM.

La posible relación entre *gale-1* y *daf-2* se abordó también determinando la expresión de *gale-1* en un fondo mutante *daf-2(e1370)*, para lo cual se construyó una cepa que expresaba GFP bajo el promotor de *gale-1* en un fondo *daf-2(e1370)* y se comparó con la expresión en un fondo silvestre. Como se observa en la Figura 2.45, la expresión en un fondo *daf-2* disminuye en intestino y gónadas comparado con *gale-1::GFP* en un fondo silvestre. El factor de transcripción *daf-16* es conocido por suprimir los fenotipos de longevidad, termotolerancia, formación de dauer y resistencia a patógenos en mutantes *daf-2* (Landis and Murphy, 2010). Para saber si también era capaz de suprimir la falta de expresión de *gale-1* en intestino y gónadas, el doble *daf-2(e1370); gale-1::GFP* fue crecido en RNAi de *daf-16* y en plásmido vacío con los respectivos controles de *gale-1::GFP* en RNAi de plásmido vacío y RNAi de *daf-16* (Figura 2.45.A). Las fotos muestran la recuperación de la expresión del intestino y las gónadas de *gale-1* en un fondo mutante *daf-2* cuando es crecido en RNAi de *daf-16*.

Con formato: Fuente: Cursiva

Eliminado: .

La cuantificación de los niveles de fluorescencia en el intestino producidos por la expresión de *gale-1* crecidos en pL4440 vacío y RNAi de *daf-16* no marcaron ninguna diferencia, mientras la expresión de *daf-2(e1370); gale-1::GFP* crecido en plásmido vacío disminuyó a un tercio. La expresión se recuperó cuando se trató con RNAi de *daf-16* (Figura 2.45.B) indicando que DAF-16 es el responsable de la reducción de la expresión de *gale-1* al menos en intestino y gónadas, sugiriendo que esta reducción es la razón por la que *daf-2* potencia el fenotipo de malformación de gónadas en *gale-1(pv18)*.

Con formato: Fuente: Cursiva

Eliminado: .

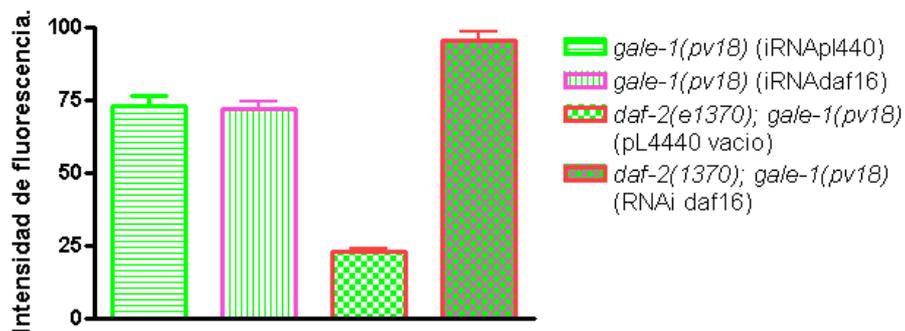
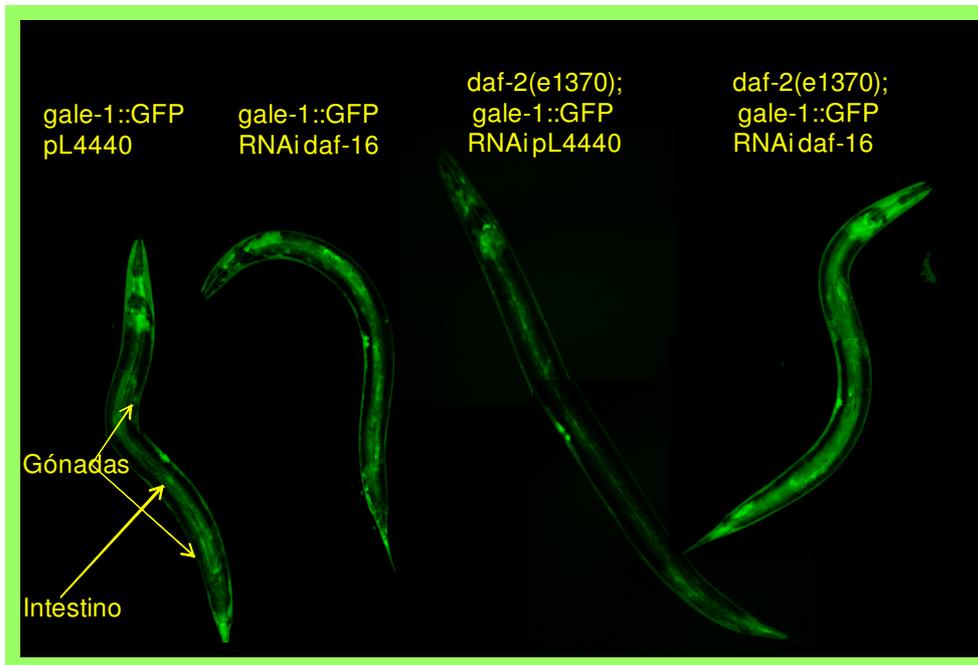


Figura 2.45. Expresión de *gale-1::GFP* con relación a *daf-2* y *daf-16*. A. La expresión de *gale-1* es igual en RNAi de *daf-16* y pL4440 vacío. En un fondo mutante *daf-2* los niveles de expresión a nivel de las gónadas e intestino disminuyen y se recupera si es crecido en RNAi de *daf-16*. Fotos de confocal con Ex laser line 488. Proyección de 30Z cada 1 μ . B. Cuantificación de la expresión. La intensidad de la fluorescencia esta alrededor del 75% para *gale-1(pv18)* en RNAi de *daf-16* y pL4440 vacío. En el doble *gale-1(pv18); daf-2(e1370)* es de un 20% y supera la intensidad de *gale-1* cuando es crecido en RNAi de *daf-16*. Barra de error SEM. N= 20.

4. DISCUSIÓN

El objetivo inicial de este trabajo ha sido caracterizar el gen *gale-1* y entender su relación con el proceso de longevidad a través de mutantes de pérdida o reducción de función. Sin embargo, el hecho de que mutantes de reducción de función del gen homólogo a *gale-1* en humanos genere galactosemia tipo III, una enfermedad poco estudiada, ha hecho que el objetivo se haya ampliado para entender esta enfermedad en un modelo biológico animal.

3.1. LA NATURALEZA DE LA MUTACIÓN DE *gale-1(py18)*.

gale-1 está muy conservado en al escala evolutiva, de hecho está presente en mamíferos, mosca, nematodos, plantas, levaduras y una gran variedad de bacterias, entre otras especies (Schulz et al., 2005; Schulz et al., 2004), conservando un alto grado de similitud (por ejemplo entre *gale-1* de C. elegans y *gale* humano hay un 73% de similitud) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

GALE es una epimerasa que junto con las dehidrogenasas, isomerasas, oxidoreductasas y liasas, pertenecen a la superfamilia de dehidrogenasa/reductasa de cadena corta (sdrs) caracterizadas por tener secuencias características como un motivo de sitio activo, YXXXX, y el motivo de unión al cofactor, TGXXGXXG. La YXXXX está ubicada en el sitio activo de la proteína y la Tyr 157 interactúa directamente con el grupo 4'-hidroxil del azúcar sustrato y sirve de base del sitio activo, tanto la secuencia YXXXX como la Tyr 157 se encuentran en la proteína GALE-1 de C. elegans.

La proteína GALE humana se pliega en dos dominios estructurales delimitados: El dominio N-terminal (Met-1 a Thr-189) responsable del posicionamiento del NAD⁺/NADH, y el C-terminal (Gly-190 a Ala-348) que está implicado en la unión de los UDP-azúcares. En la región N-terminal los aminoácidos responsables de anclar el NAD⁺ incluyen Asp 33, Asn 37, Asp 66, Try 157 y Lys 161, mientras los aminoácidos encargados de unir el grupo glucosyl del sustrato son Asn 187 y Asn 207. La unión del NADH y la UDP-glu produce un cambio conformacional limitado a regiones definidas como Glu 199 a Asp 240 y Gly 274 a Tyr 308 (Thoden et al., 2000), todos estos aminoácidos están conservados en *gale-1* de C. elegans. Por otra parte, las epimerasas, junto con

Con formato: Fuente: Cursiva

Con formato: Fuente: Cursiva

Eliminado: altamente

Eliminado: , levaduras, plantas, nematodos, mosca y mamíferos

Comentario [MM55]: Preguntale a Antonio Perez como se refiere ese dato. Yo creo que no se refiere así.

Comentario [MM56]: Mete este nombre en internete y mira si se dice así

Comentario [MM57]: Se puede introducir cofactor NADH??

Comentario [MM58]: Esta tirosina es la YXXXX???

Comentario [MM59]: Vemos como los reescribimos depuse del comentario 58

Comentario [MM60]: NO dices que es a partir del 190?

Comentario [MM61]: Al UDP-glu o a cualquier azúcar

Eliminado: las dehidrogenasas, isomerasas, oxidoreductasas y liasas, pertenecen a la superfamilia de cadenas cortas dehidrogenasa/reductasa (sdrs) caracterizadas por tener secuencias características como un motif de sitio activo, YXXXX, y el motif de unión al cofactor, TGXXGXXG. La YXXXX está ubicada en el sitio activo de la proteína y la Tyr 157 interactúa directamente con el grupo 4'-hidroxil del azúcar sustrato y sirve de base del sitio activo, tanto la secuencia YXXXX como la Tyr 157 se encuentran en la proteína GALE-1. ¶

3.2. MUTACIONES EN GALE-1 COMO MODELO DE GALACTOSEMIA TIPO III

En el hombre, mutaciones en el gen GALE produce la enfermedad conocida como galactosemia tipo III (OMIM 230350) (Fridovich-Keil, 2006; Timson, 2006), una enfermedad rara que se caracteriza por la imposibilidad de metabolizar galactosa. Los pacientes con esta deficiencia no terminan de metabolizar la galactosa al no ser capaces de transformar la UDP-gal a UDP-glu produciéndose la acumulación de UDP-gal y galactosa 1-P, un metabolito anterior en la ruta. A la acumulación de estos metabolitos se les atribuye parte de los signos clínicos como cataratas, sordera, retardo en el crecimiento y mental, entre otras. Sin embargo, al tener GALE dos papeles distintos en la epimerización de la UDP-gal a UDP-glu y de UDP-NAglu a UDP-NAgal, y ser estos azúcares necesarios para la glicosilación, se ha postulado que los síntomas de las personas con galactosemia tipo III también puedan ser debidos a defectos en glicosilación. De hecho, se ha descrito defectos en la glicosilación tipo O y N, en células mutantes para este gen. Para evitar en los enfermos una deficiencia en estos azúcares, se recomienda una ingesta controlada de galactosa y de NAgal ya que estos pacientes son dependientes, de estos azúcares para poder realizar el ensamblaje de complejos polisacáridos y otras macromoléculas glicosiladas, que son especialmente importantes en el cerebro.

Eliminado: el
Eliminado: smo de

Eliminado:

Eliminado: han sido descritos

Eliminado: cuando son crecidos sólo en glucosa, por lo cual es posible que los síntomas también puedan ser debidos a problemas de glicosilación, por esta razón

Eliminado:

Eliminado: tanto de la galactosa como de la NAgal exógena

Eliminado: para e

Comentario [MM62]: Faltan referencias de todas estas aseveraciones.

Eliminado:

Eliminado: El análisis

Eliminado: indica que este no

Eliminado: a

La falta de función de GALE ha sido hipotetizada como letal en humanos y en general en animales (Kalckar, 1965), y ha sido demostrada en *D melanogaster* (Sanders et al., 2010). De hecho, no se ha encontrado ningún alelo del gene GALE en estudios con numerosos pacientes con galactosemia tipo III que presente grandes deleciones (Daude et al., 1995). La revisión realizada por Timson DJ en 22 pacientes galactosemicos tipo III muestra 22 mutaciones puntuales que afectan la expresión y/o propiedades físicas de la proteína que pueden afectar de forma diferente a cualquiera de las 4 reacciones realizadas por GALE. Sin embargo, aunque estas mutaciones sean las responsables de la enfermedad por actividad defectuosa de la enzima, esta actividad es suficiente para la viabilidad.

Eliminado:

Comentario [MM63]: Esto necesita reescribir pero antes quiero saber si nunca se ha encontrado un alelo de falta total de función, porque eso es especialmente raro ya que los individuos son diploides.

En este trabajo hemos caracterizado dos alelos de gale-1, *pv18* y *tm3267*. El alelo *gale-1(tm3267)*, carece del tercer exón donde se encuentra el dominio activo de la

Comentario [MM64]: ¿Podría s indicar desde que aa hasta cual son los que faltan?

Eliminado: motif característico

superfamilia de las dehidrogenasa/reductasa de cadena corta (YXXXXK), conformado en humano, por Tyr-157-Gly-Lys-Ser-Lys-161 y en C. elegans por Tyr-158-Gly-Q-Ser-Lys-162, y los residuos Serina 132 y la Asn 187 que junto con la Tyr 157 y otros aminoácidos resultan claves en el posicionamiento del azúcar en el interior del sitio activo (Thoden et al., 2001), lo que puede suponer que esta región es crítica para un mínimo de funcionalidad enzimática, lo que hace que la consideremos un alelo nulo. Como ha sido hipotetizado en humanos y en otros animales, la falta de actividad de este gen impide la progresión del desarrollo y es letal. Este hecho hace que este alelo sea distinto a los alelos encontrados en humanos y que además dificulte el estudio de la función de este gen.

Eliminado: cadena corta

Eliminado: el

Eliminado: galeh

Eliminado: gale-1

Comentario [MM65]: Estás utilizando dos nomenclaturas distintas para los aminoácidos

gale-1(pv18) está mutado en la Prolina localizada en la posición 312, la cual está conservada en una gran variedad de especies, entre los que se encuentran *S. cerevisiae*, *G. gallus*, *M. musculus* y *H. sapiens*. Esta prolina se encuentra en el dominio de unión a los azúcares cerca de una cisteína localizada en la posición 307, la cual ha sido identificada como el residuo de unión al grupo Nacetil de los azúcares que metaboliza.

El hecho de que este mutante sea viable a 16 y 20°C, junto con su carácter recesivo sugiere fuertemente que *gale-1(pv18)* es un alelo hipomórfico de *gale-1* y no una falta total de función, siendo actualmente el único alelo de este tipo descrito en un animal modelo. Esta condición lo convierte en un modelo apropiado para el estudio de la función de GALE-1 y para comprender mejor la galactosemia tipo III.

Con la posibilidad de realizar estudios fisiológicos y genéticos en *C. elegans* con una mutación similar a la encontrada en los pacientes galactosemicos tipo III, iniciamos la caracterización del mutante *gale-1(pv18)*. El perfil de UDP-azúcares muestra un desbalance en UDP-gal y UDP-NAgal, en contraste con valores inalterados de UDP-glu y UDP-NAglu. Estos últimos azúcares se sintetizan por otras rutas metabólicas como la glicolisis y la ruta de las hexosaminas respectivamente (Figura 1.3) (Johnston et al., 2006; Schulz et al., 2005), en tanto, la fuerte reducción de los niveles de UDP-NAgal puede explicarse porque GALE es la única enzima conocida implicada en la biosíntesis de UDP-NAgal. De forma similar a este mutante, el incremento de UDP-gal se ha reportado en pacientes galactosemicos tipo III, en los cuales la ruta de Leloir funciona hasta la producción de UDP-gal pero al tener GALE una baja actividad no es convertirlo

Eliminado: u

en UDP-glu con eficiencia. Es muy posible que la explicación del incremento de este azúcar en el mutante *gale-1(pv18)* sea debido a la imposibilidad de metabolizar la galactosa presente en la bacteria. Este resultado, sugieren que *gale-1(pv18)* es un alelo similar a los descritos en pacientes con galactosemia tipo III (Timson, 2006), y confirma el papel de GALE en mantener el equilibrio de los 4 UDP-azúcares, todos importantes donadores de azúcares en los procesos de glicosilación.

Eliminado: junto con el carácter recesivo de la mutación fuertemente

Eliminado: de reducción de función viable

Eliminado: alelos

Eliminado: por otra parte

3.3. GALE -1 ES SENSIBLE A GALACTOSA.

La ingesta normal de galactosa en los enfermos que sufren galactosemia tipo III provoca daños graves en hígado, riñón, ojos y cerebro que se ha postulado son debidos a la acumulación de metabolitos tóxicos derivados de la galactosa. Los estudios de esta enfermedad en células de ovario de hamster chino (*Id1D*), *S. cerevisiae* y *D. melanogaster* también reportan problemas de crecimiento al suministro de D-galactosa (Krieger et al., 1989; Ross et al., 2004; Sanders et al., 2010; Walter et al., 1999). Al igual que en el resto de los organismos descritos, en *C. elegans gale-1(pv18)* es hipersensible a una dieta rica en galactosa. Sorprendentemente, la sensibilidad a galactosa de *gale-1(pv18)* no es sólo en un retraso para alcanzar el estadio adulto en comparación al silvestre, sino que un porcentaje de gusanos detienen su crecimiento en el estadio L1/L2.

Es interesante que este fenotipo de parada de desarrollo se repite en animales con problemas de estrés de retículo, por ejemplo, animales silvestres crecidos en presencia de tunicamicina, inhibidor de la glicosilación que bloquea la adición de las cadenas N-glicanos, exacerbando los problemas del plegamiento de las proteínas, también detienen su desarrollo en L1/L2 (Kaufman et al., 2002). De forma similar, dobles mutantes *ire-1*; *pek-1*, o *atf-6*; *xbp-1* los cuales son deficientes en la UPR presentan también una parada del desarrollo en este estadio (Shen et al., 2001), igual fenotipo es observado en *gale-1(pv18)* cuando es tratado con RNAi de *xbp-1*, en un porcentaje de animales en *gale-1(pv18)* a 25°C y en todos los individuos que portan la delección de este gen, condiciones en las que está estresado el retículo por la alteración de los niveles de UDP-azúcares.

Eliminado:

Con formato: Fuente: Sin Cursiva

Con formato: Fuente: Sin Cursiva

Eliminado: . Además, en *D. melanogaster*, la delección de GALE produce fallos en los embriones para eclosionar a L1 y aquellos que lo hacen son mas pequeños y letárgicos y no sobreviven al estadio L2 (Sanders et al., 2010). Fenotipo de parada en el desarrollo en L1/L2 se observa en animales llevando la delección *gale-1(tm3267)* en homocigosis en el cual se asume una alteración grave en los niveles de UDP-azúcares al igual que en *gale-1(pv18)* a 25°C.

Esta parada en L1/L2 en las distintas condiciones en el que se estresa el retículo puede deberse a que existe una mayor necesidad de proteínas N-glicosiladas en esos estadios,

de hecho, los niveles de N-glicanos han sido reportados que se encuentran en mayor cantidad en los estadios L1 y L2 (Cipollo et al., 2005), donde el intestino de *C. elegans* induce la síntesis de altos niveles de proteínas de secreción, incluyendo enzimas digestivas y hormonas de muda de la hipodermis, lo cual podría hacer este estadio más sensible a problemas en el retículo endoplásmico generar una saturación en este órgano por exceso de secreción.

Eliminado: por

Eliminado: estar

Eliminado:

Eliminado:

El hecho de que el tratamiento con D-galactosa en *gale-1(pv18)* genere una parada en L1 similar a otros problemas de estrés de retículo, sugiere que este fenotipo generado por la ingesta de D-galactosa es debido a problemas de estrés en este orgánulo mas que un problema de toxicidad general, quizás debido a una gran descompensación de los niveles de azúcares en estas condiciones. En humano, la mayoría de los defectos congénitos de la N-glicosilación de proteínas presentan daños en muchos órganos como ojo, músculo, riñón etc. pero el mayor compromiso está en el hígado y sistema nervioso (principalmente cerebro), quizás en estos órganos no solo se produzca acumulación de tóxicos sino estrés y saturación en el retículo.

3.4. GALE-1 Y RESISTENCIA A PATOGENOS.

C. elegans actualmente se está empleando como modelo de interacción huesped patógeno, utilizando para ello patógenos humanos. La glicosilación es importante para el reconocimiento huésped patógeno así como para la propia respuesta inmune (Varki, 1993), de acuerdo con esto, numerosos mutantes de *C. elegans* afectados en glicosilación son resistentes a infecciones de patógenos humanos supuestamente debido a problemas de reconocimiento de la superficie celular por los patógenos, son los casos de la familia de genes *bre* (síntesis de glicosfingolípidos), los *srf* (determinan las propiedades de la superficie de *C. elegans*), *bus* (glicosiltransferasas y transporte de UDP-azúcares) y *glf-1*(UDP-galactopirone mutasa) que han presentado resistencia a diferentes patógenos como *M. nematophilum*, *Yersinia spp* y *B. thuringiensis*. La expresión de estos genes en las seam-cell e intestino evidencian el papel fundamental de la secreción y glicosilación de la superficie y permiten explicar el por qué las bacterias no pueden adherirse e infectar. Curiosamente, al contrario de lo esperado, *gale-1(pv18)* resulto ser hipersensible a patógenos humanos como *S. aureus*, *E. faecalis* y *P. aeruginosa*, lo que sugiere que es necesario para la respuesta inmune. Esta característica

es la primera vez que se describe para un mutante afectado en glicosilación y sería interesante saber si está conservada en humanos para enfermos que sufren galactosemia tipo III ya que este hecho podría tener una alta implicación clínica en el manejo preventivo para una mejor calidad de vida.

3.5. GALE-1 Y PROBLEMAS DE MORFOGENESIS.

En la caracterización del mutante *gale-1(pv18)* encontramos una gran variedad de fenotipos: la termotolerancia a 30°C, la letalidad embrionaria a 25°C, el incremento de longevidad, reducción de la puesta de huevos y progenie tardía, retraso en el crecimiento, vulva protuberante y malformación de gónadas a cualquier temperatura y condición de crecimiento. En estudios previos, algunos de estos fenotipos han sido fuertemente relacionados con problemas de glicosilación. Los fenotipos asociados a problemas en glicosilación pueden ser muy diversos porque el número de proteínas que necesitan de este proceso para su correcta función es muy elevado (aproximadamente un tercio del proteoma) y estas pueden ejercer funciones en diferentes procesos biológicos.

Eliminado: la

Eliminado: en el estadio L4 a 25 y 20°C

Eliminado: a 20°C

3.5.1. *gale-1* y morfogénesis de vulva y letalidad embrionaria

La familia *sqv*, *sqv-1-8*, es uno de los dos set de genes involucrados en glicosilación mejor definidos por su importante papel en el desarrollo de *C. elegans*, los 8 genes codifican para un transportador de ácido urónico, un transportador de UDP-azúcares y 6 enzimas en una ruta lineal para la biosíntesis del GAG Condroitin y en todos los casos sus mutaciones presentan fenotipo de vulva de reducido tamaño en estadios de desarrollo L4 que posteriormente adquieren un fenotipo protuberante. Además del fenotipo de vulva protuberante, los mutantes *sqv* presentan fenotipo de letalidad embrionaria. Estos fenotipos se han explicado por la capacidad del condroitin extracelular de interaccionar con el agua para generar una presión osmótica que estaría implicada en la expansión de los espacios extracelulares en el embrión y en la vulva de *C. elegans* (Hwang et al., 2003), por lo tanto la deficiencia de éste causaría un menor tamaño de la vulva y la propulsión de ésta durante la puesta de huevos. La estructura del GAG Condroitin está conformada por ácido glucoronico intercalado con el NAgal, el UDP-azúcar marcadamente disminuido en el perfil de UDP-azúcar de *gale-1(pv18)*, un dato que correlaciona al UDP-NAgal con la síntesis del Condroitin y por consiguiente

Eliminado: La glicosilación de proteínas es completamente diversa porque cada proteína puede ser glicosilada en diferentes sitios y cada estructura oligosacarida destinada a la modificación puede variar entre diferentes proteínas y sufrir modificaciones posteriores una vez unidas a cada sitio de la proteína. Estas proteínas glicosiladas juegan roles en el plegamiento de proteínas, localización subcelular, actividad e interacciones proteína-proteína, entre otras (Kaji et al., 2007).

Con formato: Fuente: Cursiva

Eliminado: o

con el fenotipo de vulva protuberante descrito en *gale-1(pv18)*, así mismo *sqv-7* que participa en el transporte de este azúcar al Golgi, donde se termina de sintetizar el condroitin, presenta este mismo fenotipo, lo que sugiere que es la falta de este azúcar en *gale-1(pv18)* lo que genera este fenotipo.

Con relación al fenotipo de letalidad embrionaria, tanto el GAG heparan sulfato como el GAG condroitin han sido reportado como indispensable para el desarrollo del embrión en *C. elegans* (Kitagawa et al., 2007; Morio et al., 2003). Aunque el fenotipo que hemos observado en el mutante *gale-1(pv18)* a 25°C con la formación de vacuolas y el desprendimiento de células en embriones, podría ser consecuencia de problemas generales en la glicosilación relacionados con una incorrecta adhesión celular.

Eliminado: E

Comentario [MM66]: Hablar de similitudes o diferencias de *gale-1* con este tipo de letalidad

3.5.2. *gale-1* y morfogénesis de gónadas.

Uno de los fenotipos que presenta el mutante *gale-1(pv18)* es la distribución anormal de los brazos que conforman la gónada de las hermafroditas (Figura 2.23.B.). Este fenotipo se ha descrito en otros mutantes relacionados con N-glicosilación como *mig-23*, *cogc-1* y *cogc-3*.

Eliminado: y

Eliminado: y

Se ha predicho que más de la mitad de todas las proteínas eucarióticas son glicoproteínas, y de éstas, cerca del 90% llevan glicanos tipo N (Apweiler et al., 1999; Helenius and Aebi, 2004). Una de estas proteínas es MIG-17, una metaloproteasa que se sintetiza en el músculo y migra hasta localizarse en la membrana basal de las gónadas donde ejerce su función reestructurando la matriz extracelular para que la migración se produzca correctamente. La falta de actividad de este gen produce un problema en la migración de las gónadas similar al descrito por *gale-1 (pv18)* y *sqv-7(n2839)*. La glicosilación de MIG-17 es esencial para su localización en la membrana basal de las gónadas y para que ejerza su función. De hecho, el fenotipo observado en la falta de función de *mig-17* se imita cuando se mutan cinco de los 6 sitios de N-glicosilación ubicados en el predominio (Ihara and Nishiwaki, 2007), de igual forma, otros mutantes afectados en glicosilación como *mig-23* y *cog-1* y *cog-3* también presentan un fenotipo similar. En todos estos casos además MIG-17 no se localiza en la membrana basal de la gónada (Kubota et al., 2006; Nishiwaki et al., 2004).

Eliminado: a

Eliminado: relacionados con

Los datos que aportamos en este trabajo indican que *gale-1(pv18)* tiene alterados los niveles de UDP-azúcares necesarios para la glicosilación y en el caso de *sqv-7* posiblemente en el Golgi, orgánulo esencial en el proceso de glicosilación, en ambos casos *mig-17* no se localiza en la membrana basal de las gónadas, y ambos mutantes tienen fenotipos similares a la falta de función de *mig-17* lo que sugiere que la correcta función de *gale-1* y *sqv-7* son esenciales para la correcta glicosilación de MIG-17 y quizás por eso, estos mutantes tengan una migración anormal de las gónadas. Alternativamente, podría participar en la glicosilación del corex de la membrana basal de las gónadas participando en el correcto anclaje de MIG-17 en esta.

Comentario [MM67]: Pregunt a: se expresa *sqv-7* en el músculo??

Eliminado: tanto

Eliminado: como

Eliminado: participan en

Ambos mutantes están afectados en los niveles de UDP-azúcares, *gale-1* presenta un incremento de UDP-gal y reducción de UDP-NAgal y *sqv-7* presumiblemente una reducción en el Golgi de ácido glucurónico, UDP-gal y UDP-NAgal al codificar para un transportador de estos azúcares al Golgi (Berninsone et al., 2001). La reducción en el Golgi de este último azúcar debe ser común tanto en *gale-1* como en *sqv-7*, además esta molécula es una de las últimas que se polimeriza en las ramas de glicanos en la N-Glicosilación y esto tiene lugar en el Golgi. Todo esto nos hace pensar que la UDP-NAgal es una molécula importante en los fenotipos de migración de gónadas como posiblemente en los fenotipos *sqv*.

Por último, la posible participación de GALE-1 en la glicosilación de una determinada proteína, induce a pensar que puede tener una acción directa sobre otras proteínas que necesitan ser glicosiladas para ejercer su correcta función o para el correcto plegamiento, lo cual puede afectar a múltiples aspectos de la fisiología de *C. elegans*. En humanos, se conoce que defectos en el ensamblaje y procesamiento de glicoconjugados son responsables de numerosas enfermedades (Kaji et al., 2007). Así mismo, estos defectos en los procesos de glicosilación son posiblemente parte de los problemas descritos en la galactosemia tipo III y que este organismo modelo puede ayudar a entender.

Estudios genéticos y bioquímicos en *C. elegans* muestran un alto grado de conservación tanto en biosíntesis como en la estructura de los glicosaminoglicanos (GAG), al punto que Berninsone et al. en el 2006 propone a *C. elegans* como un modelo para el estudio de los roles de los proteoglicanos. La ruta de biosíntesis de los N-glicanos está también

conservada, aunque las estructuras son cualitativa y cuantitativamente diferentes a la encontrada en mamíferos, lo que permite que este organismo se utilice como modelo de estudio de glicosilación (Paschinger et al., 2007) y de enfermedades relacionadas con este proceso. Por otra parte, C. elegans también se ha propuesto como modelo de muchas enfermedades degenerativas, del sistema nervioso y de rutas metabólicas y el hecho de tener un 78% de genes homólogos con respecto a los 90 genes identificados en humanos con OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man), entre las que se encuentran las galactosemias, permite proponerlo proponen también como un excelente modelo de estudio de estas enfermedades (Kuwabara and O'Neil, 2001).

Comentario [MM68]: Eliminación??

3.6. LONGEVIDAD Y TERMOTOLERANCIA

Comentario [MM69]: Decir algo de termotolerancia

A pesar de que *gale-1(pv18)* presenta numerosos problemas de desarrollo y crecimiento es de destacar que su longevidad es superior a la del silvestre.

Conociendo que este mutante está presumiblemente afectado en el proceso de glicosilación y que mutantes afectados en este proceso son resistentes a patógenos, una de las posibilidades que podrían explicar el incremento de longevidad en cultivo con *E. coli* era que simplemente el incremento de longevidad fuera consecuencia de una resistencia a la infección de esta bacteria (descrita que produce infección en *C. elegans*); Sin embargo, los datos mostrados nos indican que *gale-1(pv18)* era hipersensible a patógenos humanos (resultado discutido con anterioridad) y además se observaba que era longevo cuando se utilizaba como alimento la bacteria inocua *Bacillus subtilis*, en este último caso, el incremento de longevidad es incluso mayor que cuando se usa *E. coli*, posiblemente debido al hecho de que ésta infecta a los nematodos, además *gale-1(pv18)* sigue siendo longevo en experimentos realizados con la cepa de *E. coli* OP50 en presencia de antibióticos (Figura 2.39. Anexo I. g-h.). Todos estos datos nos indican que el incremento de longevidad no se debe a una supervivencia a la infección sino que se debe a otros factores intrínsecos.

Comentario [MM70]: REF

Una explicación sencilla del incremento de longevidad que sufre *gale-1(pv18)* puede ser que alguna o varias proteínas que regulen negativamente el proceso de longevidad necesiten estar glicosilada para su correcto funcionamiento. De alguna manera, similar a

lo que ocurre con la malformación de gónadas y la glicoproteína MIG-17. Aun siendo esta una explicación factible existen una serie de evidencias que están en contra de esta posibilidad. Mutantes que generan problemas de glicosilación como mig-23, cogc, sqv-7, CO3H5.2, o el propio gale-1, todos presentan fenotipos similares a la falta de la proteína mig-17 ya que se supone que ésta se encuentra inactiva o con función reducida. Sin embargo, para el fenotipo del incremento de longevidad mutaciones en esos mismos elementos no generan un incremento de longevidad sino todo lo contrario (Figura 2.28. y 2.29.). Es especialmente interesante la mutación en el transportador al Golgi de UDP-azúcares sqv-7 que imita los problemas de desarrollo en gónadas y vulva, pero no produce un incremento de longevidad. Estos datos nos sugieren que el incremento de longevidad no se produce por una reducción del proceso de N-glicosilación y que puede deberse a otro motivo.

Eliminado: mig

Comentario [MM71]: Son dos COGC con números

GAG y O-glicosilación. Qué pasa con la glicosilación de lípidos.

gale-1(pv18) participa en la síntesis de UDP-azúcares y la disponibilidad de azúcar ha sido implicada en la regulación de la longevidad (Hunt-Newbury et al., 2007; Ingram et al., 2006). Una posibilidad sería que la reducción de la actividad de gale-1 reduzca la disponibilidad de UDP-glucosa en el organismo, necesaria para la síntesis de glucógeno y por lo tanto se sufra de una restricción de energía en este mutante. Esta podría ser un explicación atractiva, sin embargo el hecho de que gale-1 no tenga alterado los niveles de este azúcar con respecto al silvestre y que el mutante *gna-2(qa705)* de la ruta de las hexosaminas, el cual presenta niveles no detectables de UDP-NA-glu (Johnston et al., 2006), no sea longevo sino todo lo contrario (Figura 2.30) hace que sea poco probable esta hipótesis aunque no se puede descartar que exista algún mecanismo que regule los niveles de UDP-glu para mantenerlo al mismo nivel en el mutante gale-1 a costa de una restricción de este azúcar como fuente de energía.

Eliminado:

Eliminado: y en esas condiciones

Estudios previos a esta tesis muestran en *C. elegans*, una intrigante implicación de *gale-1* con el estrés de retículo endoplásmico. Cuando falta calnexin y calreticulin, dos chaperonas del retículo endoplasmático encargadas específicamente del control de las glicoproteínas, se produce una sobreexpresión de *gale-1* junto con otras proteínas del retículo endoplasmático (Lee et al., 2006) de forma similar también se observa una sobreexpresión cuando se somete a *C. elegans* a un inhibidor de glicosilación (tunicamicina) (Shen et al., 2005), que activa la respuesta de estrés del retículo

Con formato: Fuente: Sin Cursiva

Con formato: Fuente: Cursiva

Eliminado: que en *C. elegans*,

Eliminado: c

Eliminado: moleculares

Con formato: Fuente: Cursiva

Eliminado: y que gale-1

endoplasmático. Debido a estas implicaciones de *gale-1* con el estrés de retículo endoplasmático hemos estudiado la relación del mutante *gale-1(pv18)* con la UPR.

Eliminado: , la Unfolded Protein Response

En estos estudios hemos observado que la mutación en *gale-1* genera la sobreexpresión de la chaperona *hsp-4*, sugiriendo que en este mutante el ER se encuentra permanentemente estresado. Esta inducción además es dependiente de *xbp-1* y de su activador *ire-1*. *xbp-1*, es un factor de transcripción, el cual se encarga de activar una serie de genes para restaurar el equilibrio del retículo endoplasmático. Este efecto también lo hemos observado cuando se elimina *atf-6*. Curiosamente, tanto en *gale-1(pv18)* como en la falta de *atf-6* es necesario la actividad de *xbp-1*, no solo para la expresión de *hsp-4* sino también para el progreso en el desarrollo, ya que la falta de cualquiera de ellos en ausencia de *xbp-1* provoca una parada de desarrollo en el estadio L1/L2 (Shen et al., 2001). Esta similitud sugiere una implicación de *gale-1* en la regulación de la UPR, sugiriendo que quizás sea necesario para la actividad de *atf-6*.

Con formato: Fuente: Cursiva

Estos efectos aquí descritos no se observan en el mutante en el transportador de UDP-azúcares al retículo *sgv-7* (*sgv-7* no es letal en ausencia de *xbp-1*, ni genera una sobreexpresión de *hsp-4*) lo que sugiere que no es directamente un problema de glicosilación.

Con formato: Fuente: Cursiva

Con formato: Fuente: Cursiva

La relación de la longevidad con la UPR es bastante intrigante, la activación de *xbp-1* no es el único requisito para producir un incremento de longevidad ya que este no se produce en los mutantes *dnj-7(ok1495)* ni en *hdr1-1(tm1743)* (Figura 2.35. C-D), ni con el tratamiento de tunicamicina (Anexo I. k) que en todos los casos genera un incremento de la expresión de *hsp-4*. Sin embargo, se sabe que *xbp-1* es necesario para el incremento de longevidad de *daf-2* (Henis-Korenblit et al., 2010). En condiciones donde *gale-1(pv18)* no tiene un incremento de longevidad, hemos observado que *xbp-1* también es necesario para la longevidad que tiene este mutante.

Eliminado:

Por otro lado, la falta de actividad de *atf-6* tiene muchas similitudes con *gale-1(pv18)*, la ausencia de cualquiera de ellos produce estrés en el retículo, es letal en ausencia de *xbp-1*, y ambos tienen un incremento de longevidad; sin embargo, el incremento de longevidad que hemos observado en la cepa tratada con RNAi de *atf-6* no es siempre reproducible. Este resultado también lo han observado en (Henis-Korenblit et al., 2010), lo que nos sugiere que quizás exista algún elemento adicional para que se produzca el

Con formato: Fuente: Cursiva

Eliminado: eventualmente

Eliminado:

incremento de longevidad en este fondo genético o que el daño que presumiblemente se produce por la ausencia de *atf-6* (este daño debe existir ya que se sobreexpresa *hsp-4*) no es siempre compensado por los mecanismo de incremento de longevidad que se podrían activar en este fondo mutante. La relación entre ATF-6 y *gale-1* es difícil de entender, la similitud en determinados fenotipos indican que están en la misma ruta genética, y como la falta de *atf-6* imita solo a un subconjunto de fenotipos de la reducción de la actividad de *gale-1*, en principio sugiere que la actividad de *gale-1* es necesaria para la función de *atf-6*. *atf-6* es una glicoproteína

Eliminado: suficientemente

Eliminado: reparado

Algunos de los genes de la UPR se encuentran positivamente regulados por la ruta de la insulina, en particular *xbp-1* (Henis-Korenblit et al., 2010). Es de destacar que *gale-1* también se encuentra regulado positivamente por esta ruta, observándose que cuando se reduce la actividad de *daf-2* se produce una reducción de la expresión de *gale-1* que tiene como consecuencia una potenciación de los fenotipos de malformación de gónadas. Como es de esperar, esta reducción de la expresión se suprime con la falta de función de *daf-16*.

Con formato: Fuente: Cursiva

Con formato: Fuente: Cursiva

Eliminado: E

Esta regulación es bidireccional, en el mutante *gale-1* se observa un moderado, pero reproducible incremento de expresión de *daf-16*, el cual permite explicar el incremento de longevidad que se observa en este mutante ya que su longevidad es completamente dependiente de este gen. Es muy interesante que en el primer intrón de *daf-16* se encuentran 5 sitios de reconocimiento ATF y 1 sitio de unión a *xbp-1* lo que podría ayudar a entender los mecanismos moleculares de este proceso de regulación (Figura 3.1.).

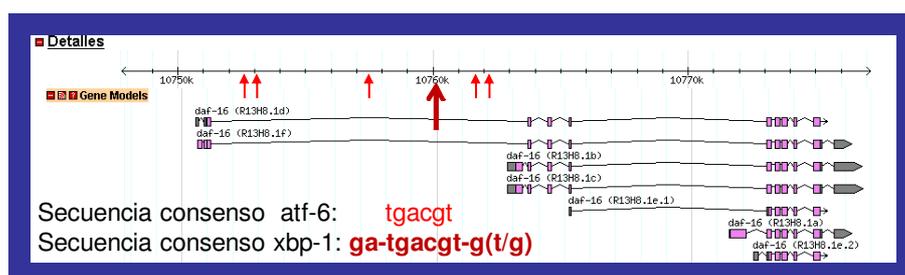


Figura 3.1. Potenciales elementos regulatorios de la UPR están localizados en el primer intrón de *daf-16*.

Un posible modelo que explica la regulación de la longevidad por la actividad de gale-1 se representa en la Figura 3.2. dónde la actividad de gale-1, manteniendo los niveles adecuados de azúcares, permite que no sea necesario y por lo tanto no se exprese xbp-1 ni daf-16, en caso de que estos niveles se alteren producirían un incremento de expresión de estos genes promoviendo reparación y longevidad. La reducción de actividad de daf-2 no tiene por qué tener un efecto aditivo a gale-1 ya que ambos regulan al factor de transcripción daf-16, y cuando éste está activo se produce una reducción de expresión de gale-1.

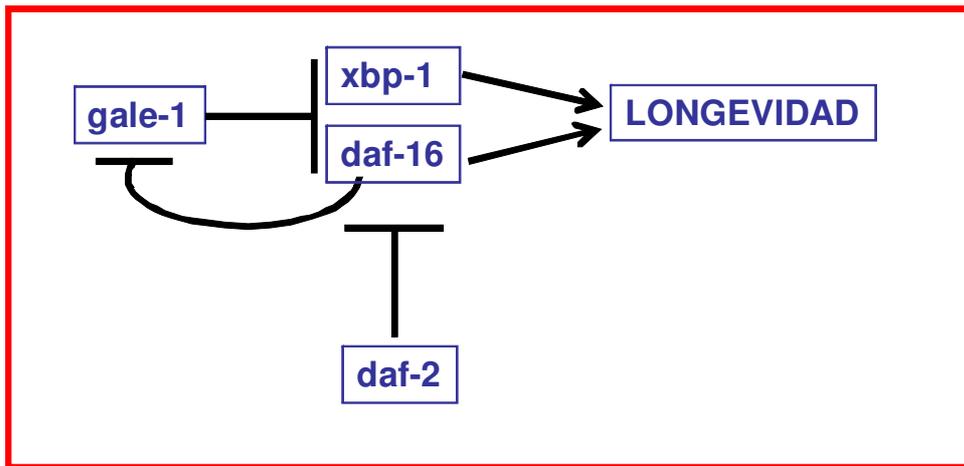


Figura 3.2. Esquema de posible modelo de acción de gale-1.

Los genes que se activan por la UPR, fueron descritos originalmente porque se activan por falta de glucosa, así hsp-4 se conoce en mamíferos como GPR78 (Glucose protein response), es sugerente pensar que el retículo endoplasmático, donde se sintetiza aproximadamente un 50% del proteoma, se debe acoplar perfectamente a las condiciones nutricionales. Es muy atractiva la idea que quizás en determinadas condiciones nutricionales pudieran darse una alteración en los niveles de UDP-azúcares similar a la que se da en gale-1, haciendo que estos azúcares regulen longevidad no tanto por una reducción en la dieta calórica sino por su efecto sobre el retículo endoplasmático y la síntesis de proteínas.

Uno de los objetivos de este trabajo, una vez identificado el gen afectado en el mutante *gale-1(pv18)* como el homólogo al gen que en humanos produce la galactosemia tipo III, ha sido estudiar fenotípicamente esta mutación como modelo de este tipo de

enfermedad. En resumen, podemos decir que la falta total de función es letal como se ha propuesto en humanos y que una reducción de función debido a la mutación pv18 que es mas similar a los alelos encontrados en humanos, es viable pero presenta numerosos problemas, sensibilidad a galactosa y problemas de desarrollo, atribuibles a fallos en glicosilación, los cuales concuerdan con fenotipos descritos en humanos. Además, en este mutante observamos un hipersensibilidad a infecciones, estrés crónico en retículo con interacciones con el ruta de la unfolded protein response y con la ruta de la insulina/IGF. Esta última observación si se conserva en humanos puede tener implicaciones biomédicas interesantes, ya que la diabetes tipo II es una enfermedad con una prevalencia muy importante (más de 220 millones de personas en el mundo) y tiene una relación directa con los hábitos alimenticios por lo que implicaría la recomendación de la regulación de la ingesta calórica a las personas que presenten galactosemia tipo III.

5. CONCLUSIONES

Las principales conclusiones obtenidas en esta tesis son expuestas a continuación:

1. El alelo *gale-1(pv18)*, aislado como **mutante** termotolerante y longevo, posee una mutación que produce un cambio de prolina por leucina en la posición 312 de la proteína galactosa-4-epimerasa.
2. **El posible alelo nulo *gale-1(tm3267)* de *C. elegans* es letal.**
3. **El alelo hipomórfico *gale-1(pv18)* es sensible a D-galactosa similar a la reducción de actividad de este gen en *S. cerevisiae*, *D. melanogaster* y pacientes galactosemicos tipo III.**
4. La pérdida parcial de función de *gale-1(pv18)* altera los niveles de UDP-azúcares con un incremento de la UDP-galactosa y un descenso de UDP-Nacetil galactosamina.
5. *gale-1(pv18)* es hipersensible a *Stafilococcus aureus* y *Streptococcus neumoniae*, bacterias patógenas para el hombre.
6. **La similitud que presenta el alelo hipomorfo *gale-1(pv18)* con las mutaciones puntuales de *gale* en humanos permite proponer a este alelo como un modelo para el estudio de galactosemia tipo III.**
7. ***gale-1* se expresa en ↓**
8. **En un fondo mutante *gale-1(pv18)* se produce una reducción en la localización de la metaloproteasa *MIG-17* en la membrana basal de las gónadas.**
9. La mutación en *sqv-7*, transportador de UDP-galactosa, UDP-Nacetil galactosamina y UDP-ácido glucurónico, presenta fenotipo de malformación de gónada y **reducción en la localización de *MIG-17* en la membrana de las gónadas**, similar a *gale-1(pv18)*.
10. **La penetrancia de los fenotipos de *gale-1(pv18)* están influenciado por la dieta.**

- Eliminado:** , cerca del sitio de unión del grupo N acetil.
- Eliminado:** La delección de *gale-1*,
- Eliminado:** ,
- Eliminado:** en
- Eliminado:** ,
- Eliminado:** igual a *D. melanogaster*, y
- Con formato:** Numeración y viñetas
- Con formato:** Fuente: Sin Cursiva
- Con formato:** Numeración y viñetas
- Con formato:** Numeración y viñetas
- Con formato:** Numeración y viñetas
- Eliminado:** M
- Eliminado:** produce una enfermedad rara conocida como galactosemia tipo III (OMIM 230350) caracterizada por la imposibilidad de metabolizar galactosa. *gale-1(pv18)* puede servir
- Comentario [MM72]:** DUDA GORDA
- Comentario [MM73]:** tejido
- Eliminado:** La expresión de
- Eliminado:** (*pv18*)
- Eliminado:** es tejido específica con los fenotipos de desarrollo de la vulva y gónadas y letalidad embrionaria a 25°C.
- Con formato:** Numeración y viñetas
- Con formato:** Numeración y viñetas
- Eliminado:** 1 fenotipo de malformación de gónadas del mutante
- Eliminado:** está relacionados con problemas en la N-glicosilación de
- Eliminado:** mig
- Con formato:** Numeración y viñetas
- Eliminado:** fallos
- Eliminado:** la N-glicosilación
- Eliminado:** mig
- Con formato:** Numeración y viñetas

11. *gale-1(pv18)* y *atf-6(ok551)* activan la Unfolded Protein Response y participan en la regulación del desarrollo junto con *ire-1/xbp-1*.

Con formato: Numeración y viñetas

12. La longevidad de *gale-1(pv18)* probablemente no se debe a un problema general de N-glicosilación, o formación de proteoglicanos.

Con formato: Numeración y viñetas

Eliminado: no es debida

Eliminado: ni a la alteración del perfil de UDP-azúcares, ni a la participación en la Unfolded Protein Response.

13. *Ire-1/xbp-1* son necesarios para la vida media de *gale-1(pv18)*.

Con formato: Numeración y viñetas

14. *gale-1(pv18)* incrementa la longevidad por restricción dietaria de bacterias en mitad de la vida.

Con formato: Numeración y viñetas

Eliminado: no

15. El factor de transcripción, *daf-16*, no es translocado al núcleo en el mutante *gale-1(pv18)* pero si es necesario para el incremento de longevidad de éste.

Comentario [MM74]: Duda

Con formato: Numeración y viñetas

Eliminado: *gale-1(pv18)*

16. Mutantes en el receptor de la ruta de la Insulina, *daf-2*, no tienen efecto aditivo de longevidad en un fondo *gale-1(pv18)*, sin embargo afecta la expresión de *gale-1* y la expresividad y penetrancia del fenotipo de malformación de gónadas.

Con formato: Numeración y viñetas

Eliminado: E

Con formato: Fuente: Cursiva

Eliminado: mutante

Eliminado: presentan un incremento en el número y forma

Eliminado: Además, disminuye la expresión de *gale-1* de forma dependiente de *daf-16*.

6. MATERIALES Y METODOS

6 .MATERIALES Y METODOS:

4.1 Medios de Cultivo y Tampones

4.1.1. Medios de gusanos:

Agar NGM (Brenner 1974-Streinagle 2006): En la preparación del medio se mezclan 3g de NaCl, 2'5g de Peptona (marca Disco) y 20g de agar en 1L de agua destilada. El contenido se autoclava y se enfría hasta una temperatura aproximada de 55°C para adicionar:

1°	CaCl	1 ml	Stock de 1M
2°	MgSO ₄	1 ml	Stock de 1M
3°	KH ₂ PO ₄	25 ml	Stock de 1M pH6
4°	Colesterol	1 ml	Stock de 5 mg/ml

El NGM se extiende en placas de 60mm de Ø con ayuda de la bomba peristáltica con la siguiente configuración:

- Volumen: 19 ml
- Tiempo: 0'3 - 1 seg
- rpm: 120

Una vez extendidas las placas, se dejan un día a temperatura ambiente y otro día a 37°C, después se adiciona la *Escherichia.coli* OP50 creando un círculo sin llegar al borde y se incuba un día a 37°C. Las placas marcadas con la fecha de preparación son conservadas a 4°C hasta su uso.

Las condiciones anteriores se mantuvieron en todo los experimentos y se adicionaron otros compuestos dependiendo de las condiciones del experimento realizado:

+ Resistencia a Patógenos:

Pseudomona aeruginosa (cepa PA14): NGM más Rifampicina a 10ug/ml.

Enterococcus faecalis (cepa OG1RF): NGM más gentamicina a 40ug/ml.

Staphylococcus aureus (cepa NTCT8325): NGM más ácido nalidixico a 10ug/ml.

+ Longevidades a condiciones diversas:

Bacillus subtilis (cepa PY79): NGM más polimixina B a 5ug/ml.

Escherichia coli OP50-i: NGM más estreptomicina a 200ug/ml.

Tunicamicina: NGM más 1ug/ml y 2ug/ml de Tunicamicina (Marca Sigma)

Interferencia de RNA (RNAi): NGM mas 100ug/ml de ampicilina y 125u/ml de tetraciclina y 100 ug/ml de IPTG.

Restricción calórica: NGM sin peptona y carbenicilina a 50ug/ml. de *E.coli* OP50 se adicionó 250ul a concentraciones de 10^9 , 10^{10} y 10^{11} ufc/ml. (NGM modificado según Di Chen, 2009).

4.1.2. Medio de bacterias:

LB (Luria Broth): Se utilizó para el aislamiento de *Escherichia coli* OP50 sin antibiótico y con antibiótico según la resistencia de otras bacterias utilizadas en el estudio. En la selección de los clones de RNAi se añade 100 ug/ml de ampicilina y 125ug/ml de tetraciclina y para la selección y mantenimiento de los plásmidos y cósmidos el antibiótico de resistencia a la concentración requerida. La fórmula para 1L de LB es 5g NaCl, 5g de extracto de levadura y 10g de Triptona.

Brain Heart Infusion (BHI): Es necesario para el crecimiento de *Enterococcus faecalis*. Se añade 52 g/L en agua destilada, calentar y esterilizar a 121° por 15 min (este producto ya tiene agar) Marca Biolife.

Triptona Soya Broth (TSB): utilizado para el crecimiento de *Stafilococcus aureus*. Se adiciona 30 g/L de agua destilada y esterilizar a 121° 15 min (Añadir agar al 2 % para sólidos). Marca Oxid.

4.1.3 Soluciones y Tampones:

+ M9:

Fórmula para 1L: 6g de Na₂HPO₄, 3g de KH₂PO₄, 5g de NaCl, 0'25g de MgSO₄.
Todos los compuestos autoclavados y mezclados en esterilidad.

+ Preparación de huevos:

Fórmula para 1L: 66ml de NaOH 2M, 164ml de lejía y 768ml de Agua Milli Q.

+ Tampon de lisis para extracción de genómico:

Fórmula para 10ml: 5ml de KCl 0'1M, 100ul de Tris 1M pH8,3, 25ul de MgCl₂ 1M, 45ul de NP-40 0.45%, 45ul de Tween 20, 1mg de gelatina y proteinasa K 60ug/ml (adicionado al momento del uso).

+ Solución de congelación (Sulston y Brenner 1974): 30 mL de Glicerol 100 % + 70 mL de M9 Buffer autoclavado.

+ Agar al 5%

+ TBE 1X:

10.8g Trizma Base, 5.5 g Acido bórico, 7.4g EDTA y enrasar a 1L con agua desionizada y ajstar a pH8.3

+ Tampón de Carga DNA:

0.25% w/v Azul de bromofenol, 30% Glicerol.

Otros comúnmente utilizados en laboratorios de biología molecular.

4.2 Estirpes y condiciones generales de crecimiento.

4.2.1 Cepas de *C. Elegans*:

Todas las cepas utilizadas en el estudio para su mantenimiento se crecieron en NGM con *Escherichia coli* OP50 como recurso alimenticio e incubadas a temperaturas de 16 ó 20°C.

Las cepas utilizadas en este estudio se detallan en la siguiente tabla:

Cepa	Genotipo
N2	Silvestre de referencia aislado en Inglaterra
DH26	fer-15(b26)II
CB4856	Silvestre aislado en Hawaii
GM62	fer-15(b26)II; pdk-1(pv16)
GM244	pv19
GM243	rol-1(e91)II pv19
DR2170	fer-15(b26)II; (m884)
GR1373	eri-1(mg366)IV
NL2099	rrf-3(pk1426)II
DR2227	aap-1(m889)I; fer-15(b26)II
RB772	atf-6(ok551)X
FX01153	atf-6(tm1153)X
GM308*	atf-6(ok551)X (2X)
GM309*	atf-6(ok551)X; daf-2(e1370)III; fer-15(b26)II
GM312*	atf-6(ok551)X; daf-2(e1370)III
NS2932	cnx-1(nr2010)III
VC1801	cnx-1(ok2234)III
ZB1030	crt-1(bz31)V
KJ216	crt-1(jh101)V
NF229	cogc-1(k179)I
NF1684	cogc-3(k181)I
DR40	daf-1(m40)IV
GM63	daf-2(e1370)III
DR1572	daf-2(e1368)III
DR1942	daf-2(e979)III
GM6	daf-2(e1370)III; fer-15(b26)II
GM45*	daf-2(e1370)III; dpy-5(e61)I
GM9	daf-2(m41)III; fer-15(b26)II
DR1572	daf-2(e1368)III
DR1942	daf-2(e979)III
DR1572	daf-2(e1391)III
CB1372	daf-7(e1372)III
AA277	dhls64 (daf-9::GFP)

MG221	daf-11(m84)V
DR20	daf-12(m20)X
DR26	daf-16(m26)I
GM11	daf-16(m26)I; fer-15(b26)II
CF1330	daf-16(m26)I; muEx128[pKL79(daf-16a::GFP)]+pRF4(rol)]
GM301*	daf-16(m26)I; muEx128[pKL79(daf-16a::GFP)]+pRF4(rol)]; eat-2(ad465)II
TJ356	zls356[daf-16::GFP rol-6]
GM155*	daf-2(m41)III; zls356[daf-16::GFP rol]
GM195*	daf-2(m577)III; zls356[daf-16::GFP rol]
GM206*	daf-2(e1368)III; zls356[daf-16::GFP rol]
GM255*	gale-1(pv18)I - zls356[daf-16::GFP rol]
GM301*	eat-2(ad465)II; daf-16::GFP (cf1330)
GM329*	atf-6(ok551)X; daf-16::GFP(cf330)
VC998	dnj-7(ok1495)X
GM31	dpy-1(e1)-unc-32(e189)III
GM5*	dpy-5(e61)I
GM218*	dpy-5(e61)-unc-59(e1052)I
DR437	dpy-5(e61)-unc-29(e1072)I
SP24	dpy-5(e61)-unc-54(e190)I
GM186*	dpy-5(e61)-unc-59(e261)I
GM256*	dpy-5(e61)-unc-95(su33)I
MT628	dpy-9(e12)-unc-17(e245)IV
DR2078	Mnl[dpy-10(e128)mls-14]/bli-2(e768)-unc-4(e120)
TH37	dpy-11(e224)-unc-23(e25)V
DR185	dpy-13(e184)-unc-22(m52)IV
CB2053	dpy-18(e364)-unc-64(e246)III
DA116	eat-2(ad116)II
DA465	eat-2(ad465)II
BC195	dpy-5(e907)/dpy-5(e907); sls 11076 [rCes C47b2.6 : : GFP + pCeh361]
BC11076	dpy-5(e907)/dpy-5(e907); sEX11076 [rCes C47b2.6 : : GFP + pCeh361]
GM 227*	daf-2(e1370)III; dpy-5(e907)/dpy-5(e907)I; sEX11076 [rCes C47b2.6 : : GFP + pCeh361]
GM 226*	daf-(1368)III-dpy-5(e907)/dpy-5(e907)I; sEX11076 [rCes C47b2.6 : : GFP + pCeh361]
GM275*	gale-1(pv18)I; eat-2(ad465)II
GM106*	gale-1(pv18)I; fer-15(b26)II
GM107*	gale-1(pv18)I
GM108*	gale-1(pv18)I; dpy-18(e364)-unc-64(e246)III
GM109*	gale-1(pv18)I; unc-64(e246)III
GM110*	gale-1(pv18)I; dpy-18(e364)III
GM103*	gale-1(pv18)-dpy-5(e61)I
GM212*	gale-1(pv18)I; unc-9(e101)X
GM211*	gale-1(pv18)I; unc-17(e245)IV
GM124*	gale-1(pv18)I; unc-31(e169)IV
GM223*	gale-1(pv18); unc-59(e1005)I
GM109*	gale-1(pv18); unc-64(e246)I

GM161*	<i>gale-1(pv18)-unc-75(e950)I</i>
GM214*	<i>gale-1(pv18)-unc-101(sy108)I</i>
GM247*	<i>gale-1(pv18)I; unc-119(e2498)III</i>
GM242*	<i>gale-1(pv18)I; unc-119(e2498)-daf-2(e1370)III</i>
GM115*	<i>gale-1(pv18)-aap-1(m889)I</i>
GM130*	<i>gale-1(pv18)I; daf-1(m40)IV</i>
GM129*	<i>gale-1(pv18)I; daf-7(e1372)</i>
GM112*	<i>gale-1(pv18)I; daf-2(m41)III</i>
GM113*	<i>gale-1(pv18)I; daf-2(e1370)III</i>
GM234*	<i>gale-1(pv18) daf-16(m26)I; daf-2(e1370)III</i>
GM132*	<i>gale-1(pv18)I; daf-2(e1368)III</i>
GM187*	<i>gale-1(pv18)I; daf-2(e1391)III</i>
GM114*	<i>gale-1(pv18)-daf-16(m26)I</i>
GM257*	<i>gale-1(pv18)I; dhls64[daf-9::GFP]</i>
GM221*	<i>gale-1(pv18)I; daf-11(m84)V</i>
GM233*	<i>gale-1(pv18)I; srf-3(e2689)IV</i>
	<i>gale-1(CxTi10048) MOS</i>
FX03267	<i>gale-1/+ (tm3267/+)</i>
GM330*	<i>gale-1/+ (tm3267/+) (2X)</i>
VC729	<i>gna-2(gk308)I/hT2[bli-4(e937)let-(g782) qls48] (I; III)</i>
VC729	<i>gna-2(ok867)I/hT2[bli-4(e937)let-(g782) qls48] (I; III)</i>
XA780	<i>gna-2(ga705)/unc-109(n499)</i>
FX0173	<i>hdrl-1(tm1743)</i>
RB1104	<i>hsp-3(ok1083)X</i>
VC1099	<i>hsp-4(gk514)II</i>
SJ4005	<i>zcls4[hsp-4::GFP]V</i>
GM261*	<i>zcls4[hsp-4::GFP]V; atf-6(ok551)X</i>
GM311*	<i>eat-2(ad465)II; zcls4[hsp-4::GFP]V</i>
GM266*	<i>gale-1(pv18)I; zcls4[hsp-4::GFP]V</i>
SJ30	<i>ire-1(zc14)II; zcls4[hsp-4::GFP]V</i>
SJ17	<i>xbp-1(zc12)III; zcls4[hsp-4::GFP]V</i>
RE666	<i>ire-1(v33)II</i>
NF8	<i>mig-17(k113)V</i>
	<i>unc-119 Ex[mig-17GFP(100) + pUnc119(50)]</i>
GM238*	<i>unc-119III; gale-1(pv18)I Ex[mig-17GFP(100) + pUnc119(50)]</i>
GM230*	<i>unc-119; daf-2(e1370)III Ex[mig-17GFP(100) + pUnc119(50)]</i>
GM237*	<i>Unc-119; gale-1(pv18)I; daf-2(e1370)III Ex[mig-17GFP(100) + pUnc119(50)]</i>
GM328	<i>Unc-119; sqv-7(n2839)II; daf-2(e1370)III Ex[mig-17GFP(100) + pUnc119(50)]</i>
	<i>unc-119 Ex[mig-17GFPNQ1(100) + pUnc119(25)+pBR322(5)]</i>
	<i>unc-119; mig-23(k180) [mig-17GFP(100) + pUnc119(50)]</i>
NF591	<i>mig-22(tk24)III</i>
NF68	<i>mig-22(k141)III</i>
NF1226	<i>mig-22(tk69)III/hT2[bli-4(e937) let-(g782) gls48] (I; III)</i>
NF317	<i>mig-23(k180)X</i>

GM62*	pdk-1(pv16)X; fer-15(b26)
TM629	pek-1(tm629)X
RB545	pek-1(ok275)X
XA4900	rib-2(qa4900)/qC1 dpy-19(e1259) glp-1(q339)III
VC733	rib-2(gk318) III/hT2[bli-4(e937) let-?(g782) gls-48] (I; III)
CF1553	mnIs84[pAD76(sod-3::GFP)]
MT7479	sqv-2(n2826)II
MT7556	sqv-3(n2842)/eT1 III; +/-eT1 V
MT7482	sqv-3(n2823)III / eT1 (III; V)
NF199	sqv-5(k175)I
NF196	sqv-5(k172)I
MT7562	sqv-7(n2839)II
GM224*	sqv-7(n2839)II; daf-2(e1368)III
GM225*	sqv-7(n2839)II; daf-2(e1370)III
GM313*	sqv-7(n2839)II; unc-119(e2498)III
MT9088	sqv-7(n2844) unc-4(e120)/mnC1 dpy-10(e128) unc-52(e444)II
MT11826	sqv-7(n3789)/mnC1dpy-10(e128) unc-52(e444)II
CB6627	srf-3(e2689)IV
CB101	unc-9(e101)X
MT7929	unc-13(e51)I
GM21*	unc-13(e51)I; fer-15(b26)II; unc-64(e246)III
CB196	unc-31(e169)IV
CB1005	unc-59(e1005)I
CB246	Unc-64(e246)III
CB950)	unc75(e950))I
HF33	unc-95(su33)I
PS529	unc-101(sv108)I
CB4845	unc-119(e2498)III
GM307	xbp-1(zc12)III
GM268	gale-1(pv18); <i>pvlIs1</i> [C47B2.6 pgk10]

*Cepas construidas durante el desarrollo de esta tesis.

4.2.2. Cepas de Bacterias:

Escherichia coli OP50: Utilizada comúnmente como alimento de los gusanos, es auxotrófica para uracilo (Brenner S. 1974). El genotipo impide crecer con rapidez en el NGM, lo cual hace que haya una delgada capa de bacterias y que sea fácil la observación de los gusanos en las placas de cultivo.

Escherichia coli HT115: F⁻, *mcrA*, *mcrB* IN(*rrnD-rrnE*)1, lambda⁻, *rnc14::Tn10*(DE3 lysogen: lacUV5 promoter::RNA polimerasa T7 (*tet*^r)). La cepa tiene mutado el gen que codifica la RNasa III y esta deficiencia permite una gran acumulación de RNAs y en

presencia de IPTG es capaz de expresar RNA polimerasa T7. Crece en LB y son resistentes a tetraciclina, se transforman con el vector pL4440 vacío ó conteniendo la secuencia de un gen diana por la técnica estándar de Cl2Ca y se utilizan para experimentos de interferencia de RNA (RNAi) por ingestión.

Pseudomona aeruginosa (cepa PA14): Bacteria patógena (Rahme et al., 1995). Cepa cedida por el Departamento de Biología Molecular, Hospital General de Massachusetts.

Enterococcus faecalis (cepa OG1RF): Bacteria patógena (Garsin et al., 2001). Cepa cedida por el Departamento de Biología Molecular, Hospital General de Massachusetts.

Staphylococcus aureus (cepa NTCT8325): Bacteria patógena (Garsin et al., 2001). Cepa cedida por el Departamento de Biología Molecular, Hospital General de Massachusetts.

Bacillus subtilis (cepa PY79): Bacteria inócua (Youngman et al., 1984a; Youngman et al., 1984b). Cepa cedida por el Departamento de Biología Molecular, Hospital General de Massachusetts

4.3 Métodos

4.3.1. Preparación de huevos.

Este procedimiento es útil para eliminar contaminación bacteriana de cultivos en medio sólido y líquido y también se utiliza para la sincronización de los gusanos en L1.

Los gusanos crecen en placas NGM con *E.coli* OP50 hasta observar un gran número de hermafroditas grávidas y de huevos en el medio. Se recogen con agua destilada y se centrifugan en tubos de propileno de 15ml. a 2000rpm por 1 minuto (Centrifuga Beckman). Cuando la contaminación es muy grande, se recomienda realizar 2 ó 3 lavados con agua. Se extrae el sobrenadante y se adiciona aproximadamente 5ml. del tampón de lisis (Apartado 4.1.3.) agitándose por 10 minutos hasta observar la destrucción de los gusanos quedando los huevos libres, en este momento se adiciona M9 (Apartado 4.1.3.) y se realizan tres lavados con M9 para quitar el exceso de lejía. Los huevos son colocados en placas e incubados a 16 ó 20°C. Para sincronización de L1

se resuspenden en 3-4ml de M9 y se dejan en incubación de 20-24H a 16 ó 20°C a 100rpm.

4.3.2. Retrocruzamiento o cruce de limpieza:

Se utiliza para asegurar que los fenotipos observados son debidos a una mutación única en la cepa estudiada. Consiste en cruzar la cepa mutante con la cepa silvestre N2 o con la cepa *fer-15(b26)* (cepa silvestre con una mutación termosensible que le confiere esterilidad a 25°C), y en la F2 del cruce se seleccionan candidatos que presenten el fenotipo de la mutación.

Como *liv-8(pv18)* proviene de una mutagénesis realizada en el fondo genético *fer-15(b26)* se realizo el retrocruzamiento con *fer-15(b26)* en 4 ocasiones y por tener rescate materno era necesario esperar la F3 para seleccionar el candidato a seguir para el siguiente retrocruzamiento. Después del cuarto cruce se hizo un último cruce de limpieza con N2, así la mayoría de los experimentos realizados se hicieron con *gale-1(pv18)(5X)* y *gale-1(pv18); fer-15(b26)(4X)*.

4.3.3. Termotolerancia:

La termotolerancia se realizo en el estadio L1. Se hicieron preparaciones de huevo de 6 a 7 placas y se sincronizaron en M9 por 24 horas en L1. Entre 800-1000 L1 fueron colocados por placa hasta completar 24 placas. Tres placas se colocaron a 16°C y se consideraron día cero (0). El resto de las placas se incubaron a 30°C y cada 24 horas durante 7 días, 3 placas se transferían a 16°C marcadas como día 1-7 respectivamente. Se consideraba termoresistente todo L1 que alcanzaba el estadio adulto tres días después de estar incubado a 16°C. Los controles utilizados fueron la cepa silvestre N2 y *daf-2(e1370)* como cepa termotolerante. Los resultados fueron analizados en Graphpad prism 4 en el modo XY: único punto.

4.3.4. Curvas de longevidad

Los ensayos fueron realizados en pacas de NGM normal o modificado según las condiciones del experimento. (Apartado 4.1.1.)

Los ensayos de longevidad empezaban con preparaciones de huevos (Apartado 4.3.1.) para la sincronización de las cepas a estudiar. Con el fin de evitar posibles estreses fisiológicos debido a la preparación de huevos, los gusanos eclosionados no se utilizaron en la realización de las curvas de longevidad y se esperaba la siguiente generación, para lo cual en el estadio L4 30 hermafroditas eran transferidas a nuevas placas (5 L4 por placa) y cuando su descendencia alcanzaba el estadio L4, 100 hermafroditas eran transferidas a las placas respectivas (20 L4 por placa) estableciéndose este día como el día cero de la curva.

La temperatura escogida para la realización de las curvas fue 25°C. La mayoría de las cepas utilizadas en el estudio llevan la mutación *fer-15(b26)* que confiere el fenotipo de esterilidad a 25°C, una condición que facilita el estudio de longevidad al evitar la puesta de huevos normal (200-300 descendientes). En todas las curvas *fer-15(b26)* fue utilizado como control. Con algunos mutantes se ensayaron longevidades a 16°C ó a 20°C.

En los primeros 6 días de la curva los gusanos son cambiados de placa cada 2 días para eliminar cualquier posible descendiente. Después son cambiados cada 5-7 días para mantener las condiciones fisiológicas establecidas de pH, bacteria fresca, etc. Cada dos días los gusanos son contados considerándose muertos aquellos que no responden con ningún movimiento al ser tocados con el asa de platino. Los gusanos fuera del agar y pegados a la pared de la placa, así como los estripados son considerados perdidos.

Todas las curvas fueron repetidas 2 ó 3 veces. El programa empleado fue Graphpad prism 4 en el modo curva de supervivencia: punto a punto, barras de error y comenzando al 100%. En la realización de las gráficas y análisis estadísticos se consideró el error estándar medio (SEM) de cada punto y las diferencias entre curvas se estableció con Log-rank test.

4.3.5. Interferencia de RNA (RNAi) por ingestión:

Esta técnica se utiliza para la producción de mutantes transitorios (*knock-down*) mediante la ingesta de dsRNA de un gen diana. El método se basa en un proceso natural

presente en plantas, nemátodos (Guo y Kemphues 1995) y *D. megalogaster* entre otros organismos y consiste en la degradación de cadenas simples de RNA ante la presencia de dsRNA con secuencias homólogas.

El vector L4440 tiene el sitio de clonación flanqueado por dos promotores T7 produciendo un dsRNA de cualquier fragmento de DNA clonado (500-1500 nucleótidos), este vector es transformado en la cepa *E.coli* HT115 (Apartado 4.2.2.) que por sus condiciones genéticas permite una mayor acumulación de RNAi. El dsRNA al ser ingerido por los gusanos es capaz de migrar a través de las membranas produciendo efecto en la mayoría de las células.

La eficiencia de RNAi puede aumentarse utilizando la cepa *rrf-3(pk1426)* (Simmer et al 2002) que tiene una mutación en una RNA polimerasa (RdRP) confiriéndole hipersensibilidad al RNAi somático. También se utiliza la cepa *eri-1(mg366)* que aumenta el efecto del RNAi en las neuronas, células de difícil acceso para el RNAi por ingestión.

Para la observación de fenotipos como letalidad y parada en L1, las hermafroditas en estadio L4 se transfieren a placas con el pL4440+RNAi en estudio y a placas con pL4440 vacío como control y se espera la descendencia para la observación de los fenotipos.

En el caso de las curvas de longevidad, se realizaron preparaciones de huevo de las cepas y se dejaron crecer en las placas de los pL4440+RNAi diana y en pL4440 vacío por dos generaciones a 16°C hasta el estadio L4. Cien L4 (1 placa=20 gusanos) son transferidos a las placas respectivas e incubados a 25°C, estableciéndose el día cero de la curva de longevidad.

Los clones utilizados en este estudio pertenecen a la genoteca de Julie Ahringer y las placas se prepararon según protocolo Ahringer (ed) 2006. (Apartado 4.1.1.) Las bacterias usadas para RNAi fueron aisladas en placas de LB+Ampicilina+Tetraciclina, el preinoculo se hacía en medio líquido LB+ampicilina+tetraciclina a 37°C toda la noche. Del preinoculo se realiza una dilución 1/100 y se incuba con IPTG hasta obtener

una DO 600=0.4 (Aprox. 4-5 horas). Una vez inducidas, las bacterias fueron sembradas en placas NGM+Ampicilina+Tetraciclina+IPTG y crecidas a 37°C por 12 horas.

4.3.6. Letalidad Embrionaria y Parada en L1:

Se incuban 200 huevos en placas de NGM con OP50 a 25°C. A las 24 horas se contaban el número de huevos eclosionados para la letalidad. Para la parada en L1 se contaban a las 48 horas todos los estadios presentes.

4.3.7. Perfil de desarrollo:

Se incubaban 200 huevos en placas de NGM con OP50 a 16, 20, 25 y 27°C de *liv-8(pv18)*; *fer-15(b26)* y *fer-15(b26)*. A los 3 días se contaban el estadio con predominio en la placa y a los 5 días el porcentaje de adultos.

4.3.8. Tamaño de la puesta de huevos:

Para el tamaño de la puesta de huevos se clonaban 10 L4 *gale-1(pv18)* y 10 N2 (1 x placa) y se incubaban a 16°C. A las 24 y 48H se contaban el número de huevos. El análisis estadístico se realizó el programa Graphpad prism 4 en el modo dos grupos de variables: categoría gráfica, barras de error.

4.3.9. Microscopia:

Sobre los pads de agarosa al 5% (apartado 4.3.16.) se deposita una gota de 5ul de M9 y sobre la gota los gusanos a estudiar, se coloca un cubre y se espera uno o dos minutos para tomar las fotos.

Morfología de gónadas y de vulva: El microscopio Zeiss Axio Imager M2 en objetivo 40X por método Nomanski La visualización y clasificación de las gónadas se realizó según protocolo descrito por Nishiwaki, K (Nishiwaki, 1999).

Para la medición del área de la vulva se utilizó el software ImgenJ. Se contorneaba todo el área bordeada de la vulva para la medición. Se midieron la vulva de siete gusanos N2

y doce *gale-1(pv18)* repitiéndose la medición de cada área tres veces. El análisis estadístico se realizó el programa Graphpad prism 4 en el modo dos grupos de variables: barras en columna vertical.

Expresión de *gale-1*: Se utilizó la cepa *dpy-5(e907)/dpy-5(e907); sEX11076[rCes C47B2.6::GFP + pCeh361]* del Laboratorio Baillie (Proyecto Genoma GFP). Se seleccionaban entre 6-8 hermafroditas silvestres en placas frescas de OP50 y se esperaba la siguiente generación para observar los diferentes estadios. La construcción de dobles mutantes *daf-2(e1370)III; dpy-5(e907)/dpy-5(e907)I; sEX11076 [rCes C47b2.6::GFP + pCeh361]* y *daf-2(1368)III-dpy-5(e907)/dpy-5(e907)I; sEX11076 [rCes C47b2.6::GFP + pCeh361]*, así como su tratamiento con RNAi de *daf-16* permitió estudiar la regulación de la expresión de *gale-1* con la Ruta de la Insulina. La visualización se hizo en Leica Confocal SP2-AOBS. Ex laser line 488.

Expresión de *hsp-4::GFP*: Se hizo por medio de la cepa *zcls4 [hsp-4::GFP]V*, en la cual los animales expresan bajos niveles de GFP en condiciones basales pero en respuesta a shock térmico y a tunicamicina la expresión se incrementa en intestino e hipodermis (Calfon M. et al. 2002). La expresión fue medida en dobles mutantes *gale-1(pv18) I; zcls4V, zcls4V; atf-6(ok551)X* y *eat-2(ad465)II; zcls4V*, además *zcls4V* y los dobles mutantes fueron sometidos a RNAi de *ire-1* y *xbp-1*.

Expresión de *daf-16::GFP*: Con la cepa *daf-16::GFP* de Samuel T. Henderson y Thomas E. Johnson se construyó el doble *gale-1(pv18)-daf-16::GFPI*. La expresión de la cepa *daf-16::GFP* fue estudiada al ser sometida a tratamiento en RNAi de *atf-6, pek-1, ire-1, xbp-1* y *pL4440*.

Expresión de *mig-17::gfp*: La cepa *unc-119 Ex[mig-17GFP(100) + pUnc119(50)]* cedida por el Laboratorio de Kiyoji Nishiwaki permite ver la expresión de MIG-17 en la línea de unión de las gónadas. Con esta cepa se construyó el doble mutante de *unc-119; gale-1(pv18) I Ex[mig-17GFP(100) + pUnc119(50)]* y también se construyeron *unc-119; daf-2(e1370)III Ex[mig-17GFP(100) + pUnc119(50)]*, *unc-119; sqv-7(n2839)II Ex[mig-17GFP(100) + pUnc119(50)]* y el triple mutante *unc-119; gale-1(pv18) I; daf-2(e1370)III Ex[mig-17GFP(100) + pUnc119(50)]*.

Para todos los estudios de expresión se seleccionaban 6-8 hermafroditas en placas frescas de OP50 ó de RNAi, según el caso, y se esperaba la siguiente generación para facilitar un crecimiento sin contaminación ó saturación que pudieran interferir en las expresiones y hacer el seguimiento en todas las fases el desarrollo. Las fotos se tomaron en L4, especialmente las de mig-17::GFP, único estadio posible para visualizar la expresión. Las expresiones de zcls4, daf-16::GFP y mig-17::GFP se realizaron en el microscopio Zeiss Axio Image M2 con la cámara AxioCam MR con el software de control y de adquisición de imágenes AxioVision de Zeiss. Los objetivos fueron N-Achroplan 10x y Plan-Apochromat 20X y el filtro para fluorescencia GFP-FITC-A488. Con el fin de evitar cambios en la expresión debidos al estrés del montaje, las fotos se tomaron siempre que el montaje no superara los 10 minutos y en daf-16::GFP sin superar los 5 minutos debido a que el control localizaba en el núcleo después de ese tiempo.

4.3.10. Cuantificación de intensidad

Expresión Gale-1: El software utilizado ha sido ImagenJ con los plugins de MacBiophotonics.

Se escogió el intestino como la zona de interés para cuantificar la expresión y como referencia un cuadrado con un área de 180 que se iba desplazando a lo largo de todo el intestino hasta hacer un total de 10 a 15 mediciones. Siete gusanos se utilizaron en cada cuantificación y la medición se repitió al menos 2 veces en cada gusano. El análisis estadístico de los resultados de las mediciones se hizo con el programa Graphpad prism 4 en el modo dos grupos de variables: barras en columna vertical.

Para la expresión de hsp-4 se midió tanto la intensidad de fluorescencia como el área de todo el gusano de las hermafrodita en el estadio L4.

4.3.11. Mapeo por Single polymorphism Nucleotide (SNP):

En el capítulo de resultados 2.1.1.3. se describen los fundamentos del mapeo por SNP, los cruces genéticos realizados, obtención de recombinantes y análisis de los resultados. En esta sección se explican detalles técnicos de los procesos de biología molecular

necesarios para la realización de RFLP. Los 18 snip-SNP de los cromosomas son referenciados en Wick SR y un listado de los snip-SNP y SNP, de los oligonucleotidos y enzimas determinados en el cromosoma I se encuentran en el anexo I. La secuenciación es explicada en el apartado 4.3.14.

Preparación de DNA: Para la extracción del genómico se estableció un número de 20 hermafroditas adultas para 20ul del tampón de lisis y se incubaron 1 hora a -80°C, 1 hora a 65°C, 15 minutos a 95°C. Se centrifugaban 1 minuto a 3000 rpm y se congelaban a -20°C hasta su utilización.

Reacción de Cadena de la Polimersa (PCR): 1 ul de la preparación de DNA se utilizó para realizar la amplificación de los SNP, la taq polimerasa marca Boline fue la enzima utilizada y el programa de PCR se estandarizó en: 95°C, 40 segundos; 58°C, 40 segundos; 72°C, 40 segundos por 35 ciclos.

Digestión del Producto de PCR de los Dobles SNP: se utilizaron 10ul del producto de PCR para la digestión, 1ul de tampón de enzima y una unidad (1Ud) de enzima en un volumen total de 30ul. Las temperaturas, tiempos y BSA se ajustaron a las necesidades de la enzima de digestión para alcanzar el 100% de eficacia.

Electroforesis de Digestión de Dobles SNP: 15ul de la digestión mas 2ul de tampón de carga de electroforesis se corrieron en agarosa al 2% en TB a 100w por 30 minutos. El tamaño de las bandas digeridas y sin digerir oscilan entre 1000 y 100 pares de base (pb), por lo cual se utilizó el Patrón de Peso Molecular de 1000 pb marca Invitrogen (ref 100787-018)

En todos los procesos se llevaban siempre controles de N2 y CB4856 digeridos y sin digerir.

4.3.12. Transformación con biobalística

Placas de disparo: Se utilizan placas de medidas (35 mm), a las que se adiciona el NGM normal, se secan mas de lo habitual y una vez secas se colocan 20ul de OP50 sin extender la gota en el centro de la placa y se deja a temperatura ambiente toda la noche.

Al momento de usarlas se colocan en hielo para que los gusanos se fijen a la *E.coli*, esto permite que los gusanos no se muevan y permanezcan en el centro del disparo.

Cepa de *C.elegans*: En el disparo era necesario utilizar la cepa *liv-8(pv18)(5X)*, sin la mutación de *fer-15*, para poder colocar L4 transformados a 25°C sin afectar la puesta de huevos, lo cual era útil debido a que el fenotipo a probar en primera instancia era complementar la letalidad embrionaria a 25°C. En la realización de 8 disparos son necesarios unos 20.000 gusanos en el estadio adulto joven con los primeros huevos en su interior. Las poblaciones sincronizadas se obtuvieron a partir de preparaciones de huevos y sincronización de L1 con incubación toda la noche en M9 a 16°C con 100rpm. Los L1 fueron transferidos a placas con comidas en un promedio de 800-1000 para no saturar la placa y crecidos a 16°C hasta llegar a adulto joven. En este estadio fueron recogidos en M9 y puestos en hielo, se lavan por 3 veces con M9 y se dejan puestos en hielo para su sedimentación. Una vez sedimentados, se extrae el M9 y 1 gota de los gusanos concentrados se traspasan a las placas preparadas para el disparo, justo en la gota de OP50, cuando se sequen están listas para el disparo.

Plásmido Marcador: El plásmido *PscA-1::GFP* (pGK10) fue seleccionado como marcador de la transformación debido a que *sca-1* se expresa en varios tejidos durante todos los estadios del desarrollo, además la GFP se expresa a través de todo el cuerpo con una expresión fuerte en los músculos de la pared corporal, siendo fácil la distinción de los gusanos transformados. El DNA de pGK10 se obtuvo de una maxipreps de Sigma a una concentración de 1.212ug/ul., a esta concentración era necesario 6.3ul para la preparación del DNA a disparar.

Cosmidos: F08A8 y C47B2 son los cosmidos que cubren la región de interés en este estudio. Con el Kit para construcciones grandes phaseprep de Sigma se obtuvo rendimientos de 340 y 832ng/ul para C47B2 y de 487 y 526ng/ul para F08A8. Se confirmó la integridad de los cosmidos con patrones de restricción de BAmH-I y Xho-I para C47B2 y en F08A8 las digestiones se realizaron con EcoR-I y Bst-X, en ambos casos los patrones de digestión correspondían a lo esperado.

Preparación del DNA: La preparación para cada DNA a disparar lleva 1mg de partículas de oro, 100ul de espermidina 50mM (mezcla sonificada por 5-10 segundos), 8ug del

DNA utilizado como marcador (pGK10) y 8ug de DNA a estudiar (mezcla a partes iguales de dos maxipreps) y agua hasta un volumen final de 360ul. Posteriormente, se adiciona CaCl₂ 1M, se lava 3 veces con etanol al 96% y se resuspende en 200ul de PVP. Debido a que el volumen a disparar es de 20ul, la preparación del DNA con estas concentraciones y cantidades permite realizar 8 disparos consecutivos. En todos los ensayos se hacía una preparación extra con 16ug de pGK10 para disparar como control de la transformación.

Equipo: Se utilizó la maquina diseñada por el profesor Ralph Schnabel (<http://www.ifg.tu-bs.de/Schnabel/>) siguiendo el protocolo sugerido por el propio profesor Schnabel (Strange 2006).

Cada placa de gusanos disparado es cortada en fragmentos y trasferidos a placas de 60mm de Ø con OP50 y se espera la descendencia para seleccionar y clonar los gusanos con fluorescencia en todo el cuerpo y se siguieron para estudio aquellos cuya descendencia presentaban un alto número de gusanos con expresión de GFP en el cuerpo. Transformantes y no transformantes de los cosmidos C47B2 y F08A8, así como de pGK10 (control) en el estadio L4 fueron sometidos a 25°C por 48H.

4.3.13. Amplificación de gale-1

La amplificación de Gale-1 se hizo a partir de genómico de la cepa silvestre N2 extraído con el kit Qiagen tip-100 obteniendo una concentración de 800ug. 100ug de genómico fueron utilizados como molde en la PCR utilizando los oligos 3'TCTGACACCACGTGAAAACC'5 y 3'AGGTCCTACCGATGATGACG'5. Los oligonucleótidos fueron diseñados para obtener un producto de 4867 pb que iban desde 1229 pb en dirección 5' para asegurar la presencia del promotor y 467 pb en dirección 3' después del final del transcrito gale-1 (C47B2.6a). El producto de PCR fue purificado, clonado en pGEN-T y transformado en DH5A. Una colonia aislada fue cultivada para hacer una maxiprep y el DNA obtenido fue secuenciado y transformado por biobalística en *liv-8(pv18)* para observar la complementación con la supresión de la letalidad embrionaria a 25°C.

4.3.14. Secuenciación:

Las secuenciaciones de los SNP y de *gale-1(pv18)* se llevaron a cabo usando el Kit BigDye terminador DNA y el equipo de secuenciación automática Perkin Elmer Abi Prism 310.

Para el caso de los SNP, los fragmentos a secuenciar eran de 200-300 pb, se realizaron en una única dirección y la cantidad de DNA utilizado era de 20-40ng, en cambio, en la secuenciación de *gale-1(pv18)* se amplificaron 3 fragmentos de alrededor de 2000 pb (tamaño del gen 6kb) y se utilizaban 100 ng de DNA para secuenciar en ambas direcciones fragmentos solapantes de 300pb. El DNA proveniente de la reacción se purificaba con el Kit High Pure Plasmad Isolation marca Roche. Los oligonucleotidos empleados en la secuenciación de *gale-1(pv18)* se listan en el anexo II.

4.3.15. Delección

La determinación de la delección fue realizada por PCR utilizando los primers (R) 5'-CGCATACCTATTCACCGATT-3' y (I) 5'-TGTCGGAGAATCAGTGGCCA-3'. El genómico fue obtenido de gusanos individuales parados en L1 *gale-1-/-* y de gusanos adultos que podían ser heterocigotos *gale-1-/+* ó *gale-1+/+*. Los fragmentos fueron separados por electroforesis en geles de 1% de agarosa.

4.3.16. Sensibilidad a galactosa

200 a 300 huevos provenientes de una preparación de huevos fueron incubados en placas conteniendo D-galactosa a una concentración de 0, 0.5, 1, 2 y 3 mg/ml y los animales en el estadio adulto fueron contados después de 4 días de incubación a 20°C. D-galactosa marca Sigma, G0625

4.3.17. HPLC

Para el análisis por HPLC 1000 hermafroditas jóvenes adultas del Silvestre y de *gale-1(pv18)* fueron recojidas y lavadas por 3 veces con el buffer M9, se incubaron a temperatura ambiente por 30 minutos y nuevamente lavadas por tres veces con agua

dejando un volume final de 50ul. Los gusanos fueron congelados a -80°C y despues de descongelados fueron sonicados por 20 segundos seguidos de centrifugación y filtración. Los extractos fueron inyectados en la columna de recambio anionico Zorbax SAX. La detección de los UDP-azucares se realizo con luz ultraviolet a 254nm.

4.3.18. Preparación pad de agarosa:

Una solución de agarosa al 5% en M9 es fundida a 60°C. Un portaobjeto se coloca en medio de dos portaobjetos forrados con cinta aislante y dos gotas de 100ul. son colocadas a cada extremo y se deja caer otro portaobjeto sobre la gota de agarosa y se presiona hasta que la gota se convierta en una fina película. Se deja secar y se retira el porta superior.

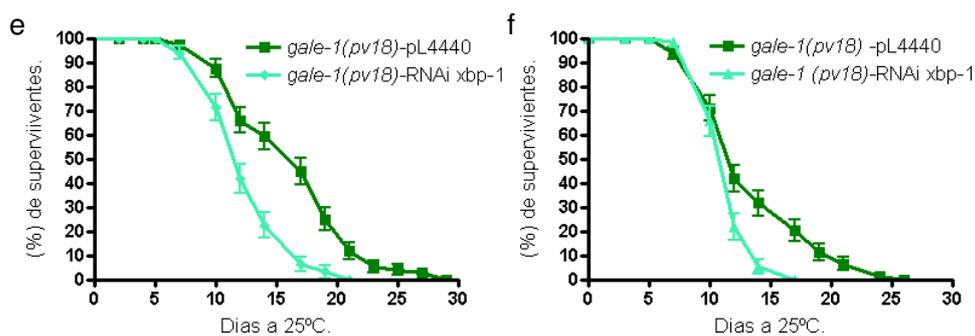
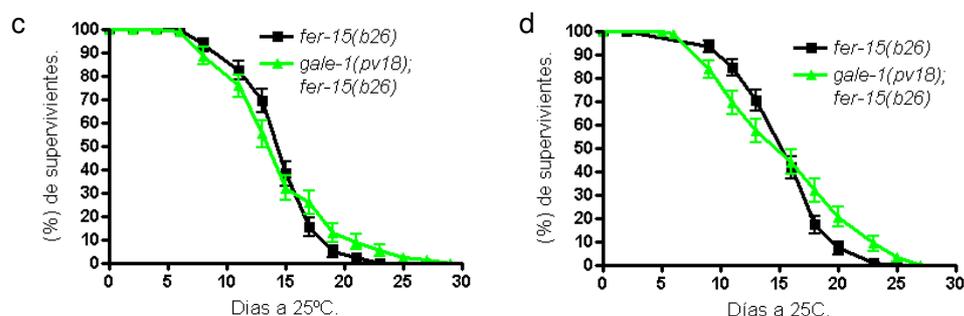
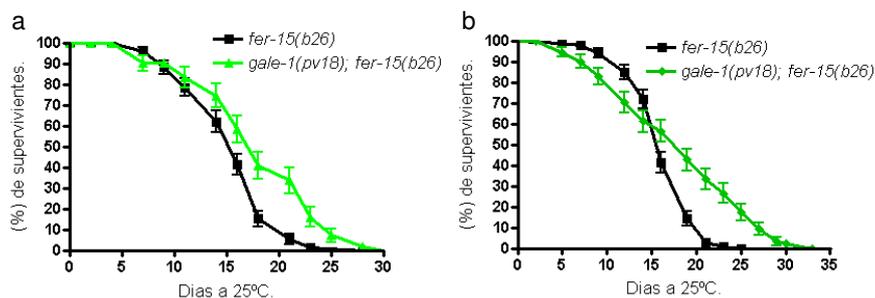
4.3.19. Congelación:

Una de las grandes ventajas de *C.elegans* como modelo de estudio en el laboratorio es la posibilidad de mantener un stock de cepas congeladas. El laboratorio cuenta con una colección de 800 cepas que han sido congeladas según el siguiente protocolo:

El estadio larvario 1 (L1) presenta una mayor eficiencia en la descongelación, por esta razón partíamos de preparaciones de huevo y éstos se distribuían entre 600-800 por placa en 4-5 placas, se esperaba la saturación de las placas, que suele ocurrir cuando la F1 esta en L1. Se procede a recoger el contenido de las 5 placas con M9 y se centrifugaba a 1000rpm en tubos de propileno de 15ml. Se extrae el sobrenadante, se resuspenden en 2ml de M9 y se adiciona 2ml de glicerol al 30% en M9. El contenido se reparte en 4 criotubos y se someten a una congelación lenta en una caja aislante hasta alcanzar los -80°C. Después de 24 horas un criotubo es descongelado para asegurar que el proceso ha ido correctamente y los 3 criotubos restantes se pasan a las cajas de la colección.

7. ANEXOS

ANEXO I



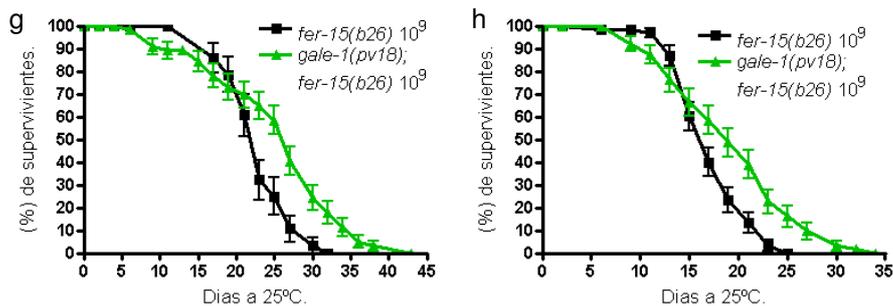


Figura I. g-h. Curvas de longevidad de *gale-1(pv18)* en restricción dietaria. Puede observarse el incremento de longevidad de *gale-1(pv18); fer-15(b26)* en comparación con *fer-15(b26)* crecido en una dilución bacteriana de 10^9 . g $P=0.0019$. h $P=0.0102$. Barra de error SEM. Logrank test: las curvas son diferentes. $N=100$.

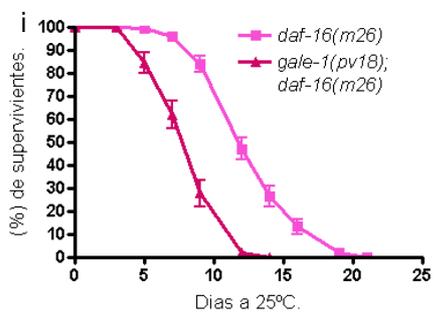


Figura I.i. Curva de longevidad del doble mutante *gale-1(pv18); daf-16(m26)*. La longevidad de *gale-1(pv18)* es dependiente de *daf-16*. Barra de error SEM. $N=100$. Logrank test: las curvas son diferentes. $P=0.0001$.

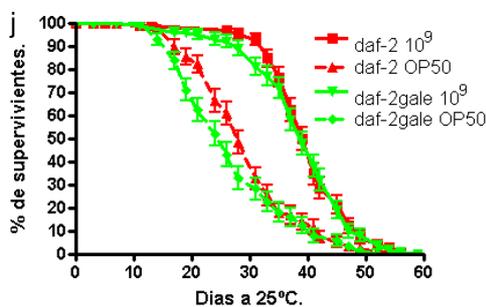


Figura I.j. Curva de longevidad del *gale-1(pv18); daf-2(e1370)* Ad Libitum y en RD. No hay incremento de longevidad en ningún caso. Barra de error SEM. Logrank test: Las curvas no son diferentes. $N=100$.

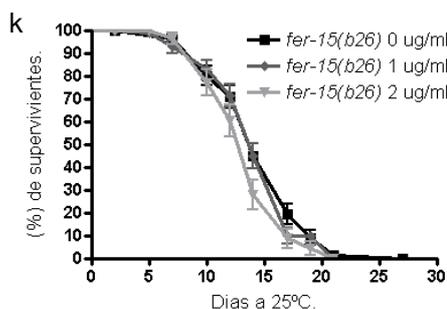


Figura I. J. La Tunicamicina no extiende la vida media de *C. elegans*. Curva de longevidad de *fer-15(b26)* en tunicamicina a 0, 1 y 2 ug/ml. Los animales fueron crecidos hasta L4 en ausencia de tunicamicina y luego transferidos a las placas respectivas y a 25°C. Barra de error SEM. Logrank test: las curvas no son diferentes (0-1 ug/ml. $P=0.7979$ y 0-2ug/ml $P=0.546$). $N=100$

ANEXO II.

Oligonucleotidos, enzimas, polimorfismo y localización de los snip-snp y snp utilizados para el mapeo de *gale-1(pv18)* en el cromosoma I.

SNP	Oligo	Oligo	Enzima	Polimorfismo	Ubicación
pkP1059	catctgggacgttcttcac	ttcaggctccactttatgcc	DraI	g/a	3.01
F59C6	tftataggtcaaagtgtcctc	ttcgtgccacgtatcatgg	TaqI	c/t	5.05
pkP1128	ccaccaatttcggctaaaatc	tggaggaaggaggggttttc	DraI	t/a	12.87
dbP1	tcgctgtaacttgcctcatag	tctcagcctcaacaatattc	BmsaI	g/c	14
Y18D10A.8	ttccaatgaattcaattaaaataa	atcagaatcgttggagcacagtaa	sec	c/t	14.13
uCE-1(1388)	ttgacagggtgcagcaaaag	ccgctttataactgggttca	sec	a/g	14.16
uCE-1(1390)	tcattaccctccagccatc	cgcacaactctcgaatca	sec	c/t	14.24
pkP1132	tgaacctctctcgatttc	accagcagaagaggtgagattc	TaqI	c/t	14.36
Y26D4A	gcgacgcaattcttcctatg	cgccaaaattgtcagttgg	AatII		15.24
uCE-1(1392)	tggaggaaggaggggttttc	ttgacaggttcagcaaaag	sec	c/t	16.8
uCE-1(1394)	gcgacgcaattcttcctatg	ccgctttataactgggttca	sec	aa/--	16.84
W05B5.1	cctctaaaactccggcaa	attcggcgatgatcacacat	sec	g/a	17.1
pkP1073	cgccaaaattgtcagttgg	gcgacgcaattcttcctatg	AatII	a/g	17.18
ZK909	cacaagtgtttggaagtaccg	caacaaagggatagatcacggg	HindIII	c/g	28.8

Anexo III

Oligonucleotidos utilizados en la secuenciación de *gale-1(pv18)*

C476.5t2	GTTGGATCCTCGAGCTTAATAA
c47.6.3T	TAGGATCCTCTGACACCACGTG
c47b.2T3(2)	TCTGACACCACGTGAAAACC
c47.2T5(2)	AGGTCCTACCGATGATGACG
c47.6e1.3	CTGACGTCACATTTTTGAGCA
c47.6e15	TTTTTCGATTTTCAGTTTTTGAA
c47.6e1A5	AGCACTGTGTGACTGCCAAT
c47.6e1B3	CCAGAACCTCTTCCCCACTA
c47.6e1B5	TTCCAATGCTGCTTCATCAC
c47.6e1C3	CTCTCCGCTTTTCCCTGAAT
c47.6e33	AAGAAAAATGAGCAAAACTTTCAA
c47.6e35	CGTACATTTTAGCGTCTGGGTA
c47.6e3A5	ACCACATTCCATTCGGGATT
c47.6e3B3	CTCACCCAAATCCATATTCCA
c47.6e3B5	CTGGCAGTTTTCCAATAGCC
c47.6e3C3	GGTGGCTATTGGAAAAGTGC
c47.6e43	AGATTTTCGCCTTTTCCCAGT
c47.6e45	TTCAAGCTCCAAATTTTCAGAATC
c47.93	TATGGATCCTTTCCAATTTTACCAAGG
c47.9.5	TTCGGATCCGTTCGCCTATATG

8. BIBLIOGRAFIA

- Aballay, A., Yorgey, P., and Ausubel, F. M. (2000). *Curr Biol*, 1539-1542.
- Ahringer, J. (2006). Reverse Genetics In WormBook, T. C. e. R. Community, ed.
- Akimoto, Y., Hart, G., Hirano, H., and Kawakami, H. (2005). O-GlcNAc modification of nucleocytoplasmic proteins and diabetes. *Med Mol Morphol*, 84-91.
- Alano, A., Almashanu, S., Chinsky, J. M., Costeas, P., Blitzer, M. G., Wulfsberg, E. A., and Cowan, T. M. (1998). Molecular characterization of a unique patient with epimerase-deficiency galactosaemia. *J Inherit Metab Dis* 21, 341-350.
- Alcedo, J., and Kenyon, C. (2004). Regulation of *C. elegans* longevity by specific gustatory and olfactory neurons. *Neuron* 41, 45-55.
- Antebi, A., Norris, C. R., Hedgecock, E. M., and Garriga, G. (1997). Cell and growth cone migrations., In *C. elegans* II, D. L. Riddle, T. Blumenthal, J. Meyer, and J. R. Priess, eds., pp. 583-609.
- Apfeld, J., and Kenyon, C. (1999). REgulation of lifespan by sensory perception in *Caenorhabditis elegans*. . *Nature*, 804-809.
- Apfeld, J., O'Connor, G., McDonagh, T., DiStefano, P. S., and Curtis, R. (2004). The AMP-activated protein kinase AAK-2 links energy levels and insulin-like signals to lifespan in *C. elegans*. *Genes Dev* 18, 3004-3009.
- Apweiler, R., Hermjakob, H., and Sharon, N. (1999). On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. *Biochim Biophys Acta* 1473, 4-8.
- Arantes-Oliveira, N., Apfeld, J., Dillin, A., and Kenyon, C. (2002). Regulation of life-span by germ-line stem cells in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 295, 502-505.
- Artal-Sanz, M., and Tavernarakis, N. (2008). Mechanisms of aging and energy metabolism in *Caenorhabditis elegans*. *IUBMB Life* 60, 315-322.
- Artal-Sanz, M., and Tavernarakis, N. (2009). Prohibitin couples diapause signalling to mitochondrial metabolism during ageing in *C. elegans*. *Nature* 461, 793-797.
- Artal-Sanz, M., Tsang, W. Y., Willems, E. M., Grivell, L. A., Lemire, B. D., van der Spek, H., and Nijtmans, L. G. (2003). The mitochondrial prohibitin complex is essential for embryonic viability and germline function in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem* 278, 32091-32099.
- Banhegyi, G., Baumeister, P., Benedetti, A., Dong, D., Fu, Y., Lee, A. S., Li, J., Mao, C., Margittai, E., Ni, M., *et al.* (2007). Endoplasmic reticulum stress. *Ann N Y Acad Sci* 1113, 58-71.
- Bernales, S., Papa, F. R., and Walter, P. (2006). Intracellular signaling by the unfolded protein response. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22, 487-508.

Berninsone, P., Hwang, H. Y., Zemtseva, I., Horvitz, H. R., and Hirschberg, C. B. (2001). SQV-7, a protein involved in *Caenorhabditis elegans* epithelial invagination and early embryogenesis, transports UDP-glucuronic acid, UDP-N-acetylgalactosamine, and UDP-galactose. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 3738-3743.

Berninsone, P. M. (2006). Carbohydrates and glycosylation. *WormBook*, 1-22.

Braeckman, B. P., and Vanfleteren, J. R. (2007). Genetic control of longevity in *C. elegans*. *Exp Gerontol* *42*, 90-98.

Brenner, S. (1974). The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* *77*, 71-94.

Byerly, L., Cassada, R. C., and Russell, R. L. (1976). The life cycle of the nematode *Caenorhabditis elegans*. I. Wild-type growth and reproduction. *Dev Biol* *51*, 23-33.

Caffaro, C. E., Hirschberg, C. B., and Berninsone, P. M. (2007). Functional redundancy between two *Caenorhabditis elegans* nucleotide sugar transporters with a novel transport mechanism. *J Biol Chem* *282*, 27970-27975.

Calfon, M., Zeng, H., Urano, F., Till, J. H., Hubbard, S. R., Harding, H. P., Clark, S. G., and Ron, D. (2002). IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature* *415*, 92-96.

Cipollo, J. F., Awad, A. M., Costello, C. E., and Hirschberg, C. B. (2004). *srf-3*, a mutant of *Caenorhabditis elegans*, resistant to bacterial infection and to biofilm binding, is deficient in glycoconjugates. *J Biol Chem* *279*, 52893-52903.

Cipollo, J. F., Awad, A. M., Costello, C. E., and Hirschberg, C. B. (2005). N-Glycans of *Caenorhabditis elegans* are specific to developmental stages. *J Biol Chem* *280*, 26063-26072.

Clark, R., McDonough, P., Sawnsen, E., Trost, S., Suzuki, M., Fukuda, M., and al., e. (2003). Diabetes and the accompanying hyperglycemia impairs cardiomyocyte calcium cycling through increased nuclear O-GlcNAcylation. *J Biol Chem*, 44230-44237.

Cohen, E., Bieschke, J., Perciavalle, R. M., Kelly, J. W., and Dillin, A. (2006). Opposing activities protect against age-onset proteotoxicity. *Science* *313*, 1604-1610.

Commer, F., and Hart, G. (2001). Reciprocity between O-GlcNAc and O-phosphate on the carboxyl terminal domain of RNA polymerase II. *Biochemistry*, 7845-7852.

Cristina, D., Cary, M., Lunceford, A., Clarke, C., and Kenyon, C. (2009). A regulated response to impaired respiration slows behavioral rates and increases lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet* *5*, e1000450.

Chen, D., Thomas, E. L., and Kapahi, P. (2009). HIF-1 modulates dietary restriction-mediated lifespan extension via IRE-1 in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet* *5*, e1000486.

Darby, C., Hsu, J. W., Ghori, N., and Falkow, S. (2002). *Caenorhabditis elegans*: plague bacteria biofilm blocks food intake. *Nature* *417*, 243-244.

- Daude, N., Gallaher, T. K., Zeschnick, M., Starzinski-Powitz, A., Petry, K. G., Haworth, I. S., and Reichardt, J. K. (1995). Molecular cloning, characterization, and mapping of a full-length cDNA encoding human UDP-galactose 4'-epimerase. *Biochem Mol Med* 56, 1-7.
- Dias, W., and Hart, G. (2007). O-GlcNAc modification in diabetes and Alzheimer's disease. *Mol Biosyst*, 766-772.
- Fielenbach, N., and Antebi, A. (2008). *C. elegans* dauer formation and the molecular basis of plasticity. *Genes Dev* 22, 2149-2165.
- Flodin, N. W. (1984). The senescence of postmitotic mammalian cells: a cell-clock hypothesis. *Mech Ageing Dev* 27, 15-27.
- Fridovich-Keil, J. L. (2006). Galactosemia: the good, the bad, and the unknown. *J Cell Physiol* 209, 701-705.
- Friedman, D. B., and Johnson, T. E. (1988). A mutation in the age-1 gene in *Caenorhabditis elegans* lengthens life and reduces hermaphrodite fertility. *Genetics* 118, 75-86.
- Fulop, N., Feng, W., Xing, D., He, K., Not, L., Brocks, C., and al., e. (2008). Aging leads to increased levels of protein O-linked N-acetylglucosamine in heart, aorta, brain and skeletal muscle in Brown-Norway rats. *Biogerontology*.
- Galbadage, T., and Hartman, P. S. (2008). Repeated temperature fluctuation extends the life span of *Caenorhabditis elegans* in a daf-16-dependent fashion. *Mech Ageing Dev* 129, 507-514.
- Garigan, D., Hsu, A. L., Fraser, A. G., Kamath, R. S., Ahringer, J., and Kenyon, C. (2002). Genetic analysis of tissue aging in *Caenorhabditis elegans*: a role for heat-shock factor and bacterial proliferation. *Genetics* 161, 1101-1112.
- Garsin, D. A., Sifri, C. D., Mylonakis, E., Qin, X., Singh, K. V., Murray, B. E., Calderwood, S. B., and Ausubel, F. M. (2001). A simple model host for identifying Gram-positive virulence factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 10892-10897.
- Garsin, D. A., Villanueva, J. M., Begun, J., Kim, D. H., Sifri, C. D., Calderwood, S. B., Ruvkun, G., and Ausubel, F. M. (2003). Long-lived *C. elegans* daf-2 mutants are resistant to bacterial pathogens. *Science* 300, 1921.
- Gems, D., Sutton, A. J., Sundermeyer, M. L., Albert, P. S., King, K. V., Edgley, M. L., Larsen, P. L., and Riddle, D. L. (1998). Two pleiotropic classes of daf-2 mutation affect larval arrest, adult behavior, reproduction and longevity in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 150, 129-155.
- Gitzelmann, R. (1972). Deficiency of uridine diphosphate galactose 4-epimerase in blood cells of an apparently healthy infant. Preliminary communication. *Helv Paediatr Acta* 27, 125-130.

- Gravato-Nobre, M. J., Stroud, D., O'Rourke, D., Darby, C., and Hodgkin, J. (2010). Glycosylation genes expressed in seam cells determine complex surface properties and bacterial adhesion to the cuticle of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* *187*, 141-155.
- Greer, E. L., Banko, M. R., and Brunet, A. (2009). AMP-activated protein kinase and FoxO transcription factors in dietary restriction-induced longevity. *Ann N Y Acad Sci* *1170*, 688-692.
- Greer, E. L., and Brunet, A. (2009). Different dietary restriction regimens extend lifespan by both independent and overlapping genetic pathways in *C. elegans*. *Aging Cell* *8*, 113-127.
- Greer, E. L., Dowlatshahi, D., Banko, M. R., Villen, J., Hoang, K., Blanchard, D., Gygi, S. P., and Brunet, A. (2007). An AMPK-FOXO pathway mediates longevity induced by a novel method of dietary restriction in *C. elegans*. *Curr Biol* *17*, 1646-1656.
- Griffitts, J. S., Huffman, D. L., Whitacre, J. L., Barrows, B. D., Marroquin, L. D., Muller, R., Brown, J. R., Hennet, T., Esko, J. D., and Aroian, R. V. (2003). Resistance to a bacterial toxin is mediated by removal of a conserved glycosylation pathway required for toxin-host interactions. *J Biol Chem* *278*, 45594-45602.
- Griffitts, J. S., Whitacre, J. L., Stevens, D. E., and Aroian, R. V. (2001). Bt toxin resistance from loss of a putative carbohydrate-modifying enzyme. *Science* *293*, 860-864.
- Guan, D., Wang, H., Li, V. E., Xu, Y., Yang, M., and Shen, Z. (2009). N-glycosylation of ATF6beta is essential for its proteolytic cleavage and transcriptional repressor function to ATF6alpha. *J Cell Biochem* *108*, 825-831.
- Guarente, L., and Kenyon, C. (2000). Genetic pathways that regulate ageing in model organisms. *Nature* *408*, 255-262.
- Hansen, M., Taubert, S., Crawford, D., Libina, N., Lee, S. J., and Kenyon, C. (2007). Lifespan extension by conditions that inhibit translation in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell* *6*, 95-110.
- Hart, G., Housley, M., and C., S. (2007). Cycling of O-linked beta-N-acetylglucosamine on nucleocytoplasmatic proteins. *Nature*, 1017-1022.
- Hay, N., and Sonenberg, N. (2004). Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev*, 1926-1945.
- Helenius, A., and Aebi, M. (2001). Intracellular functions of N-linked glycans. *Science* *291*, 2364-2369.
- Helenius, A., and Aebi, M. (2004). Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annu Rev Biochem* *73*, 1019-1049.

- Henderson, S. T., and Johnson, T. E. (2001). *daf-16* integrates developmental and environmental inputs to mediate aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Curr Biol* *11*, 1975-1980.
- Henis-Korenblit, S., Zhang, P., Hansen, M., McCormick, M., Lee, S. J., Cary, M., and Kenyon, C. (2010). Insulin/IGF-1 signaling mutants reprogram ER stress response regulators to promote longevity. *Proc Natl Acad Sci U S A* *107*, 9730-9735.
- Herman, T., Hartweg, E., and Horvitz, H. R. (1999). *sqv* mutants of *Caenorhabditis elegans* are defective in vulval epithelial invagination. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 968-973.
- Hertweck, M., Gobel, C., and Baumeister, R. (2004). *C. elegans* SGK-1 is the critical component in the Akt/PKB kinase complex to control stress response and life span. *Dev Cell* *6*, 577-588.
- Hodgkin, J., and Herman, R. K. (1998). Changing styles in *C. elegans* genetics. *Trends Genet* *14*, 352-357.
- Holden, H. M., Rayment, I., and Thoden, J. B. (2003). Structure and function of enzymes of the Leloir pathway for galactose metabolism. *J Biol Chem* *278*, 43885-43888.
- Holton, J. B., Gillett, M. G., MacFaul, R., and Young, R. (1981). Galactosaemia: a new severe variant due to uridine diphosphate galactose-4-epimerase deficiency. *Arch Dis Child* *56*, 885-887.
- Holton JB, W. J., Tyfield LA (2000). Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease., In Galactosemia, B. A. Scriver C, Sly W, Valle D, Childs B, Kinzler K, Vogelstein B., ed. (New York: McGraw Hill), pp. 1553-1587.
- Hong, M., Luo, S., Baumeister, P., Huang, J. M., Gogia, R. K., Li, M., and Lee, A. S. (2004). Underglycosylation of ATF6 as a novel sensing mechanism for activation of the unfolded protein response. *J Biol Chem* *279*, 11354-11363.
- Honjoh, S., Yamamoto, T., Uno, M., and Nishida, E. (2009). Signalling through RHEB-1 mediates intermittent fasting-induced longevity in *C. elegans*. *Nature* *457*, 726-730.
- Horwitz, J. (1992). Alpha-crystallin can function as a molecular chaperone. *Proc Natl Acad Sci U S A* *89*, 10449-10453.
- Hosono, R., Mitsui, Y., Sato, Y., Aizawa, S., and Miwa, J. (1982). Life span of the wild and mutant nematode *Caenorhabditis elegans*. Effects of sex, sterilization, and temperature. *Exp Gerontol* *17*, 163-172.
- Hotamisligil, G. S. (2010). Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. *Cell* *140*, 900-917.
- Houthoofd, K., Braeckman, B. P., Lenaerts, I., Brys, K., De Vreese, A., Van Eygen, S., and Vanfleteren, J. R. (2002a). Axenic growth up-regulates mass-specific metabolic

rate, stress resistance, and extends life span in *Caenorhabditis elegans*. *Exp Gerontol* 37, 1371-1378.

Houthoofd, K., Braeckman, B. P., Lenaerts, I., Brys, K., De Vreese, A., Van Eygen, S., and Vanfleteren, J. R. (2002b). No reduction of metabolic rate in food restricted *Caenorhabditis elegans*. *Exp Gerontol* 37, 1359-1369.

Hsin, H., and Kenyon, C. (1999). Signals from the reproductive system regulate the lifespan of *C. elegans*. *Nature* 399, 362-366.

Hsu, A. L., Murphy, C. T., and Kenyon, C. (2003). Regulation of aging and age-related disease by DAF-16 and heat-shock factor. *Science* 300, 1142-1145.

Hunt-Newbury, R., Viveiros, R., Johnsen, R., Mah, A., Anastas, D., Fang, L., Halfnight, E., Lee, D., Lin, J., Lorch, A., *et al.* (2007). High-throughput in vivo analysis of gene expression in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Biol* 5, e237.

Hwang, H. Y., and Horvitz, H. R. (2002). The SQV-1 UDP-glucuronic acid decarboxylase and the SQV-7 nucleotide-sugar transporter may act in the Golgi apparatus to affect *Caenorhabditis elegans* vulval morphogenesis and embryonic development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 14218-14223.

Hwang, H. Y., Olson, S. K., Esko, J. D., and Horvitz, H. R. (2003). *Caenorhabditis elegans* early embryogenesis and vulval morphogenesis require chondroitin biosynthesis. *Nature* 423, 439-443.

Ihara, S., and Nishiwaki, K. (2007). Prodomain-dependent tissue targeting of an ADAMTS protease controls cell migration in *Caenorhabditis elegans*. *Embo J* 26, 2607-2620.

Ingram, D. K., Roth, G. S., Lane, M. A., Ottinger, M. A., Zou, S., de Cabo, R., and Mattison, J. A. (2006). The potential for dietary restriction to increase longevity in humans: extrapolation from monkey studies. *Biogerontology* 7, 143-148.

Jia, K., Chen, D., and Riddle, D. L. (2004). The TOR pathway interacts with the insulin signaling pathway to regulate *C. elegans* larval development, metabolism and life span. *Development* 131, 3897-3906.

Johnston, W. L., Krizus, A., and Dennis, J. W. (2006). The eggshell is required for meiotic fidelity, polar-body extrusion and polarization of the *C. elegans* embryo. *BMC Biol* 4, 35.

Joshua, G. W., Karlyshev, A. V., Smith, M. P., Isherwood, K. E., Titball, R. W., and Wren, B. W. (2003). A *Caenorhabditis elegans* model of *Yersinia* infection: biofilm formation on a biotic surface. *Microbiology* 149, 3221-3229.

Kaji, H., Kamiie, J., Kawakami, H., Kido, K., Yamauchi, Y., Shinkawa, T., Taoka, M., Takahashi, N., and Isobe, T. (2007). Proteomics reveals N-linked glycoprotein diversity in *Caenorhabditis elegans* and suggests an atypical translocation mechanism for integral membrane proteins. *Mol Cell Proteomics* 6, 2100-2109.

- Kalckar, H. M. (1965). Galactose metabolism and cell "sociology". *Science* 150, 305-313.
- Karlsson, K. A. (2001). Pathogen-host protein-carbohydrate interactions as the basis of important infections. *Adv Exp Med Biol* 491, 431-443.
- Kaufman, R. J., Scheuner, D., Schroder, M., Shen, X., Lee, K., Liu, C. Y., and Arnold, S. M. (2002). The unfolded protein response in nutrient sensing and differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 411-421.
- Kawano, T., Ito, Y., Ishiguro, M., Takuwa, K., Nakajima, T., and Kimura, Y. (2000). Molecular cloning and characterization of a new insulin/IGF-like peptide of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Biochem Biophys Res Commun* 273, 431-436.
- Kenyon, C. (2011). The first long-lived mutants: discovery of the insulin/IGF-1 pathway for ageing. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 9-16.
- Kenyon, C., Chang, J., Gensch, E., Rudner, A., and Tabtiang, R. (1993). A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature* 366, 461-464.
- Kenyon, C. J. (2010). The genetics of ageing. *Nature* 464, 504-512.
- Kimura, K. D., Tissenbaum, H. A., Liu, Y., and Ruvkun, G. (1997). *daf-2*, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 277, 942-946.
- Kingsley, D. M., Kozarsky, K. F., Hobbie, L., and Krieger, M. (1986). Reversible defects in O-linked glycosylation and LDL receptor expression in a UDP-Gal/UDP-GalNAc 4-epimerase deficient mutant. *Cell* 44, 749-759.
- Kirkwood, T. B., Boys, R. J., Gillespie, C. S., Proctor, C. J., Shanley, D. P., and Wilkinson, D. J. (2003). Towards an e-biology of ageing: integrating theory and data. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 243-249.
- Kirkwood, T. B., and Rose, M. R. (1991). Evolution of senescence: late survival sacrificed for reproduction. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 332, 15-24.
- Kitagawa, H., Izumikawa, T., Mizuguchi, S., Dejima, K., Nomura, K. H., Egusa, N., Taniguchi, F., Tamura, J., Gengyo-Ando, K., Mitani, S., *et al.* (2007). Expression of *rib-1*, a *Caenorhabditis elegans* homolog of the human tumor suppressor EXT genes, is indispensable for heparan sulfate synthesis and embryonic morphogenesis. *J Biol Chem* 282, 8533-8544.
- Klass, M. R. (1977). Aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*: major biological and environmental factors influencing life span. *Mech Ageing Dev* 6, 413-429.
- Klass, M. R. (1983). A method for the isolation of longevity mutants in the nematode *Caenorhabditis elegans* and initial results. *Mech Ageing Dev* 22, 279-286.

- Krieger, M., Reddy, P., Kozarsky, K., Kingsley, D., Hobbie, L., and Penman, M. (1989). Analysis of the synthesis, intracellular sorting, and function of glycoproteins using a mammalian cell mutant with reversible glycosylation defects. *Methods Cell Biol* 32, 57-84.
- Kubota, Y., Sano, M., Goda, S., Suzuki, N., and Nishiwaki, K. (2006). The conserved oligomeric Golgi complex acts in organ morphogenesis via glycosylation of an ADAM protease in *C. elegans*. *Development* 133, 263-273.
- Kuwabara, P. E., and O'Neil, N. (2001). The use of functional genomics in *C. elegans* for studying human development and disease. *J Inherit Metab Dis* 24, 127-138.
- Kwon, E. S., Narasimhan, S. D., Yen, K., and Tissenbaum, H. A. (2010). A new DAF-16 isoform regulates longevity. *Nature* 466, 498-502.
- Landis, J. N., and Murphy, C. T. (2010). Integration of diverse inputs in the regulation of *Caenorhabditis elegans* DAF-16/FOXO. *Dev Dyn* 239, 1405-1412.
- Lazarus, B., Love, D., and Hanover, J. (2009). O-GlcNAc cycling: Implications for neurodegenerative disorders. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2134-2146.
- Lee, A. S. (1992). Mammalian stress response: induction of the glucose-regulated protein family. *Curr Opin Cell Biol* 4, 267-273.
- Lee, R. Y., Hench, J., and Ruvkun, G. (2001). Regulation of *C. elegans* DAF-16 and its human ortholog FKHRL1 by the *daf-2* insulin-like signaling pathway. *Curr Biol* 11, 1950-1957.
- Lee, S. S., Kennedy, S., Tolonen, A. C., and Ruvkun, G. (2003). DAF-16 target genes that control *C. elegans* life-span and metabolism. *Science* 300, 644-647.
- Lee, W., Kim, K. A., Singaravelu, G., Park, B.-J., Kim, D. H., Ahn, J., and Yoo, Y. J. (2006). Alternative chaperone machinery may compensate for calreticulin/calnexin deficiency in *Caenorhabditis elegans*. *Proteomics*, 1329-1339.
- Lithgow, G. J., and Walker, G. A. (2002). Stress resistance as a determinant of *C. elegans* lifespan. *Mech Ageing Dev* 123, 765-771.
- Liu, J., Marchase, R., and Chatham, J. (2007). Glutamine-induced protection of isolated rat heart from ischemia/reperfusion injury is mediated via the hexosamine biosynthesis pathway and increased protein O-GlcNAc levels. *J Mol Cell Cardiol*, 177-185.
- Maier, W., Adilov, B., Regenass, M., and Alcedo, J. (2010). A neuromedin U receptor acts with the sensory system to modulate food type-dependent effects on *C. elegans* lifespan. *PLoS Biol* 8, e1000376.
- Mair, W., and Dillin, A. (2008). Aging and survival: the genetics of life span extension by dietary restriction. *Annu Rev Biochem* 77, 727-754.

- Maley, F., and Maley, G. F. (1959). The enzymic conversion of glucosamine to galactosamine. *Biochim Biophys Acta* *31*, 577-578.
- Malhotra, J. D., and Kaufman, R. J. (2007). The endoplasmic reticulum and the unfolded protein response. *Semin Cell Dev Biol* *18*, 716-731.
- Marroquin, L. D., Elyassnia, D., Griffiths, J. S., Feitelson, J. S., and Aroian, R. V. (2000). *Bacillus thuringiensis* (Bt) toxin susceptibility and isolation of resistance mutants in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* *155*, 1693-1699.
- Masaro, E. J. (2005). Overview of caloric restriction and ageing. *Mech Ageing Dev*, 913-922.
- McElwee, J., Bubb, K., and Thomas, J. H. (2003). Transcriptional outputs of the *Caenorhabditis elegans* forkhead protein DAF-16. *Aging Cell* *2*, 111-121.
- Medvedev, Z. A. (1990). An attempt at a rational classification of theories of ageing. *Biol Rev Camb Philos Soc* *65*, 375-398.
- Millet, K. G., and Ewbank, J. J. (2004). Immunity in *C. elegans*. *Curr Opin Immunol*, 4-9.
- Monje, J. (2010) Nuevos loci implicados en el control de la longevidad y formación de dauer en *Caenorhabditis elegans*. El papel de *pkc-1*, Pablo de Olavide Sevilla.
- Morio, H., Honda, Y., Toyoda, H., Nakajima, M., Kurosawa, H., and Shirasawa, T. (2003). EXT gene family member *rib-2* is essential for embryonic development and heparan sulfate biosynthesis in *Caenorhabditis elegans*. *Biochem Biophys Res Commun* *301*, 317-323.
- Munoz, M. J., and Riddle, D. L. (2003). Positive selection of *Caenorhabditis elegans* mutants with increased stress resistance and longevity. *Genetics* *163*, 171-180.
- Murphy, C. T., Lee, S. J., and Kenyon, C. (2007). Tissue entrainment by feedback regulation of insulin gene expression in the endoderm of *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 19046-19050.
- Murphy, C. T., McCarroll, S. A., Bargmann, C. I., Fraser, A., Kamath, R. S., Ahringer, J., Li, H., and Kenyon, C. (2003). Genes that act downstream of DAF-16 to influence the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Nature* *424*, 277-283.
- Nicholas, H. R., and Hodgkin, J. (2004). The ERK MAP kinase cascade mediates tail swelling and a protective response to rectal infection in *C. elegans*. *Curr Biol*, 1256-1261.
- Nishiwaki, K. (1999). Mutations affecting symmetrical migration of distal tip cells in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* *152*, 985-997.
- Nishiwaki, K., Hisamoto, N., and Matsumoto, K. (2000). A metalloprotease disintegrin that controls cell migration in *Caenorhabditis elegans*. *Science* *288*, 2205-2208.

- Nishiwaki, K., Kubota, Y., Chigira, Y., Roy, S. K., Suzuki, M., Schvarzstein, M., Jigami, Y., Hisamoto, N., and Matsumoto, K. (2004). An NDPase links ADAM protease glycosylation with organ morphogenesis in *C. elegans*. *Nat Cell Biol* 6, 31-37.
- Novelli, J. F., Chaudhary, K., Canovas, J., Benner, J. S., Madinger, C. L., Kelly, P., Hodgkin, J., and Carlow, C. K. (2009). Characterization of the *Caenorhabditis elegans* UDP-galactopyranose mutase homolog *glf-1* reveals an essential role for galactofuranose metabolism in nematode surface coat synthesis. *Dev Biol* 335, 340-355.
- Ogg, S., Paradis, S., Gottlieb, S., Patterson, G. I., Lee, L., Tissenbaum, H. A., and Ruvkun, G. (1997). The Fork head transcription factor DAF-16 transduces insulin-like metabolic and longevity signals in *C. elegans*. *Nature* 389, 994-999.
- Ogg, S., and Ruvkun, G. (1998). The *C. elegans* PTEN homolog, DAF-18, acts in the insulin receptor-like metabolic signaling pathway. *Mol Cell* 2, 887-893.
- Olsen, A., Vantipalli, M. C., and Lithgow, G. J. (2006). Lifespan extension of *Caenorhabditis elegans* following repeated mild hormetic heat treatments. *Biogerontology* 7, 221-230.
- Openo, K. K., Schulz, J. M., Vargas, C. A., Orton, C. S., Epstein, M. P., Schnur, R. E., Scaglia, F., Berry, G. T., Gottesman, G. S., Ficicioglu, C., *et al.* (2006). Epimerase-deficiency galactosemia is not a binary condition. *Am J Hum Genet* 78, 89-102.
- Oyadomari, S., Yun, C., Fisher, E. A., Kreglinger, N., Kreibich, G., Oyadomari, M., Harding, H. P., Goodman, A. G., Harant, H., Garrison, J. L., *et al.* (2006). Cotranslocational degradation protects the stressed endoplasmic reticulum from protein overload. *Cell* 126, 727-739.
- Panowski, S. H., Wolff, S., Aguilaniu, H., Durieux, J., and Dillin, A. (2007). PHA-4/Foxa mediates diet-restriction-induced longevity of *C. elegans*. *Nature* 447, 550-555.
- Paradis, S., Ailion, M., Toker, A., Thomas, J. H., and Ruvkun, G. (1999). A PDK1 homolog is necessary and sufficient to transduce AGE-1 PI3 kinase signals that regulate diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev* 13, 1438-1452.
- Paradis, S., and Ruvkun, G. (1998). *Caenorhabditis elegans* Akt/PKB transduces insulin receptor-like signals from AGE-1 PI3 kinase to the DAF-16 transcription factor. *Genes Dev* 12, 2488-2498.
- Pierce, S. B., Costa, M., Wisotzkey, R., Devadhar, S., Homburger, S. A., Buchman, A. R., Ferguson, K. C., Heller, J., Platt, D. M., Pasquinelli, A. A., *et al.* (2001). Regulation of DAF-2 receptor signaling by human insulin and *ins-1*, a member of the unusually large and diverse *C. elegans* insulin gene family. *Genes Dev* 15, 672-686.
- Piller, F., Hanlon, M. H., and Hill, R. L. (1983). Co-purification and characterization of UDP-glucose 4-epimerase and UDP-N-acetylglucosamine 4-epimerase from porcine submaxillary glands. *J Biol Chem* 258, 10774-10778.

- Prehm, P., Schmidt, G., Jann, B., and Jann, K. (1976). The cell-wall lipopolysaccharide of *Escherichia coli* K-12. Structure and acceptor site for O-antigen and other substituents. *Eur J Biochem* *70*, 171-177.
- Prehm, P., Stirm, S., Jann, B., and Jann, K. (1975). Cell-wall lipopolysaccharide from *Escherichia coli* B. *Eur J Biochem* *56*, 41-55.
- Rahme, L. G., Stevens, E. J., Wolfort, S. F., Shao, J., Tompkins, R. G., and Ausubel, F. M. (1995). Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. *Science* *268*, 1899-1902.
- Ross, K. L., Davis, C. N., and Fridovich-Keil, J. L. (2004). Differential roles of the Leloir pathway enzymes and metabolites in defining galactose sensitivity in yeast. *Mol Genet Metab* *83*, 103-116.
- Sanders, R. D., Sefton, J. M., Moberg, K. H., and Fridovich-Keil, J. L. (2010). UDP-galactose 4' epimerase (GALE) is essential for development of *Drosophila melanogaster*. *Dis Model Mech* *3*, 628-638.
- Schmelzle, T., and Hall, M. N. (2000). TOR, a central controller of cell growth. *Cell* *103*, 253-262.
- Schroder, M., and Kaufman, R. J. (2005a). ER stress and the unfolded protein response. *Mutat Res* *569*, 29-63.
- Schroder, M., and Kaufman, R. J. (2005b). The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem* *74*, 739-789.
- Schulz, J. M., Ross, K. L., Malmstrom, K., Krieger, M., and Fridovich-Keil, J. L. (2005). Mediators of galactose sensitivity in UDP-galactose 4'-epimerase-impaired mammalian cells. *J Biol Chem* *280*, 13493-13502.
- Schulz, J. M., Watson, A. L., Sanders, R., Ross, K. L., Thoden, J. B., Holden, H. M., and Fridovich-Keil, J. L. (2004). Determinants of function and substrate specificity in human UDP-galactose 4'-epimerase. *J Biol Chem* *279*, 32796-32803.
- Shen, X., Ellis, R. E., Lee, K., Liu, C. Y., Yang, K., Solomon, A., Yoshida, H., Morimoto, R., Kurnit, D. M., Mori, K., and Kaufman, R. J. (2001). Complementary signaling pathways regulate the unfolded protein response and are required for *C. elegans* development. *Cell* *107*, 893-903.
- Shen, X., Ellis, R. E., Sakaki, K., and Kaufman, R. J. (2005). Genetic interactions due to constitutive and inducible gene regulation mediated by the unfolded protein response in *C. elegans*. *PLoS Genet* *1*, e37.
- Shiu, R. P., Pouyssegur, J., and Pastan, I. (1977). Glucose depletion accounts for the induction of two transformation-sensitive membrane proteins in Rous sarcoma virus-transformed chick embryo fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* *74*, 3840-3844.

- Steinkraus, K. A., Smith, E. D., Davis, C., Carr, D., Pendergrass, W. R., Sutphin, G. L., Kennedy, B. K., and Kaeberlein, M. (2008). Dietary restriction suppresses proteotoxicity and enhances longevity by an hsf-1-dependent mechanism in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell* 7, 394-404.
- Sulston, J. E., and Horvitz, H. R. (1977). Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 56, 110-156.
- Suzuki, N., Toyoda, H., Sano, M., and Nishiwaki, K. (2006). Chondroitin acts in the guidance of gonadal distal tip cells in *C. elegans*. *Dev Biol* 300, 635-646.
- Syntichaki, P., Troulinaki, K., and Tavernarakis, N. (2007). eIF4E function in somatic cells modulates ageing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 445, 922-926.
- Szewczyk, N. J., Udranszky, I. A., Kozak, E., Sunga, J., Kim, S. K., Jacobson, L. A., and Conley, C. A. (2006). Delayed development and lifespan extension as features of metabolic lifestyle alteration in *C. elegans* under dietary restriction. *J Exp Biol* 209, 4129-4139.
- Tatar, M., Bartke, A., and Antebi, A. (2003). The endocrine regulation of aging by insulin-like signals. *Science* 299, 1346-1351.
- Thoden, J. B., and Holden, H. M. (1998). Dramatic differences in the binding of UDP-galactose and UDP-glucose to UDP-galactose 4-epimerase from *Escherichia coli*. *Biochemistry* 37, 11469-11477.
- Thoden, J. B., Wohlers, T. M., Fridovich-Keil, J. L., and Holden, H. M. (2000). Crystallographic evidence for Tyr 157 functioning as the active site base in human UDP-galactose 4-epimerase. *Biochemistry* 39, 5691-5701.
- Thoden, J. B., Wohlers, T. M., Fridovich-Keil, J. L., and Holden, H. M. (2001). Human UDP-galactose 4-epimerase. Accommodation of UDP-N-acetylglucosamine within the active site. *J Biol Chem* 276, 15131-15136.
- Timson, D. J. (2006). The structural and molecular biology of type III galactosemia. *IUBMB Life* 58, 83-89.
- Tissenbaum, H. A., and Guarente, L. (2001). Increased dosage of a sir-2 gene extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 410, 227-230.
- Troemel, E. R., Chu, S. W., Reinke, V., Lee, S. S., Ausubel, F. M., and Kim, D. H. (2006). p38 MAPK Regulates Expression of Immune Response Genes and Contributes to Longevity in *C. elegans*. *PLoS Genet* 2, 1725-1739.
- Tyfield, L., and Walter, J. (2002). The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease., In *Galactosemia*, B. A. Scriver C, Sly W, Valle D, Childs B, Kinzler K, Vogelstein B., ed. (New York: McGraw-Hill).
- Varki, A. (1993). Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology*, 97-130.

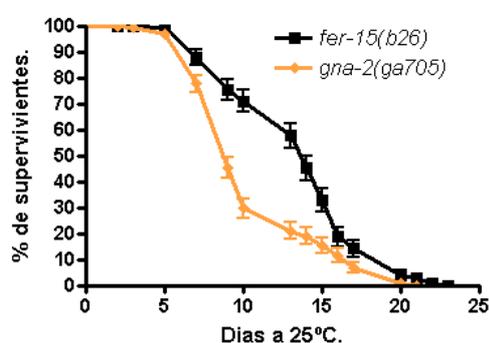
- Vaupel, J. (1997). Trajectories of Mortality at Advanced Ages, In Betwvn Zeus and de Salmon. The biodemography of Longevity, K. W. W. a. C. E. Finch, ed. (Washington D.C.: National Academic Press), pp. 17-37.
- Vellai, T., Takacs-Vellai, K., Zhang, Y., Kovacs, A. L., Orosz, L., and Muller, F. (2003). Genetics: influence of TOR kinase on lifespan in *C. elegans*. *Nature* *426*, 620.
- Viswanathan, M., Kim, S. K., Berdichevsky, A., and Guarente, L. (2005). A role for SIR-2.1 regulation of ER stress response genes in determining *C. elegans* life span. *Dev Cell* *9*, 605-615.
- Walter, J. H., Roberts, R. E., Besley, G. T., Wraith, J. E., Cleary, M. A., Holton, J. B., and MacFaul, R. (1999). Generalised uridine diphosphate galactose-4-epimerase deficiency. *Arch Dis Child* *80*, 374-376.
- Weinbruch, R. H., and Walford, R. L. (1988). *The Retardation of Aging and Disease by Dietary Restriction.*: Springfield).
- Weinkove, D., Halstead, J. R., Gems, D., and Divecha, N. (2006). Long-term starvation and ageing induce AGE-1/PI 3-kinase-dependent translocation of DAF-16/FOXO to the cytoplasm. *BMC Biol* *4*, 1.
- White, J. G., Southgate, E., Thomson, J. N., and Brenner, S. (1986). The structure of the nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans*).
- Wicks, S. R., Yeh, R. T., Gish, W. R., Waterston, R. H., and Plasterk, R. H. (2001). Rapid gene mapping in *Caenorhabditis elegans* using a high density polymorphism map. *Nat Genet* *28*, 160-164.
- Williams, B. D., Schrank, B., Huynh, C., Shownkeen, R., and Waterston, R. H. (1992). A genetic mapping system in *Caenorhabditis elegans* based on polymorphic sequence-tagged sites. *Genetics* *131*, 609-624.
- Wohlers, T. M., Christacos, N. C., Harreman, M. T., and Fridovich-Keil, J. L. (1999). Identification and characterization of a mutation, in the human UDP-galactose-4-epimerase gene, associated with generalized epimerase-deficiency galactosemia. *Am J Hum Genet* *64*, 462-470.
- Wohlers, T. M., and Fridovich-Keil, J. L. (2000). Studies of the V94M-substituted human UDPgalactose-4-epimerase enzyme associated with generalized epimerase-deficiency galactosaemia. *J Inherit Metab Dis* *23*, 713-729.
- Wolkow, C. A., Kimura, K. D., Lee, M. S., and Ruvkun, G. (2000). Regulation of *C. elegans* life-span by insulinlike signaling in the nervous system. *Science* *290*, 147-150.
- Wolkow, C. A., Munoz, M. J., Riddle, D. L., and Ruvkun, G. (2002). Insulin receptor substrate and p55 orthologous adaptor proteins function in the *Caenorhabditis elegans* daf-2/insulin-like signaling pathway. *J Biol Chem* *277*, 49591-49597.

Youngman, P., Perkins, J. B., and Losick, R. (1984a). Construction of a cloning site near one end of Tn917 into which foreign DNA may be inserted without affecting transposition in *Bacillus subtilis* or expression of the transposon-borne *erm* gene. *Plasmid* 12, 1-9.

Youngman, P., Perkins, J. B., and Losick, R. (1984b). A novel method for the rapid cloning in *Escherichia coli* of *Bacillus subtilis* chromosomal DNA adjacent to Tn917 insertions. *Mol Gen Genet* 195, 424-433.

Tampoco se observó un incremento de longevidad en mutantes con malformación de gónadas como mig-17 (proteína N-glicosilada), ni en mig-23 (NDPasa cuya actividad es indispensable para la fabricación de nuevos azúcares nucleosidos en el Aparato de Golgi), ni en mig-22 (cofactor con sqv-5 en la síntesis y polimerización del condroitin), (Figura 2.29 A-B-C).

Por otra parte, la enzima glucosamina 6-fosfato Nacetiltransferasa, *gna-2*, forma parte de la ruta de las hexosaminas para la síntesis de UDP-NAglu, el cual es necesario para la formación de UDP-NAgal a través de *gale-1*. El perfil de UDP-azúcares de *gna-2(qa705)* muestra niveles de UDP-NAglu no detectables y una disminución del 19% [MM1]de UDP-NAgal con niveles normales de UDP-gal y UDP-glu (Johnston et al., 2006), mientras *gale-1(pv18)* tiene niveles bajos de UDP-NAgal, alto de UDP-gal y niveles normales de UDP-NAglu y UDP-glu, por esta razón se determinó la longevidad para ver si por un desequilibrio en los UDP-azúcares era posible incrementar la longevidad. La curva de longevidad realizada al mutante *gna-2(qa705)* muestra que no



es longevo (Figura 2.30.), un dato mas para sugerir que la longevidad es una circunstancia específica de *gale-1(pv18)* y no de cualquier tipo de mutantes afectados en los perfiles de UDP-azúcares necesarios para la glicosilación ni en la propia glicosilación.

de proteínas mal plegadas

su expresión es fuertemente

que induce estrés en el RE

, esta cepa es comúnmente utilizada como un marcador del grado de estrés en RE producido por genes o factores externos adversos, por lo que la utilizamos para saber si *gale-1(pv18)* produce estrés en el RE. En pruebas iniciales *hsp-4::gfp* fue tratado con RNAi de *xbp-1* y pL4440 vacío a 20 y 25°C observándose un aumento en la intensidad de la fluorescencia de *hsp-4* en pL4440 a 25°C comparado con pL4440 a 20°C y ninguna fluorescencia fue observada en RNAi de *xbp-1* a ambas temperaturas. Como el estrés de *hsp-4::gfp* a 25°C es muy alta y podría alcanzar la saturación y a 16°C (temperatura de crecimiento de *gale-1(pv18)*), es muy tenue, los experimentos fueron realizados a 20°C.

Página 84: [7] Eliminado	Manolo M	22/06/2011 17:38:00
---------------------------------	-----------------	----------------------------

llegando a ser igual a *hsp-4::gfp* creciendo en RNAi de *xbp-1*

Página 84: [8] Comentario [MM48]	Manolo M	23/06/2011 19:39:00
---	-----------------	----------------------------

Es cierto