

RNA de interferencia en *Caenorhabditis elegans*

Resumen

Caenorhabditis elegans es un nematodo de vida libre que mide 1 mm de largo en estadio adulto, cuya hábitat natural está siempre asociada al suelo, y presenta dos dimorfismos sexuales: macho y hermafrodita. Se caracterizan por crecer fácilmente sobre agar -en placas de Petri- suplementadas con *Escherichia coli* como fuente de alimento. Son fácilmente observables con lupa o microscopio de bajo aumento, de manera que no se requiere gran equipamiento para su estudio. Por otro lado, el mecanismo post-transcripcional de silenciamiento génico mediado por RNA (denominado también RNA de interferencia, o RNAi) fue descubierto inicialmente en *C. elegans*. El RNAi es una efectiva herramienta para el estudio de funciones génicas en diferentes organismos, y es exitosamente aplicado en *C. elegans* para estudiar la función de sus genes. Debido a las diversas aplicaciones biotecnológicas del RNAi en estos nematodos, en este trabajo se pretende evaluar la utilidad del silenciamiento génico post-transcripcional en el modelo animal *C. elegans* (cepa *wild type*). En particular, se alimentarán nematodos adultos con bacterias modificadas genéticamente que expresan los RNAi, y se analizará el fenotipo obtenido.

Palabras clave: *Caenorhabditis elegans*, RNAi, RNAi feeding, Ahringer library.

Estado del arte

Caenorhabditis elegans es un gusano nematodo que mide aproximadamente 1 milímetro de longitud y vive libre en el suelo en ambientes templados. En el laboratorio, los animales se crecen normalmente en placas de Petri con un medio sólido NGM (del inglés, *Nematode Growth Medium*) y se alimentan con una pátina de la bacteria *Escherichia coli* (las cepas más utilizadas son la OP50 y la HB101) (Kiontke K., 2006). Fue propuesto como modelo de estudio en los años '70 de la década pasada por el científico Sydney Brenner, y desde entonces ha sido utilizado en diversos estudios genéticos, debido a su caracterizada genética (Brenner S., 1974).

Algunas ventajas que proporciona *C. elegans* como sistema experimental son: (1) es un animal con los rudimentos de los sistemas fisiológicos (alimentario, nervioso, muscular y reproductivo) que se encuentran en los animales superiores como los ratones y los humanos; (2) se pueden crecer fácilmente sobre agar -en placas de Petri- o en medio líquido, en ambos casos suplementado con *E. coli* como fuente de alimento; (3) puede poner de 200 a 300 huevos que en dos días llegan a estado semiadulto; (4) posee alrededor de 17.800 genes codificantes de proteínas en su genoma, el cual ha sido secuenciado completamente (sus células contienen 5 pares de autosomas y, usualmente, 2 cromosomas X); (5) la mayoría del tiempo se autofecundan, de manera que cualquier alelo

recesivo se vuelve rápidamente homocigoto y afecta al fenotipo; (6) después de 3 semanas muere, mostrando signos de envejecimiento; y (7) el proceso de *screening* genético resulta relativamente sencillo.

El término “RNA de interferencia” se refiere al mecanismo post-transcripcional de silenciamiento génico, mediado por RNA. Fue descubierto inicialmente en *C. elegans* (Fire, et al., 1998), pero luego se comprobó que existe en casi todos los organismos eucariotas estudiados hasta el momento (animales, plantas, etc.). En este proceso, fragmentos de RNA doble cadena (dsRNA) promueven la degradación específica de un mensajero de RNA de secuencia complementaria (Siomi y Siomi, 2009). El proceso de silenciamiento ocurre en tres etapas. En la primera, moléculas de dsRNA dentro de la célula son procesadas por la endonucleasa Dicer a RNA de menor tamaño (20-25nt). Estas moléculas reciben el nombre de siRNA (*small interfering*). En una segunda etapa, los siRNA se incorporan a un complejo proteico denominado RISC (*RNA-induced silencing complex*), el cual permite la unión al mensajero blanco por complementariedad de bases. Finalmente, RISC cataliza cortes en la cadena del mRNA blanco, bloqueando de esta manera la síntesis de la proteína correspondiente (Jinek y Doudna, 2009).

Además, existen microRNAs codificados a nivel genómico vinculados a la regulación del desarrollo. La actividad de los microRNAs depende de la complementariedad entre su secuencia y la correspondiente del mRNA blanco. Cuando existe una complementariedad perfecta se induce la degradación del mRNA por la vía de RNA de interferencia (RNAi). Una complementariedad imperfecta con el mRNA blanco, permite la regulación post-transcripcional del mismo.

El RNAi es una efectiva herramienta para el estudio de funciones génicas en diferentes organismos, y es exitosamente aplicado en *C. elegans* para estudiar la función de sus genes (Kamath, et al. 2003; Simmer, et al. 2003; Aristizabal-Corrales, et al. 2012). En este nematodo existen tres métodos de *delivery* de dsRNA: (1) microinyección del dsRNA, (2) inmersión de los nematodos en un medio conteniendo el dsRNA, y (3) alimentación de estos organismos con bacterias modificadas mediante ingeniería genética que expresan el dsRNA (RNAi *feeding*). En este último caso, la secuencia de DNA de interés es clonada en un vector de expresión, bajo control del promotor del bacteriófago T7. El plásmido recombinante es transformado en una cepa de bacterias, BL21(DE3), que expresa la polimerasa del fago T7 bajo el control de un promotor inducible (*lac*). Esta cepa de bacteria es RNAasalll- (Timmons, et al. 2001). En los experimentos de RNAi con *C. elegans*, un aspecto importante a tener en cuenta es el estadio del desarrollo en el que se encuentran los nematodos. El más favorable depende del tipo de gen que se quiera silenciar. En general, las larvas L1 son utilizadas para maximizar la exposición de los dsRNA. La temperatura puede también afectar el fenotipo. Temperaturas entre 15 – 25°C son recomendadas.

Hipótesis

En el laboratorio, *Caenorhabditis elegans* puede crecer normalmente en placas de Petri con un medio sólido NGM suplementado con IPTG, ampicilina y tetraciclina, y puede alimentarse con una pátina de la bacteria *Escherichia coli* cepa HT115DE3 que expresa un dsRNA de interés. Además, dado que el RNAi es una herramienta muy utilizada para el estudio de funciones génicas en diversos organismos, se podrá aplicar en *C. elegans* para estudiar la función de sus genes.

Objetivo general

Evaluar la utilidad del silenciamiento génico postranscripcional en el modelo animal *C. elegans* (cepa *wild type*), y de esta forma poder utilizar este organismo modelo en investigación para el estudio de diversas enfermedades humanas.

Objetivos específicos

- Disponer de una población sincronizada de *C. elegans*.
- Describir el fenotipo de nematodos adultos alimentados con bacterias modificadas mediante ingeniería genética (cepa HT115DE3) que expresan los dsRNA.

Materiales y Métodos

Cepas bacterianas

Se utilizarán diferentes cultivos bacterianos (cepas de *Escherichia coli* HB101 y HT115DE3) para alimentar a los nematodos. Los cultivos bacterianos se realizarán en medio LB líquido (Luria-Bertani: Triptona 10 g, NaCl 10 g, Extracto de levadura 5 g; Britannia) en presencia del antibiótico ampicilina 50 µg/ml, según corresponda (Sigma).

Mantenimiento de *Caenorhabditis elegans*

Se utilizarán nematodos de la cepa N2 (*wild type*) adquiridos del *Caenorhabditis Genetics Center* (Universidad de Minnesota, <https://cgc.umn.edu/>). Los nematodos serán cultivados en placas de Petri de 15 mm de diámetro con medio NGM (*Nematode Growth Medium*; NaCl 0,3% p/v, Peptona 0,25% p/v, Colesterol 5 µg/mL, CaCl₂ 1 mmol/L, MgSO₄ 1 mmol/L, Agar 1,7% p/v en buffer fosfato de potasio 25 mmol/L a pH 6,0) y un césped de *E. coli* cepa HB101. Los nematodos se mantendrán siempre bajo condiciones de oscuridad y temperatura constante de 20°C. Para obtener poblaciones sincronizadas en el estadio larval L1, se utilizará el método de cloro (Lewis y Fleming 1995). Posteriormente, los embriones se resuspenderán en 3,5 mL de *buffer* M9 (Na₂HPO₄ 42 mM, KH₂PO₄ 22 mM, NaCl 85,5 mM, MgSO₄ 1 mM), suplementado con Antibiótico-antimicótico 1X (Thermo Fisher Scientific) y 10 µg/mL de tobramicina (Tobrabiotic, Denver Farma) y se dejarán en agitación durante 24 horas a 50 rpm en un agitador tipo vaivén (Serie 2014, Decalab). Al día siguiente las larvas L1 serán utilizadas para el experimento de RNAi.

Ensayo de RNAi

Para inducir RNAi por alimentación, larvas L1 serán crecidas en placas de petri con medio NGM suplementado con 50 µg/ml de ampicilina; 12,5 µg/ml de tetraciclina y 1mM de IPTG (isopropil-β-D-tiogalactósido), y sembradas con un césped de *E. coli* cepa HT115DE3. Los clones de RNAi que se utilizarán para los experimentos serán obtenidos a partir de ORFeome Library (Kamath, et al. 2003) o Ahringer library (Kamath, et al. 2003), dependiendo del gen a silenciar. Las placas sembradas con los correspondientes clones de RNAi serán utilizadas para alimentar larvas L1 *wild type*. La identidad de todos los clones de RNAi será confirmada por secuenciamiento. Como control negativo, la cepa *wild type* de *C. elegans* será alimentada con un clon que contiene el vector vacío L4440. Los efectos biológicos del silenciamiento postranscripcional se llevarán a cabo mediante observación en lupa o microscopio óptico y se analizarán patrones morfológicos y de comportamiento estándar.

Cronograma

| Actividades | Cuatrimestre | | |
|--|--------------|-------|-------|
| | Día 1 | Día 2 | Día 3 |
| Obtención de poblaciones sincronizadas de nematodos. | X | | |
| Pasaje de larvas L1 a las placas de RNAi. | | X | |
| Observación de los nematodos y análisis del fenotipo obtenido. | | | X |

Factibilidad

Todo el equipamiento necesario para realizar este trabajo se encuentra disponible en las instalaciones de la UNQ. No se requieren autorizaciones especiales, ya que no se trabajará con organismos silvestres, animales vertebrados de laboratorio ni seres humanos. Los nematodos serán obtenidos del laboratorio de cría de la UNQ. Ninguna de las cepas bacterianas que se utilizarán confieren un riesgo para el ambiente o para los seres humanos. Los residuos derivados de este trabajo serán dispensados según las normas vigentes en la UNQ.

Resultados esperados

Mediante la ejecución de este trabajo se pretende evaluar la utilidad del silenciamiento génico postranscripcional en el modelo animal *C. elegans* (cepa *wild type*). En primer lugar, se espera obtener poblaciones de nematodos sincronizadas al mismo estadio larval (larvas L1) las cuales serán alimentadas con los diferentes clones de RNAi. Luego, cuando los nematodos lleguen a primer día de adulto, se espera poder describir los diferentes fenotipos obtenidos como consecuencia del silenciamiento.

Este plan será uno de los trabajos prácticos de *Ingeniería Genética II de la Licenciatura en Biotecnología de UNQ*.

Bibliografía

- Aristizabal-Corrales, D., L. Fontrodona, M. Porta-de-la-Riva, A. Guerra-Moreno, J. Ceron y S. Schwartz, Jr. 2012. **The 14-3-3 gene par-5 is required for germline development and DNA damage response in *Caenorhabditis elegans***. J Cell Sci 125:1716-1726.
- Brenner, S. 1974. **The genetics of *Caenorhabditis elegans***. Genetics 77:71-94.
- Fire, A., S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver y C. C. Mello. 1998. **Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans***. Nature 391:806-811.
- Jinek, M. y J. A. Doudna. 2009. **A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference**. Nature 457:405-412.
- Kamath, R. S., A. G. Fraser, Y. Dong, G. Poulin, R. Durbin, M. Gotta, A. Kanapin, N. Le Bot, S. Moreno, M. Sohrmann, D. P. Welchman, P. Zipperlen y J. Ahringer. 2003. **Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi**. Nature 421:231-237.
- Kiontke, K. y W. Sudhaus. 2006. **Ecology of *Caenorhabditis* species**. WormBook:1-14.
- Lewis, J. A. y J. T. Fleming. 1995. **Basic culture methods**. Methods Cell Biol 48:3-29.
- Simmer, F., C. Moorman, A. M. van der Linden, E. Kuijk, P. V. van den Berghe, R. S. Kamath, A. G. Fraser, J. Ahringer y R. H. Plasterk. 2003. **Genome-wide RNAi of *C. elegans* using the hypersensitive rrf-3 strain reveals novel gene functions**. PLoS Biol 1:E12.
- Siomi, H. y M. C. Siomi. 2009. **On the road to reading the RNA-interference code**. Nature 457:396-404.
- Timmons, L., D. L. Court y A. Fire. 2001. **Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans***. Gene 263:103-112.