

Trabajo de Laboratorio

RNA de interferencia en *Caenorhabditis elegans*

A continuación se describen los aspectos fundamentales del Trabajo de laboratorio que se realizará en el marco de la asignatura Ingeniería Genética II, necesarios para la elaboración del plan de trabajo correspondiente.

I. Estado del arte

Caenorhabditis elegans

Caenorhabditis elegans (**Figura 1**) es un gusano nematodo que mide aproximadamente 1 milímetro de longitud y vive libre en el suelo en ambientes templados, alimentándose de microorganismos, tales como la bacteria *Escherichia coli* (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).

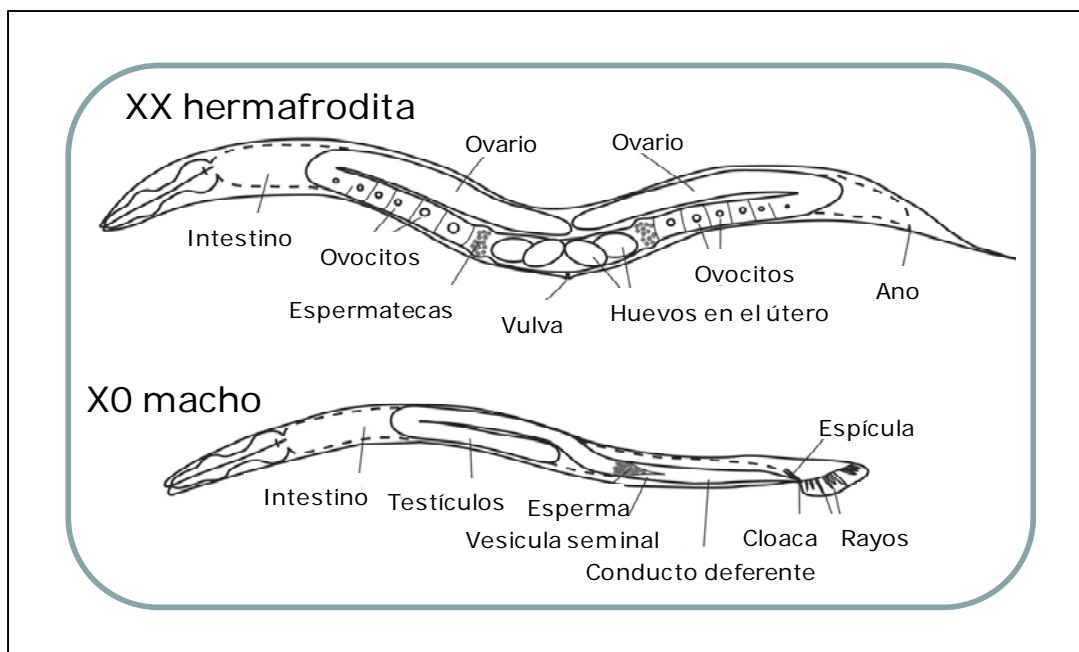


Figura 1. Dibujo esquemático de *Caenorhabditis elegans* hermafrodita/macho.

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, (4) puede poner de 200 a 300 huevos que en dos días llegan a estado semiadulto, (5) posee 17.800 genes diferentes que forman su mapa genético, secuenciado completamente (sus células contienen 5 pares de autosomas y, usualmente, 2 cromosomas X), (6) la mayoría del tiempo se autofecundan, de manera que cualquier alelo recesivo se vuelve rápidamente homocigoto y afecta al fenotipo, (7) después de 3 semanas muere, mostrando signos de envejecimiento, y (8) el proceso de *screening* genético resulta relativamente sencillo.

Mecanismo de silenciamiento

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 etapa, 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**, el cual permite la unión al mensajero blanco por complementariedad de bases. Finalmente, RISC produce 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 secuencia 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.

RNAi en *Caenorhabditis 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 (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 (**Figura 2**). 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 RNAasall⁻ (Timmons, et al. 2001).

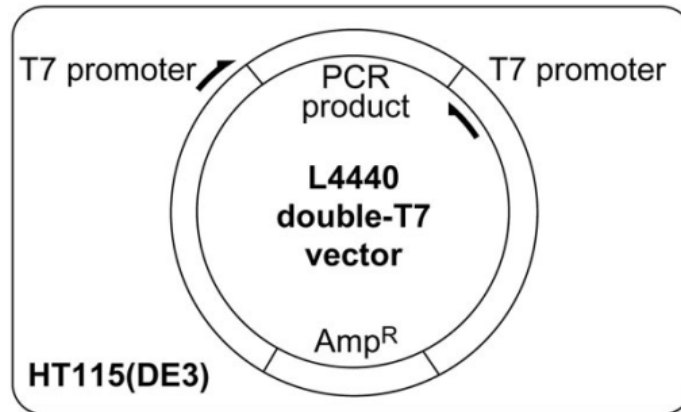


Figura 2. Plásmido que expresa el dsRNA para *delivery* mediado por alimentación en *C. elegans*. Figura tomada de Kamath RS, et al., 2001.

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.

II. Los objetivos

El **objetivo general** de este trabajo consiste en evaluar la utilidad del silenciamiento génico post-transcripcional en el modelo animal *C. elegans* (cepa *wild type*). Para llegar a cumplir dicha meta, se plantean como **objetivos específicos** los siguientes:

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

III. Esquema experimental

Para evaluar el silenciamiento génico post-transcripcional en *C. elegans* mediante RNAi *feeding* se seguirá el siguiente esquema (**Figura 3**):

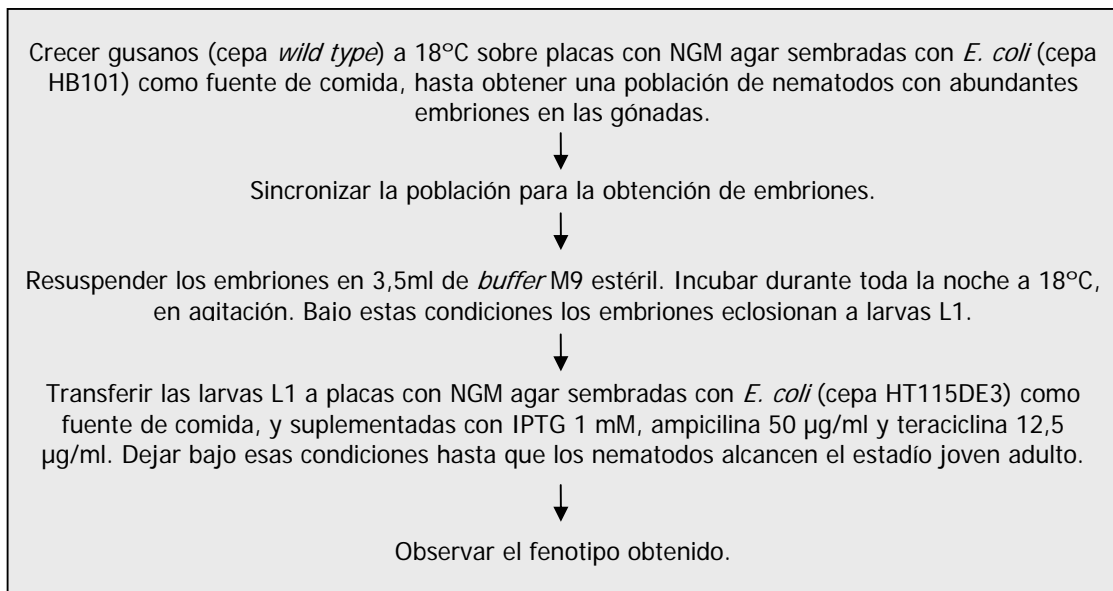


Figura 3. Estrategia desarrollada.

IV. Metodología

Sincronización

1. Levantar los gusanos de la placa con 3ml de *buffer* M9, aspirando y botando con pipeta (P1000) para despegar los gusanos. Transferir el producto lavado a un tubo de 15 ml (no más de dos placas por tubo).
2. Centrifugar a 2.000 rpm durante 20 segundos. Eliminar el sobrenadante.
3. Agregar 5 ml de una solución de NaOH/Cl₂ y agitar con la mano por 4 minutos. Con este tratamiento se rompen los gusanos y se liberan los embriones.
4. Agregar 2 volúmenes de M9 estéril para diluir la solución de cloro/NaOH.
5. Centrifugar a 2.000 rpm durante 20 segundos. Eliminar el sobrenadante.
6. Realizar dos lavados con 15ml de *buffer* M9 estéril. Centrifugar a 2.000 rpm durante 20 segundos entre cada lavado. Descartar el sobrenadante.
7. Resuspender los embriones en 3,5ml de *buffer* M9 estéril. Incubar durante toda la noche a 18°C, en agitación.

Solución de NaOH/Cl₂

Volumen (ml)	10	15	20	30	40
Cloro 5% (ml)	3,8	5,7	7,6	11,4	15,2
NaOH 1N (ml)	5	7,5	10	15	20
H ₂ O (ml)	1,2	1,8	2,4	3,6	4,8

RNAi

Para inducir RNAi por alimentación, crecer larvas L1 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). Los clones de RNAi que se utilizarán en el trabajo práctico se obtuvieron 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*.

V. 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., Martinez-Campos M., Zipperlen P., Fraser AG, Ahringer J.** 2001. Effectiveness of specific RNA-mediated interference through ingested double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Genome Biol.*
- **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.
- **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.