

PROYECTO FINAL DE INGENIERÍA

**“Búsqueda de genes necesarios para la formación de la larva *dauer*
con potencial función parasitaria en *C. elegans*”**

Pérez Marchesin, Daniela - LU: 1046353

Licenciatura en Biotecnología

Tutor:

Martinez Tosar, Leandro - Facultad de Ingeniería y Ciencias Exactas, UADE

Co-tutor:

Hochbaum, Daniel - Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA

11/05/2018



Universidad Argentina de la Empresa

Facultad de Ingeniería y Ciencias Exactas

Índice

Agradecimientos.....	4
Resumen.....	5
Abstract.....	7
Introducción.....	8
Relevancia del proyecto.....	8
Estructura del reporte.....	9
Modelo biológico.....	9
Crecimiento y mantenimiento de nematodos.....	12
Objetivo.....	14
Antecedentes.....	15
El receptor nuclear DAF-12.....	15
Nematodos y parasitismo.....	18
<i>C. elegans</i> y ARNi.....	22
Hipótesis.....	25
Metodología.....	26
Lugar de trabajo.....	26
Mantenimiento de la cepa de <i>C. elegans</i>	28
Análisis <i>in silico</i>	29
Biblioteca de bacterias que expresan ARNi.....	29
Crecimiento de bacterias que expresan ARN complementario para el <i>screening</i>	31
Puesta a punto del protocolo de silenciamiento mediante ARNi.....	32

Protocolo de silenciamiento mediante ARNi.....	35
Resultados.....	41
Discusión.....	48
Conclusión.....	52
Bibliografía.....	54
Anexos.....	59

Agradecimientos

A mi tutor Daniel Hochbaum, por haberme dado la oportunidad de trabajar junto a él, instruirme y acompañarme durante todo el proyecto.

A mi Leandro Martínez Tosar, por haber sido una inspiración desde el principio de mi carrera, un excelente profesor y un gran consejero durante mi desarrollo profesional.

A mis compañeros de laboratorio Esteban y Martín, por toda su ayuda y paciencia durante mi aprendizaje y en el día a día de trabajo.

A mis compañeros de la facultad, por haber hecho de esta carrera una experiencia hermosa.

A mi familia, por acompañarme tanto en mi carrera como en todos mis emprendimientos.

A Martín, por todo su apoyo y cariño tanto en lo profesional como en lo personal.

Gracias.

Resumen

Los nematodos parasíticos infectan a más de mil millones de personas por año en el mundo. Desde hace décadas, los tratamientos disponibles contra éstos se basan en un pequeño grupo de drogas antiparasitarias que poseen una desventaja: no son efectivas en la fase infecciosa de los gusanos. Los receptores nucleares se encuentran en la mira como potenciales blancos moleculares de nuevas terapias antiparasitarias ya que tienen un papel clave en el desarrollo, metabolismo y fase infectiva de gusanos parasíticos.

Trabajamos con el nematodo de vida libre *C. elegans*, cuyo genoma está totalmente caracterizado y las herramientas de interferencia por ARN disponibles para su manipulación genética hacen de éste un modelo biológico ideal para la búsqueda de fenotipos de interés. Este gusano forma un tipo de larva llamada *dauer* la cual tiene similitud morfológica con un tipo de larva infecciosa que forman algunos nematodos parasíticos.

Nos enfocamos en el receptor nuclear DAF-12, el cual controla la entrada y salida del estadio *dauer* ante las condiciones ambientales en las que se encuentra *C. elegans*. La actividad de este receptor también es requerida para la formación de la larva infecciosa en nematodos parasíticos.

Como hipótesis de trabajo se plantea que, dentro del grupo de genes blanco de DAF-12, existen genes que controlan la entrada al estadio *dauer*. El objetivo principal del proyecto fue identificar, dentro de los genes blanco de DAF-12, aquellos que sean necesarios para la formación de la larva *dauer*. Estos genes podrían estar conservados en gusanos parasíticos y ser potenciales blancos de nuevas terapias antiparasitarias.

Esto se logró silenciando determinados genes mediante la tecnología del ARN de interferencia y visualizando el fenotipo obtenido. Para realizar este *screening* se llevó a cabo la puesta a punto del protocolo de interferencia mediante ARN. Desafortunadamente, ninguno de los genes silenciados por ARN de interferencia en este trabajo inhibe la formación de la larva *dauer* en *C. elegans*.

Abstract

Parasitic nematodes infect millions of people per year in the world. For decades, the treatments relayed on a small group of antiparasitic drugs that have a disadvantage: they are not effective in the infectious phase of the worms. Nuclear receptors have emerged as potential molecular targets of new antiparasitic therapies since because they have a key role in worm's development, metabolism and infective phase.

We worked with the free living nematode *C. elegans*, which genome is fully sequenced and annotated and gene silencing by RNAi is extremely simple. These worms develop the *dauer* larva in harsh environmental conditions, which is related to the infective larva in parasitic nematodes.

We focused on the nuclear receptor DAF-12, which controls entry and exit of the *dauer* stage by sensing environmental conditions. In addition, DAF-12's activity is also required for infective larva's development in parasitic nematodes.

We hypothesized that, within DAF-12's target genes, there must be genes required for *dauer* development. Thus, the main goal in this project was identified genes necessary for *dauer* entry. This was achieved by silencing certain genes by RNAi and visualizing *dauer* development. Unfortunately, none of the genes tested inhibit *dauer* development in *C. elegans*.

1. Introducción

1.1. Relevancia del proyecto

Los gusanos parasíticos se encuentran ampliamente distribuidos en el mundo e infectan más de mil millones de personas anualmente causando una gran variedad de enfermedades. Las terapias actuales consisten en un grupo de drogas cuya principal desventaja recae en su incapacidad de inhibir el estadio infeccioso de estos parásitos.

La larva *dauer* es un estadio de arresto que se presenta durante el desarrollo de nematodos en respuesta a condiciones ambientales adversas. Muchos nematodos parásitos, para poder infectar a su hospedador deben desarrollar una larva infecciosa. Dado que la formación de larvas infecciosas en nematodos parásitos y la formación de la larva *dauer* en el nematodo de vida libre *C. elegans* requieren la actividad del receptor nuclear DAF-12, y estas larvas son morfológicamente similares, nos propusimos identificar genes que fuesen blanco de DAF-12 para evaluar su relevancia en la formación de la larva *dauer*. Asumiendo una función conservada, estos genes podrían ser necesarios en la formación de larvas infecciosas de nematodos parásitos.

Al completar este proyecto esperamos identificar genes potencialmente atractivos como blanco de terapias anti parasitarias, a partir de los cuales se podrían diseñar drogas con menores efectos secundarios. Para lograr esto, el foco esta puesto en los receptores nucleares como DAF-12, los cuales ya son utilizados para generar terapias en mamíferos y están siendo estudiados en nematodos.

1.2. Estructura del reporte

El presente trabajo se divide en una serie de apartados. En primer lugar se detalla una introducción al tema de estudio, el objetivo de la investigación y el modelo biológico utilizado para tal fin. Luego se presentan los antecedentes que fueron considerados como más relevantes para la investigación. En la sección de hipótesis y metodología se presentan los materiales de trabajo, lugares y protocolos utilizados. A continuación se muestran los resultados del *screening* y la conclusión a la que se arribó. Por último se detalla la bibliografía consultada para la realización de este proyecto.

1.3. Modelo biológico

Caenorhabditis elegans (*C. elegans*) es un nematodo de vida libre que puede ser encontrado en la tierra o alimentos en descomposición. Crece en un amplio rango de temperaturas y se alimenta de bacterias como *Escherichia coli*. Las larvas recién eclosionadas miden 0.25 mm de largo y los adultos miden 1 mm de largo, por lo tanto éstos son visualizados utilizando un microscopio o una lupa. Existen principalmente en forma de hermafroditas que se auto-fecundan. También aparecen machos, con una frecuencia menor al 0.2% (Hope, 1999).

Los tiempos de desarrollo varían dependiendo de la temperatura de trabajo en el laboratorio, pero a grandes rasgos *C. elegans* tiene un ciclo de vida corto. Luego de aproximadamente 3 días los gusanos se desarrollan a adultos reproductivos. En cada oviposición pueden llegar a poner entre 200 y 300 huevos. La embriogénesis de *C. elegans* toma aproximadamente 16 horas. Cuando el embrión sale del huevo pasa a formar una larva denominada L1. Los animales empiezan a alimentarse y se desarrollan a través de 4 estadios larvales denominados L1 a L4. Este ciclo es conocido como desarrollo reproductivo. Una vez

desarrolladas las larvas L4 los adultos hermafroditas empiezan a producir progenie durante un periodo de 2 a 3 días. Luego del periodo reproductivo, los hermafroditas pueden vivir durante varias semanas.

Frente a condiciones ambientales adversas, tales como hambreado, alta temperatura o alta densidad poblacional, *C. elegans* puede optar por una vía alternativa de desarrollo, conocida como diapausa, en la cual se generan “arrestos” en el desarrollo reproductivo. Las larvas L2 activan la entrada a un ciclo de vida alternativo (Hu, 2007) y viran hacia un estadio larval llamado larva *dauer*, la cual se desarrolla alternativamente a la larva L3 (Golden y Riddle, 1984). La cutícula de la larva *dauer* rodea completamente al animal y tapona la boca, previniendo que el animal se alimente y por lo tanto arrojando el desarrollo. La cutícula que poseen las larvas *dauer* es resistente a ciertos químicos nocivos, lo cual provee a estas larvas de gran protección contra el estrés ambiental y agentes cáusticos. Este tipo de larva puede sobrevivir por varios meses y son la forma más común de *C. elegans* encontrada en la naturaleza. Cuando los *dauers* encuentran condiciones ambientales favorables (por ejemplo alimento disponible), se desprenden del tapón bucal y continúan su desarrollo reproductivo.

Se conocen más de 30 genes *daf* (*dauer formation*) que regulan la formación de la larva *dauer* (Albert y Riddle, 1988) y dependiendo del fenotipo observado, se los clasifica como *dauers* constitutivos o genes *daf-c* (siempre desarrollan la larva *dauer* independientemente de las condiciones ambientales) y *dauers* defectuosos o *daf-d* (incapaces de desarrollar la larva *dauer*). Dentro de estas categorías, también se encuentran mutantes termosensibles. Por ejemplo, el alelo *daf-2(e1370)* muestra un fenotipo *daf-c* cuando se desarrollan a 25°C (Gems *et al.*, 1998). Dentro de las vías que regulan la formación de *dauers* se encuentra la vía neurosensorial, la señalización intracelular vía cGMP y la síntesis de serotonina, un neurotransmisor que activa las vías de TGF- β y de insulina/IGF-1. Finalmente, todas estas vías terminan desembocando en una señalización de hormona esteroidea (ácido dafacrónico), cuya presencia es determinante en la decisión del tipo de desarrollo del gusano (Antebi *et al.*, 2000). En un ambiente favorable, la alta secreción de

hormonas (serotonina, TGF- β , insulina y ácido dafacrónico) promueve el desarrollo reproductivo. Por el contrario, la baja secreción de estas hormonas favorece el desarrollo de la larva *dauer*.

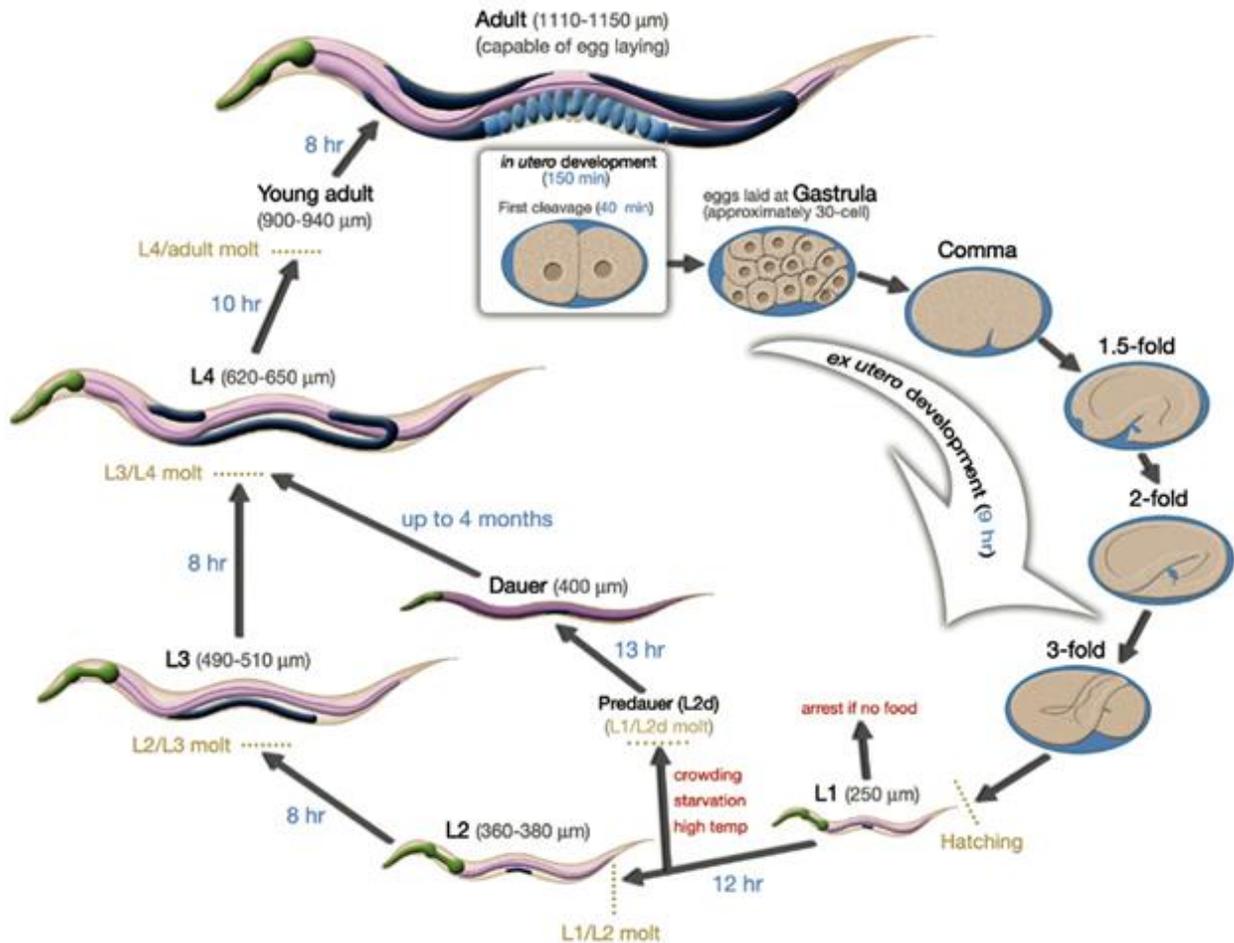


Figura 1A. Ciclo de vida de *C. elegans*. Se observa en la imagen tanto el desarrollo reproductivo como la diapausa *dauer*. Los animales se desarrollan pasando por cuatro estadios larvales hasta alcanzar la adultez. La larva *dauer* es más delgada que el resto de los estadios larvales. (Figura de Altun y Hall, <http://www.wormatlas.org>).

Este animal posee un número invariante de células somáticas, por lo cual es posible seguir el rastro de cada célula desde la fertilización hasta la adultez. *C. elegans* fue el primer organismo multicelular cuyo genoma fue secuenciado por completo (*C. elegans* Secuencing Consortium 1998). El genoma de *C. elegans* está anotado en la base de datos Wormbase. Esta gran cantidad de información dio lugar a la posibilidad de estudios genéticos que dieron lugar a la identificación de muchos genes clave en el desarrollo y en procesos celulares del gusano.

1.3.1. Crecimiento y mantenimiento de nematodos

En el laboratorio, estos gusanos pueden ser crecidos en medio sólido o líquido. En este proyecto fueron crecidos en placas de Petri de 60mm con medio de crecimiento de nematodos (NGM) sobre un césped de la bacteria *E. coli* OP50. Una vez que los gusanos agotan toda la bacteria disponible utilizan sus reservas de grasa como fuente de energía. Cuando no hay alimento disponible, el desarrollo de las larvas jóvenes es arrestado formando larvas *dauer*. Cuando se precisa que los gusanos estén sanos y en crecimiento, se corta un pequeño pedazo de agar a partir de una placa de gusanos hambreados y se lo transfiere a una nueva placa con alimento. Los animales se desplazan hacia la bacteria y al alimentarse abandonan el estadio *dauer* y retoman el desarrollo a nivel del estadio larval L4.

C. elegans es un modelo biológico cuyo mantenimiento y uso experimental es especialmente conveniente debido a varios motivos:

- Al ser un hermafrodita que se auto-fecunda, un solo gusano puede poblar una placa entera. Además, cada gusano genera una gran cantidad de descendencia.

- Pueden mantenerse congelados durante años y ser descongelados cuando se los necesite.

- No requieren un gran espacio de almacenamiento en el laboratorio ya que se los mantiene en placas de Petri de tamaños reducidos.

- Pueden ser crecidos en un rango de temperatura que va desde los 16°C hasta los 25°C (el crecimiento por encima de los 25°C los vuelve estériles). Esto hace posible que se pueda controlar la cantidad de horas que tardan en desarrollarse a adultos.

- Pueden ser sincronizados para obtener una placa donde todos los gusanos estén en el mismo estadio a través de la separación de larvas recién nacidas o bien obteniendo solo los huevos al realizarle un tratamiento con hipoclorito a gusanos adultos.

- Pueden ser crecidos en medio líquido, lo cual facilita el crecimiento de un gran número de individuos para estudios bioquímicos.

- No es indispensable el uso de equipos costosos ni especializados. A grandes rasgos es un modelo biológico barato y fácil de mantener.

- Es muy sencillo inhibir la expresión de un gen mediante ARN de interferencia para realizar estudios genéticos.

2. Objetivo

El objetivo de este proyecto consiste en la identificación de genes regulados por el factor de transcripción DAF-12 que sean necesarios para la formación de la larva *dauer*. Con este fin, se realizó un *screening* mediado por ARNi para hallar genes que regulen el desarrollo de esta larva. Utilizando una cepa mutante para el receptor de insulina *daf-2*, que forman *dauers* a 25,5°C, se determinó si el silenciamiento de genes blanco de DAF-12 inhibe la formación de la larva *dauer*.

3. Antecedentes

En esta sección se detallan los estudios que fueron utilizados como antecedentes de referencia para este proyecto.

3.1. El receptor nuclear DAF-12

Los receptores nucleares son factores de transcripción activados por ligando que regulan diversos procesos biológicos incluidos el metabolismo, el desarrollo y la reproducción. Por la naturaleza lipofílica de sus ligandos y su habilidad de modular la expresión de múltiples genes, los receptores nucleares se volvieron targets de interés para el desarrollo de moléculas que actúen como drogas orales (Evans *et al.*, 2014). Los receptores nucleares son blancos terapéuticos bien conocidos en mamíferos, y se ha empezado a estudiarlos en gusanos parasíticos, donde están ampliamente distribuidos y juegan roles clave en el control del metabolismo y del desarrollo. Uno de estos receptores nucleares es DAF-12, el cual es requerido para el desarrollo normal de los nematodos, incluyendo todas las etapas importantes del estadio infeccioso en nematodos parasíticos (Wang *et al.*, 2017).

El nematodo de vida libre *C. elegans* tiene 248 receptores nucleares, más que cualquier otra especie conocida (Antebi, 2006). Además de su rol en el desarrollo y la reproducción, muchos de estos receptores juegan un papel fundamental en la adaptación de los gusanos al estrés ambiental y la supervivencia al mismo. Uno de los receptores nucleares más estudiados es DAF-12. La función principal de DAF-12 es regular el desarrollo larval del nematodo en base al entorno en el que se encuentra. En condiciones favorables para el desarrollo, se promueve la síntesis de ácidos dafacrónicos (DAs), los cuales son hormonas esteroides que se unen y activan la actividad transcripcional de DAF-12 (Motola, 2006; Mahanti *et al.*, 2014). El receptor nuclear activado induce la expresión de una cascada de genes que coordinan y promueven el desarrollo

reproductivo y previene la entrada al estadio *dauer* (Bethke *et al.*, 2009; Hochbaum *et al.*, 2011). En contraste, ante condiciones ambientales desfavorables no se producen DAs y de esta forma DAF-12 funciona como un represor transcripcional, generando que *C. elegans* entre en estadio *dauer* (Ludweig *et al.*, 2004). Cuando las condiciones favorables son restituidas, los DAs son producidos y actúan como ligando de DAF-12, sacando a *C. elegans* del estadio *dauer* y reactivando el desarrollo reproductivo. Por lo tanto, DAF-12 es necesario tanto para la entrada al estadio *dauer* (en ausencia de ligando) como para la salida del mismo y la reactivación del desarrollo reproductivo (en presencia de ligando).

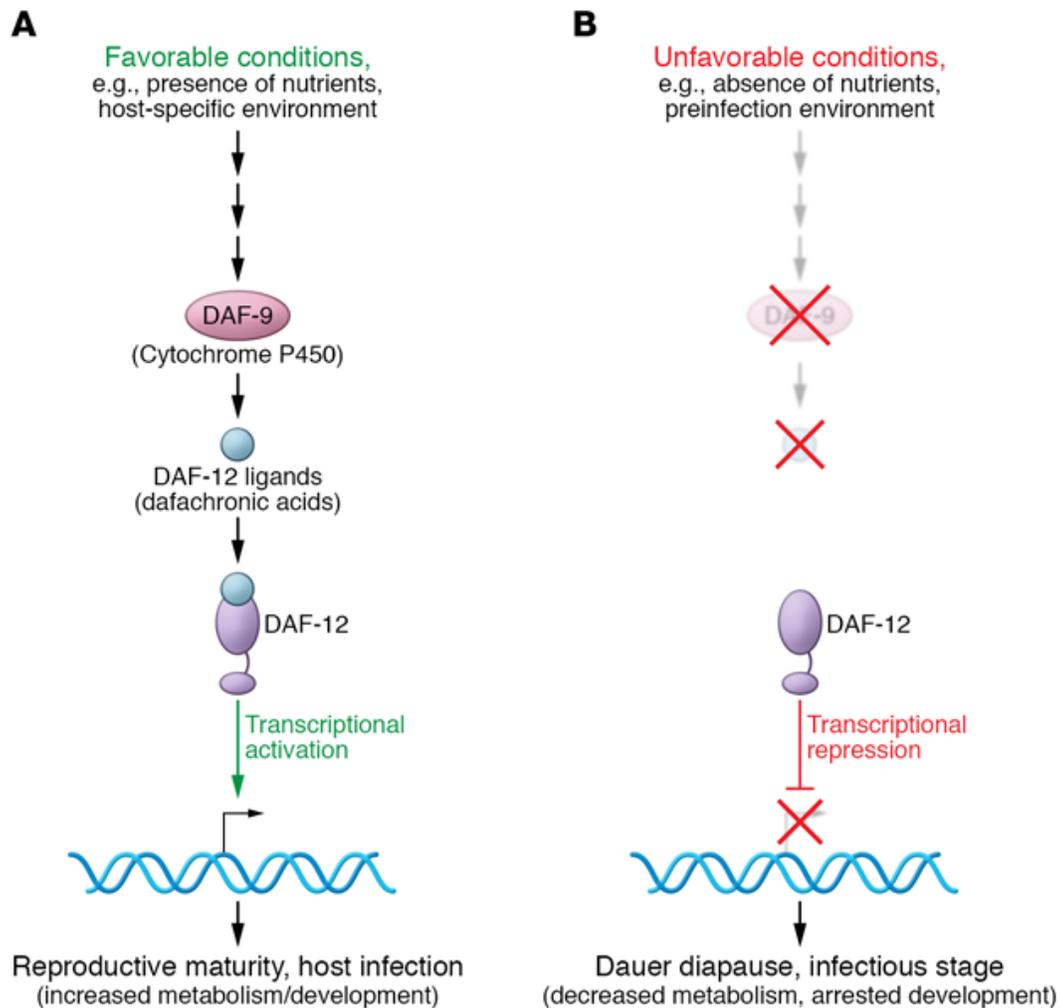


Figura 3A. La cascada de señalización de DAF-12. **A.** Bajo condiciones ambientales favorables, el nematodo de vida libre *C. elegans* estimula la producción de hormonas esteroides (DAs) que activan al receptor nuclear DAF-12, lo que promueve la madurez reproductiva. **B.** Ante condiciones ambientales desfavorables, los DAs no son sintetizados y DAF-12 actúa como un represor transcripcional de una serie de genes que resulta en el arresto del desarrollo y entrada al estadio *dauer*. Esta es la cascada de señalización que se cree que gobierna el desarrollo de la larva infecciosa y la reactivación de su desarrollo a la madurez reproductiva una vez dentro del hospedador de los nematodos parasitarios. (Figura de Wang *et al.*, 2017).

A pesar de la importancia biológica de DAF-12 en la formación de la larva *dauer*, sus genes blanco no eran conocidos. Utilizando gusanos transgénicos que expresan DAF-12 fusionado al epítipo TAP (*tándem affinity purification*, TAP::DAF-12), el Dr. Daniel Hochbaum identificó mediante inmunoprecipitación de DAF-12 y posterior hibridación en chip (ChIP-chip) (Hochbaum *et al.*, 2011), 1155 regiones genómicas que unían DAF-12. Estas regiones genómicas estaban a 5Kb de un total de 3179 genes. Particularmente, DAF-12 mostró mayor unión a una distancia de hasta 500 pares de bases río abajo del ATG, sugiriendo que se podría unir a las regiones promotoras y regular la expresión de estos genes. A partir de estos genes hallados surge el planteo de que algunos de ellos deberían ser necesarios para formar la larva *dauer* en *C. elegans* y se espera poder extrapolar esos resultados a la formación de la larva infectiva de nematodos parasitarios.

3.2. Nematodos y parasitismo

Una de las clases más prevalentes de parásitos son los gusanos parasíticos, los cuales infectan a más de mil millones de personas en todo el mundo y causan un amplio rango de enfermedades tales como malnutrición, retardo mental y de crecimiento, desfiguramiento, discapacidad física y muerte (Hotez *et al.*, 2008). De las 40.000 o más especies de nematodos que existen, se estima que más de la mitad son parasíticos. Los tratamientos antiparasitarios actuales se basan en un pequeño grupo de drogas que fueron usadas durante décadas que poseen la desventaja de no ser efectivas durante la fase infecciosa de los parásitos. Además el uso extensivo de fármacos antihelmínticos ha dado lugar a una tasa de resistencia creciente. Ante la ausencia de estrategias para tratamientos alternativos, por ejemplo vacunas, se necesitan con urgencia nuevas drogas para tratar este tipo de infecciones.

Los receptores nucleares son blancos terapéuticos muy establecidos en mamíferos y han empezado a ser estudiados en los gusanos parasíticos. Éstos juegan un papel fundamental en el

control de las redes transcripcionales del desarrollo y del metabolismo en nematodos. Debido a la naturaleza lipofílica de sus ligandos y su habilidad de modular la expresión de múltiples genes de una misma cascada, se han vuelto atractivos como targets para el diseño de pequeñas moléculas que actúen como drogas orales. Uno de estos receptores nucleares es DAF-12, requerido para el desarrollo normal del nematodo, incluidas las etapas fundamentales para el estadio infeccioso. Se propone que el uso de receptores tales como DAF-12 como blanco farmacológico podría representar una nueva estrategia clínica distinta a las utilizadas actualmente, las cuales utilizan como blanco tubulinas, canales iónicos o bacterias simbióticas para parásitos (Wang *et al.*, 2017).

Los nematodos parasíticos invaden a sus huéspedes en la forma de una larva infectiva, un estadio que demuestra tener similitud morfológica con la larva *dauer* de *C. elegans* (Lee, 2002). A pesar de que los receptores de insulina y TGF- β regulan la entrada al estadio *dauer* en *C. elegans*, estudios realizados utilizando ortólogos de TGF- β en nematodos parasíticos no evidenciaron un origen común entre la formación de la larva *dauer* y la larva infectiva (Ogawa *et al.*, 2009).

En *C. elegans*, las señales que indican superpoblación, alta temperatura o escasez de alimento son procesadas a través de las cascadas de señalización de insulina/IGF, TGF- β y guanilil ciclasa. Esto da como resultado una disminución de un tipo de hormona esteroide: los ácidos dafacrónicos $\Delta 4$ -DA y $\Delta 7$ -DA, generando la inhibición del receptor nuclear DAF-12, promoviendo la entrada al estadio *dauer*. La enzima clave en la biosíntesis de los ligandos de DAF-12 es el citocromo P450 DAF-9. Los gusanos que carecen de DAF-9 forman larvas *dauer* de forma constitutiva (es decir que los mutantes *daf-9* están arrestados en la larva L3 *dauer* de forma permanente) pero pueden retomar el desarrollo reproductivo si se les administra los ácidos dafacrónicos de manera exógena (Motola *et al.*, 2006). Curiosamente, no se identificaron homólogos de DAF-9 en ningún nematodo parasítico. Esto sugiere que los nematodos parasíticos carecen de la habilidad de sintetizar sus propios ligandos de DAF-12 (Wang *et al.*, 2017).

Estudios realizados utilizando el nematodo *Pristionchus pacificus* como intermediario entre *C. elegans* y los nematodos parasíticos, demostraron que estas dos especies compartían la señalización por ácidos dafacrónicos y DAF-12 como el modulador endócrino de la formación de la larva *dauer* (Ogawa *et al.*, 2009). Estos estudios también demostraron que el ácido dafacrónico, $\Delta 7$ -DA, tiene una función conservada regulando la entrada al estadio infectivo en el parásito de mamíferos *Strongyloides papillosus*. El agregado de $\Delta 7$ -DA a este parásito bloqueaba la formación de larvas infectivas generando animales de vida libre. Concluyeron que la conservación de este pequeño ligando representa un link fundamental entre la larva *dauer* y la larva infectiva y que puede generar un gran acercamiento a la estrategia de infección de nematodos parasíticos.

El similar efecto de la hormona $\Delta 7$ -DA en *C. elegans*, *P. pacificus* y *S. papillosus* apoya la idea de un origen común entre la larva *dauer* y la larva infectiva de estas especies. Los nematodos parasíticos suelen infectar a sus huéspedes bajo la forma de una larva infectiva y su similitud morfológica con la larva *dauer* llevo a la idea de que la larva infectiva pudo haber evolucionado a partir de la larva *dauer* de los nematodos de vida libre. Esta conservación del efecto de $\Delta 7$ -DA puede tener una importante implicancia farmacológica en la prevención de infecciones causadas por nematodos (Wang *et al.*, 2017).

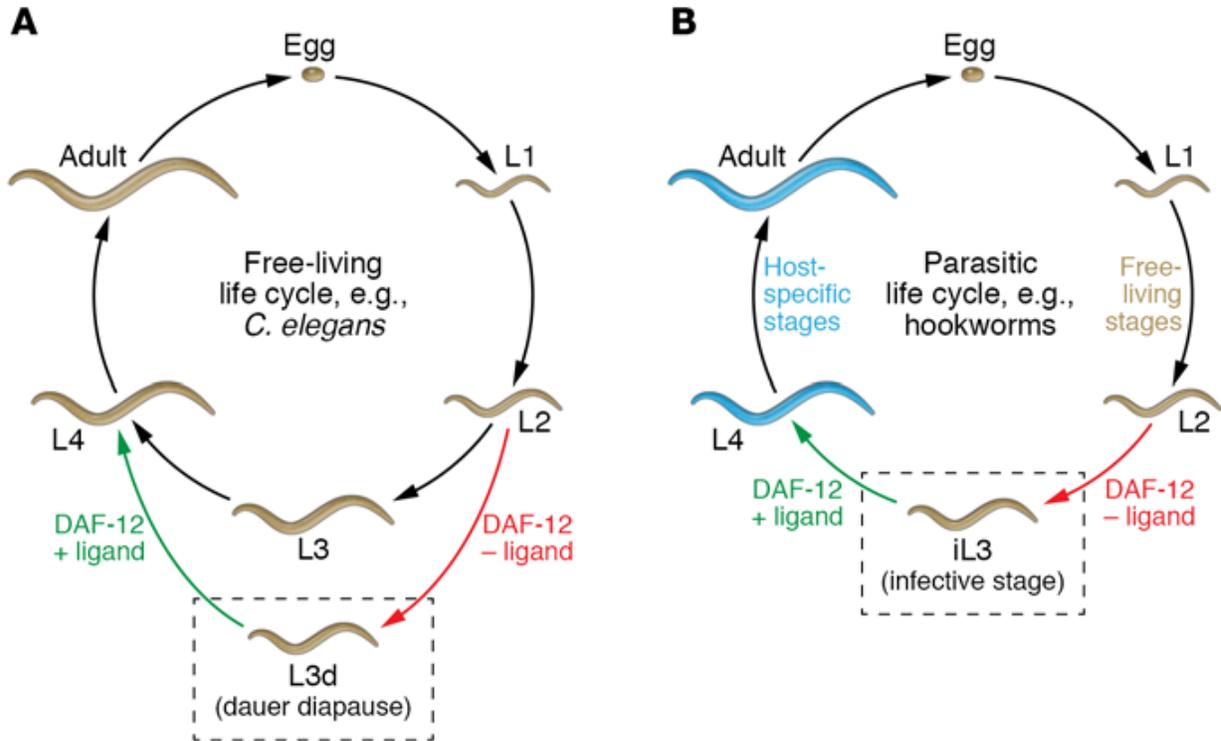


Figura 3B. Regulación del estadio infeccioso iL3 por DAF-12 como blanco terapéutico. En los nematodos de vida libre, la decisión de la entrada a forma *dauer* ocurre en el tercer estadio larval. La entrada y salida del estadio larval *dauer* son determinadas por la presencia o ausencia de ligandos del receptor nuclear DAF-12: los ácidos dafacrónicos. En los nematodos parasíticos, el estadio larval infeccioso es equivalente al estadio larval *dauer* de los nematodos de vida libre, y este estadio puede ser regulado por ligandos de DAF-12. A pesar de que los ligandos para el receptor nuclear DAF-12 de nematodos parasíticos aún no hay sido bien identificados, la administración farmacológica de ácidos dafacrónicos demostró prevenir la formación de la larva infecciosa, de esta forma interrumpiendo el ciclo de vida del parásito. La activación artificial de DAF-12 en parásitos podría ser una estrategia para el desarrollo de drogas anti parasitarias innovadora. (Figura de Wang *et al.*, 2017).

3.3. *C. elegans* y el ARN de interferencia

El silenciamiento génico mediado por ARN de interferencia fue inicialmente descrito en *C. elegans*. En 1998, Fire y Mello descubrieron que la inyección de ARN de doble cadena (dsRNA) en gusanos resultaba en la degradación específica del correspondiente ARN mensajero, un proceso denominado interferencia por ARN (Fire *et al.*, 1998). Esto produce el silenciamiento de un gen específico y también se puede observar la interferencia en la progenie del animal afectado. La disponibilidad de la secuencia genómica completa de *C. elegans*, combinada con técnicas de genética reversa, permiten el estudio de prácticamente cualquier gen de este gusano. La función del gen es alterada y su efecto sobre el desarrollo o el comportamiento en el organismo puede ser analizado. El ARN de interferencia (ARNi) es uno de los métodos más utilizados para perturbar la función de genes en *C. elegans*. En menos de un día de trabajo neto, el ARN de interferencia inhibe la función de un gen sin alterar el ADN del organismo. Esto puede ser realizado a gran escala, donde se inhiben muchos genes en un solo experimento para la búsqueda de algún fenotipo en particular.

Por otro lado, se descubrió que sumergiendo a los gusanos en una solución conteniendo ARNi (*soaking*) o alimentándolos con bacterias que producían ARN complementario, también podía inducirse una robusta respuesta de ARNi (Tabara *et al.*, 1998; Timmons y Fire, 1998). El método a utilizar depende de la naturaleza de cada experimento. Estudios con ARNi demostraron que el método por inyección de ARNi atraviesa la membrana celular, es decir que el sitio de inyección no es crítico para el éxito de la inactivación del gen. En el caso de la interferencia mediante alimentación, el ARN es absorbido en el intestino y distribuido al tejido somático y la línea germinal, donde se silencia efectivamente la mayoría de las células de *C. elegans*. Al alimentar a los gusanos con esta bacteria se genera la degradación del ARN mensajero del gen target en el gusano. Sin embargo, el sistema nervioso tiene una respuesta retardada y menos robusta al ARNi en comparación al resto de los tejidos (Kamath *et al.*, 2000).

Cuando se trabaja con ARNi administrado a través de la alimentación, se utilizan bacterias productoras del ARN doble cadena de interés. Este método es el menos laborioso de los tres mencionados anteriormente y es también el menos costoso. Sin embargo, produce resultados levemente más variables que las alternativas de ARNi por inyección o inmersión. La interferencia mediante ARN puede ser utilizada para tratar un gran número de gusanos de una sola vez o para búsquedas de alto rendimiento (*high-throughput screening*), como es el caso de este proyecto, tanto en medio sólido como en medio líquido.

La cepa de gusanos más conveniente para llevar a cabo este tipo de experimentos depende de la naturaleza de éstos. Tanto las distintas cepas como los distintos tejidos difieren en su sensibilidad al ARNi. Para muchos ensayos o fenotipos de interés la cepa salvaje da buenos resultados. Sin embargo, en algunos casos, los fenotipos buscados se evidencian al utilizar gusanos que llevan la mutación *rrf-3*. Estos mutantes tienen una delección en el gen codificante para la ARN polimerasa dependiente de ARN (esencial en la generación de ARNdc durante el fenómeno de interferencia) y son hipersensibles al ARNi (Simmer *et al.*, 2002). En este proyecto se utilizó la cepa doble mutante GL228 (*daf-2(e1371);rrf-3(pk1426)*). Estas mutaciones permiten que los gusanos formen larvas *dauer* cuando son crecidos a 25°C y sean hipersensibles al ARNi (esto se explica con más detalle en la sección 5.2).

Gusanos en cualquier estadio de vida pueden ser alimentados o sumergidos en ARNi. Sin embargo, cuando se usa el método por alimentación es preferible permitir que los gusanos se alimenten de las bacterias productoras de ARNi por 2-3 días. En este proyecto, gusanos recién eclosionados fueron alimentados con las bacterias productoras de ARNi durante 5 días y posteriormente su progenie fue alimentada con las mismas bacterias durante 3 días más antes de analizar los resultados.

Es esencial optimizar las condiciones del silenciamiento por ARNi previo a los ensayos a gran escala (*screening*). Los controles positivos y negativos deben ser apropiadamente definidos

así como también deben ser evaluadas diferentes condiciones de trabajo para encontrar los valores óptimos para cada variable de relevancia. En este proyecto se pusieron a punto distintas variables del protocolo de silenciamiento como ser la concentración de antibiótico utilizada, el agregado de un antifúngico, el estadio en que son situados los gusanos en las placas mulipocillo y la cantidad de bacteria con las que se los alimenta. Al encontrar un resultado positivo en este tipo de análisis, éstos deben ser analizados nuevamente para asegurarse que el resultado sea reproducible.

Para silenciar genes de forma transitoria, están disponibles bibliotecas de ARNi. En este proyecto se utilizó la biblioteca diseñada por Julie Ahringer que cubre aproximadamente el 90% de los genes anotados en el genoma de *C. elegans*. Ésta contiene 16.757 clones, generada mediante el clonado de fragmentos genómicos específicos de genes en el medio de dos promotores de la polimerasa T7 invertidos (Fraser *et al.*, 2000; Kamath *et al.*, 2003). En la sección 5.4 se profundiza sobre los detalles de esta biblioteca.

4. Hipótesis

La hipótesis de este proyecto se basa en la similitud morfológica entre la larva *dauer* que forma *C. elegans* y la larva infectiva que forman algunos nematodos parasíticos. Es sabido que DAF-12 es un factor de transcripción implicado en la formación de la larva *dauer*, por lo tanto éste debería regular genes relacionados con desarrollo de dicha larva. De esta forma nos propusimos, a través de la técnica de interferencia por ARN, buscar genes regulados por DAF-12 cuyo silenciamiento afecte directamente a la formación de la larva *dauer* en *C. elegans*.

5. Metodología

5.1. Lugar de trabajo

Todas las tareas necesarias para llevar adelante este proyecto fueron realizadas en los laboratorios de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires. Entre estas tareas se encuentran la preparación de los medios de cultivo, el autoclavado de material, el mantenimiento de la cepa de gusanos, la preparación de placas para los experimentos de ARNi y los ensayos de silenciamiento génico propiamente dichos.

Equipos utilizados para la realización de los experimentos:

- **Flujo laminar:** la cabina de flujo laminar fue utilizada para la preparación de las placas de medio de crecimiento de nematodos, donde los gusanos son mantenidos rutinariamente, la preparación de las placas utilizadas durante los experimentos de ARNi y el sembrado de bacterias en placas multipocillo. El flujo laminar posee un filtro que garantiza que el contenido de microorganismos en el aire durante el trabajo con las placas sea mínimo, para así evitar posibles contaminaciones. Durante el trabajo en cabina fue importante tomar las precauciones necesarias para extremar las condiciones de esterilidad, tales como el uso de guantes, material autoclavado y el rociado del material con alcohol 70% previo a su ingreso al flujo.
- **Freezer:** en el freezer fue almacenada la biblioteca de bacterias que expresan ARN doble cadena (dsRNA), entre otros reactivos, a una temperatura de -80°C . Al extraer la biblioteca para su uso, fue imperativo su almacenamiento en hielo hasta su devolución al freezer.

- **Agitador:** el agitador fue utilizado para el crecimiento de las bacterias que expresan el ARNi en medio líquido LB-ampicilina a una temperatura de 37°C, a 170-190 RPM durante 16 horas para su óptimo crecimiento. También fue utilizado para el crecimiento de *E. coli* (cepa OP50) previo a su siembra en las placas donde se mantiene rutinariamente a los gusanos.

- **Lupa de disección:** la lupa de disección Nikon SMZ-2T con aumento 40x fue utilizada con varios fines: el chequeo rutinario de los gusanos, el monitoreo de la disolución de los nematodos durante el tratamiento de *bleaching*, la visualización del fenotipo de los gusanos durante los experimentos con ARNi, la identificación del estadio de los gusanos y su conteo, la identificación de contaminaciones, entre otros.

- **Incubadora a 16°C:** la incubadora ajustada a 16°C fue utilizada para el crecimiento de los gusanos. En ella se guardan tanto las placas de Petri de 60mm, donde se mantiene la cepa de nematodos, como también las placas F₀ correspondientes a la primera generación de gusanos durante los experimentos de ARNi. Su espacio permite el almacenamiento de varias placas a la vez, por lo que es utilizada para guardar todas las cepas de gusanos utilizadas en el laboratorio.

- **Incubadora a 25°C:** la incubadora ajustada a 25°C fue utilizada para almacenar las placas de ARNi en las que se desarrolla la segunda generación de gusanos durante los experimentos (F₁). A 25°C, la cepa de gusanos GL228 forma larvas *dauer* debido a la mutación del gen de insulina/IGF-1, llamado *daf-2*.

5.2. Mantenimiento de la cepa de *C. elegans*

Para los ensayos de interferencia con ARN, se utilizó la cepa doble mutante GL228 (*daf-2(e1371);rrf-3(pk1426)*). Estos gusanos tienen una mutación puntual termo sensible en el receptor de insulina *daf-2* y se desarrollan normalmente a la temperatura permisiva de 20°C, pero forman larvas *dauer* a 25.5°C. El gen *rrf-3* codifica para una ARN polimerasa dependiente de ARN, que inhibe ARN de interferencia (ARNi) somático. Gusanos que llevan la mutación *rrf-3(pk1426)* tienen una delección de 3kb en este gen y son hipersensibles al ARNi.

Los gusanos fueron mantenidos en placas de Petri de 60mm conteniendo medio de crecimiento de nematodos (NGM) sólido (ver Anexo 1), estreptomycin y nistatina en una incubadora ajustada a 16°C. Las placas fueron sembradas con un césped de la cepa de *Escherichia coli* OP50, previamente crecida en LB líquido, la cual actuó como alimento para los gusanos. En el Anexo 1 se detallan los reactivos necesarios para la preparación del medio de crecimiento de nematodos (NGM).

Para mantener el stock de *C. elegans*, se realizó periódicamente el corte de un pequeño cubo de NGM conteniendo gusanos de una placa y se lo depositó sobre una nueva placa de Petri con NGM sembrado con *E. coli* OP50. Los gusanos se desplazan fuera del cubo de NGM proveniente de la placa original y se alimentan con bacteria fresca en la nueva placa. Al haber alimento disponible, los gusanos crecen en un ambiente propicio para el desarrollo de adultos capaces de poner huevos.

5.3. Análisis *in silico*

En resultados preliminares del grupo (Hochbaum *et al.*, 2011), se identificaron 1155 regiones genómicas que unen a DAF-12. Estas regiones se encuentran a 5Kb de un total de 3179 genes, sugiriendo que DAF-12 podría modular su expresión. Los genes silenciados por ARN de interferencia en este proyecto surgen a partir de esta lista de 3179 genes que se encuentran cercanos a regiones a las que el receptor nuclear DAF-12 se une.

Como criterio de selección, se decidió trabajar con genes que no tuviesen ortólogos en mamíferos. De esta forma, se realizó la búsqueda de cada gen en el buscador de la página Wormbase y se anotaron los genes que cumplieron con este criterio de selección. Es de destacar, que durante la realización de este proyecto, les fueron asignados a algunos de estos genes ortólogos en mamíferos.

A continuación, se procedió a buscar cada uno de los genes de esta nueva lista en la biblioteca de bacterias que expresan ARNi que posee el laboratorio. De esta manera verificamos que esté disponible el ARNi para el silenciamiento de cada uno de los genes seleccionados. Fueron descartados 24 genes por no encontrarse disponibles en la biblioteca. Por lo tanto, obtuvimos una lista de 101 genes para ser evaluados según el protocolo de silenciamiento utilizado.

5.4. Biblioteca de bacterias que expresan ARNi

En 1999, Timmon y Fire demostraron que el uso de una cepa particular de *E. coli* (HT115(DE3)), la cual carece de una RNAsa específica de ARN doble cadena (RNAsa III), mejora la capacidad de producir interferencia por ARN mediante alimentación. El gen de la RNAsa III es interrumpido por un transposón que contiene un marcador de resistencia a

tetraciclina. Para generar la biblioteca, un fragmento de ADN correspondiente al gen de interés es clonado dentro de un vector (L4440) entre dos promotores T7 con orientación invertida y luego este vector es transformado dentro de esta cepa bacteriana. El plásmido contiene además un fragmento de ADN que codifica para la polimerasa T7 inducible por agregado de IPTG al cultivo que permite la transcripción a partir de los promotores mencionados. Dentro de las bibliotecas de bacterias que expresan ARNi disponibles comercialmente, la que fue utilizada para este proyecto es la biblioteca desarrollada por Julie Ahringer.

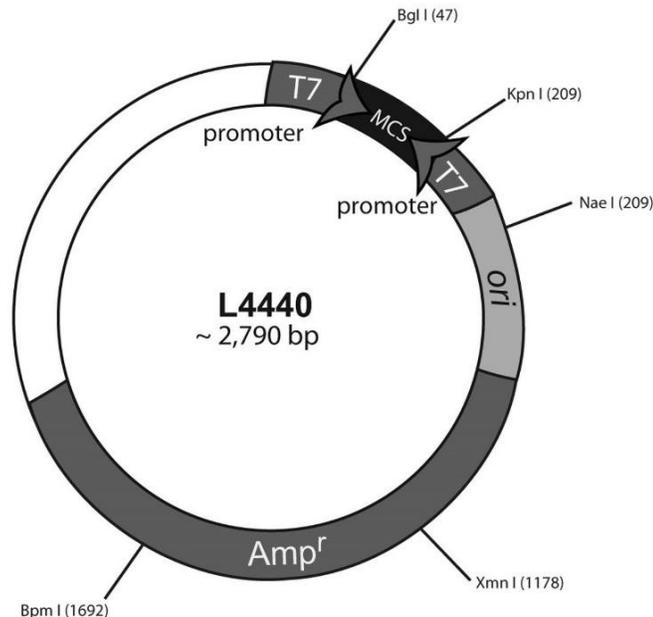


Figura 5H. Esquema del Vector L4440 doble T7 que se encuentra dentro de la cepa deficiente en RNAsa III *E. coli* HT1115 utilizada para silenciar genes por ARNi. En el MCS (*multiple cloning site*) se inserta un segmento de aproximadamente 1kb de longitud de DNA genómico del gen que se quiere silenciar. Los dos promotores de la transcripción T7 generan 2 hebras de ARN complementarias que se aparean generando una hebra de ARN doble cadena

(dsRNA). Este dsRNA dentro del animal es procesado y se utiliza como molde para degradar cualquier ARN mensajero que sea complementario a algún segmento del dsRNA.

5.4.1. Crecimiento de bacterias que expresan ARN complementario para el *screening*

Para obtener colonias de las bacterias deseadas disponibles para su uso en los experimentos se retiró con un ansa rulo una pequeña alícuota de los clones de bacteria pertenecientes a la biblioteca de ARNi, almacenados en placas de 386 pocillos a -80°C , y se la estrió en placas de Petri de 100mm conteniendo LB-agar (ampicilina $50\ \mu\text{g/ml}$). Estas placas fueron almacenadas de forma invertida en una incubadora a 37°C durante toda una noche para permitir el crecimiento de colonias y posteriormente almacenadas a 4°C hasta su uso. En el Anexo 2 se detallan los reactivos necesarios para la preparación de medio LB-agar. Este medio fue utilizado para la preparación de placas de Petri solidas de 100mm donde fueron estriadas las bacterias presentes en la biblioteca para su expansión.

5.5. Puesta a punto del protocolo de silenciamiento mediante ARNi

Para determinar las condiciones óptimas bajo las cuales alimentar a los gusanos con las bacterias que expresan ARNi se probaron diversos parámetros que podrían afectar a la eficiencia del silenciamiento génico. Seleccionamos cuatro genes cuyo silenciamiento genera un fenotipo fácil de identificar:

- *daf-12* y *daf-16*: al utilizar la cepa de gusanos que contiene el alelo *daf-2(e1371)*, deberían formar larvas *dauer* al ser crecidos a 25°C. El silenciamiento de *daf-12* o *daf-16* resulta en la formación de gusanos adultos reproductivos en vez de larvas *dauer*. Estos clones fueron utilizados como control positivo durante los experimentos posteriores a la puesta a punto del protocolo de silenciamiento.
- *unc-22*, cuyo silenciamiento genera que los gusanos se muevan de manera descoordinada.
- *rol-6*, cuyo silenciamiento genera que los gusanos en vez de desplazarse, rueden.
- Como control negativo se utilizó el clon L4440, es decir el plásmido vacío.

Los parámetros evaluados fueron:

- La concentración de isopropiltiogalactósido (IPTG) utilizada (1mM vs 0.4 mM).
- La concentración de ampicilina utilizada (50ug/ml vs 100ug/ml).
- El agregado, o no, del antifúngico nistatina.

En base a los resultados obtenidos, complementados con la bibliografía consultada, determinamos las concentraciones óptimas para el *screening*:

- El mejor método de inducción de la expresión del ARNi por parte de las bacterias es crecerlas en medio de cultivo sin IPTG, luego sembrarlas en placas conteniendo IPTG

1mM y dejar que el césped de bacteria se seque a temperatura ambiente y oscuridad durante toda la noche.

- Las bacterias transferidas a LB líquido deben ser crecidas durante 16 horas a 37°C en agitación y luego sembradas directamente sobre las placas conteniendo IPTG.
- Si bien las placas utilizadas en el *screening* pueden ser guardadas hasta 6 semanas a 4°C, los mejores resultados fueron obtenidos con placas preparadas no más de 10 días antes de los experimentos.
- La concentración de ampicilina que permite controlar posibles contaminaciones sin afectar el crecimiento de las bacterias es de 50 ug/ml.
- El uso de nistatina no se registra en la bibliografía. Sin embargo, su uso no pareció afectar negativamente los experimentos. Por el contrario, ayudó a mantener las placas libres de contaminaciones fúngicas, por lo cual se decidió utilizarla.
- La administración de tetraciclina es necesaria en las placas de LB donde las bacterias son estriadas al descongelarlas para su expansión. Sin embargo, el agregado de tetraciclina al medio de cultivo utilizado durante los experimentos de silenciamiento por ARNi genera una interferencia más débil.

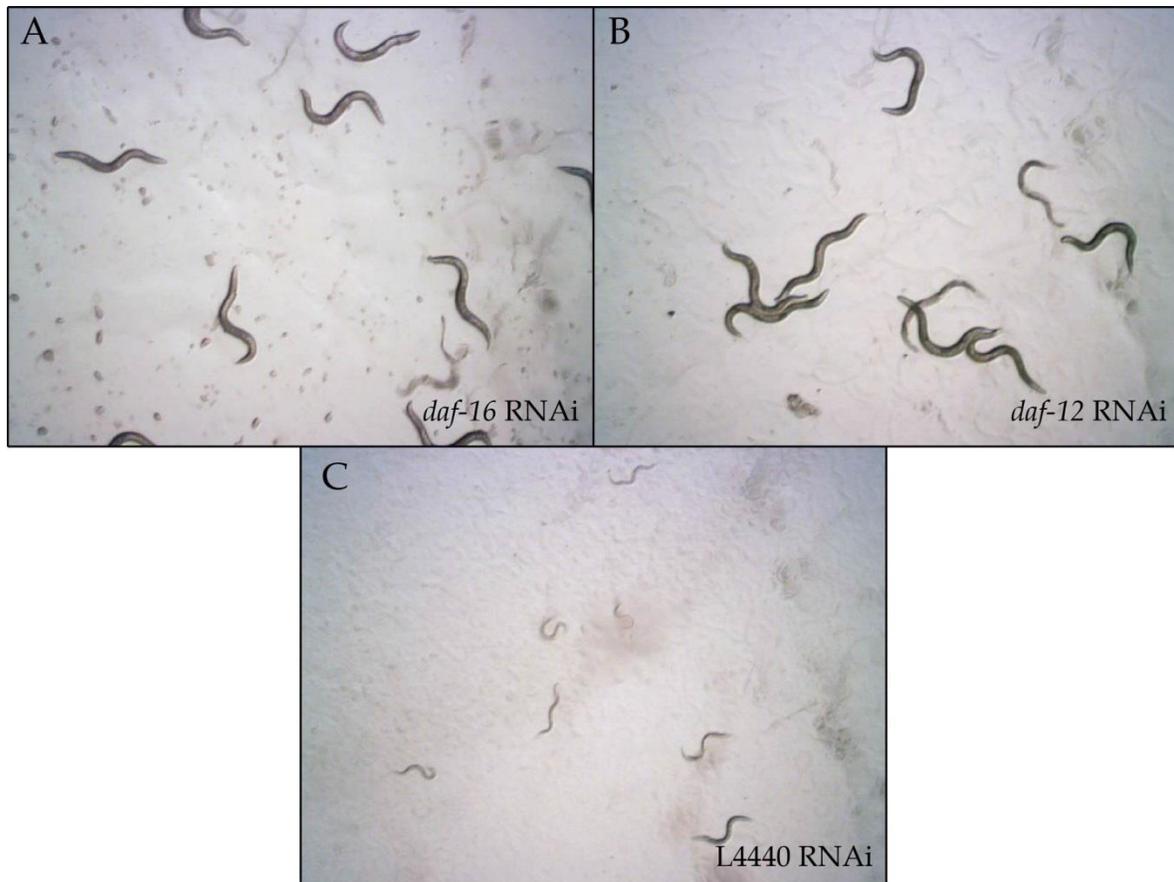


Figura 5I. A) y B) El silenciamiento por ARNi de los genes *daf-16* y *daf-12* resulta en la formación de gusanos adultos reproductivos luego de crecerlos a 25°C, indicando que estos genes son necesarios para la entrada al estadio *dauer*. C) El plásmido vacío L4440 fue utilizado como control negativo y se puede ver como todos los gusanos resultantes se encuentran en estadio *dauer*, evidenciando el correcto funcionamiento de la metodología.

Una vez puesta a punto la técnica de ARNi en el laboratorio, comenzamos con los ensayos a mayor escala. Llevamos a cabo los experimentos en placas multipocillo de 24 pocillos para todos los genes seleccionados. Se consideraron validos los ensayos en los que el pocillo conteniendo el control positivo (*daf-16* o *daf-12*) mostró adultos reproductivos. Un resultado posible de obtener

involucraba la ejecución parcial de los programas de desarrollo de la larva *dauer*, es decir que larvas fuesen morfológicamente similares a *dauers*, pero sin todas sus características (cutícula engrosada, ausencia de alimentación, boca y ano sellados). A este tipo de larva la llamamos larvas *dauers* incompletas o anormales. Para diferenciar entre *dauers* anormales o verdaderos, tomamos ventaja de las características que tiene la larva *dauer*, como es la formación de una cutícula protectora y de un tapón en la boca y en el ano, impidiendo que se alimenten (Fielenbach y Antebi, 2008). Es por estas características que la larva *dauer* tiene la capacidad de sobrevivir al ser expuesta a una solución de 1% SDS durante 15 minutos, mientras que los *dauers* anormales siguen alimentándose y son sensibles a este tratamiento.

5.6. Protocolo de silenciamiento mediante ARNi

El tiempo necesario para degradar un ARNm por ARNi es difícil de predecir y depende de cada mensajero. En general, se utilizan tiempos largos de exposición al ARNi, como 48-72hs. El problema es que a 25,5°C, la decisión de interrumpir el desarrollo y formar *dauers* toma aproximadamente 24hs. Esto plantea un problema, ya que necesitamos que el gen de interés esté totalmente silenciado previo a formar *dauers*. Para solucionar esto, tomamos ventaja de que en *C. elegans* los fenotipos inducidos por ARNi pueden transmitirse por generaciones, indicando que es heredable, y alimentamos gusanos *daf-2(e1371);rrf-3(pk1426)* con ARNi durante dos generaciones. La primera generación fue criada a 16°C, temperatura que permite un desarrollo normal. Una vez adultos, los transferimos a una placa nueva para que depositen huevos. Los huevos de esta primera generación, que ya no expresan el gen de interés, son creados a la temperatura no permisiva de 25,5°C, temperatura a la cual estos gusanos se desarrollan *dauers*, a menos que el gen silenciado sea necesario para la diapausa. Los detalles del protocolo de este *screening* se nombran a continuación.

Para poder iniciar el *screening* se debieron realizar ciertos pasos previos. Uno de ellos es el armado de las placas multipocillo a utilizar, según se detalla en el Anexo 3. Se añade IPTG a estas placas para inducir la expresión del plásmido bacteriano que codifica para el ARNi. Cada experimento requiere dos placas multipocillo de 24 pocillos conteniendo NGM-IPTG. Por otro lado también se deben descongelar y expandir las bacterias que se utilizaran durante los experimentos de silenciamiento (ver sección 5.4.1 y Anexo 2).

Una vez preparados los materiales para iniciar un experimento, se prosiguió según el siguiente protocolo:

1. El primer paso consistió en tomar una serie de tubos *Eppendorf* debidamente rotulados y llenar cada uno con 40µl de medio LB líquido (en el Anexo 4 se detallan los reactivos necesarios para preparar este medio) con el agregado de ampicilina 50 µg/ml. Luego, utilizando un escarbadiante estéril, se picó una colonia simple correspondiente a la expansión de la bacteria que expresa un determinado ARNi y se lo sumergió en uno de los tubos *Eppendorf*. Este paso se repitió con todas las bacterias a utilizar en cada experimento. Los tubos fueron posicionados en un *shaker* a 37°C durante 16 horas a 170-190 RPM para lograr el crecimiento de los cultivos de bacterias.
2. Una vez que las suspensiones de bacterias crecieron, se procedió a rotular dos placas multipocillo de 24 pocillos conteniendo medio NGM para experimentos de ARNi (Anexo 3). Una de las placas fue rotulada como F₀, donde se creció la primera generación de gusanos, y la segunda placa fue rotulada como F₁, donde se creció la segunda generación. Estas placas son “mellizas”, es decir que en el pocillo donde en la F₀ fue sembrada una bacteria que expresa cierto ARNi, en ese mismo lugar pero en la placa F₁ se sembró la misma bacteria. Trabajando bajo la campana de flujo laminar, se vertió una pequeña gota (aproximadamente 10µl) de cada bacteria en cada pocillo y se dejó secar a las placas, destapadas bajo el flujo, durante al menos 15 minutos. Al finalizar este paso se obtuvieron dos placas multipocillo que contienen el mismo

ARNi en las mismas posiciones. Las placas deben fueron guardadas a temperatura ambiente y en oscuridad durante 24 horas para inducir la expresión del ARNi por el IPTG.

3. Pasado el tiempo necesario para que se exprese el ARNi en las bacterias presentes en las placas, se prosiguió a depositar huevos en éstas. Con este fin, se realizó una sincronización (*bleaching*) de una de las placas de NGM donde se mantiene la cepa de gusanos. Esta placa debe contener gusanos que no estén hambreados, ya éstos no ponen huevos. Por eso, fue muy importante transferir gusanos a una placa con alimento disponible 5 días antes de la sincronización, de manera de tener una placa con gusanos adultos y no hambreados, óptima para el tratamiento de *bleaching*. El objetivo de la sincronización es trabajar con gusanos que estén todos en el mismo estadio.

Método de sincronización (*bleaching*): se tomó una (o más de una) placa conteniendo la cepa de gusanos GL228 y se la lavó con unos pocos mililitros de agua destilada. Se barrió la placa con agua con el objetivo de levantar la mayor cantidad de gusanos posible. El agua con gusanos fue transferida a un tubo de ensayo y centrifugada a 1500 RPM, para obtener un *pellet* de gusanos. Se descartó el sobrenadante y se añadió al *pellet* una solución alcalina de hipoclorito (en el Anexo 5 se detalla la preparación de esta solución). El tubo fue agitado durante al menos 10 minutos o hasta que no se visualicen cuerpos. La solución de hipoclorito disuelve los cuerpos de los gusanos pero no los huevos contenidos dentro de éstos. Al llegar al punto de disolución de cuerpos, se realizó una centrifugación y se descartó el sobrenadante. Luego se hizo un primer lavado con 6ml de buffer M9 (se detalla su composición en el Anexo 6) y se volvió a centrifugar el tubo. El sobrenadante fue descartado y se repitió el último paso de lavado con 3 ml de buffer M9. Los lavados fueron realizados para diluir la solución de hipoclorito. Finalmente, se volcó una pequeña gota del pellet de huevos obtenido (2 o 3 μ l) en cada pocillo, con el objetivo de tener aproximadamente 10 huevos por pocillo. En este paso se trabajó con la placa rotulada como F₀ y, luego de depositar los huevos en ésta, fue guardada a 16°C. La

relación bacteria:gusanos es muy importante ya que si las placas se hambread el silenciamiento no resultaría efectivo.

4. Luego de cinco días de incubación a 16°C se transfirió un gusano adulto reproductivo desde cada pocillo de la placa F₀ al pocillo correspondiente (el pocillo “mellizo”) en la placa F₁ para que depositen huevos. Esta placa se dejó durante 3 días a 25,5°C, tiempo suficiente para que los huevos se desarrollen a larvas *dauer*.

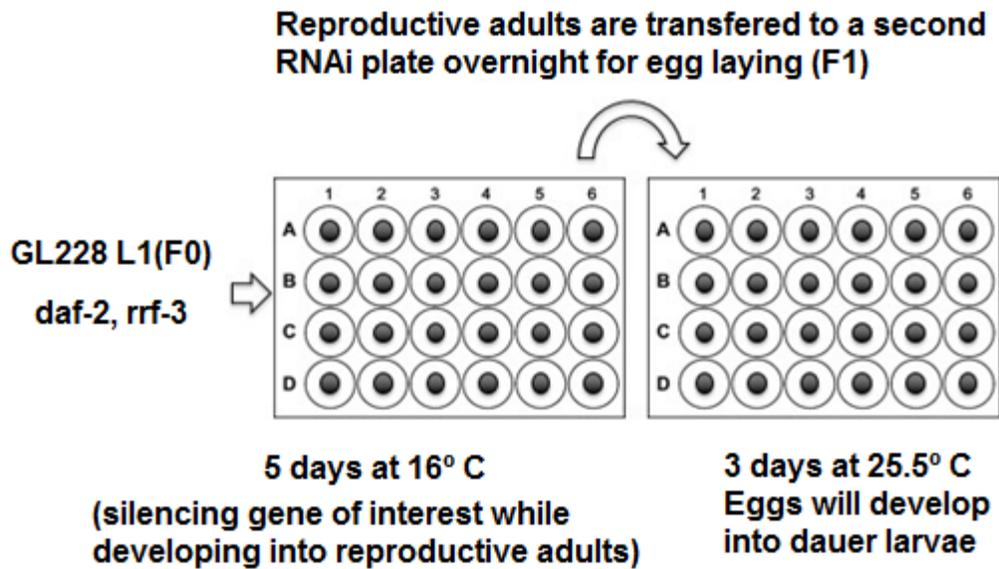


Figura 5J. Esquema de las placas multipocillo en las cuales fue llevado a cabo el *screening*. El par de placas posee los mismos clones de bacterias y en el mismo orden.

5. A las 24 horas de la transferencia de un gusano adulto a la F₁, o hasta que hayan depositado al menos 10 huevos, los gusanos adultos fueron levantados y quemados. El objetivo es que el gusano adulto no deposite más huevos, de manera de lograr homogeneidad en el estadio de los gusanos cuyo fenotipo será evaluado.

6. Tres días después de haber quemado a los gusanos adultos de la F₁, se procedió a verificar el fenotipo buscado en la progenie de éstos. Como control positivo se utilizaron bacterias que contienen ARN de doble cadena de *daf-12* o *daf-16*, es decir que no deberían formar larvas *dauer* a 25°C. Fue de especial importancia verificar que los gusanos presentes en el pocillo correspondiente al control positivo sean gusanos adultos y no larvas *dauer*. El resultado de cada silenciamiento se evaluó en base a dos parámetros:

- En primer lugar se visualizó bajo la lupa si los gusanos eran adultos o larvas *dauer*
- Por otro lado, se debió verificar que no sean las larvas *dauer* “anormales” mencionadas previamente. Por esto, no solo se verificó el fenotipo buscado al mirar los gusanos en la lupa sino que se los expuso a un tratamiento con el detergente SDS. Los gusanos fueron levantados de los pocillos utilizando 500 ul de M9-tween (buffer M9 con %0.1 del detergente Tween, el cual facilita el despegado de los gusanos de la placa) y centrifugados a 1500 RPM durante un minuto y medio. El sobrenadante fue luego descartado y se añadieron 150µl de SDS 1%, el cual se dejó actuar durante 10 minutos. Las larvas *dauer* resisten este tratamiento porque no se alimentan, mientras que los gusanos que se desarrollaron a larvas *dauer* anormales pueden seguir alimentándose y son sensibles a este tratamiento. Esto lo verificamos al observar en la lupa a los gusanos y ver si se encuentran tiosos o si están moviéndose. Si los gusanos estaban vivos, indicaba que la ausencia del gen ensayado no era necesario para la formación de larva *dauer*. En cambio, si todos los gusanos se encontraban muertos o se encontraban poblaciones mixtas, es decir, algunos vivos y algunos muertos, se repetía el experimento en otra placa de 24 pocillos.

Al repetir el ensayo, se procedió a realizar la misma metodología utilizada previamente y transcurridos los tiempos de incubación, se realizó al análisis visual y con 1% SDS por segunda vez. Una vez completado el duplicado en placa multipocillo, podían suceder dos cosas. La primera era que todos los gusanos estuvieran vivos. Si esto sucedía, se descartaría el gen

ensayado. En cambio, si los gusanos morían en el tratamiento, se consideraría como positivo el gen de interés.

6. Resultados

A continuación se muestran las tablas que indican los genes que fueron silenciados, el cromosoma en el que se ubican en el genoma de *C. elegans* y el resultado al que se arribó al realizar el *screening*. En todos los casos se destinó un pocillo de cada placa al control positivo (*daf-12* o *daf-16*) para poder verificar que el silenciamiento haya sido satisfactorio.

Nombre público del gen	Cromosoma	Resultado
ego-1	I	Negativo
inx-17	I	Negativo
F25H2.7	I	Negativo
del-3	I	Negativo
F58D5.3	I	Negativo
M01E5.3	I	Negativo
W05B5.1	I	Negativo
Y106G6H.1	I	Negativo
noah-1	I	Negativo
F21F3.6	I	Negativo
F27C1.3	I	Negativo

F32B5.6	I	Negativo
F48C1.6	I	Negativo
srt-62	I	Negativo
Y119C1B.9	I	Negativo

Nombre público del gen	Cromosoma	Resultado
nrf-6	II	Negativo
tps-2	II	Negativo
wrt-10	II	Negativo
F07H5.7	II	Negativo
F58G1.7	II	Negativo
cutl-2	II	Negativo
ZK892.6	II	Negativo
ZK1307.3	II	Negativo
ZK1307.4	II	Negativo
C44B7.10	II	Negativo
F33G12.6	II	Negativo

Nombre público del gen	Cromosoma	Resultado
F58A4.6	III	Negativo
R10E9.3	III	Negativo
T20G5.14	III	Negativo
Y37D8A.5	III	Negativo
Y37D8A.19	III	Negativo
ZK632.9	III	Negativo
ZK1058.9	III	Negativo
CO5D2.8	III	Negativo
flh-2	III	Negativo
C56G2.3	III	Negativo
F01F1.3	III	Negativo
K02D10.4	III	Negativo
ttr-32	III	Negativo
ttr-8	III	Negativo

Nombre público del gen	Cromosoma	Resultado
dpy-20	IV	Negativo
lin-66	IV	Negativo
gei-18	IV	Negativo
inx-7	IV	Negativo
C09G9.1	IV	Negativo
C33A12.4	IV	Negativo
F11E6.4	IV	Negativo
F12F6.1	IV	Negativo
F58G6.8	IV	Negativo
H01G02.1	IV	Negativo
R102.4	IV	Negativo
R102.6	IV	Negativo
T05E11.2	IV	Negativo
ZK792.7	IV	Negativo
F37C4.5	IV	Negativo
M01H9.3	IV	Negativo

Y42H9AR.4	IV	Negativo
-----------	----	----------

Nombre público del gen	Cromosoma	Resultado
gei-7	V	Negativo
grl-12	V	Negativo
her-1	V	Negativo
srx-47	V	Negativo
B0250.2	V	Negativo
C13C12.2	V	Negativo
F17C11.2	V	Negativo
F25D1.2	V	Negativo
T06C12.9	V	Negativo
Y44A6C.1	V	Negativo
Y75B12B.11	V	Negativo
ztf-9	V	Negativo
F21C10.10	V	Negativo
F21C10.9	V	Negativo

T10H9.1	V	Negativo
Y38A10A.2	V	Negativo

Nombre público del gen	Cromosoma	Resultado
lin-14	X	Inhibe el desarrollo
ptr-24	X	Negativo
ram-5	X	Negativo
sel-7	X	Negativo
tps-1	X	Negativo
jud-4	X	Negativo
C03A3.1	X	Negativo
C29F7.2	X	Negativo
F02C12.1	X	Negativo
oac-14	X	Negativo
F21A10.4	X	Negativo
F40E10.5	X	Negativo
F59F4.3	X	Negativo

F59F5.7	X	Negativo
M163.8	X	Negativo
T10B10.3	X	Negativo
B0403.3	X	Negativo
C26B9.2	X	Negativo
F20B6.4	X	Negativo
lact-1	X	Negativo
F52E4.5	X	Negativo
T06F4.1	X	Negativo
T14G11.1	X	Negativo
T22B7.3	X	Negativo
ZC13.2	X	Negativo
ZK154.6	X	Negativo
B0403.6	X	Negativo

7. Discusión

En el siguiente apartado se discutirán los resultados obtenidos y su relevancia. Se logró tanto el objetivo principal como el objetivo específico de la puesta a punto del protocolo de silenciamiento por ARNi.

Con respecto a los resultados del *screening*, ninguno de los genes seleccionados para su silenciamiento evitó la entrada al estadio *dauer* dando lugar a la formación de adultos reproductivos. En todos los casos se pudo observar gusanos más delgados que un adulto, característica típica de la larva *dauer*. Los clones correspondientes a los genes *daf-12* o *daf-16*, cuyo silenciamiento genera gusanos adultos reproductivos, fueron utilizados como control positivo. Si al finalizar el experimento en el pocillo correspondiente a *daf-12* o *daf-16* podían visualizarse gusanos adultos, los resultados del ensayo eran considerados como válidos. Luego de muchos experimentos de silenciamiento, previos a este proyecto, se decidió no destinar un pocillo a un control negativo ya que como control negativo debería utilizarse un gen cuyo silenciamiento no de como resultado la formación de gusanos adultos reproductivos. Por lo tanto todos los pocillos conteniendo bacterias que expresan el ARNi para genes cuyo silenciamiento no genera la formación de gusanos adultos actuaron como controles negativos, los cuales fueron prácticamente todos a excepción del control positivo. En resumen, todos los pocillos a excepción del control positivo actuaron como controles negativos.

El único gen cuyo silenciamiento generó un resultado diferente al resto fue *lin-14*. Este es un gen heterocrónico, es decir que su función es controlar el tiempo de los eventos de desarrollo estadio-específico en *C. elegans*. Las mutaciones en *lin-14* generan la eliminación o la reiteración de los eventos celulares que dan lugar al estadio larvario, dependiendo el tipo de mutación que sea (pérdida de función o ganancia de función). Además, *lin-14* actúa parcialmente como

regulador de la actividad de *lin-28*, un gen que codifica para una proteína citoplasmática requerida para un desarrollo correcto temporalmente hablando. El silenciamiento de este gen no generó lo que en este proyecto definimos como resultado positivo, ya que los gusanos al final del experimento no eran adultos reproductivos. Se destacó este resultado ya que tampoco se formaron larvas *dauer* sino que estos gusanos parecían no haber superado nunca el estadio L1. Este resultado concuerda con la bibliografía consultada: el silenciamiento de *lin-14* genera que los gusanos entren en estadio L1 reiteradamente.

Es de destacar que este mismo *screening* fue realizado por otros miembros del equipo del Dr. Daniel Hochbaum sobre otro grupo de genes que fueron seleccionados a partir de parámetros distintos a los establecidos en este proyecto. Se obtuvieron a partir de esos ensayos dos genes regulados por DAF-12 estrictamente necesarios para la formación de larva *dauer*: *chd-7* y *ztf-6*.

chd-7 es un gen que codifica para una proteína remodeladora de la cromatina dependiente de ATP que posee actividad helicasa. En *C. elegans* se desconoce la función que cumple. El gen Chd7 humano, ortólogo funcional a *chd-7* en nematodos, es el único gen asociado al síndrome cognitivo de CHARGE (Manning y Yusufzai, 2017). *ztf-6* es un gen que codifica para un factor de transcripción tipo *zinc finger* cuyo ortólogo en mamíferos es ZEB1. Su actividad modula la acumulación de lípidos tanto en *C. elegans* como en ratones. ZEB1 también participa en el desarrollo de diversos tipos de cáncer y es un gen necesario para la transición mesénquima-epitelial (Zhang *et al.*, 2015). Estos resultados fueron un punto de partida sobre el cual continuar los estudios planteados en el equipo en el marco de estudio de la longevidad en gusanos. En la figura 7A se pueden observar las diferencias morfológicas entre las larvas *dauer* y las larvas *dauer* anormales generadas por los tratamientos con ARNi para *chd-7* y *ztf-6*.

Con respecto a la relevancia de DAF-12 como potencial blanco de futuras terapias, una estrategia que se está estudiando es el uso de ligandos exógenos para interferir con las funciones fisiológicas del receptor. Un fármaco ideal debería poder modular a DAF-12 ya que dirige tanto la entrada como la salida de la etapa iL3. Un fármaco potencial es el $\Delta 7$ -DA, que es el ligando endógeno DAF-12 en *C. elegans* y también activa a DAF-12 en algunos nematodos parasíticos, aunque con menos potencia y eficacia. Además, la activación continua de DAF-12 mediante la administración farmacológica de ácidos dafacrónicos a larvas preinfecciosas previene la etapa infecciosa al inducir el desarrollo reproductivo de larvas jóvenes que de lo contrario arrestarían su desarrollo como las infecciosas iL3s (Wang *et al.*, 2009). Por lo tanto, el estado de activación de DAF-12 parece ser esencial tanto para iniciar como para establecer la infección. La capacidad de interrumpir el ciclo de vida del parásito en la tercera etapa infecciosa mediante la actividad de DAF-12 no tiene precedentes y sugiere una estrategia terapéutica antihelmíntica potencialmente interesante.

Es importante destacar que el beneficio terapéutico potencial de apuntar a DAF-12 ya ha sido validado en *S. stercoralis*. Este es un parásito que se ha utilizado para evaluar el potencial terapéutico de los ácidos dafacrónicos. Este parásito sigue dos estrategias de desarrollo para establecer infecciones. En una vía, las larvas L1 recién eclosionadas en el intestino del huésped se excretan en las heces y, a temperaturas ambientales, estas L1 se convierten en adultos de vida libre (Albarqui *et al.*, 2016). Después de un ciclo de vida libre, la segunda generación de estas crías se desarrolla en larvas iL3 que infectan a nuevos huéspedes. En la segunda vía, las larvas L1 recién eclosionadas permanecen dentro del huésped y a 37 ° C establecen una autoinfección continua al desarrollarse directamente en larvas iL3 que re-infectan continuamente al huésped. La incapacidad de los fármacos antihelmínticos actuales (por ejemplo, ivermectina o benzimidazoles) para dirigirse a las larvas autoinfecciosas latentes es una razón principal por la que estos fármacos a menudo son ineficaces para tratar la estrogiloidiasis. Por el contrario, el uso de ligandos DAF-12 puede ser una estrategia más eficaz para prevenir la autoinfección y

eliminar los parásitos. Dada la asociación entre la señalización DAF-12 y la longevidad, se esperaría que la alteración de la señalización DAF-12 con moduladores selectivos como $\Delta 7$ -DA tuviera dos atributos terapéuticos beneficiosos: evitarían que los gusanos inmaduros entren en la fase infecciosa (evitando la vía de “*dauer*”) y acortar la vida útil de los parásitos adultos (al inhibir la vía germinal). Este último efecto podría ser de particular importancia en la eliminación de los nematodos parásitos de larga vida, como los nematodos filariales y anquilostomas. En conjunto, la investigación actual sugiere que DAF-12 es un blanco terapéutico prometedor. DAF-12 controla importantes procesos biológicos que son esenciales para la transmisión de parásitos, siendo necesarios tanto para entrar como para salir de las etapas iL3, similares a *dauer*. Esta doble funcionalidad de DAF-12 proporciona dos modos potenciales de efecto terapéutico. Además, los homólogos de DAF-12 hasta ahora se han identificado en todos los nematodos parásitos que se someten a una detención del desarrollo L3, lo que indica que un fármaco dirigido al receptor sería ampliamente aplicable. También es digno de mención que la especificidad de DA para la unión y activación de DAF-12 es suficientemente alta para evitar la actividad de cruce con los receptores nucleares del huésped, que solo están relacionados lejanamente (Motola *et al.*, 2006). Finalmente, la estructura cristalina del dominio de unión al ligando DAF-12 se ha resuelto para dos especies parásitas (Wang *et al.*, 2009 y Zhi *et al.*, 2012), que podrían guiar el descubrimiento y la optimización de nuevos fármacos.

8. Conclusión

El objetivo de este proyecto consistió en la identificación de genes necesarios para la entrada al estadio *dauer* en *C. elegans* regulados por el factor de transcripción DAF-12 mediante la técnica de silenciamiento génico por ARN de interferencia. Como objetivo específico, se realizó la puesta a punto del protocolo de silenciamiento utilizado.

Se partió del trabajo realizado por el Dr. Daniel Hochbaum en el año 2011 donde se encontraron 1175 regiones genómicas a las cuales el receptor nuclear DAF-12 se une. Se planteó la cuestión acerca de si algunos de los genes que se encuentran cercanos a las regiones donde DAF-12 se une debían ser necesarios para regular la formación de la larva *dauer*. Este cuestionamiento surge a partir de la homología estructural entre la larva *dauer* del nematodo de vida libre *C. elegans* y la larva infectiva de algunos nematodos parasitarios.

A través de la bibliografía consultada y en base los experimentos realizados, se logró poner a punto el protocolo de silenciamiento génico por ARN de interferencia utilizado en el laboratorio. Se determinó que crecer a las bacterias de la biblioteca en medio de cultivo sin IPTG, bajo condiciones de agitación durante 16 horas a 37° C, y sembrarlas posteriormente en placas conteniendo IPTG 1mM, resulta en una mejor inducción de la expresión del ARNi. Se descartó de esta manera la expansión de las colonias de bacterias en medio líquido conteniendo IPTG. Con respecto a la formulación de las placas, los mejores resultados en lo que refiere a minimizar la contaminación de éstas fueron obtenidos con el uso de ampicilina en una concentración de 50 ug/ml y el agregado del antifúngico nistatina. Se descartó el uso de tetraciclina por observarse una interferencia más débil por parte del ARN. Por último, se concluyó que realizar los experimentos de silenciamiento con placas de NGM frescas dieron mejores resultados desde el

punto de vista que éstas no estaban reseca, con grietas donde los gusanos podían perderse, y resultaban menos contaminadas.

Con respecto al *screening*, de este proyecto se concluye que los genes seleccionados para su silenciamiento no afectan directamente la formación de la larva *dauer* en *C. elegans*.

9. Bibliografía

- Ahringer, J. (2006). Reverse genetics. WormBook.

- Albarqi MM, *et al.* (2016). Regulation of life cycle check-points and developmental activation of infective larvae in *Strongyloides stercoralis* by dafachronic acid. PLoS Pathog. 2016;12(1):e1005358.

- Albert, P.S., and Riddle, D.L. (1988). Mutants of *Caenorhabditis elegans* that form dauer-like larvae. Dev. Biol. 126, 270–293.

- Aitken, R.J., Allman-Farinelli, M.A., King, L.A., and Bauman, A.E. (2009). Current and future costs of cancer, heart disease and stroke attributable to obesity in Australia - a comparison of two birth cohorts. Asia Pac J Clin Nutr 18, 63–70.

- Antebi, A. (2006). Nuclear hormone receptors in *C. elegans*. WormBook.

- Antebi, A., Culotti, J.G., and Hedgecock, E.M. (1998). *daf-12* regulates developmental age and the dauer alternative in *Caenorhabditis elegans*. Development 125, 1191–1205.

- Antebi, A., Yeh, W.-H., Tait, D., Hedgecock, E.M., and Riddle, D.L. (2000). *daf-12* encodes a nuclear receptor that regulates the dauer diapause and developmental age in *C. elegans*. Genes Dev 14, 1512–1527.

- Cseke, L.J., Kaufman, P.B., Podila, G.K., and Tsai, C.-J. (2003). Handbook of Molecular and Cellular Methods in Biology and Medicine, Second Edition (CRC Press).

- Dieterich, C., Clifton, S.W., Schuster, L.N., Chinwalla, A., Delehaunty, K., Dinkelacker, I., Fulton, L., Fulton, R., Godfrey, J., Minx, P., et al. (2008). The *Pristionchus pacificus* genome provides a unique perspective on nematode lifestyle and parasitism. *Nat. Genet.* *40*, 1193–1198.
- Evans, R.M., and Mangelsdorf, D.J. (2014). Nuclear Receptors, RXR, and the Big Bang. *Cell* *157*, 255–266.
- Fielenbach, N., and Antebi, A. (2008). *C. elegans* dauer formation and the molecular basis of plasticity. *Genes Dev.* *22*, 2149–2165.
- 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.
- Hochbaum, D., Zhang, Y., Stuckenholtz, C., Labhart, P., Alexiadis, V., Martin, R., Knölker, H.-J., and Fisher, A.L. (2011). DAF-12 regulates a connected network of genes to ensure robust developmental decisions. *PLoS Genet.* *7*, e1002179.
- Hodgkin, J. (2005). Genetic suppression. *WormBook*.
- Hope, I.A. (1999). *C. elegans: A Practical Approach* (OUP Oxford).
- Hotez, P.J., Brindley, P.J., Bethony, J.M., King, C.H., Pearce, E.J., and Jacobson, J. (2008). Helminth infections: the great neglected tropical diseases. *J Clin Invest* *118*, 1311–1321.
- Hu, P.J. (2007). *Dauer*. *WormBook*.

- Kamath, R.S., Martinez-Campos, M., Zipperlen, P., Fraser, A.G., and Ahringer, J. (2000). Effectiveness of specific RNA-mediated interference through ingested double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Genome Biology* 2, research0002.

- Kutscher, L.M. (2014). Forward and reverse mutagenesis in *C. elegans*. *WormBook* 1–26.

- Larsen, P.L., Albert, P.S., and Riddle, D.L. (1995). Genes that regulate both development and longevity in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 139, 1567–1583.

- Lee, D.L. (2002). *The Biology of Nematodes* (CRC Press).

- *lin-14* (gene) - WormBase : Nematode Information Resource.

- Ludewig, A.H., Kober-Eisermann, C., Weitzel, C., Bethke, A., Neubert, K., Gerisch, B., Hutter, H., and Antebi, A. (2004). A novel nuclear receptor/coregulator complex controls *C. elegans* lipid metabolism, larval development, and aging. *Genes Dev.* 18, 2120–2133.

- Mahanti, P., Bose, N., Bethke, A., Judkins, J.C., Wollam, J., Dumas, K.J., Zimmerman, A.M., Campbell, S.L., Hu, P.J., Antebi, A., et al. (2014). Comparative Metabolomics Reveals Endogenous Ligands of DAF-12, a Nuclear Hormone Receptor, Regulating *C. elegans* Development and Lifespan. *Cell Metabolism* 19, 73–83.

- Manning, B.J., and Yusufzai, T. (2017). The ATP-dependent chromatin remodeling enzymes CHD6, CHD7, and CHD8 exhibit distinct nucleosome binding and remodeling activities. *J. Biol. Chem.* 292, 11927–11936.

- Motola, D.L., Cummins, C.L., Rottiers, V., Sharma, K.K., Li, T., Li, Y., Suino-Powell, K., Xu, H.E., Auchus, R.J., Antebi, A., et al. (2006). Identification of Ligands for DAF-12 that Govern Dauer Formation and Reproduction in *C. elegans*. *Cell* 124, 1209–1223.

- Ogawa, A., Streit, A., Antebi, A., and Sommer, R.J. (2009). A Conserved Endocrine Mechanism Controls the Formation of *Dauer* and Infective Larvae in Nematodes. *Current Biology* 19, 67–71.

- Ozanne, S.E. (2015). Epigenetic signatures of obesity. *N. Engl. J. Med.* 372, 973–974.

- Palmisano, N.J., and Meléndez, A. (2016). ARNi-Mediated Inactivation of Autophagy Genes in *Caenorhabditis elegans*. *Cold Spring Harb Protoc* 2016, pdb.prot086520.

- Reinhart, B.J., and Ruvkun, G. (2001). Isoform-specific mutations in the *Caenorhabditis elegans* heterochronic gene *lin-14* affect stage-specific patterning. *Genetics* 157, 199–209.

- Ruvkun, G., and Giusto, J. (1989). The *Caenorhabditis elegans* heterochronic gene *lin-14* encodes a nuclear protein that forms a temporal developmental switch. *Nature* 338, 313–319.

- Sommer, R.J. (2006a). Figure 1, Life cycle of *P. pacificus* in comparison to *C. elegans*.

- Sommer, R.J. (2006b). *Pristionchus pacificus*. *WormBook*.

- Vella, M.C. (2005). *C. elegans* microRNAs. *WormBook*.

- Wang, Z., Zhou, X.E., Motola, D.L., Gao, X., Suino-Powell, K., Conneely, A., Ogata, C., Sharma, K.K., Auchus, R.J., Lok, J.B., et al. (2009). Identification of the nuclear receptor DAF-12 as a therapeutic target in parasitic nematodes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 9138–9143.

- Wang, Z., Schaffer, N.E., Kliewer, S.A., and Mangelsdorf, D.J. (2017). Nuclear receptors: emerging drug targets for parasitic diseases. *J. Clin. Invest.*
- Zhang, P., Sun, Y., and Ma, L. (2015). ZEB1: at the crossroads of epithelial-mesenchymal transition, metastasis and therapy resistance. *Cell Cycle* *14*, 481–487.

10. Anexos

Anexo 1. Lista de reactivos necesarios para la preparación de 1 litro de medio de crecimiento de nematodos (NGM).

Reactivo	Cantidad
NaCl	3 g
Agar Sigma	17 g
Bacto peptona	2,5 g
H ₂ O	975 ml
Autoclavar	

Anexo 2. Lista de reactivos necesarios para la preparación de 1 litro de medio LB-agar.

Reactivo	Cantidad
Triptona	10 g
NaCl	10 g
Extracto de levadura	5 g
Agar bacteriológico	15 g
H ₂ O	935 ml

Autoclavar. Luego agregar:	
Tetraciclina	1000 ul
Ampicilina	1000 ul

Anexo 3. Lista de reactivos necesarios para la preparación de 500ml de medio de cultivo utilizado para la preparación de placas destinadas a los ensayos de ARNi.

Reactivo	Cantidad
NGM (ver Anexo 1)	500 ml
Autoclavar. Luego agregar:	
Colesterol en etanol	500 µl
CaCl ₂	500 µl
MgSO ₄	500 µl
KPO ₄	20 ml
Ampicilina	500 µl
Nistatina	500 µl
IPTG	500 µl

Anexo 4. Lista de reactivos necesarios para la preparación de 1 litro de medio de cultivo líquido Luria-Bertani (LB). Este medio es utilizado para la expansión de las bacterias sembradas en las placas utilizadas en los experimentos de ARNi.

Reactivo	Cantidad
Triptona	10 g
NaCl	10 g
Extracto de levadura	5 g
H ₂ O	950 ml
Autoclavar	

Anexo 5. Lista de reactivos necesarios para la preparación de la solución de *bleaching*.

Reactivo	Cantidad
NaOH (1N)	600 µl
Lavandina	600 µl
H ₂ O (d)	10,8 ml

Anexo 6. Lista de reactivos necesarios para la preparación de 1 litro de buffer M9.

Reactivo	Cantidad
KH ₂ PO ₄	3 g
K ₂ HPO ₄	6 g
NaCl	0,5 g
MgSO ₄	1 ml
H ₂ O (d)	89,5 ml
Autoclavar	