

Trabajo Práctico N° 3

RNA de interferencia en *Caenorhabditis elegans*

Introducción

El modelo *Caenorhabditis elegans*

Caenorhabditis elegans es un gusano nematodo hermafrodita de un milímetro de longitud, que se alimenta de bacterias y vive en el suelo. Fue propuesto como modelo de estudio en los años ´70 por S. Brenner. Posee un total de 959 células, de las cuales 300 son neuronas.

Algunas ventajas que proporciona *C. elegans* como sistema experimental eucariota son: se puede cultivar fácilmente en placas de Petri; puede poner de 200 a 300 huevos que en dos días llegan a estado semiadulto; posee 17.800 genes diferentes que forman su mapa genético, secuenciado completamente; la mayoría del tiempo se autofecundan, de manera que cualquier alelo recesivo se vuelve rápidamente homocigoto y afecta al fenotipo; después de 3 semanas muere, mostrando signos de envejecimiento; y es fácil su *screening* genético.

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*, pero luego se comprobó que existe en casi todos los organismos estudiados hasta el momento (animales, plantas, hongos, etc.). En este proceso, fragmentos de RNA doble cadena (RNAdc) promueven la degradación específica de un mensajero de RNA de secuencia complementaria.

El proceso de silenciamiento ocurre en tres etapas. En la primera etapa, moléculas de RNAdc 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.

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.

En este nematodo existen tres métodos de *delivery* de dsRNA: microinyección del dsRNA; inmersión de los nematodos en un medio conteniendo el dsRNA y alimentación de estos organismos con bacterias modificadas mediante ingeniería genética que expresan el dsRNA. 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 1). 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 RNAasaIII⁻.

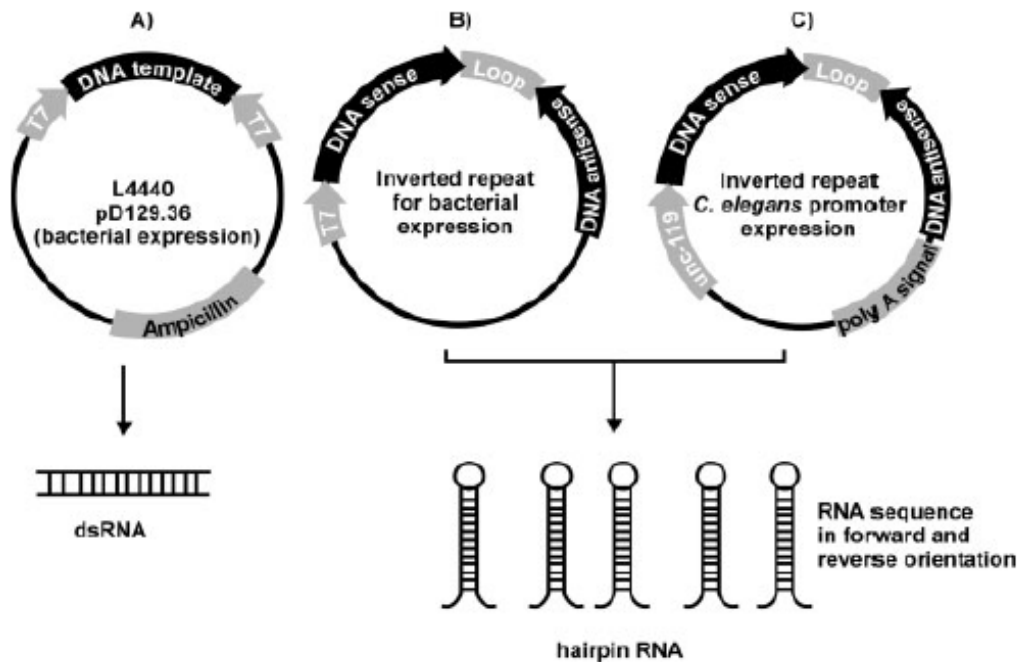


Figura 1. Diferentes métodos de construcción de plásmidos que expresan el dsRNA para *delivery* mediado por alimentación en *C. elegans*. A) Expresión de dsRNA. B) Expresión de *hairpin* RNA. C) Expresión de *hairpin* RNA bajo el control de un promotor tejido específico.

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 estadio 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.

Trabajo experimental

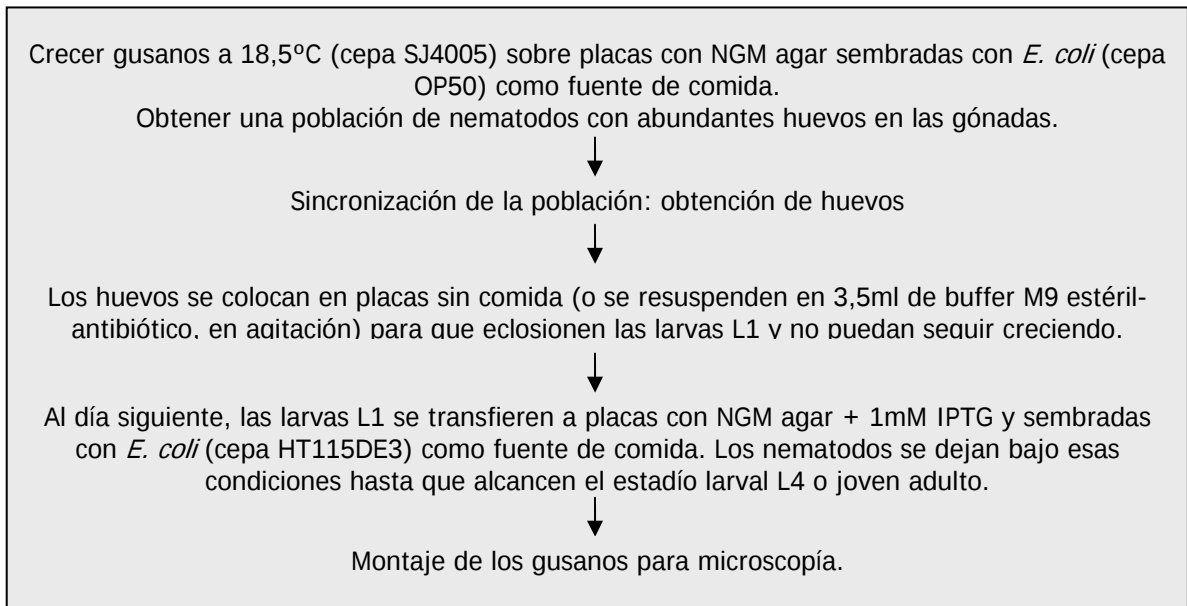
El objetivo del trabajo práctico es producir el silenciamiento génico en *C. elegans* (cepa SJ4005), mediante alimentación ("*RNAi feeding*") de los nematodos con bacterias modificadas mediante ingeniería genética (cepa HT115DE3) que expresan dsRNAs.

El gen blanco es el denominado F26H9.8, cuya función es desconocida, pero por análisis bioinformático se determinó que posee alta homología con proteínas humanas que tienen actividad de glucosiltransferasa. Las glucosiltransferasas son proteínas que están involucradas en el control de calidad del plegamiento de glicoproteínas.

La cepa SJ4005 de *C. elegans* posee el gen que codifica para la proteína indicadora GFP bajo el control del promotor del gen *hsp4*. La HSP4 es una proteína de respuesta al estrés en retículo endoplasmático.

Los nematodos serán alimentados con bacterias HT115D3 transformadas con el vector L4440 vacío, o con el vector que posee clonado, entre dos promotores T7 invertidos, un fragmento del gen que se pretende silenciar, en este caso el gen F26H9.8 (actividad de glucosiltransferasa).

Esquema experimental



Protocolos

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 2000 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 (exactos). Con este tratamiento se rompen los gusanos y se liberan los huevos.
4. Agregar 2 volúmenes de M9 estéril para diluir la solución de cloro/NaOH.
5. Centrifugar a 2000 rpm durante 20 segundos. Eliminar el sobrenadante.
6. Realizar dos lavados con 15ml de buffer M9 estéril. Centrifugar a 2000 rpm durante 20 segundos entre cada lavado. Descartar el sobrenadante.
7. Resuspender los huevos en 100 µl buffer M9 estéril-antibiótico.
8. Los huevos se colocan en placas sin comida (o se resuspenden en 3,5ml de buffer M9 estéril-antibiótico, en agitación) para que eclosionen las larvas L1 y no puedan seguir creciendo. Al día siguiente las L1 se transfieren a placas con comida.

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

Microscopía

Para la visualización de los gusanos por microscopía es necesario anestésarlos con una solución de azida.

Solución stock:

Azida 10%.

Solución de trabajo:

Dilución: se agrega 3,5ul de azida *stock* en 700ul de H₂O.

Se utilizarán 3,5ul de esta solución para 20ul de gusanos en M9.

Bibliografía

1. Biología general de *C. elegans*. Disponible en [http://avery.rutgers.edu/WSSP/Student Scholars/project/introduction/worms.html](http://avery.rutgers.edu/WSSP/Student%20Scholars/project/introduction/worms.html)
2. Altun, Z. F. y Hall, D. H. (2005). Handbook of *C. elegans* Anatomy. In Worm Atlas. Disponible en <http://www.wormatlas.org/handbook/contents.htm>.
3. Fire A., Xu S., Montgomery M.K., Kostas S.A., Driver S.E. y Mello C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806–811.
4. Grishok A. (2005). Rna mechanisms in *Caenorhabditis elegans*. *FEBS Letters* 579, 5932-5939. Minireview.
5. Kim J., Gabel H., Kamath R., Tewari M., Pasquinelli A., Rual J., Kennedy S., Dybbs M., Bertin N., Kaplan J., Vidal M. y Ruvkun G. (2005). Functional Genomic Analysis of RNA Interference in *C. elegans*. *Science* 308, 1164-1167.
6. Lehner B., Fraser A., y Sanderson C. (2004). How to use RNA interference. *Briefings in Funct. Genom. Proteom.* 3:1, 68–83. Technique review.
7. Timmons, L., Court, D.L., and Fire, A. (2001). Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Gene* 263, 103–112.