



Facultad de Medicina

Escuela de Medicina

**“Funciones de las ligasas de
Ubiquitina E3 y de las proteínas de respuesta a
choque térmico (HSP) en espermatogénesis de
Caenorhabditis elegans”**

**Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias
Médicas, mención en Biología Celular y Molecular**

HENRY GUZMÁN AMARO

Director de Tesis: Mario Párraga San Román

Diciembre /2016



Facultad de Medicina

Escuela de Medicina

**“Funciones de las ligasas de ubiquitina E3 y de las proteínas de
respuesta a choque térmico (HSP) en espermatogénesis de
Caenorhabditis elegans”**

**Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias
Médicas, mención en Biología Celular y Molecular**

HENRY GUZMÁN AMARO

Director de Tesis: Dr. Mario Párraga San Román

Diciembre /2016



Facultad de Medicina

Escuela de Medicina

Magíster en Ciencias Médicas Mención Biología Celular y Molecular

“Funciones de las enzimas E3 ligasas de ubiquitina y de las proteínas de respuesta al choque térmico (HSP) en espermatogénesis de *Caenorhabditis elegans*”

HENRY GUZMÁN AMARO

Este trabajo se realizó bajo la supervisión del Director de Tesis, Mario Párraga San Román en el laboratorio de Biología Molecular de la Espermatogénesis, Escuela de Medicina, Universidad de Valparaíso y ha sido aprobado por los miembros de la Comisión:

Dr. Sebastián San Martín Henríquez

Presidente Comisión

Dr. José Luis Bucarey Tapia

Profesor Informante

Dr. Hugo Monzón Godoy

Profesor Informante

Dr. Mario Párraga San Román

Director de Tesis

Valparaíso, Chile 2016

DEDICATORIA/AGRADECIMIENTOS.

Dar las gracias a mi madre que siempre está conmigo más en los momentos difíciles, siempre serás como una luz que ilumina mi camino, por el apoyo y la perseverancia que me traspasaste y no darme por vencido fácilmente. A mi polola que también me ayudó mucho a terminar sobre todo motivándome para seguir trabajando, aunque hubieran muchas piedras en el camino. A mi hermano por su ayuda y apoyo sobre todo cuando no se solucionaban los problemas. A mis tíos en Valparaíso, que siempre me recibieron como un hijo más, los quiero mucho.

A mis profesores gracias por la paciencia, en especial a Dr. Mario Párraga, mi director de tesis estaré siempre agradecido por todo, sobre todo por lo gran persona que es y además de sus enseñanzas. A mis compañeros momentos inolvidables y largas noches de estudio fue un gusto compartir y conocerlos.

A mis compañeros en el paso por Santiago, en especial a la Dr. Andrea Calixto por recibirme siempre sin ningún problema y estar dispuesta a ayudarme.

A mis amigos, que miles de veces me permitían distraerme y disfrutar de ellos cuando las cosas no salían como uno quería. Siempre estuvieron ahí cuando los necesitaba, sin dudas son los mejores.

Y para finalizar a la Eli, la secretaria del programa, siempre con una voluntad inmensa también mis agradecimientos para ella.

"Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor, la electricidad y la energía atómica: la voluntad"

Albert Einstein

ABREVIATURAS

HSP: proteínas de choque térmico
UPP: vía ubiquitina proteosoma
E2s: enzimas de conjugación
HSC70: proteína de choque térmico 70
HECT: dominio homólogo al C-terminal de E6AP
RING: nuevo gen realmente interesante
CRL: ligasa cullin ring
Lys: lisina
Gly: glicina
ERAD: vía de degradación asociada al retículo endoplasmático
CBL: linfoma casitas de linaje B
E3: enzima ligasa de ubiquitina
APC/C: complejo promotor de anafase ciclosooma
Cdc: ciclo división celular
Cdh1: cadherina 1
CDK: proteína quinasa dependientes de ciclinas
SAC: punto de control del ensamblaje del huso
UbcH10: enzima de conjugación de ubiquitina humana 10
Ube2S: enzima de conjugación de ubiquitina E2 S
RNAi: RNA interferente
WT: tipo silvestre
DNA: ácido desoxirribonucleico
SAS-4: proteína eje del huso anormal 4
PLG-1: proteína de formación del tapón de cópula-1
Such-1: gen supresor del defecto de punto de control del huso-1
fog-2 : gen feminización de la línea germinal 2
gfi-3 : gen de interacción con GEI-4
mat : gen defecto en la transición metafase-anafase
L1: etapa larval 1
L4: etapa larval 4

Ts: sensibles a la temperatura
BRCA1: proteína cáncer de mama 1
BARD1: proteína 1 con dominio ring asociada a BRCA1
DSB: roturas de doble hebra de DNA
HR: recombinación homóloga
NHEJ: unión de extremos no homólogos
FANCD2: proteína D2 del grupo de la anemia de Fanconi
BLM: síndrome de Bloom
SPO-11: proteína Homólogo del gen de SPOrulation de la levadura 11
RAD-51: proteína sensibilidad anormal a la radiación/relacionada con RAD 51
him-14: gen incidencia alta de varones (aumento de la pérdida de cromosomas X) 14
MSH4: proteína MutS homólogo 4
SYCP-1: proteína del complejo sinaptonémico 1
CED-3: proteína anomalía en la muerte celular
DAPI: 4',6-diamino-2-fenilindol
REC-8: proteína recombinación anormal-8
BRCT: C-terminal de BRCA1
Ubc5: proteína ubiquitina c 5
LET-70: proteína letal 70
IR: radiación ionizante
MRE-11: proteína reparadora de doble hebra 11
atl-1: gen ataxia telangiectasia mutada 1
K6R-Ub: ubiquitinas en lisina 6 sustituidas en arginina
CAND1: proteína 1 que separa NEDD8-Cullin
CKI-1: proteína familia CKI (inhibidor de quinasa dependiente de ciclina)
ELC-1: proteína Elongin C
SRS: proteínas no receptores con actividad de tirosina quinasa
DDB1: Proteína de unión al DNA dañado 1
Skp2: gen 2 asociada a la quinasa en la fase S
SKPT-1: proteína dos asociada a la quinasa en fase S homólogo a SKP2
dsRNA: RNA doble hebra
RBX-1: proteína 1 caja RING
GSC : células madres de la línea germinal

LRR-1: proteínas con repeticiones ricas en leucina
H2B: histona H2B
RPA-1: proteína replicación homóloga a Proteína A
FBF-1: proteína factor de unión al RNAm Fem-3
HTP-3: proteína him parálogo 3
Cye-1: ciclina E
TRA-1: proteína TRAnsformador: animales XX transformados en machos
MAB-3: proteína macho anormal-3
EGL-1: puesta de huevos defectuosa
FEM: proteína feminización
UBA-1 proteína UBA relacionado con la ubiquitina humana
FOG-3: proteína femineización de la línea germinal
RbBP-5: Proteína de unión a proteínas de RetinoBlastoma
GFP: proteína verde fluorescente
SPE-42: proteína defectuosa de la espermatogénesis 42
DC-STAMP: dominio específico de transmembrana DC
DHHC-CRD: dominio rico en cisteína
ZF-DHHC: dominio zing finger Asp-His-His-Cys
SC : complejo sinaptonémico
ZIP-3: proteína ZYGoto defectuoso: letal embrionario
zhp-3: proteína Homóloga de Zip (cremallera meiótica de levadura)
AIR-2: proteína Quinasa aurora 2
MutS: gen mutador S
SYCP: proteína del complejo sinaptonémico
SEL-10: proteína supresor/potenciador de lin-12
INTRA : receptor intracelular de Notch
Pas-5: proteína subunidad alfa del proteosoma
PLK4: proteína quinasa Polo 4
Slimb/BTRCP: proteína homólogo de LIN-23
LIN-23 células del linaje anormal 23
PEST: secuencia peptídica rica en residuos de prolina (P), ácido glutámico (E), serina (S), y treonina (T)
SOG: mutaciones supresoras de GLP-1

ubr5: proteína E3 ligasa de ubiquitina n-recognin 5
LF: fenotipo de pérdida parcial de función
EMS: etilmetanosulfonato
PROM-1: prominin 1
INA-1: integrina alfa
PAT-2: paralización por arresto al duplicarse
FAK: quinasa adhesión focal
VAB-3: morfología anormal variada 3
FCD-2: defecto proteína anemia Fanconi
RFS-1: proteína corta tipo RAD-51
RAD51C: proteína de reparación del DNA 51 C
ICL: reparación de los enlaces entrecruzados del DNA
FANCL: proteína E3 ligasa ubiquitina FANCL
ARF-BP1: proteína 1 de unión ARF
ARF: Factor de ADP-ribosilación
USP4: Proteasa 4 específica de ubiquitina
EEL-1: Potenciador del fenotipo mutante Efl-1
CEP-1: proteína tipo p53 en *C.elegans*
FSN-1: proteína sináptica caja-F
ENU: agente de alquilación
PCD: muerte celular programada
HSF1: factor de choque térmico 1
Cel-DAF: formación anormal de dauer *C.elegans*
Emb: fenotipos con letalidad embrionaria
Ste: estériles
WEE-1.3: Quinasa nuclear perteneciente a la familia Ser/Thr
siRNA: RNA de interferencia pequeño
emo: ovocitos con fenotipo de endomitosis
Raf/LIN-45: proteína quinasa serina/treonina homologa a Raf
IRES: sitios internos de entrada de ribosoma
RE: retículo endoplásmico
eIF4G: Factor de iniciación de la traducción eucariótica 4 G
MosSCI: Inserción de copia única mediada por mos1

EGFP: Proteína Fluorescente Verde mejorada
pHSP: promotor de proteínas de respuesta al choque térmico
AMP-5: proteína quinasa activada por AMP
WTSS: Secuenciación aleatoria de transcriptoma completo
AAK-2: quinasa activada por AMP
Gostat: programa estadístico de genes ontólogos
VBH-1: Helicasa tipo Belle y Vasa
LAF-1: feminizante y letal 1
SIP-1: proteína inducida por estrés
NPC: complejos de poro nuclear
Pg-NPC: complejos de poro nuclear asociados a gránulos-P
PEEL-1 letalidad embrionaria por epistasis del efecto paterno
ZEEL-1: letalidad embrionaria por epistasis del cigoto
PolyQ: poliglutaminas
UPR: proteína desplegada
BiP: Proteína de unión a inmunoglobulina
GRP94: Proteína inducible por estrés del retículo endoplásmico
IRE1: enzima 1 que requiere Inositol
XBP1: proteína de unión a la caja X
HRD-1: proteína E3 ligasa ubiquitina asociado ERAD
RNF-121: proteína ring finger 121
DER-1: proteína 1 de degradación en el retículo endoplásmico
TRIM71: Proteína que contiene un dominio tripartito 71
NHL: dominio de homología entre las proteínas Ncl-1, HT2A y Lin-41
HT2A: receptor serotonina hidroxitriptamina A
(iPSCs): células madre pluripotentes inducidas
UNC-45: descoordinado 45
UFD-2: Degradación de la ubiquitina por fusión 2
CHN-1: proteína que en C-terminal interactúa con Hsp70 (familia CHIP)
EBAX-1: Elongin BC unido al Axón regulador-1
SAX-3: axón sensorial guía 3
HGPPS: parálisis de la mirada horizontal y escoliosis progresiva
EGF: factor crecimiento epidérmico

SCF: complejo que contiene Skp, Cullin, caja-F
UFD: degradación de fusión de ubiquitina
sHSP: pequeñas proteínas de choque térmico
CHIP: C-terminal de la proteína interactuando con HSP70
EndoG: endonucleasa G
PD: enfermedad de Parkinson
αSN: α-sinucleína
MPTP: tetrahidropiridina
PolyQ: replegamiento de poliglutaminas
SCA: ratón transgénico ataxia espinocerebelosa
PARK2: Parkin RBR Ligasa de Ubiquitina E3
HD: enfermedad de Huntington
MEK-2: MAP quinasa quinasa o quinasa Erk
TPR1: repetición tetratricopéptido 1
DP1: repeticiones de residuos prolina aspartato 1
PGC: células germinales primordiales
DTC: células somáticas de la punta distal
MZ: zona mitótica
FB: cuerpo fibroso
MO: organelo membranoso
FB-MO: cuerpo fibroso organelo membranoso
MSP: proteína de esperma principal
RP: regulador cap, partícula 19S o PA700)
GLP-1: proliferación de la línea germinal anormal 1
DSS-1: Deleción en proteína 1 Split mano/pie
Paraquat: Dicloruro de 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridilo

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	2
3. OBJETIVO GENERAL.....	6
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	7
5. METODOLOGÍA.....	8
6. REVISIÓN DE LA LITERATURA.....	14
6.1. Generalidades de la relación entre E3 ligasas de ubiquitina y las proteínas de respuesta al choque térmico (HSP).....	14
6.2. Descripción general del desarrollo de la línea germinal en <i>C.elegans</i>.....	17
6.3. Descripción general del desarrollo de la espermatogénesis en <i>C.elegans</i>.....	19
6.4. Descripción general de la vía ubiquitina proteosoma y la especificidad de las E3 ligasas de ubiquitina.....	21
6.5. Funciones de la vía de degradación de proteínas ubiquitina proteosoma en la línea germinal de <i>C.elegans</i>.....	25
6.6. Funciones de las E3 ligasas de ubiquitina en la espermatogénesis y línea germinal de <i>C.elegans</i>	29
6.6.1. Funciones de las E3 ligasas de ubiquitina APC/C.....	29
6.6.2. Funciones de las E3 ligasas de ubiquitina BRCA1.....	35
6.6.3. Funciones de las E3 ligasas de ubiquitina Cullin.....	41
6.6.4. Funciones de las E3 Ligasas de ubiquitina relacionadas con la determinación del sexo en <i>C.elegans</i>	50
6.6.5. Funciones de las E3 ligasa de ubiquitina SPE.....	53
6.6.6. Funciones de las E3 ligasas de ubiquitina ZHP-3.....	57

6.6.7.	Funciones de las E3 ligasa de ubiquitina relacionadas con SEL-10.....	62
6.6.8.	Funciones de otras E3 ligasas de ubiquitina.....	64
6.7.	Generalidades de las proteínas de respuesta al choque térmico (HSP).....	80
6.7.1.	Funciones de las proteínas de respuesta a choque térmico (HSP) en la espermatogénesis y línea germinal de <i>C.elegans</i>	82
6.7.2.	Funciones de las proteínas de respuesta a choque térmico (HSP) en mamíferos.....	103
6.8.	Funciones en conjunto de las E3 ligasas de ubiquitina y las proteínas de respuesta al choque térmico (HSP) en espermatogénesis y línea germinal de <i>C.elegans</i>	105
7.	CONCLUSIONES	114
8.	BIBLIOGRAFÍA	117

1. RESUMEN

La espermatogénesis, es un proceso de diferenciación celular altamente regulado. Uno de los mecanismos que controla dicho proceso es la vía ubiquitina proteosoma, que actúa mediante una cascada enzimática, donde la ligasa de ubiquitina (E3) es específica del sustrato, para que posteriormente dicho sustrato sea degradado mediante el proteosoma 26S.

Igualmente, las proteínas de choque térmico regulan la espermatogénesis reparando proteínas mal plegadas producto de la exposición al estrés.

Ambas familias de proteínas, E3s y HSPs se encargan de regular la proteostasis, degradación y reparación, en diversos procesos celulares como: espermatogénesis, neurodegeneración, crecimiento y, envejecimiento, por ende, son consideradas cruciales para el funcionamiento celular en *C.elegans* y otros organismos.

El nemátodo *C.elegans* es un organismo no parasitario, con un ciclo de vida corto y una alta camada en la progenie, posee un linaje celular invariante, con una anatomía y desarrollo descritos y con su genoma completamente secuenciado, lo que lo transforma en un modelo atractivo para investigadores.

Algunas E3 en *C.elegans* están involucradas en la línea germinal, cumpliendo funciones en el desarrollo de la espermatogénesis, como por ejemplo, en el crossing-over, apoptosis, reparación del DNA, entre otras. También las HSP, poseen funciones en la formación de la gónada, meiosis, progresión del ciclo celular, entre otras, que contribuyen al desarrollo de la espermatogénesis en *C.elegans*. Además, ambas proteínas en conjunto, están involucradas en mecanismos relacionados con la espermatogénesis en *C.elegans*, específicamente en la formación de la gónada.

Esta revisión bibliográfica, se orienta en describir las funciones de las E3 ligasas, las HSP y cómo ambas proteínas, en conjunto, regulan etapas en la espermatogénesis y la línea germinal en *C.elegans*.

Palabras claves: *E3 ligasas de ubiquitina, proteínas de choque térmico (HSP), línea germinal, espermatogénesis y C.elegans.*

2. INTRODUCCIÓN

La espermatogénesis es un proceso de alta complejidad que consta de divisiones celulares y eventos de diferenciación para la formación continua de espermatozoides. Este mecanismo consta de tres etapas ordenadas las cuales son: mitosis, meiosis y espermiogénesis, resultando así gametos masculinos al final del proceso. La espermatogénesis ocurre en la gónada masculina y está altamente regulada y controlada, por ejemplo existe un nivel de regulación extrínseco mediante hormonas (eje hipotálamo-hipófisis), un nivel de regulación interactivo relacionado con la conexión entre célula-célula y un último nivel denominado intrínseco que ocurre mediante la regulación de la expresión génica, en todas las etapas que conforman la gametogénesis masculina (1).

Con respecto al nivel intrínseco, además de la expresión génica durante la espermatogénesis, se requiere la expresión de enzimas y proteínas, tanto para la regulación de la transcripción y traducción de genes como para la degradación de proteínas mediante la vía ubiquitina proteosoma, donde las enzimas E3 ligasas ubiquitan sustratos específicos para su posterior degradación por el proteosoma, y además, para la reparación de otros polipéptidos mediante las proteínas de choque térmico (HSP) (2).

Asimismo, la vía ubiquitina proteosoma, es considerada como el principal mecanismo de degradación de proteínas celulares que actúa a través de una cascada enzimática, las cuales son las siguientes: una enzima de activación de ubiquitinas (E1), que activa las ubiquitinas y las traslada a una enzima de conjugación de ubiquitinas (E2), esta enzima a su vez le cede las ubiquitinas a otra proteína, denominada enzima ligasa de ubiquitina (E3). Esta enzima E3 ligasa posee la especificidad para reconocer sustratos, distinguiendo entre una gran diversidad de proteínas, permitiendo así su identificación para que dichos sustratos sean degradados mediante el proteosoma 26S, logrando un recambio proteico y así contribuir al desarrollo adecuado de la espermatogénesis fielmente y sin errores (3).

Las E3 ligasas son de gran importancia reconociendo dianas proteicas que serán degradadas por el proteosoma, funciones que realiza en distintos procesos como: la progresión del ciclo celular (4) (5), la muerte celular programada y reparación del DNA (6), destacando las relacionadas con la espermatogénesis, las cuales se asocian con: meiosis (7), formación de la línea germinal (8), apoptosis en la línea germinal (9) entre otras.

Por otro lado, relacionado con la reparación de proteínas, una de las funciones principales de las HSPs, es reconocer las conformaciones de proteínas no nativas o estructuralmente incorrectas. Estas HSPs, muestran una amplia variedad de especificidades para identificar ciertas secuencias de aminoácidos y características estructurales que no son correctas, pero en la mayoría de los casos, las HSP reconocen secuencias hidrofóbicas que no están expuestas en la conformación normal de las proteínas (10).

Las *heat shock protein* cumplen un rol fundamental reconociendo estas anomalías, para después volver a replegar las proteínas plegadas erróneamente. Esto ocurre normalmente en procesos celulares, producto que la proteostasis o también denominada homeostasis proteica, está constantemente desafiada por diversos factores tales como mutaciones, errores en la traducción o condiciones de estrés, entre otras (10). Cuando existe errores funcionales en las proteínas de choque térmico, estas anomalías pueden afectar al desarrollo de diversos procesos celulares como por ejemplo, crecimiento y desarrollo normal (11), envejecimiento (12) respuesta a estímulos biológicos (13), destacando la importancia de las HSPs que cuando presentan errores en su estructura, también generan anomalías en el desarrollo de la espermatogénesis en *C.elegans*.

Las HSP o proteínas de choque térmico son responsables de ciertas funciones en la espermatogénesis de *C.elegans*, las cuales están relacionadas con: formación de la gónada y la línea germinal (14) (15) (16), progresión del ciclo celular en la línea germinal (17) (18), regulación de la meiosis en *C.elegans* (18), entre otras.

Sin embargo, si el funcionamiento del repliegue proteico fracasa por medio de las HSP, las enzimas E3 ligasas de ubiquitina distinguen estas proteínas dianas sin la capacidad de replegarse y de volverlas a una conformación normal eliminándolas a través de la proteólisis mediada por la vía principal de degradación de proteínas conocida como vía ubiquitina proteosoma (10).

Ambas familias de proteínas, E3s ligasas de ubiquitina y proteínas de choque térmico o HSPs se destacan por poseer una alta especificidad para la identificación de proteínas dianas, la primera con el propósito de marcarlas para eliminar estas proteínas sustrato y generar un recambio proteico mediante la vía ubiquitina proteosoma y la segunda reparando el plegamiento erróneo de las proteínas en respuesta al choque térmico u otros factores que conducen al estrés, ambas proteínas, en conjunto, cumplen funciones en el desarrollo de la espermatogénesis y en la formación de la línea germinal en *C.elegans*. Por ejemplo, existen datos en *C.elegans* que E3 ligasas y HSP en conjunto, son responsables de la formación correcta de la gónada en el nemátodo (19).

La presente tesis bibliográfica, se realizó en el modelo *C.elegans*, un nemátodo de vida libre no parasitario (20), de aproximadamente 1 mm de longitud (21), con un ciclo de vida corto, una alta camada en la descendencia (22), y su genoma completamente secuenciado (21). Además, el gusano presenta dos sexos, una hermafrodita y un macho y se mantiene con facilidad en condiciones de laboratorio (20). También, el gusano *C.elegans* es transparente en todas las etapas del desarrollo, permitiendo la visualización directa de todas las células, incluyendo sus divisiones y movimientos (21). Posee un linaje celular somático completamente caracterizado e invariante, lo que facilita el análisis de fenotipos (21).

C.elegans es un potente modelo de estudio, debido a que contiene muchos genes que son homólogos con los genes humanos (23). En el nemátodo *C.elegans* se ha desarrollado la capacidad de producir y detectar mutantes, y ser susceptible a la formación de transgénicos (22). Asimismo, se destaca por los aportes en genética clásica y enfoques genómicos funcionales modernos en este modelo. Igualmente, el gusano tiene valor tanto en la genética directa como en la genética inversa, las cuales están bien establecidas, permitiendo un análisis exhaustivo de las vías genéticas y de las funciones proteicas (21).

Específicamente, el gusano *C.elegans* como sistema de investigación se destaca en estudios relacionados con el control del ciclo celular en la línea germinal (24), en cáncer (21), reparación del DNA (23), entre muchas otras.

Para finalizar, en esta revisión bibliográfica, se contextualiza en la explicación de las funciones que desempeñan las enzimas E3 ligasas de ubiquitina, las proteínas de choque térmico (HSP) y cómo ambas proteínas recientemente mencionadas, en conjunto, se relacionan para la regulación de las distintas etapas de la espermatogénesis y la línea germinal en *C.elegans*.

3. OBJETIVO GENERAL

Describir las funciones de las E3 ligasas de ubiquitina y las proteínas de choque térmico (HSP) en espermatogénesis de *C.elegans* mediante una revisión narrativa de la literatura.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Describir las funciones de las E3 ligasas de ubiquitina en espermatogénesis de *C.elegans*.
2. Describir las funciones de las proteínas de choque térmico (HSP) en espermatogénesis de *C.elegans*.
3. Describir las funciones de las E3 ligasas de ubiquitina, asociadas con las proteínas de choque térmico (HSP), en espermatogénesis de *C.elegans*.

5. METODOLOGÍA

Para el desarrollo de esta tesis bibliográfica, se recolectaron artículos científicos relacionados con las siguientes palabras claves, con el uso de un conector explicado en los siguientes pasos:

Spermatogenesis *C.elegans*

Pathway ubiquitin proteasome *C.elegans*

E3 ubiquitin-ligase enzyme *C.elegans*

Heat shock protein (HSP) *C.elegans*

Se utilizó el Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) que es parte de la Biblioteca Nacional de Medicina de Estados Unidos como base de datos y PubMed Central® (PMC) que es un buscador donde existen archivos de publicaciones biomédicas y de ciencias de la vida de la librería nacional de medicina de los Estados Unidos, utilizando el Proxy de la Universidad de Valparaíso. La estrategia utilizada para identificar los artículos científicos seleccionados, se realizó de la siguiente manera y con los correspondientes criterios que se mencionan a continuación:

PRIMER CRITERIO DE BÚSQUEDA:

Se recopilaron documentos científicos desde el año 2006 hasta el año 2016.

Se incluyó un documento científico anexo del año 2002 en la introducción de la presente revisión bibliográfica.

Se consideraron artículos científicos originales y revisiones bibliográficas.

Se incluyeron publicaciones realizadas en el nemátodo *C.elegans* y algunos en mamíferos.

Solo se incluyeron artículos del mismo idioma de búsqueda, el cual fue el inglés.

Se utilizó como organizador bibliográfico, el programa MENDELEY Desktop 1.17.4 y formateado de citas según el estilo VANCOUVER.

Algunos datos de *C.elegans* se obtuvieron de la página www.wormbase.com.

SEGUNDO CRITERIO DE BÚSQUEDA:

Se seleccionaron artículos científicos de la espermatogénesis y línea germinal relacionados con la vía ubiquitina-proteosoma, con las E3 ligasas de ubiquitina, con las proteínas de respuesta al choque térmico (HSP), y asociados con las E3 ligasas de ubiquitina y proteínas de respuesta al choque térmico (HSP).

Para desarrollar el proceso de búsqueda bibliográfica en la NCBI, se utilizaron combinaciones entre las palabras clave escritas anteriormente, utilizando "AND" como operador booleano, que se muestran en la siguiente frase:

E3 ubiquitin-ligase enzyme AND Heat shock protein (HSP) *C.elegans*.

Spermatogenesis AND pathway ubiquitin proteasome *C.elegans*.

De esta manera se obtuvieron los siguientes resultados:

Spermatogenesis and pathway ubiquitin proteasome *C.elegans*, 301 artículos.

E3 ubiquitin-ligase enzyme *C.elegans*, 3879 artículos.

Heat shock protein (HSP) *C.elegans*, 1650 artículos.

E3 ubiquitin-ligase enzyme AND Heat shock protein (HSP) *C.elegans*, 218 artículos.

TERCER CRITERIO DE BÚSQUEDA:

De los 301 artículos encontrados en "Spermatogenesis and pathway ubiquitin proteasome *C.elegans*", se utilizaron otras palabras clave:

Spermatocytes

Spermatides

Spermatozoa

Spermatogenesis

Germline

Meiosis

Proteosome

Ubiquitin

Y se seleccionaron 16 artículos para realizar la revisión bibliográfica.

De los 3879 artículos encontrados en "E3 ubiquitin-ligase enzyme *C.elegans*", se utilizaron otras palabras clave, tales como:

Spermatocytes
Spermatids
Spermatozoa
Spermatogenesis
Germline
Meiosis
Germline somatic
Gametogenesis
Gonadas
E3
Ubiquitin ligase
Nematodes
C.elegans

Y se seleccionaron 81 artículos para realizar la revisión bibliográfica.

De los 1650 artículos encontrados en "Heat shock protein (HSP) *C.elegans*", se utilizaron otras palabras claves:

Spermatocytes
Spermatids
Spermatozoa
Spermatogenesis
Germline
Meiosis
Germline somatic
Gametogenesis
Gonadas
C.elegans
Nematodes
Heat shock protein Hsp

Mammals

Heat shock transcription factor 1 (HSF-1)

Promoter heat shock protein pHSP.

Y se seleccionaron 45 artículos para realizar la revisión bibliográfica.

De los 218 artículos encontrados en "E3 ubiquitin-ligase enzyme AND Heat shock protein (HSP) *C.elegans*", se utilizaron otras palabras clave:

Spermatocytes

Spermatides

Spermatozoa

Spermatogenesis

Germline

Germline somatic

Meiosis

Gametogenesis

Gonadas

C.elegans

Nematodes

E3

Ubiquitin ligase

Heat shock protein Hsp

Heat shock transcription factor 1 (HSF-1)

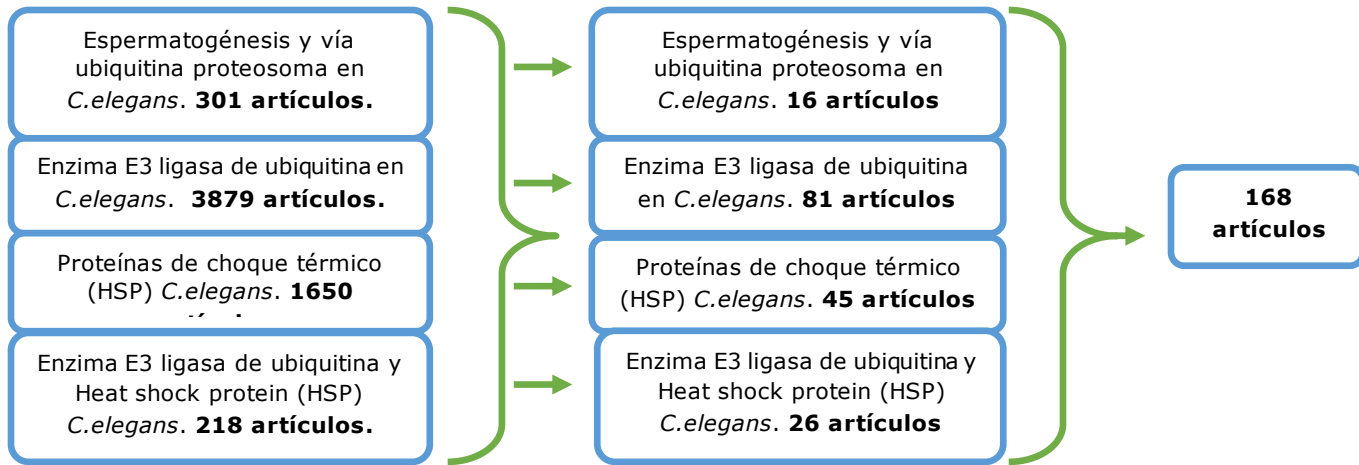
Promoter heat shock protein pHSP

Nematodes

Y se seleccionaron 26 artículos para realizar la revisión bibliográfica.

Para la presente revisión bibliográfica se recopilaron un total de 168 artículos, el resto de los documentos se descartaron debido a que no se encontró información relacionada con los criterios de búsqueda mencionados anteriormente en esta metodología.

ALGORITMO DE BÚSQUEDA BIBLIOGRÁFICA.



Para finalizar, los artículos se ordenaron a través de la búsqueda de palabras claves:

Objetivo 1:

- **Espermatogénesis y vía ubiquitina proteosoma en *C.elegans*.** De los cuales se encontraron 301 artículos siendo utilizados 16, que permitieron describir el desarrollo de la línea germinal, la espermatogénesis, la vía ubiquitina proteosoma y la especificidad de las E3 ligasas de proteínas en *C.elegans*.
- **Enzima E3 ligasa de ubiquitina en *C.elegans*.** Se encontraron 3879 artículos de los cuales fueron utilizados 81, que permitieron encontrar las funciones de las E3 ligasas de ubiquitina en la espermatogénesis y línea germinal de *C.elegans*.

Objetivo 2:

- **Proteínas de choque térmico (HSP) *C.elegans*.** Se encontraron 1650 artículos de los cuales fueron utilizados 45, que permitieron encontrar las funciones de las proteínas de respuesta a choque térmico (HSP) en la espermatogénesis y línea germinal de *C.elegans*.

Objetivo 3:

- **Enzima E3 ligasa de ubiquitina y Heat shock protein (HSP) *C.elegans*.** Se encontraron 218 artículos de los cuales fueron utilizados 26, que permitieron encontrar funciones en conjunto de las E3 ligasas de ubiquitina y las proteínas de respuesta al choque térmico (HSP) en espermatogénesis y línea germinal de *C.elegans*.

6. REVISIÓN DE LA LITERATURA

6.1. Generalidades de la relación entre E3 ligasas de ubiquitina y las proteínas de respuesta al choque térmico (HSP).

Las condiciones adecuadas para un correcto funcionamiento del organismo en el transcurso del tiempo se deben a la capacidad para enfrentarse a condiciones de estrés y a otros factores. Esta particularidad, depende de las características para responder y adaptarse a modificaciones internas y externas, así como la capacidad para reparar daños en las macromoléculas celulares. Esta propiedad en todos los organismos para contrarrestar las alteraciones celulares y mantener un equilibrio interno se ha definido como, homeostasis (25).

Cuando las células están expuestas a factores de estrés, que se pueden definir como cualquier señal que altere la homeostasis, se activan vías moleculares que contrarrestan el desequilibrio para prevenir el daño grave. Esta capacidad de detectar las modificaciones celulares y de responder a las consecuencias, se basa en la presencia de sistemas de control de calidad, que se refieren a mecanismos implicados en la defensa, mantenimiento y reparación celular (26).

El sistema de control de calidad celular, cumple una función crucial en el mantenimiento de la estructura tridimensional óptima y la función de una gran variedad de macromoléculas dentro de la célula. Dependiendo del modo de acción, los componentes del sistema de control de calidad pueden clasificarse como mecanismos de defensa preventivos, los cuales están permanentemente activados y garantizan que no ocurran daños, y los mecanismos de reparación celular, que se activan una vez que se ha perturbado la homeostasis con el fin de reponer el equilibrio interno (25).

Por ejemplo, existen complejos de proteínas, indicados como proteosomas, y procesos de autofagia, que están implicados en la eliminación de proteínas irreversiblemente dañadas, y la degradación de organelos desgastados, respectivamente (25).

Por otro lado, una vez ocurridos los daños, se altera la homeostasis y diversos mecanismos se activan para la mantención y reparación de macromoléculas celulares, y así, remediar o eliminar el daño, antes de que puedan producirse efectos deletéreos. Dependiendo de la macromolécula afectada o proteína desplegada, los respectivos miembros del sistema de control de calidad los detectan, y luego lo repara o lo elimina (26).

Por ejemplo, para realizar su función biológica, las proteínas deben alcanzar y mantener su conformación tridimensional. En consecuencia, las células han desarrollado un sistema de control de calidad para las proteínas, que consiste en vías de señalización de respuesta al estrés, que a su vez aseguran un adecuado ensamblaje proteico (27).

Este sistema de control de calidad de las proteínas, consiste en chaperonas moleculares que ayudan a plegar proteínas, asegurando que se acoplen en su estructura activa (25). Algunas de estas proteínas de respuesta al choque térmico son capaces de replegar las proteínas que han sido desnaturalizadas bajo estrés, mientras que otras HSPs, también funcionan como escoltas para proteínas terminalmente mal plegadas para su degradación (28).

Cuando las proteínas dañadas no pueden ser reparadas, el sistema de control de calidad cataliza la ubiquitinación mediante las enzimas E3 ligasas que reconocen estas proteínas dianas, para que el proteosoma reconozca las cadenas de ubiquitina y degrade la proteína dañada, con el propósito de prevenir el daño sostenido en la célula (29).

Sólo cuando el daño excede la capacidad normal del sistema de control de calidad de la célula, se notará un efecto deletéreo, que incluye un daño irreversible con desnaturalización de proteínas y formación de agregados proteicos (25).

Cuando se forman agregados de proteínas, los cuales son demasiado insolubles y excesivamente voluminosos para el replegamiento mediante chaperonas o para su eliminación por degradación proteosomal, en su lugar, su eliminación es mediante un proceso conocido como autofagia (30).

Por lo tanto, la célula bajo ciertas condiciones, la maquinaria de chaperonas no puede reparar la proteína mal plegada y debe coordinar su degradación por la vía de ubiquitina proteosoma, o la autofagia mediada por lisosomas (30).

Estudios muestran que además de regular la activación de HSF1, la E3 ligasa de ubiquitina CHIP ha sido identificada para estimular la vía ubiquitina proteosoma. La proteína CHIP contiene un dominio caja-U conservada, con el cual puede cooperar con las enzimas E1, E2 y E3 con el fin de ubiquitinarlas a las proteínas unidas a las chaperonas para la degradación (25).

Además, la actividad de la E3 ligasa CHIP puede selectivamente dirigirse a proteínas anormales para la degradación mediante el proteosoma 26S. Debido a que CHIP puede interactuar con HSP70, esta proteína CHIP también tiene actividad como una co-chaperona que podría proporcionar el eslabón perdido entre el fracaso de los mecanismos de reparación y, como consecuencia, la eliminación del sustrato (25).

Esta conexión, entre la maquinaria de reparación y eliminación, asegura el mantenimiento celular. Por ejemplo, si el plegado no tiene éxito, los sustratos desnaturalizados asociados con chaperonas durante un período de tiempo serán degradados a través de una E3 ligasa CHIP que proporciona ubiquitinas para eliminar las proteínas dañadas mediante la degradación por el proteosoma (31). Por otra parte, la doble capacidad de CHIP para activar simultáneamente HSF1 y la vía de degradación de proteínas, sugiere que esta co-chaperona, cumple un rol importante en determinar si la acción predominante del sistema de control de calidad da lugar a protección o degradación (31).

En los siguientes apartados, se explicaran funciones de las enzimas E3 ligasas, de las proteínas de choque térmico y las funciones en conjunto, entre las enzimas E3 ligasa de ubiquitina y las proteínas de choque térmico (HSP) específicamente en espermatogénesis y línea germinal de *C.elegans*.

6.2. Descripción general del desarrollo de la línea germinal en *C.elegans*

En el nemátodo *C.elegans*, el linaje celular somático es invariable y está completamente descrito (32). En contraste, la línea germinal contiene una población de células mitóticas restringidas que persisten a lo largo de toda vida en el gusano y que, según la capacidad reproductora del organismo se renuevan por sí misma (32). En el desarrollo de la gónada en *C.elegans*, las células germinales son identificadas tempranamente durante la embriogénesis (Figura 1) (33) (34). En el linaje celular embrionario, la blastómera P donde nace la línea germinal, se divide sólo cuatro veces posterior a la fertilización, antes de especificar la blastómera P4 como el único antecesor de todas las células germinales en el animal. La célula P4 se divide una vez para formar dos células primordiales germinales (PGC), denominadas Z2 y Z3, durante la embriogénesis. Las células PGC, Z2 y Z3 permanecen mitóticamente inactivas durante el resto de la embriogénesis, pero posteriormente comienzan a dividirse, aproximadamente en la mitad del primer estadio larval (L1) (35)(Figura 1). Las células continúan proliferando a medida que la gónada se expande durante los estadios larvales L2 y L3. Las células somáticas de la punta distal (DTC) de cada brazo gonadal, guían el crecimiento distal de la línea germinal, avanzando en el proceso, empieza a girar hacia el centro del animal durante la transición entre L3 y L4 (35). Poco después de la entrada en L3, las células más alejadas de las DTC inician la meiosis. El proceso de meiosis difiere significativamente de la mitosis debido a que dirige la recombinación entre cromosomas y también incluye una división adicional en el cual existe una reducción en el número de cromosomas para dar lugar a células haploides (35). La meiosis que es parte de la gametogénesis es fundamental para la formación de los gametos, de tal manera que los espermatozoides se producen en la etapa L4 y los ovocitos en edad adulta (35), permitiendo que *C.elegans* sea una hermafrodita auto fértil (36) (Figura 1).

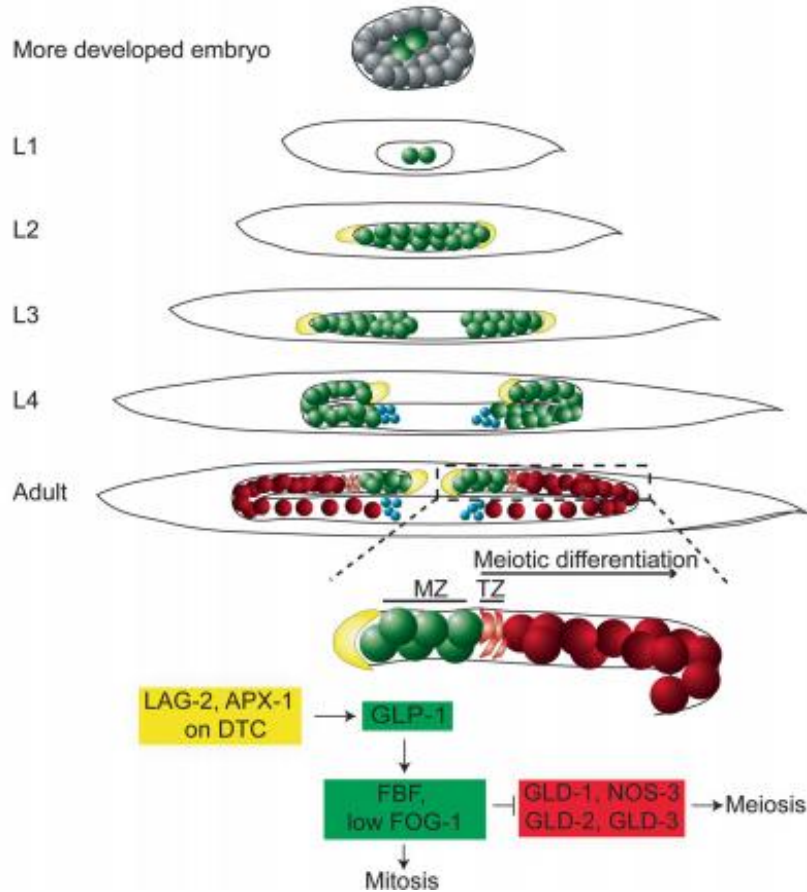


Figura 1. Desarrollo de la línea germinal en el hermafrodita de *C.elegans*. Las células germinales se indican mediante esferas coloreadas, mientras que la célula de la punta distal (DTC) está representada con color amarillo. Las células madre germinales (GSC), están en el ciclo celular mitótico dentro de la zona mitótica (MZ) están representadas como esferas de color verde, las células que entran en la meiosis en la zona de transición (TZ), se muestran como esferas crecientes. Las células espermatogénicas meióticas son de color azul y las células ovogénicas meióticas de color rojo (35).

Las células germinales dentro de cada brazo de la gónada adulta poseen una disposición polarizada y progresiva, en la que se mantienen células proliferativas cerca de las DTC, y las células más diferenciadas se sitúan en la gónada proximal. En la línea germinal del hermafrodita adulto, la región que contiene las células germinales que proliferan se conoce como la "zona mitótica" (MZ) (35). Según varias estimaciones, entre 200 y 250 células germinales son mitóticamente activas dentro de la MZ, que se extiende aproximadamente entre 19-22 tamaños celulares desde la punta distal de la gónada (35).

Estas "células" son en realidad un sincitio. Sin embargo, como cada núcleo tiene su propio citoplasma asociado que parece comportarse de manera autónoma permitiendo el desarrollo de los gametos (37). Todas las células dentro de la MZ están activas cíclicamente (37), aunque con leves diferencias, dependiendo de su posición relativa con respecto a la punta distal (32).

6.3. Descripción general del desarrollo de la espermatogénesis en *C.elegans*.

La espermatogénesis de *C.elegans* utiliza vías de tráfico de vesículas para ayudar a establecer la polaridad celular durante la diferenciación. Cada espermatocito primario sufre meiosis para producir cuatro espermátidas haploides (Figura 2)(38). Las espermátidas retienen selectivamente los componentes requeridos, mientras que los componentes innecesarios se acumulan en el cuerpo residual anucleado. La vía vesicular, produce organelos denominados Cuerpo Fibroso-Organelo Membranoso (FB-MO), que cumplen una función importante durante esta partición citoplasmática asimétrica (38). Los cuerpos fibrosos (FBs) y los orgánulos membranosos (MOs) se forman en estrecha asociación a medida que se desarrolla el espermatocito primario (Figura 2) (38). Cada MO que surge del Aparato de Golgi, tiene una membrana con doble capa que rodea las fibras de la proteína principal de esperma (MSP), que constituyen su asociación en conjunto con el FB (Figura 2), y muchos complejos FB-MO que se encuentran en cada uno de los espermatocitos primarios (Figura 2) (38). Los FB-MOs se segregan a cada espermátida en formación, simultáneamente con la finalización de la meiosis, mientras que los ribosomas, la actina, la mayor parte de la tubulina y varias membranas se descartan en el cuerpo residual (38). Las membranas de los MOs, se retraen de los FBs en el momento en que las espermátidas se separan del cuerpo residual, y los FBs se despolimerizan en dímeros constituyentes de la MSP que se dispersan a lo largo del citoplasma (Figura 2) (38). Durante la transformación de las espermátidas en espermatozoides, los dímeros de MSP se concentran en el pseudópodo, y se polimerizan en el citoesqueleto para regular la movilidad celular (Figura 2) (38).

Los MOs se localizan bajo la superficie de la célula espermática donde se fusionan con la membrana plasmática y forman un poro de fusión permanente. Este evento mediante el mecanismo de exocitosis, libera el contenido del MO hacia la superficie celular, lo cual es necesario para que las espermátidas se conviertan en espermatozoides funcionales (Figura 2) (38).

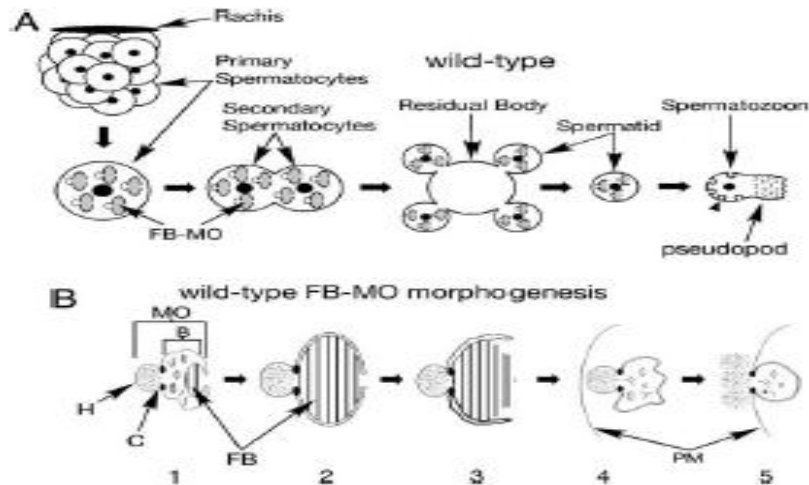


Figura 2. Resumen de la espermatogénesis WT (A), y morfogénesis del complejo FB-MO (B) en *C.elegans*. (A) Los espermátocitos primarios se desarrollan en un sincitio con el raquis, brotan del mismo raquis después de iniciar la meiosis. Un espermátocito primario experimenta dos fases de meiosis, para producir cuatro espermátidas haploides, posteriormente estas entran en la espermiogénesis para formar cuatro espermatozoides en *C.elegans*. B, la formación del organelo membranoso cuerpo fibroso, en donde el FB se desarrolla en asociación con el MO (38).

Relacionado con las proteínas de estudio, existen antecedentes de que las E3 ligasas de ubiquitina y las proteínas de choque térmico (HSP), están presentes y cumpliendo funciones cruciales en el desarrollo de la espermatogénesis y línea germinal de *C.elegans*.

De la información encontrada una parte de ésta, fue asociada a la enzima E3 ligasa que posee funciones específicas reconociendo sustratos, que están involucradas en los siguientes procesos como: meiosis (7), cantidad adecuada de DNA y centriolos en los espermatozoides (39), formación de la línea germinal (8), apoptosis en la línea germinal (9) entre otras.

Con respecto a las proteínas de choque térmico o HSP, que cumplen funciones en el plegamiento correcto de las proteínas y mantención de la proteostasis celular, se encontró información relacionada con los siguientes procesos en espermatogénesis de *C.elegans*, los cuales son: formación de la gónada y la línea germinal (14) (15) (16), progresión del ciclo celular en la línea germinal (17) (18), letalidad embrionaria y fenómenos de esterilidad (14) entre otras.

6.4. Descripción general de la vía ubiquitina proteosoma y la especificidad de las E3 ligasas de ubiquitina

La vía ubiquitina proteosoma (UPP) es el principal sistema que regulariza la degradación de proteínas de corta vida y la eliminación de proteínas solubles que están dañadas. El mecanismo UPP es dependiente de ATP y se consigue a través de una cascada enzimática que implica tres clases distintas de proteínas: la primera es la enzima activadora de ubiquitina (E1) que estimula las ubiquitinas y las cede a la segunda proteína denominada enzima de conjugación de ubiquitina (E2) que transfiere las ubiquitinas a la tercera y última proteína, la enzima ligasa de ubiquitina (E3) (3) (Figura 3) (40). La misma reacción une moléculas de ubiquitina adicionales a la ubiquitina primaria a través de los aminoácidos lisina internos en la ubiquitina (41)(42). Las cadenas de ubiquitina polimerizada actúan como una señal que traslada las proteínas diana al proteosoma, donde el sustrato se descompone proteolíticamente, en el proteosoma 26S (43).

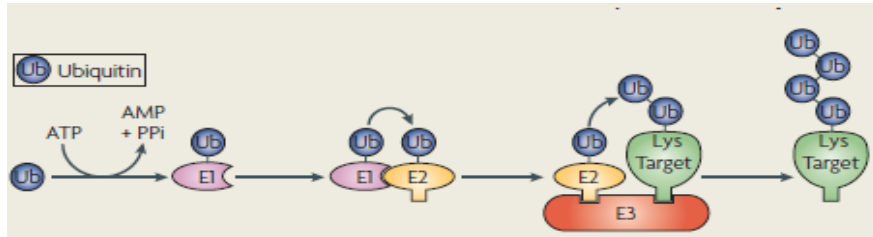


Figura 3. Vía ubiquitina proteosoma. Es un proceso de varios pasos en el cual, la etapa inicial requiere ATP, para unir la ubiquitina a la enzima activadora de ubiquitina (E1). La ubiquitina activada se transfiere a una enzima conjugadora de ubiquitina (E2s). Las E2s pueden donar ubiquitina directamente a los sustratos de proteínas, a través de complejos proteicos, denominados ligasas de ubiquitina o mediante HECT E3 ligasas específicas. Esto da como resultado, conjugados de proteína en donde la ubiquitina está unida a la proteína diana. Los sustratos podrían ser modificados por la unión de una sola ubiquitina (monoubiquitinación), moléculas de ubiquitina simple en múltiples residuos (multiubiquitinación) o cadenas de ubiquitina (polyubiquitinación). Muchas proteínas poliubiquitinadas son degradadas por el proteosoma 26S (40).

El holocomplejo de proteosoma o proteosoma 26S, consta de dos entidades: una estructura cilíndrica central con actividad de hidrólisis de péptidos (partícula de núcleo [CP] o proteosoma 20S) y una partícula reguladora (RP, también conocida como regulador *cap*, partícula 19S o PA700) necesarias para el reconocimiento del sustrato, la eliminación de la cadena de ubiquitina y el despliegue dependiente de ATP (44) (45).

La vía ubiquitina proteosoma (UPP), controla casi todos los procesos celulares básicos, como la progresión del ciclo celular, la transducción de señales, la muerte celular, las respuestas inmunitarias, el metabolismo, el control de la calidad de las proteínas y el desarrollo, degradando proteínas reguladoras de corta duración o estructuralmente aberrantes (45) (46).

Además, la vía ubiquitina proteosoma (UPP), interviene en funciones relacionadas con procesos en la espermatogénesis en *C.elegans*, como por ejemplo: el equilibrio entre la proliferación y la entrada a la meiosis de las células germinales (47), la degradación de los MOs y las mitocondrias paternas posterior a la fertilización (48), formación correcta de los espermatozoides (49), entre otras.

En relación a las enzimas E3 ligasas de ubiquitina, estas son de particular interés en los estudios evolutivos del sistema de ubiquitinación, debido a que existe una mayor diversidad con respecto a las enzimas E1 y E2 que participan en el mecanismo (50).

Los eucariotas poseen un único gen que codifica para la única E1 enzima activadora de ubiquitinas, decenas de genes para las enzimas E2 de conjugación de ubiquitinas, y como varios cientos de genes que codifican para las E3 ligasas de ubiquitina (50).

De hecho, los pocos genomas eucariotas hasta ahora analizados, codifican para muchas más enzimas E3 que E1 o E2. Por ejemplo, hay más de 600 tipos de E3 en el genoma humano, mientras que sólo hay dos proteínas E1, y aproximadamente 30 proteínas E2 (51).

La razón de esto, se debe a que las E3 ligasas son responsables de la especificidad del sistema de ubiquitinación, es decir, reconocen, discriminan e interactúan con el sustrato proteico adecuado (40), y por lo tanto, son funcionalmente más especializadas (50). De hecho, hay varios grupos de enzimas E3, según su estructura cuaternaria, la disposición de los dominios específicos y la forma en que interactúan con las enzimas E2 y la proteína diana. Esto incluye, por ejemplo, las ligasas HECT y RING, y los complejos CRL (50). Estas proteínas, típicamente, tienen una amplia gama de conformaciones en sus dominios, que implican motivos específicos de interacción proteína-proteína (50).

Las E3 facilitan la transferencia de ubiquitina a uno o más residuos de Lys en el sustrato. La conjugación covalente, se produce entre el grupo carboxilo del residuo de Gly en el carboxi-terminal de la ubiquitina y el grupo ϵ -amino de una Lys interna en el sustrato. Un sustrato puede ser monoubiquitinado en un solo residuo de Lys, multiubiquitinado en varios residuos de Lys, o poliubiquitinado, en el cual la transferencia secuencial de ubiquitina da lugar a cadenas de ubiquitina, unidas a uno o más residuos de Lys en el sustrato (40).

Generalmente, el tipo de ubiquitinación y las cadenas de ubiquitina formadas, determinan el destino de la proteína. La ubiquitina en sí, contiene siete residuos de Lys (Lys6, Lys11, Lys27, Lys29, Lys33, Lys48 y Lys63), y las cadenas secuenciales de ubiquitina, que se ensamblan por las E3, pueden implicar uno o más de estos residuos, aunque Lys48 y Lys63 son los más usados comúnmente (40).

Las dianas que contienen cadenas de ubiquitina ligadas a Lys48, son usualmente degradados por el proteosoma 26S, mientras que la monoubiquitinación y la poliubiquitinación, a través de Lys63, parecen estar implicadas en una serie de diferentes procesos celulares, tales como endocitosis y clasificación vesicular (40).

La función de las cadenas de ubiquitina, vinculadas a otros residuos de Lys, se está comenzando a dilucidar. Un reciente informe demuestra que las cadenas de poliubiquitina, a través de todos los residuos de Lys en la ubiquitina, excepto Lys63, pueden dirigirse a las proteínas para la degradación por el proteosoma, y los sustratos ligados a Lys11 están específicamente involucrados en la ruta de degradación asociada al retículo endoplasmático (ERAD) (40).

Comúnmente, se encuentran dos tipos de E3: el tipo RING y el tipo HECT (Figura 4). Una característica clave de las ligasas HECT en el residuo conservado de Cys, es que forma un enlace tioéster intermedio con el C-terminal de la ubiquitina, antes de catalizar la ubiquitinación del sustrato. Por el contrario, E3s RING son andamios que llevan la E2 cerca de los sustratos para facilitar la transferencia de ubiquitinas. E3 RING puede ser una cadena simple (por ejemplo, CBL) o ser parte de complejos multiméricos (por ejemplo, Cullin E3s) (Figura 4) (40).

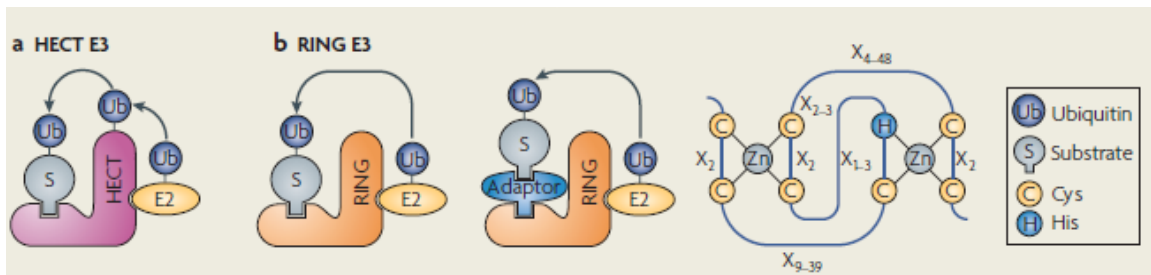


Figura 4. Principales tipos de proteínas E3 ligasas de ubiquitina. Dos grupos principales de proteínas ligasas de ubiquitina, las enzimas E3s HECT y las E3s RING, difieren en la forma en que transfieren la ubiquitina al sustrato. Las E3s HECT son enzimas que actúan como un receptor de enzimas E2 de ubiquitina (E2). La ubiquitina se transfiere a continuación a un residuo específico del sustrato (figura A). Por el contrario, las E3s RING actúan como un andamio para facilitar la interacción entre las E2 y los sustratos. Estas E3s pueden formar una cadena única o grandes complejos de múltiples proteínas que proporcionan la especificidad y complejidad (figura B). La mayoría de las E3s conocidos son RING. Estos se caracterizan por una secuencia $CX_2CX_{9-39}CX_{1-3}HX_{2-3}(C/H)X_2CX_{4-48}CX_2C$ que produce un motivo "crossbrace" que se estabiliza mediante la unión a dos átomos de zinc a través de residuos de Cys e His (figura B) (40).

En el nemátodo *C.elegans*, las E3 ligasas regulan procesos tan diversos como la determinación del sexo, la progresión del ciclo celular, (4) (5), la diferenciación, la reparación del DNA y la muerte celular programada (PCD o apoptosis) (6). Además, enzimas E3 ligasas de ubiquitina, intervienen en funciones relacionadas con procesos en la espermatogénesis como por ejemplo: meiosis (7), cantidad de DNA y centriolos en los espermatozoides (39), gametogénesis (8), formación de la línea germinal (8), apoptosis en la línea germinal (9) entre otras.

Por otra parte, se debe mencionar que la ubiquitinación es una reacción reversible, ya que muchos enzimas cisteína-proteasa y las metaloproteinasas que desubiquitinan (DUBs) están presentes en la célula (43). Las DUBs funcionan en la etapa inicial durante el desglose de las proteínas marcadas con ubiquitina para permitir que las ubiquitininas sean recicladas (43).

6.5. Funciones de la vía de degradación de proteínas ubiquitina proteosoma en la línea germinal de *C.elegans*.

La espermatogénesis se constituye por divisiones celulares, a través de una sucesión de etapas de alta complejidad, que conduce a la formación de células diferenciadas denominadas espermatozoides (2). Dicho complejo programa requiere una expresión precisa de enzimas y proteínas estructurales, que se relaciona no sólo para la regulación de la transcripción y traducción de genes, sino también para la degradación de proteínas diana (2). El sistema ubiquitina proteosoma en la espermatogénesis, se encarga de funciones proteolíticas y no proteolíticas en la ubiquitinación, como la formación de cadenas de proteínas conjugadas, usando otras lisinas que pueden regular procesos tales como la reparación del DNA o transducción de señales (2).

La importancia de la ubiquitina y el proteosoma, se resalta con la demostración de ejemplos relacionados con la capacidad altamente eficiente y selectiva de la UPP, para regular rigurosamente algunos de estos procesos, promoviendo la producción adecuada de espermatozoides normales (2).

La importancia de la UPP durante la meiosis se evidencia por defectos observados por el agotamiento de la ubiquitina o deterioro del proteosoma. Por ejemplo, la eliminación del gen de la poliubiquitina Ubb en ratones, conduce a la infertilidad con una detención de células germinales en la profase de la meiosis (52).

En *C.elegans*, la UPP también es relevante para el desarrollo adecuado de espermatozoides. En el siguiente apartado se demuestran ejemplos sobre algunas funciones de la vía ubiquitina proteosoma en la espermatogénesis y la línea germinal de *C.elegans*.

La capacidad reproductiva en muchos animales se basa en un estrecho equilibrio, entre el número de células que proliferan en la línea germinal y el número de células que entran en meiosis y se diferencian en gametos (47). En la línea germinal de *C.elegans* la vía de señalización GLP-1/Notch, controla este equilibrio entre la proliferación y la entrada a la meiosis. Se identificó al proteosoma como un regulador adicional de este equilibrio (47).

Los investigadores proponen un modelo en el que el proteosoma degrada las proteínas, que son necesarias para la proliferación a medida que las células cambian de la proliferación a la entrada en meiosis (Figura 5) (47).

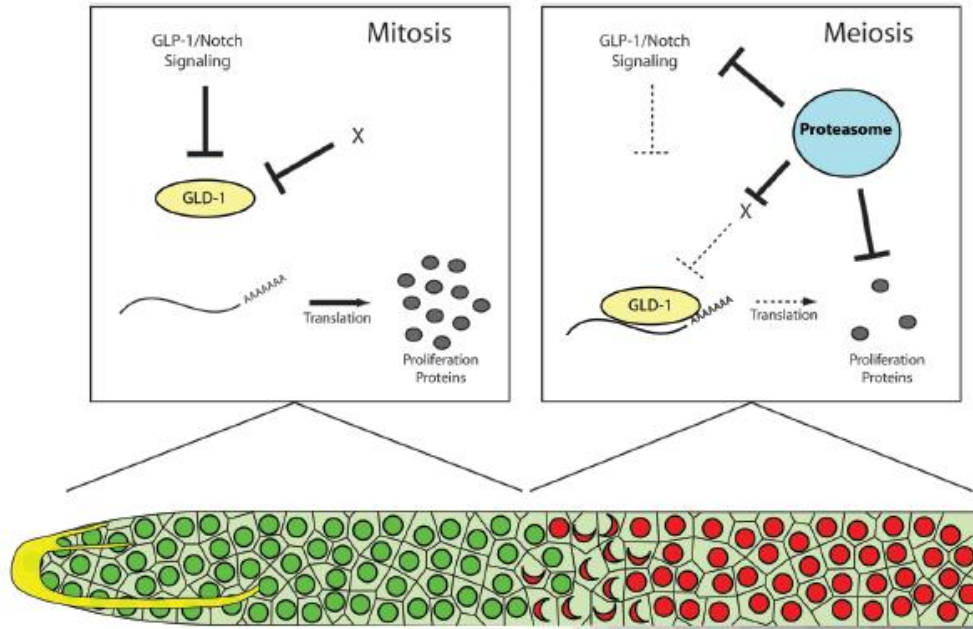


Figura 5. Modelo de la actividad del proteosoma en la regulación de la proliferación frente a la decisión de entrada a meiosis. En este modelo, las células proliferativas en la zona mitótica (verde) tienen activa la señalización GLP-1/Notch. Esta señalización inhibe la actividad de GLD-1, limitando su expresión en el extremo distal, lo que permite traducir ARNm específicos y producir proteínas necesarias para la proliferación. Como parte de un modelo, un factor desconocido (X) también puede inhibir la actividad de GLD-1 de una manera independiente de la señalización GLP-1/Notch. (47).

Otros mecanismos asociados con funciones de la vía ubiquitina proteosoma ocurren posterior a la fecundación en *C.elegans*. Unos organelos correspondientes a los espermatozoides denominados organelos membranosos (MO), se agrupan junto con mitocondrias paternas para ser eliminadas inmediatamente después de la fecundación (48).

El número de mitocondrias y MOs de los espermatozoides muestran una fuerte disminución durante el tiempo transcurrido entre la fusión espermatozoide-ocito y el inicio de la primera mitosis. Durante este tiempo, las mitocondrias paternas permanecen estrechamente agrupadas con los MOs (28).

Se observaron dos tipos de cadenas de poliubiquitinas en los MOs: cadenas de ubiquitina ligada a la K48 que se sabe que conducen a degradación proteosomal y cadenas de ubiquitina ligadas a la K63, las que se han relacionado con autofagia (48).

Poco tiempo después de la fecundación en *C.elegans*, los proteosomas maternos se localizan en los MOs y proteosomas paternos de los espermatozoides se localizan en las estructuras que se encuentran en la periferia de la agrupación de los MOs, lo que sugiere que la presencia de ambas poblaciones de proteosomas en conjunto con mecanismo de autofagia, se encargan de la degradación del material paterno, como los MOs y mitocondrias que se encuentran en los espermatozoides de *C.elegans* (48).

Relacionado con otro estudio, se ha descrito a DSS1 (o Rpn15) como una proteína conservada que ha sido implicada en varias funciones celulares. Se ha comprobado que DSS1 es una subunidad del proteosoma 26S (53). Para estudiar la importancia de DSS-1 se analizó el fenotipo de gusanos mutantes para DSS-1. Los gusanos homocigotos DSS-1 (tm370) crecieron hasta convertirse en adultos, los cuales fueron estériles (49).

Por lo tanto, se ha demostrado que la falta de descendencia fue provocada por un defecto en la formación de espermatozoides por los mutantes DSS-1, al realizar el apareamiento con gusanos machos WT (49).

Además, los espermatozoides que estaban presentes en la espermateca de los gusanos mutantes, eran comparables en número con los de los gusanos heterocigotos control (49). Esto sugirió que la espermatogénesis era superficialmente normal. Sin embargo, se presentó un cierto retraso en la formación de espermatozoides debido a la acumulación de espermatocitos en un 35% a los 3 días de edad en mutantes DSS-1, comparados con los gusanos control (49).

En resumen. las mutaciones producidas en DSS-1, alteran una subunidad del proteosoma 26S, conduciendo a defectos en la formación normal de los espermatozoides y un retraso en tiempo de la formación de los mismos (49).

6.6. Funciones de las E3 ligasas de ubiquitina en la espermatogénesis y línea germinal de *C.elegans*

6.6.1. Funciones de las E3 ligasas de ubiquitina APC/C

La destrucción oportuna de los reguladores del ciclo celular por el proteosoma, es parte importante para que ocurra la división celular exitosa en todos los eucariotas (7). Para llevar a cabo estos hechos, existen enzimas E3 ligasas que catalizan la ubiquitinación de varias proteínas en el ciclo celular, para la degradación a través del proteosoma. Este mecanismo se realiza mediante la degradación ordenada de sustratos, tales como ciclinas, quinasas mitóticas, proteína securin, microtúbulos y componentes del ensamblaje del huso (36) (54) (55).

El complejo promotor de anafase o ciclosoma (APC/C) es un promotor clave en la progresión del ciclo celular. Esta E3 ligasa de ubiquitina formada por múltiples subunidades proteicas, impulsa tanto la transición metafase-anafase y la salida de la fase M por poliubiquitinación de los diferentes sustratos para dirigirlos a degradación mediada por el proteosoma 26S (56) (57).

Los diversos sustratos mitóticos y meióticos de APC/C incluyen a securin, cuya destrucción libera la proteína separasa para escindir el complejo cohesina entre las cromátidas hermanas, como la ciclina B, cuya destrucción permite la salida de la fase M. Cuando existen modificaciones por agotamiento o la represión de la actividad APC/C, esta E3 ligasa impide la destrucción de securin y conduce a una detención de las células en metafase (8).

Como en todos los aspectos del ciclo celular, la actividad de APC/C debe estar regulada con precisión. Para activarse y facilitar el reconocimiento del sustrato, el promotor APC/C debe estar unido a uno de sus activadores que contienen repetición de WD (triptófano-aspartato) (56).

Los principales reguladores bioquímicos o coactivadores secuencialmente, son; Cdc20/Fizzy que impulsa la transición metafase-anafase, y Cdh1, gen supresor de tumores que no sólo impulsa la salida de la mitosis, sino que también reprime la entrada al ciclo celular posterior y promueve la diferenciación celular somática (58)(59).

Un ejemplo de un sitio de regulación es cuando la actividad de APC/C es temprana, se producen aberraciones en la segregación cromosómica, la actividad de APC/C está regulada negativamente por el punto de control del ensamblaje del huso (SAC)(8). Este sitio de regulación bloquea la transición metafase-anafase a menos que todos los cinetocoros estén unidos a los microtúbulos y bajo una tensión del huso bipolar adecuada (60), retrasando el inicio de la anafase por inhibición de la actividad de APC mediante el secuestro de Cdc20. Este retraso suele ser suficiente para que la célula corrija el problema en el huso, para permitir la progresión del ciclo celular (61).

En *C.elegans*, el tiempo de activación de APC/C, es importante regularlo, porque la segregación precoz o aberraciones en los cromosomas que pueden dar lugar a la aneuploidía de las células hijas, que conduce a la muerte del embrión o la proliferación celular descontrolada (61). En el nemátodo, la mayoría de las subunidades de APC/C son necesarios para la división celular tanto en mitosis como en meiosis (61).

A partir de esta información, se examinaron proteínas del tipo APC-16, ortólogo de K10D2.4 en *C.elegans*, que podrían ser subunidades funcionales de APC/C. Estudios anteriores mediante la inhibición de diversas subunidades de APC/C por RNAi o mutaciones sensibles a la temperatura provocan un fenotipo de “transición defectuosa metafase-anafase” (Mat), que es característico por la pérdida de función en APC/C (7).

Se realizaron *knockdown* de K10D2.4 por RNAi, que además de generar un fenotipo *mat*, todos los huevos fertilizados permanecieron detenidos en una sola célula dentro del útero de las hermafroditas (7). La detención se produjo en la transición metafase-anafase en la meiosis I, y el agotamiento se parecía al de un fenotipo *mat-2* (APC1) (7).

Al visualizar el útero en un lapso de tiempo, el óvulo fecundado con K10D2.4 RNAi mostró la formación del huso en la transición en metafase, que persistió durante 67 minutos. Por el contrario, los embriones WT iniciaron la anafase meiótica I después de $5,1 \pm 0,89$ minutos y la anafase II después de $19,3 \pm 0,45$ minutos, después de la salida de la espermateca (7).

En resumen, la inhibición de K10D2.4, ortólogo de APC16, es esencial para APC/C en *C.elegans*, debido a que causa un fenotipo altamente específico de pérdida de función de APC/C, indicando que los óvulos fecundados con RNAi de K10D2.4 mostraron una detención prolongada del huso en la transición metafase-anafase comparado con los WT (7).

Otras indagaciones relacionadas con la E3 ligasa de ubiquitina, APC/C están vinculadas con algunos componentes de los espermatozoides en *C.elegans*, como el DNA y los centriolos. Se conoce que los espermatozoides contribuyen con el DNA, que constituye el pronúcleo masculino, y los únicos centriolos al cigoto. Científicos estudiaron el gen *such-1*, que codifica para un componente del complejo promotor de anafase/ciclosoma, mutantes *such-1(t1668)* en espermatozoides, presentan una cantidad de DNA anormal y un número inadecuado de centriolos (39).

Los espermatozoides WT contienen DNA altamente condensado, asociado a un par de centriolos marcados con SAS-4 (Figura 6 A). Estos dos centriolos suelen aparecer como un único foco, debido a su pequeño tamaño y proximidad (39).

En los espermatozoides mutantes *such-1 (t1668)* se visualizan una serie de fenotipos con respecto al contenido de DNA y número de centriolos, los que se clasificaron por analogía con sus fenotipos embrionarios (de un total de $n = 87$ espermatozoides). En los ordenados en la clase I, los espermatozoides (32%) contienen DNA y uno o dos focos independientes de SAS-4, presumiblemente correspondientes a dos o cuatro centriolos (Figura 6 B) (39).

Este subconjunto de espermatozoides mutantes, probablemente resulta en embriones clasificados en primera clase, los cuales son diploides y conforman un huso bipolar o multipolar (39).

En los espermatozoides catalogados como de clase II (47%) el DNA está ausente, y contienen un único foco de SAS-4 que está presente de manera normal (Figura 6 C). Este subconjunto de espermatozoides mutantes *such-1* (t1668) forma embriones haploides de clase II, que carecen del pronúcleo masculino. Los espermatozoides presentes en la tercera clasificación, (21%) carecen de DNA y de centriolos (Figura 6 D), y por lo tanto, es probable que los embriones *such-1* (t1668) que formen sean agrupados en los de clase III (39).

Investigadores confirmaron que la letalidad embrionaria observada es de origen paterno a través de los siguientes cruzamientos: ovocitos de hermafroditas homocigotos mutantes *such-1* (t1668), fueron fertilizados por espermatozoides mutantes, produciendo un 100% de letalidad embrionaria (Figura 6 E). Por el contrario, se encontró que la letalidad embrionaria fue rescatada cuando ovocitos mutantes *such-1* (t1668) se fertilizaron por espermatozoides machos WT PLG-1 (E2001) (Figura 6 E) (39).

Además, la información se confirmó con cruzamientos de espermatozoides mutantes *such-1* (t1668) con hermafroditas *fog-2* (q71) que no forman espermatozoides, resultando el 100% de letalidad embrionaria en la descendencia (Figura 6 E). Afirmando que espermatozoides paternos de mutantes *such-1* (t1668) causan letalidad embrionaria (39).

El estudio informa que la segregación del DNA y los centriolos, de manera incorrecta, es producida probablemente durante la meiosis en la formación de los espermatozoides, información que se comprueba con el rescate de la descendencia cuando se realizaron cruzamientos con espermatozoides WT, indicando que las dos divisiones meióticas en la ovogénesis de mutantes *such-1* (t1668) conducen a ovocitos que se producen de manera normal (39).

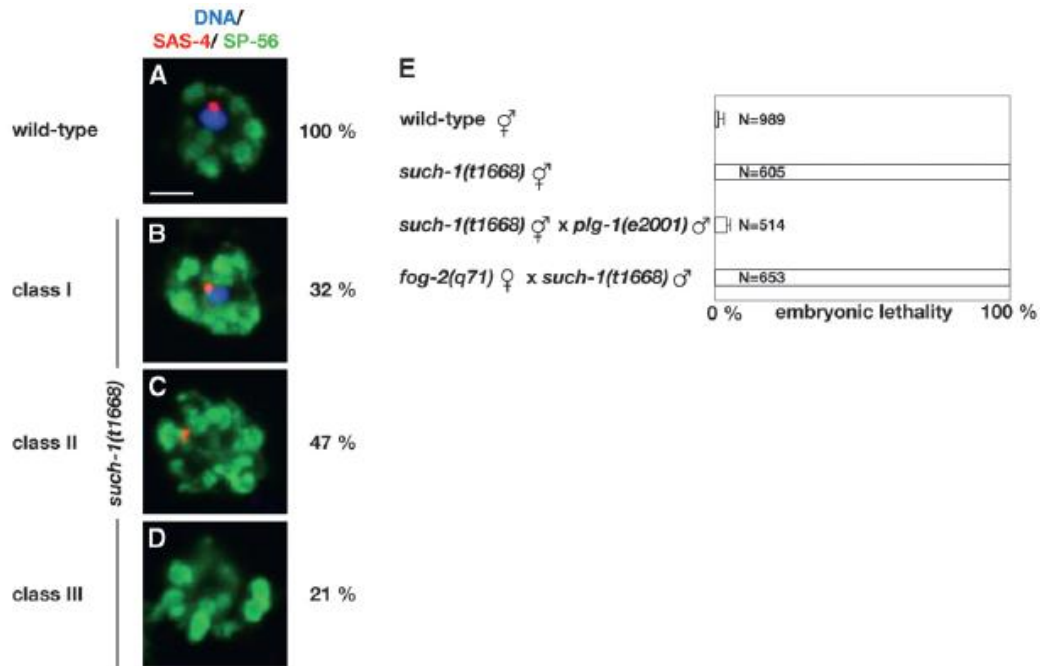


Figura 6. Espermatozoides *such-1* (t1668) con aberraciones en el ADN y en la cantidad de centriolos causa letalidad embrionaria. (A-D) inmunofluorescencia de espermatozoides WT y espermatozoides *such-1* (t1668). Los centriolos (SAS-4, en rojo), membranas (SP-56, en verde), y la tinción con hoechst para visualizar el ADN (en azul). En los WT, con un n = 58; en los espermatozoides *such-1* (t1668), n = 87; los porcentajes a la derecha indican la fracción de espermatozoides *such-1* (T1668) en cada clase. (A) los espermatozoides WT con ADN altamente condensado y un claro foco de SAS-4. (B) espermatozoides *such-1* (t1668) de clase I. (C) espermatozoides *such-1* (t1668) de clase II sin ADN pero con centriolos. (D) machos *such* (t1668) de Clase III no contienen ADN ni centriolos. (E) el efecto de machos *such-1* (t1668) conduce a la letal embrionaria (39).

Como idea general el gen supresor del defecto de punto de control del huso-1, codifica para un componente del complejo promotor de anafase/ciclosoma, que conduce a una cantidad de DNA y el número de centriolos adecuado para los espermatozoides.

Una nueva investigación relacionada con la función de APC5, una subunidad del complejo promotor de anafase/ciclosoma en *C.elegans*, que contiene dos parálogos, *such-1* y *gfi-3*, los que se coexpresan en la línea germinal (61).

El estudio demuestra que el agotamiento de *such-1* o *gfi-3* mediante RNAi, no solo tiene un efecto sobre las divisiones meióticas, sino que además codepleción de ambos, da como resultado la detención meiótica. En suma, los dos parálogos de APC5 en *C.elegans* tienen una función redundante durante las divisiones meióticas (61).

Para entender el rol de APC5 en *C.elegans*, se determinó el patrón de expresión de *such-1* y *gfi-3* y luego se investigó más a fondo el fenotipo de pérdida de función de cada gen, para establecer los procesos para los cuales se requiere. Se examinó el patrón de expresión de *such-1* y *gfi-3*, mediante la construcción de fusiones transcripcionales y la generación de animales transgénicos (61). La proteína de fusión mCherry::histona H2B, fue impulsada por el promotor y el 3' UTR de *such-1* o GFI-3. La construcción *Such-1p::mCh::H2B::such-1 3' UTR*, se expresa en todo el desarrollo de la línea germinal, así como la meiosis en el embrión y a lo largo de la embriogénesis (61).

La construcción *GFI-3p::mCh::H2B::gfi-3 3' UTR* se expresó a lo largo de la línea germinal, en meiosis y en todas las etapas embrionarias (61).

En hermafroditas, tanto la expresión del transgénico que impulsan la expresión de *such-1* y *gfi-3*, es prominente en los espermatozoides maduros almacenados en la espermateca. Se generaron transgénicos machos, y encontraron que ambos también se expresan a lo largo de la línea germinal masculina (61).

Estos datos, indican que *such-1* y *gfi-3* actúan de forma redundante durante el desarrollo de la línea germinal, y la meiosis. En *C.elegans*, existen dos subunidades de APC5, que se requieren para la meiosis en forma redundante. La pérdida severa de la función de estos dos genes en conjunto, conducen a la detención en la metafase meiótica, lo que sugiere que APC5 en *C.elegans* funciona como una clásica subunidad de APC/C (61).

Una nueva evidencia genética nos dice que otro gen, EMB-1, funciona como un componente esencial para APC/C. Los mutantes EMB-1 fueron aislados originalmente de un *screen* genético sensible a la temperatura (ts), el gen embriogénesis anormal 1 fue descrito como un fenotipo de una sola célula, específicamente detenido en metafase I ("huevos fertilizados sin división ") (8).

Los hermafroditas mutantes *emb-1* (ok2759) fueron fijados y teñidos con DAPI para comprender su fenotipo estéril, y se encontraron con una reducción significativa de la línea germinal en la gónada, la cual contiene un número reducido de células germinales tempranas y ninguna evidencia de que esas células realicen la transición de mitosis a meiosis (8).

Los machos mutantes *emb-1* (ok2759) exhibieron una línea germinal en la gónada reducida de manera similar a lo que ocurrió en los hermafroditas (8).

Se analizaron en profundidad las gónadas de mutantes homocigotos de *emb-1* (ok2759) las cuales no se desarrollan completamente. Se mostró poca evidencia, ya sea de la espermatogénesis o la ovogénesis, y los brazos se mantuvieron de forma lineal fallando el reflejo hacia el costado dorsal en el gusano (8).

En resumen el gen *emb-1* participa en la mantención del número adecuado de células germinales tempranas y una transición de mitosis a meiosis de forma adecuada tanto en hermafroditas como en machos.

6.6.2. Funciones de las E3 ligasas de ubiquitina BRCA1

El gen supresor de tumores BRCA1 y su par estructuralmente relacionado, BARD1, forman un complejo heterodímero. Los genes BRCA1 y BARD1 son ortólogos de *Cebrc-1* y *Cebrd-1* en *C.elegans* respectivamente y ambos poseen dominios funcionales incluyendo motivos RING, ankyrin y BRCT (62). Por lo tanto, posee actividad de una E3 ligasa de ubiquitina (62). Los genes BRCA1 y BARD1 participan en una variedad de procesos celulares incluyendo la regulación transcripcional, la progresión del ciclo celular y el mantenimiento de la inactivación del cromosoma X (62). También existe evidencia de que BRCA1 y BARD1 están implicados en la reparación del DNA (62).

Interrupciones en el DNA, incluyendo roturas en la doble hebra (DSB), son causadas por factores endógenos (la síntesis del DNA, la recombinación) y exógenos (agentes genotóxicos). En todos los organismos, la reparación imprecisa de tales discontinuidades conduce a una variedad de alteraciones genéticas, tales como mutaciones puntuales, deleciones y reordenamientos (9).

Hay dos vías principales de reparación en las roturas de la doble hebra de DNA (DSB), las cuales son: recombinación homóloga (HR) y unión de extremos no homólogos (NHEJ) (63).

La pérdida de la reparación precisa de las DSB, se asocia con varios síndromes de predisposición al cáncer, como la anemia de Fanconi (FANCD2), síndrome de Bloom (BLM) o susceptibilidad al cáncer de mama y de ovario (BRCA1, BRCA2/FANCD1), que se ven afectados por la reparación de las DSB mediante recombinación homóloga (9).

Durante la profase meiótica, las DSBs son inducidos por la proteína meiótica conservada SPO-11 (9). La reparación de al menos una de las DSB en la meiosis, se necesitan para generar un entrecruzamiento entre cada par de cromosomas homólogos, hecho que es esencial para la precisa segregación cromosómica en la primera división meiótica (9).

Cuando existen errores en el entrecruzamiento en los cromosomas, se conduce a la no disyunción y aneuploidía en la siguiente generación. Las mutaciones que afectan la reparación de la recombinación homóloga de las DSB en la meiosis, muestran un aumento en la letalidad embrionaria debido a la aneuploidía, una alta incidencia de los machos debido a la no disyunción del cromosoma X, anomalías en el número y forma de los cromosomas en diacinesis, y la alteración de los niveles y la distribución de focos de RAD-51 en la etapa de paquiteno (9).

Se investigó la contribución de los genes BRCA1 en *C.elegans* (BRC-1) durante la recombinación homóloga, explorando aspectos específicos de la meiosis en el nemátodo, como son: las DSB en la meiosis inducidos por SPO-11 que no es un prerequisite para el montaje del complejo sinaptonémico y la formación del complejo sinaptonémico que no es necesario para RAD-51 en la DSBs (9).

Dentro de los resultados, se encontró que los mutantes BRC-1 son viables y fértiles, pero muestra un fenotipo meiótico débil con una incidencia en la formación de machos (fenotipo him), lo que refleja una alta frecuencia en la no disyunción del cromosoma X en la meiosis de *C.elegans* en mutantes BRC-1 (2% frente 0.1% en WT) (9).

Sin embargo, los niveles de letalidad embrionaria (0,38%) no se incrementan significativamente en la ausencia de BRC-1, lo que indica que la segregación de cromosomas autosómicos durante la meiosis se produce de forma normal. La mayor parte de los núcleos en diacinesis de mutantes BRC-1 muestran un complemento similar al de los WT, con seis cromosomas bivalentes en diacinesis, que representa los cromosomas homólogos unidos por quiasmas (9).

Sin embargo, aproximadamente el 12% de los núcleos de los ovocitos muestran siete núcleos (cuerpos), lo que podría explicar el fenotipo him. Por lo tanto, BRC-1 es en gran parte prescindible en el crossing-over en los cromosomas autosómicos (9).

Un posible defecto meiótico, también se propone por los resultados que muestran los mutantes BRC-1, con elevados niveles basales de apoptosis en los núcleos en paquiteno (9). Para determinar si este fenotipo apoptótico es dependiente de la formación de la DSB en la meiosis, se generó un doble mutante BRC-1;SPO-11, eliminando la formación de las DSB en la meiosis con la mutación SPO-11 (9), suprimiendo el fenotipo apoptótico de mutantes BRC-1 (9).

Para examinar la consecuencia de la eliminación de la apoptosis en ausencia de BRC-1, se combinaron BRC-1 con una mutación de CED-3, que es esencial para la apoptosis (9). Los científicos observaron un aumento de cuatro veces la letalidad embrionaria en el doble mutante BRC-1;CED-3, en comparación con los mutantes individuales (9), sugiriendo que, la ausencia de BRC-1 se requiere para eliminar por apoptosis las células meióticas comprometidas, que son incompatibles con la producción de descendencia viable (9).

Con el fin de analizar un posible defecto de la reparación de la DSB en la meiosis de mutantes BRC-1, se examinaron los focos de RAD-51, que marcan eventos de recombinación homóloga (9).

La carga de RAD-51 en las DSBs en la meiosis de las primeras etapas de la profase meiótica, se produce de forma normal en mutantes BRC-1. Sin embargo, mutantes BRC-1 muestran niveles anormalmente altos de focos de RAD-51 en los núcleos en paquiteno, un fenotipo que se suprime por la mutación de spo-11 (9).

Un aumento similar en los focos de RAD-51 también se observa en los núcleos meióticos de mutantes BRD-1, que carecen de la pareja proteica heterodimera BRC-1 (9)(62). Estos datos indican una función para BRC-1 en la reparación eficaz de un subconjunto de las DSBs, en las meiosis dependientes de SPO-11(9).

En *C.elegans* un crossing-over, por cada par de cromosomas homólogos, es necesario y suficiente para generar conexiones interhomólogas, independiente de la longitud del cromosoma (9), por lo tanto, se deduce que las DSBs adicionales, generadas por SPO-11, deben ser reparadas por vías donde no ocurre entrecruzamiento (9).

La tendencia hacia el cromosoma homólogo, como un molde de recombinación homóloga, está regulada por factores pro crossing-over, como el complejo HIM-14/MSH4-MSH-5 y el complejo sinaptonémico (9).

Mutantes en cualquiera de estos complejos, carecen de quiasmas y muestran 12 cromosomas homólogos univalentes intactos en diacinesis (3). Para analizar la posible función de BRC-1, donde no ocurre crossing-over en las vías de reparación de la DSB, se observaron los efectos al combinar el mutante BRC-1 con (i) mutantes him-14/MSH4, donde el complejo sinaptonémico está presente, pero el entrecruzamiento se suprime, y (ii) el mutante SYP-2, en el que tanto la formación del complejo sinaptonémico y entrecruzamiento están ausentes (9).

La combinación de la mutación de BRC-1, ya sea con mutantes him-14/MSH4 o SYP-2, resultaron en un aumento estadísticamente significativo en los núcleos (cuerpos) teñidos con DAPI en diacinesis, lo que indica la fragmentación de los cromosomas (9).

A diferencia del doble mutante BRC-1;him-14/MSH4, aproximadamente el 25% de los mutantes BRC-1;SYP-2, se observa la resolución de los núcleos en diacinesis, con la cromatina deforme y mal condensada (9). Este fenotipo es similar al observado en cepas BRC-2 y RAD-51 deficientes, que están comprometidos en la reparación de todas las DSBs en la meiosis, a través de la vía de recombinación homóloga (9).

Estos datos, indican que en ausencia del entrecruzamiento, BRC-1 contribuye a la reparación de las DSB meiótica, mediante el uso de las cromátidas hermanas como molde (9).

Es posible que la fragmentación observada en los dobles mutantes BRC-1;him-14/msh-4 y BRC-1;SYP-2, podrían ser el resultado de la pérdida prematura de la cohesión en los cromosomas o de un defecto en la reparación de las DSB. Para distinguir entre estas dos posibilidades, se observaron los núcleos de dobles mutantes BRC-1;him-14/MSH4 y BRC-1;SYP-2, en diacinesis que se inmunotñieron las cohesinas con REC-8 en la meiosis (9).

En ambos mutantes dobles, los núcleos (cuerpos) marcados con DAPI conservan REC-8, lo que indica que la fragmentación cromosómica surge como resultado de un defecto de la reparación, en lugar que la pérdida prematura de la cohesión (9).

En resumen, en ausencia del entrecruzamiento, BRC-1 contribuye a la reparación de las DSB en la meiosis dependientes de SPO-11, mediante el uso de las cromátidas hermanas como molde.

También relacionado con el complejo BRCA1/BARD1 (CeBCD) en *C.elegans*, antecedentes informan que la delección de Cebrc-1 o Cebrd-1 en un *screen* de RNAi produce muerte de células germinales dependiente de p53, sensibilidad a la radiación y fragmentación de los cromosomas (62).

Evidencias del complejo CeBCD, informan que se activa en respuesta a la cromatina bajo tratamiento de radiación ionizante (IR), demostrando que el punto de control del daño en el DNA promueve la asociación del complejo CeBCD con la enzima E2 de conjugación de ubiquitina, Ubc5 (LET-70), para formar una activa E3 ligasa de ubiquitina en respuesta al daño (9).

Los investigadores analizaron la función de CeBRC-1 y CeBRD-1 en los procesos de reparación del DNA, y las proteínas asociadas al complejo CeBCD purificadas por *tándem* de inmuoafinidad en condiciones de crecimiento normales o en diferentes puntos de tiempo, después de la exposición a la IR (9).

Esta estrategia de purificación se realiza en animales completos, en todas las etapas del desarrollo, por lo tanto, tiene el potencial de identificar las proteínas asociadas a CeBRD-1 de todos los tipos de células que expresan CeBRD-1, incluyendo células en el ciclo mitótico, en el compartimento de la línea germinal y durante la embriogénesis, y en células de las etapas progresivas de la profase meiótica (62).

La inmunotinción de la línea germinal en *C.elegans* con el anticuerpo FK2, revela eventos de ubiquitinación en las últimas etapas de la profase meiótica, en condiciones de crecimiento normal , que se suprimen rápidamente después del tratamiento con IR, con una cinética similar a la observada por la pérdida de la actividad de las E3 ligasa de ubiquitina en los complejos CeBCD solubles (62). Por lo tanto, es posible que estos eventos de ubiquitinación, a finales de la profase meiótica, correspondan a la actividad del complejo CeBCD E3 ligasa de ubiquitina solubles, purificados bajo condiciones de crecimiento normales (62).

Aunque los mutantes *Cebrd-1* y *Cebrc-1* exhiben un fenotipo meiótico (62), la función de los eventos de ubiquitinación, a finales de meiosis I, y la naturaleza del mecanismo inhibitorio de las E3 ligasa de ubiquitina, después del daño en el DNA, queda por determinar y es objeto de estudio (62). En las células mitóticas no irradiadas, dentro de la línea germinal de *C.elegans*, un pequeño número de focos de ubiquitina conjugada son detectables dispersas por el citoplasma, con muy pocos o ninguno concordante con la cromatina (Figura 7) (62).

Después del tratamiento con IR, múltiples focos de ubiquitina conjugadas son detectables en núcleos mitóticos, en sitios de daño en el DNA en gusanos WT, entre 3 y 16 horas después del tratamiento (Figura 7) (62).

Por el contrario, mutantes *Cebrd-1* y *Cebrc-1* son defectuosos para la formación de focos de ubiquitina conjugada después de IR (Figura 7) (62), lo que indica que, la ubiquitinación en los sitios de daño en el DNA en las células mitóticas requiere la acción funcional del complejo CeBCD (62).

En síntesis, complejos CeBCD ubiquitina en condiciones de crecimiento normal, en las últimas etapas de la profase meiótica y en un eventual daño en el DNA, función que se suprimen rápidamente después del tratamiento con IR.

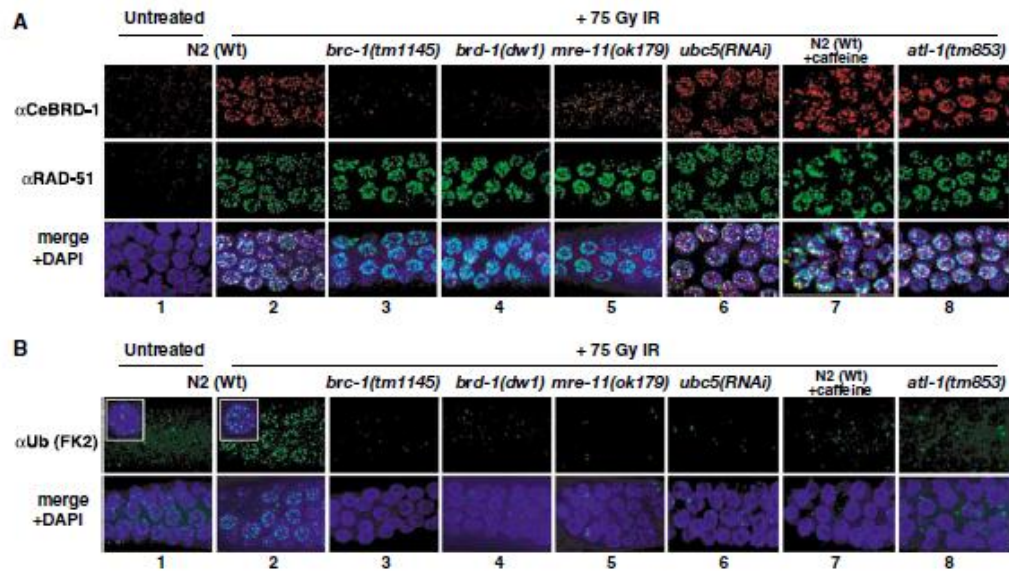


Figura 7. Formación de focos conjugados de ubiquitina después del tratamiento con radiación ionizante que están suprimidos en mutantes Cebrd-1, Cebrc-1, MRE-11, atl-1 y Ubc5/let-70 después del tratamiento con cafeína. Imágenes con núcleos mitóticos fijado en el extremo distal de la línea germinal se tiñeron para (A) CeBRD-1 y RAD-51, (B) conjugados de ubiquitina (FK2) antes (WT) y 3 horas después tratados con 75 Gy de IR para los genotipos indicados. BRC-1 (tm1145), brd-1 (DW1), MRE-11 (ok179) y atl-1 (tm853) son mutantes de BRCA1, BARD1, MRE11 y ATR en *C.elegans*, respectivamente (62).

6.6.3. Funciones de las E3 ligasas de ubiquitina Cullin

Las proteínas Cullin RING ligasas (CRL), son reguladores críticos de múltiples procesos del desarrollo y celulares en eucariotas. La proteína CAND1 es un inhibidor bioquímico de CRL (64). En *C.elegans*, el gen cand-1 es un regulador positivo de Cullin-RING ubiquitina ligasas, que se requiere para la viabilidad y para el desarrollo adecuado de las células de la costura, la vulva y la cola. CAND-1 se expresa en células que proliferan en el embrión y larvas, y está mayormente ausente de tejidos somáticos adultos; además la proteína CAND-1 se localiza predominantemente en el núcleo (<http://www.wormbase.org/>).

La proteína CAND-1 es capaz de unirse a todos los cullins, y puede interactuar físicamente con CUL-2 y CUL-4 *in vivo* (64). Se conoce que la proteína CAND-1 cumple un rol en la actividad de CRL en *C.elegans* y que la inactivación de cada una de los cuatro cullins (CUL-1, CUL-2, CUL-3, o CUL-4), provoca letalidad con defectos celulares graves (64).

Se investigaron mutantes *cand-1*, tratados con RNAi, para los principales fenotipos mutantes de Cullin, con el fin de determinar si se requiere CAND-1 para sus respectivas funciones (64). Los primeros estudios fueron en *cul-2*, cuya proteína está altamente expresada en la línea germinal (65) y en los embriones tempranos (66), donde regula numerosos procesos del desarrollo, incluyendo la proliferación de células germinales (65) (67), la determinación del sexo (67), la progresión a través de la meiosis en los ovocitos, la polaridad celular, la determinación del destino celular (68) y la progresión del ciclo celular (65) (68).

En mutantes *cul-2* que exhiben una serie de fenotipos distintos, incluyendo: un defecto en la progresión de las células en meiosis II, detención del ciclo celular en las células germinales, un fracaso en la condensación de los cromosomas y un retraso en prometáfase mitóticas en el embrión temprano. Estos fenotipos, que son cada uno potencialmente letales, no se observan en mutantes *cand-1* ni en RNAi de *cand-1* por separado (64).

Del mismo modo, fenotipos mutantes de *cul-3* afectan a la meiosis y mitosis en el embrión temprano, y no se observan en mutantes RNAi de *cand-1*. La inactivación de *cul-4* en estadios larvales posteriores, produce defectos en las células germinales (69), fenotipo de los cuales no se observa en mutantes *cand-1* tratados con RNAi. Por lo tanto, la mayoría de los fenotipos graves de cullin no se observan en la inactivación de *cand-1*, lo que implica que muchos CRLs en *C.elegans* pueden realizar sus funciones celulares esenciales en ausencia de CAND-1 (64).

Se realizaron análisis genéticos de *cand-1* y *cullin*, con una cepa *cand-1* (*tm1683*);*cul-2* (*EK4*)/+, en donde cada brazo gonadal tiene un pequeño número de células germinales, que se someten a la detención en el ciclo celular con un aumento en el tamaño de las células y en su contenido de DNA 2N ($4,2 \pm 0,8$ células por brazo gónadas (64).

Este fenotipo es similar, pero mucho menos penetrante que la detención del 100% de las células germinales observado en mutantes homocigotos *cul-2*. Hechos que no ocurrieron ni en homocigotos *cand-1* (*tm1683*) ni heterocigotos *cul-2* (*EK4*)/+, relacionados con la detención de las células germinales (64).

Otro resultado informa que mutantes *cand-1* son hipersensibles a *cul-1*, *cul-2*, *cul-3* y *cul-4*, tratados con RNAi (56). En larvas L1 mutantes *cand-1* con RNAi de *cul-1* el ochenta por ciento fueron sometidas a una detención larval, y el resto se convirtieron en adultos estériles; por el contrario, los larvas L1 WT con RNAi de *cul-1*, no se sometieron a la detención larval y se convirtieron en adultos que fueron capaces de formar huevos detenidos en su formación (64).

Del mismo modo, RNAi de *cul-3* y mutantes *cand-1* en larvas L1, se desarrollan para convertirse en adultos estériles, mientras que en larvas L1 WT se convierten en adultos que podrían producir huevos (64). En los RNAi de *cul-4* y mutantes *cand-1* en larvas en etapa L4, se desarrollaron hasta adultos, donde el 68% de su progenie está detenido en el estado embrionario, mientras que gusanos WT en etapa L4 se produce sólo el 5% de embriones detenidos (64).

Los científicos concluyeron que se requiere CAND-1 para la función óptima de las proteínas cullin, pero que muchos complejos de CRL pueden mantener sus funciones esenciales en ausencia de CAND-1(64).

Siguiendo con la actividad de uno de los componentes de la familia de las CRL, CUL-2, se encontró que tiene funciones en la línea germinal de *C.elegans*. El estudio informa que gusanos con pérdida de función de *cul-2* son defectuosos en la proliferación de las células madres de la línea germinal (GSC), resultando la esterilidad en el animal (65).

Para analizar la función de *cul-2* en la línea germinal, se realizaron búsquedas en las subunidades de reconocimiento de sustrato (SRS), que actúa conjuntamente con CUL-2 para regular la proliferación GSC (65).

La subunidad de reconocimiento de sustrato LRR-1 actúa junto con CUL-2 para regular la proliferación de células germinales (67) (70). La proteína LRR-1 es abundante en la línea germinal, y en animales mutantes nulo de LRR-1 [LRR-1 [0]] se comporta de manera similar a los mutantes *Cul-2*, que también son defectuosos en la proliferación de las células germinales, resultando la esterilidad del animal (65).

En mutantes LRR-1 (0), se realizó en un *screen* supresor, basado en la visualización por RNAi. Una cepa de LRR-1 (0), que expresa la histona H2B fusionado a GFP bajo el control del promotor de la línea germinal específico *pie-1*, se utilizó para detectar genes cuya inactivación por RNAi suprimió la detención del ciclo celular de las células germinales en mutante LRR-1 (0), y restaurar su fertilidad (65).

Este *screen* identificó a CHK-1 (Chk1, punto de control para la kinasa 1 en humanos) y la quinasa ATL-1 (relacionados con ATR, ataxia telangiectasia y Rad3), que son componentes fundamentales en el punto de control de la vía de replicación del DNA (65). Esta vía del punto de control, normalmente se activa en respuesta a los defectos en la replicación del DNA, tales como horquillas de replicación atascadas y bloqueos en la fase G2 en la progresión del ciclo celular (71).

Estas observaciones, indican que el punto de control de la replicación del DNA se hiperactiva en mutantes LRR-1 (0) y evita la proliferación mitótica de las GSC, resultando la esterilidad en los animales (70).

La hiperactivación de la vía de la replicación del DNA, en ausencia de la función LRR-1, no sólo se produce en la línea germinal, sino también en los embriones tempranos, donde los *knockdown* por RNAi de LRR-1 causan la activación del punto de control de la replicación del DNA, que resulta en un retraso grave en la división de la blastómera P1, en el estadio de dos células, importante para la formación de la gónada (también conocido como P1 fenotipo tardío(65).

El hallazgo en un alelo de *cul-2* en este *screen* genético, confirmó que los puntos de control de la progresión del ciclo celular bloquean la replicación del DNA en la línea germinal, tras la inactivación de la enzima E3 CRL2-LRR-1 (70). La función de esta E3 ligasa es regular, la integridad de la replicación del DNA en las células germinales y en los embriones tempranos (65).

Los mutantes nulos de LRR-1 y *cul-2* son defectuosos en la proliferación de células germinales, por lo tanto, el análisis del rol del complejo CRL2-LRR-1 en los eventos posteriores al desarrollo de las células germinales fue posible identificando los alelos de *cul-2* sensibles a la temperatura (*ts*) (65).

Con el uso de este alelo, se descubrieron fenotipos adicionales asociados a la pérdida de función *cul-2* (65). Afirmando mediante la evidencia existente que CRL2-LRR-1 influye en el equilibrio entre la proliferación de las células madres en la línea germinal y la diferenciación meiótica, y demostrando además que esta enzima inhibe el ensamblaje del complejo sinaptonémico (SC) (65).

En *C.elegans*, el equilibrio entre la proliferación de células germinales y diferenciación meiótica, es controlado por la vía de señalización GLP-1/Notch (34). La célula de la punta distal (DTC), limitan el extremo distal de la línea germinal, proporcionado por el ligando Notch. Río abajo de la señalización Notch, una red de regulación post-transcripcional, coordina la decisión de la proliferación o diferenciación para la entrada a la meiosis. Esta red central, idéntica a las proteínas de unión FBF-1/2 (*pumilio*) al RNA, que reprimen la traducción de los promotores de la meiosis en GSCs, incluyendo GLD-1, GLD-2/3, y CKI-2 (72). Animales *cul-2 ts*, son hipersensibles a la inactivación mediada por RNAi de FBF-1/2, información confirmada mediante alelos genéticos (65).

Los resultados sugieren que FBF-1/2 y CUL-2 pueden compartir dianas comunes para inhibir la diferenciación meiótica, actuando a nivel de RNAm y proteínas, respectivamente. Tales mecanismos complementarios, proporcionarían la decisión de entrada a la meiosis (65).

La decisión de entrar en la meiosis, debe coordinarse con la producción oportuna de las proteínas cromosómicas en la meiosis, tales como los componentes del SC y el reclutamiento en los cromosomas meióticos. Las proteínas FBF-1/2 desempeña un rol en esta coordinación, reprimiendo la expresión de los componentes del SC en GSC, incluyendo him 3, HTP-1/2, y SYP-1 (73). Sin embargo, el reclutamiento de estas proteínas en los cromosomas, depende de la actividad de la proteína HTP-3 con dominio HORMA (74) (75). La proteína HTP-3 se expresa a bajos niveles en GCSs, pero en contraste con los otros componentes estructurales de los cromosomas meióticos, la expresión de HTP-3 no está regulada por FBF-1/2 (73).

Se obtuvieron evidencias sustanciales, las que indican que HTP-3 es un sustrato de E3 ligasa CRL2-LRR-1. La proteína HTP-3 interacciona físicamente con LRR-1, y se acumula tras la inactivación de cul-2 o de las subunidades del proteosoma. Considerando que la acumulación inapropiada de HTP-3 en GSC promueve el reclutamiento de HIM-3 en los cromosomas, sin embargo, no es suficiente para desencadenar la entrada a la meiosis (65).

Estas observaciones, sugieren que varias vías independientes actúan juntas para regular y coordinar la entrada a la meiosis. En particular, la quinasa ciclina E/Cdk2(CYE-1)/CDK-2 en *C.elegans*, que emergió recientemente como un regulador crítico de la mitosis y la decisión de la entrada a la meiosis (76) (24).

De hecho, la inactivación de Cye-1, que impulsa las células germinales mitóticas para entrar en la meiosis (68) (76), sugiere que la proteína CYE-1/CDK-2 podría inhibir las diferentes vías que promueven la entrada a la meiosis (24).

Se destaca la identificación de un alelo de cul-2, sensibles a la temperatura, que reveló nuevos conocimientos sobre la función de la E3 ligasa CRL2-LRR-1 en el desarrollo de la línea germinal (65).

Además esta enzima E3, no solo promueve la proliferación de células germinales, probablemente mediante el control de la integridad de la replicación del DNA, sino que también influye en el equilibrio entre la proliferación mitótica y la diferenciación meiótica, e impide la formación prematura del complejo sinaptonémico, mediante la regulación de la estabilidad de HTP-3 (65).

Nuevos antecedentes aportados por científicos encontraron otras funciones relacionadas con *cul-2*, observaron que mutaciones en la proteína LRR-1 (proteína con repeticiones ricas en leucina) que contiene una caja BC/CUL, es fenotípicamente similar a la mutación de *cul-2*, lo que resulta en la acumulación de CKI-1, una proteína de la familia CKI (inhibidor de quinasa dependiente de ciclina) (67). Además, se encontraron datos que informan que un defecto en la detención de células germinales en mutantes LRR-1 en G1, fue rescatado parcialmente por la eliminación de un alelo de CKI-1(77).

Los autores encontraron que LRR1 se une físicamente a CKI-1, y su sobreexpresión aumenta con el recambio proteico de CKI-1 (77). Colectivamente, estos datos genéticos y bioquímicos, son consistentes con la idea de que en *C.elegans* las funciones de la proteína LRR-1, promueven la progresión de las células germinales de G1 a S, al actuar como sustrato del receptor diana de CKI-1 para la ubiquitinización por la ligasa E3 CRL2-LRR1 (77). La función del complejo CRL2-LRR-1 es degradar CKI-1, inhibidor de CDK Cip/Kip en el núcleo, para asegurar una progresión del ciclo celular adecuada en fase G1 en las células germinales (67) (70).

En otros estudios en la familia CLR, mencionan que Cul-4 mediante silenciamiento por RNAi, conduce a una re-replicación en el DNA en células blásticas, y las células germinales masculinas y que estas se someten a una espermatogénesis prematura (78). Siguiendo con la misma proteína de estudio, investigadores proponen que CUL-4, varía en función de los componentes del complejo DDB1. La proteína DDB1 (proteína 1 de unión al DNA dañado) se identificó inicialmente como un componente del complejo DDB, que funciona en la reparación por escisión de nucleótidos y es defectuoso en individuos con xeroderma pigmentosa y síndrome de Cockayne (69).

En *C.elegans*, CUL-4 regula negativamente el ortólogo de Cdt-1, CDT-1, para evitar la re-duplicación del DNA durante la fase S (69). El mantenimiento de la integridad del genoma depende de la replicación exacta durante cada ciclo celular. La replicación del DNA está estrictamente regulada para asegurar que los orígenes de replicación pueden iniciar la síntesis de DNA sólo una vez por ciclo celular (69).

En eucariotas, esta regulación se centra en el montaje de los complejos de replicación previos a la fase S. Se caracterizaron los fenotipos de pérdida de función de los ortólogos de DDB1 y Skp2 en *C.elegans*, y se determinó en relación a cómo contribuyen a la degradación de CDT-1, en la fase S (69).

Se encontraron con el requerimiento del complejo CUL-4/DDB-1 para la degradación de CDT-1 durante la fase S y para detener la re-duplicación del DNA. El complejo DDB-1 físicamente asociados con CDT-1, lo que indica que la CDT-1 es un sustrato directo del complejo CUL-4/DDB-1. Por el contrario, el ortólogo de Skp2, SKPT-1, no se requiere para la viabilidad y sólo exhibe un defecto impenetrable en la migración de células germinales que constituyen la gónada. La proteína SKPT-1 no proporciona ninguna contribución medible a la degradación del CDT-1 en WT o en mutantes DDB-1 de fondo (69).

Al observar las células gonadales somáticas que se dividen durante la etapa L3, se logra apreciar que son más grandes y contienen un aumento de los niveles de DNA normal (69). Las células germinales de mutantes DDB-1 (tm1769), exhibieron vacuolas y células con morfología nuclear dañada durante la etapa L4 y, a menudo, se someten a la necrosis en los adultos mayores (Figura 8 A, B, e I-L) (69).

La espermatogénesis se observa en mutantes DDB-1 (tm1769), y la ovogénesis se produce con poca frecuencia, lo que sugiere que la entrada a la meiosis por sí sola, no es defectuosa (Figura 8 E, F, I, y J) (69).

También, se observaron defectos similares en células germinales, cuando las larvas son alimentadas con bacterias que expresan *dsRNA* de *cul-4*, lo que indica que se requiere también CUL-4 para la viabilidad de las células germinales. Sin embargo, hay una relación clara entre estos defectos de la línea germinal y la replicación del DNA (69).

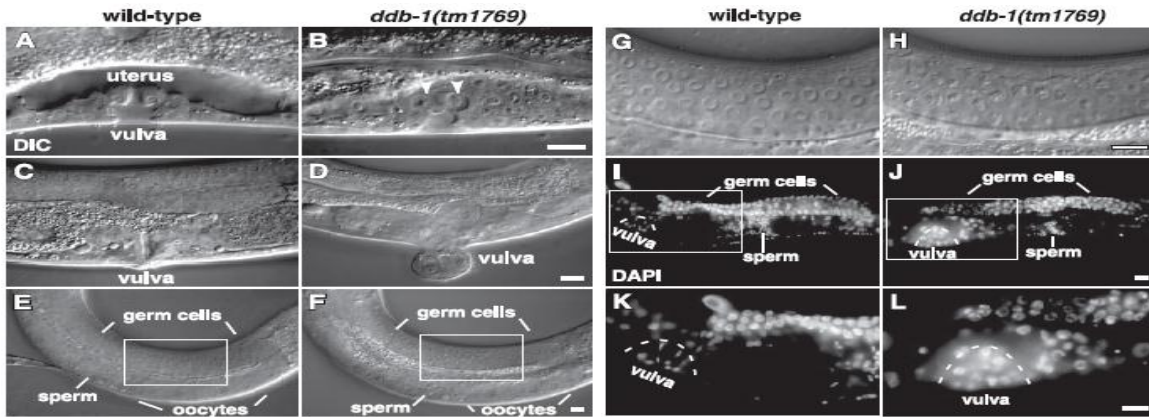


Figura 8. Pérdida de expresión de DDB-1 en el cigoto provoca defectos en las etapas del desarrollo tardío en *C.elegans*. (A-D) Imágenes DIC que identifican la región de la vulva en WT (A) y DDB-1 (tm1769) en (B), larvas a mediados de la etapa L4 WT en (C) y adultos DDB-1 (tm1769) en (D). Puntas de flecha blancas en el panel B indican que se agrandan las células vulvares en DDB-1 (tm1769). (E-H) Imagen DIC de la línea germinal WT (E) y adultos jóvenes DDB-1 (tm1769) (F). La región en las células germinales que contiene paneles con cajas blancas en E y F se muestran magnificadas en paneles G y H, respectivamente. (I-L) tinción con DAPI de WT (I) y gónadas aisladas de mutante adultos jóvenes en DDB-1 (tm1769) (J), se proyectan a mediados de la región posterior. Las regiones vulvares englobadas en las cajas blancas en los paneles I y J se magnifican en los paneles K y L, respectivamente (69).

Los resultados también indican que mutantes DDB-1 en las células germinales, no tienen los niveles de DNA mayores que en intervalos del ciclo celular normal de $2n$ a $4n$: el nivel de DNA en las células germinales, en el WT, es de $2.2 \pm 0,4 C$, mientras que las células germinales DDB-1 (tm1769) tienen $2,6 \pm 0,6 C$ ($n=19$ para cada grupo) (69).

En síntesis, el complejo CUL-4/DDB-1 es necesario para la viabilidad de las células germinales, independientemente de su función en la regulación de la replicación del DNA y además CUL-4, cumple funciones en las células germinales masculinas sometiéndolas a la espermatogénesis en el tiempo adecuado (69).

6.6.4. Funciones de las E3 Ligasas de ubiquitina relacionadas con la determinación del sexo en *C.elegans*

La determinación del sexo en el nemátodo *C.elegans*, está genéticamente controlado por una compleja vía de regulación negativa, que en última instancia está ligada a la relación del cromosoma sexual con los cromosomas somáticos (79).

El factor de transcripción TRA-1, es el regulador crítico de la determinación del sexo en líneas somáticas y germinales, actuando principalmente como un inhibidor del destino sexual masculino (80). Los embriones XX (2X:2A) experimentan un desarrollo hermafrodita y animales XO (1X: 2A) el desarrollo de machos (81). La relación X:A proporciona diferentes dosis complementarias del cromosoma X y factores de regulación ligados a cromosomas somáticos, que en última instancia controlan la expresión del regulador maestro Xol-1, que regula negativamente una cascada de interacciones genéticas, que a su vez determinan el control del sexo y/o la compensación de las dosis (79).

En relación a la cascada de determinación del sexo TRA-1, un factor de transcripción zinc finger, desempeña una función global en la identidad sexual, tanto de la línea germinal como en la somática (82). La proteína TRA-1A, contiene cinco zinc fingers y está estrechamente relacionado con una proteína drosophila cubitus interruptus (Ci) y represores transcripcionales Gli en mamíferos (82).

Proteínas Ci/Gli desempeñan funciones fundamentales en el desarrollo, mantenimiento de células madre y la tumorigénesis, como transductores de la señalización *hedgehog* (82). Aunque no se conoce la vía de señalización *hedgehog* en *C.elegans*, se plantea que la vía de determinación del sexo en el gusano, fue adaptado o deriva de la vía *hedgehog* (81).

La proteína TRA-1 promueve el desarrollo femenino mediante la inhibición de genes, que dirigen la diferenciación sexual masculina (82). En las células germinales, la proteína TRA-1 promueve el cambio a la ovogénesis mediante la inhibición de dos genes de la feminización de la línea germinal, fog-1 y fog-3, que son necesarios para la espermatogénesis (79).

La proteína TRA-1 se une al promotor de fog-3 y directamente reprime su transcripción. En los tejidos somáticos, dos genes del desarrollo sexual, MAB-3 (machos anormales) y EGL-1 (huevos defectuosos), también han sido identificados como dianas directas de la represión por TRA-1 (82).

Inmediatamente río arriba de tra-1 en la vía genética de determinación del sexo, los genes FEM (fem-1, fem-2 y fem-3) (82), que también cumplen un rol central en la determinación del sexo, regulando a tra-1 en *C.elegans*, promueven el desarrollo masculino en la línea somática de los animales XO, así como la espermatogénesis en las líneas germinales de machos y hermafroditas (83).

Las proteínas FEM, son miembros del complejo E3 ligasa de ubiquitina tipo CUL-2 (82), las tres proteínas FEM, junto con Cullin-2 (Cul-2), Elongin B, y Elongin C, forman un complejo de múltiples subunidades, que tiene actividad E3 ubiquitina ligasa en *C.elegans* (83), regulando negativamente a TRA-1, para dirigir la degradación, mediante la vía ubiquitina proteosoma (4), y por lo tanto, promueven destinos de las células masculinas, incluyendo el desarrollo de los espermatozoides en los hermafroditas (80).

Otros datos encontrados en la determinación del sexo en el nemátodo, predice que la disminución de la función de UBA-1 por mutaciones, disminuye la actividad del complejo FEM/CUL2, lo que lleva a un aumento en los niveles de TRA-1, que inhibirían los procesos de desarrollo masculino (80).

En síntesis, TRA-1 en las células germinales, promueve la ovogénesis mediante la inhibición de dos genes, fog-1 y fog-3, que son necesarios para la espermatogénesis. Y los genes FEM (fem-1, fem-2 y fem-3) forman un complejo E3 ligasa de ubiquitina con CUL-2 regulando a tra-1, para así promover el desarrollo masculino y la espermatogénesis en la línea germinal de machos y hermafroditas (82).

En otro estudio relacionado con la determinación del sexo en *C.elegans*, la proteína SEL-10 es una proteína caja-F, con repeticiones de aminoácidos WD (triptófano-aspartato), y puede servir como un componente de reconocimiento de sustrato en el complejo SCF ligasa de ubiquitina (Skp1-Cullin-F-box), también se informó que afecta en la determinación del sexo mediante la rotación de proteínas masculinas, FEM-1 y FEM-3 (figura 9) (84).

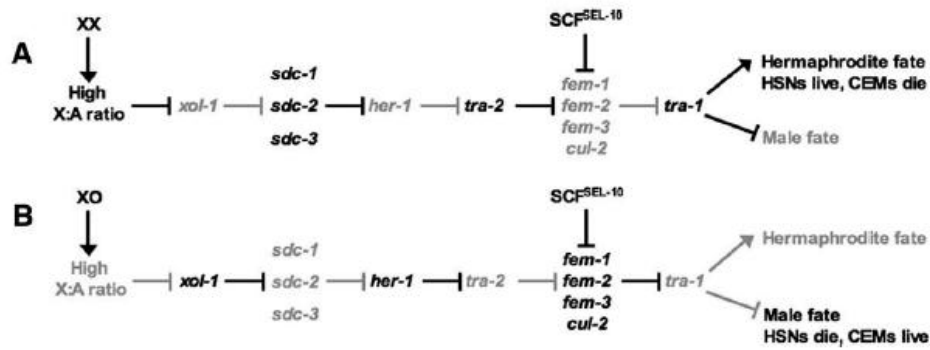


Figura 9. Una vista simplificada de la vía de determinación del sexo en los gusanos XX (A) y los gusanos XO (B). Genes que participan en la determinación del sexo representados en negro son activos y los genes representados en gris son reprimidos. SCF SEL-10 es una ubiquitina ligasa E3 compuesto por SKR-1, CUL-1, y SEL-10 (84).

Los hermafroditas *sel-10* nulos no son visiblemente masculinizados, pero presentan un fenotipo de masculinización sinérgico en combinación con los mutantes con alelos débiles de *tra-2* (84).

Sin embargo, las mutaciones dominantes en *sel-10*, tales como *sel-10* (n1074), causan un fenotipo más fuerte de masculinización en hermafroditas, caracterizado por cambios en los destinos de la muerte celular en neuronas específicas del sexo: como las neuronas específicas del hermafroditas, HSNs y neuronas específicas de la cabeza masculina, CEMs (84).

No está claro cómo mutantes SEL-10 (G567E) afecta la actividad del complejo SCF-SEL-10, para causar un defecto dominante en la masculinización (84). Por lo tanto, se realizó un *screen* supresor de *sel-10* (n1074) con el fin de identificar los componentes que pueden actuar con SEL-10 para regular la determinación del sexo. Se presenta la identificación de SKR-1 (relacionado Skp-1) como cofactor de *sel-10* (84).

Después, se aisló una mutación débil de pérdida de función de SKR-1 (*sm151*), que suprime específicamente el defecto de la masculinización en animales *sel-10* (n1074) la cual fue realizada por una sustitución de metionina, por isoleucina en el aminoácido 140 (M140I) (84).

La proteína SKR-1 es un homólogo de la proteína humana Skp1 en *C.elegans*, un miembro del complejo SCF que se dirige a las proteínas sustrato, para la degradación mediada por la vía ubiquitina proteosoma (84). Se encontró que SEL-10 se une a SKR-1, y esta unión se ve comprometida por la mutación de SKR-1 (M140I). La unión de SKR-1/SEL-10 se reduce, adicionalmente, en presencia de ambas mutaciones SKR-1 (M140I) y SEL-10 (G567E) (84). Estos resultados sugieren que SEL-10 y SKR-1, probablemente actúan en el mismo complejo SCF y proporcionan una base mecánica en la supresión del fenotipo masculinizado de *sel-10* (n1074) por SKR-1 (sm151) (84). Destacando el rol importante del extremo C-terminal de SEL-10 en la unión con SKR-1, dimerizando SEL-10 para la regularización de la actividad del complejo E3 ligasa SCF en la determinación del sexo (84).

6.6.5. Funciones de las E3 ligasa de ubiquitina SPE

Los mutantes defectuosos en la espermatogénesis (SPE) fueron descubiertos en un *screens* genético, utilizando hermafroditas, que se pueden recuperar por medio del apareamiento con machos WT. Científicos descubrieron que mutaciones en el gen *spe-42* en *C.elegans*, produce espermatozoides morfológicamente normales, que son defectuosos en la fertilización, a pesar de hacer contacto directo con los huevos en el sitio de fertilización, la espermateca (85).

SPE-42 es una proteína transmembranal de seis pasos, con los N y C terminal en el citosol (85). Análisis de la secuencia de aminoácidos de SPE-42, muestran 3 dominios de potencial importancia para la función de la proteína: (1) un gran dominio extracelular entre las hélices transmembranales 3 y 4, que contienen seis cisteínas conservadas, separadas entre 9-13 aminoácidos; (2) un dominio DC-STAMP, que incluye hélices transmembranas 5 y 6, relacionadas con eventos de fusión celular; y (3) una predicción de un dominio RING finger, formado por 8 cisteínas conservadas en el C-terminal citoplasmático (85).

Los investigadores utilizaron un enfoque de mutagénesis sistemática para caracterizar la región C-terminal citoplasmática de SPE-42, que contiene el dominio RING finger putativo. Se generaron gusanos transgénicos de la proteína SPE-42 con las siguientes modificaciones, unos con sustituciones en los aminoácidos individuales y otros con cambios de mayor escala, para producir hermafroditas auto-estériles (85). La cepa de mutantes nulos de SPE-42, permitió determinar la importancia de los aminoácidos individuales para la función de SPE-42 (85).

Los resultados muestran que los 8 residuos de cisteína predichos para formar un RING finger, son críticos para la función de SPE-42 *in vivo* (85). Por lo tanto, se crearon construcciones transgénicas en gusanos que codifican sustituciones de cisteína por alanina, en cada cisteína del RING finger (Figura 10) (85). Los gusanos transgénicos individuales se cruzaron con mutantes SPE-42 (tm1231) o *spe-42* (tm2421) y la función de la proteína se midió contando la progenie. Los gusanos que se utilizaron son homocigotos, para cualquiera de estos mutantes *spe-42* (tm1231) o *spe-42* (tm2421), los cuales son completamente estériles a 25°C (85), por lo que cualquier resultado que ocurra en la progenie a partir de ambos transgénicos, son los de rescate (85).

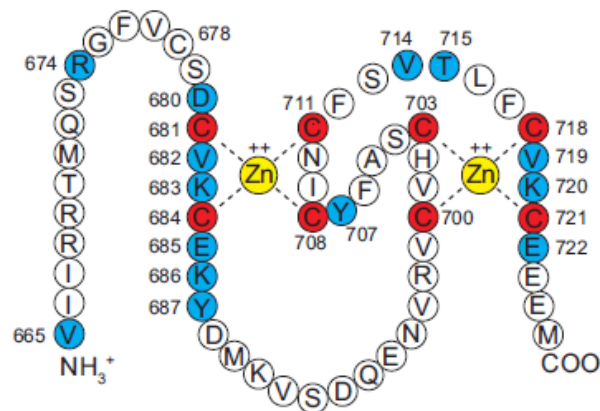


Figura 10. Aminoácidos del dominio RING finger con su potencial interacción proteína-proteína. Las 8 cisteínas que aparecen en rojo predicen la coordinación con los dos iones Zn ++, dando estabilidad a la estructura RING finger. Son indispensables para la función SPE-42 excepto por C681, cuya pérdida puede ser compensada parcialmente por C678 (85).

Los resultados mostraron conclusiones relacionadas con la función de la proteína SPE-42 que fue severamente reducida, en todas las mutaciones de alanina, por cisteína, a excepción de la cisteína 681. Sorprendentemente, las camadas promedios para la mutación de la cisteína 681, fueron de 45% en comparación con el WT, lo que sugiere que, o bien este aminoácido no es esencial para la coordinación con Zn⁺⁺ o algún otro aminoácido, parcialmente, compensa su pérdida. Como se predijo en el modelo de homología de SPE-42, un buen candidato para compensación del aminoácido cisteína, era el 678 (figura 10) (85).

Para probar esta información, se hicieron dos transgénicos adicionales: uno en el que la cisteína 678 se sustituyó por alanina, y una segunda mutación, en la que se sustituyeron las dos cisteínas, 678 y 681 (85). Los transgénicos, con la mutación en la cisteína 678, fueron rescatados en el mismo nivel de los WT, lo que indica que esta mutación por sí sola no afecta a la función de las proteínas. La doble mutación de las cisteínas 678/681, reduce la camada al mismo bajo nivel observado para los otros 7 transgénicos mutantes en las cisteína descritas (85).

Los resultados demostraron claramente que, si bien la cisteína 678 no es necesaria para la coordinación de Zn⁺⁺ en circunstancias normales, se puede compensar parcialmente por la pérdida de la cisteína 681, restaurando la función de la proteína a un nivel suficiente para la fertilización (85).

Además, los resultados constituyen un sólido argumento, que los 8 cisteínas mostrados en la figura 10, están involucrados en la coordinación con Zn⁺⁺, que mantiene unidos a la estructura RING finger de SPE-42, el modelo de homología de SPE-42 generado a partir de estructuras RING finger conocidos, es robusto y predictivo (85).

En resumen, en la proteína SPE-42 el dominio RING finger formado por 8 cisteínas coordina la unión al Zn⁺⁺ permitiendo la capacidad fecundante de los espermatozoides.

Antecedentes explican un nuevo mutante de la espermatogénesis defectuosa en *C.elegans*, la proteína SPE-10, que codifica una proteína transmembranal específica en los espermatozoides, que contiene un dominio zinc finger llamado *NEW 1*, con un motivo DHHC-CRD (dominio rico en cisteína), y un ZF-DHHC (38).

Los datos bioquímicos sugieren que el dominio DHHC-CRD cataliza la transferencia de lípidos por palmitoilación a proteínas sustrato. En los eucariotas, la palmitoilación juega una importante función reguladora en muchos eventos de señalización y el tráfico de proteínas vesiculares (38). La proteína SPE-10, podría estar regulando uno o más eventos críticos de palmitoilación, necesarios para una adecuada interacción del FB con el MO durante la espermatogénesis de *C.elegans*. La proteína SPE-10 se localiza dentro del cuerpo fibroso-organelo membranoso (FB-MO), estructura que se segrega hacia espermátidas, a medida que surgen del cuerpo residual durante la espermatogénesis de *C.elegans* (38). La falta de la proteína en el FB-MO en mutantes SPE-10, probablemente forman defectos ultraestructurales en los espermatozoides y generan un fenotipo estéril (38).

Spe-10 es el único gen que codifica para una proteína de membrana DHHC-CRD/Zinc-finger, requerida para la morfogénesis del retículo endoplásmico/aparato de golgi durante la espermatogénesis en *C.elegans* (38). Un análisis tanto genético como fenotípico indica que SPE-10 es una proteína de membrana, situada sobre todo en el OM. La proteína SPE-10 es probable que funcione como un modulador de interacciones proteína-proteína por palmitoilación de uno o más sustratos, requeridos para la interacción apropiada del OM con el FB (38). Una mutación de SPE-10, podría no permitir la asociación estable entre el FB y MO, aboliendo el transporte del FB a la espermátida, causando deficiencias en la formación normal de los espermatozoides (38).

También dentro de la información vinculada con mutantes SPE, se explica una esterilidad específica en espermatozoides mutantes UBA-1 (it129), junto con la reciente identificación de spe-16 como un homólogo de una E3 ligasa de ubiquitina, indicando un rol previamente no caracterizado de la ubiquitina en espermatogénesis de *C.elegans* (80).

Destacando que, existen genes spe que codifican para proteínas E3 ligasa de ubiquitina y que su función aún no ha sido detallada.

6.6.6. Funciones de las E3 ligasas de ubiquitina ZHP-3

Para garantizar de manera adecuada la disyunción de los cromosomas homólogos, se deben generar vínculos físicos entre ellos en los procesos que se realizan durante la profase meiótica, como es el caso del emparejamiento de los cromosomas homólogos, el ensamblaje del complejo sinaptonémico (SC), y la recombinación (crossing-over) (86). Los defectos en cualquiera de estos procesos producen fallas en la segregación de los cromosomas meióticos que conducen a la inviabilidad en los cigotos, y también pueden dar lugar a defectos en el desarrollo y la predisposición al cáncer (86).

El gen *zhp-3* en *C.elegans*, ortólogo del gen *zip3* en levaduras, posee un en su estructura dominios RING, que codifica para una proteína con actividad ligasa de ubiquitina con funciones importantes en profase I de la meiosis (86).

Inicialmente, científicos realizaron estudios mediante la proteína ZHP-3 fusionada a GFP. La proteína ZHP-3-GFP, con un bajo número de copias se expresa en un gusano transgénico que la ha integrado de forma estable en el genoma (*zhp-3::gfp*), resumiendo en gran medida la localización de ZHP-3, en profase I de la meiosis (86).

Mediante los estudios con la proteína de fusión ZHP-3-GFP, se señala que ZHP-3 tiene dos funciones durante la meiosis en *C.elegans*, la primera promoviendo la formación del crossing-over (87)(88), y en los quiasmas de manera que los cromosomas bivalentes garanticen una separación adecuada (86). La segunda, una función conservada de la proteína en la coordinación de la recombinación, con la morfogénesis del complejo sinaptonémico. En resumen, la proteína ZHP-3 coordina la recombinación con el desmontaje del SC y la formación de los cromosomas bivalentes (86).

Siguiendo con los estudios en la proteína ZHP-3 que es dinámica durante la meiosis y que su localización se analizó previamente utilizando una proteína de fusión GFP. Se efectuaron investigaciones para entender sus funciones con mayor detalle, mediante trabajos con anticuerpos policlonales para localizar la proteína endógena (86). Además, la organización espacial y temporal de los núcleos meióticos en la línea germinal del gusano, facilita el análisis de la localización de la proteína específicamente en profase I de la meiosis (Figura 11 A) (86).

Durante la profase temprana, se observó que la proteína ZHP-3 se localiza a lo largo del complejo sinaptonémico (SC) e inicialmente en los cromosomas en paquiteno. A pesar de su localización en el SC, también se requiere en los componentes centrales, que inicialmente aparecen como puntos a lo largo de los tramos continuos del SC (Figura 11 B, C y E)(86).

También, se registró la proteína ZHP-3, a mediados de paquiteno donde se extiende a lo largo de toda la longitud del SC (86). Sin embargo, a diferencia de las proteínas de los elementos axiales y centrales HTP-3 y SYP-1 respectivamente, su aspecto no era uniforme a lo largo de la longitud del SC (Figura 11 F y G)(86).

A finales de paquiteno, la localización de la proteína ZHP-3 se hizo más restringida en la longitud del SC, de tal manera que cada par homólogo en sinapsis mostró una amplia extensión de SYP-1, que carece de ZHP-3 (Figura 11 H-K) (86). La reconstrucción tridimensional de los pares de cromosomas homólogos, reveló que ZHP-3 fue localizado asimétricamente desde el punto intersticial a un extremo en el SC (Figura 11 L) (86).

La presencia de SYP-1, a lo largo de toda la longitud de estos cromosomas en sinapsis (Figura 11 L y M) (86), indica que este cambio en la localización de ZHP-3 precede del desmontaje asimétrico del crossing-over, dependiente del SC, que acompaña la transición tardía de paquiteno a diploteno (86).

La presencia de mutaciones impiden la sinapsis completa y, por lo tanto, se extiende una región morfológica nuclear polarizada (por ejemplo, deficiencias de los componentes centrales en el emparejamiento o mutantes him-8), que también causan cambios retrasando la distribución de la proteína ZHP-3, extendiéndose en la región de los núcleos donde se conservan la localización a lo largo del SC (86).

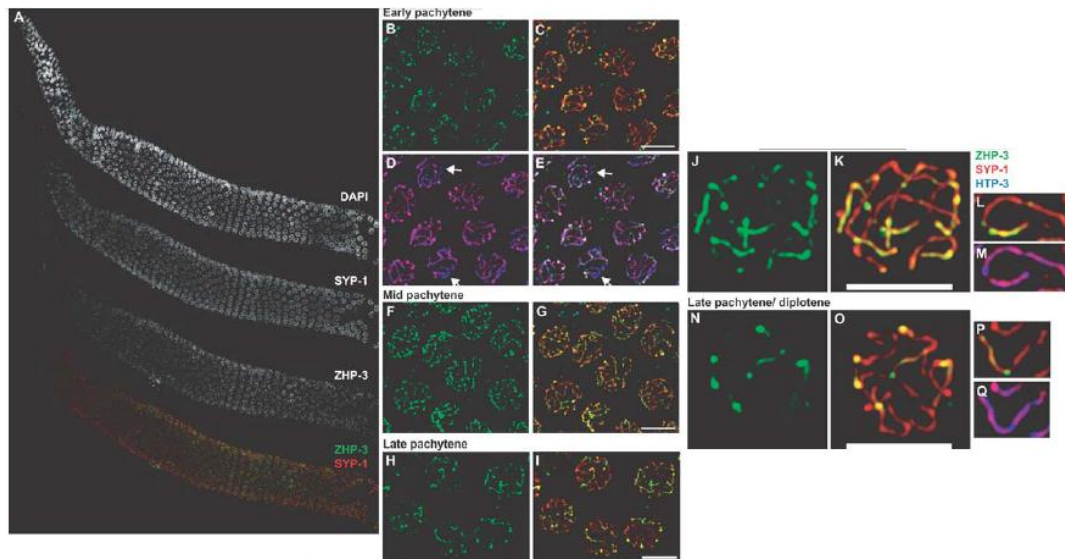


Figura 11. La proteína ZHP-3 se localiza de manera dinámica durante la profase meiótica. (A) gónadas WT se tiñeron con DAPI y con anticuerpos contra SYP-1 y ZHP-3. La proteína ZHP-3 se colocaliza en gran medida con SYP-1 a lo largo de la gónada. Imágenes amplificadas muestran núcleos meióticos en paquiteno (B, C, D y E), a mediados de paquiteno (F y G) y paquiteno tardío (H e I) teñidos con anticuerpos contra ZHP-3, SYP-1 y HTP-3. Las flechas en D y E indican los cromosomas sin sinapsis, que se detectaron con segmentos de HTP-3 carentes de SYP-1 y ZHP-3. Imágenes ampliadas de los núcleos individuales a finales de paquiteno (J y K) y paquiteno tardío/diploteno (N y O). Un solo par de homólogos en sinapsis de cada uno de estos núcleos se muestra en L, M, P y Q (86).

En los núcleos, a finales de paquiteno y diplotena temprano, ZHP-3 se convirtió en un único foco prominente en cada par de cromosomas homólogos (Figura 11 N-Q) (86). A finales de paquiteno, una débil señal de ZHP-3 todavía se puede observar a lo largo del SC (Figura 11 P) (86), pero esto desapareció en la iniciación del desmontaje del SC en diploteno (86).

Estos focos corresponden al límite entre el "brazo largo" de los cromosomas bivalentes, del cual la proteína central SYP-1 fue eliminada, y en el "brazo corto" donde se conserva la proteína SYP-1 hasta diacinesis (86).

Los pares de cromosomas homólogos en *C.elegans*, por lo general se someten a un solo evento de recombinación homóloga (crossing-over) durante la meiosis, y la formación de estos crossing-over dirigen el desmontaje asimétrico del SC, observado en diplotena/diacinesis (86).

Por lo tanto, parece probable que los focos de ZHP-3 podrían corresponder al crossing-over meiótico. Para probar esta posibilidad, se supervisó la localización de ZHP-3 en mutantes defectuosos en la meiosis, en la formación del crossing-over, haciendo referencia a la proteína SPO-11 que rompe la doble hebra de DNA (DSBs), que es esencial para la recombinación meiótica (89).

Y también la proteína MSH-5, un homólogo de MutS cuya función esta relacionada con la reparación de genes en la meiosis, que se requiere (junto con su acompañante HIM-14/MSH4) río abajo de la DSB, para promover la formación del crossing-over (86). Los resultados mostraron que en mutantes SPO-11 y MSH-5, se observó la persistencia de ZHP-3 a lo largo de toda la longitud del SC hasta diploteno (86).

En ausencia de la recombinación, el desmontaje del SC es desregulado: algunos cromosomas pierden la tinción de SYP-1 por completo, algunos se conservan a lo largo de su longitud y otros cromosomas presentan focos intensos de SYP-1 (86). En tales casos, se encontró que ZHP-3 se mantuvo asociado con focos de SYP-1 en diploteno, aunque existen algunas regiones donde observó a SYP-1 sin ZHP-3. Sin embargo, ZHP-3 ya no se detecta en diacinesis, incluso en cromosomas univalentes que retuvieron SYP-1(86).

Como una prueba más de que los focos de ZHP-3 se ubica en el crossing-over, se detectaron ciertos patrones perturbados en la localización de la proteína en mutantes con defectos en el entrecruzamiento. En *C.elegans*, el control del crossing-over se manifiesta tanto en el número, como en la ubicación del mismo (86). En hermafroditas mutantes HIM-8, que no se produce sinapsis en los cromosomas sexuales, resultando un aumento apreciable del crossing-over en los cromosomas somáticos (90). Por lo tanto, si el control del crossing-over se mantuvo en estos animales, se espera ver cinco focos de ZHP-3 en cada núcleo, lo que corresponde a un único evento de crossing-over en cada cromosoma autosómico. Consistente con la evidencia genética, en ovocitos HIM-8 (86), a finales de paquiteno, se muestran más de cinco focos de ZHP-3 (86), que se detectan en los distintos pares de cromosomas en sinapsis, con más de un foco de ZHP-3 (86).

Los investigadores no observaron focos de ZHP-3 en los cromosomas sin sinapsis, consistente con la evidencia de que la sinapsis es un requisito previo para la localización de ZHP-3 (86). En resumen, se requiere el ortólogo de ZIP3 en *C.elegans* para la formación del crossing-over en la meiosis, y esta localización se mantiene en los sitios del entrecruzamiento hasta finales de Profase I (86).

En otras investigaciones relacionadas con la misma proteína, se realizaron mediante el estudio comparativo de RNF212 de ratón, ortólogo de ZIP3 y ZHP-3 en *Saccharomyces cerevisiae* y *C.elegans* respectivamente. En el mamífero, la pérdida de la fase tardía en los espermatoцитos y un elevado número de ovocitos se observan en ratones RNF212 *-/-*, sugiriendo que el complejo sinaptonémico se forma de manera eficiente realizando una sinapsis completa. Para probar esta inferencia, se localizó el complejo sinaptonémico en espermatoцитos y ovocitos fetales (91).

Aparentemente en ambos, tanto en núcleos de espermatoцитos como núcleos de ovocitos de ratones RNF212 *-/-*, se observó el SC, en paquiteno de manera normal, con los cromosomas autosomas completamente en sinapsis(91).

Además, las frecuencias en los defectos sinápticos no se incrementaron en la etapa de paquiteno en la meiosis de animales machos y hembras de RNF212 *-/-*, lo que indica que la sinapsis se produce de manera eficiente (91). Este hallazgo es análogo a la sinapsis aparentemente normal, visto en mutantes ZHP-3 en *C.elegans* (91).

Igualmente, los mutantes de ZIP3 en levadura y *zhp-3* en *C.elegans*, comparten defectos comunes en el entrecruzamiento con ratones (91). Dado que el efecto leve del *knockout* de RNF212 en la sinapsis, el entrecruzamiento defectuoso es una causa probable de la infertilidad. Para analizar aún más este mecanismo, se realizó un conteo de los quiasmas en los espermatoцитos, en etapas de diacinesis/metafase I (91).

En las células WT, los quiasmas en promedio son de $24,8 \pm 0,5$ por núcleo (12 núcleos), consistente con estimaciones previas (92). En contraste, con el 60% de las células RNF212 *-/-* (30/50) contenía exclusivamente cromosomas monovalentes, lo que indica una ausencia completa de los quiasmas (91). El 40% restante de los núcleos en metafase (20/50) contenía 1-3 cromosomas bivalentes (91), para un promedio de sólo $0,84 \pm 0,17$ quiasmas por núcleo (91).

Los patrones de localización cromosómica de ZHP-3 en *C.elegans* también se asemejan a los de RNF212 en ratón, pero con algunas diferencias importantes. ZHP-3 se localiza, inicialmente, a lo largo de las longitudes de los complejos sinaptonémicos, pero la tinción parece ser continua, en contraste con la tinción punteada de RNF212 en ratón (86) (93).

En resumen, existen altas similitudes en la localización de las proteínas homólogas, ZHP-3 y RNF212 en gusano y ratón respectivamente, con lo cual cumplen funciones importantes en la profase I de la meiosis específicamente en el crossing-over, actividad que se ha mantenido durante largo tiempo con pocas variaciones.

6.6.7. Funciones de las E3 ligasa de ubiquitina relacionadas con SEL-10

La proteína SEL-10 es un componente de un tipo de E3 ligasa de ubiquitina, que ubiquitina la porción intracelular del receptor Notch (INTRA), para la degradación por el proteosoma (47). Estudios han encontrado un alelo, oz237 de Pas-5 (subunidad alfa del proteosoma), que codifica un componente conservado del proteosoma 20S (94). Se conoce que en gusanos *C.elegans* que carecen de la actividad de sel-10, han aumentado la señalización Notch, mejorando un fenotipo multivulvar de lin-12 (gf) (47).

Para determinar si el presunto aumento en la señalización Notch en animales mutantes Pas-5 (oz237) se debe a una disminución en la degradación de INTRA, regulada por sel-10, se analizaron dobles mutantes pas-5 (oz237);sel-10 (bc243) en el que sel-10 (bc243) es un alelo nulo (47).

Los resultados encontrados en animales pas-5 (oz237);sel-10 (bc243) se relacionan con un fenotipo multivulvar sintético, lo que sugiere que los dobles mutantes tiene un mayor nivel de señalización Notch que los encontrados en mutantes únicos (47).

Por lo tanto, el aumento en la señalización Notch en mutantes pas-5 (oz237) no se debe únicamente a una disminución en la degradación de INTRA, mediada por sel-10. De cualquier manera, existe la posibilidad de que sel-10 puede no ser el único medio por el cual INTRA es diana del proteosoma, o también puede existir un regulador positivo de la señalización Notch, que no sea INTRA, que también se degrada por el proteosoma (47).

En las líneas germinales de dobles mutantes, pas-5 (oz237);sel-10 (bc243), los animales tienen muy pocas células germinales y los núcleos tienen morfología anormal. Éste no parece ser el resultado de una alteración en la proliferación, *versus* la decisión de entrada a la meiosis, característico de la señalización Notch (47).

La proteína SEL-10 probablemente está involucrada en otros procesos en la línea germinal, que dan lugar a este fenotipo. De hecho, SEL-10 está implicado en las dianas para la degradación de proteínas distintas de Notch (47).

Por lo tanto, los animales pas-5 (oz237);sel-10 (bc243) tienen un fenotipo que posee una línea germinal sintética, probablemente relacionado con una diana de SEL-10, aparte de Notch, que impide que la línea germinal se forme correctamente. Por lo tanto, este fenotipo de la línea germinal no permite analizar el efecto de pas-5 (oz237);sel-10 (bc243) sobre la proliferación frente a la entrada a la meiosis (47).

También existen otros antecedentes relacionados con la pérdida de SEL-10 que mejora la proliferación de la línea germinal, en mutantes GLP-1 (gf) de fondo, lo que sugiere que SEL-10 puede ser diana intracelular de GLP-1 para la degradación por proteosoma (35). Parece claro que la actividad proteosomal regule la entrada en la meiosis, ya que la eliminación de varios componentes del proteosoma aumenta la proliferación de las GSC en mutantes GLP-1 (gf) de fondo (47).

Sin embargo, si la reducción, tanto de la función de sel-10 y el proteosoma, provoca una proliferación tumoral de las GSC, se podría esperar que la señalización de GLP-1 ectópico no podría ser evaluada, debido a la deficiente regulación de las otras dianas de SEL-10, causen un fenotipo temprano en la línea germinal (47).

Como SEL-10 es el único regulador de la degradación intracelular de GLP-1, independientemente de su dominio PEST, por lo tanto, sigue siendo una interrogante (35).

6.6.8. Funciones de otras E3 ligasas de ubiquitina

La inducción de la señalización mediada por GLP-1 de la gónada somática hacia la línea germinal, es esencial para la proliferación de las células germinales en larvas y adultos (95). Durante la fase proliferativa temprana, varias células somáticas de la gónada reciben la señal de GLP-1, a través de la línea germinal y en la última fase, sólo recibe señales de GLP-1 a través de las células de la punta distal, hacia la línea germinal (96). Las células germinales que proliferan, no se mantienen si la señalización se reduce o es suprimida por una mutación en un componente de la vía GLP-1 o por abolición de la señalización de las células somáticas; en su lugar, las células germinales salen prematuramente en mitosis, entran en meiosis, y forman gametos con anomalías (96).

Los factores adicionales que promueven la proliferación de las células germinales a nivel de un WT, incluyen las células de la vaina distal (96), uniones gap entre la gónada somática y la línea germinal (97), y factores nutricionales (98), entre otros.

Estudios afirman que se recuperaron previamente mutaciones supresoras de GLP-1, mediante *screening* genéticos de SOG-1, con fenotipos sensibles a la temperatura (ts) (96). Las mutaciones en la proteína SOG-1, suprimen parcialmente el efecto de GLP-1 con letalidad embrionarias y defectos en la proliferación de la línea germinal.

La caracterización molecular, demostró que sog-1 codifica para el mismo gen ubr-5 según estudios moleculares, la proteína es un miembro de HECT (homólogo al extremo carboxi terminal E6-AP) un tipo de proteínas de la familia E3 ligasa de ubiquitina (96).

Los resultados encontraron que la pérdida de la actividad de UBR-5 provoca un aumento tanto de la actividad en la señalización GLP-1 y LIN-12 en fondos genéticos sensibilizados donde el receptor lleva una mutación condicional (96). El análisis genético sugiere que UBR-5 actúa en el receptor celular y además, el complejo E3 ligasa de ubiquitina SCF-SEL-10 limita la actividad de LIN-12 y, en menor medida, la actividad de GLP-1 mediante la unión y la promoción del dominio intracelular (96).

Las mutaciones en SOG-1 fueron recuperados en un *screen* genético para supresores recesivos de GLP-1 (q224ts) y GLP-1 (q231ts) (96). Ambos alelos de GLP-1 (ts) tienen un fenotipo nulo a 25°C y un fenotipo de pérdida parcial de función (LF) a 20°C (96).

En consecuencia, cuando las larvas en etapa L1 de GLP-1 (ts) se ponen a una temperatura permisiva de 25°C, sus células germinales salen de la mitosis, entran en meiosis y se someten a la espermatogénesis (96). En contraste, cuando larvas en etapa L1 de GLP-1 (ts) se ponen a la temperatura permisiva de 20 °C, sus células germinales proliferan durante un período de tiempo antes de entrar prematuramente a la meiosis y someterse a la gametogénesis; en la mayoría de los casos, se generan una dotación completa de espermatozoides y ovocitos, y forman algunos embriones (96). Estos embriones mueren, debido a defectos en la señalización de GLP-1 durante la embriogénesis (96). Las mutaciones en SOG-1 parcialmente suprimen los defectos de GLP-1 (ts) a 20°C, pero no a 25 °C, por lo tanto, no pasan por alto el requisito de la actividad GLP-1(96).

Se consideró que mutantes UBR-5 podrían afectar al grupo de células madre de la línea germinal (96). Esta información se confirmó mediante la medición del tamaño de la zona proliferativa, contando el número de núcleos de las células en la línea germinal, desde el extremo distal de la gónada somática hasta la región de inicio de leptoteno/cigoteno, en los animales mantenidos a 20°C (96). Cuando se comparó el número de filas de núcleos en la zona mitótica de la línea germinal de los animales GLP-1 (q231ts) y UBR-5 (OM2); GLP-1 (q231ts) a las 24 horas de la etapa L4, se observó un aumento del tamaño en la zona mitótica, de un promedio de cuatro filas en GLP-1 (q231ts) a un promedio de 11 filas en el doble mutante UBR-5 (OM2);GLP-1 (q231ts) (96).

Por lo tanto, se rescata que la pérdida de la actividad de UBR-5 conduce a un aumento en la proliferación de las células germinales, en GLP-1 de fondo (ts). En contraste, no se observó un aumento en el número de células en las líneas germinales mitóticas en mutantes UBR-5, en comparación con el WT a las 24 horas después de L4 (96).

Por lo tanto, la pérdida de actividad de UBR-5 no impactó la longitud de la región mitótica en líneas germinales en los WT en función de GLP-1 (96).

Entre los ocho alelos de UBR-5, se caracterizaron tres UBR-5 (OM2), UBR-5 (ok1108), UBR-5 (Q345) que contienen un codón de parada prematuro y todos podrían ser alelos nulos. La naturaleza de estos alelos, sugiere que una reducción de la función de UBR-5 suprime la pérdida de la actividad de GLP-1, y por lo tanto, UBR-5 sea un regulador negativo de GLP-1 (96).

Se confirmó, aún más, que las mutaciones de *ubr-5* son de pérdida de función, utilizando *knockdown* de UBR-5 mediante RNAi en fenotipo *glp-1* de fondo con ganancia de función, y se examinaron las consecuencias de la señalización de GLP-1 (96). Esta ganancia de función de las mutaciones de *glp-1*, ha elevado la señalización de GLP-1, lo que da como resultado que la línea germinal prolifera de forma excesiva y eventualmente forma tumores en dicha línea celular (96). Por lo tanto, se infiere de que UBR-5 actúa en la línea germinal, para limitar la señalización de GLP-1 y la proliferación de células germinales (96).

Nuevos antecedentes asociados con otros mecanismos de las E3 ligasas en la línea germinal de *C.elegans* fueron realizados por investigadores mediante estudios vinculados con el gen *prom-1*, que aislaron de un *screen* de mutantes con aumento de la apoptosis en la línea germinal en *C.elegans*. El gen *Prom-1* codifica una proteína caja-F con homología limitada, con el supresor putativo de tumores humano FBXO47. Muchas proteínas caja-F, están implicadas para actuar como sustrato de reconocimiento de los componentes del complejo de proteínas E3 ligasas de ubiquitina, Skp1-Cullin-caja-F (99).

Las mutaciones en el locus de los mutantes *prom-1*, causan una fuerte reducción en la formación de los cromosomas bivalentes, lo que resulta en un aumento de la letalidad embrionaria y un fenotipo him (99).

Los núcleos de las gónadas mutantes *prom-1*, poseen una completa zona de proliferación mitótica y la replicación pre-meiótica correcta, pero se someten a un prolongado retraso en la entrada a la meiosis. La proteína Prom-1 regula la progresión oportuna, a través de la profase I de la meiosis, y en su ausencia se deteriora fuertemente el reconocimiento de los cromosomas homólogos (99).

En resumen, la proteína PROM-1 contiene un dominio tipo caja-F que constituye la ligasa SCF^{Prom-1}, PROM-1 puede desempeñar una función en la ubiquitinación, en la regulación de la profase meiótica (99).

Por otro lado, se encontró actividad de una E3 ligasa de ubiquitina que regula la migración celular en la gónada de *C.elegans*. La función de la E3 ligasa, se relaciona con la proteína integrina que cumple un rol importante, como receptor de adhesión celular (100). Esta proteína contiene una subunidad α (INA-1 y PAT-2) y una subunidad β (PAT-3) (100). Tras la estimulación por un ligando, la señalización de las integrinas se activan mediante vías intracelulares que incluyen a FAK, Src, y otras cascadas de quinasas (100). En suma, parece probable que estos receptores funcionan juntos en las DTC, coordinando la señalización a través de SRC-1 u otras moléculas conservadas que no han sido demostradas (100).

La integrina INA-1/PAT-3 es importante para la migración celular (en neuronas, así como en las DTC) (100), mientras que en *C.elegans*, la integrina PAT-2/PAT-3 son frecuentes en células contráctiles, células inmóviles, como por ejemplo células musculares de la pared del cuerpo (100).

Se encontró información relacionada con algunos receptores que desempeñan funciones distintas durante la migración de las DTC, y que la regulación de su expresión es crucial para la morfogénesis de la gónada (100). La expresión de *ina-1* es inducida antes del inicio de la migración, debido a que es necesaria para que las DTC completen la migración (101). En mutantes *ina-1*, ocasionalmente los brazos gonadales están mal dirigidos, presentan morfologías defectuosas y pérdida de células germinales (100).

Durante la migración en la membrana basal ventral, la expresión de VAB-3, un factor de transcripción Pax6, se inicia en las DTC y activa directamente la expresión de pat-2, en la primera curva en L3. En ausencia de VAB-3, DTCs tiene un camino migratorio largo y confuso, asociado con una falta de pat-2 (100).

En los animales WT, la regulación positiva de la expresión de pat-2 proporciona un segundo receptor de adhesión (PAT-2/PAT-3), que puede permitir a las DTC adaptarse a los diferentes sustratos de la membrana basal, sobre la cual migran las células. Por otra parte, este cambio en la expresión del receptor de integrina, en combinación con la repulsión mediada por netrina en las DTC, puede proporcionar una colección de receptores esencial para la adhesión en la nueva ruta migratoria (100).

El nivel de PAT-3 en las DTC es crucial para la migración, y su recambio proteico, es regulado mediante la proteína RNF-121. La proteína RNF-121, es una E3 ligasa conservada con dominios RING finger, que se expresa en las DTC, funcionando como un retículo endoplásmico (ER) anclada a la ligasa de ubiquitina que dirige la degradación de PAT-3 (100). Cuando RNF-121 se sobreexpresa, los niveles de PAT-3 se reducen, y los animales exhiben defectos similares a las que llevan la forma negativa dominante de pat-3 (figura 12) (100). Por lo tanto, un nivel óptimo de la expresión de PAT-3 en las DTC, debe mantenerse durante los inicios de las DTC (102), ya sea para formar una particular integrina heterodimera que está dirigida por RNF-121, o para esta rotación donde podría ser crucial para el cambio de los heterodímeros INA-1 a PAT-2 en las DTC, información que aún se desconoce (100).

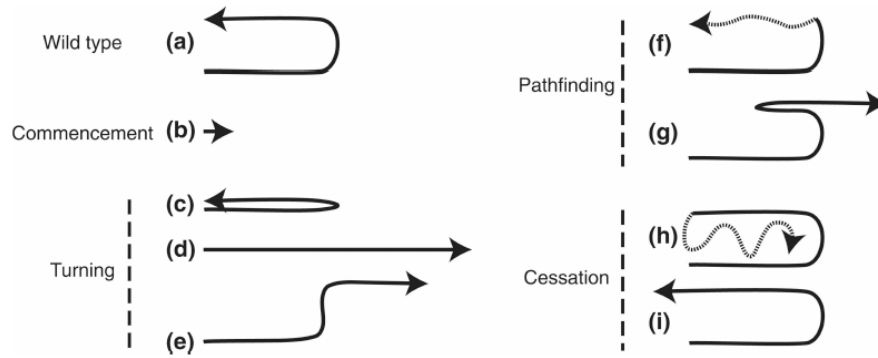


Figura 12. Defectos de la migración celular en las células de la punta distal en la gonada de *C.elegans*. Las flechas indican la dirección de la migración. Secciones representadas por líneas de puntos indican la variabilidad potencial en las rutas de migración. Una forma de ruta migratoria en WT es de movimiento en forma de U se muestra en (a). Los defectos se agrupan de acuerdo a las etapas de migración: inicio (b, sin migración), girando (c, ventralizado; d, sin vuelta; e, giro equivocado), la búsqueda de caminos (f, serpenteando sobre la posición dorsal; g, cambio de dirección), y cesación (h, la migración perpetua; i, en exceso). Sólo gónadas posteriores están representadas, aunque estos defectos también se producen en los brazos de las gónadas anteriores (100).

Otros funciones de las proteínas *RING finger* se encontraron relacionadas con la reparación del DNA en las células germinales de *C.elegans*. Investigadores encontraron las funciones de RNF-113 en respuesta a la inducción de ICL en la proliferación de células germinales de *C.elegans*, caracterizado por las relaciones genéticas con FCD-2/FANCD2, RFS-1/RAD51C, y RAD-51 (103). Para estudiar si RNF-113, genéticamente interactúa con FCD-2, se debilitó RNF-113 en mutantes FCD-2 (tm1298). Estos gusanos debilitados, forman solo 12 embriones, en comparación con 241 en el WT, 201 de fcd-2 (tm1298), y 100 de RNF-113 (RNAi) (103).

El porcentaje de embriones eclosionados, a partir de gusanos dobles mutantes (26±12%), fue mucho menor que en los gusanos no tratados con RNF-113 (80±7%). De hecho, el número de la progenie de los gusanos doblemente deficientes, era demasiado pequeña para medir la supervivencia por efecto de ICL (103).

Para investigar las razones de este muy pequeño tamaño de la camada, se analizó la línea germinal, y los investigadores encontraron con un número de fenotipos con endomitosis (Emo) en los ovocitos de gusanos dobles mutantes FCD-2 (tm1298);RNF-113 (RNAi), que fue mucho mayor que en cualquiera de las cepas deficientes por separado (103).

El fenotipo “emo”, se observó previamente en ovocitos con ovulación defectuosa y replicación descontrolada del DNA (103). Los ovocitos con endomitosis contenían, ya sea un conglomerado de cromosomas con enorme cantidad de DNA, o un alto número de cromosomas bivalentes condensados (103).

Para investigar la localización intracelular de RNF-113, se tiñeron las gónadas WT y gusanos RNF-113 (RNAi) con anticuerpo anti-RNF-113 (103).

La proteína estaba presente, en el citoplasma y en la periferia de los núcleos de las células germinales. Después del tratamiento con ICL, la cantidad de proteína había aumentado tanto en el núcleo como en el citoplasma, y el efecto máximo se observó entre 9 y 16 horas después del tratamiento, es decir, el período en que aumento el tamaño de las células germinales debido a la detención del ciclo celular (103).

La acumulación de RNF-113 disminuyó con el tiempo, y casi desapareció antes de 24 horas en la mayoría de las células germinales. Acontecimiento que se relaciona con la reanudación del ciclo celular, que se reconoce a través del tamaño nuclear, y además por la pérdida de los focos de RAD-51 (103).

Los investigadores examinaron el efecto del debilitamiento de RNF-113 en la formación de focos FCD-2. La proteína FCD-2 (homólogo de FANCD2) apareció como focos nucleares en las células germinales WT, 18 horas después del tratamiento con ICL, y los focos de FCD-2 se formaron incluso con el agotamiento de RNF-113 (104) (105) (103).

La mayoría de los focos de FCD-2 desaparecieron 24 horas después del tratamiento con ICL en ambas células, WT y RNF-113 (RNAi) (106) (107). Por lo tanto, el hecho de que la formación de focos de FCD-2 no se ve afectada por *knockdown* de RNF-113, sugiere que FCD-2 no es diana de ubiquitinación de RNF-113 (103).

Con esta información, los científicos examinaron la formación de focos de RAD-51 en núcleos de células germinales (103), que en células de mamíferos, RAD51 actúa río abajo de FANCD2, el cual es reclutado para las DSB resultantes de las incisiones por ICL, e iniciar la reparación de las DSB mediante recombinación homóloga (108).

Los científicos identificaron focos de RAD-51 en los núcleos, después del tratamiento con ICL en WT de células germinales de *C.elegans* , con una señal más prominente entre 9 y 18 horas (103).

Sin embargo, cuando se agotó el *knockdown* de RNF-113, el número de focos de RAD-51 se redujo considerablemente (de 9.5 ± 0.5 (SEM) a 5.0 ± 0.6 focos por plano de focalización nuclear) y el número no aumentó significativamente con el tiempo después del tratamiento con ICL (103).

Esto indica que RNF-113 es necesaria para la carga eficiente de RAD-51 en los sitios de daño en el DNA por el entrecruzamiento (103).

Con el fin de examinar si RNF-113 responde específicamente al tratamiento con ICL, y no a otros tipos de daño en el DNA tales como las DSB, se probó la formación de focos RAD-51 después de la irradiación con rayos γ (103).

Los focos de RAD-51 aparecieron claramente, entre 3 y 9 horas después de irradiación con rayos γ , en ambas células germinales WT y RNF-113 (RNAi)(103), lo que sugiere que RNF-113 se requiere para la reparación de ICL, pero no para las DSBs inducida por los rayos γ (103).

Para finalizar con las funciones de la E3 ligasa de ubiquitina, RNF-113, investigadores encontraron que la enzima ha sido reportada como un promotor tumoral en la línea germinal de mutantes GLP-1 (oz64) (109).

Aportes de otra E3 ligasa relacionado con el funcionamiento de la línea germinal en *C.elegans*, se encontraron en el gen supresor de tumores ARF, codificado por el locus INK4A, que está regulado positivamente por la activación inadecuada de varios oncogenes estimulados por p53, e inhibiendo la actividad de MDM2, a través de mecanismos que pueden implicar la degradación proteosomal y secuestro nucleolar (110).

Se identificaron proteínas que interactúan con ARF implicadas en estos procesos, mediante la purificación de complejos ARF a partir de células p53 nulas, e identificaron un gen supresor de tumores ARF interactuando con una E3 ligasa con dominio HECT, a la que denominaron ARF-BP1 (110).

En *C.elegans*, el homólogo de ARF-BP1, EEL-1 es necesario para la apoptosis en la línea germinal, en respuesta a estrés genotóxico (6). El nemátodo *C.elegans* posee una vía de señalización de la apoptosis y mecanismos de las E3 ligasas de ubiquitina altamente conservado (6).

El gusano *C.elegans* contiene un único gen que codifica para p53, CEP-1, que es requerido para la activación de la apoptosis en las células germinales tratadas con agentes que dañan el DNA (6). Al igual que en mamíferos, en *C.elegans* el DNA percibe daños a través de puntos de control conservados, que incluyen el complejo 9-1-1 (HPR-9, Hus-1, y MRT-2) y el ortólogo de Tel2, clk-2. Se requiere de estos genes para iniciar la detención transitoria del ciclo celular en células germinales mitóticas en proliferación y/o activar la apoptosis dependiente de CEP-1 en la región de paquiteno, en la línea germinal (6). También se ha descubierto el rol de Skp1/Cullin/caja-F (SCF), otra E3 ligasa de ubiquitina SCF-FSN-1 en la regulación negativa de la apoptosis en células germinales dependiente de CEP-1 (111).

Para examinar exhaustivamente el rol de la “ubiquitoma” en la apoptosis de *C.elegans* inducida por daños, se inhibieron de forma sistemática 108 de las 165 predicciones de genes que contiene E3 ligasa RING, hect, y U-box mediante RNAi, y se cuantificó la apoptosis en la línea germinal inducida por radiación ionizante. De un *screen* de RNAi, se ha identificado un dominio hect en la E3 ligasa, EEL-1, un homólogo de Huwe1/ARF-BP1/Mule en humano, como un regulador positivo de la apoptosis en la línea germinal inducida por IR (6).

La información dice que el gen eel-1 regula la apoptosis en la línea germinal mediante la inducción por IR, pero es prescindible para la apoptosis fisiológica en las células germinales y en el desarrollo de la línea somática. La proteína EEL-1 promueve la apoptosis por medio de un mecanismo, que no afecta a la actividad transcripcional de la proteína de tipo p53, CEP-1, ni altera los niveles endógenos de la proteína tipo factor antiapoptótico oncogénico, MCL-1, CED-9. La proteína EEL-1 regula el daño en el DNA, inducido por la señalización de la apoptosis en la línea germinal en *C.elegans* (6).

A través de un *screen* mediante RNAi. El gen eel-1, mediante dos mutantes por delección, muestran niveles similares de resistencia a la apoptosis en la línea germinal inducida por IR, en un rango de dosis (6).

Además, se demuestra que en ausencia del daño en el DNA, el 50% de las células germinales sufren apoptosis fisiológica (6). Esta apoptosis fisiológica de las células germinales, fue similar en mutantes eel-1 en comparación con los controles WT (6), lo que sugiere que eel-1 regula específicamente la muerte de las células germinales inducidas por daño (6).

Hay dos posibles explicaciones de cómo el gen eel-1 regula la muerte de las células germinales inducida por daño. La primera, es que eel-1 puede controlar el momento de la apoptosis, tal que los núcleos (cuerpos) de las células germinales no aparecen en mutantes eel-1 hasta después de 24 horas. Como alternativa, eel-1 puede ser necesaria para activar la apoptosis de células germinales inducidas por daño similar al gen tipo p53, cep-1(6). Para probar la primera posibilidad, los investigadores realizaron un análisis de curso temporal de mutantes eel-1 (ok1575) y se encontró que eran resistentes a la apoptosis inducida por IR, e incluso 48 horas después del tratamiento (6).

Esto, apunta a que se requiere el gen eel-1 para promover la apoptosis de las células germinales inducidas por daño, antes de controlar la cinética de la aparición de los núcleos (cuerpos) (6).

Como los niveles más bajos de apoptosis en las células germinales inducidas por IR podrían ser el resultado de la disminución de la proliferación de células germinales en mutantes eel-1, se determinó el número de núcleos en la región de paquiteno en la línea germinal (6).

Los mutantes eel-1 tenían un número similar de núcleos en las regiones de paquiteno que en los controles WT (6), lo que sugiere que los niveles más bajos de apoptosis no se debieron a un defecto en la proliferación. Esto es apoyado por observaciones que advierten, que existe un número similar de células germinales que proliferan por mitosis en mutantes eel-1 y en animales WT (Figura 13 A y B) (6).

Para verificar que mutantes eel-1 no tienen un defecto general en la apoptosis, cuantificamos los núcleos (cuerpos), utilizando alelos defectuosos de ced-1 (e1735) y en dobles mutantes de ced-1 (e1735);eel-1 (ok1575), donde los niveles de apoptosis de la línea germinal fisiológica eran similares a mutantes individuales ced-1 (e1735), durante el mismo curso temporal (6).

Para determinar si *eel-1* regula apoptosis en el desarrollo somático, se comparó el número de cuerpos en el desarrollo de embriones mutantes *CED-1* (*e1735*) y embriones dobles mutantes *ced-1* (*e1735*);*eel-1* (*ok1575*). Al igual que en la apoptosis fisiológica de la línea germinal, no se encontraron diferencias en el número de cuerpos persistentes en los embriones y larvas en la primera etapa en dobles mutantes *ced-1*; *eel-1*, frente a mutantes *ced-1* (6).

En conjunto, estos resultados indican que *eel-1* regula específicamente la apoptosis de células germinales inducidas por daño en el DNA (6).

En animales WT, el estrés genotóxico activa unos conservados puntos de control del daño en el DNA, lo que provoca una detención transitoria en la proliferación mitótica de las células germinales y activan la reparación del DNA(6).

Estos genes de control *HPR-9/Rad9*, *Hus-1/Hus1*, *MRT-2/RAD1*, y *CLK-2/TEL2* son necesarios para la detención del ciclo celular y la activación de la reparación del DNA (6). Las mutaciones de pérdida de función en estos genes, también causan resistencia a la apoptosis de la línea germinal, debido a que el punto de control es incapaz de activar la proteína tipo p53, *CEP-1*. A medida que los niveles reducidos de la apoptosis en mutantes *eel-1* podrían ser el resultado de la activación del punto de control defectuoso, se examinó la respuesta en animales WT, mutantes *CEP-1* (*gk138*) y *eel-1* (*ok1575*)(6).

Contrariamente, a lo observado en otros estudios que marcan un defecto leve en la detención del ciclo celular, cuando *eel-1* fue debilitado por RNAi, en este experimento, se observó una robusta detención de la proliferación de células germinales mitóticas en los mutantes *eel-1*, que era indistinguible con los controles WT (Figura 13 A y B) (6).

Además de la detención del ciclo celular, los mutantes en los punto de control también generan una alta frecuencia de progenie inviable, después de la exposición a agentes genotóxicos, debido a que no pueden responder las vías de reparación de DNA adecuadamente (6).

Se ha demostrado que mediante el gen *Huwe1*, se regula la reparación del DNA en células de mamífero (112), con este argumento se determinó que los mutantes *eel-1* fueron sensibles al daño del DNA por dos métodos. En primer lugar, se cuantificó la progenie inviable generada por adultos expuestos a agentes que dañan el DNA; en segundo lugar, se determinó la frecuencia de los animales irradiados en la fase L1, que se desarrolló hasta convertirse en adultos estériles (113). Se encontró que mutantes *eel-1* generan mayor progenie inviable que los controles WT, después del tratamiento con IR, o por inhibidores de la replicación (6).

Por el contrario, el porcentaje de animales irradiados en L1 que se convirtió en estériles por la etapa adulta era el mismo que el WT, mientras que con mutantes *CLK-2* eran hipersensibles (Figura 13 C) (6). Este resultado, aparentemente contradictorio, podría explicar que la línea germinal de *eel-1* no es hipersensibles a agentes que dañan el DNA durante el desarrollo de las larvas, pero pueden ser sensibles en la etapa adulta (6).

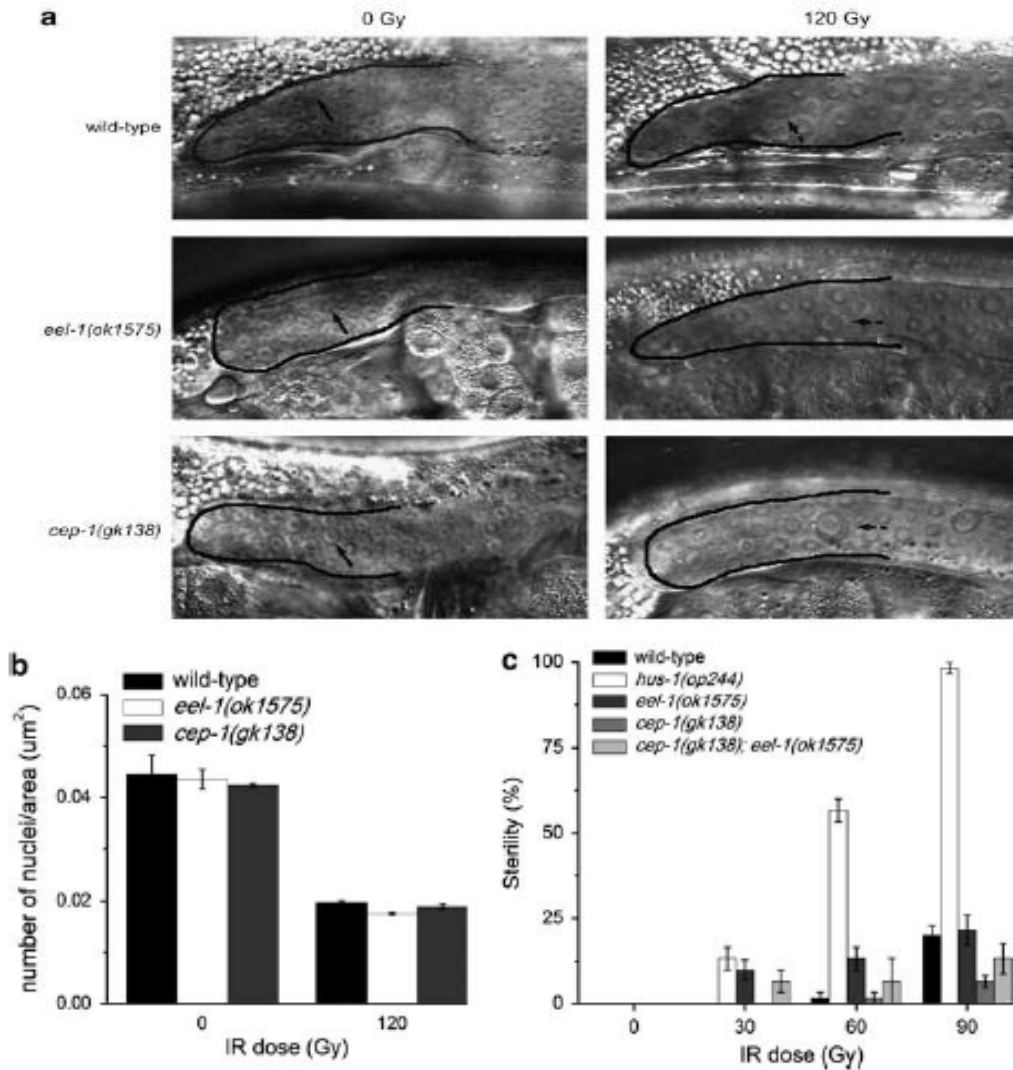


Figura 13. Mutantes *eel-1* no son defectuosos en función a los puntos de control del daño en el ADN. (A) los mutantes *eel-1* (*ok1575*) experimentan una detención transitoria en la proliferación de las células germinales mitóticas en respuesta a la IR que es indistinguible en WT o mutantes *CEP-1*(*gk138*). Las líneas germinales se describen en las líneas negras y las flechas indican los núcleos mitóticos normales. Flechas con puntos indican ampliación de núcleos mitóticos 20 horas después de la exposición a 120 Gy de IR. (B) La cuantificación del número de núcleos por unidad de área en la región mitótica de la línea germinal, como se muestra en el panel a. (C) Explica la sensibilidad de las larvas L1 mutantes *eel-1* estériles, inducidos por IR son similares a los WT (6).

Para hacer frente a la potencial función de EEL-1 en la reparación, se diseccionaron líneas germinales irradiadas en adultos *eel-1*, teñidas con anticuerpos para RAD-51, que repara las roturas en la doble hebra de DNA (6).

Los resultados identificaron focos de RAD-51 en los sitios de rupturas en la doble hebra de la línea germinal, que aumentan después del tratamiento con IR en adultos y que persisten durante períodos más largos de tiempo en los puntos de control de las líneas germinales en adultos mutantes (6).

También se encontró un número persistente de focos RAD-51 en *eel-1*, que fue similar a los controles WT, antes y después del tratamiento con IR (6). Curiosamente, se observó más focos de RAD-51 en dobles mutantes *cep-1;eel-1* irradiados (6), lo que sugiere que la eliminación combinada de estos dos genes, causa defectos en la reparación del DNA. Sin embargo, no se puede excluir la posibilidad de que esto podría ser debido a un defecto metabólico general de mutantes *cep-1;eel-1*, ya que también generan mayor progenie inviable en ausencia de estrés genotóxico (6). Los resultados sugieren que *eel-1*, probablemente actúa río abajo o de forma independiente del punto de control del daño en el DNA (6).

Además, no se requiere CEP-1/p53 para activar la apoptosis inducida por daño en la línea germinal de adultos, y se ha demostrado que *Huwe1* regulan negativamente a p53 en células de mamíferos. También, se ha evidenciado, que la E3 ligasa ubiquitina SCF-FSN-1 regula negativamente la apoptosis inducida por IR, a través CEP-1, hallazgo que fue demostrado estar conservado en humanos (111) (114). Para determinar si EEL-1 regula la actividad CEP-1, se cuantificó la abundancia de la transcripción de su gen diana pro-apoptótica, EGL-1. Después de la irradiación, los niveles de transcripción de EGL-1 aumentaron, aproximadamente, nueve veces en animales WT adultos que en mutantes *eel-1* (*ok1575*) (6), lo que sugiere que no se requiere *eel-1* para la activación de CEP-1, y es probable que modula el daño inducido por la apoptosis río abajo de la línea germinal o independiente de CEP-1 (6). Para determinar dónde *eel-1* actúa, en relación a la vía señalización de la apoptosis en el núcleo, se analizó la relación de epistasis entre *eel-1* y el gen de pro-supervivencia *ced-9*, por la construcción de una cepa doble mutante entre el alelo putativo nulo de *ced-9* (*n2812*) y la *eel-1* (*ok1575*) (6).

Como ced-9 funciona para evitar que las células entren en apoptosis, la pérdida de CED-9 provoca la muerte masiva de células germinales en hermafroditas adultos. En ausencia y presencia del daño, hermafroditas homocigotos ced-9 (n2812), a partir de madres heterocigotos, habían generado un aumento significativo en los niveles de apoptosis en células germinales en comparación con los WT, que no fue suprimido por la pérdida de eel-1 (6).

La eliminación completa de ced-9 en homocigotos mutantes, conduce a niveles similares en la apoptosis de la línea germinal en ausencia o presencia de IR (6). Por lo tanto, si la función de EEL-1 es de regular específicamente CED-9 en respuesta al daño del DNA, este efecto podría ser enmascarado cuando el gen ced-9 está completamente eliminado (6).

Para hacer frente a esta posibilidad, se tomaron dos enfoques: en primer lugar, se cuantificó la apoptosis inducida por IR en la línea germinal en una cepa heterocigoto para el alelo ced-9 (n2812), pero homocigotos para eel-1 (ok1575); segundo, se examinaron los niveles endógenos de la proteína CED-9 en eel-1. Se presenta una reducción de ced-9, en animales ced-9 (n2812)/HT2, que resulta en un aumento moderado de la apoptosis fisiológica e hipersensibilidad a IR en la línea germinal (6).

En animales mutantes ced-9 (n2812)/HT2;eel-1 (ok1575), la IR aumentó la apoptosis en la línea germinal a niveles que eran similares a los observados en heterocigotos ced-9 (n2812)/HT2, lo que sugiere que, eel-1 actúa antes o independientemente de ced-9 (6). Con estos resultados, los investigadores mostraron que Huwe-1 apunta a MCL-1 (homólogo de CED-9) para la degradación, en respuesta al daño del DNA (6), también se cuantificó el nivel de proteína CED-9 en WT y de eel-1, antes y después del daño en el DNA. No hubo diferencia significativa en los niveles de proteína CED-9 en los mutantes eel-1 (zu462) o eel-1 (ok1575), en comparación con los controles WT, después del tratamiento con IR (6), argumento necesario para afirmar que CED-9 no es diana de EEL-1 para la degradación en *C.elegans* (6).

Curiosamente, se encontraron niveles de proteína CED-9 que no cambiaron en los animales WT no irradiados en comparación con los gusanos irradiados, lo que sugiere que la estabilidad de CED-9 no cambia en respuesta al daño del DNA (6).

Sin embargo, es posible que la proteína CED-9 esté regulada por el daño en el DNA sólo en la región de paquiteno de la línea germinal, que podría no ser detectable a través del análisis (33).

Al parecer, *eel-1* funciona río abajo de *cep-1*, y no regula los niveles de la proteína CED-9. En estudios anteriores en EEL-1, indican que actúa en la especificación del destino celular, a través del factor de transcripción SKN-1, que regula la especificación del destino celular mesendodermal en el embrión temprano, y es el único sustrato propuesto por EEL-1 en *C.elegans* (114). Se ha planteado que EEL-1 y SKN-1 interactúan en el embrión temprano para regular el desarrollo, y es posible que también puedan actuar en la misma vía para regular la apoptosis en la línea germinal (6).

En otros estudios en *C.elegans*, las E3 ligasas de ubiquitina RBX-1 y RBX-2 tienen múltiples funciones relacionados con la mitosis y la progresión meiótica (21). Investigaciones, a través de mutante *knockdown*, mediante *siRNA* en RBX1, causan defectos en la primera división meiótica, la condensación cromosómica en la mitosis, y en la proliferación de células germinales, lo que indica que cumple un rol en el comportamiento de los cromosomas y control del ciclo celular (115) (116) (117). Mientras que *knockdown* de Rbx2 (R10A10.2), no causó ningún cambio significativo en los fenotipos (117).

Otros estudios en RBX-1, mediante el silenciamiento por la alimentación de gusanos con bacterias, que expresan RNA doble hebra dirigido a RBX-1 (118). Se realizaron procedimientos para localizar la proteína RAD-51 en la gónada y en el intestino de *C.elegans*, como respuesta al daño del DNA (DDR). Los resultados informan que los *Knockdown* de RBX-1 contienen un menor número de filas de células germinales en las gónadas, en comparación con el vector de control (118). Y además, sorprendentemente no se observó ningún aumento en la tinción de RAD-51 en las células germinales mitóticas (118).

Aunque la línea germinal de los gusanos RNAi de RBX-1 tenía el doble de cuerpos apoptóticos, en comparación con los vectores de control (111), el defecto celular no se correlacionó con la transactivación de EGL-1, que se requiere normalmente para la apoptosis asociada con DDR en la línea germinal (118).

Este hallazgo, sugiere que la respuesta apoptótica puede no estar relacionada con el DDR. Posteriormente, se observó una aparente reducción en la densidad de las células germinales mitóticas en las gónadas de los gusanos RNAi de RBX-1 (118). Esta información, es consistente y se confirma que el complejo SCF-RBX-1 se requiere para la progresión del ciclo celular en células germinales a través de G1 (67) (70), debido a que el silenciamiento de *rbx-1* afectaría entrada en la fase S y a su vez suprimir la replicación del DNA debido al DDR en la línea germinal mitótica de *C.elegans* (118).

6.7. Generalidades de las proteínas de respuesta al choque térmico (HSP)

Las proteínas de estrés o choque térmico (HSP), fueron descubiertas por primera vez en 1962, siendo reconocidas como un conjunto de proteínas altamente conservadas, cuya expresión es inducida por diferentes tipos de estrés (119). Cuando los organismos están expuestos a factores de estrés que desnaturalizan las proteínas, tales como el calor, la respuesta al choque térmico (HSR) se encarga de manejar el daño de las diversas proteínas que existen en las células y así restaurar la proteostasis (120).

Las proteínas de choque térmico son un gran grupo de proteínas ubicuas, sintetizadas tanto en procariontes como en eucariotes. Las proteínas HSPs son chaperonas moleculares, que confieren plegamiento apropiado a las proteínas y cumplen un rol importante en la respuesta al estrés, mediante la prevención en la acumulación de proteínas dañadas o mal plegadas en las células (121).

La respuesta al choque térmico HSR, está regulada por el factor de choque térmico 1 (HSF1). Durante condiciones basales, HSF1 existe como un monómero en el citoplasma y el núcleo, y durante condiciones de estrés se somete a una trimerización y se acumula en el núcleo, donde se une a los elementos de *heat shock*, en los promotores de genes que codifican para proteínas de choque térmico (HSP) (122).

Las chaperonas moleculares (HSP), vuelven a normalizar las proteínas mal plegadas que se acumulan durante el estrés, pero también pueden tener funciones esenciales en la síntesis de proteínas, procesamiento, y la degradación (123).

Además, en diversos estudios, se ha demostrado que la mayoría de estas proteínas tienen fuertes efectos citoprotectores, también están relacionadas con funciones en etapas específicas del desarrollo, la diferenciación y durante la oncogénesis (119), entre muchas más.

En el nemátodo de vida libre *C.elegans*, ha proporcionado conocimientos sobre la regulación de una serie de vías de respuesta al estrés, incluyendo HSR. El factor HSF-1, es homólogo en *C.elegans* de HSF1 en mamíferos, que contiene un N-terminal conservado de unión al DNA y dominios de trimerización, así como también un dominio de transactivación en el C-terminal (123).

Se ha demostrado, que se requiere el mismo mecanismo de activación para HSF1 en mamífero, incluyendo la trimerización, la hiperfosforilación y la unión al DNA, que también se requieren para la activación de HSF-1 en el gusano (124) (125).

En *C.elegans*, HSF-1 cumple una función central no sólo en la HSR, sino que también contribuye a la fisiología del organismo. El factor HSF-1 es esencial para la viabilidad del gusano, en mutantes con HSF-1 truncado en el dominio C-terminal putativo, carecen de la activación, formando gusanos defectuosos en la síntesis de chaperonas que conducen a deficiencias en la liberación de los embriones, y además reduce la prolongación de la vida (123). También, esta cepa tiene un fenotipo sensible a la temperatura relacionado con la detención en el desarrollo, dicha detención, se produce en la transición L2-L3 (123).

En varios experimentos, relacionados con HSF-1 (RNAi), se ha demostrado que el factor de choque térmico 1, está implicado en funciones no inducidas por el estrés, incluyendo procesos tales como el desarrollo, el metabolismo, longevidad (126) (127) y trastornos neurodegenerativos (128), entre otras.

Igualmente, se han encontrado antecedentes de que las HSP en *C.elegans* están asociadas al desarrollo de las larvas, prolongación de la vida, crecimiento y desarrollo normal (11), envejecimiento (12), letalidad embrionaria (129), respuesta a estímulos biológicos (13), entre otras.

Destacando en el siguiente apartado, la revisión de las funciones reguladoras de las HSP en espermatogénesis y línea germinal de *C.elegans*, las cuales están vinculadas con la formación de la gónada y la línea germinal (14) (15) (16), progresión del ciclo celular (17) (18), regulación de la meiosis (18), entre otras.

6.7.1. Funciones de las proteínas de respuesta a choque térmico (HSP) en la espermatogénesis y línea germinal de *C.elegans*

Investigaciones realizadas mediante DNA complementario, permitieron la identificación de una proteína que codifica para 707 aminoácidos con una homología significativa, con proteínas de la familia de las HSP90. La alta homología de la proteína HSP90 con proteínas en los nemátodos, incluyendo *C.elegans*, confirma que la proteína Cel-DAF-21 en *C.elegans* es ortólogo de HSP90 en mamíferos (15).

La proteína HSP90 es una chaperona molecular, que unida con varias co-chaperonas, se estabiliza y activa para regular más de 200 proteínas (16) (130). Además, se activa producto de la respuesta al choque térmico (HSR), a través de la regulación mediante HSF-1 (15). La HSP90 es una proteína esencial en muchos organismos, incluyendo *S. cerevisiae*, *C.elegans*, *D. melanogaster* y vertebrados (131) (132).

En *C.elegans*, la proteína DAF-21 (C47E8.5) es importante en el desarrollo de las gónadas y de la línea germinal (14) (15) (16).

Se realizaron estudios más detallados, con el fin de investigar el patrón de expresión espacial y temporal del gen *daf-21*, para esto se generaron construcciones transcripcionales del gen que contienen, ya sea 2.3 kb o 4.1 kb de la secuencia río arriba del gen *daf-21*. Posteriormente, se analizó la tinción con β -galactosidasa en estos gusanos, demostrando que ambos promotores conducen patrones similares de expresión génica en todas las etapas del ciclo de vida (133). Con la información obtenida y corroborando con los datos de estudios previos, se ha identificado a través de AC88, un anticuerpo monoclonal bien caracterizado para la proteína HSP-90, la identificación de la proteína DAF-21 en *C.elegans*, mediante la criofracturación de gusanos, en donde se observaron niveles muy altos de expresión de la proteína DAF-21 en la línea germinal en la gónada y embriones tempranos. (Figura 14 C y D) (133).

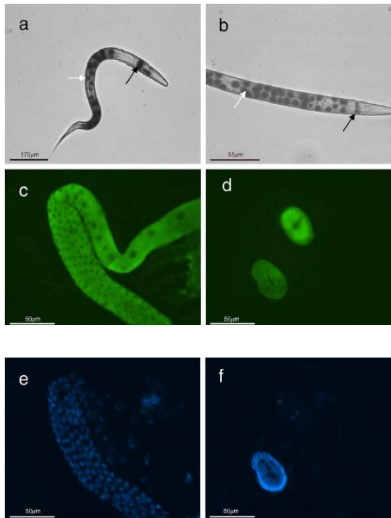


Figura. 14. El promotor de 4,1 kb de DAF-21 (Ce-daf-21) es activo durante todo el ciclo de vida de *C.elegans* mostrando que Ce-DAF-21 se expresa en la línea germinal. Gusanos WT fueron transfectadas con la construcción transcripcional de 4,1 kb de Ce-daf-21 en pPD96.04 y se tiñeron con X-Gal durante 2 horas para identificar la actividad b-galactosidasa. (A) una larva L2 ampliada 10X. (B) una larva L4 ampliada 40X. En (a) y (b), flechas blancas indican las células intestinales, flechas negras indican anillo nervioso. (c-f) hermafroditas grávidas WT de *C.elegans* se congelaron y agrietaron para teñirlas con una dilución 1: 400 de anticuerpo monoclonal AC88 seguido de Alexa 488 en una dilución 1: 200. La tinción se observó en la línea germinal (c) y embriones en desarrollo (d) gusanos WT de *C.elegans*. Las mismas muestras teñidas con DAPI se muestran en (e) y (f) (133).

Nuevos aportes de la proteína HSP90 homólogo de DAF-21 en *C.elegans*, afirman que es crítica para las formación de gónadas y además para el funcionamiento adecuado de la ovogénesis (17) (132) (133), así como el desarrollo y maduración de los ovocitos (18) (119) (133) (134). Otra información encontrada, vinculada al gen de la chaperona daf-21, cuando es silenciado mediante RNAi, los gusanos poseen fenotipos con letalidad embrionaria (Emb) y esteriles (Ste), por lo tanto, la actividad del gen daf-21 podría estar afectando funciones asociadas con la gametogénesis (14). Como también mediante otro tipo de mutación en el gen daf-21 que conduce a la detención de la células en la línea germinal específicamente entre profase/metafase (17) (18).

Dentro de la información obtenida, se presentan estudios específicos que también confirman la actividad de la proteína DAF-21 en la línea germinal, concretamente en la regulación de la meiosis en *C.elegans* (18). En el nemátodo *C.elegans*, se utiliza la proteína homóloga DAF-21/HSP90 para asegurar el funcionamiento normal de Wee (WEE-1.3), que es responsable de la detención de las células en diacinesis (135). La pérdida de la función de DAF-21 mediante RNAs interferentes pequeños (*siRNA*), condujo a una aberrante progresión del ciclo celular y ovocitos con fenotipo de endomitosis (135).

Con respecto a la relación de la proteína homóloga DAF-21/HSP90 y el funcionamiento normal de Wee (WEE-1.3), se sabe que la disminución de los niveles de WEE-1.3 en las células, bajo *knockdown* de Hsp90, sugiere que la proteína de choque térmico 90 es responsable de la estabilidad de esta proteína quinasa, y por lo tanto, para la correcta fosforilación de CDK-1 en las gónadas de los nemátodos que contribuyen a una regulación estricta de la progresión del ciclo celular (16) (133).

Se investigó el desarrollo de la línea germinal en los nemátodos, mediante un análisis amplio de perfiles fenotípicos. El efecto *knockdown* de 554 genes esenciales en la arquitectura de las gónadas, los cuales fueron analizados y clasificados para producir una red de genes que involucran el desarrollo de la línea germinal en *C.elegans* (136).

El estudio sugiere la participación de las proteínas Cdc37 y Hsp90 en Raf/LIN-45 o en la regulación de la quinasa MEK-2 durante el desarrollo de la línea germinal en nemátodos (136). En resumen, el estudio en *C.elegans*, reveló la función esencial de la proteína HSP90 en los pasos críticos del desarrollo de células germinales y la división celular (16).

Para entender las funciones celulares de Hsp90, se realizaron búsquedas de fenotipos por pérdida de función de *daf-21* mediante RNAi. Se seleccionaron los animales estériles, tratados con RNAi, denominados animales F0. Y se reportó que *daf-21* (RNAi) F0, posee fenotipo estéril, de tal manera que todos los *daf-21* (RNAi) en la F1 murieron como embriones, antes de llegar al estadio de 8 células (18).

Se confirmó este fenotipo y se buscó la base de la esterilidad. Estos animales *daf-21* (RNAi), mostraron varios defectos en la ovogénesis. En primer lugar, células madre de la línea germinal, dividiéndose mitóticamente en la región más distal, detuvieron su proliferación. En segundo lugar, los ovocitos en la región más proximal, poseían cromosomas univalentes anormales o poliploides (18).

Este fenotipo es muy similar al fenotipo llamado “emo”, que se visualiza en mutantes *emo-1* (OZ1) y *wee-1,3* (RNAi), en donde ovocitos distales tienen seis cromosomas bivalentes, y hacia el extremo proximal muestran cromosomas univalentes o aumentan su ploidía (18). Este defecto cromosómico, también se observó en la cepa mutante *daf-21* (p673) a 25°C. Por el contrario, ovocitos WT en diacinesis, normalmente tenían seis pares de cromosomas bivalentes (18).

Los investigadores analizaron fenotipos relacionados con cromosomas univalentes, y se investigó la razón de su formación en los ovocitos (18). Las posibles razones a considerar fueron tres:

En primer lugar, si no se ha producido ninguna recombinación, no se requiere la formación de quiasmas, lo que resulta en la formación de cromosomas univalentes en diacinesis. En segundo lugar, si no se forman los complejos sinaptonémicos, no hay cromosomas homólogos que se emparejen entre sí, dando lugar a cromosomas univalentes (18).

En tercer lugar, en caso de que los ovocitos anormales en diacinesis omiten la detención profase/metafase, los cromosomas tendrían pocas posibilidades para formar seis cromosomas bivalentes, y en su lugar, formar cromosomas univalentes (18).

Para distinguir entre estas posibilidades, se analizaron los animales *cdk-1* (RNAi). En *C.elegans*, *Cdc2* es homólogo de *cdk-1*, un regulador clave para el ciclo celular, y se requiere para la activación y entrada a metafase. La supresión de la formación de cromosomas univalente en animales *cdk-1* (RNAi), sugiere una activación anormal de la transición profase/metafase. Por el contrario, si no se suprime la formación de los cromosomas univalentes en animales *cdk-1* (RNAi), la transición profase/metafase, ocurriría de forma irrelevante; y su causa debe derivarse de algún evento defectuoso río arriba, en la detención de los ovocitos anormales en diacinesis (18). Todos los experimentos con RNAi contra animales *cdk-1* que se llevaron a cabo en los mutantes *rec-8* (se requiere para la recombinación), *spo-11* (necesarios para roturas de DNA doble cadena), o *syp-1* (componente de complejo sinaptonémico), dieron como resultado la formación de cromosomas univalentes (18).

Por el contrario, cromosomas univalentes que se formaron en animales *daf-21* (RNAi), fueron completamente suprimidos en animales *cdk-1* (RNAi) (18). Esto sugiere que la formación de los cromosomas univalentes en animales *daf-21* (RNAi), fue debido a la transición prematura de profase/metafase, y presumiblemente no a otras deficiencias (18).

Para que los animales *daf-21* regulen negativamente la transición profase/metafase, se requiere la función de CDK-1. Científicos, investigaron la contribución de *daf-21* a la regulación negativa de la transición profase/metafase. Se demostró, previamente, que RNAi contra *wee-1.3* también causó el fenotipo “emo”, con ovocitos que poseen cromosomas univalentes o núcleos poliploides, y un fenotipo que era similar al fenotipo “emo” visto en animales *daf-21* (RNAi), el cual fue totalmente suprimido en animales *cdk-1* (RNAi) (18).

El gen *wee-1.3*, es un (familia quinasa Wee1) ortólogo de Myt1 en *C.elegans* y en otras especies, Myt1 fosforila los residuos Thr-14 y Tyr-15 de Cdc2 y lo mantiene inactivo durante la profase. Aunque en *C.elegans* no hay evidencia directa, *wee-1.3* se considera que es la quinasa más plausible, responsable de la fosforilación inhibitoria de CDK-1 en la transición profase/metafase. Basándose en esta predicción y la similitud fenotípica observada, representada por ambos animales *wee-1.3* (RNAi) y *daf-21* (RNAi), se probó el estado de fosforilación de CDK-1, mediante el uso de dos anticuerpos: el anticuerpo anti-DP-Cdc2, que reconoce la forma fosforilada de Cdc2 y anticuerpo anti-PSTAIR, para la detección de CDK-1(18).

Ambos anticuerpos, mostraron un patrón de tinción idéntico en animales WT, se detectó la proteína en los núcleos de dos o tres ovocitos más proximales (Figura 15) (18). La fosforilación de CDK-1, fue detectada de forma específica por el anticuerpo anti-DP-Cdc2, y esta ausente en ambos, *wee-1.3* (RNAi) y *daf-21* (RNAi), mientras que CDK-1, fue detectado por el anticuerpo anti-PSTAIR, el cual estaba presente normalmente en todos los animales WT, *WEE-1.3* (RNAi), y el doble mutante *daf-21* (RNAi);*wee-1.3* (Figura 15) (18). Se tomaron en conjunto estos resultados, que indican que CDK-1 no se fosforiló en cualquiera de los animales *wee-1.3* (RNAi) o animales *daf-21* (RNAi), sugiriendo que la ausencia de fosforilación es inhibitoria sobre CDK-1, el cual podría haber causado el fenotipo “emo” en ambos animales (18).

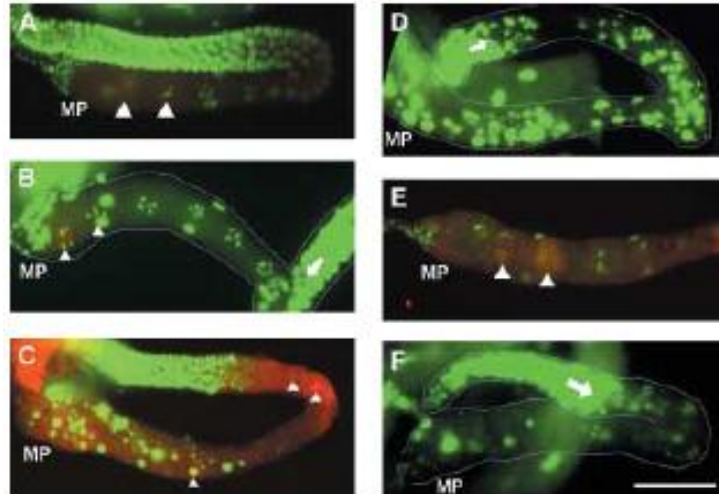


Figura. 15. La proteína CDK-1 no se fosforila, en gusanos *wee-1.3* (RNAi) o *daf-21* (RNAi). En (A, B) la gónada proximal WT. (C, D) gónada proximal *wee-1.3* (RNAi). (E, F) gónada proximal *daf-21* (RNAi). En A, C, y E, el color rojo indica CDK-1. En B, D y F, de color rojo indica la forma fosforilada de CDK-1, las formas de las gónadas se describen por líneas blancas y las flechas indican la dirección del movimiento celular y la región de paquiteno en la meiosis. En todos los paneles, el color verde indica que el ADN marcado DAPI. Considerando que CDK-1 se observó claramente en todos los animales en la mayoría de los núcleos en los ovocitos proximales (indicados por el triángulo), la forma fosforilada de CDK-1 solamente fue observada en WT (indicado por el triángulo), pero no en gusanos *wee-1,3* (RNAi) y en gusanos *daf-21* (RNAi). La mayoría de los ovocitos producidos por animales *wee-1.3* (RNAi) y *daf-21* (RNAi) poseían cromosomas univalentes o poliploides, lo que indica la transición prematura de profase/metafase (18).

La proteína *daf-21* se predice que funciona como una chaperona molecular en la maduración de otras proteínas. Los resultados indican que para los fenotipos “emo” en ambos animales, *wee-1,3* (RNAi) y *daf-21* (RNAi), fue causada por el mismo defecto, es decir, la falta de la fosforilación de CDK-1(18).

Para investigar la posibilidad de que *daf-21* podría ser una chaperona para WEE-1.3, en el momento de la inhibición de CDK-1, se realizó una inmunotinción en gusanos con anticuerpos anti-WEE-1,3. Se observó WEE-1.3 en el citoplasma, a través de las células de la línea germinal de animales WT (18).

Cuando *daf-21* (RNAi) se tiñó con este anticuerpo, se observó, una reducción evidente de WEE-1.3 (18). Los resultados, apoyan que se requieren las funciones de *daf-21* para la producción de WEE-1.3. Los investigadores, mencionaron que DAF-21 regula indirectamente la transición profase/metafase en la meiosis durante el desarrollo de los ovocitos, garantizando la función normal de WEE-1.3. Los resultados dan cuenta de una relación funcional entre la familia quinasa Wee1 y chaperona molecular Hsp90, en cualquier organismo multicelular, como se relaciona especialmente con el ciclo celular meiótico(18).

La expresión o función de *wee-1.3* en *C.elegans*, ha sido reportado en la embriogénesis, la ovogénesis y espermatogénesis. Los resultados, también sugieren que *wee-1,3* tiene una función global de bloquear el ciclo celular en varios tejidos, mediante la inhibición de la entrada en metafase (18).

Como se destacó anteriormente, DAF-21 regula la actividad de la quinasa WEE-1,3 durante la ovogénesis. Sin embargo, no se sabe las funciones en otros tejidos, como en las células de la línea germinal en machos. Un estudio muestra, que una cepa mutante con una mutación de ganancia de función en el gen *wee-1.3*, menciona una entrada defectuosa en la fase M durante la espermatogénesis. De acuerdo con los estudios de expresión de las proteínas, DAF-21 se expresa en espermatogonias y espermatocitos, pero no en los espermatozoides maduros. Incluso, es posible que DAF-21 mantenga una actividad quinasa de WEE-1.3 durante la maduración de los espermatozoides, especialmente en el momento de la entrada en la fase M en la meiosis I y II (18).

Correspondiente a otros estudios en la línea germinal de *C.elegans*, se encontraron antecedentes sobre la proteína no canónica Hop en el gusano, que ejerce funciones en algunas HSP y ha sido descrita como un cofactor en complejos de multichaperonas formados por proteínas citosólicas, como Hsp90 y Hsp70 (134).

El homólogo putativo de la cochaperona Hop en el genoma de *C.elegans*, es CeHop también identificada con la secuencia R09E12.3. Una vez establecido que Cehop, es capaz de unirse a Hsc70 o Hsp90, se experimentó con *knockdown* mediante RNAi, para mostrar la participación de cualquiera de las dos chaperonas, observando los efectos celulares en los *knockdown* de CeHop/R09E12.3. Por lo tanto, se realizaron experimentos utilizando RNAi, y construcciones que fueron dirigidas a Hsp90/daf-21 y Hsc70/HSP-1 en WT y HSF-1 (sy441) (134). Con el fin de evitar fenotipos iniciales relacionados con la detención en larvas y para permitir la detección de fenotipos durante el desarrollo de las gónadas, se realizaron *knockdown* en las etapas de desarrollo larvario L1, L2 y L3 (134).

En los cuales, no se observaron características de los fenotipos descritos para HSF-1(sy441)/R09E12.3 (RNAi) durante el *knockdown* de Hsc70, debido a que se detectó una detención temprana de larvas en L1, L2 o un fenotipo WT comenzando en el estadio larval L3 (134).

En cambio, en WT/daf-21 (RNAi), desarrollaron un fenotipo, en el cual la vulva sobresale y los gusanos están detenidos en estadios larvarios tardíos, fenotipo con limitaciones similares a HSF-1 (sy441)/R09E12.3 (RNAi) (Figura 16) (134).

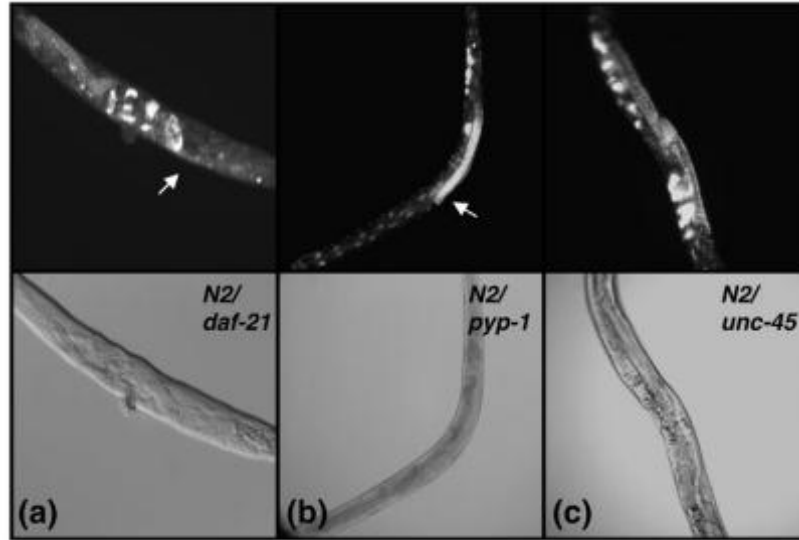


Figura 16. Knockdown de Hsp90/DAF-21 conduce a la interrupción en el desarrollo de las gónadas. Tinción con DAPI de las gónadas se realizó en los gusanos WT tratados con *daf-21* (a), *pyp-1* (b) y *unc-45* RNAi (c). Gusanos *Daf-21* (RNAi) y *pyp-1* (RNAi) dieron lugar a malformaciones en la gónada; (a; flechas) o pérdida de la localización de los brazos gonadales (b; flechas) de manera similar a HSF-1 (*sy441*)/R09E12.3 (RNAi). Aunque N2/*unc-45* (RNAi) muestra un fenotipo estéril que produjo gónadas de tamaño WT (C) (134).

Los fenotipos que se observaron además de tener una detención larval tardía, y un desarrollo vulvar sobresaliente, en la línea germinal los brazos gonadales fueron cortos, tanto en la gónada proximal como distal, y el desarrollo de ovocitos con fenotipo de endomitosis (134). Sobre la base de estos datos, se concluye que Hsp90, es la principal pareja de interacción conocida de CeHop, que está involucrada en el desarrollo adecuado de los brazos de la gónada en *C.elegans*, aunque la complejidad del proceso no permite identificar si esta participación ocurre en conjunto con CeHop (134).

Estudios relacionados con la proteína quinasa activada por AMP-5 (AMPK), es asignada como una proteína quinasa serina/treonina con múltiples sustratos, la cual tiene una expresión ubicua y es considerado un sensor de combustible intracelular. La proteína AMPK se activa cuando está fosforilada, debido al agotamiento de ATP, en relación con AMP, que se expresa por diversos tipos de estrés ambiental o metabólico, causados por condiciones tales como choque térmico, hipoxia, y el bajo nivel de glucosa (137).

La proteína AMPK, controla su efecto mediante la regulación de la transcripción de genes río abajo por fosforilación directa de factores de transcripción y coactivadores (137).

Los investigadores realizaron un transcriptoma, mediante secuenciación aleatoria completa (WTSS), para que posteriormente se identificaran genes, que se expresan diferencialmente entre mutantes AAK-2, que codifica una subunidad catalítica de proteína AMPK y WT en *C.elegans*, en presencia o ausencia de estrés oxidativo inducido por un herbicida, *paraquat* (Dicloruro de 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridilo) (13).

De los resultados conseguidos, se obtuvieron genes implicados en la respuesta al estrés, el envejecimiento y la línea germinal, y otras funciones, que están sobrerreguladas en mutantes débiles de AAK-2, comparados con WT, y que posteriormente, fueron analizados por el programa estadístico, *GOstat*. Del amplio grupo de genes, Hsp-6 es el único gen que tiene relación con la espermatogénesis y línea germinal de *C.elegans* (13), debido a que las funciones de hsp-6 se asocian con la reproducción sexual y la formación de gametos. Esto ocurre debido a que AMPK, mediante la subunidad catalítica AAK-2 puede regular una diversidad de genes relacionados con la reproducción y la proliferación de la línea germinal entre los cuales se encuentra Hsp-6 (13).

Siguiendo con el estudio de las HSP en la línea germinal en *C.elegans*. Un grupo de investigadores encontraron que las proteínas VBH-1 (helicasa tipo belle y vasa 1) y LAF-1 (femeinización y letalidad 1) se relacionan con proteínas de choque térmico en la línea germinal de *C.elegans*. La proteína VBH-1, es un miembro de la amplia familia conservada de las RNA helicasas con caja DEAD, que regulan casi todos las fases del metabolismo del RNA (138). En *C.elegans*, VBH-1 es una proteína que se enriquece en la línea germinal, es importante para la espermatogénesis, fertilidad y el desarrollo embrionario (139).

Específicamente, VBH-1 promueve el interruptor de espermatozoides a ovocitos en *C.elegans* y también podría ser importante en la apoptosis durante la ovogénesis y se expresa bajo condiciones de estrés (139) (140) (141).

La proteína LAF-1, parálogo de VBH-1, se expresa de forma ubícua en *C.elegans* (142). Esta proteína cumple una función en el desarrollo embrionario, y junto con VBH-1, la proteína LAF-1 promueve la espermatogénesis (142).

Se conoce que VBH-1 se expresa en focos citoplasmáticos y gránulos germinales perinucleares denominadas gránulos-P en las células germinales, y además se encuentra de forma difusa por todo el citoplasma de todas las blastómeras (139). Mediante un transgénico con GFP, se mostró la misma expresión como en el endógeno de VBH-1 en células germinales y embriones (comparación de la figura 17 A y C con figuras 18 B y E) (143), sugiriendo que la expresión de VBH-1 en el transgénico fue similar a la endógena (143).

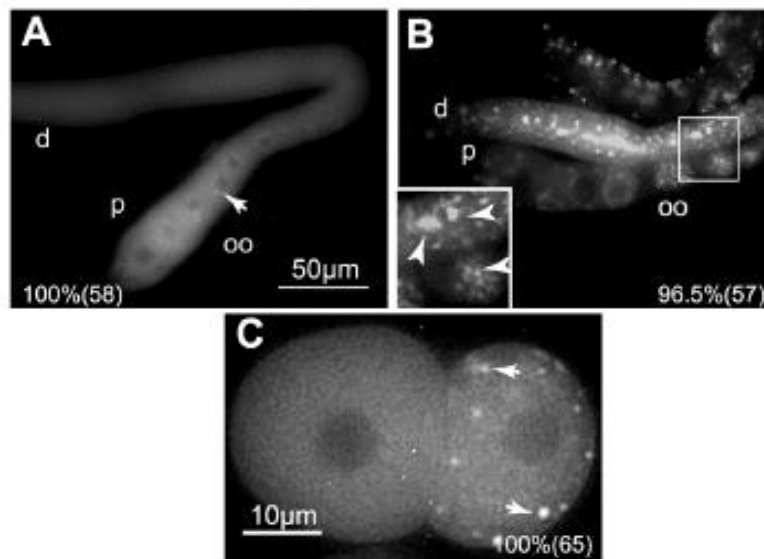


Figura 17. Un transgénico GFP::VBH-1 se expresa en las gónadas de *C.elegans*. Gusanos control (20°C) y con choque térmico (30°C durante 4 horas) expresan el transgénico Pvbh-1::GFP::VBH-1::VBH-1 3' UTR. La localización de GFP::VBH-1 en (A) gónadas de los gusanos control, (B) gónadas después del choque térmico, (C) los embriones de 2 células de los gusanos control (134).

Dado que VBH-1 es importante durante la respuesta al estrés, se identificaron dianas putativas, mediante un análisis de *microarrays* en las transcripciones de VBH-1 (RNAi) en adultos de un día de edad y se compararon con los animales control de la misma edad a 20°C. Se encontraron dos RNAm de proteína de choque térmico, como sip-1 y HSP-1, que estaban disminuidos en este análisis. La proteína SIP-1 es un miembro de la familia *alpha-crystallin/Hsp20*, mientras la proteína HSP-1 es un miembro de la familia Hsp70 (143).

Mediante análisis de cuantificación, se confirmó que los RNAm de sip-1, y en menor medida los RNAm de hsp-1, se regularon a la baja en animales vbh-1 (RNAi) comparados con los controles (143).

En la proteína LAF-1 que también es importante durante el estrés, se observó una reducción en la abundancia del RNAm de hsp-1 y, en menor medida, los RNAm de SIP-1 en animales LAF-1 (RNAi) (143). Condición que también se observó en los RNAm de SIP-1 y HSP-1 regulados a la baja en animales dobles mutantes VBH-1 (RNAi);LAF-1(RNAi) (143).

Los investigadores llegaron a la conclusión de que VBH-1 y LAF-1 regulan la acumulación de RNAm de SIP-1 y HSP-1. Sin embargo, VBH-1 podría ser más importante para la regulación de RNAm de SIP-1, mientras que LAF-1 podría ser más importante para la acumulación de RNAm de hsp-1(143).

Para determinar si HSP-1 y SIP-1 son importantes para la supervivencia producto del choque térmico, se utilizó RNAi para silenciar los genes que codifican estas proteínas y se evaluó la supervivencia de estos animales a 36°C (143). De manera similar que en los animales VBH-1(RNAi), los animales SIP-1(RNAi) fueron incubados a 36°C, los cuales son más sensibles a la supervivencia producto del choque térmico que los animales control (143). Por el contrario, no se observaron diferencias, estadísticamente significativas, en los animales hsp-1 (RNAi) (143).

De los resultados se rescata que SIP-1 es importante para la supervivencia al choque térmico, mientras que HSP-1 parece no ser esencial. También, es posible que hsp-1 sea importante para la respuesta de choque térmico, pero debido a la utilización del silenciamiento por RNAi, en lugar de un mutante nulo, donde no se detecta la función (143).

Debido a que la expresión de VBH-1 es más alta en la línea germinal, se analizó la localización subcelular de VBH-1 en la gónada durante el choque térmico. Por lo tanto, se sometieron a choque térmico durante 4 horas a 30°C gusanos adultos WT de un día de edad (143). Se utilizó una condición más leve de choque térmico, en lugar de las condiciones utilizadas en el ensayo de supervivencia (36°C), porque la línea germinal y embriones son sensibles al choque térmico (143).

La ubicación de VBH-1 después del choque térmico se observó en la gónada distal y en la gónada proximal que se muestran en detalle en las figuras 18 A, H, O, V, C', J', y R' (143).

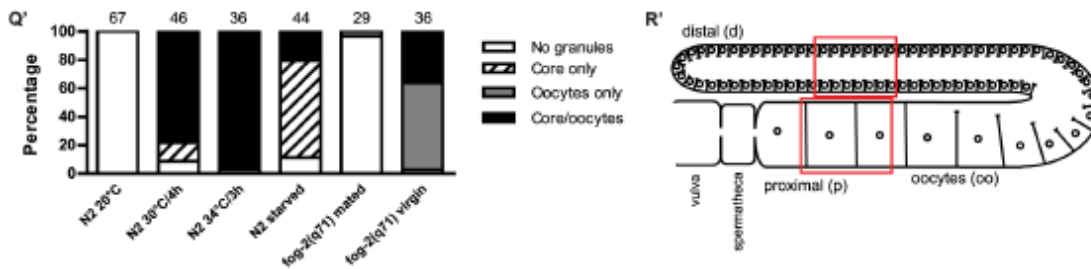
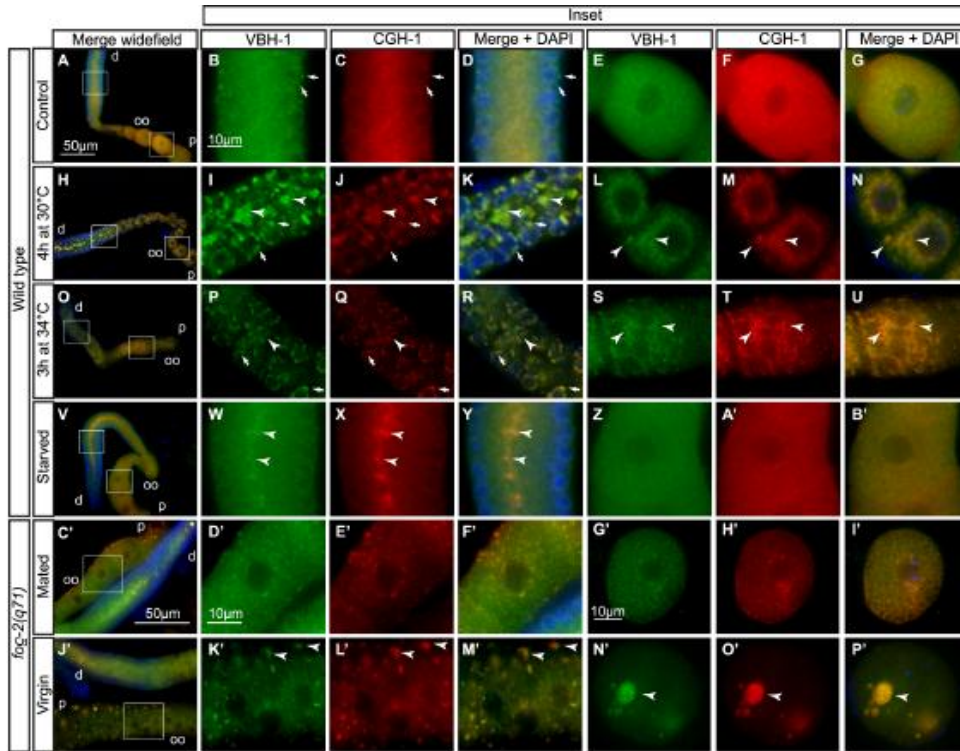


Figura 18. VBH-1 se asocia con grandes focos de CGH-1 en la gónada después de estrés. Las gónadas de gusanos WT y de hermafroditas fog-2(q71) fueron teñidas con anticuerpos anti-VBH-1 y anti-CGH-1 y DAPI que marca el ADN. Gusanos con gónadas WT (A-G) crecido a 20°C, (H-N) gusanos con gónadas WT con choque térmico durante 4 horas a 30°C, (O-U) gusanos con gónadas WT con choque térmico durante 3 horas a 34°C, (V-B') los gusanos WT se colocaron en placas de NGM sin bacterias por 5 horas, (C'-F') hermafroditas feminizadas fog-2(q71) que fueron apareadas, y (J'-M') gusanos sin cruzar fog-2(q71). En (G' I') ovocitos de hermafroditas fog-2(q71) que se cruzaron y (N'-P') gusanos sin cruzar fog-2(q71). d = distal, p = proximal, oo = ovocitos, las flechas indican gránulos-P, y las puntas de flecha indican la formación de focos después de cada exposición al estrés. (Q') gráfico agrupado, que resume los fenotipos observados. (R'). Dibujos de las gónadas de *C. elegans*, con cuadrados rojos indican las regiones de interés (134).

A 20°C, se observó a VBH-1 en gránulos-P y focos citoplasmáticos, y se expresó de forma difusa por todo el citoplasma de las células germinales (Figura 18 A, B y E) (143). Después del choque térmico, VBH-1 era visible en forma de agregados en el núcleo de las gónadas y ovocitos (Figura 18 H, I, L puntas de flecha y Q), y en grandes gránulos-P en la gónada de *C.elegans* (Figura 18 H, I, K flechas y Q) (143).

Un patrón de agregación similar, se observó también para GFP::VBH-1 durante el choque térmico (Figura 17 B) (143). Con esta información se confirma que VBH-1, también se expresa durante la embriogénesis de forma difusa en el citoplasma, en todas las blastómeras y en los gránulos-P de las blastómeras de la línea germinal, en el transcurso de la embriogénesis (139).

Los resultados entregan la función de la proteína VBH-1 caja DEAD, durante el estrés, donde se destaca la importancia para supervivencia en *C.elegans*, durante el choque de calor y el estrés oxidativo (143). Además, los resultados sugieren una potencial expresión somática de VBH-1, que podría ser al menos parcialmente responsable de la supervivencia al estrés. Igualmente, se encontró que RNAm de SIP-1 y RNAm de HSP-1, que codifican dos proteínas de choque térmico, que se regulan a la baja en los animales VBH-1 (RNAi), lo que sugiere que estas proteínas podrían ser controladas, ya sea directa o indirectamente, a través de VBH-1(RNAi) (143). Por otra parte, se observó que LAF-1, es importante para la supervivencia durante el estrés, y RNAm de HSP-1 y SIP1 también se regulan a la baja en los animales LAF-1 (RNAi) (143). De la misma manera, se observaron agregados de VBH-1 en embriones tempranos, en núcleos de las gónadas, en ovocitos y grandes gránulos-P en animales con choque térmico. Asimismo, se advirtió que los dominios de helicasa en el núcleo y C-terminales de VBH-1, son suficientes para la asociación con gránulos-P, mientras que la agregación de VBH-1 durante el estrés, no depende de un motivo específico. Aunque los dominios N-terminal y helicasa parecen ser más importantes para esta localización (143). Los estudios demostraron que el silenciamiento de VBH-1, tuvo un efecto negativo en la supervivencia de los animales durante estrés térmico y oxidativo (143).

En resumen, los resultados sugieren que, 1) el RNAm de las proteínas de choque térmico SIP-1 y HSP-1, son candidatos para la regulación de VBH-1 durante la respuesta al estrés, debido a que RNAm de sip-1 y, en menor medida, RNAm hsp-1 se regulan a la baja, cuando vbh-1 fue silenciada utilizando RNAi, y 2) el silenciamiento de sip-1 afecta negativamente la supervivencia en animales con choque térmico, de una manera similar a los animales VBH-1 (RNAi) (143).

Conjuntamente, los animales hsp-1 (RNAi) no fueron más sensibles al choque térmico que los animales control, lo que sugiere que no se requiere hsp-1 para una respuesta apropiada a ese estrés, pero también es probable que hsp-1 (RNAi) no sea suficiente para anular completamente la función de esta proteína durante el estrés. VBH-1 también es importante en la inducción de la apoptosis en las células germinales, tanto en condiciones normales y de estrés (141), lo que sugiere que esta proteína podría tener varios objetivos durante la respuesta al estrés en *C.elegans*, para asegurar la supervivencia de los animales, mantener la calidad del ovocito, y preservar las células de la línea germinal (143).

En síntesis, la proteína VBH-1 se enriquece en la línea germinal, es importante para la fertilidad, el desarrollo embrionario, tiene funciones en la apoptosis en las células germinales, y en conjunto con LAF-1 promueven espermatogénesis. Además ambas proteínas, VBH-1 y LAF-1, en respuesta al estrés podrían estar reguladas por proteínas de choque térmico SIP-1 y HSP-1 respectivamente, por lo tanto, faltaría esclarecer la función precisa entre las proteínas VBH-1 y LAF-1 con las HSP en los procesos que conlleva el desarrollo de la gametogénesis, específicamente en la espermatogénesis en *C.elegans*.

Se encontraron antecedentes que demuestran que los promotores de las HSP son activos en la germinal de *C.elegans* mediante unos elementos nucleares codificados en *C.elegans*, que da muerte a animales no portadores (144). Este elemento se conoce como peel-1/zeel-1, que es polimórfico dentro de la especie, y cuando los animales que llevan los elementos peel-1/zeel-1 que se cruzan con los animales que carecen de ella, los elementos peel-1-/zeel-1 actúan en el heterocigoto de la F1, a través del efecto paterno, y dan muerte a embriones que no lo heredan en la F2 o retrocruzamiento (33).

Para determinar si PEEL-1 puede funcionar como una toxina fuera de los embriones, expresamos peel-1 ectópica en larvas y adultos. Pee-1 se expresó utilizando dos promotores de choque térmico, pHSP-16.2 y pHSP-16.41. Para cada construcción, se generaron dos inserciones genómicas de una sola copia y arreglos extra cromosómicos, que normalmente contienen de decenas a cientos de copias de un transgénico (33).

Ambos tipos de animales, crecieron normalmente en condiciones de laboratorio estándar, pero 1 hora de choque térmico a 34°C fue letal para todos los gusanos adultos mueran dentro de 2 horas después del inicio del choque térmico, y los animales que transportan la inserción, dentro de 4,5 horas (33). La muerte más rápida de los animales que transportan el arreglo, es consistente con las dosis altas observadas de peel-1, y los resultados fueron similares para larvas que fueron expuestas a choque térmico. Además, aparte del fenotipo de muerte, los animales con choque térmico mostraron defectos en la mayoría, pero no todos los tejidos (33).

A partir de, aproximadamente, 30 a 45 minutos antes de la muerte, los músculos de la pared del cuerpo y de la cola masculina, se encontraron hipercontraídos; vacuolas formadas en muchos tejidos (Figura 19 A); el lumen de la célula excretora (Figura 19 B), distendido; la gónada desintegrada (Figura 19 C) ; y en hermafroditas, la gónada y el intestino, de vez en cuando se rompe a través de la vulva (33). Los investigadores concluyeron que PEEL-1 es una toxina casi universal, que afecta a muchos estados del desarrollo y tipos de células (33).

Posteriormente, se probó si la expresión de zeel-1, podría rescatar la letalidad causada por la expresión de peel-1 después del choque térmico (33). Para ello, los investigadores confeccionaron cinco arreglos extracromosómicos y una inserción de una sola copia de pHSP-16.41::zeel-1, y se probaron contra un arreglo y una inserción de pHSP-16.41::peel-1. La expresión de zeel-1, después del choque térmico, fue capaz de rescatar la letalidad causada por pHSP-16.41::peel-1, pero sólo cuando pHSP-16.41::peel-1 se expresa a partir de inserciones, no arreglos (33).

La capacidad de pHSP-16.41::zeel-1 para rescatar pHSP-16.41::peel-1, incluso cuando ambos se expresaron a partir de inserciones de una sola copia (33), indica que en la medida en que estos dos transgénicos producen niveles equivalentes de proteína, el rescate mediante zeel-1 no requiere niveles superiores de ZEEL-1, comparados con los niveles de PEEL-1(33).

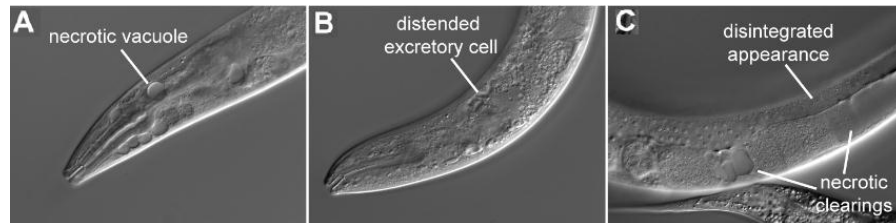


Figura 19. Expresión ectópica de peel-1 y Zeel -1. Se muestran hermafroditas adultos con choque térmico que llevan una inserción de pHSP-16.41::peel-1. Los animales fueron fotografiados poco después de comenzar su parálisis. La necrosis es visible en la cabeza (A) en las gónadas (B), y la célula excretora distendida (C) (144).

Se ha demostrado, que los elementos peel-1/zeel-1 en *C.elegans* se compone de dos genes, estrechamente relacionados: toxina peel-1, entregada por los espermatozoides y zeel-1, expresado en el embrión. Peel-1 y zeel-1, se encuentran uno junto al otro en el genoma, y ambos genes codifican proteínas de transmembrana. Peel-1 se expresa en la línea germinal masculina, y su producto se entrega al embrión por medio de los organelo membranoso-cuerpo fibroso (FB-MO). En ausencia de zeel-1, los espermatozoides producen suministros de PEEL-1 dependientes de la dosis, y de forma tardía se producen defectos en el músculo y tejido epidérmico (33). Zeel-1 se expresa de forma transitoria en el embrión, y la expresión específica de zeel-1 produce rescate del determinado tejido. Se requiere que el dominio transmembranal de zeel-1, para la función, y al igual que en peel-1, este dominio es evolutivamente novedoso y sólo se produce en *C.elegans* (33).

Por último, a pesar de que las funciones de PEEL-1 y ZEEL-1 normalmente son en los embriones, peel-1 es letal cuando se expresa de forma ectópica en los gusanos adultos, y esta letalidad es rescatado por la expresión ectópica de Zeel-1 utilizando promotores para HSP, como el pHSP-16.41(33).

En relación a los promotores de proteínas de respuesta al choque térmico, investigadores realizaron estudios utilizando fusiones del promotor hsp-16.2, sugiriendo que hsp-16.2 es un promotor activo en la línea germinal para generar fenotipos que no han sido caracterizados (145).

Para probar la actividad de promotores de choque térmico en la línea germinal, se realizaron constructos con inserciones de copia única que contienen el promotor hsp-16.2 o hsp-16.41 y tbb-2 3'UTR, como regulador de la expresión con GFP etiquetado con his-58 y la integración empleando *MosSCI* (145).

Se generaron cinco cepas que difieren en el promotor, secuencias de etiquetado y su ubicación y el sitio de integración (Figura 20 A) (146). Todos los transgénicos se expresaron en la línea somática, la línea germinal y embriones después de choque térmico. La expresión en la línea somática fue mucho más fuerte que en la línea germinal, y observando en esta última una variación en la intensidad de la expresión (147).

Además, la señal a partir de construcciones realizadas con EGFP fusionada a pHSP-16.41 (cepas JA1533 y JA1541) era más débil que la señal a partir de construcciones con GFP. No se sabe la causa de esta diferencia, pero otros grupos de investigación han informado que la GFP S65C tiene un mejor rendimiento en *C.elegans* que EGFP F64LS65T. Se examinó el momento de aparición de la expresión del transgénico, utilizando el promotor de hsp-16.41 en la cepa EG5295 (147).

Mediante el sometimiento de adultos hermafroditas a un choque térmico de una hora a 33°C, seguido de una recuperación a 20°C, se observaron los animales y su progenie, en intervalos de una hora. Inmediatamente después del choque térmico, el inicio de la fluorescencia de GFP, sólo era visible en la línea somática (147).

Después de una hora de recuperación, una débil señal de GFP, localizada en el núcleo, se podía ver en las células germinales proximal cerca de la región del bucle (Figura 20 C) (134). Además, la señal de GFP fue visible en ovocitos después de dos horas, y luego en embriones, después de cuatro horas (Figura 20 D y E) (134).

La intensidad de la señal, también se hizo más fuerte entre una y tres horas después de la recuperación (Figura 20) (134). Después de seis horas, la señal en la gónada comenzó a disminuir (Figura 20 B) (134). Estos resultados fueron similares a los observados utilizando el promotor HSP-16.2 (147).

En resumen, la expresión del promotor para HSP, HSP-16.1 y HSP-16.2 son activos en la línea germinal que constituyen la gónada en *C.elegans*.

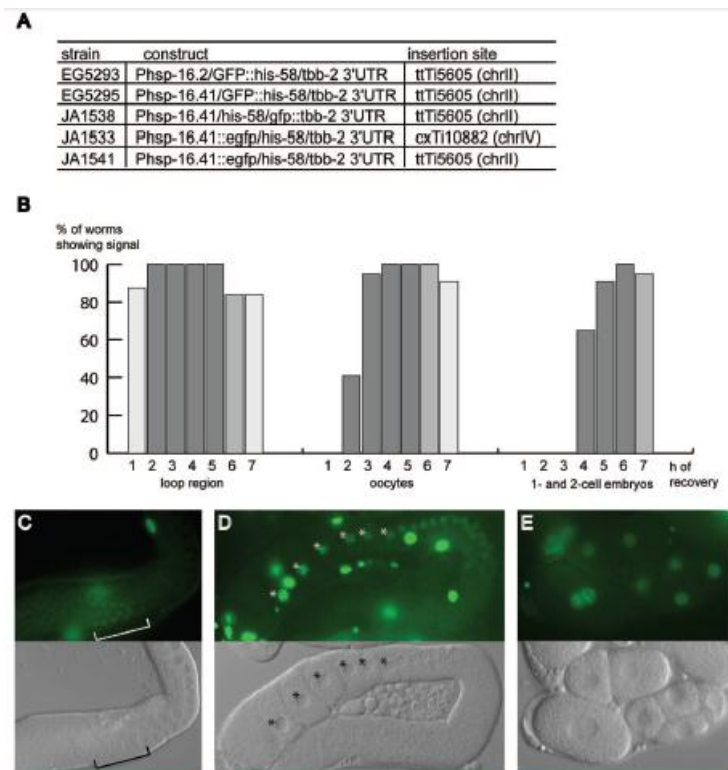


Figura 20. Actividad de los promotores de choque térmico en la línea germinal de *C.elegans*. (A) Cepas MosSCI generadas para los experimentos de choque térmico. (B) Análisis en el transcurso del tiempo de pHSP-16.41/GFP::his-58/TBB-2 3'UTR (cepa EG5295). Los diferentes tonos en gris indican una cuantificación aproximada de los niveles promedio de la intensidad de las señales observadas después del choque térmico. Los tonos más oscuros indican una señal más fuerte. Los embriones fueron evaluados a partir de 3 horas de recuperación. (C) GFP-HIS-58 fue observada cerca de la región del bucle de la gónada en 1 hora después de la recuperación del choque térmico. (D) Núcleos de ovocitos a las 4 horas después de choque térmico. (E) Núcleos de embriones a 4,5 horas después de choque térmico (147).

6.7.2. Funciones de las proteínas de respuesta a choque térmico (HSP) en mamíferos

La información encontrada sobre las funciones de las HSPs y el factor de choque térmico en mamíferos se relaciona con actividades vinculadas con la regulación en la formación de gametos en ratones, por ejemplo investigadores proponen que HSF1 promueve la apoptosis de los espermatozoides en testículo de ratón cuando son expuestos a temperaturas elevadas (148).

Las HSPs y su factor de transcripción también tienen funciones claves en la formación de gametos en hembras de ratón. Específicamente en la maduración de los ovocitos, estos contienen un huso bipolar normal, y en la mayoría de los ovocitos con HSF1 deficientes, mostraron una amplia gama de estructuras microtubulares anormales (135).

Evidencias demuestran claramente que la actividad de Hsp90 dependiente de HSF1 se requiere para la meiosis de los ovocitos de ratón, argumento que se respalda debido a que el déficit significativo en la proteína Hsp90, conduce a defectos en el desarrollo de ovocitos que se visualizan en mutantes *Hsf1*^{-/-}, identificando a HSF1 como un factor meiótico y como uno de los pocos elementos maternos necesarios para el éxito reproductivo en hembras de mamíferos (135).

En otro contexto, en mamíferos también la inducción de las HSPs mediada por HSF1, se correlaciona con la adquisición de tolerancia a la temperatura y la protección celular bajo condiciones patológicas, tales como trastornos neurodegenerativos (149).

En este mismo contexto, el factor de respuesta al choque térmico, HSF2, cumple funciones en el desarrollo del cerebro y los órganos reproductores. Además, la pérdida de función de HSF2, aumenta la acumulación de agregados proteicos por poliglutaminas, acortando la vida en ratones R6/2 con la enfermedad de Huntington(150).

Otras publicaciones relacionadas con las HSPs en mamífero, nos dice que el incremento de los niveles de las HSP se asocia a enfermedades, como el cáncer humano (151)(152). En modelos experimentales, se ha demostrado el incremento de HSP27 y HSP70 en células cancerosas y tumores, y su agotamiento puede inducir una regresión espontánea de los mismos (119).

Además, varios componentes del crecimiento y la supervivencia de las vías asociadas a células tumorales, son relacionados con proteínas cliente de HSP90. Esta característica de HSP90, han hecho que las HSP sean dianas para el desarrollo de medicamentos contra el cáncer (119).

En otro estudio relaciona a las HSP con la apoptosis, un grupo de investigadores demostraron que la regulación a la baja o la inhibición de HSP27, HSP70 o HSP90, son suficientes para sensibilizar células a la apoptosis, lo que demuestra que los niveles endógenos de las chaperonas parecen ser suficientemente altos para controlar la muerte celular (153). Estas chaperonas, pueden interactuar con las proteínas claves de las vías de señalización de apoptosis y así regular el proceso (119).

Para finalizar, se encontraron antecedentes que vinculan a las HSP con el músculo estriado en mamíferos, mediante estudios en la chaperona miosina UNC-45 en ratones y humanos. La proteína UNC-45 fue identificada por análisis computacional y aislamiento de genes, que se utilizaron posteriormente para definir patrones de expresión en mamíferos. Ambos organismos tienen dos genes *unc-45*, que son expresados, ya sea en los músculos estriados (SM UNC-45, también conocido como UNC-45b) o en otros tipos de células (CG UNC-45 o UNC-45a). Tratamientos RNA antisentido, mostraron que UNC-45a es importante para la proliferación y fusión celular, mientras que UNC-45b es esencial para la fusión y el desarrollo de las miofibrillas, pero no para la acumulación de miosina (22). Por lo tanto, la HSP UNC-45 cumple funciones en la proliferación, fusión y desarrollo de las miofibrillas en el músculo en mamíferos.

En resumen las HSP en mamífero se asocia con funciones relacionadas con la apoptosis de espermátocitos y en la formación de meiosis en ovogénesis, también están vinculadas a enfermedades neurodegenerativas, desarrollo muscular y cáncer humano entre otras.

6.8. Funciones en conjunto de las E3 ligasas de ubiquitina y las proteínas de respuesta al choque térmico (HSP) en espermatogénesis y línea germinal de *C.elegans*.

Según el sistema control de calidad celular, se describe que el debilitamiento en la síntesis de una chaperona afectaría la actividad o la expresión de otra. Utilizando el modelo de *C.elegans*, un grupo de investigadores describió la regulación compensatoria entre nueve chaperonas en el ER, incluyendo a la chaperona de unión a inmunoglobulina, BiP y la chaperona asociada al retículo endoplasmático, GRP94 (154).

La relación entre ambas HSP, ocurre con la inducción de BiP, cuando GRP94 es silenciado por RNAi, involucrando al factor de transcripción IRE1/XBP1, para promover la vía de respuesta a proteínas desplegadas (UPR), asociada con el ER (154).

La chaperona BiP también se estimula, cuando en el gusano la E3 ligasa de ubiquitina HRD-1 se agota, a través de RNAi, produciendo un crecimiento extremadamente retrasado en *C.elegans* (19), cuando están vinculados con interacciones físicas, entre las proteínas del lumen y las dianas de la maquinaria de degradación de proteínas en el retículo endoplásmico (ERAD) (155) (156).

Un estudio relacionado con las E3 ligasas de ubiquitina y las HSP en *C.elegans*, demuestran que la E3 ligasa HRD-1, funciona en conjunto con una proteína de unión específica, la chaperona BiP, que en *C.elegans* es codificada con dos genes, con una alta homología hsp-3 y hsp-4 (19).

La proteína E3 ligasa HRD-1 que interacciona con la chaperona BiP, codificada por el gen HSP-3, cumple un rol importante en el funcionamiento de las células intestinales, mientras que HRD-1 y BiP (HSP-4) lo hace en la formación de las gónadas en *C.elegans*, información que fue identificada mediante gusanos doble mutante hrd-1 (tm1743); hsp-4 (gk514) que muestra un fenotipo estéril (20/20 gusanos analizados), causado defectos en el desarrollo y formación de gónadas. (Figura 21) (19).

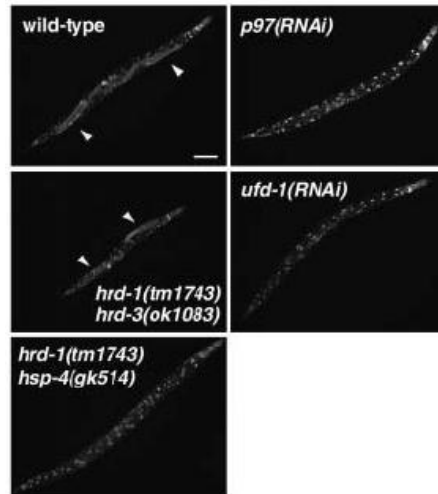


Figura 21. Evidencia de interacción genética entre HRD-1 y BiP. Los gusanos mutantes fueron fijados y teñidos con DAPI. Las puntas de flecha representa la gónada. Barra de escala: 0.1 mm en todas las imágenes (19).

Estos resultados también indican que la E3 ligasa, HRD-1 y la HSP, BiP tienen una interacción genética, y que HRD-1 y BiP (HSP-4) cumple una función importante en la formación de gónadas (19).

Se encontraron estudios relacionados en E3 ligasas, fusionada a un promotor hsp-16p específico de proteínas de choque térmico, dicha construcción está involucrada en funciones asociadas con la gametogénesis y en la línea germinal de *C.elegans*. La proteína determinada es RNF-121, una E3 ligasa de ubiquitina unida al ER, que se requiere para la resistencia al estrés en el ER y que su inactivación induce a la vía UPR (102).

La proteína RNF-121, mediante un promotor inducible por calor se localiza en etapas específicas del desarrollo. Los resultados destacan defectos en el desarrollo normal, sólo cuando RNF-121 es inducida en una etapa específica del desarrollo, a mediados de L2, lo que resulta en una disminución de la fertilidad en los hermafroditas (102).

Los resultados en detalle, explican que el número promedio de descendientes de la construcción, hsp-16p::RNF-121, fue de 55 ± 18 ($n = 65$), en comparación con 254 ± 28 ($n = 60$) en los gusanos WT, tratados con las mismas condiciones de choque térmico, en la fase intermedia de L2 (102).

Para caracterizar este fenotipo de esterilidad parcial, se analizó la morfología de las gónadas, el desarrollo de los ovocitos, la maduración y la ovulación en gusanos adultos jóvenes (102).

Las características fenotípicas después de la inducción de RNF-121, en la etapa mitad de L2 observadas en etapa adulto, mostraron brazos gonadales con una gametogénesis defectuosa, que dio lugar a gónadas proximales con un pequeño número de ovocitos, 3.6 ± 1.5 ovocitos por cada brazo gonadal ($n = 61$) (Figura 22 C-H) (211), tanto en adultos en etapa intermedia como tardía, en comparación con los 9.6 ± 1.5 ovocitos en etapa intermedia de adultos WT ($n = 49$) y 9.2 ± 1.3 en la etapa intermedia en adultos con la expresión inactiva de la ligasa RNF-121 mutada (HSP-16::RNF-121^{C222AC225A}; $n = 67$) (211). En concreto, los análisis revelaron retrasos en el desarrollo de los ovocitos en las gónadas proximales (Figuras 22 C-E, comparadas con Figura 22 A y B) (102).

Análisis mediante DIC y DAPI revelaron el funcionamiento correcto de las gónadas WT, que explican la progresión de los núcleos de paquiteno a diploteno en la región del bucle, mientras que en el brazo gonadal proximal, los ovocitos progresan hacia diacinesis (102).

Por el contrario, los resultados encontrados en los núcleos en paquiteno de las gónadas proximales con la construcción hsp-16p::RNF-121, después de la región del bucle, indican un notorio retraso en la progresión en diploteno ($72.6 \pm 4.5\%$, $n=256$) (Figura 22 E, punta de flecha) (102).

Además, los ovocitos en desarrollo y, especialmente, el ovocito más proximal, tenían formas alargadas anormales (Figura 22 C, D y F, esquema en blanco) (102), y no rectangulares como los ovocitos WT antes de la maduración (Figura 22 A) (102).

Otro resultado, informa que las tasas de maduración meiótica, fueron más lentas (0.85 ± 0.23 maduraciones/brazo gonadal/horas; $n= 27$) en relación con las tasas de maduración en hermafroditas WT, que fueron tratados con las mismas condiciones de choque térmico (2.65 ± 0.50 maduraciones/brazo gonadal/horas; $n=16$). La señalización anormal desde los espermatozoides a los ovocitos o a las células de la vaina que rodean el ovocito, podrían contribuir a un fenotipo de maduración inferior (102).

Asimismo, debido a que los espermatozoides con la construcción HSP-16::RNF-121 en adultos, parecen anormales e hinchados (Figura 22 F) (102), se investigó si el cruzamiento con machos WT podría rescatar el fenotipo de esterilidad parcial. De hecho, los espermatozoides WT rescatan parcialmente la esterilidad, y el número de la progenie aumentó considerablemente (118 ± 37 , $n = 31$) (102).

Además de las anomalías en el desarrollo de los ovocitos y la maduración, después de la inducción con RNF-121, también se observaron defectos en la migración de las gónadas, formando giros adicionales y rutas de migración anormales, como por ejemplo una migración de 45° hacia el lado dorsal, seguida de una migración inversa para el lado ventral y una migración repetida hacia el lado dorsal (Figura 22 G) (102), o una migración inversa en el lado ventral, hasta el punto medio del cuerpo del gusano (Figura 22 H) (102).

Estos fenotipos, dependen de la expresión de un dominio RING finger intacto en RNF-121 y podrían ser detectados en menor porcentaje, sin tratamiento de choque térmico, lo que sugiere que los bajos niveles de la proteína expresada en el WT, a través de la actividad basal del promotor de choque térmico son efectivos, en contraste con los mutantes RING (Figura 22 I) (102).

Para determinar la relación funcional entre la actividad de la E3 ligasa RNF-121 y la vía ERAD, se estimuló RNF-121 después de la depleción del componente de retrotranslocación putativo der-1 (102). El agotamiento del gen putativo der-1 en WT de fondo, no tenía efecto sobre el desarrollo de las gónadas (Figura 22 I) (102). Sin embargo, el análisis del gen putativo der-1 (RNAi) en gónadas de hermafroditas adultos, después de la inducción de RNF-121 suprime el efecto de la actividad de la E3 ligasa y presenta un fenotipo de baja penetración en las gónadas (Figura 22 I) (102), lo que sugiere el requerimiento de la actividad de RNF-121 y Derlin-1 por el funcionamiento en la vía ERAD (102).

Los científicos concluyeron, que la expresión ectópica de RNF-121, a principios de las etapas del desarrollo de las gónadas y en la línea germinal, alteran su desarrollo, y que esta actividad depende de DER-1, probablemente, contribuyendo a la retrotranslocación activa de sustratos, desde el RE al citosol (102).

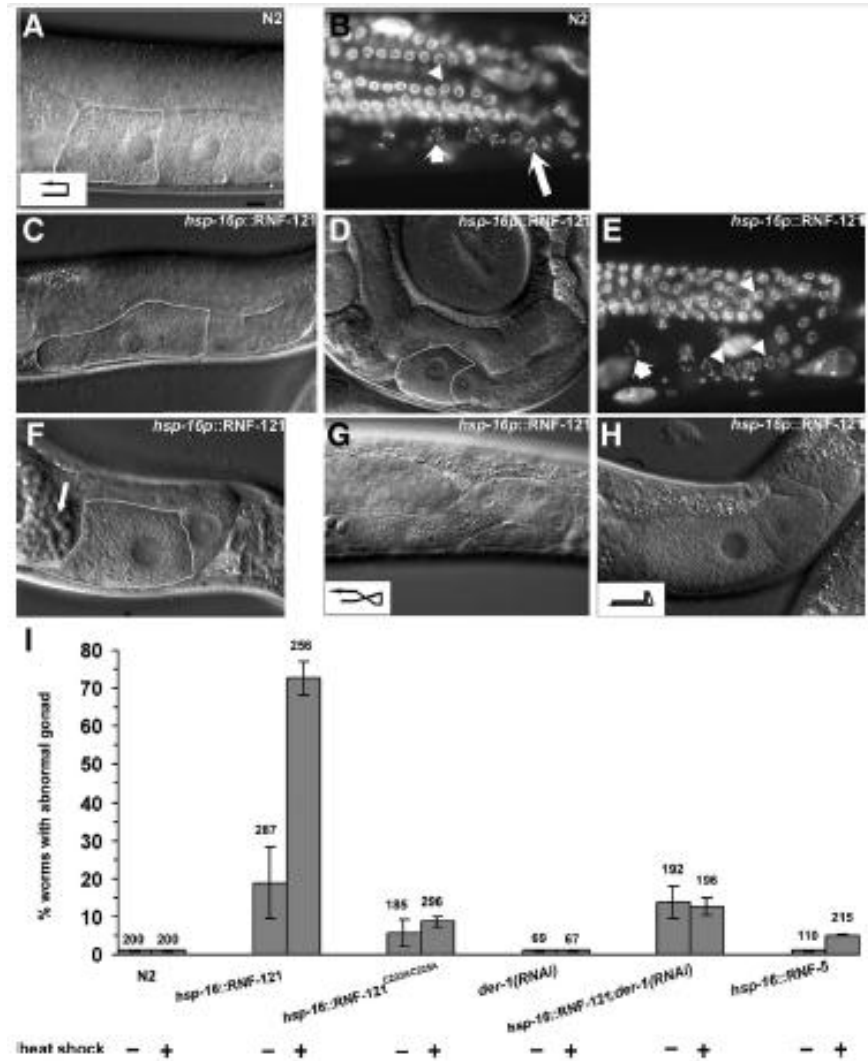


Figura 22. Sobreexpresión de RNF-121 en la línea germinal y en las gónadas defectuosas en etapa L2. (A y B) Imágenes en DIC y tinción con DAPI en los brazos gónadales de hermafroditas adultos WT. Marcas de los núcleos en paquiteno (punta de flecha), diplotena (flecha larga), y ovocitos en diacinesis (flecha corta). Un esquema de la trayectoria de las DTC se muestra a la izquierda. (C-E) imágenes DIC y tinción con DAPI de *hsp-16p::RNF-121* en los brazos gónadales de hermafroditas adultos. Marcas de núcleos en paquiteno (punta de flecha) y ovocitos en diacinesis (flecha corta). (F) los espermatozoides anormales en la espermateca de hermafroditas adultos de *hsp-16p::RNF-121* (flecha). (G y H) defectos de la migración de las DTC en adultos *hsp-16p::RNF-121*. (I) Porcentaje de los gusanos con gónadas anormales. El análisis se realizó con líneas transgénicas HSP-16p::RNF-121, HSP-16p::RNF-121^{C222AC225A}, y HSP-16p::RNF-121 tratadas con RNAi de *der-1*. RNAi de *der-1* en los gusanos WT fue utilizado como control. Los gusanos fueron tratados con choque térmico en la mitad de la etapa L2 para inducir la expresión del transgénico (+) o los controles no tratados (-) (102).

Se encontraron nuevos antecedentes entre una E3 ligasa, LIN-41 y un promotor de HSP, pHSP-16.41 que funcionan en la línea germinal de *C.elegans*. La proteína LIN-41/TRIM71 es un regulador de pluripotencia, que pertenece a la familia de proteínas TRIM-NHL (157). Estas proteínas contienen un motivo tripartito (TRIM), que consiste en un dominio RING finger (158) (159), dos motivos caja-B y un dominio de doble plegamiento (157).

Además, posee seis repeticiones NHL (con el nombre de NCL-1, HT2A y LIN-41) y pueden contener un dominio filamina, que ha sido implicado en interacciones proteína-proteína y proteína-RNA (159) (160) (161) (162) (163).

Diferentes funciones moleculares, han sido atribuidas a las proteínas de tipo LIN-41, por ejemplo, no está claro si todos los dominios funcionan juntos y/o se utilizan de una manera dependiente del contexto del tejido (158) (160) (161) (164) (165). La familia de las TRIM-NHL, funcionan como conocidos reguladores de la auto-renovación y diferenciación (157).

Los defectos en las proteínas TRIM-NHL, también se han asociado con patologías humanas, por ejemplo, TRIM32 ha sido implicado en el síndrome de Bardet-Biedl y la distrofia muscular Limb-Girdle (166). Recientemente, se ha demostrado en humanos que la proteína LIN-41, promueve la reprogramación de células diferenciadas, en células madre pluripotentes inducidas (iPSCs) (167).

Los resultados de las investigaciones, muestran la relación de LIN-41 en el control de la pluripotencia durante el desarrollo del gusano. En *C.elegans*, LIN-41 es un componente bien conocido de la vía heterocrónica somática, que controla temporalmente la transición de las larvas a destinos celulares adultos (168), y parece funcionar en la línea germinal y somática, a través de dos mecanismos moleculares distintos (157).

Para determinar si el fenotipo gonadal refleja la función de LIN-41 en la línea germinal o es causado indirectamente por la pérdida de LIN-41 en la línea somática, los investigadores confeccionaron un transgénico que conduce a la expresión de lin-41 mediante un promotor de choque térmico (HSP-16.41) (157).

Debido a una falta de sensibilidad general de las células germinales, impulsadas por la expresión del promotor de choque térmico, este transgénico no se expresó en la línea germinal, pero cuando se cruzan con el mutante lin-41 (rrr3) de fondo y se mantienen a una temperatura elevada (24 a 25°C, que es aparentemente suficiente para conducir la expresión de lin-41 en la línea somática), rescatando los defectos somáticos de lin-41, donde los animales transgénicos ya no parecen estar enfermos o con un fenotipo corto; (Figura 23 A) (157).

A pesar del rescate de la línea somática, estos animales todavía desarrollan teratomas (Figura 23 B) (157), 50/50 de los animales examinados), sugiriendo un control en la transición de la línea germinal a la línea somática, donde LIN-41 funciona de forma autónoma en la línea germinal (157). Para examinar más profundamente, se inmunotñeron las gónadas, utilizando anticuerpos generados contra LIN-41 y se encontró que, en efecto, LIN-41 estaba presente en el citoplasma de las células germinales a partir de la etapa de paquiteno tardío, y que la localización culmina en los ovocitos completamente crecidos (Figura 23 C) (157).

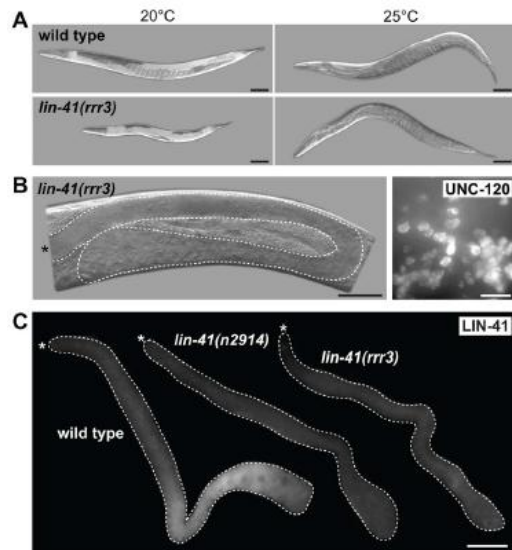


Figura 23. LIN-41 controla la transición de la línea germinal a somática de forma autónoma en la línea germinal. A. Gusanos WT o *lin-41 (rrr3)*, contienen el rescate de un transgénico con GFP-LIN-41 dirigido por un promotor de choque térmico (HSP-16.41). Los gusanos control mantenidos a 20°C se muestran a la izquierda y gusanos mantenidos a 25°C que permite la expresión del promotor de choque térmico a la derecha. Panel izquierdo: gusanos vivos *lin-41 (rrr3)* crecido a 25°C. Se observa la ausencia de ovocitos y la presencia de un tumor en la línea germinal proximal. Panel derecho: una pequeña área en una gónada proximal inmunoteñidas para el marcador de la línea muscular UNC-120, lo que indica la formación de teratomas en gusanos *lin-41 (rrr3)* mantenidos a 25°C. C. Los genotipos de las gónadas indican la inmunotinción para LIN-41(157).

Curiosamente, LIN-41 a menudo está ausente en los ovocitos más proximales (157), lo que sugiere una posible conexión entre la maduración de los ovocitos y/o la ovulación y los niveles de LIN-41(157). La expresión de LIN-41, se limitaba a la línea germinal durante la ovogénesis (es decir, en ausencia de espermatozoides (157), lo que sugiere que la transición de la línea germinal a la línea somática, en gónadas *lin-41*, es causada por la pérdida de la función de LIN-41 en el desarrollo de los ovocitos (157). En la línea somática, se cree que LIN-41 se asocia y reprime los RNAm que codifican, para un factor de transcripción, LIN-29, y el agotamiento de LIN-29, suprime los defectos somáticos de mutantes *lin-41*. En contraste con estas observaciones, en la línea somática la expresión de los RNAm de *lin-29* parece ser, pobremente o en absoluto no expresada en la línea germinal (157).

Consistentemente con los resultados, se encontró que RNAi para el agotamiento de LIN-29, no suprimió los defectos de la línea germinal en mutantes lin-41 (rrr3), sin embargo, se suprime los defectos somáticos. También se obtuvieron resultados similares en dobles mutantes lin-41;lin-29 (157). Por lo tanto, LIN-41 puede funcionar en la línea germinal y somática, a través de dianas y/o mecanismos distintos (157).

La estructura del dominio LIN-41, refleja la diversidad de funciones que se han asociado con proteínas TRIM-NHL (157). Varias de estas proteínas funcionan como E3 ubiquitina ligasas, que requieren un dominio RING funcional (168). Por otra parte, mutaciones en los cinco residuos de cisteína, son críticos para el dominio RING en la estructura zing finger (C114S, C117S, C130S, C151S, C154S (157), producen una proteína que rescató los dos defectos de las líneas somáticas y germinales en animales lin-41 (rrr3) (157).

Aunque no se descarta la posibilidad de que LIN-41 se asocia con factores adicionales para regular la ubiquitinación, estos resultados sugieren que el nemátodo LIN-41 no funciona como una E3 ligasa ubiquitina directa. El estudio describe a LIN-41, como un componente crítico del mecanismo de sincronización, que controla la capacidad de reprogramación de los ovocitos (157).

La proteína c-Myc, facilita la reprogramación de varias maneras, incluyendo mediante la inhibición de la diferenciación (169), y LIN-41 parece desempeñar una función similar, que reprime los RNAm que codifican para factores a favor de la diferenciación (167).

En resumen, además de remarcar que los promotores de HSP son activos en la línea germinal, fusionados a una E3 ligasas de ubiquitina, éstas cumplen diversas funciones relacionadas con la formación de la línea germinal y gametogenesis como es el ejemplo de RNF-121, y además también se vinculan con estas funciones a LIN-41, pero aun falta esclarecer si la proteína LIN-41 realmente funciona como E3 ligasa.

7. CONCLUSIONES.

En la vía ubiquitina proteosoma, la enzima E3 ligasa es la que posee la especificidad para reconocer, interactuar y discriminar entre una gran diversidad de sustratos para la degradación de proteínas celulares. Existen diversas E3 ligasas que participan en etapas de la espermatogénesis y en la formación de la línea germinal de *C.elegans*. Ciertas modificaciones en las ligasas de ubiquitina conducen a falencias en las etapas de la formación de gametos y en las propias células reproductivas.

Específicamente, esta enzima tiene funciones en los siguientes procesos: el patrón temporal del desarrollo de las gónadas y la dirección correcta de los brazos gonadales, la determinación del sexo, participa en la decisión entre la proliferación y la entrada a la meiosis, en la capacidad fecundante de los espermatozoides, promoviendo la formación del crossing-over, en la apoptosis de las células de la línea germinal en respuesta a estrés genotóxico o inducidas por daño entre otras.

Con respecto a las proteínas de choque térmico (HSP), la mayoría son chaperonas y algunas de ellas son capaces de replegar proteínas que han sido dañadas, mal plegadas o desnaturalizadas bajo condiciones de estrés, manejando así el daño en las proteínas y restaurando la proteostasis.

Algunas de las funciones de las HSP en la espermatogénesis y línea germinal de *C.elegans* tienen relación con los siguientes procesos: en la formación de las gónadas específicamente en los brazos gonadales, en la apoptosis en células germinales de la gónada, en el desarrollo de las células germinales y la división celular, en la regulación de la meiosis evitando que las células se detengan en diacinesis, en el desarrollo de las espermatogonias y espermatocitos entre otras.

Una información relevante que se encontró en esta revisión en cuanto al choque térmico, fue que los promotores de las HSP en la línea germinal y espermatogénesis son activos, generando la expresión ectópica de un gen de interés.

Por otro lado, al comparar las HSP en gusanos con mamíferos, también se encontraron funciones asociadas con la espermatogénesis, específicamente con el factor de transcripción de choque térmico.

Además, de la capacidad de replegar proteínas desnaturalizadas bajo condiciones de estrés, las proteínas de respuesta al choque térmico (HSP) también funcionan como acompañantes de las proteínas terminales mal plegadas para su degradación. Cuando las proteínas dañadas no pueden ser reparadas, el sistema de control de calidad las dirige a la degradación mediante el proteosoma con el fin de prevenir el daño sostenido en la célula.

Concretamente, en respuesta al tercer objetivo planteado, las E3 ligasas de ubiquitina funcionan en conjunto con una HSP de unión específica. Como ocurre con la información encontrada entre la ligasa HRD-1 y BiP (HSP-4) que cumplen funciones en la formación de la gónadas.

Y respecto del funcionamiento de estas proteínas en mamíferos, no se encontraron asociaciones en cuanto a la espermatogénesis, pero si en otras funciones como en neurodegeneración.

Finalmente, en la presente revisión bibliográfica se puede mencionar que indagaciones de las E3 ligasas de ubiquitina y las proteínas de choque térmico HSP, no es un tema muy estudiado y puede ser un potencial blanco de investigación tanto en *C.elegans* como en mamíferos. Además, la gran mayoría de los estudios que no son muchos, fueron realizados en hermafroditas de *C.elegans*, el cual solo en el estado larval L4 desarrolla espermatogénesis y en la etapa adulto joven, ya desarrolla ovogénesis para generar la autofecundación.

En relación a lo mismo, se proponen realizar mayores estudios a fin de especificar en profundidad las funciones de las E3 ligasas y HSP en la formación de espermatozoides en la etapa larval L4, sugiriendo realizar un trabajo exhaustivo de estas dos proteínas de estudio en la etapa mencionada, monitoreando el proceso completo de la formación de gametos masculino, resaltando que en hermafroditas la espermatogénesis solamente ocurre en la cuarta etapa larval.

Otra alternativa, es que se realicen estudios en machos que desarrollan espermatogénesis durante su ciclo de vida. Se ha de reconocer que los machos en la población de *C.elegans* son escasos, pero se pueden recolectar numerosas poblaciones mediante un protocolo muy sencillo, el que consiste en mantener gusanos hermafroditas en etapas larval L3-L4 en un baño termoregulado a 33 °C por 5 horas, de lo cual se genera una alta descendencia de gusanos machos.

En esta revisión bibliográfica se evidencian escasos estudios relacionados con funciones asociadas entre las E3 ligasas y las HSP en espermatogénesis de *C.elegans*, por lo cual podría ser un amplio tema de investigación a desarrollar o buscar funciones no solamente en la formación de gametos, sino que también en otros procesos vitales en el nemátodo *C.elegans*, como por ejemplo en neurodegeneración.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Edward EM. Male Germ Cell Gene Expression. 2002;103–28.
2. Bose R, Manku G, Culty M, Wing SS. Ubiquitin–Proteasome System in Spermatogenesis. 2014.
3. Finley D. Recognition and processing of ubiquitin-protein conjugates by the proteasome. 2012;477–513.
4. Starostina NG, Lim J min, Schvarzstein M, Wells L, Spence AM, Kipreos ET. A CUL-2 Ubiquitin Ligase Containing Three FEM Proteins Degrades TRA-1 to Regulate *C. elegans* Sex Determination. *Dev Cell*. 2007;13(1):127–39.
5. Schaefer H, Rongo C. KEL-8 Is a Substrate Receptor for CUL3-dependent Ubiquitin Ligase That Regulates Synaptic Glutamate Receptor Turnover. 2006;17(March):1250–60.
6. Ross a J, Li M, Yu B, Gao MX, Derry WB. The EEL-1 ubiquitin ligase promotes DNA damage-induced germ cell apoptosis in *C. elegans*. *Cell Death Differ* [Internet]. 2011;18(7):1140–9. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3131952&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>
7. Kops GJPL, Voet M Van Der, Manak MS, Osch MHJ Van, Naini SM, Brear A, et al. APC16 is a conserved subunit of the anaphase- promoting complex / cyclosome. 2009;1:1623–33.
8. Shakes DC, Allen AK, Albert KM, Golden A. Emb-1 Encodes the Apc16 Subunit of the *Caenorhabditis Elegans* Anaphase-Promoting Complex. *Genetics*. 2011;189(2):549–60.
9. Adamo A, Montemauri P, Silva N, Ward JD, Boulton SJ, Volpe A La. BRC-1 acts in the inter-sister pathway of meiotic double-strand break repair. *EMBO Rep*. 2008;9(3):287–92.
10. Hartl FU, Hayer-Hartl M. Converging concepts of protein folding in vitro and in vivo. *Nat Struct Mol Biol*. 2009;16(6):574–81.
11. Tullet JMA. DAF-16 target identification in *C. elegans*: past, present and future. *Biogerontology*. 2015;16(2):221–34.

12. Wu D, Rea SL, Yashin AI, Johnson TE. Visualizing hidden heterogeneity in isogenic populations of *C. elegans*. *Exp Gerontol*. 2006;41(3):261–70.
13. Shin H, Lee H, Fejes AP, Baillie DL, Koo H-S, Jones SJ. Gene expression profiling of oxidative stress response of *C. elegans* aging defective AMPK mutants using massively parallel transcriptome sequencing. *BMC Res Notes*. 2011;4:34.
14. Ciche T a, Sternberg PW. Postembryonic RNAi in *Heterorhabditis bacteriophora*: a nematode insect parasite and host for insect pathogenic symbionts. *BMC Dev Biol [Internet]*. 2007;7:101. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2014770&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>
15. Gelmedin V, Delaney A, Jenelle L, Hawdon JM. Expression profile of heat shock response factors during hookworm larval activation and parasitic developmGelmedin, V., Delaney, A., Jenelle, L., & Hawdon, J. M. (2016). Expression profile of heat shock response factors during hookworm larval activation a. 2015;202(1):1–14.
16. Haslbeck V, Kaiser CJO, Richter K. Hsp90 in non-mammalian metazoan model systems. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res [Internet]*. Elsevier B.V.; 2012;1823(3):712–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.09.004>
17. Grad I, Cederroth CR, Walicki J, Grey C, Barluenga S, Winssinger N, et al. The molecular chaperone hsp90a is required for meiotic progression of spermatocytes beyond pachytene in the mouse. *PLoS One*. 2010;5(12):1–11.
18. Inoue T, Hirata K, Kuwana Y, Fujita M, Miwa J, Roy R, et al. Cell cycle control by daf-21/Hsp90 at the first meiotic prophase/metaphase boundary during oogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Growth Differ*. 2006;48(1):25–32.
19. Sasagawa Y, Yamanaka K, Ogura T. ER E3 ubiquitin ligase HRD-1 and its specific partner chaperone BiP play important roles in ERAD and developmental growth in *Caenorhabditis elegans*. *Genes to Cells*. 2007;12(9):1063–73.
20. Papaevgeniou N, Chondrogianni N. The ubiquitin proteasome system in *Caenorhabditis elegans* and its regulation. *Redox Biol [Internet]*. Elsevier; 2014;2(1):333–47. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2014.01.007>

21. Kirienko Natalia V., Mani Kumaran and FDS. Cancer models in *C. elegans*. 2014;239(5):1413–48.
22. Chi F. Lee, Girish C. Melkani and SIB. The UNC-45 Myosin Chaperone: From Worms to Flies to Vertebrates. 2014. 1-39 p.
23. Astin JW, O’Neil NJ, Kuwabara PE. Nucleotide excision repair and the degradation of RNA pol II by the *Caenorhabditis elegans* XPA and Rsp5 orthologues, RAD-3 and WWP-1. DNA Repair (Amst). 2008;7(2):267–80.
24. Jeong J, Verheyden JM, Kimble J. Cyclin E and Cdk2 control GLD-1, the mitosis/meiosis decision, and germline stem cells in *Caenorhabditis elegans*. PLoS Genet. 2011;7(3).
25. Wiegant FAC, de Poot SAH, Boers-Trilles VE, Schreij AMA. Hormesis and cellular quality control: A possible explanation for the molecular mechanisms that underlie the benefits of mild stress. Dose-Response. 2013;11(3):413–30.
26. Rorth P. Quality control in an unreliable world. 2008;27(2):303–5.
27. Bar-Lavan Y, Kosolapov L, Frumkin A, Ben-Zvi A. Regulation of cellular protein quality control networks in a multicellular organism. FEBS J. 2012;279(4):526–31.
28. Xuejun Wang*, Huabo Su and MJR. Protein Quality Control and Degradation in Cardiomyocytes. 2008;45(1):11–27.
29. Allan M. Weissman1,* , Nitzan Shabek2 and AC. the Predator becomes the Prey: Regulating the Ubiquitin System by Ubiquitylation and Degradation. 2013;100(2):130–4.
30. Zhang Yue and Calderwood Stuart K. Autophagy, Protein Aggregation and Hyperthermia: A Minireview. 2014;27(5):409–14.
31. Ravid T, Hochstrasser M. Diversity of degradation signals in the ubiquitin-proteasome system. Nat Rev Mol Cell Biol [Internet]. 2008;9(9):679–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18698327>
32. Maciejowski J, Ugel N, Mishra B, Isopi M, Hubbard EJA. Quantitative analysis of germline mitosis in adult *C. elegans*. Dev Biol. 2006;292(1):142–51.
33. Seidel HS, Ailion M, Jialing Li, van Oudenaarden A, Rockman M V., Kruglyak L. A novel sperm-delivered toxin causes late-stage embryo lethality and transmission ratio distortion in *C. elegans*. PLoS Biol. 2011;9(7).

34. Kimble Judith and Crittenden Sarah L. Controls of Germline Stem Cells, Entry into Meiosis, and the Sperm/Oocyte Decision in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. 2007;125(1):29–39.
35. Waters K, Reinke V. Extrinsic and intrinsic control of germ cell proliferation in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Reprod ...* [Internet]. 2011;78(3):151–60. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mrd.21289/full>
36. Waters K, Yang AZ, Reinke V. Genome-wide analysis of germ cell proliferation in *C. elegans* identifies VRK-1 as a key regulator of CEP-1/p53. *Dev Biol* [Internet]. Elsevier Inc.; 2010;344(2):1011–25. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2010.06.022>
37. Crittenden SL, Leonhard KA, Byrd DT, Kimble J. Cellular Analyses of the Mitotic Region in the *Caenorhabditis elegans* Adult Germ Line. 2006;17(July):3051–61.
38. Gleason EJ, Lindsey WC, Kroft TL, Singson AW, L'Hernault SW. Spe-10 encodes a DHHC-CRD zinc-finger membrane protein required for endoplasmic reticulum/golgi membrane morphogenesis during *Caenorhabditis elegans* spermatogenesis. *Genetics*. 2006;172(1):145–58.
39. Bezler A, Gönczy P. Mutual antagonism between the anaphase promoting complex and the spindle assembly checkpoint contributes to mitotic timing in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. 2010;186(4):1271–83.
40. Rotin D, Kumar S. Physiological functions of the HECT family of ubiquitin ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2009;10(6):398–409. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19436320>
41. Dimova N V., Hathaway N a., Lee B-H, Kirkpatrick DS, Berkowitz ML, Gygi SP, et al. APC/C-mediated multiple monoubiquitylation provides an alternative degradation signal for cyclin B1. *Nat Cell Biol* [Internet]. Nature Publishing Group; 2012;14(2):168–76. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ncb2425>
42. Shabek N, Herman-Bachinsky Y, Buchsbaum S, Lewinson O, Haj-Yahya M, Hejjaoui M, et al. The Size of the Proteasomal Substrate Determines Whether Its Degradation Will Be Mediated by Mono- or Polyubiquitylation. *Mol Cell* [Internet]. Elsevier Inc.; 2012;48(1):87–97. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2012.07.011>

43. Tanaka K. The proteasome: overview of structure and functions. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* [Internet]. 2009;85(1):12–36. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3524306&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>
44. Schmidt M, Finley D. Regulation of proteasome activity in health and disease. *Biochim Biophys Acta* [Internet]. 2014;1843(1):13–25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23994620><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3858528>
45. Tai H-C, Schuman EM. Ubiquitin, the proteasome and protein degradation in neuronal function and dysfunction. *Nat Rev Neurosci*. 2008;9(11):826–38.
46. Ciechanover A. The ubiquitin proteolytic system: from a vague idea, through basic mechanisms, and onto human diseases and drug targeting. *Neurology* [Internet]. 2006;66(Suppl 1):S7-19. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16432150>
47. MacDonald LD, Knox A, Hansen D. Proteasomal regulation of the proliferation vs. meiotic entry decision in the *Caenorhabditis elegans* germ line. *Genetics*. 2008;180(2):905–20.
48. Hajjar C, Sampuda KM, Boyd L. Dual roles for ubiquitination in the processing of sperm organelles after fertilization. *BMC Dev Biol* [Internet]. 2014;14(1):6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24528894>
49. Pispá J, Palmén S, Holmberg CI, Jantti J. *C. elegans* dss-1 is functionally conserved and required for oogenesis and larval growth. *BMC Dev Biol* [Internet]. 2008;8:51. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18471277
50. Grau-Bové X, Sebé-Pedrós A, Ruiz-Trillo I. A genomic survey of HECT ubiquitin ligases in eukaryotes reveals independent expansions of the HECT system in several lineages. *Genome Biol Evol*. 2013;5(5):833–47.
51. Schwartz AL, Ciechanover A. Targeting proteins for destruction by the ubiquitin system: implications for human pathobiology. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* [Internet]. 2009;49:73–96. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18834306>

52. Ryu K-YK, Sinnar SAS, Reinholdt LG, Vaccari S, Hall S, Garcia MA, et al. The mouse polyubiquitin gene Ubb is essential for meiotic progression. *Mol Cell Biol* [Internet]. 2008;28(3):1136–46. Available from: <http://mcb.asm.org/content/28/3/1136.short>
53. Jossé L, Harley ME, Pires IMS, Hughes D a. Fission yeast Dss1 associates with the proteasome and is required for efficient ubiquitin-dependent proteolysis. *Biochem J*. 2006;393:303–9.
54. Primorac I, Musacchio A. Panta rhei: The APC/C at steady state. *J Cell Biol*. 2013;201(2):177–89.
55. Meyer H, Rape M. Seminars in Cell & Developmental Biology Processive ubiquitin chain formation by the anaphase-promoting complex. *Semin Cell Dev Biol*. Elsevier Ltd; 2011;22(6):544–50.
56. Pesin JA, Orr-weaver TL. Regulation of APC / C Activators in Mitosis and Meiosis. 2008;
57. Simpson-lavy KJ, Oren YS, Feine O, Sajman J, Listovsky T, Brandeis M. Fifteen years of APC / cyclosome : a short and impressive biography. 2010;38:78–82.
58. Peters J. The anaphase promoting complex / cyclosome : a machine designed to destroy. 2006;
59. Wa R. The emerging role of APC / C Cdh1 in controlling differentiation , genomic stability and tumor suppression. 2010;(October 2009):1–10.
60. Zich J, Hardwick KG. Getting down to the phosphorylated " nuts and bolts " of spindle checkpoint signalling. 2009;(October).
61. Stein KK, Nesmith JE, Ross BD, Golden A. Functional redundancy of paralogs of an anaphase promoting complex/cyclosome subunit in *Caenorhabditis elegans* meiosis. *Genetics*. 2010;186(4):1285–93.
62. Polanowska J, Martin JS, Garcia-Muse T, Petalcorin MIR, Boulton SJ. A conserved pathway to activate BRCA1-dependent ubiquitylation at DNA damage sites. *EMBO J* [Internet]. 2006;25(10):2178–88. Available from: <http://emboj.embopress.org/content/25/10/2178.abstract>
63. Wyman C, Kanaar R. DNA Double-Strand Break Repair: All's Well that Ends Well. *Annu Rev Genet* [Internet]. 2006;40(1):363–83. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.genet.40.110405.090451>

64. Bosu DR, Feng H, Min K, Kim Y, Wallenfang MR, Kipreos ET. *C. elegans* CAND-1 regulates cullin neddylation, cell proliferation and morphogenesis in specific tissues Dimple. 2011;346(1):113–26.
65. Merlet J, Pintard L. Role of the CRL2LRR-1 E3 ubiquitin-ligase in the development of the germline in *C. elegans*. 2013;2–5.
66. Cai W, Yang H. The structure and regulation of Cullin 2 based E3 ubiquitin ligases and their biological functions. Cell Div [Internet]. BioMed Central; 2016;11(1):7. Available from: <http://celldiv.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13008-016-0020-7>
67. Starostina NG, Simpliciano JM, McGuirk MA, Kipreos ET. CRL2LRR-1 Targets a CDK Inhibitor for Cell Cycle Control in *C. elegans* and Actin-Based Motility Regulation in Human Cells. Dev Cell [Internet]. Elsevier Inc.; 2010;19(5):753–64. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2010.10.013>
68. Burger J, Merlet J, Tavernier N, Richaudeau B, Arnold A, Ciosk R, et al. CRL2LRR-1 E3-Ligase Regulates Proliferation and Progression through Meiosis in the *Caenorhabditis elegans* Germline. PLoS Genet. 2013;9(3).
69. Kim Y, Kipreos ET. The *Caenorhabditis elegans* replication licensing factor CDT-1 is targeted for degradation by the CUL-4/DDB-1 complex. Mol Cell Biol. 2007;27(4):1394–406.
70. Merlet J, Burger J, Tavernier N, Richaudeau B, Gomes J-E, Pintard L, et al. The CRL2LRR-1 ubiquitin ligase regulates cell cycle progression during *C. elegans* development. Development [Internet]. 2010;137(22):3857–66. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20978077> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3188596>
71. Lin JJ, Dutta A. ATR pathway is the primary pathway for activating G2/M checkpoint induction after re-replication. J Biol Chem. 2007;282(42):30357–62.
72. Kalchauer I, Farley BM, Pauli S, Ryder SP, Ciosk R. FBF represses the Cip/Kip cell-cycle inhibitor CKI-2 to promote self-renewal of germline stem cells in *C. elegans*. EMBO J. 2011;30(18):3823–9.
73. Merritt C, Seydoux G. The Puf RNA-binding proteins FBF-1 and FBF-2 inhibit the expression of synaptonemal complex proteins in germline stem cells. Development. 2010;137(11):1787–98.

74. Goodyer W, Kaitna S, Couteau F, Ward JD, Boulton SJ, Zetka M. HTP-3 Links DSB Formation with Homolog Pairing and Crossing Over during *C. elegans* Meiosis. *Dev Cell*. 2008;14(2):263–74.
75. Severson AF, Ling L, Van Zuylen V, Meyer BJ. The axial element protein HTP-3 promotes cohesin loading and meiotic axis assembly in *C. elegans* to implement the meiotic program of chromosome segregation. *Genes Dev*. 2009;23(15):1763–78.
76. Fox PM, Vought VE, Hanazawa M, Lee M-H, Maine EM, Schedl T. Cyclin E and CDK-2 regulate proliferative cell fate and cell cycle progression in the *C. elegans* germline. *Development* [Internet]. 2011;138(11):2223–34. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3091494&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>
77. Xiong Y, Comprehensive L, Hill C. Targeting p21 Degradation Locally. 2016;19(5):641–3.
78. Sharma P, Nag A. CUL4A ubiquitin ligase: a promising drug target for cancer and other human diseases. *Open Biol* [Internet]. 2014;4(February):130217. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3938054&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>
79. Ellis R, Schedl T. Sex determination in the germ line. *WormBook*. 2007;1–13.
80. Kulkarni M, Smith HE. E1 ubiquitin-activating enzyme UBA-1 plays multiple roles throughout *C. elegans* development. *PLoS Genet*. 2008;4(7).
81. Zarkower D. Somatic sex determination. *WormBook* [Internet]. 2006;1–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18050479>
82. Li T, Kelly WG. A role for WDR5 in TRA-1/Gli mediated transcriptional control of the sperm/oocyte switch in *C. elegans*. *Nucleic Acids Res*. 2014;42(9):5567–81.
83. Wang X, Desai N, Hu YP, Price SM, Abate-Shen C, Shen MM. Mouse Fem1b interacts with the Nkx3.1 homeoprotein and is required for proper male secondary sexual development. *Dev Dyn*. 2008;237(10):2963–72.

84. Killian DJ, Harvey E, Johnson P, Otori M, Mitani S, Xue D. SKR-1, a homolog of Skp1 and a member of the SCFSEL-10 complex, regulates sex-determination and LIN-12/Notch signaling in *C. elegans*. Dev Biol [Internet]. Elsevier Inc.; 2008;322(2):322–31. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.07.035>
85. Wilson LD, Sackett JM, Mieczkowski BD, Richie AL, Thoemke K, Rumbley JN, et al. Fertilization in *C. elegans* requires an intact C-terminal RING finger in sperm protein SPE-42. BMC Dev Biol [Internet]. 2011;11(1):10. Available from:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3053230&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>
86. Bhalla N, Wynne DJ, Jantsch V, Dernburg AF. ZHP-3 acts at crossovers to couple meiotic recombination with synaptonemal complex disassembly and bivalent formation in *C. elegans*. PLoS Genet. 2008;4(10).
87. Strong ER, Schimenti JC. Evidence implicating CCNB1IP1, a RING domain-containing protein required for meiotic crossing over in mice, as an E3 SUMO ligase. Genes (Basel). 2010;1(3):440–51.
88. Sandor C, Li W, Coppieters W, Druet T, Charlier C, Georges M. Genetic variants in REC8, RNF212, and PRDM9 influence male recombination in cattle. PLoS Genet. 2012;8(7).
89. Neale MJ, Keeney S. Clarifying the mechanics of DNA strand exchange in meiotic recombination. 2006;442(July):153–8.
90. Carlton PM, Farruggio AP, Dernburg AF. A link between meiotic prophase progression and crossover control. PLoS Genet. 2006;2(2):119–28.
91. Reynolds A, Qiao H, Yang Y, Chen JK, Jackson N, Biswas K, et al. RNF212 is a dosage-sensitive regulator of crossing-over during mammalian meiosis. Nat Genet [Internet]. 2013;45(3):269–78. Available from:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4245152&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>
92. Holloway JK, Booth J, Edlmann W, McGowan CH, Cohen PE. MUS81 generates a subset of MLH1-MLH3-independent crossovers in mammalian meiosis. PLoS Genet. 2008;4(9).

93. Yokoo R, Zawadzki KA, Nabeshima K, Drake M, Arur S, Villeneuve AM. COSA-1 reveals robust homeostasis and separable licensing and reinforcement steps governing meiotic crossovers. *Cell* [Internet]. Elsevier Inc.; 2012;149(1):75–87. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.052>
94. Kahn NW, Rea SL, Moyle S, Kell A, Johnson TE. Proteasomal dysfunction activates the transcription factor SKN-1 and produces a selective oxidative-stress response in *Caenorhabditis elegans*. *Biochem J* [Internet]. 2008;409(1):205–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17714076> <http://biochemj.org/lookup/doi/10.1042/BJ20070521>
95. Hansen Dave¹ and Sched Tim. Stem cell proliferation versus meiotic fate decision in *Caenorhabditis elegans*. 2013;(Bianco 2011):1–26.
96. Safdar K, Gu A, Xu X, Au V, Taylor J, Flibotte S, et al. UBR-5, a Conserved HECT-Type E3 Ubiquitin Ligase, Negatively Regulates Notch-Type Signaling in *Caenorhabditis elegans*. *G3 (Bethesda)* [Internet]. 2016;6(7):2125–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27185398>
97. Hubbard EJA, Korta DZ, Dalfó D. Physiological Control of Germline Development. 2013. 101-131 p.
98. Starich TA, Hall DH, Greenstein D. Physiological Control of Germline Development. 2013;198(November):1127–53.
99. Jantsch V, Tang L, Pasierbek P, Penkner A, Nayak S, Baudrimont A, et al. *Caenorhabditis elegans* prom-1 Is Required for Meiotic Prophase Progression and Homologous Chromosome Pairing □. 2007;18(December):4911–20.
100. Wong M, Schwarzbauer JE. Gonad morphogenesis and distal tip cell migration in the *Caenorhabditis elegans* hermaphrodite. 2012;1(August).
101. Meighan CM, Schwarzbauer JE. Control of hermaphrodite gonad size and shape by vab-3 / Pax6-mediated regulation of integrin receptors. Cold Spring Harb Lab Press. 2007;1615–20.
102. Darom Amir, Bening-Abu-Shach and BL. RNF-121 Is an Endoplasmic Reticulum-Membrane E3 Ubiquitin Ligase Involved in the Regulation of beta -Integrin. *Mol Biol Cell*. 2010;21(22):4042–56.

103. Lee H, Alpi AF, Park MS, Rose A, Koo HS. *C. elegans* Ring Finger Protein RNF-113 Is Involved in Interstrand DNA Crosslink Repair and Interacts with a RAD51C Homolog. *PLoS One*. 2013;8(3).
104. Collis SJ, Barber LJ, Ward JD, Martin JS, Boulton SJ. *C. elegans* FANCD2 responds to replication stress and functions in interstrand cross-link repair. *DNA Repair (Amst)*. 2006;5(11):1398–406.
105. Lee KY, Chung KY, Koo HS. The involvement of FANCM, FANCI, and checkpoint proteins in the interstrand DNA crosslink repair pathway is conserved in *C. elegans*. *DNA Repair (Amst)* [Internet]. Elsevier B.V.; 2010;9(4):374–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dnarep.2009.12.018>
106. Moldovan G, Andrea ADD. How the Fanconi Anemia Pathway Guards the Genome. 2009;
107. Garner E, Smogorzewska A, Just W. Ubiquitylation and the Fanconi anemia pathway Stalling of replication by ICL. *FEBS Lett. Federation of European Biochemical Societies*; 2011;585(18):2853–60.
108. De Carvalho CE, Colaiácovo MP. SUMO-mediated regulation of synaptonemal complex formation during meiosis. *Genes Dev*. 2006;20(15):1986–92.
109. Kerins JA, Hanazawa M, Dorsett M, Schedl T. PRP-17 and the pre-mRNA splicing pathway are preferentially required for the proliferation versus meiotic development decision and germline sex determination in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Dyn*. 2010;239(5):1555–72.
110. Love IM, Grossman SR. It Takes 15 to Tango: Making Sense of the Many Ubiquitin Ligases of p53. *Genes Cancer* [Internet]. 2012;3(3–4):249–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23150758>
111. Gao MX, Liao EH, Yu B, Wang Y, Zhen M, Derry WB. The SCF FSN-1 ubiquitin ligase controls germline apoptosis through CEP-1/p53 in *C. elegans*. *Cell Death Differ*. 2008;15:1054–62.
112. Parsons JL, Tait PS, Finch D, Dianova II, Edelmann MJ, Khoronenkova S V, et al. Ubiquitin ligase ARF-BP1/Mule modulates base excision repair. *EMBO J* [Internet]. Nature Publishing Group; 2009;28(20):3207–15. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2771081&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>

113. Bailly AP, Freeman A, Hall J, Déclais AC, Alpi A, Lilley DMJ, et al. The *Caenorhabditis elegans* homolog of Gen1/Yen1 resolvases links DNA damage signaling to DNA double-strand break repair. *PLoS Genet.* 2010;6(7):1–16.
114. A Peschiaroli^{1, 6}, F Scialpi^{2, 6}, F Bernassola^{2, 7}, M Pagano^{3, 4}, and G Melino^{1 5}. The F-box protein FBXO45 promotes the proteasome-dependent degradation of p73. 2012;100(2):130–4.
115. Tan M, Davis SW, Saunders TL, Zhu Y, Sun Y. RBX1/ROC1 disruption results in early embryonic lethality due to proliferation failure, partially rescued by simultaneous loss of p27. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2009;106(15):6203–8. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2669381&tool=pmc&rendertype=abstract>
116. Jia L, Sun Y. RBX1/ROC1-SCF E3 ubiquitin ligase is required for mouse embryogenesis and cancer cell survival. *Cell Div* [Internet]. 2009;4:16. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2732615&tool=pmc&rendertype=abstract>
117. Wei D, Sun Y. Small RING Finger Proteins RBX1 and RBX2 of SCF E3 Ubiquitin Ligases: The Role in Cancer and as Cancer Targets. *Genes Cancer* [Internet]. 2010;1(7):700–7. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2983490&tool=pmc&rendertype=abstract>
118. Jia L, Bickel JS, Wu J, Morgan MA, Li H, Yang J, et al. RBX1 (RING box protein 1) E3 ubiquitin ligase is required for genomic integrity by modulating DNA replication licensing proteins. *J Biol Chem.* 2011;286(5):3379–86.
119. Lanneau D, de Thonel A, Maurel S, Didelot C, Garrido C. Apoptosis Versus Cell Differentiation. *Prion.* 2007;1(1):53–60.
120. Gidalevitz T, Prahlad V, Morimoto RI. The stress of protein misfolding: from single cells to multicellular organisms. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011;3(6).

121. Hao X, Zhang S, Timakov B, Zhang P. The Hsp27 gene is not required for *Drosophila* development but its activity is associated with starvation resistance. *Cell Stress Chaperones*. 2007;12:364–72.
122. Anckar J, Sistonen L. Heat shock factor 1 as a coordinator of stress and developmental pathways. *Adv Exp Med Biol*. 2007;594:78–88.
123. Brunquell J, Morris S, Lu Y, Cheng F, Westerheide SD. The genome-wide role of HSF-1 in the regulation of gene expression in *Caenorhabditis elegans*. *BMC Genomics* [Internet]. *BMC Genomics*; 2016;17(1):559. Available from: <http://bmcbgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12864-016-2837-5>
124. Chiang WC, Ching TT, Lee HC, Mousigian C, Hsu AL. HSF-1 regulators DDL-1/2 link insulin-like signaling to heat-shock responses and modulation of longevity. *Cell* [Internet]. Elsevier Inc.; 2012;148(1–2):322–34. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.12.019>
125. Morton EA, Lamitina T. *Caenorhabditis elegans* HSF-1 is an essential nuclear protein that forms stress granule-like structures following heat shock. *Aging Cell*. 2013;12(1):112–20.
126. Minsky N, Roeder RG. Direct link between metabolic regulation and the heat-shock response through the transcriptional regulator PGC-1 α . *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2015;201516219. Available from: <http://www.pnas.org/content/early/2015/09/30/1516219112.abstract.html?etoc>
127. Peng ZY, Serkova NJ, Kominsky DJ, Brown JL. Glutamine-Mediated Attenuation of Cellular Metabolic Dysfunction and Cell Death After Injury Is Dependent on Heat Shock factor-1 expression. 2006;30(5):373–9.
128. Cohen EHUD, Bieschke Jan, Perciavalle Rhonda M., Kelly Jeffery W. 2 Dillin1 Andrew. Opposing activities protect against age-onset proteotoxicity. 2006;(September):1604–11.
129. Morton DG, Hoose WA, Kempfues KJ. A Genome-Wide RNAi Screen for Enhancers of par Mutants Reveals New Contributors to Early Embryonic Polarity in *Caenorhabditis elegans*. 2012;192(November):929–42.

130. Neckers L. Heat shock protein 90: The cancer chaperone. J Biosci [Internet]. 2007;32(3):517–30. Available from: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-34248187981&partnerID=40&md5=da5811f58e4a907d1fbc8601e0722353>
131. Yeyati PL, Bancewicz RM, Maule J, Van Heyningen V. Hsp90 selectively modulates phenotype in vertebrate development. PLoS Genet. 2007;3(3):0431–47.
132. Gaiser AM, Kaiser CJO, Haslbeck V, Richter K. Downregulation of the Hsp90 system causes defects in muscle cells of *Caenorhabditis elegans*. PLoS One. 2011;6(9).
133. Gillan V, Maitland K, McCormack G, Nik Him NAI, Devaney E. Functional genomics of hsp-90 in parasitic and free-living nematodes. Int J Parasitol [Internet]. Australian Society for Parasitology Inc.; 2009;39(10):1071–81. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.02.024>
134. Gaiser AM, Brandt F, Richter K. The Non-canonical Hop Protein from *Caenorhabditis elegans* Exerts Essential Functions and Forms Binary Complexes with Either Hsc70 or Hsp90. J Mol Biol [Internet]. Elsevier Ltd; 2009;391(3):621–34. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2009.06.051>
135. Metchat A, Akerfelt M, Bierkamp C, Delsinne V, Sistonen L, Alexandre H, et al. Mammalian heat shock factor 1 is essential for oocyte meiosis and directly regulates Hsp90 expression. J Biol Chem. 2009;284(14):9521–8.
136. Green RA, Kao HL, Audhya A, Arur S, Mayers JR, Fridolfsson HN, et al. A high-resolution *C. elegans* essential gene network based on phenotypic profiling of a complex tissue. Cell [Internet]. Elsevier Inc.; 2011;145(3):470–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.03.037>
137. Solaz-Fuster MC, Gimeno-Alcañiz JV, Casado M, Sanz P. TRIP6 transcriptional co-activator is a novel substrate of AMP-activated protein kinase. Cell Signal. 2006;18(10):1702–12.
138. Jankowsky E. RNA helicases at work: Binding and rearranging. Trends Biochem Sci [Internet]. Elsevier Ltd; 2011;36(1):19–29. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibs.2010.07.008>

139. Salinas LS, Maldonado E, Macı M, Blackwell TK. The DEAD Box RNA Helicase VBH-1 Is Required for Germ Cell Function in *C. elegans*. 2007;546(September):533–46.
140. Salinas LS, Maldonado E, Navarro RE. Stress-induced germ cell apoptosis by a p53 independent pathway in *Caenorhabditis elegans*. *Cell Death Differ.* 2006;13(12):2129–39.
141. Salinas LS, Franco-Cea A, Láscarez-Lagunas LI, Villanueva-Chimal E, Maldonado E, Navarro RE. Germ cell survival in *C. elegans* and *C. remanei* is affected when the dead box rna helicases Vbh-1 or Cre-VBH-1 are silenced. *Genesis.* 2012;50(11):801–18.
142. Hubert A, Anderson P. The *C. elegans* sex determination gene *laf-1* encodes a putative DEAD-box RNA helicase. *Dev Biol [Internet]. Elsevier Inc.;* 2009;330(2):358–67. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.04.003>
143. Paz-Gómez D, Villanueva-Chimal E, Navarro RE. The DEAD Box RNA helicase VBH-1 is a new player in the stress response in *C. elegans*. *PLoS One.* 2014;9(5).
144. Seidel HS, Rockman M V, Kruglyak L. Widespread genetic incompatibility in *C. elegans* maintained by balancing selection. *Science.* 2008;319(5863):589–94.
145. Tursun B, Patel T, Kratsios P, Hobert O. Direct Conversion of *C. elegans* Germ. *Science (80-).* 2011;331(January):304–9.
146. Walerych D, Gutkowska M, Klejman MP, Wawrzynow B, Tracz Z, Wiech M, et al. ATP binding to Hsp90 is sufficient for effective chaperoning of p53 protein. *J Biol Chem.* 2010;285(42):32020–8.
147. Zeiser E, Frøkjær-Jensen C, Jorgensen E, Ahringer J. MosSCI and gateway compatible plasmid toolkit for constitutive and inducible expression of transgenes in the *c. elegans* germline. *PLoS One.* 2011;6(5):3–8.
148. Kinet MJ, Malin JA, Abraham MC, Blum ES, Silverman MR, Lu Y, et al. HSF-1 activates the ubiquitin proteasome system to promote non-apoptotic developmental cell death in *C. elegans*. 2016;1–24.

149. Hayashida N, Fujimoto M, Tan K, Prakasam R, Shinkawa T, Li L, et al. Heat shock factor 1 ameliorates proteotoxicity in cooperation with the transcription factor NFAT. *EMBO J.* Nature Publishing Group; 2010;29(20):3459–69.
150. Shinkawa T, Tan K, Fujimoto M, Hayashida N, Yamamoto K. Heat shock factor 2 is required for maintaining proteostasis against febrile-range thermal stress and polyglutamine aggregation. 2011;22.
151. Dai C, Whitesell L, Rogers AB, Lindquist S. Heat Shock Factor 1 Is a Powerful Multifaceted Modifier of Carcinogenesis. *Cell.* 2007;130(6):1005–18.
152. Kang BH, Plescia J, Dohi T, Rosa J, Doxsey SJ, Altieri DC. Regulation of Tumor Cell Mitochondrial Homeostasis by an Organelle-Specific Hsp90 Chaperone Network. *Cell.* 2007;131(2):257–70.
153. Chatterjee M, Jain S, Stühmer T, Andrulis M, Ungethüm U, Kuban RJ, et al. STAT3 and MAPK signaling maintain overexpression of heat shock proteins 90 α and β in multiple myeloma cells, which critically contribute to tumor-cell survival. *Blood.* 2007;109(2):720–8.
154. Eletto Davide, Dersh Devin and AY. GRP94 in ER Quality Control and Stress Responses. 2010;21(5):479–85.
155. Christianson JC, Shaler TA, Tyler RE, Kopito RR. OS-9 and GRP94 deliver mutant alpha1-antitrypsin to the Hrd1-SEL1L ubiquitin ligase complex for ERAD. 2009;10(3):272–82.
156. Bernasconi R, Galli C, Calanca V, Nakajima T, Molinari M. Stringent requirement for HRD1, SEL1L, and OS-9/XTP3-B for disposal of ERAD-LS substrates. *J Cell Biol.* 2010;188(2):223–35.
157. Tocchini C, Keusch JJ, Miller SB, Finger S, Gut H, Stadler MB, et al. The TRIM-NHL Protein LIN-41 Controls the Onset of Developmental Plasticity in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet.* 2014;10(8):18–20.
158. Rybak A, Fuchs H, Hadian K, Smirnova L, Wulczyn EA, Michel G, et al. The let-7 target gene mouse lin-41 is a stem cell specific E3 ubiquitin ligase for the miRNA pathway protein Ago2. *Nat Cell Biol* [Internet]. Nature Publishing Group; 2009;11(12):1411–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ncb1987><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19898466>

159. Raheja R, Liu Y, Hukkelhoven E, Yeh N, Koff A. The ability of TRIM3 to induce growth arrest depends on RING-dependent E3 ligase activity. *Biochem J* [Internet]. 2014;458(3):537–45. Available from: <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=24393003&retmode=ref&cmd=prlinks%5Cnpapers3://publication/doi/10.1042/BJ20131288>
160. Kwon SC, Yi H, Eichelbaum K, Föhr S, Fischer B, You KT, et al. The RNA-binding protein repertoire of embryonic stem cells. *Nat Struct Mol Biol* [Internet]. 2013;20(9):1122–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23912277>
161. Loedige I, Stotz M, Qamar S, Kramer K, Hennig J, Schubert T, et al. The NHL domain of BRAT is an RNA-binding domain that directly contacts the hunchback mRNA for regulation. *Genes Dev.* 2014;28(7):749–64.
162. Löer B, Bauer R, Bornheim R, Grell J, Kremmer E, Kolanus W, et al. The NHL-domain protein Wech is crucial for the integrin-cytoskeleton link. *Nat Cell Biol.* 2008;10(4):422–8.
163. Liu Y, Raheja R, Yeh N, Ciznadija D, Pedraza AM, Ozawa T, et al. TRIM3, a tumor suppressor linked to regulation of p21(Waf1/Cip1.). *Oncogene* [Internet]. Nature Publishing Group; 2014;33(3):308–15. Available from: <http://www.nature.com/onc/journal/v33/n3/pdf/onc2012596a.pdf>
164. Chang H-M, Martinez NJ, Thornton JE, Hagan JP, Nguyen KD, Gregory RI. Trim71 cooperates with microRNAs to repress Cdkn1a expression and promote embryonic stem cell proliferation. *Nat Commun* [Internet]. Nature Publishing Group; 2012;3(May):923. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3518406&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>
165. Lee SH, Cho S, Sun Kim M, Choi K, Cho JY, Gwak HS, et al. The ubiquitin ligase human TRIM71 regulates let-7 microRNA biogenesis via modulation of Lin28B protein. *Biochim Biophys Acta - Gene Regul Mech* [Internet]. Elsevier B.V.; 2014;1839(5):374–86. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagr.2014.02.017>

166. Chiang AP, Beck JS, Yen H-J, Tayeh MK, Scheetz TE, Swiderski RE, et al. Homozygosity mapping with SNP arrays identifies TRIM32, an E3 ubiquitin ligase, as a Bardet-Biedl syndrome gene (BBS11). *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2006;103(16):6287–92. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1458870&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>
167. Worringer KA, Rand TA, Hayashi Y, Sami S, Takahashi K, Tanabe K, et al. The let-7/LIN-41 pathway regulates reprogramming to human induced pluripotent stem cells by controlling expression of prodifferentiation genes. *Cell Stem Cell* [Internet]. Elsevier Inc.; 2014;14(1):40–52. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2013.11.001>
168. Ecsedi M, Großhans H. Lin-41/Trim71: Emancipation of a miRNA target. *Genes Dev.* 2013;27(6):581–9.
169. Knoepfler PS. Why Myc? An Unexpected Ingredient in the Stem Cell Cocktail Minireview. 2007;2–5.