



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

Importancia de la ubiquinona de la dieta en estirpes de *C. elegans* que no sintetizan benzoquinonas

Tesina de grado – Licenciatura en Bioquímica

Florentina Arispe

Tutor: Dr. Gustavo Salinas

Laboratorio de Biología de Gusanos

Unidad Mixta Institut Pasteur – Facultad de Química, UdelaR

14 de Junio de 2024

Contenido

Contenido	2
Resumen.....	4
Introducción	6
Ubiquinona: importancia y funciones	6
Ubiquinona en la cadena respiratoria	7
<i>C. elegans</i> como el organismo modelo animal más sencillo	10
<i>C. elegans</i> como helminto modelo	12
Biosíntesis de UQ en organismos procariotas y eucariotas	15
El mutante en <i>clk-1</i> no sintetiza UQ, pero sí RQ	17
Bioíntesis de RQ en <i>C. elegans</i>	19
El mutante en <i>kynu-1</i> no sintetiza RQ	21
El doble mutante en <i>clk-1</i> y <i>kynu-1</i> vive	21
Rol de la dieta.....	22
Ensayos de respirometría en Seahorse	22
Definición y alcance de la tesina	26
Objetivos	26
Materiales y métodos.....	27
Cultivos de <i>E. coli</i>	27
Prueba en Medio Mínimo de Succínico (SMM)	28
Cultivo de <i>C. elegans</i>	28
Sincronización de los nematodos.....	29
Cambio de dieta.....	29
Conteo de progenie	30
Obtención de ADN genómico.....	30
PCR.....	30
Respirometría en Seahorse.....	32

Resultados.....	34
<i>E. coli</i> GD1 no crece en Medio Mínimo Succínico.....	34
El mutante en <i>clk-1(qm30)</i> muestra interrupción del desarrollo en dieta sin UQ y retraso en el crecimiento	35
El doble mutante <i>clk-1;kynu-1</i> se desempeña peor que los mutantes por separado.	47
Respirometrías en Seahorse	52
Puesta a punto con N2.....	53
Optimización de la concentración de desacoplante e inhibidores del complejo IV y la ATP sintasa.....	54
Respirometrías en las distintas estirpes mutantes	57
Discusión.....	60
La UQ de la dieta es esencial en el mutante en <i>clk-1(qm30)</i> y el doble mutante <i>clk-1(qm30);kynu-1(tm4924)</i>	61
Las respirometrías en Seahorse aportaron una nueva perspectiva respecto al doble mutante <i>clk-1/kynu-1</i>	62
Perspectivas	63
Conclusiones.....	65
Bibliografía.....	65

Resumen

La ubiquinona (UQ) es un lípido esencial en la mayoría de los organismos, por su función como transportador de electrones en la cadena respiratoria mitocondrial, con un rol central para la fosforilación oxidativa, y como antioxidante en las membranas. La UQ proviene de la biosíntesis y en el caso del nematodo *C. elegans* también en pequeñas cantidades de la dieta basada en *E. coli*. Existen mutantes de este nematodo en la vía de biosíntesis de UQ, siendo el mutante en *clk-1* el más estudiado por ser el único viable y que además presenta mayor longevidad respecto a la estirpe silvestre (N2), siempre y cuando el alimento contenga una fuente de UQ. Con una dieta sin UQ el mutante en *clk-1* no completa su desarrollo y se detiene en el estadio larvario L2.

C. elegans cuenta con otra benzoquinona particular, la rodoquinona (RQ). Permite el funcionamiento en reversa de la succinato deshidrogenasa, es decir como fumarato reductasa, lo cual es de gran importancia en situaciones de hipoxia, donde la UQ no puede regenerarse. La RQ se encuentra en organismos que en alguna etapa de su vida habitan en atmósferas con baja tensión de oxígeno. En el caso de *C. elegans*, se ha especulado que podría ser útil en el estadio de resistencia, *dauer*, y para sobrevivir en ambientes con sulfuro o cianuro que pueden ser producidos por bacterias como *Pseudomonas spp.* La biosíntesis de RQ en *C. elegans* es a través de la vía de la kinurenina, cuyo precursor es el triptófano que también da lugar a la síntesis *de novo* de NAD⁺. La vía de biosíntesis de RQ comparte algunas enzimas con la biosíntesis de UQ, pero al contrario de ésta, no se ha definido cabalmente la importancia de la RQ. En el marco de esta tesina se evaluaron los fenotipos de los mutantes nulos en la biosíntesis de UQ (*clk-1(qm30)*), de RQ (*kynu-1(tm4924)*), y el doble mutante (*clk-1;kynu-1*), en dietas con y sin UQ, con el fin de estudiar qué procesos se ven afectados por la ausencia de estas benzoquinonas. Los resultados indican que a diferencia de los mutantes en *clk-1*, los mutantes en *kynu-1* pueden vivir aún con alimento sin UQ, en tanto el doble mutante puede reproducirse en dieta con UQ, pero exhibe fenotipos adicionales al mutante en *clk-1* (movimientos más lentos, mayor desincronización de los estadios y progenie temprana inviable) y también sufre un arresto larvario si se alimenta con dieta sin UQ. De forma complementaria se puso en marcha un protocolo de respirometría en los nematodos en el equipo Seahorse XF Pro Analyzer, con resultados preliminares que indican que el mutante en *clk-1* tiene una menor tasa de consumo de oxígeno (OCR) que N2, el mutante en *kynu-1* no exhibe diferencias

apreciables con N₂, pero el doble mutante tiene un OCR más alto que N₂, por lo que la falta de ambas benzoquinonas genera un nuevo fenotipo, resultado, que no podemos racionalizar sin nuevos experimentos que permitan disecar mejor el fenómeno observado.

Palabras clave: ubiquinona, rodoquinona, *C. elegans*, *clk-1*, *kynu-1*, respirometría, cadena de transporte de electrones

Introducción

Ubiquinona: importancia y funciones

La ubiquinona, coenzima Q o UQ es una benzoquinona muy importante en la producción de energía, presente en los tres dominios de lo viviente, dejando en evidencia su esencialidad en los organismos. Consta de una "cabeza" benzoquinona redox activa y una "cola" poliisoprenoide hidrofóbica, cuyo largo (número de unidades de isopreno) varía según las especies. En *Escherichia coli* tiene 8 unidades (UQ8), en *Saccharomyces cerevisiae* tiene 6 unidades (UQ6), en *Caenorhabditis elegans* es UQ9 y en humanos, la conocida UQ10. La región hidrofóbica le concede la capacidad de difundir libremente por las membranas, elemento clave para cumplir sus funciones. Tiene tres estados de oxidación: la forma reducida (ubiquinol, UQH₂), la forma intermedia (semiubiquinona, UQH•) y la forma totalmente oxidada (ubiquinona, UQ) (Figura 1) (revisado en Wang & Hekimi, 2019). La semiubiquinona es un radical relativamente estable, no oxidante, que puede reducir al oxígeno a superóxido (Cape et al., 2007). La generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) son habituales en la mitocondria y existen diversos mecanismos para evitar su daño y la propagación de reacciones radicalares, como son las superóxido dismutasas (SOD), capaces de transformar el superóxido en peróxido de hidrógeno (Turrens, 2003).

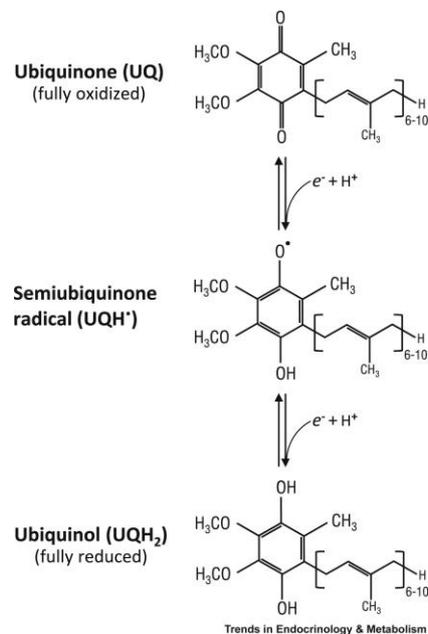


Figura 1: Estructura química y estados de oxidación de la ubiquinona. Se puede encontrar oxidada como ubiquinona, parcialmente reducida como el radical semiubiquinona o semiquinona y totalmente reducida como ubiquinol. Extraído de Wang & Hekimi, 2019.

La UQ tiene un rol esencial en la cadena respiratoria mitocondrial, donde actúa como transportadora de electrones desde los complejos I y II al III (revisado en Wang & Hekimi, 2013), mecanismo que es acoplado a la síntesis de ATP por fosforilación oxidativa. Además, la UQ tiene diversas funciones, ya que también actúa como antioxidante en las membranas celulares, regenerando al tocoferol (vitamina E) y al ácido ascórbico (vitamina C) para prevenir la lipoperoxidación, ayuda a regular la relación $[NAD^+]/[NADH]$ y media el metabolismo del sulfuro, la síntesis de pirimidinas, la β -oxidación de ácidos grasos y la oxidación de aminoácidos de cadena ramificada (Bentinger et al., 2010; Desbats et al., 2015).

Su biosíntesis se ha estudiado tanto en procariotas como en eucariotas. La mayoría de las enzimas involucradas son homólogas, derivadas de genes ortólogos, apoyando el origen ancestral común y conservación de dicha vía a lo largo de la evolución (Pierrel et al., 2022). Se ha visto que su deficiencia, por mutaciones que afecten la biosíntesis (deficiencias primarias de UQ), conlleva a serios problemas de salud, que en el ser humano y otros mamíferos son de manifestación clínica heterogénea. Para el ser humano, las patologías son compartidas con las de otras enfermedades mitocondriales en donde la cadena transportadora de electrones (CTE) se ve afectada (revisado en Desbats et al., 2015). En particular la deficiencia de UQ se encuentra asociada a encefalopatías, retraso mental, epilepsia, fallo renal, atrofia óptica, debilidad muscular y obesidad, entre otras. Dependiendo el gen y el grado de afectación, algunas de estas manifestaciones se logran revertir con un suplemento de UQ10, dado que pueden absorberse pequeñas cantidades de la dieta (revisado en Desbats et al., 2015).

Ubiquinona en la cadena respiratoria

Las cadenas respiratorias dependientes de UQ son similares entre organismos procariotas y eucariotas, con la gran diferencia que en los primeros ocurre asociada a la membrana plasmática, y en los últimos dentro de la mitocondria. Existen además otras CTEs que confieren ventajas adaptativas a distintos ambientes; en particular, la CTE dependiente de rodoquinona (RQ), en la que ahondaremos más adelante.

La cadena respiratoria típica consta de 4 complejos proteicos (I al IV) que generan un gradiente electroquímico utilizado para la síntesis de ATP por la ATP sintasa, muchas veces considerada como el complejo V (**Figura 2**). Estos complejos son transmembrana y en las células eucariotas, se encuentran en la membrana mitocondrial interna

(revisado en Wang & Hekimi, 2016). En la CTE el poder reductor (en forma de NADH) obtenido del catabolismo de nutrientes es oxidado a NAD^+ y los electrones son cedidos secuencialmente a la UQ, al Citocromo c (Cit c) y el último término al oxígeno, a través de los distintos complejos (I, III y IV respectivamente). El oxígeno es el aceptor final de electrones, que se reduce a agua. El complejo II, en tanto, recibe electrones del succinato y los cede a la UQ, aportando electrones a la CTE. La energía de este proceso es utilizada para el bombeo de protones al espacio intermembrana por los complejos I, III y IV y genera un gradiente electroquímico que puede ser utilizado como fuerza protón-motriz para impulsar la síntesis de ATP por fosforilación oxidativa (Cox & Nelson, 2008).

Así pues, la UQ interviene en los complejos I, II y III (**Figura 2**). En el complejo I (NADH deshidrogenasa) recibe dos electrones del NADH que los cede a la UQ, a través del FMN y los centros ferro-sulfurados (Fe-S). En ese proceso, el NADH se oxida a NAD^+ y la UQ en UQH_2 . Estos centros Fe-S aceptan y donan de a un electrón, lo que lleva tanto al FMN como a la UQ a formar radicales que pueden desencadenar la producción de ROS. El UQH_2 formado puede difundir hacia el complejo III para donar sus electrones al Cit c y permitir que más H^+ sean bombeados. El complejo II (succinato deshidrogenasa) es la única enzima del ciclo del ácido cítrico asociada a la membrana mitocondrial interna. La actividad succinato deshidrogenasa oxida el succinato a fumarato, al tiempo que reduce la UQ a UQH_2 , vinculando directamente el ciclo del ácido cítrico con la cadena respiratoria con el aporte de electrones. Tiene asociado al FAD, que transfiere electrones del succinato a la UQ, nuevamente por centros Fe-S (Cox & Nelson, 2008). La UQ también recibe electrones de otras fuentes, como de la β -oxidación de ácidos grasos y del catabolismo de aminoácidos de cadena ramificada a través de la flavoproteína de transferencia de electrones deshidrogenasa (ETFDH) o de forma directa como de la dihidroorotato deshidrogenasa (DHODH) involucrada en la biosíntesis de pirimidinas, glicerol 3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH) de la glucólisis y gluconeogénesis, colina deshidrogenasa (CHDH) del metabolismo de la glicina y de la sulfuro quinona oxidoreductasa (SQR), enzima esencial para la detoxificación del sulfuro (**Figura 2**) (revisado en Wang & Hekimi, 2016). Estas enzimas y complejos enzimáticos reducen UQ a UQH_2 que lleva los electrones hasta el complejo III (ubiquinona-citocromo c oxidoreductasa) donde los cede, a través de grupos hemo y centros Fe-S, al Cit c, un transportador de electrones proteico que en eucariotas se

encuentra en el espacio intermembrana de la mitocondria. El complejo tiene dos cavidades, que le permiten a la UQ el libre pasaje entre las caras de la membrana mitocondrial interna, proceso por el cual transfiere sus electrones al Cit c. En el marco de dicho proceso, se propuso el ciclo de la UQ, en el que se necesitan 2 Cit c para oxidar una molécula de UQH₂. Ocurre en dos pasos: en el primero un UQH₂ dona un electrón al Cit c y el segundo electrón a UQ, para formar UQH• y el consecuente bombeo de H⁺; el segundo paso, requiere una segunda molécula de UQH₂ que da un electrón a un Cit c y el otro al UQH• formado anteriormente, nuevamente con el bombeo de H⁺ (Cox & Nelson, 2008). El Cit c reducido lleva sus electrones al complejo IV (citocromo oxidasa); dentro de este complejo los electrones viajan por grupos hemo y centros Fe-Cu, para ser utilizados en la reducción de O₂ a H₂O.

Los protones translocados al espacio intermembrana son mayoritariamente aprovechados por la ATP sintasa, que utiliza energía del gradiente protón motriz para la síntesis de ATP. La cadena de transporte de electrones asociada a la síntesis de ATP se denomina fosforilación oxidativa y es un proceso fundamental en la obtención de energía para la mayoría de los organismos aeróbicos (Cox & Nelson, 2008). La fuerza protón motriz también es utilizada para impulsar otros procesos, como por ejemplo la rotación del flagelo en bacterias o el cotransporte de solutos en la membrana mitocondrial interna.

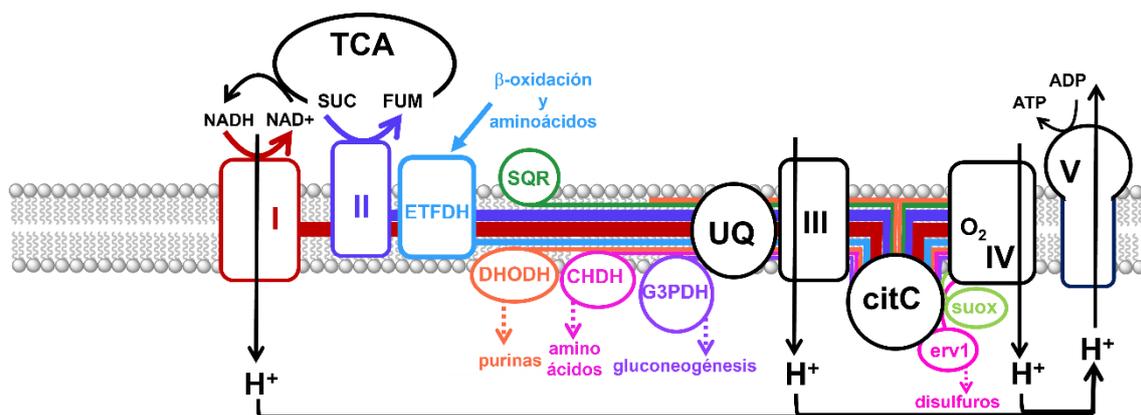


Figura 2: Cadena transportadora de electrones mitocondrial. Los complejos I, III y IV son transmembrana y bombean protones al espacio intermembrana, mientras que el complejo V utiliza la energía protón-motriz para la síntesis de ATP por fosforilación oxidativa. La UQ tiene un rol central en el transporte de electrones, aceptando electrones de distintas vías metabólicas para llevarlos al citocromo c en el complejo IV. Otras enzimas como dihidroorotato deshidrogenasa (DHOD), colina deshidrogenasa (CHDH), glicerol 3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH), sulfuro quinona oxidoreductasa (SQR) y complejos multienzimáticos como la flavoproteína de transferencia de electrones deshidrogenasa (ETFDH) entregan electrones a la CTE a través de la UQ. Por último, la CTE también se alimenta de electrones a nivel del Cit c, que

además de recibir electrones de UQH₂, recibe de la sulfito oxidasa (SUOX) y ERV-1 que participa en la formación de disulfuros en la mitocondria.

En resumen, la UQ es un lípido esencial para la mayoría de los organismos, ocupando un rol central en el transporte de electrones, al ser un nodo donde se vierten electrones de diferentes fuentes y en último término de distintas vías metabólicas. Esto causa que su ausencia o deficiencia genere diversos problemas. Esclarecer su biosíntesis y mecanismos en los que participa ayuda a la comprensión y búsqueda de tratamientos para las patologías asociadas a la falta de UQ. La biosíntesis de UQ (y su malfuncionamiento) ejemplifica la complejidad de fenotipos que pueden involucrar diferentes genes, de que un gen esté involucrado en diversos fenotipos y de interacciones génicas. Para entender esta complejidad el uso de modelos animales, puede ser clave, por la posibilidad que estos organismos ofrecen de interrogarlos experimentalmente a nivel orgánico. Entre esos, existe un organismo que a pesar de su simpleza comparte una gran semejanza a nivel genético con los humanos: el nematodo *C. elegans*.

C. elegans como el organismo modelo animal más sencillo

El nematodo *Caenorhabditis elegans* es un excelente modelo animal por una serie de atributos y ventajas que se mencionan a continuación. Es un gusano de vida libre, del filo *Nematoda*, pequeño y transparente, con un ciclo de vida corto, que desde el huevo hasta el estadio adulto demora tan sólo 3 días (**Figura 3**). Durante su desarrollo atraviesa 4 estadios larvarios (L1, L2, L3 y L4) definidos por el cambio de la cutícula del gusano. Puede tener un estado larvario alternativo, de resistencia, que ocurre bajo condiciones de estrés como puede ser la falta de alimento en L1-L2 (**Figura 3**). Esta fase es conocida como "dauer", que significa "duradero" en alemán. En *dauer*, la cutícula cubre la boca de la larva, impidiendo la alimentación y arrestando su crecimiento, además de proporcionarle mayor protección al ambiente (Corsi et al., 2015). Estas larvas pueden sobrevivir varios meses y al mejorar las condiciones ambientales, como puede ser el aumento del alimento o humedad, reanudan su desarrollo hacia L4 (**Figura 3**) (Corsi et al., 2015; Hu, 2007). En las condiciones de cultivo en laboratorio, la progenie es numerosa (del orden de 300 huevos por gusano adulto) lo cual facilita el mantenimiento y los estudios estadísticos. Pueden ser criopreservados a -70°C, simplificando su almacenamiento. Fue el primer animal en ser completamente secuenciado y es un organismo muy fácil de manipular genéticamente, con

disponibilidad de colecciones de estirpes mutantes, transgénicas y de bibliotecas de clones interferentes de la expresión génica (The *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998). Es eutélico, donde el gusano adulto tiene tan solo 959 células, de las cuales se conoce su linaje completo. Forman tejidos y órganos, en particular se destaca su sistema nervioso, compuesto por 302 neuronas de las que se conoce las conexiones que establecen (Corsi et al., 2015; White et al., 1986). Este sistema nervioso permite variedad de comportamientos respondiendo a cambios de temperatura, alimento, olor, tacto e incluso algunos más complejos como aprendizaje, memoria y comportamientos sociales, que han sido estudiados mayoritariamente a través de mutantes donde éstos se ven afectados (Brenner, 1974; Rankin, 2002).

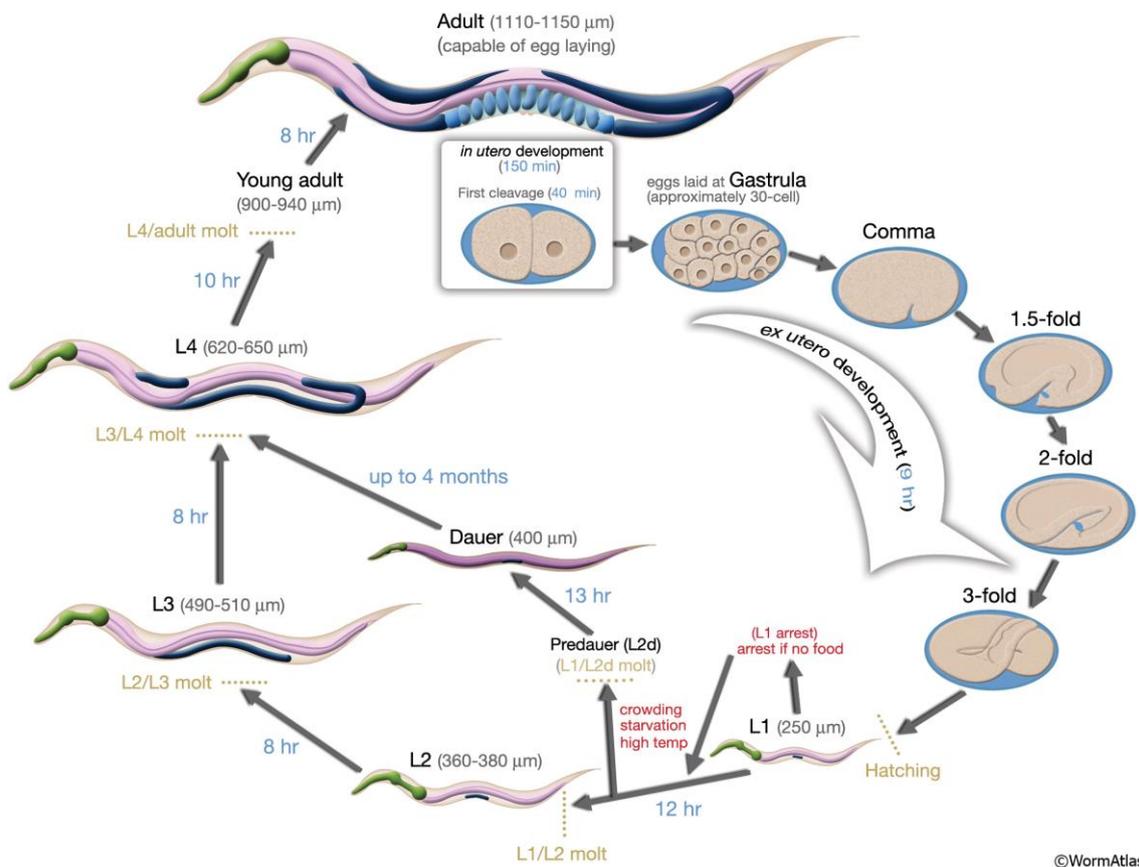


Figura 3: Ciclo de vida del *C. elegans* a 22°C. Se indican las fases del ciclo, junto con los tiempos de desarrollo de cada fase y la longitud del gusano. Los huevos son depositados en estadio de 24-30 células, que eclosiona con 558 células en una L1. Los tiempos de desarrollo dependen de la temperatura, cuyo rango ideal es entre 16°C y 25°C. A 20°C, las L1 en 3 días llegan a adultos grávidos y ponen huevos durante los próximos 2 a 3 días. El estadio dauer es alternativo a L2-L3, ocurre bajo condiciones desfavorables, como poco alimento y permite la resistencia de esas larvas hasta que las condiciones ambientales sean favorables. Extraído de *WormAtlas* (Altun & Hall, 2024).

Típicamente se encuentra el organismo hermafrodita que cuenta con la ventaja de la autofecundación. Igualmente, la especie posee dimorfismo sexual y los machos (genéticamente haploides para el cromosoma sexual X0) ocurren en baja proporción (0.1%), que aumenta bajo condiciones de estrés para promover la variabilidad de las crías. (Corsi et al., 2015). La existencia de hermafroditas y machos conlleva la ventaja de poder realizar cruces cuando es conveniente, pero no de rutina; en otras palabras, los machos funcionan como vehículo de mutaciones en los cruces con hermafroditas.

Volviendo sobre la transparencia del gusano, sus órganos y huevos pueden verse en un microscopio de campo claro o incluso bajo una lupa. La microscopía de fluorescencia es una técnica ampliamente aplicada en estos gusanos, ya que, además, es fácil generar reporteros con proteínas fluorescentes, así como la transgénesis, por medio de microinyección del constructo en la línea germinal (Boulin et al., 2006). De hecho, *C. elegans* fue el organismo pionero para el uso de las proteínas fluorescentes para el estudio de procesos biológicos in vivo (Chalfie, 1995). Otra técnica de manipulación genética es el ARN de interferencia (ARNi), utilizado para generar *knock-downs* en genes, lo cual resulta sencillo de manipular ya que *C. elegans* toma el ARN de la dieta (Timmons & Fire, 1998).

Por último, y nada menor, son de cultivo y mantenimiento sencillo: se cultivan en placas de Petri con NGM (nematode growth media) agar o en medio líquido con NGM y se alimentan usualmente con *E. coli*, en particular con la cepa OP50 que tiene una auxotrofia para uracilo, ideal para que no sobrecrezcan en el cultivo con los gusanos. Todo esto lo hace un modelo muy sólido y conveniente en diversas áreas como biología del desarrollo, neurociencia, bioquímica, farmacología, con el consecuente impacto en la medicina (Corsi et al., 2015; Meneely et al., 2019). De forma más específica, este organismo se ha utilizado para comprender la síntesis y funciones de la UQ y de la benzoquinona relacionada, RQ; sobre esta lo que profundizaremos en la siguiente sección.

C. elegans como helminto modelo

C. elegans es un nematodo de vida libre, que comparte muchas características con los helmintos. Esto lo hace un excelente modelo, por ejemplo, para el estudio de la acción de fármacos antihelmínticos, simplificando los ensayos (Burns et al., 2015).

Los helmintos son gusanos parásitos, muchos de ellos nematodos, aunque existen helmintos pertenecientes a otros *phyla*. Muchos helmintos tienen parte de su ciclo de vida en condiciones de hipoxia en el interior de sus hospederos, particularmente en el intestino. Como organismo de vida libre, *C. elegans* no tiene este requerimiento, pero en su hábitat natural (materia orgánica en descomposición), se enfrenta a microorganismos patógenos, entre los cuales algunos como *Pseudomonas aeruginosa* producen cianuro que inhibe la cadena respiratoria convencional al nivel del complejo IV (Gallagher & Manoil, 2001). *C. elegans*, los helmintos y otros linajes animales adaptados a condiciones de hipoxia (por ejemplo, anélidos y bivalvos) cuentan con una benzoquinona particularmente útil: RQ (**Figura 4**). Por su potencial de reducción estándar (E° RQ/RQH₂ = -63 mV) (comparado a los 43 mV de UQ/UQH₂) (Erabi et al., 1975) facilita el funcionamiento del complejo II en reversa, es decir, reduciendo el fumarato a succinato, ya que el potencial de reducción fumarato/succinato es de 30 mV. El rodoquinol (RQH₂) es regenerado por el NADH cuyo potencial de reducción NAD⁺/NADH es de -320 mV, a través del complejo I. Así, con una CTE mínima, que involucra los complejos I y II, y en la que NADH cede electrones y el fumarato los acepta, es posible regenerar el NAD⁺, permitiendo que continúe el bombeo de H⁺ al espacio intermembrana por parte del complejo I (**Figura 4**). Como se puede deducir, en el caso de ausencia de oxígeno o inhibición de la CTE a nivel de los complejos III y IV, se mantendrá una mínima síntesis de ATP, que, si bien es menor que en la respiración, es mayor que contar la fermentación láctica como única fuente de ATP (Del Borrello et al., 2019; Takamiya et al., 1999). A este tipo de CTE asociada a síntesis de ATP a veces se la conoce como "respiración anaerobia", aunque si bien hay una CTE, en términos estrictos es una fermentación, ya que el aceptor final de electrones de la CTE es sintetizado por el organismo, a través de la vía de dismutación del malato (Müller et al., 2012). También se ha especulado que la RQ podría ser relevante en el estadio *dauer*, ya que este estadio es más resistente a la hipoxia y se piensa que la tensión de oxígeno interna sería baja (Braeckman et al., 2008; Shen et al., 2005).

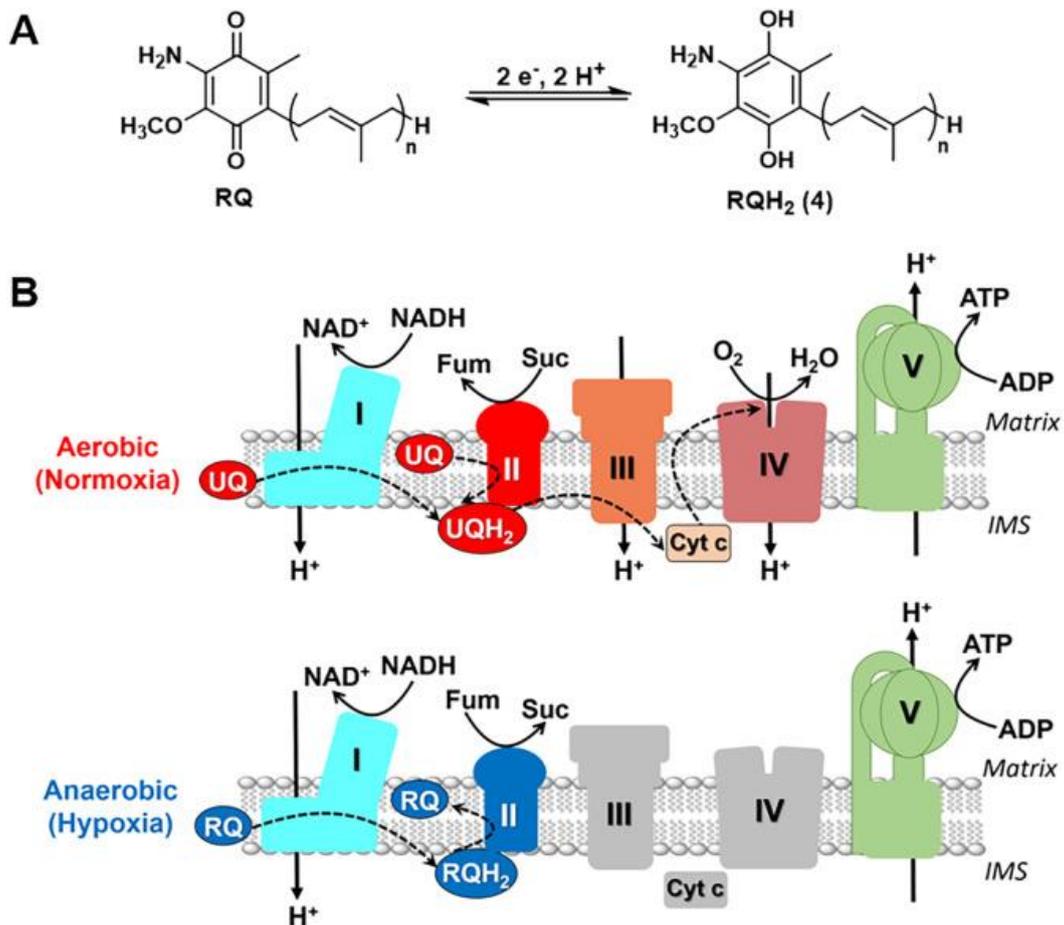


Figura 4: Rodoquinona como benzoquinona alternativa a UQ. A) RQ contiene un amino en la posición 2, que lo diferencia del metoxilo presente en UQ. Puede aceptar dos electrones y adquirir la forma reducida, rodoquinol (RQH₂). B) Funcionamiento de la CTE en normoxia (con UQ) y en hipoxia (con RQ). RQ facilita el funcionamiento del complejo II en reversa, así el complejo I regenera NAD⁺ y bombea H⁺ al espacio intermembrana (IMS). Extraído de (Salinas et al., 2020).

La RQ se ha encontrado en procariontas, donde su síntesis depende de la enzima RquA que permite la transformación de UQ en RQ (Campbell et al., 2019). Ésta es la única enzima que se ha encontrado como responsable de la biosíntesis de RQ y al expresarla de forma heteróloga en especies como *E. coli* que no sintetizan RQ, se ve la transformación de UQ a RQ (Bernert et al., 2019). Sin embargo, en *C. elegans* (así como en el resto de los helmintos, moluscos y anélidos) el gen *rquA* no se ha encontrado y la vía de síntesis es distinta; es a través de la vía de la kinurenina, que en *C. elegans* y otros organismos también se encarga de la síntesis *de novo* de NAD⁺ (Roberts Buceta et al., 2019; Salinas et al., 2020). Aún no se conocen todos los pasos de dicha vía, pero sí que comparte enzimas con la vía de síntesis de la UQ y recientemente se descubrió en un trabajo realizado en nuestro laboratorio que solo los organismos que sintetizan UQ y RQ tienen dos formas de splicing del gen *coq-2*, que son las que discriminan entre los precursores de ambas benzoquinonas en su biosíntesis (Tan et al., 2020).

Biosíntesis de UQ en organismos procariotas y eucariotas

La síntesis de UQ en procariotas y eucariotas tiene similitudes en cuanto a los pasos y las enzimas que la componen; es una vía muy conservada, lo que ha permitido dilucidar la vía a través de mutantes de *E. coli* y *Saccharomyces cerevisiae* en donde se han encontrado homologías (**Figura 5**) (Kawamukai, 2002; Pierrel et al., 2022). En *E. coli* (y en general procariotas) los genes son nombrados como *ubi*, mientras que en *S. cerevisiae* (y más en general en eucariotas) se denominan *coq*. El precursor es el ácido 4-hidroxibenzoico (4HB), que en procariotas deriva del corismato y en eucariotas de la tirosina, aunque en el caso de *S. cerevisiae* también del ácido para-aminobenzoico (pABA) (Marbois et al., 2010). Al anillo aromático se le añade la cola isoprenoide, que proviene de la vía del mevalonato en el caso de eucariotas. Ambos precursores son formados en el citosol, pero la unión del anillo con la cola isoprenoide, catalizado por COQ-2, así como los pasos posteriores ocurren en la membrana mitocondrial interna, donde se encuentra el complejo proteico llamado CoQ-sintoma (COQ-3-COQ-9) (**Figura 5**). En el caso de *E. coli*, las proteínas UbiE-UbiK que conforman un metabolón soluble, del que se conoce la función de la mayoría de las proteínas (**Figura 5**). Este metabolón no sólo cumple funciones catalíticas, sino que también mantiene cerca a los sustratos y promueve la catálisis por parte de las otras proteínas del complejo. El anillo aromático sufre varias modificaciones: descarboxilaciones, hidroxilaciones y metilaciones (revisado en Wang & Hekimi, 2019).

sufren la interrupción de su desarrollo en fases larvarias L1-L4 según el gen afectado (Gavilán et al., 2005). Dentro de los fenotipos observados se encuentra la parálisis, pérdida de coordinación motora, muerte de neuronas y defecto en la puesta de huevos en el caso de hermafroditas heterocigotas (Earls et al., 2010; Wang & Hekimi, 2013). Este panorama indica que, en términos generales, la pérdida por completo la síntesis de UQ y/o la acumulación de intermediarios es letal, y que la UQ de la dieta no es suficiente para revertir este fenómeno. Una forma que se ha utilizado para estudiar la relevancia de estos genes es interfiriendo su expresión por ARNi, donde la síntesis de UQ no se bloquea totalmente y permite que el gusano se desarrolle (Rodríguez-Aguilera et al., 2003). El único *knock out* de *C. elegans* que se conoce que puede vivir sin sintetizar UQ es el mutante en *clk-1* (homólogo de *coq-7* de levadura) (Jonassen et al., 1998, 2001). Su producto codifica para una hidroxilasa que cataliza el penúltimo paso en la biosíntesis, hidroxilando en la posición 6 del anillo (**Figura 5**). Este mutante acumula al precursor DMQ9 en grandes cantidades, y ha sido ampliamente estudiado ya que además de ser viable y fértil, es más longevo (revisado en Wang & Hekimi, 2013).

El mutante en *clk-1* no sintetiza UQ, pero sí RQ

El mutante en *clk-1* ha permitido estudiar las funciones de la UQ en el gusano y qué ocurre cuando no se encuentra presente. Este gen solo afecta a la biosíntesis de UQ, sin afectar la de RQ (Jonassen et al., 2001). Se han obtenidos varios alelos distintos, por ejemplo, el *e2519* contiene una mutación puntual que introduce un codón de terminación prematuro, lo que la hace fácil de revertir (Hihi et al., 2003) y no es tan confiable como el *qm30* que contiene una deleción de 591 pb, que será el utilizado en este trabajo. La deleción que contiene el alelo *qm30* abarca la última sección de la región codificante, afectando a 35 aminoácidos, el codón de terminación y la región 3'-UTR (Hihi et al., 2003). La cepa que contiene este alelo en homocigosis es MQ130. Estos mutantes bajo dieta de *E. coli* OP50 no tienen mayores dificultades. El fenotipo más intrigante es el de mayor longevidad, pudiendo vivir un máximo de 46 días, en contraste con los 27 días de la estirpe silvestre N2 (Wong et al., 1995). Otros fenotipos incluyen movimientos, defecación y el bombeo faríngeo (*pumping*) más lentos y aproximadamente un tercio de la progenie respecto a N2 (Wong et al., 1995). De L1 a adulto grávido, tienen un retraso en el desarrollo de aproximadamente 24 hs respecto a N2 y se observa una leve desincronización durante el desarrollo. Algunos de los

mutantes en *clk-1(qm30)* tienen un desarrollo embrionario más rápido que N2, mientras que otros son más lentos, sin haber una tendencia clara y la distribución que se obtiene no es gaussiana (Wong et al., 1995). Como se puede ver, este gen tiene un fuerte rol en el reloj biológico del gusano, de ahí el nombre *clk-1* (Wong et al., 1995).

Aunque el mutante *clk-1(qm30)* es incapaz de sintetizar UQ, durante mucho tiempo no se había reparado en que el gusano podía tomar UQ de la dieta. Esto generó dudas del rol de CLK-1 en la síntesis de UQ (Felkai et al., 1999). Con el fin de estudiar al gusano sin UQ, se utilizaron cepas mutantes de *E. coli* que no sintetizan UQ, como la anteriormente mencionada, GD1. Así es como se vio que el mutante en *clk-1(qm30)* no puede continuar su desarrollo si no obtiene ningún tipo de UQ, deteniéndose en L2 (Jonassen et al., 2001), demostrando finalmente el rol de CLK-1 en la biosíntesis de UQ. En un trabajo se menciona que, alimentados con GD1, los gusanos eventualmente retoman su desarrollo hacia adultos estériles, luego de una semana (Burgess et al., 2003). Durante L2 los gusanos N2, aumentan considerablemente la concentración de UQ por lo que parece haber un mayor requerimiento de UQ en esta etapa del desarrollo, siendo coherente con el arresto observado en L2 (Jonassen et al., 2002), pero la causa de este aumento se desconoce. La incorporación de UQ8 de *E. coli* y UQ en forma de suplemento en las mitocondrias de *C. elegans* ha sido reportada (Jonassen et al., 2002; Saiki et al., 2008), funcionando como rescate de la interrupción del desarrollo, además de ver que el largo de la cadena de la UQ es importante, ya que en el caso de UQ7 no es tan bien aceptada, dando lugar a malformación en las gónadas, huevos inviables e infertilidad en general (Jonassen et al., 2003). Esto prueba el rol de la dieta en el gusano. Por otro lado, se pueden realizar cambios a dieta sin UQ, posteriores a L2 para no sufrir el arresto en el desarrollo. Si el pasaje a dieta sin UQ es luego de L4, el desarrollo continúa de forma normal y los adultos pueden vivir en una dieta sin UQ sin fenotipos adicionales (Jonassen et al., 2001).

Al estudiar otros mutantes en la vía de biosíntesis de UQ y ver que no eran viables (Gavilán et al., 2005), se estudió la posible función del precursor que acumulan los mutantes en *clk-1*. Este precursor fue propiamente identificado como DMQ9 en el trabajo de Miyadera et al., 2001, pero ya había sido observado en Jonassen et al., 2001. Según se ha visto, DMQ9 puede tomar algunas de las funciones de la UQ, siendo complejo su papel en la CTE, donde actúa como transportador de electrones entre el complejo II-III, pero como inhibidor o competidor entre el complejo I-III (Yang et al.,

2011). Esto puede deberse a diferencias en la especificidad de los sitios activos de los diferentes complejos (Yang et al., 2011). El hecho de que los mutantes en *clk-1* sobrevivan, mientras que otros mutantes en la biosíntesis no, apunta a que DMQ9 no es tóxica y se ha propuesto que es esencial en estos mutantes, sustituyendo en algunos roles a la UQ y permitiendo que el mutante sobreviva junto con la UQ dietaria, cosa que no ocurre en los otros mutantes de la vía de la UQ (Jonassen et al., 2002). La RQ tampoco se consideró que pudiera contribuir a la viabilidad del mutante en *clk-1* y es un detalle no menor, ya que este mutante no tiene la biosíntesis de RQ afectada, pero los gusanos interferidos con otros genes *coq* (*coq-1*, *coq-2* y *coq-3*) tienen afectada la biosíntesis de las dos benzoquinonas. De hecho, cuando se comenzó a estudiar, se creyó que DMQ9 era un precursor común a ambas benzoquinonas (Roberts Buceta et al., 2019). En el mutante en *clk-1*, la RQ se encuentra en mayor concentración y se especula si es de utilidad para compensar la falta de UQ endógena (Jonassen et al., 2001). Su contribución aún no ha sido estudiada. Es de interés estudiar cómo es la respiración en el mutante en *clk-1*, ver si logran respirar como lo hacen los N2, al contar con UQ8 y DMQ9 o sólo con DMQ9, en el caso de dieta sin UQ8.

Bioíntesis de RQ en *C. elegans*

La vía de biosíntesis de RQ en animales fue un enigma no resuelto por décadas y todavía no dilucidado por completo, aunque se realizaron importantes avances en los últimos años. En simultáneo, nuestro grupo y el de Andy Fraser (Del Borrello et al., 2019; Roberts Buceta et al., 2019) demostraron que en *C. elegans* la RQ no deriva de la UQ como en las bacterias, sino que el sustituyente amino del anillo aromático proviene de la vía de la kinurenina, vía catabólica del triptófano, también involucrada en la síntesis de NAD⁺ *de novo* (Figura 6). La delección del gen *kynu-1* que codifica para una kinureninasa elimina por completo la biosíntesis de RQ, pero no afecta a la de UQ. KYNU-1 cataliza la transformación de L-kinurenina a ácido antranílico y la de 3-hidroxi-L-kinurenina a ácido 3-hidroxiantranílico, siendo estas arilaminas las precursoras de RQ.

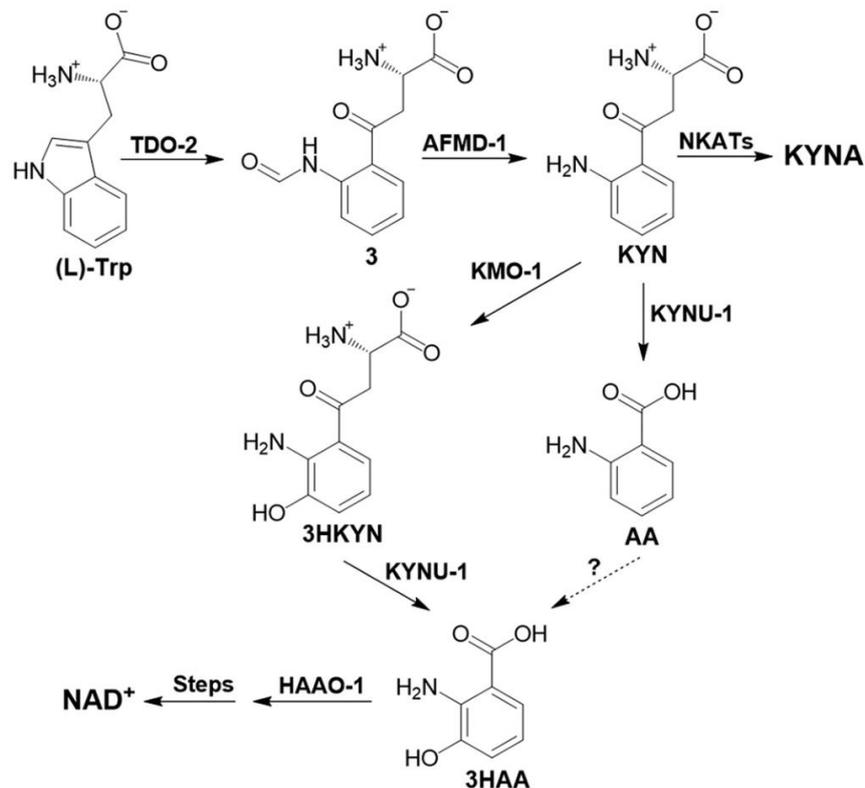


Figura 6: Vía de la kinurenina comienza en el triptófano que da lugar a los precursores de la vía de biosíntesis de RQ y NAD^+ *de novo*. A partir del ácido 3-hidroxiantranílico (3HAA) las vías de biosíntesis se separan. Extraído de (Roberts Buceta et al., 2019).

Más adelante, las enzimas de la biosíntesis de ambas benzoquinonas son compartidas, como es el caso de los genes *coq-3*, *coq-5* y *coq-6* que de ser interferidos en su expresión se ven afectados los niveles de ambas benzoquinonas (RQ y UQ) (Roberts Buceta et al., 2019). El punto interesante se encuentra en el gen *coq-2*, más específicamente en el exón 6, donde *C. elegans* cuenta con 2 variantes de splicing: 2a y 2e (Tan et al., 2020). COQ-2a toma como sustrato al ácido 4-hidroxibenzoico (4HB) y cataliza la adición de la cola isoprenoide, precursor de la UQ. Por otro lado, COQ-2e, reconoce al ácido 4-hidroxiantranílico (4HA) como sustrato, dando lugar a la síntesis de RQ. Al generar mutantes en estos exones por separado se ve cómo se produce solo UQ en $\Delta coq-2e$, mientras que $\Delta coq-2a$ produce muy poca UQ y más RQ (**Figura 7**) (Tan et al., 2020). Es importante aclarar que, aunque existen mutantes para *coq-2a* y *coq-2e*, consisten en la delección de un único exón, que se podrían revertir más fácilmente que los mutantes nulos de *clk-1* y *kynu-1* o que mantienen una mínima síntesis de las benzoquinonas, por lo que para la tesina se optó por el mutante en *clk-1(qm30)* para UQ y el mutante en *kynu-1(tm4924)* para RQ.

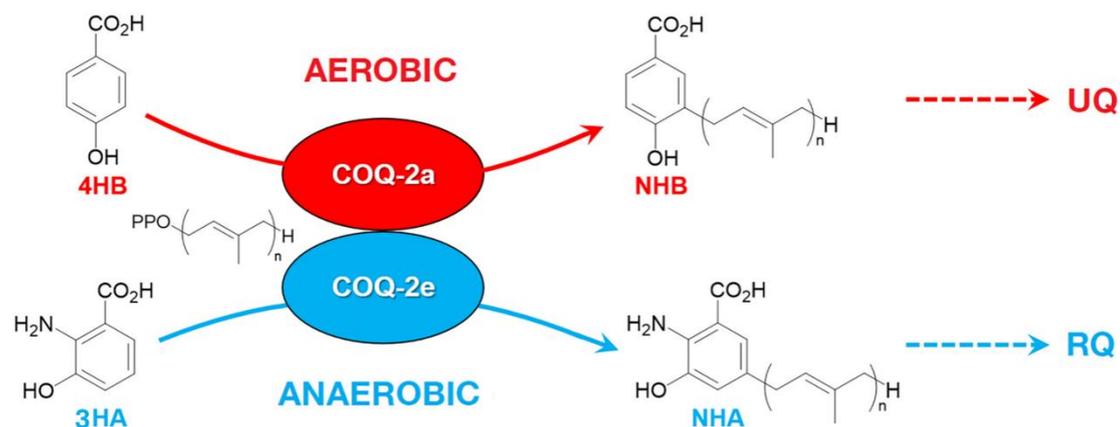


Figura 7: Las isoformas de COQ-2 reconocen los precursores de las benzoquinonas y catalizan el agregado de la cola hidrofóbica. COQ-2a reconoce al ácido 4-hidroxibenzoico (4HB) que dará lugar a UQ. COQ-2e toma como sustrato al ácido 3-hidroxiantranílico (3HA) para permitir la síntesis de RQ. Extraído de (Tan et al., 2020).

El mutante en *kynu-1* no sintetiza RQ

Con el fin de estudiar la influencia de la RQ, se cuenta con el mutante en *kynu-1*, que afecta la vía de la kinurenina. El alelo *tm4924* tiene una delección de 521 pb con una inserción de 19 pb, lo cual afecta 3 exones del gen y se generó en el marco de un proyecto donde se busca generar *knock-outs* para todos los genes del *C. elegans* (Barstead et al., 2012). La cepa que contiene este alelo en homocigosis es OW454. Este mutante no puede sintetizar RQ9, y tampoco sintetiza NAD^+ *de novo*, así que los fenotipos que se observen también pueden ser a causa de la deficiencia en NAD . No hay una descriptiva exhaustiva del mutante en general; en el artículo de (McReynolds et al., 2017) se reporta una menor progenie en el mutante, comparado con N2 que se revierte cuando se suplementa con ácido quinolínico, metabolito que no participa de la biosíntesis de RQ, pero sí en la de NAD^+ , por lo que RQ9 no tendría un rol en la disminución de la progenie. Sería interesante estudiar la respiración de los mutantes en *kynu-1(tm4924)*, al no tener RQ podría plantearse que la cadena respiratoria solo con UQ puede funcionar a pleno. La existencia de las dos benzoquinonas abre interrogantes en relación con cuáles funciones de la UQ pueden ser cubiertas por la RQ y en qué condiciones la RQ se vuelve esencial.

El doble mutante en *clk-1* y *kynu-1* vive

Una nueva posibilidad apareció cuando se logró obtener el doble mutante para *clk-1* y *kynu-1* cruzando las estirpes que portan los alelos *qm30* y *tm4924* respectivamente,

ambos en homocigosis. Curiosamente, este mutante que no sintetiza ni UQ ni RQ, sobrevive y completa su ciclo de vida con la dieta con OP50 (contiene UQ), pero se abre la interrogante de cómo la deficiencia de ambas quinonas afecta el desarrollo y la progenie al ser alimentados con GD1 (que no sintetiza UQ) y de cómo se verá afectada su respiración. De este mutante no se ha estudiado nada aún.

Rol de la dieta

Hasta ahora se ha hablado del rol de la dieta en los mutantes, pero se reporta que en el caso de N2, la dieta de GD1 aumenta la longevidad en dicha cepa (Saiki et al., 2008), algo no asociado directamente a la UQ, sino al estado en que se encuentran estas bacterias, que podría facilitar la digestión por parte del gusano.

El rol de UQ de la dieta en los mutantes en la vía de biosíntesis de estas quinonas no es trivial, ya que permite que el mutante *clk-1(qm30)* y el doble mutante *clk-1(qm30);kynu-1(tm4924)* se desarrollen y sean fértiles. Para estudiar los fenotipos y la necesidad de la UQ en el desarrollo se realizaron cambios de dieta en distintos estadios larvarios. Si bien del mutante en *clk-1* hay extensa literatura, y por lo tanto funciona como un control, del mutante en *kynu-1* y del doble mutante *clk-1;kynu-1* se conoce realmente muy poco.

Ensayos de respirometría en Seahorse

Las respirometrías permiten estudiar el consumo de oxígeno de las células u organismos enteros en el caso de *C. elegans*, en el tiempo. Dado que hay pocos estudios sobre respirometría en *C. elegans* usando Seahorse, al tiempo que esta técnica no estaba puesta a punto en el laboratorio previo al inicio de esta Tesina, entendimos pertinente incluir aquí una breve introducción metodológica sobre estos ensayos.

La pendiente obtenida, normalizada por el número de células (en nuestro caso de gusanos) es el OCR (oxygen consumption rate). Este ensayo permite observar las diferencias en la respiración de los distintos mutantes respecto a N2, lo que ayudará a entender el rol de la UQ y RQ, así como de la UQ bacteriana en el metabolismo de los gusanos en condiciones aeróbicas. Se utilizará el equipo *Seahorse XF Pro Analyzer*, que funciona con placas de 96 pocillos, sobre el cual se coloca un cartucho que contiene sensores individuales que funcionan con *quenching* de fluoróforos que son sensibles a O₂ o H⁺. Para medir, el cartucho desciende y se forma una microcámara entre el pocillo

y el sensor. El cartucho, además del sensor, contiene 4 puertos por pocillo, que permiten cargar sustancias para ser inyectadas en el transcurso de los experimentos (Figura 8). En este caso serán distintos compuestos para obtener parámetros adicionales; por ejemplo, el uso de azida de sodio, que inhibe la CTE, para obtener el consumo de oxígeno no mitocondrial (Dranka et al., 2011). El sensor también cuenta con la capacidad de medir la tasa de acidificación extracelular (ECAR) que es útil para entender los procesos metabólicos que ocurren, como puede ser la producción de ácido láctico en procesos de fermentación. Al utilizar el organismo completo, es difícil lograr cambios en el pH de la del medio y asociarlos con vías metabólicas específicas del organismo, como la vía glicolítica (Koopman et al., 2016).

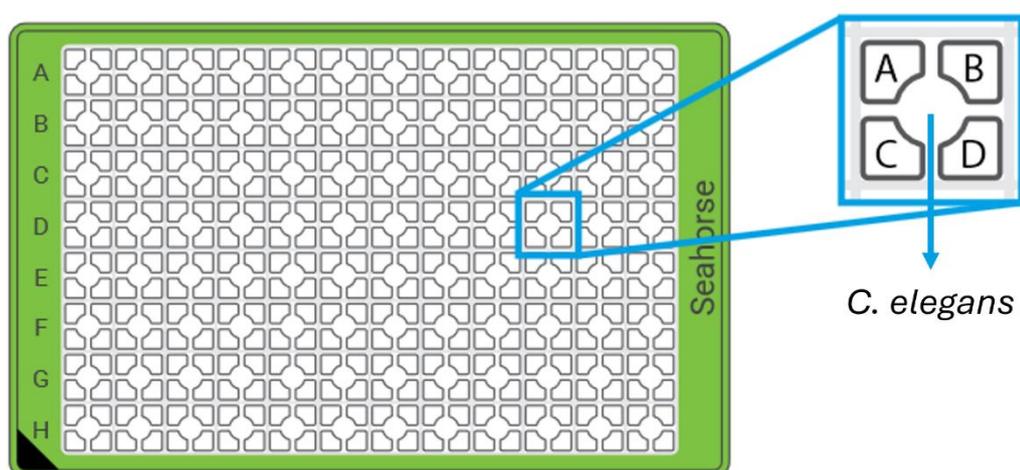


Figura 8: Esquema de la placa con sus respectivos puertos. Modificado de How to Run an Assay | Agilent.

Este kit está diseñado para su uso con cultivos celulares, donde las células son capaces de adherirse a los pocillos, cosa que no ocurre con los gusanos que nadan en el medio líquido por lo que se necesita adaptar el protocolo para su funcionamiento en *C. elegans*. Al momento existen otros métodos para medir el consumo de oxígeno en los nematodos, como el tradicional electrodo de Clark, donde la ventaja que ofrece el Seahorse no es menor; el electrodo de Clark requiere al menos 2000 gusanos por medida, mientras que el Seahorse funciona bien en un rango de 5 a 25 gusanos por pocillo, y el formato en placa de 96 permite realizar réplicas y ensayar distintas condiciones simultáneamente en un mismo ensayo. (Koopman et al., 2016).

Dentro de los compuestos usualmente utilizados en respirometrías se encuentran: I) oligomicina como inhibidor de la ATP sintasa, en la subunidad F₀, II) FCCP como desacoplante de la CTE, lo que permite el retorno de protones a la matriz mitocondrial sin pasar por la ATP sintasa y III) rotenona y antimicina A que son inhibidores de los complejos I y III respectivamente y funcionan como inhibidores completos de la respiración. Para *C. elegans* se ha visto que tanto oligomicina como rotenona/antimicina A no funcionan en el gusano ya que no logran penetrar la cutícula de este. Para ello se toma como alternativa a la oligomicina al DCCD y en lugar de rotenona/antimicina A se utiliza azida de sodio (Koopman et al., 2016; Luz, Smith, et al., 2015). El DCCD inhibe tanto la subunidad F₀ como la F₁, pero carece de la especificidad de la oligomicina, ya que también puede inhibir otras ATPasas que acoplan la hidrólisis de ATP al pasaje de protones en contra del gradiente electroquímico (Luz, Smith, et al., 2015). La concentración de DCCD aún no se encuentra optimizada y además se ha visto que causa interferencias con el FCCP, por lo que no se pueden utilizar en conjunto (Luz, Rooney, et al., 2015). La azida de sodio inhibe en particular el complejo IV de la cadena respiratoria mitocondrial, por lo que impide la reducción de oxígeno a agua.

La azida de sodio es un inhibidor muy importante en el ensayo ya que permite obtener el consumo de oxígeno residual, no mitocondrial. Este valor debe ser restado al resto para quedarse sólo con el consumo de oxígeno utilizado para la respiración, denominado respiración basal. Es el consumo de oxígeno normal del gusano y se espera que permanezca constante durante el ensayo (**Figura 9**). El OCR obtenido del DCCD, si bien no es tan específico como la oligomicina, es una medida de la permeabilidad de la membrana a los protones, que se denomina escape de protones (*proton leak*) y permite calcular el estrictamente OCR ligado a la producción de ATP. Al añadir FCCP, se elimina el gradiente de protones, facilitando el bombeo de protones y, en consecuencia, el funcionamiento de la ETC y por lo tanto el OCR, son máximos. La diferencia con el OCR basal es denominada como capacidad de reserva, que es una medida de la capacidad de las células de aumentar su OCR (Koopman et al., 2016). En una investigación realizada en cardiomiocitos de ratón, se ha reportado que la capacidad de reserva es particularmente relevante para mantener el funcionamiento celular durante condiciones de estrés (Sansbury et al., 2011).

El equipo inyecta automáticamente el contenido de los puertos según sea indicado y repite ciclos de mezcla, espera y medida que son asignados previamente en cantidad y

tiempos de cada paso. La ventaja es que a cada pocillo se le pueden inyectar hasta 4 soluciones de forma secuencial, pudiendo obtener una curva como la mostrada en la **Figura 9**.

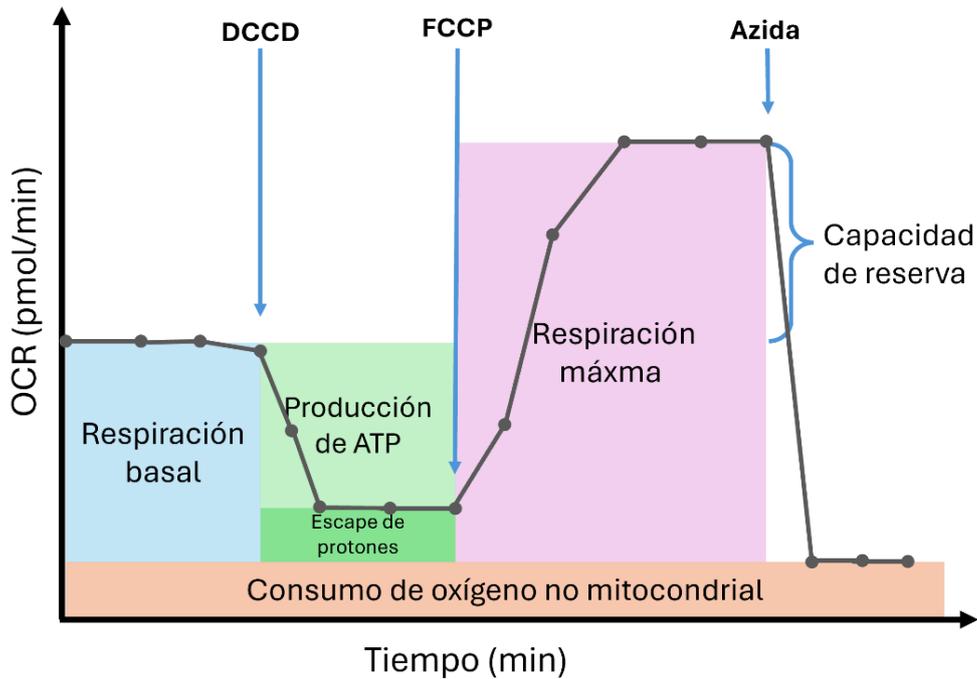


Figura 9: Esquema típico del perfil obtenido de la respirometría. Comienza con la respiración basal la cual requiere del OCR de la azida para calcularlo. Con la inyección de DCCD se puede estimar el consumo de oxígeno ligado a la producción de ATP, restándolo al OCR basal, así como el escape o leak de protones al restar el OCR de la azida; la respiración máxima y la capacidad de reserva (al restar el OCR basal) se estiman del FCCP. El consumo de oxígeno no mitocondrial se obtiene de la inyección de azida de sodio.

Dentro de las variables a definir para el protocolo se encuentran: I) la cantidad de gusanos a utilizar, II) el estadio de los gusanos (L4 o adultos), III) la concentración de los inhibidores y desacoplante a usar y IV) el programa (cantidad de ciclos y tiempos de mezcla, espera y medida). Es especialmente importante ajustar dichas variables para que durante la medida el oxígeno no sea consumido por completo y que durante la mezcla pueda ser repuesto en su totalidad. La cantidad de gusanos puede oscilar según Koopman et al., 2016, entre 2 y 25 gusanos. Una menor cantidad de gusanos facilita el conteo de estos a la hora de normalizar los resultados, mientras que con una mayor cantidad de gusanos se corre el riesgo de consumir todo el oxígeno. Al mismo tiempo, si una estirpe presenta un menor OCR de lo esperado, tener pocos gusanos puede arrojar resultados en el límite de detección.

La respirometría es una técnica muy potente que ayuda a entender cómo está funcionando la cadena respiratoria en las distintas estirpes. Por otra parte, cabe destacar que aporta una componente de novedad, ya que es una técnica nueva para el laboratorio y que aún no es utilizada en forma amplia en la investigación con *C. elegans*.

Definición y alcance de la tesina

Es importante señalar que se abre un espectro de posibles experimentos que exceden los objetivos de esta tesina, al disponer de mutantes de *C. elegans* en la biosíntesis de UQ y RQ, en ambas y alimento con o sin UQ (dado por OP50 y GD1 respectivamente), además de que la cantidad de UQ tomada por el mutante en *clk-1* y el doble mutante *clk-1;kynu-1* define su desarrollo, añadiendo entonces, la variable de concentración de UQ en los distintos estadios del desarrollo.

De forma adicional e innovadora se optimizó un protocolo de respirometría en Seahorse para *C. elegans*, lo que permitió obtener una primera aproximación a cómo es la respiración en N2 y los mutantes de interés, dejando nuevas interrogantes para continuar la investigación.

Objetivos

Objetivo general: contribuir a la comprensión de las funciones de UQ y RQ en *C. elegans*.

Objetivos específicos: estudiar la influencia de la UQ de la dieta basada en *E. coli* en el desarrollo de diferentes estirpes de *C. elegans*, en particular de una que no sintetiza ubiquinona (mutante en *clk-1(qm30)*), una que no sintetiza rodoquinona (mutante en *kynu-1(tm4924)*) y la estirpe portadora de ambas mutaciones *clk-1(qm30);kynu-1(tm4924)*. Se utiliza N2 (Bristol) como cepa silvestre. También se propone realizar una puesta a punto inicial de Seahorse para *C. elegans* e incursionar en las respirometrías para las estirpes mencionadas, tomando como referencia a la estirpe N2.

Materiales y métodos

Las cepas de *C. elegans* N2 Bristol (WT), MQ130 y OW454 fueron obtenidas del Caenorhabditis Genomics Center (CGC) (Tabla 1). El doble mutante *clk-1(qm30);kynu-1(tm4924)*, PHX7099, fue obtenido por cruce de las cepas MQ130 y OW454 realizado de forma comercial en Suny Biotech, China (Tabla 1). El alimento de los nematodos, *E. coli* OP50 también se obtuvo del CGC, mientras que la cepa GD1 fue provista por Catherine Clarke (Departamento de Química y Bioquímica, Universidad de California) (Tabla 2). El constructo del plásmido pAL0(*ubiG*), así como la transformación y selección de las colonias, fue realizada en el laboratorio de Biología de Gusanos del Institut Pasteur Montevideo por Mariel Fontes (Tabla 2).

A continuación, se resumen las cepas de *E. coli* y *C. elegans* utilizadas.

Tabla 1. Estirpes de *C. elegans* utilizadas

Estirpe	Genotipo	Descripción
N2	WT	Variante Bristol
MQ130	<i>clk-1(qm30)</i>	No sintetiza UQ
OW454	<i>kynu-1(tm4924)</i>	No sintetiza RQ ni NAD ⁺ <i>de novo</i>
PHX7099	<i>clk-1(qm30)/kynu-1(tm4924)</i>	No sintetiza UQ ni RQ ni NAD ⁺ <i>de novo</i>

Tabla 2. Cepas de *E. coli* utilizadas

Cepa	Genotipo	Fenotipo
OP50	ura	WT
GD1	ubiG	No sintetiza UQ, no crece en SMM
GD1-pAL0	Plásmido con ubiG	Recupera síntesis de UQ

Cultivos de *E. coli*

La bacteria *E. coli* es el alimento de *C. elegans*. Las mismas se cultivan en LB (10 g triptona, 5 g extracto de levadura, 10 g NaCl, H₂O csp. 1L) a 37°C durante 24 hs para OP50 y GD1::pAL0 o al menos 48 hs para GD1.

En medio LB se inocula una colonia de una placa de LB agar con ansa. Se incuba a 37°C durante 24 hs para OP50 y GD1::pAL0 o al menos 48 hs para GD1 que presenta un crecimiento más lento. Las 3 cepas se mantienen estriadas en placas de LB agar (LB con 15 g/L agar) en heladera.

Prueba en Medio Mínimo de Succínico (SMM)

La cepa GD1 crece más lento y sus colonias son más pequeñas que OP50, por lo que es muy fácil que los cultivos se contaminen. Para estar seguros de trabajar con GD1, se estría en SMM agar (11.3 g/L de sales M9, 0.05 g/L CaCl₂, 8 mg/L FeCl₃, 0.5 g/L succinato, 15 g/L agar, 1 mL/L de solución de minerales traza (Trace Metal Mix A5 with Co, Sigma) y se incuba a 37°C, en principio por 48 hs y luego algunos días más. No se debe ver crecimiento ya que GD1 no puede utilizar el succinato como fuente de energía. De observarse crecimiento implicaría contaminación del medio.

Cultivo de *C. elegans*

Los nematodos se cultivan en placas de Petri con nematode growth media (NGM) agar (3 g/L NaCl, 2,5 g/L peptona, 17 g/L agar, 5 µg/L colesterol, 1 mM MgSO₄, 1 mM CaCl₂ y 25 mM buffer fosfato pH 6) que contienen un césped de *E. coli* que puede ser de OP50, GD1 o GD1::pAL0(*ubiG*). OP50 tiene una auxotrofia para uracilo que sirve para evitar el sobrecrecimiento en la placa de NGM agar. GD1 contiene una delección en el gen *ubiG* que le impide la biosíntesis de UQ. Como GD1 no contiene la auxotrofia para uracilo, en los primeros experimentos se utilizó GD1 con el plásmido pAL0(*ubiG*) que restaura la síntesis de UQ a modo de control únicamente de la falta de UQ.

Las placas de Petri utilizadas pueden ser de 5 cm o 9 cm, donde la diferencia es la cantidad máxima de gusanos que pueden crecer sin ser hambreados. Las pequeñas se utilizan para cantidades de hasta 1000 gusanos, mientras que las grandes pueden contener entre 4000 y 5000 gusanos.

Los gusanos se mantienen en incubador habitualmente a 20°C donde las larvas L1 tardan 3 días en llegar a adultos para la estirpe N2 (silvestre) y puede haber variaciones entre las cepas. En particular, en lo que concierne a este trabajo, el mutante en *clk-1*

demora un día más en llegar a adultos, en tanto el mutante *clk-1;kynu-1* tarda 4 días en llegar a adultos, con tendencia a desincronizarse (se tienen L4 y adultos grávidos); el mutante en *kynu-1* demora aproximadamente 3 días como N2. La temperatura de cultivo puede variar entre 16°C y 25°C para retardar o acelerar su crecimiento, respectivamente. Esto no afecta el desarrollo de los gusanos, excepto en el caso del mutante *clk-1;kynu-1* ya que se vuelven estériles a 16°C.

La manipulación de los gusanos puede darse por recogida con M9 (3 g KH₂PO₄; 6 g Na₂HPO₄; 5 g NaCl; 1 mL 1 M MgSO₄; H₂O csp. 1 L), centrifugación y pipeteo a otra placa o por medio de la pica, para una manipulación de forma individual o en pequeñas cantidades. Esta herramienta consiste en un alambre de platino que se utiliza a modo de pala. Generalmente se une a una pipeta Pasteur de vidrio que hace de ancha. Para mantener las cepas, se cortan trozos del NGM agar con una espátula y se coloca en una placa nueva.

Sincronización de los nematodos

La sincronización se hace mediante *bleaching*. Es una mezcla con hipoclorito de sodio (1%) e hidróxido de sodio (1 M) que provoca la lisis de los gusanos de todos los estadios. Los adultos grávidos al desintegrarse liberan los huevos que tienen en su interior, cuya cáscara los protege del daño por un período breve de exposición. Al observar la ruptura de los gusanos en una lupa, centrifugar 1' 1200 g, remover el sobrenadante y completar con agua para realizar dos lavados centrifugando 2' 1200 g. El pellet que contiene a los huevos se resuspende en aproximadamente 10 mL de M9, se coloca en matraz y se incuba con agitación a 205 RPM 24 hs a 20°C o hasta 72 hs a 16°C. Luego se toman unos microlitros para contar las L1 en la lupa. Así se puede estimar la cantidad total obtenida y poder distribuir las larvas adecuadamente en las placas de NGM agar.

Cambio de dieta

Los *C. elegans* de las distintas cepas fueron cambiados de dieta con UQ (OP50) a dieta sin UQ (GD1) a distintos tiempos de su desarrollo. Las L1 provenientes de *bleaching* se colocaron en placas de NGM con OP50. Al comienzo, para el mutante en *clk-1* se realizó una purga, procedimiento que consiste en un lavado para eliminar toda la *E. coli* que se encuentre en el gusano y su intestino. Se colocan en M9 y se mezclan mecánicamente durante 2 hs, luego se centrifuga para remover el sobrenadante. En los

siguientes cambios de dieta se vio que este procedimiento no cambiaba los resultados, por lo que se optó por 3 lavados con M9 por centrifugación. También se realizaron cambios de placa por pica. El primero tiene la ventaja de tomar una gran cantidad de gusanos y ser rápida. La pica es buena para pocos gusanos, pero tiene la desventaja de ser más lento, arrastre de contaminación, o daño a los gusanos.

Conteo de progenie

El conteo de progenie se realizó en las cepas N2 y el mutante en *kynu-1*. Las larvas provenientes de bleaching se colocaron en placas de NGM agar con su respectiva dieta (OP50 o GD1). Al llegar a L4, se transfieren con pica unas pocas larvas (entre 3 y 9) a placas nuevas. Al día siguiente, o cuando comience la puesta de huevos, se transfieren a placas nuevas y se cuentan los huevos con un contador mecánico. El cambio de placa se repite hasta que cesa la puesta de huevos.

Obtención de ADN genómico

Se prepara el buffer de lisis (Tris pH 8.2 10 mM, KCl 50 mM, MgCl₂·6H₂O 2.5 mM, Triton X-100 0.45%, Tween 0.45%, gelatina 0.01%) con proteinasa K 1 mg/mL (Qiagen). Se toman 20 µL para 25 gusanos adultos. Dejar a -80°C al menos 15'. Se lleva al termociclador donde se corre el siguiente programa:

Temperatura	Tiempo
65°C	60 min
90°C	15 min
4°C	15 min

La solución resultante contiene ADN genómico que se puede almacenar a -20°C hasta su uso.

PCR

Se utilizó la ADN polimerasa Thermo Phusion High Fidelity, cuya procesividad es de 30 s/kb y se realiza a 72°C. Se siguieron las indicaciones del fabricante para la preparación de la mezcla para un volumen de 25 µL. Se utiliza 1 µL de la extracción de ADN.

clk-1

Cebador directo: 5'-TGTCGGTTCAGCACTTCTAGG-3'

Cebador reverso: 5'-AAAGTAATGCGATTCCCCCA-3'

Fragmentos esperados:

N2: 981 pb

qm30: 391 pb

Programa en termociclador:

Desnaturalización inicial	98°C 30 s	1 ciclo
Desnaturalización	98°C 10 s	
Hibridación	60°C 20 s	30 ciclos
Extensión	72°C 25 s	
Extensión final	72°C 10 min	1 ciclo

kynu-1

Cebador directo: 5'-TTTCCGATAGTGATGCGCTG-3'

Cebador reverso: 5'-GCACATCCGCGTTTAACAAG-3'

Fragmentos esperados:

N2: 1930 pb

tm4924: 1428 pb

Programa en termociclador:

Desnaturalización inicial	98°C 30 s	1 ciclo
Desnaturalización	98°C 10 s	
Hibridación	64°C 20 s	30 ciclos
Extensión	72°C 60 s	
Extensión final	72°C 10 min	1 ciclo

Electroforesis en agarosa

Se realiza en agarosa 1%, de la cual se preparan 25 mL en buffer TAE 1X (buffer Tris-acetato 4 mM M, EDTA 1 mM, pH 8). Mientras se encuentra tibio se agrega BrEt 1 µg/µL de BrEt. Se utilizó el buffer de carga "loading dye 6X" de New England Biolabs. El gel se corre a 100 mV durante 30 min y se revela bajo lámpara UV.

Respirometría en Seahorse

El protocolo diseñado se basó principalmente en el trabajo de Koopman et al., 2016, optimizado para N₂ en el equipo Seahorse XF 96 de Agilent, al que se le aplicaron modificaciones de acuerdo con comunicaciones personales con Joel Meyer (Levine Science Research Center, Universidad Duke, Carolina del Norte) según nuestros resultados. Para el uso de DCCD utilizamos las recomendaciones vistas en Luz et al., 2015 y Luz, Rooney, et al., 2015. El equipo utilizado fue el Seahorse XF Pro Analyzer de Agilent.

Las larvas obtenidas por bleaching se colocaron en placas de NGM agar con OP50, donde se dejan crecer hasta L4 o adulto, según el experimento. En esta puesta a punto inicial no se realizaron respirometrías de gusanos alimentados con GD1.

El día previo al ensayo se lleva a cabo la hidratación del sensor, con 200 µL por pocillo de *XF Calibrant*. La hidratación se realiza a 37°C, según recomienda el fabricante. También se prepara, previo a la corrida, el software con los grupos de estudio y el programa a seguir: inyecciones, ciclos, tiempos de mezcla (2 min), espera (3 min) y medida (3 min). Para DCCD se realizaron 11 ciclos, para FCCP 7 u 8 ciclos (o 4+7 en el caso de dos inyecciones) y 4 ciclos para azida. El diseño de la placa contiene siempre a N₂ como referencia, con al menos 5 réplicas por condición. Las condiciones utilizadas fueron: sin fármacos; con FCCP y azida; con DCCD.

El día del ensayo se pipetea los inhibidores y el desacoplante a usar (10X) en sus respectivos puertos. Para DCCD se utilizó 80 µM, para FCCP se probaron las concentraciones 20 µM y 40 µM, siendo 20 µM la elegida. De azida se utilizó 80 mM. Mientras ocurre la calibración del sensor, se lavan dos veces con M9 los gusanos a utilizar, por centrifugación 1 min a 1100 g. Se calcula el volumen necesario para sembrar la cantidad deseada en la placa. Los tips se lavan previamente con M9 + 0.05% (vol/vol) de Tritón X-100 para evitar que los gusanos se adhieran a estos. Se siembran aproximadamente 20 gusanos por pocillo y luego se larga la corrida a temperatura ambiente. Previamente se probaron las cantidades de 5, 10, 15, 25 y 40 gusanos. Al final del experimento, los gusanos son contados bajo lupa para luego normalizar el OCR por gusano.

Como todos los pocillos deben ser ocupados, los que no se desean utilizar se llenan con M9. Los puertos de los grupos que no llevan inhibidores también deben ser cargados con M9.

Resultados

E. coli GD1 no crece en Medio Mínimo Succínico

El Medio Mínimo Succínico (SMM) contiene succinato como única fuente de carbono. El mismo es incorporado por las bacterias a través de la ETC dependiente de UQ, en donde el succinato es oxidado a fumarato. En el caso de GD1, el succinato no puede ser utilizado y, por lo tanto, no hay crecimiento en este medio. *E. coli* OP50 sí puede crecer en SMM por sintetizar UQ. Este ensayo permite distinguir entre las cepas y es utilizado como control.

Además de las cepas mencionadas, también se cuenta con GD1::pAL0(*ubiG*), que recupera la síntesis de UQ, trabajo realizado en el laboratorio por Mariel Fontes. Estas bacterias crecen en SMM y se utilizan como control porque OP50 contiene una auxotrofia en uracilo (*ura*) que no se encuentra en GD1, por lo que no es una comparación solo por UQ.

Se estriaron placas de SMM agar y LB agar para las 2 cepas y se incubaron a 37°C. Para GD1, la incubación fue de 48 hs en LB agar y de al menos 72 hs en SMM. Para el resto de las cepas, la incubación fue de 24 hs (**Figura 10**).

Como se observa en la **Figura 10**, se verifica que GD1 crece en LB agar (**Figura 10a**), pero no crece en SMM agar (**Figura 10b**). Para GD1 en SMM agar la placa se dejó 3 días más, a fin de corroborar que no presentara un crecimiento muy lento, pero no fue el caso, como era esperado. En contraste con GD1, GD1 rescatada con el plásmido pAL0(*ubiG*) crece tanto en LB agar (**Figura 10c**) como en SMM agar (**Figura 10d**). Como GD1 no tiene UQ, en LB agar (**Figura 10a**) crece más lentamente y en colonias más pequeñas que la rescatada, y de hecho también más lentamente que OP50, la *E. coli* que es el alimento de los gusanos.

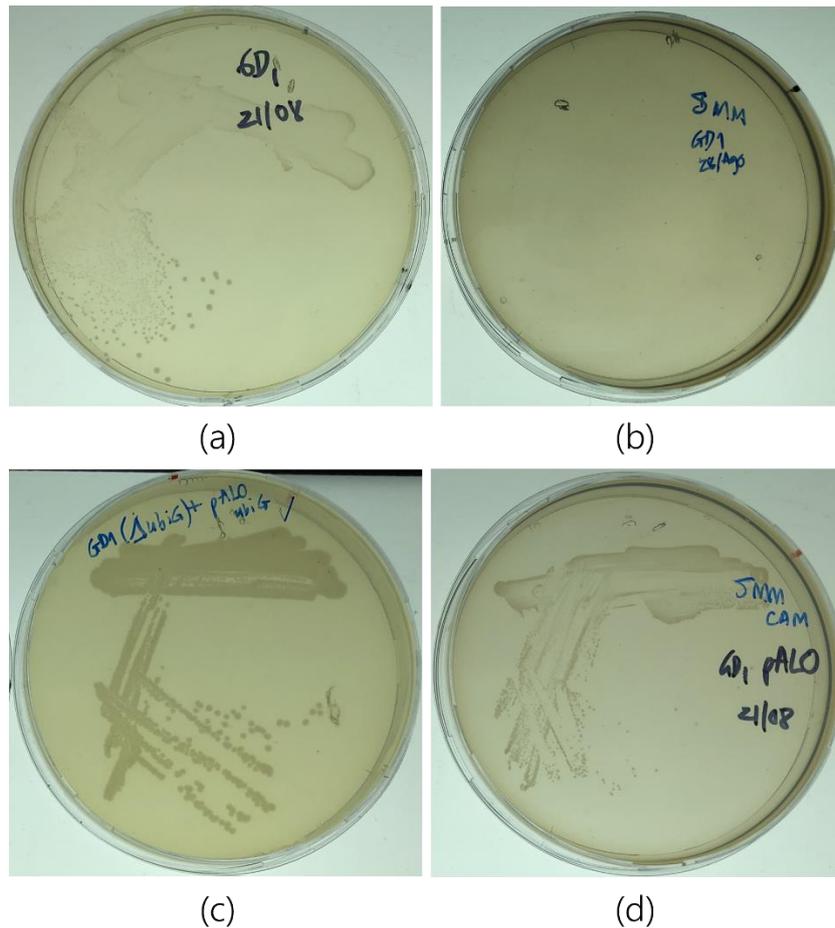


Figura 10: *E. coli* GD1 (no sintetiza UQ) y GD1::pAL0(*ubiG*) (recupera síntesis de UQ) en LB agar y SMM agar. (a) *E. coli* GD1 en LB agar. Fotografía tomada luego de incubar 48 hs a 37°C. Muestra un crecimiento lento y con colonias pequeñas. (b) *E. coli* GD1 en SMM agar. Fotografía tomada luego de incubar 48 hs a 37°C. No muestra crecimiento. Tampoco se ve crecimiento en los 3 días posteriores. (c) *E. coli* GD1-pAL0(*ubiG*) en LB agar. Fotografía tomada luego de incubar 24 hs a 37°C. Muestra un gran crecimiento comparado con GD1 y OP50. (d) *E. coli* GD1-pAL0(*ubiG*) en SMM agar. Fotografía tomada luego de incubar 24 hs a 37°C. Muestra crecimiento, pero es menor que en LB agar.

El mutante en *clk-1(qm30)* muestra interrupción del desarrollo en dieta sin UQ y retraso en el crecimiento

Se comenzó trabajando con el mutante en *clk-1(qm30)*, utilizando la cepa MQ130, ya que se encuentra bien caracterizada y es un buen punto de partida para verificar concordancias con la literatura, así como para familiarizarse con las técnicas de trabajo en *C. elegans* del laboratorio. Esta es la estirpe que no sintetiza nada de UQ (pero sí RQ) y en su lugar acumula al precursor DMQ9.

El primer paso consistió en realizar la PCR para amplificar el gen *clk-1* y correr el gel correspondiente para visualizar las bandas de peso molecular esperado para este

mutante y para N2 (control, silvestre). Este mutante presenta una deleción de 591 pb con respecto a N2 (**Figura 11**). La extracci3n de ADN se realiz3 por digesti3n enzimática con proteinasa K de gusanos adultos. Los cebadores utilizados se marcan en violeta en el esquema de la **Figura 11**. El revelado se hizo en gel de agarosa 1% con bromuro de etidio y se utiliz3 Gen Ruler 1kb Plus como marcador de peso molecular (MPM). El gel obtenido se muestra en la **Figura 12**. El fragmento esperado para el gen *clk-1* en el alelo *qm30* es de 391 pb y la banda obtenida se encuentra alrededor de 400 pb, mientras que para N2 el fragmento esperado es de 981 pb y la banda obtenida se encuentra por debajo de 1000 pb. Esto verifica la deleción de un fragmento de este gen en la cepa MQ130 en la regi3n que se encuentra entre los cebadores utilizados.

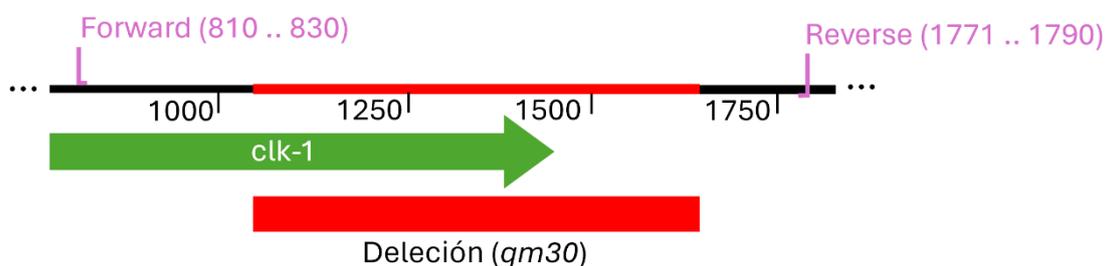


Figura 11: Esquema del genoma de *C. elegans* en la zona del gen *clk-1* y la respectiva deleción en el alelo *qm30*, presente en la estirpe MQ130. Se señalan además la posición de los cebadores usados para la PCR.

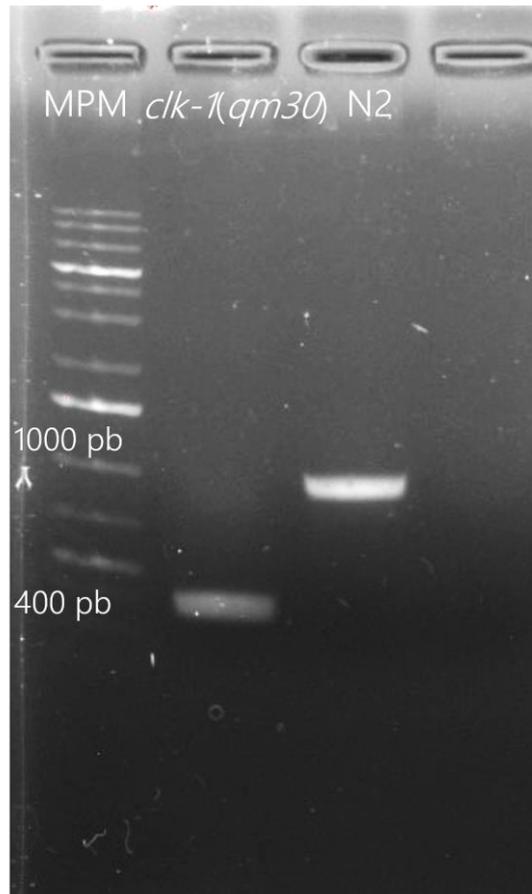


Figura 12: Gel de agarosa 1% para la PCR del gen *clk-1(qm30)* en MQ130 y N2, revelado con BrEt bajo luz UV. El fragmento esperado para MQ130 es de 391 pb mientras que para N2 es de 981 pb. El marcador de peso molecular (MPM) utilizado fue Gen Ruler 1kb Plus.

Luego de comprobar que se está trabajando con las estirpes correctas, se procedió a estudiar la influencia de la UQ de la dieta en el desarrollo. Para ello se sembraron L1 del mutante en *clk-1* y de la estirpe silvestre (N2) en placas de NGM agar previamente sembradas con un "césped" de *E. coli* GD1 u OP50 como alimento de *C. elegans*. Las L1 se obtienen de bleaching de adultos grávidos alimentados en OP50. Los huevos se mantienen 24 hs a 20°C en M9 con Mg²⁺ para que eclosionen y sincronizar las L1 al mantenerlas hambreadas. Las fotografías mostradas en la **Figura 13** fueron tomadas luego de 48hs desde que se sembraron las L1 en las placas de NGM agar, tiempo en el que los N2 llegan, desde L1, a adulto joven en OP50 a 20°C.

La principal diferencia reside en que los mutantes en *clk-1(qm30)* alimentados con GD1 (**Figura 13a**), se detienen en lo que se presume es L2, como fue visto en Jonassen et al., 2001, aunque también existe la posibilidad de que luego de una semana desde L1, algunas larvas retoman su desarrollo hacia adultos, pero son estériles (Burgess et al., 2003). A fines prácticos se habla de una interrupción. Los N2 no sufren este fenómeno,

debido a la presencia de la UQ endógena (**Figura 13d**). Los mutantes en *clk-1* detenidos en L2 no se veían igual una L2 silvestre o incluso L2 mutante en *clk-1* en medio con UQ. Dentro de las observaciones, se destaca un movimiento más lento, con tendencias a enrollarse en vez de mostrar el característico movimiento como onda sinusoidal. Al estar descrito que los mutantes en *clk-1(qm30)* alimentados con GD1 podrían avanzar hasta adulto estéril luego de varios días, los dejamos 10 días en GD1, notando que sólo una minoría de los gusanos lograba crecer más allá de L4, mientras que otros pocos alcanzaban el tamaño de L4, pero sin la formación característica de la vulva. Esto podría reflejar una mayor dosis de UQ materna presente en el huevo o que estos gusanos se hayan alimentado de una zona contaminada (con alimento con UQ) no detectable a la lupa. Tanto en GD1::pAL0 (**Figura 13b**) como en OP50 (**Figura 13c**) no hay detenimiento del desarrollo en los mutantes en *clk-1*, lo que permite suponer que la UQ exógena cubre las necesidades de los gusanos para su desarrollo. Sí se constató que los mutantes en *clk-1* alimentados con OP50 demoran aproximadamente un día más que N2 en llegar a adulto con ese alimento. Al no notar diferencias entre alimentar con OP50 y GD1::pAL0, a efectos de este trabajo la dieta con UQ siempre será dada por OP50.

A excepción del mutante en *clk-1(qm30)* alimentado con GD1, en las otras condiciones todos los *C. elegans* mutantes en *clk-1(qm30)* llegan a adultos fértiles. Esto indica que sólo con RQ no es suficiente para el desarrollo de los gusanos. La UQ es esencial y puede ser adquirida de la dieta, siendo en este caso, suficiente para completar exitosamente el ciclo de vida. Los mutantes en *clk-1(qm30)* muestran, como era reportado en la bibliografía, un ligero retraso en su desarrollo, que llega a ser de aproximadamente 24 hs de L1 a adulto con respecto a N2.

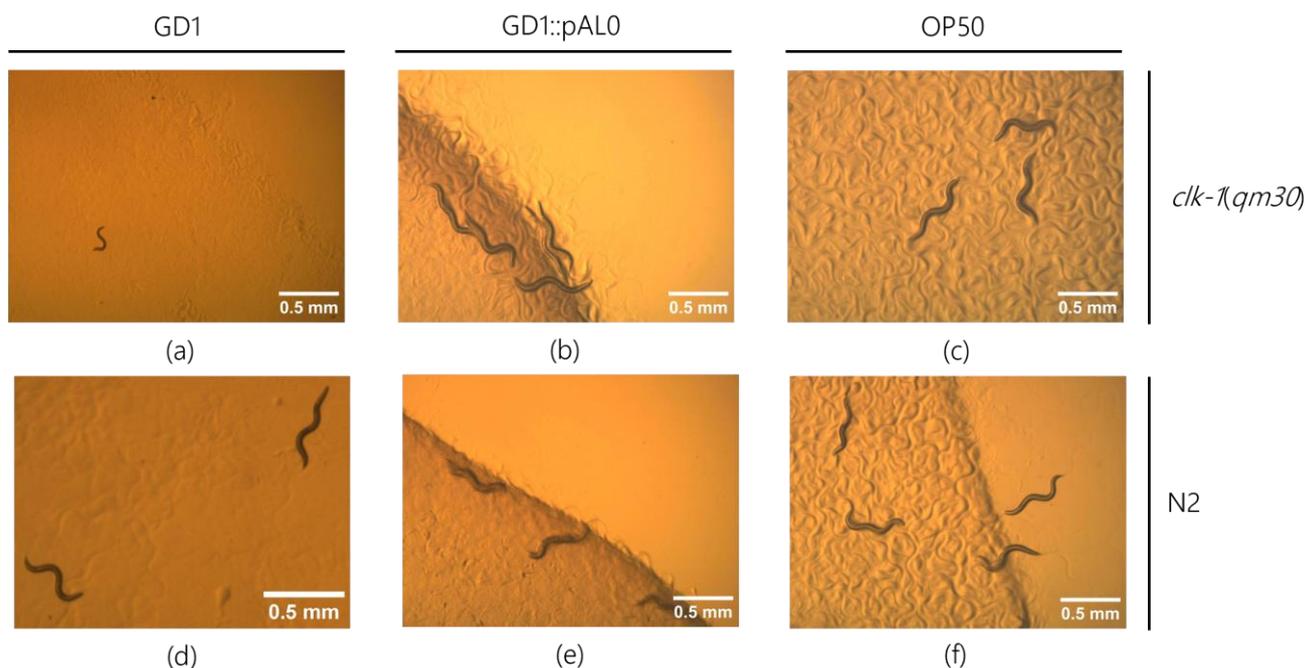


Figura 13: Mutante en *clk-1(qm30)* y estirpe silvestre en placas de NGM agar con *E. coli* GD1, GD1-pAL0 u OP50 como alimento. Fotografías tomadas pasadas 48 hs en la correspondiente dieta. (a) Mutante en *clk-1* en GD1. Permanecen en L2. (b) Mutante en *clk-1* en GD1::pAL0 y (c) Mutantes en *clk-1* en OP50 llegan a L4 sin problemas. (d) N2 en GD1, (e) N2 en GD1-pAL0 y (f) N2 en OP50 no muestran diferencias en el desarrollo, entrando joven adulto.

En cuanto a la progenie, se sabe que es menor para el mutante en *clk-1(qm30)*. Además de lo visto en Wong et al., 1995, se realizó la progenie en un laboratorio comercial (Suny Biotech, China), donde se vio que la progenie del mutante en *clk-1* es, en promedio, de 130 huevos, mientras que para N2 es de 263 huevos presentado una diferencia considerable. En dicho experimento se contaron los huevos de 5 adultos durante 8 días, con 3 réplicas. También se observó el retraso en el desarrollo de los mutantes en *clk-1*, ya que en el día 1 de conteo de huevos de N2, los mutantes en *clk-1* no ponen huevos. En cuanto a la viabilidad, todos los huevos eclosionan, no hay letalidad en los embriones. En los mutantes en *clk-1* se observa una interrupción del desarrollo menor al 2% para un $n > 150$, esto significa que no todas las larvas llegan a adultos, fenómeno que no se observa en N2.

Dado que los mutantes en *clk-1* no logran llegar a adultos en dieta sin UQ, se optó por un cambio de dieta de OP50 a GD1 cuando llegaron a L4 (**Figura 14**). Previo al cambio de dieta se realizó una purga de 2 hs para eliminar de los restos de UQ y bacterias presentes en el intestino de las larvas. La misma consiste en un lavado en M9 con ciclos

de agitación. Se realizó un control, cambiando los nematodos de la placa con OP50 a otra (con OP50), también con purga para estandarizar la influencia de dicha manipulación. Las fotografías fueron tomadas pasados 4 días de sembradas las L1 y 6 días después de L1 (**Figura 14**). Se observa que al llevarlos a dieta sin UQ luego de L4 los gusanos completan su desarrollo y son fértiles (**Figura 14a y b**) y no hay diferencias con el control (**Figura 14c y d**). A su vez, los huevos eclosionan (son viables) como se puede observar en dichas figuras. Esto es consistente con lo reportado en Jonassen et al., 2001. En síntesis, el cambio de dieta con UQ a dieta sin UQ desde L4 no parece tener efecto en el desarrollo y la progenie de los mutantes en *clk-1*.

Cambio de dieta de OP50 a GD1 en L4



Control en OP50: cambio de placa en L4

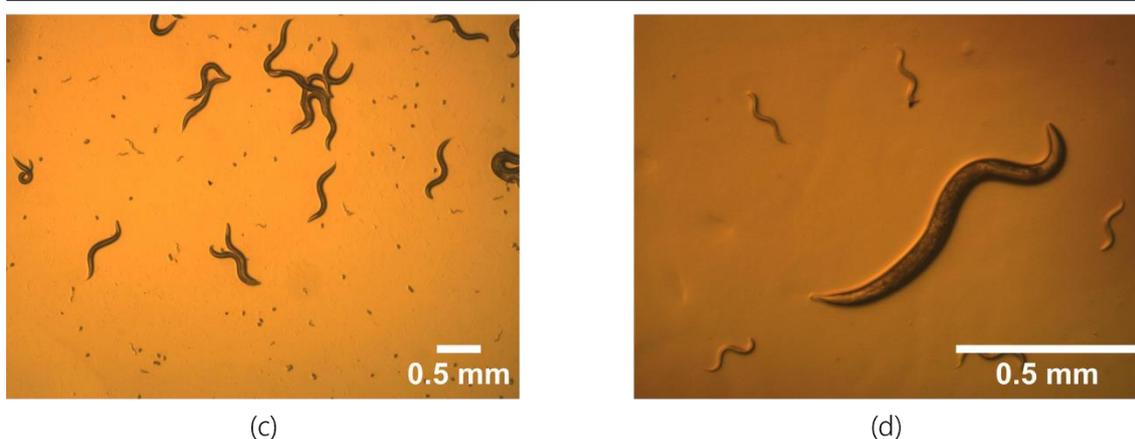
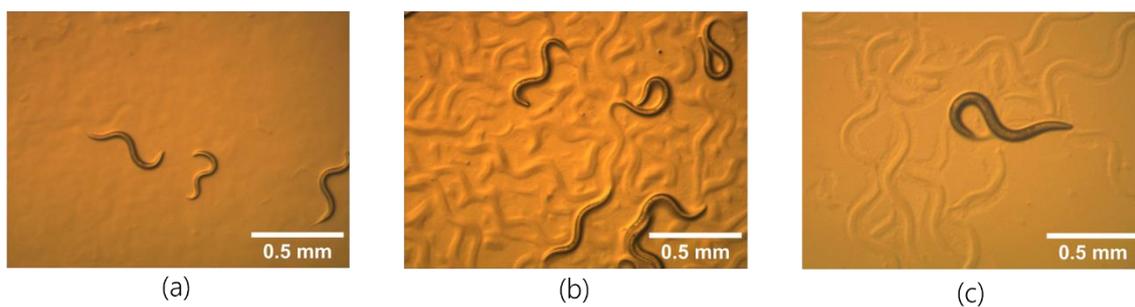


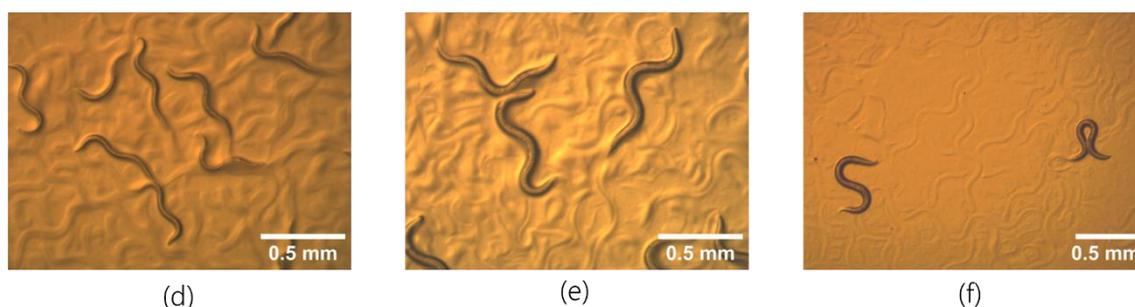
Figura 14: Mutantes en *clk-1* luego del cambio de dieta de GD1 a OP50 en L4. Los mutantes en *clk-1* fueron crecidos hasta L4 en NGM agar con OP50 y pasados a placas con GD1 u OP50 con previa purga de 2 hs. (a) y (c) corresponden a fotografías tomadas 24 hs luego del cambio de dieta, donde ya se observan huevos y L1. (b) y (d) corresponden a fotografías tomadas 48 hs luego del cambio de placa. No se observan diferencias entre GD1 y OP50, por lo que la dieta sin UQ luego de L4 no influye en lo que resta del desarrollo ni en la fertilidad.

Se propuso entonces, realizar el cambio de dieta de OP50 a GD1 a distintos tiempos desde L1, eligiendo 20 hs y 25 hs por contener, teóricamente, la transición de L1 a L2. Esta etapa es clave en el desarrollo en cuanto a la demanda de UQ como se explica en la introducción (Jonassen et al., 2002). Se tomó registro fotográfico en los 2, 3 y 6 días posteriores al estadio L1 (**Figura 15**). Lo observado en el pasaje a 20 hs y 25 hs es que los gusanos llegan a tamaño adulto al mismo tiempo que los que se encuentran en OP50, pero no se ven grávidos, incluso días después de haber alcanzado el estadio adulto (**Figura 15a-f**), a diferencia del control en OP50 (**Figura 15g-i**), en donde hay huevos y L1. Este ensayo fue repetido con un cambio de dieta de OP50 a GD1 (y su respectivo control en OP50) a las 25 hs y nuevamente el resultado fue el mismo: mutantes en *clk-1* de tamaño adulto que no ponen huevos (**Figura 16**). En ambos experimentos los gusanos se dejaron varios días más, para corroborar que no fuera un retraso y pusieran huevos más tarde. Sin embargo, en ningún momento llegaron a estar grávidos.

Cambio de dieta de OP50 a GD1 a las 20 hs



Cambio de dieta de OP50 a GD1 a las 25 hs



Control en OP50: cambio de placa a las 20 hs

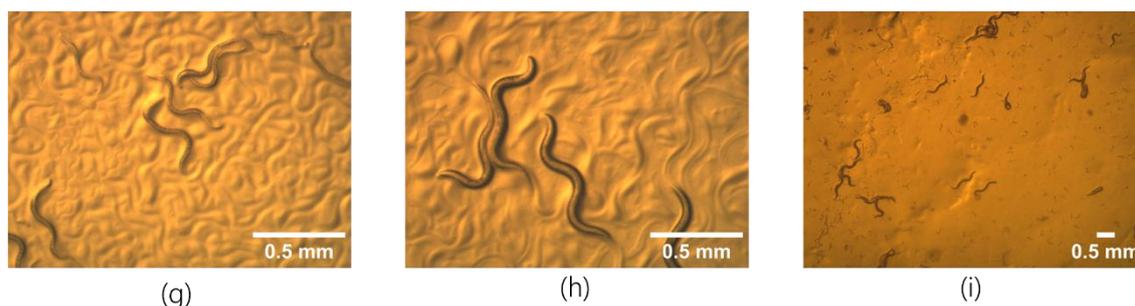


Figura 15: Cambio de dieta de OP50 a GD1 de mutantes en *clk-1* a las 20 hs y 25 hs desde sembradas las L1 y control en OP50, donde los mutantes en *clk-1* fueron cambiados de placa a las 20 hs. (a), (b) y (c) corresponden al cambio de OP50 a GD1 a las 20 hs, con fotografías tomadas 24 hs, 48 hs y 5 días luego del cambio, respectivamente. Luego de 5 días se observan gusanos de tamaño adulto, pero no ponen huevos ni están grávidos. (d), (e) y (f) corresponden al cambio de OP50 a GD1 a las 25 hs, con fotografías tomadas 24 hs, 48 hs y 5 días luego del cambio, respectivamente. Al igual que con el cambio a las 20 hs, estos gusanos no han puesto huevos. (g), (h) e (i) corresponden al control, pasando los gusanos de OP50 a OP50 a las 20 hs, con fotografías tomadas 24 hs, 48 hs y 5 días luego del cambio, respectivamente.

Cambio de dieta de OP50 a GD1 a las 25 hs

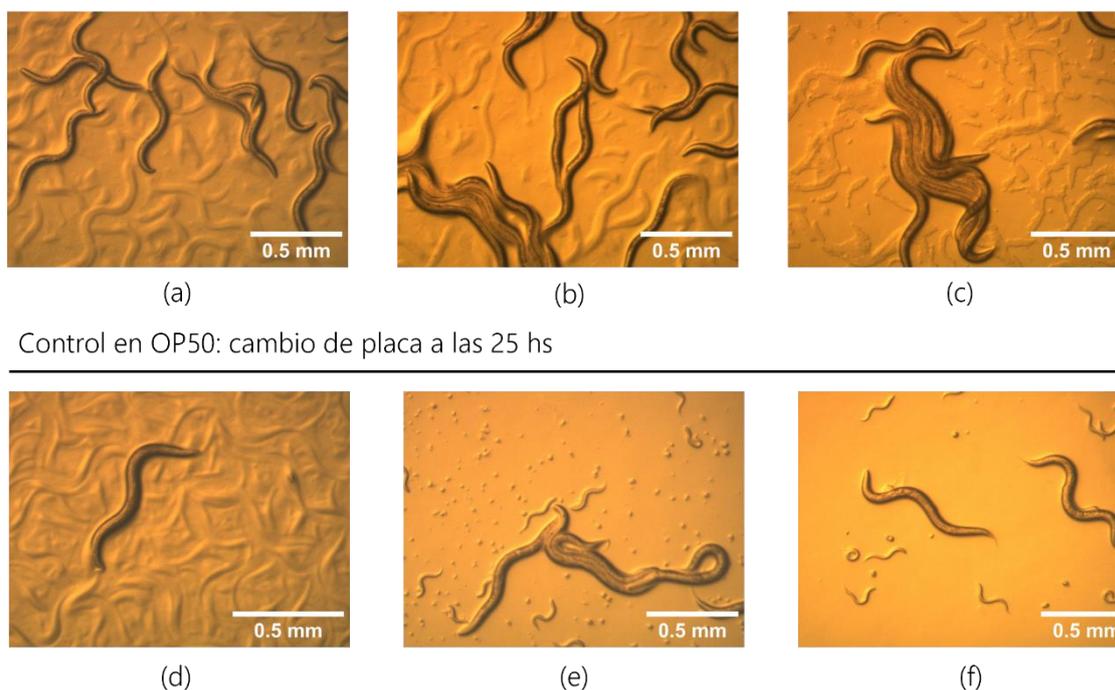


Figura 16: Cambio de dieta de OP50 a GD1 de mutantes en *clk-1* a las 25 hs desde sembradas las L1 y control en OP50, donde los mutantes en *clk-1* fueron cambiados de placa a las 25 hs. (a), (b) y (c) corresponden al cambio de OP50 a GD1 a las 25 hs, con fotografías tomadas 3 días, 4 días y 5 días luego del cambio, respectivamente. Luego de 5 días se observan gusanos de tamaño adulto, pero no ponen huevos ni están grávidos. (d), (e) y (f) corresponden al control, pasando los gusanos de OP50 a OP50 a las 25 hs, con fotografías tomadas 3 días, 4 días y 5 días luego del cambio, respectivamente.

Al sembrar los mutantes en *clk-1* en GD1, desde L1 sólo llegan a L2, lo que podría estar dado por el efecto materno, que es la UQ proporcionada por el hermafrodita en el huevo. En la **Figura 14** se ve que el cambio de dieta en L4 es suficiente para que pongan huevos y también se ve que esas larvas también llegan al menos a L2. Se desconoce si estos huevos llegan a obtener algo de UQ residual que provenga de la dieta, pero sería razonable, dado lo visto al realizar cambios de dieta entre L1 y L2 (**Figura 15** y **Figura 16**).

Lo observado es concordante con otros trabajos en la materia. Es importante destacar que, si bien la falta de UQ es lo que en principio le da mayor longevidad al gusano, no se debe olvidar que requiere de la misma para su desarrollo y reproducción. Con lo realizado no es posible deducir si la RQ está cumpliendo algún rol, ni la importancia del precursor acumulado, DMQ9, en las condiciones estudiadas.

El mutante en *kynu-1(tm4924)* no tiene afectado el desarrollo

El siguiente objetivo fue estudiar cómo se comporta el mutante que no sintetiza RQ (pero sí UQ), con la estirpe OW454, que contiene la mutación en *kynu-1(tm4924)*. Recordando la introducción, esta mutación afecta la vía de la kinurenina, encargada de la síntesis de NAD⁺ *de novo* y precursores de RQ. Sin RQ se ve afectada la vida del gusano en ambientes con toxinas que afecten la CTE como cianuro o sulfuro.

Al igual que con el mutante en *clk-1(qm30)*, el primer paso fue verificar que se esté trabajando con la estirpe correcta, por medio de PCR. El gen amplificado fue *kynu-1* que en el mutante en *kynu-1(tm4924)* el tamaño esperado es de 1428 pb, mientras que para N2 es de 1930 pb. El esquema del gen con la delección y los cebadores utilizados para la PCR se muestran en la **Figura 17**. El gel de agarosa 1% se muestra en la **Figura 18**. En la sección de materiales y métodos se detallan los procedimientos. La banda correspondiente al mutante en *kynu-1(tm4924)* se encuentra cercana a 1500 pb, de menor tamaño que el fragmento amplificado de N2, alrededor de 2000 pb, ambos concordantes con lo calculado.

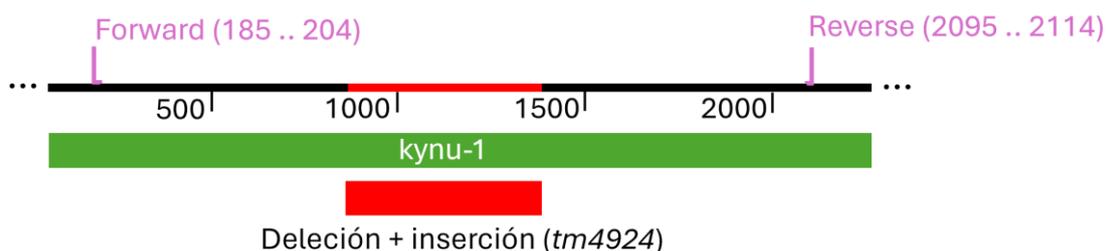


Figura 17: Esquema del genoma de *C. elegans* en la zona del gen *kynu-1* y la respectiva delección en el alelo *tm4924*, presente en la estirpe OW454. Se señalan además la posición de los cebadores usados para la PCR.

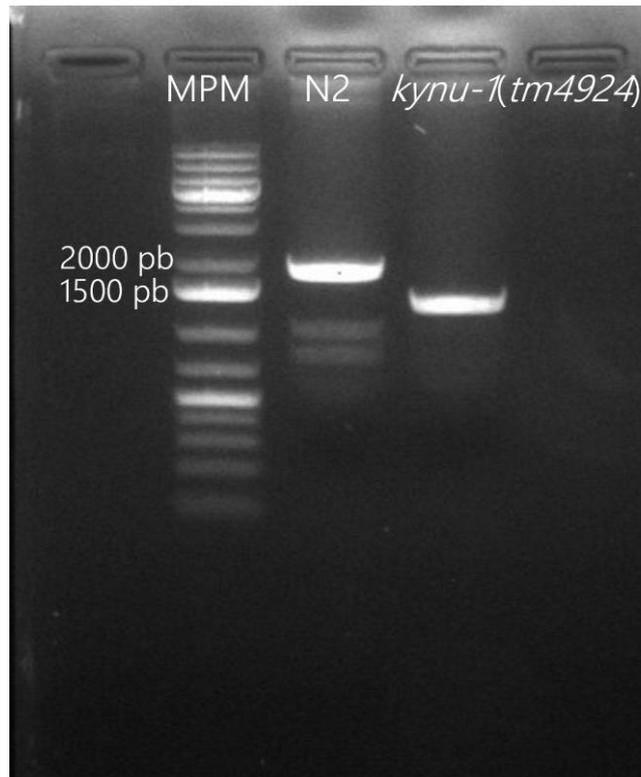


Figura 18: Gel agarosa 1% para la PCR de *kynu-1* en OW454 y N2, revelado con BrEt bajo luz UV. El fragmento esperado para OW454 es de 1428 pb mientras que para N2 es de 1930 pb. El marcador de peso molecular (MPM) utilizado fue Gen Ruler 1kb Plus.

De la misma forma que para el mutante en *clk-1*, primero se sembraron L1 del mutante en *kynu-1* en NGM agar con GD1 u OP50 como alimento. En estos gusanos no se observa arresto en el desarrollo. La UQ endógena cubre las necesidades y la RQ parece pasar a un segundo plano, donde no es indispensable. En donde puede haber una diferencia, es en la progenie de los gusanos. Se realizó el conteo de progenie del mutante en *kynu-1(tm4924)* y N2 tanto en GD1 como en OP50, picando gusanos adultos en grupos de 3 a placas de NGM agar con la respectiva dieta y picando día a día a placas nuevas (Tabla 3). La progenie obtenida para el mutante en *kynu-1* es ligeramente menor a la de N2 con ambos alimentos (reducción de 12% en OP50 y reducción de 28% en GD1), si bien la diferencia es más marcada con la dieta de GD1. Es interesante notar que con la dieta de GD1, en comparación con OP50, se ve afectada la progenie del mutante en *kynu-1*, pero no la de N2. Aunque los resultados no son suficientes para aplicar un test estadístico, en el trabajo de McReynolds et al., 2017 realizado sobre el mutante en *kynu-1(tm4924)* y N2, alimentados con OP50 obtienen la misma tendencia, de disminución de la progenie, aunque más marcada (una disminución cercana al 25% en la progenie del mutante en *kynu-1*). Esta disminución se revierte al suplementar con ácido quinolínico, un precursor exclusivo de la vía de

síntesis *de novo* del NAD⁺. Puede decirse que, si hay un efecto en la progenie, la RQ no es la responsable directa de dicha diferencia. También se cuenta con ensayos hechos en un laboratorio comercial (Suny Biotech, China), donde se analizó la progenie del mutante en *kynu-1(tm4924)* y N2 en OP50 (Tabla 4) de la misma forma que para el mutante en *clk-1(qm30)*. La diferencia en la progenie de ambas estirpes nuevamente muestra una tendencia similar a la de nuestro trabajo, en este caso con diferencias menos marcadas, una disminución de 4% respecto a N2.

Tabla 3. Conteo de progenie para el mutante en *kynu-1(tm4924)* y N2 en dietas de *E. coli* sin UQ (GD1) o con UQ (OP50). Se realizaron duplicados por cada experimento. Se indica el número de gusanos cuya progenie se contó en cada experimento.

	<i>kynu-1(tm4924)</i>				N2			
	GD1		OP50		GD1		OP50	
<i>Gusanos</i> → <i>Día</i> ↓	3	4	3	7	7	9	6	9
1	74	-	57	-	42	37	32	51
2	76	120	79	107	182	149	133	99
3	20	79	59	73	62	84	63	79
4	0	30	48	16	0	0	35	12
<i>Total</i>	169	229	243	197	286	270	263	241
<i>Promedio</i>	199		220		278		252	

Tabla 4. Progenie de 5 *C. elegans* mutantes en *kynu-1(tm4924)* y 5 N2 contados durante 8 días. Realizado por laboratorio comercial (Suny Biotech, China). El promedio por gusano de N2 es ligeramente mayor que para el mutante en *kynu-1*.

<i>Día</i>	Progenie de 5 mutantes en <i>kynu-1(tm4924)</i>			Progenie de 5 N2		
1	107	70	107	183	180	96
2	558	516	470	735	691	683
3	457	501	377	306	283	380
4	168	162	205	107	136	110
5	8	17	4	13	6	16
6	3	1	2	3	7	3
7	0	0	0	1	0	2

<i>8</i>	0	0	0	0	0	0
<i>Total</i>	1301	1267	1165	1348	1303	1290
<i>Promedio por gusano</i>	260	253	233	270	261	258

Aunque puede no ser intuitivo, tanto los mutantes en *kynu-1* como los N2 alimentados con GD1 se adelantarían unas pocas horas en la puesta de huevos, finalizando la puesta de huevos aproximadamente un día antes que los alimentados con OP50, como se puede observar en la **Tabla 3**. Para N2 alimentado con GD1 se ha visto también un aumento en su longevidad, respecto a N2 alimentados con OP50 (Saiki et al., 2008). Este resultado no necesariamente es por la UQ *per se* sino por las condiciones en que se encuentra esta cepa bacteriana, en relación con que es más débil y su metabolismo es distinto a las OP50, lo que podría facilitar la digestión en el gusano, aunque esto no explica directamente la mayor longevidad (Saiki et al., 2008). La dieta de GD1 resultaría en un beneficio para el *C. elegans* que sintetiza UQ. Sería interesante estudiar qué ocurre con la dieta de GD1::pAL0.

La puesta de huevos de ambas estirpes en GD1 requiere una caracterización más fina para poder asegurar que se adelanta unas horas respecto a la dieta de OP50, así como también establecer si la diferencia en la progenie de ambas estirpes y entre dietas es significativa bajo nuestras condiciones de trabajo.

El doble mutante *clk-1;kynu-1* se desempeña peor que los mutantes por separado

Habiendo estudiado las estirpes sin UQ y sin RQ por separado, ahora se toma el doble mutante *clk-1(qm30);kynu-1(tm4924)*: la estirpe nombrada como PHX7099, para ver qué ocurre al no tener UQ ni RQ según la dieta con o sin UQ.

En este caso se requiere confirmar por PCR la delección en ambos genes (*clk-1* y *kynu-1*), donde los tamaños esperados son 391 pb para *clk-1(qm30)* y 981 pb para *clk-1* de N2 y 1428 pb para *kynu-1(tm4924)* y 1930 pb para N2. Los geles de agarosa 1% correspondientes se muestran en la **Figura 19**. Las bandas obtenidas son acordes a los fragmentos esperados y también a los resultados de los mutantes por separado, mostrados en **Figura 12** y **Figura 18**.

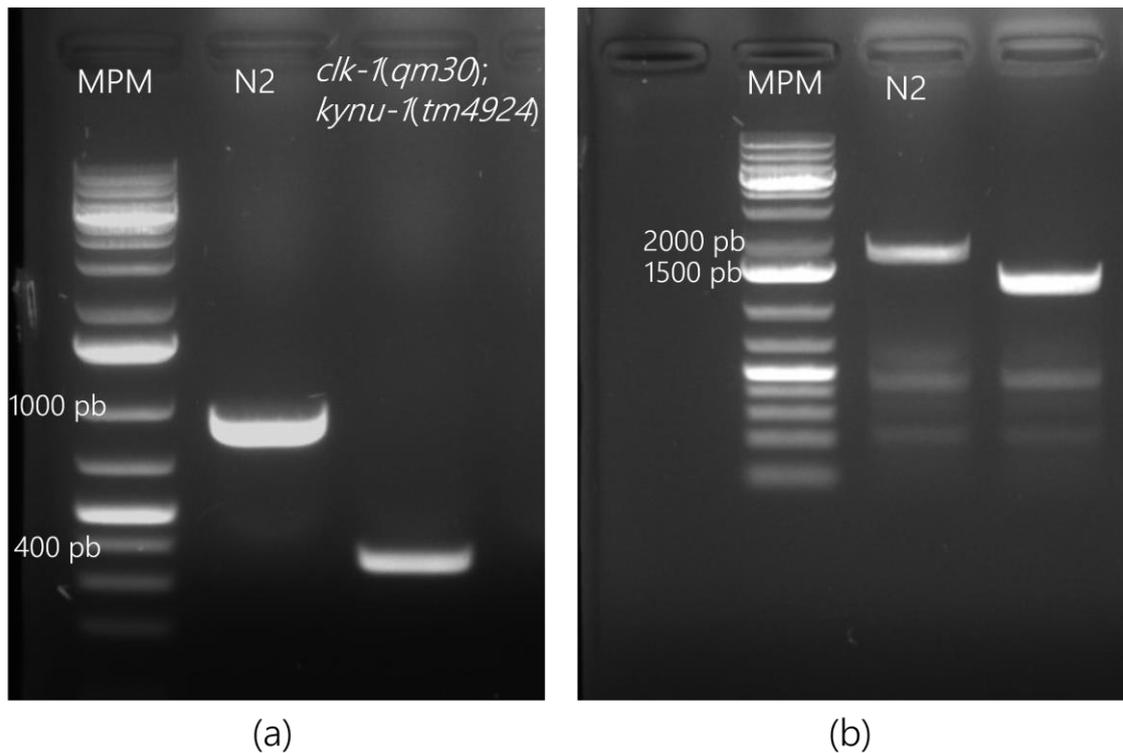
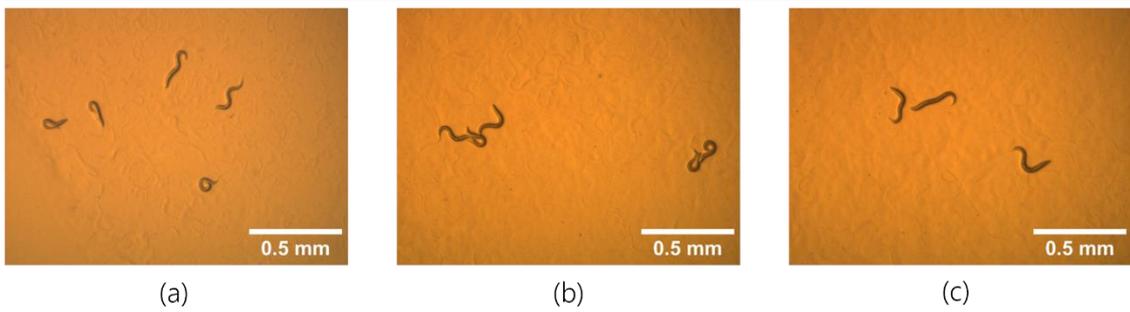


Figura 19: Gel agarosa 1% para la PCR de *clk-1* (a) PCR de *kynu-1* (b) en el doble mutante *clk-1(qm30);kynu-1(tm4924)* y N2 y. Revelado con BrEt bajo luz UV. El marcador de peso molecular (MPM) utilizado es Gene Ruler 1kb Plus.

Las L1 provenientes de bleaching se colocaron en placas de NGM agar con GD1 u OP50 como alimento (**Figura 20**). Alimentados con OP50 se observa un desarrollo completo, pero más lento, con unas horas de retraso respecto al mutante en *clk-1* (**Figura 20d-f**). También son más frágiles, dificultando la manipulación con pica y más sensibles a los reactivos utilizados en el *bleaching*. Además, se observa una rápida pérdida de sincronización que se obtiene mediante dicha técnica. Otra observación es que los primeros huevos no son viables, tienen forma anómala y no eclosionan. Por el aspecto que presentan es probable que no se encuentren fecundados. Algo similar se ha observado en el mutante en *rad-8(mn183)* (Hartman & Herman, 1982), cuya mutación causa una baja importante en la síntesis de ambas benzoquinonas, aunque no es nula (datos no publicados de nuestro laboratorio). En GD1 se espera que al menos ocurra la detención del desarrollo en L2 como ocurría con los mutantes en *clk-1* y la incógnita es si la falta de RQ vuelve la supervivencia o el desarrollo más difícil. Lo observado (**Figura 20a-c**) es que además de la interrupción del desarrollo, los gusanos se veían más afectados que el mutante en *clk-1(qm30)*. Tenían movimientos muy lentos y se encontraban la mayor parte del tiempo quietos o "enrollados", lo cual no suele ser buen signo de salud.

Dieta de GD1



Dieta de OP50

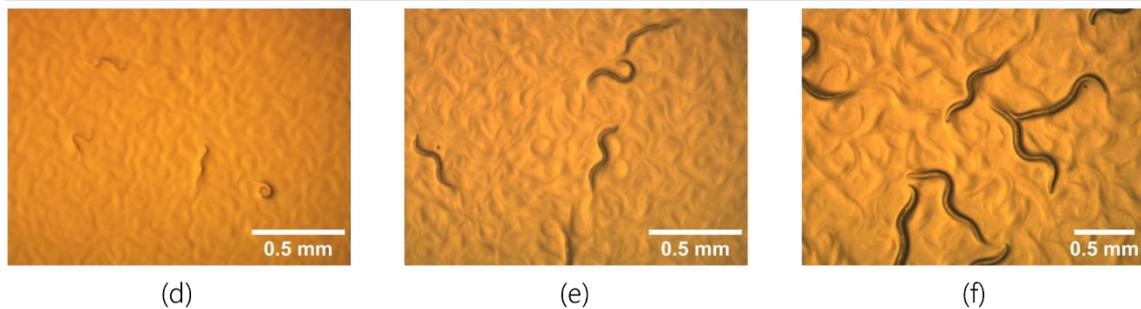
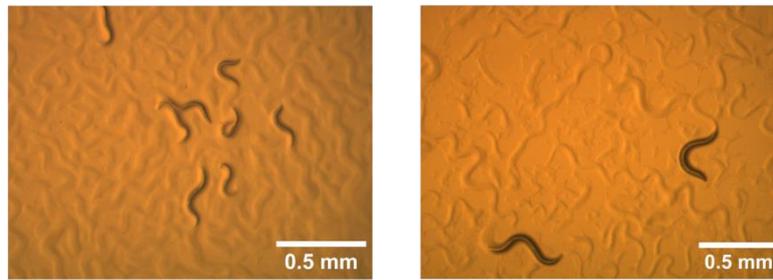


Figura 20: Mutantes en *clk-1;kynu-1* en placas de NGM agar con *E. coli* GD1 u OP50 como alimento. (a) y (d) son fotografías tomadas 24 hs luego de sembradas las L1. (b) y (e) son fotografías tomadas 48 hs luego de sembradas las L1. (c) y (f) son fotografías tomadas 72 hs luego de sembradas las L1. En GD1 las larvas se ven enfermas y no avanzan de L2. En OP50 continúan su desarrollo, pero es más lento que el de N2 e incluso que el mutante en *clk-1*.

Se repitió el ensayo y se tomaron fotografías luego de 6 días desde sembradas las L1, en donde para la dieta de GD1 (Figura 21a y b) se vio el crecimiento de algunas de las larvas comparable al tamaño en el estadio L3-L4, pero no se observa desarrollo de la vulva. Luego de 4 días más, no se constató más crecimiento. Como se puede ver en OP50 (Figura 21c y d), al día 6 desde L1, el mutante en *clk-1;kynu-1* se encuentra en plena puesta de huevos, con algunas L1 y L2 de huevos ya eclosionados.

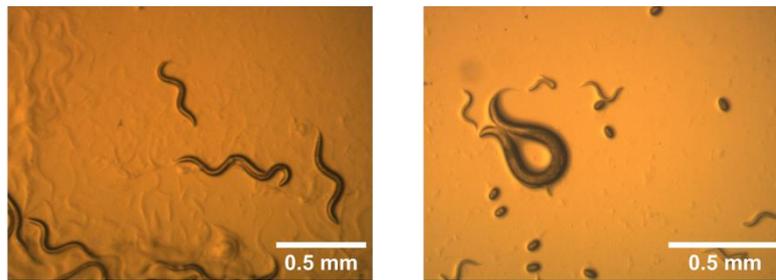
Dieta de GD1



(a)

(b)

Dieta de OP50 (control)



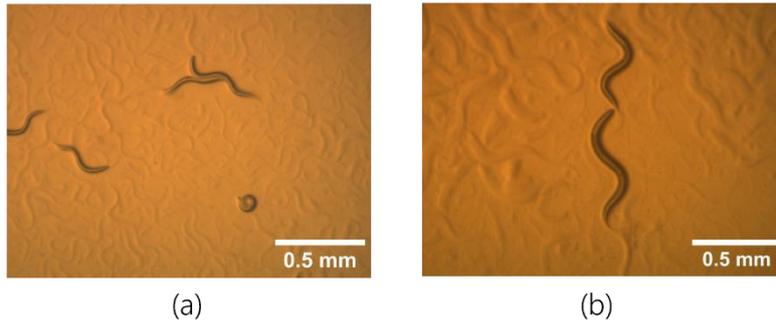
(c)

(d)

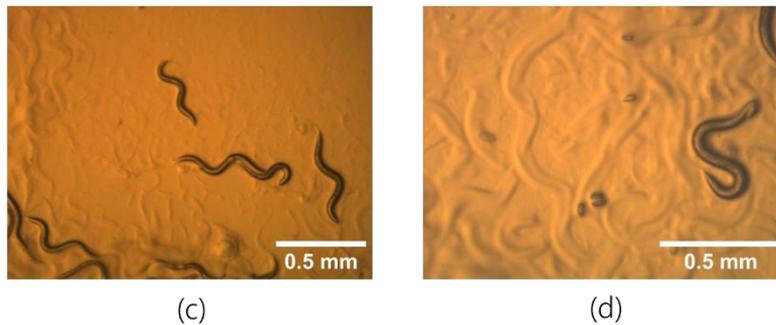
Figura 21: Mutante en *clk-1;kynu-1* en placas de NGM agar con *E. coli* GD1 u OP50 como alimento. (a) y (d) son fotografías tomadas 48 hs luego de sembradas las L1. (b) y (c) son fotografías tomadas 6 días luego de sembradas las L1.

Se procedió con el cambio de dieta a OP50 a las 24 hs y 48 hs (**Figura 22**). El cambio de dieta a las 24 hs (**Figura 22a y b**), da lugar al crecimiento de las larvas, pero a diferencia del mutante en *clk-1*, el doble mutante *clk-1;kynu-1* no llega a tamaño adulto. Esas 24 hs en presencia de UQ ya son significativas, pero no suficientes para el desarrollo del gusano adulto. El cambio de dieta de OP50 a GD1 a las 48 hs (**Figura 22c y d**) sí alcanza para completar el desarrollo a adulto y como se puede ver en la **Figura 22d** están grávidos y hay huevos en la placa, pero incluso luego de algunos días no eclosionan. Los huevos presentan forma anómala, similares a los que se ven al comienzo cuando esta estirpe es alimentada en OP50 y una mayor transparencia, si se compara con el control en OP50 (**Figura 22g y h**). En OP50 se muestra que a las 48 hs las larvas son más grandes que en aquellas con cambio de dieta de OP50 a GD1 a las 24 hs. A los 6 días desde sembradas las L1, se encuentran grávidos y con presencia de L1 provenientes de huevos que ya eclosionaron (**Figura 22h**).

Cambio de dieta de OP50 a GD1 a las 24 hs



Cambio de dieta de OP50 a GD1 a las 48 hs



Control en OP50

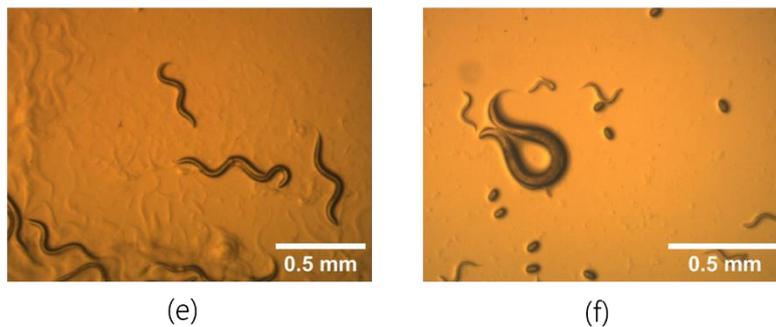


Figura 22: Cambio de dieta de OP50 a GD1 del doble mutante *clk-1;kynu-1*. (a) y (b) corresponden al cambio de OP50 a GD1 a las 24 hs desde sembradas las L1, con fotografías tomadas 24 hs y 5 días luego del cambio, respectivamente. (c) y (d) corresponden al cambio de OP50 a GD1 a las 48 hs de sembradas las L1, con fotografías tomadas 2 hs previas al cambio de dieta (aún en OP50) y 4 días luego del cambio de dieta. En (d) se ven huevos, pero no L1. Estos huevos no eclosionan. (e) y (f) corresponden al control en dieta de OP50, con fotografías tomadas a las 48 hs desde sembradas las L1 y 6 días luego de sembradas.

En suma, esta estirpe doble mutante es distinta a los mutantes simples por separado, con más dificultades que el mutante en *clk-1*, que se puede ver en OP50 por movimientos ralentizados y anómalos, un retraso mayor en el desarrollo y los primeros huevos que no eclosionan a L1. Con el cambio de dieta, donde 24 hs en OP50 ya no es suficiente para llegar a adulto, como ocurría con el mutante en *clk-1*. En el mutante en *clk-1* nunca se observaron huevos que no eclosionen, sí en el mutante en *clk-1;kynu-1*,

donde ocurre durante las primeras horas si la dieta es de OP50 y en el caso del cambio de dieta de OP50 a GD1 a las 48 hs es para todos los huevos.

Con esto puede decirse que, aunque en el mutante en *kynu-1*, la falta de NAD⁺ *de novo* y RQ no parece afectar en el desarrollo y que en el mutante en *clk-1* la RQ no era suficiente para contrarrestar la falta de UQ, con el doble mutante la falta de ambas benzoquinonas afecta más al gusano que la falta de UQ solamente (y, lógicamente, de RQ solamente). Nuevamente, dado el rol de *kynu-1*, no podemos distinguir si es por la falta de NAD⁺ *de novo* o por la ausencia RQ.

Esto da lugar a la aplicación de las respirometrías en *C. elegans*. Estudiar el consumo de oxígeno de los mutantes de interés, con respecto a N2, puede dar indicios de cómo es su CTE. Se espera que tanto en el mutante en *clk-1* como en el mutante en *clk-1;kynu-1* la CTE se vea severamente afectada y, por lo tanto, su respiración sea distinta a la de N2.

Respirometrías en Seahorse

La puesta a punto consistió en establecer la cantidad de gusanos a utilizar, definir entre L4 o adulto, así como los fármacos y la concentración a utilizar. Las respirometrías en Seahorse aún requieren ajustes, en cuanto a la concentración de fármacos y lograr obtener réplicas consistentes. No obstante, el protocolo utilizado, así como el diseño de las placas es suficiente para obtener un panorama general, inicial, sobre algunas características de la respiración en las cepas de interés.

Todos los nematodos se cultivaron en placas de NGM agar con OP50 como dieta, en condiciones normales (aerobiosis a 20°C). En esta primera aproximación se dejó a un lado la influencia de la dieta sin UQ en la respiración, dado que el mutante en *clk-1* y el mutante en *clk-1;kynu-1* requieren UQ para alcanzar el estadio adulto lo que significa un cambio de dieta desde OP50 a GD1 posterior a L2, lo que aumenta la complejidad del experimento.

Los nematodos se recogieron de la placa de NGM con M9, se lavaron por centrifugación para eliminar la bacteria del medio y del interior animal. Este proceso funciona como la purga, permitiendo quitar la mayor parte de *E. coli* del medio y del interior de los gusanos. No es necesario eliminar por completo la bacteria, ya que se ha visto que no afecta significativamente las medidas de OCR (Koopman et al., 2016).

Puesta a punto con N2

Comenzando con N2, la cepa silvestre, se probaron las cantidades aproximadas de 5, 10, 15, 25 y 40 gusanos adultos por pocillo (**Figura 23**), así como también 20 y 30 L4, con 5 réplicas de cada densidad de gusanos. En la primera placa, donde se utilizaron sólo adultos, el conteo de los gusanos no fue preciso y se subestimó la cantidad presente. Igualmente, los mejores resultados se obtuvieron con 15 y 25 nematodos por pocillo, teniendo en cuenta en primer lugar, los datos primarios, donde la presión de oxígeno se recupera al máximo con cada ciclo y las pendientes tienen buen ajuste lineal (**Figura 23a**). En segundo lugar, se consideró la variabilidad entre las réplicas, que son muy similares entre sí y con menos desvío estándar, que, por ejemplo, con 5 gusanos por pocillo (**Figura 23b**). En el tiempo en que se realizó el experimento, el OCR basal se mantuvo estable en todas las densidades de gusanos. Esto es muy positivo, dado que el equipo no posee sistemas de enfriamiento y la temperatura sube considerablemente durante el ensayo, comenzando en 25°C y pudiendo alcanzar hasta 29°C, condiciones subóptimas para los gusanos. Para las siguientes placas se eligió un número de 20 gusanos por pocillo, ya que no se colocan exactamente 20 gusanos, sino que, al ser por dilución, en algunos pocillos habrá menos mientras que en otros habrá más. Elegir un punto medio en la cantidad a sembrar permite que todos los pocillos contengan una cantidad de gusanos que esté en el rango lineal de OCR.

En cuanto a los estadios, las diferencias no son significativas entre adultos y L4. El consenso fue realizar todas las respirometrías con gusanos adultos por la facilidad de sincronizar los gusanos de distintas cepas a este estadio; los adultos se distinguen claramente bajo la lupa y para las estirpes que tienden a desincronizarse, tener algunas L4 mezcladas no afectan el ensayo.

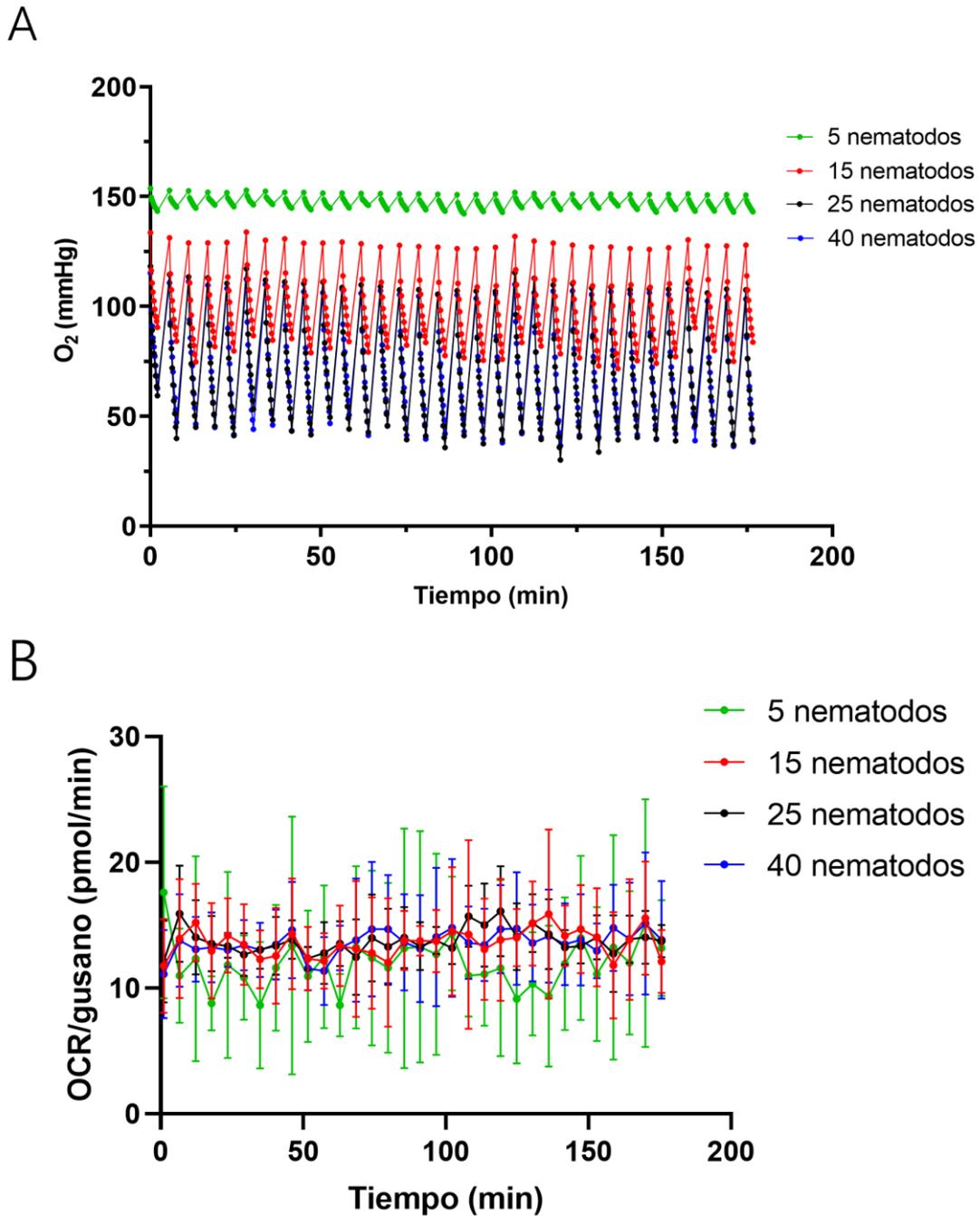


Figura 23: Respirometrías sin fármacos para distintas cantidades de *N2* adultos. (a) Datos primarios de la respirometría, para las cantidades de 5, 15, 25 y 40 *N2*. Excepto para 5 gusanos, de las demás cantidades se obtienen buenas pendientes. (b) OCR obtenido de las pendientes de (a) normalizado por cantidad de gusanos.

Optimización de la concentración de desacoplante e inhibidores del complejo IV y la ATP sintasa

Con el objetivo de ver la acción de los fármacos, se probaron en una primera instancia dos concentraciones para cada una en *N2*: las concentraciones recomendadas en

(Koopman et al., 2016) para FCCP y azida y (Luz, Smith, et al., 2015) para DCCD y el doble de lo recomendado (**Figura 24**).

Para FCCP inicialmente se ensayaron 10 μM y 20 μM , siendo esta última la que dio mayor aumento del OCR (**Figura 24b**). Es importante observar los datos primarios también, ya que, si el OCR es muy alto, se consumirá todo el oxígeno en el pocillo, como se observa en la **Figura 24a** al colocar 40 gusanos por pocillo y la pendiente obtenida no es representativa del OCR real. Luego se probó con dos inyecciones de las concentraciones 10 μM , 20 μM y 40 μM para verificar si la concentración en la primera inyección era suficiente para alcanzar el máximo OCR (**Figura 25**). Para la concentración de 10 μM el OCR sigue aumentando luego de la segunda inyección, indicando que se necesita una mayor concentración de FCCP. Con 20 μM el OCR se mantiene estable al momento de la segunda inyección, mientras que para 40 μM se ve un aumento al principio, que alcanza valores de OCR similares al promedio cuando se utiliza 20 μM . Este aumento decae rápidamente y no se aprecia cambio durante la segunda inyección. La concentración intermedia, de 20 μM es la más consistente y se utilizó para el resto de los ensayos, además de que según la literatura consultada se utilizan concentraciones en el rango de 10 μM a 25 μM . Sin embargo, este valor da lugar a un mejor ajuste, entre 20 μM y 40 μM .

De azida, se utilizó 40 mM y 80 mM (**Figura 24**) y se continuó con 80 mM para asegurar su funcionamiento con cualquier cantidad de nematodos.

Para DCCD, al principio, se inyectó al comienzo de los grupos que también llevaban FCCP y azida, con las concentraciones de 20 μM y 40 μM (**Figura 24**). Cabe consignar que el uso de DCCD sólo se encuentra reportado en Luz, Smith, et al., 2015. Al no observar efecto del DCCD (y a consejo del grupo de Joel Meyer) se optó por aumentar la concentración a 80 μM (**Figura 26**). Allí sí se vio su acción y se confirmó la interferencia que tiene con el FCCP (mencionada en Luz, Smith, et al., 2015), donde el efecto del FCCP no se observa si es adicionado luego del DCCD (**Figura 26a**). Entonces, en los futuros diseños de la placa, el DCCD se inyecta al final en un grupo que sólo lleva dicho inhibidor. La desventaja es que requiere de al menos 15 ciclos para visualizar una disminución en el OCR, prolongando el experimento unas 3 hs más, lo que en algunas estirpes causa un notorio descenso del OCR basal.

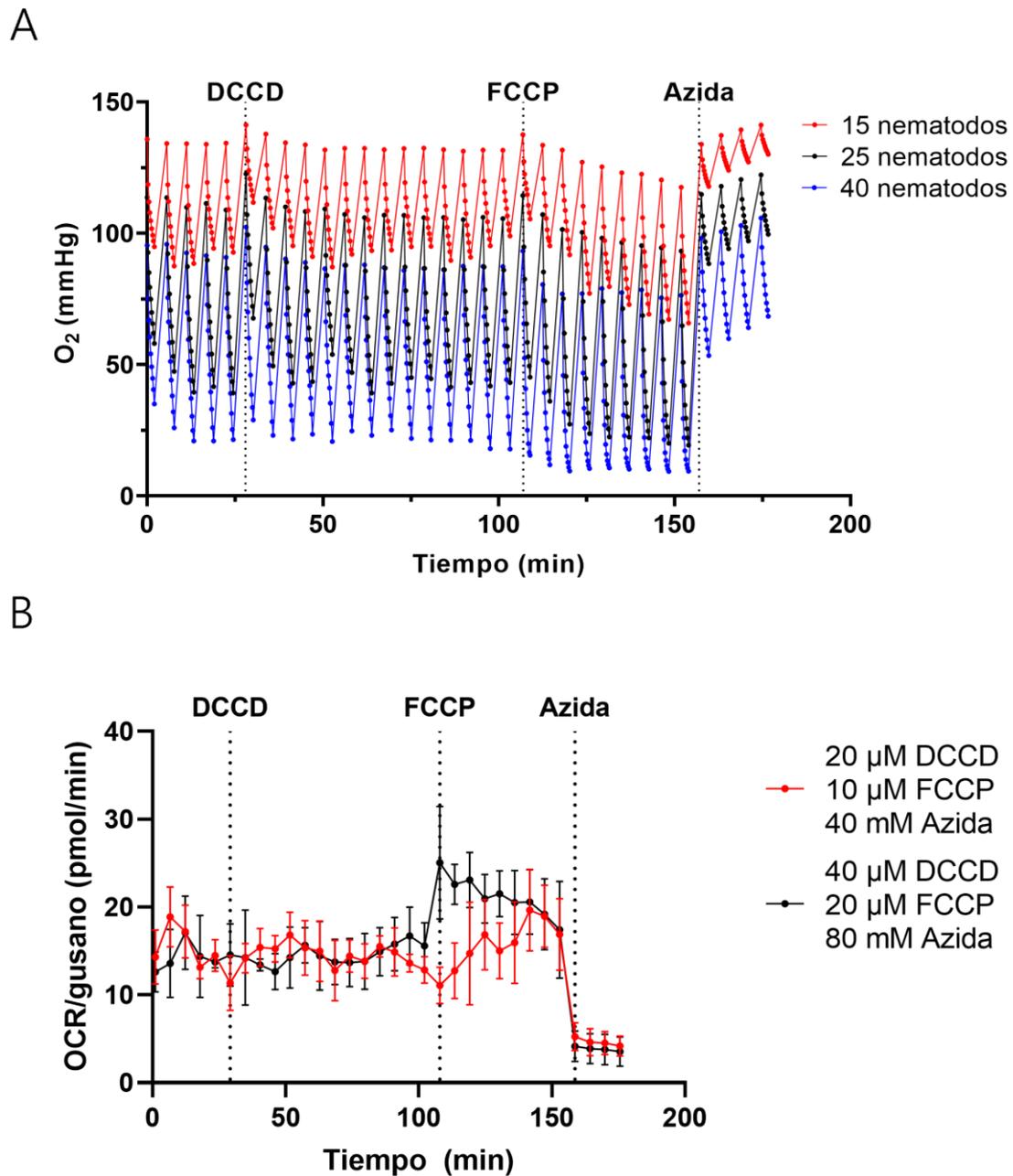


Figura 24: Respirimetrías de N2 adultos con DCCD, FCCP y azida. (a) Datos primarios de la respiimetrías para 15, 25 y 40 N2, en donde se inyectó como concentración final 20 μM DCCD, 10 μM FCCP y 40 mM azida. El FCCP aumenta el consumo de oxígeno y con 40 N2 por pocillo las pendientes se desvían. (b) OCR/gusano en el tiempo para 20 N2 por pocillo, con 20 μM DCCD, 10 μM FCCP y 40 mM Azida (rojo) y 40 μM DCCD, 20 μM FCCP y 80 mM azida (negro). Las concentraciones utilizadas de DCCD no son suficientes para apreciar el efecto del inhibidor. Para FCCP se requiere una mejor optimización, pero 20 μM da mejor resultado que 10 μM . La azida funciona bien en las dos concentraciones utilizadas.

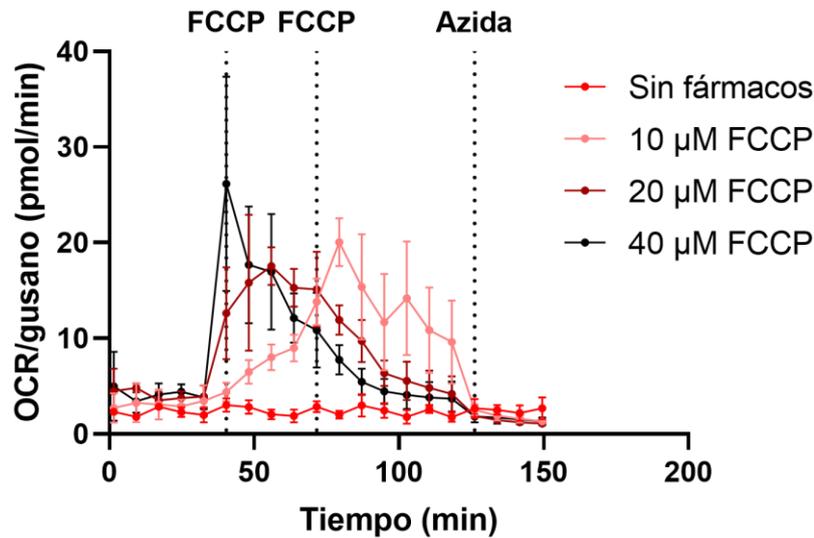


Figura 25: OCR/gusano en el tiempo para 20 N2 por pocillo con dos inyecciones de FCCP de concentración 10 μ M, 20 μ M o 40 μ M, y N2 sin fármacos (rojo). Con 10 μ M se requiere una segunda inyección para alcanza el máximo OCR. Con 20 μ M el OCR forma una meseta, que permite estimar el OCR máximo. 40 μ M genera una respuesta inmediata que decae rápidamente.

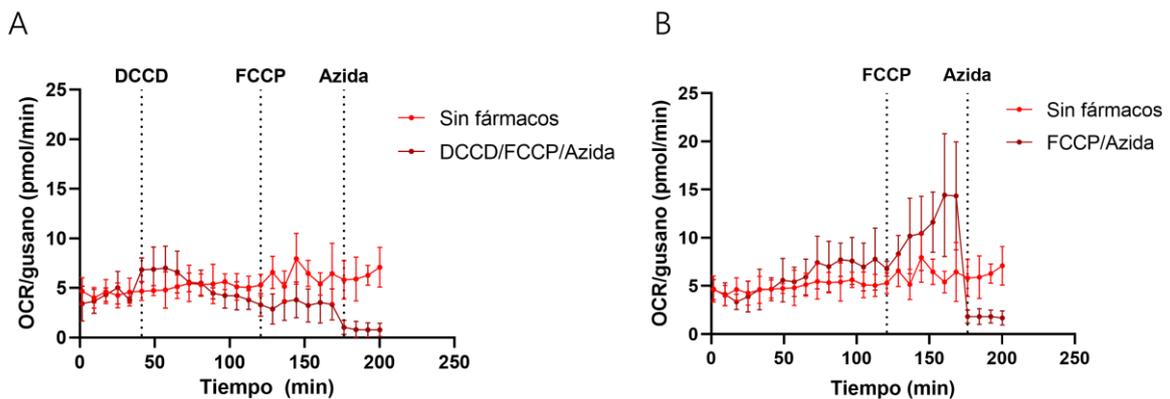


Figura 26: DCCD interfiere con el FCCP. (a) OCR/gusano en el tiempo para 20 N2 por pocillo, donde se inyecta 80 μ M DCCD, 20 μ M FCCP y 80 mM azida; y sin fármacos (rojo). Luego del DCCD, no se observa el aumento del OCR por acción del FCCP. (b) OCR/gusano en el tiempo para 20 N2 por pocillo, donde se inyecta 20 μ M FCCP y 80 mM azida; y sin fármacos (rojo). El efecto del FCCP se aprecia correctamente cuando no se inyecta DCCD antes.

Respirometrías en las distintas estirpes mutantes

Se llevaron a cabo las respirometrías en las 4 estirpes de interés, con 20 gusanos adultos. Se inyectó azida para poder calcular el OCR basal, que es el OCR que se corresponde con el consumo mitocondrial, ya que el consumo en presencia de azida corresponde al OCR no mitocondrial.

Para comenzar con los mutantes, en el que no sintetiza UQ, mutante en *clk-1(qm30)*, se esperaba que su OCR fuera más bajo que el de N2, ya que el DMQ9 no cubre por

completo a la UQ y estaría inhibiendo el complejo I, además de que la UQ8 de la dieta probablemente no se encuentre en la misma cantidad que la endógena en N2 y la cola isoprenoide es de diferente largo a la UQ del gusano. Un menor OCR en mutantes en *clk-1(e2519)* y *qm30* ya había sido reportado en un par de estudios (Braeckman et al., 1999; Van Raamsdonk et al., 2010). Como se ve en la **Figura 27a**, el OCR es más bajo que el de N2. Con esto se puede suponer que su CTE se encuentra afectada por la falta de UQ del gusano.

El mutante que no sintetiza RQ, *kynu-1(tm4924)*, sí tiene UQ endógena. No existen estudios en relación a cómo respiran estos gusanos, pero no se esperaban diferencias importantes con N2, ya que no hay función reportada de la RQ en normoxia. Este parece ser el caso, ya que los OCR basales son similares para el mutante en *kynu-1* y N2 (**Figura 27b**). En el mutante en *kynu-1* se observa una tendencia al descenso del OCR basal con el paso de los ciclos.

Por el lado del doble mutante, *clk-1;kynu-1*, se esperaba algo similar al mutante en *clk-1*, incluso un menor OCR, dado lo observado anteriormente con el cambio de dieta. Sin embargo, ocurrió lo contrario: el OCR del mutante en *clk-1;kynu-1* es considerablemente mayor que el de N2 (**Figura 27c**). Luego de los 100 minutos el OCR del mutante en *clk-1;kynu-1* comienza a disminuir, similar a lo que ocurría con el mutante en *clk-1*.

Dado que no se esperaba que el mutante en *clk-1;kynu-1* tuviera un OCR más alto que el de N2, se repitió el experimento, con una PCR previa para confirmar que, efectivamente, se trate del mutante correcto. Nuevamente los resultados fueron los mismos, el OCR se mantiene más alto que el de N2 y también disminuye con el número de ciclos (**Figura 27d**).

Cabe consignar que en este trabajo se reporta siempre el OCR por gusano porque en principio es un dato sin error (se cuentan todos los gusanos de cada pocillo al final del experimento) y resulta conveniente. Sin embargo, puede pasar que las diferencias entre las estirpes hagan más conveniente una normalización por concentración de proteína en el pocillo (por ejemplo, N2 es un gusano más grande que el mutante en *clk-1(qm30)* y normalizar por el número de gusanos podría no ser óptimo), lo cual es descrito Luz, Smith, et al., 2015, pero lo dejan a criterio del investigador. Hay literatura al respecto para el caso de otro mutante en *clk-1(e2519)*, en donde postulan que efectivamente, es

mejor normalizar por concentración de proteínas y en este caso las diferencias en el OCR respecto a N2 no son significativas (Braeckman et al., 2002).

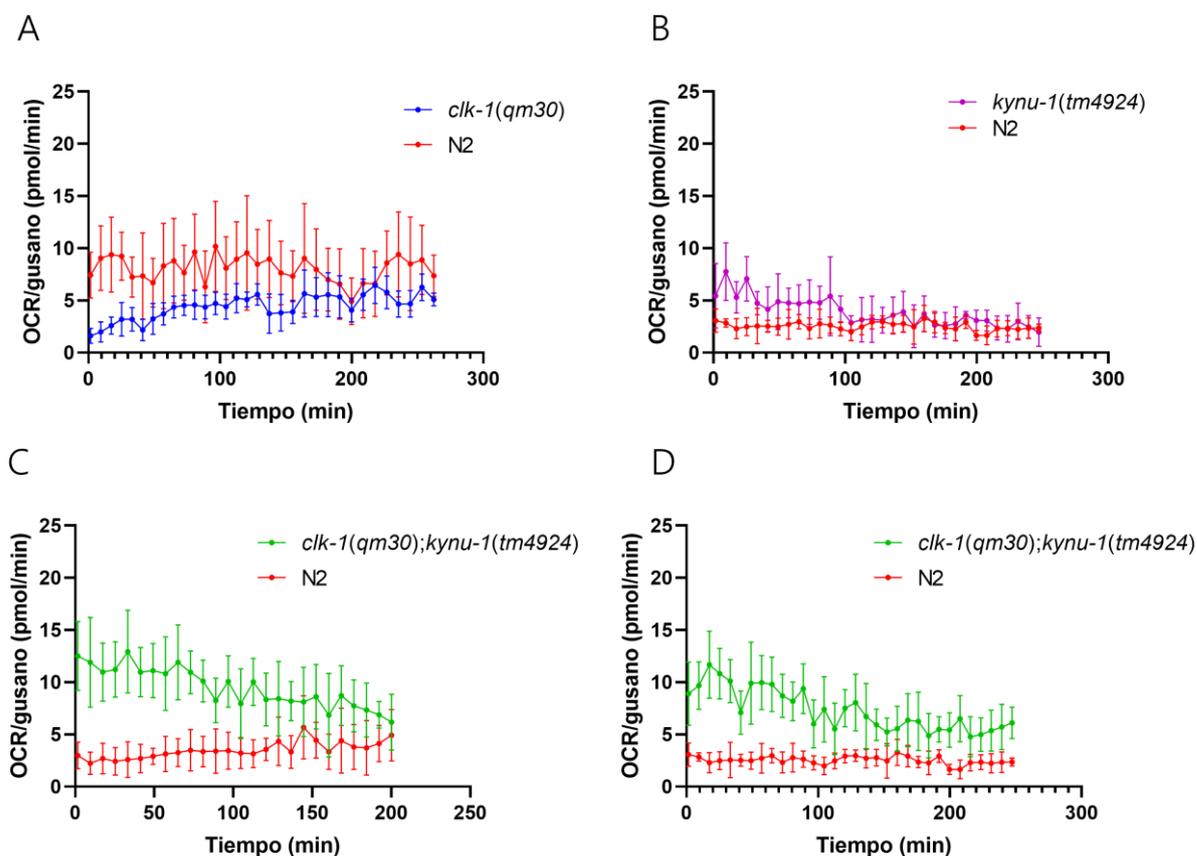


Figura 27: OCR basal para las estirpes de interés. (a) mutante en *clk-1(qm30)*, (b) mutante en *kynu-1(tm4924)*, (c) y (d) mutante en *clk-1(qm30);kynu-1(tm4924)*. Todas llevan como referencia a N2, la estirpe salvaje, ya que se realizaron en placas distintas. La respirometría del mutante en *clk-1;kynu-1* se realizó por duplicado para confirmar la tendencia.

En particular para el mutante en *clk-1;kynu-1*, el uso de fármacos que intervengan en la cadena respiratoria mitocondrial es de especial interés. Como se observa en la **Figura 28b**, el FCCP no tiene efecto sobre el OCR, como si la CTE del gusano ya estuviera funcionando al máximo y no tiene capacidad de reserva. Una explicación posible es que exista un gradiente de potencial muy bajo entre la matriz mitocondrial y el espacio intermembrana, por lo que el desacoplante no tenga efecto. El OCR basal es más alto por la misma razón: si el gradiente de potencial es muy bajo, el transporte de electrones es facilitado y se requiere un elevado funcionamiento de la cadena respiratoria para lograr la síntesis de ATP. Esto podría ser efecto de la desregulación que sufra el nematodo debido a la falta de benzoquinonas, pero el mecanismo de funcionamiento de su CTE es difícil de explicar. Sabemos que la cadena respiratoria está afectada por la falta de UQ9 y RQ. Las únicas benzoquinonas presentes son DMQ9 y

UQ8. Respecto a DMQ9, no permitiría el transporte de electrones I-III, pero sí el transporte II-III. UQ8 estaría en baja proporción y se desconoce si pudiera funcionar en el transporte I-III y cómo compite con DMQ9. Sin embargo, la acción del DCCD (Figura 28a) permite confirmar que los electrones llegan al complejo IV, en donde se reduce el oxígeno. La interrogante es quién le está aportando estos electrones al citocromo c.

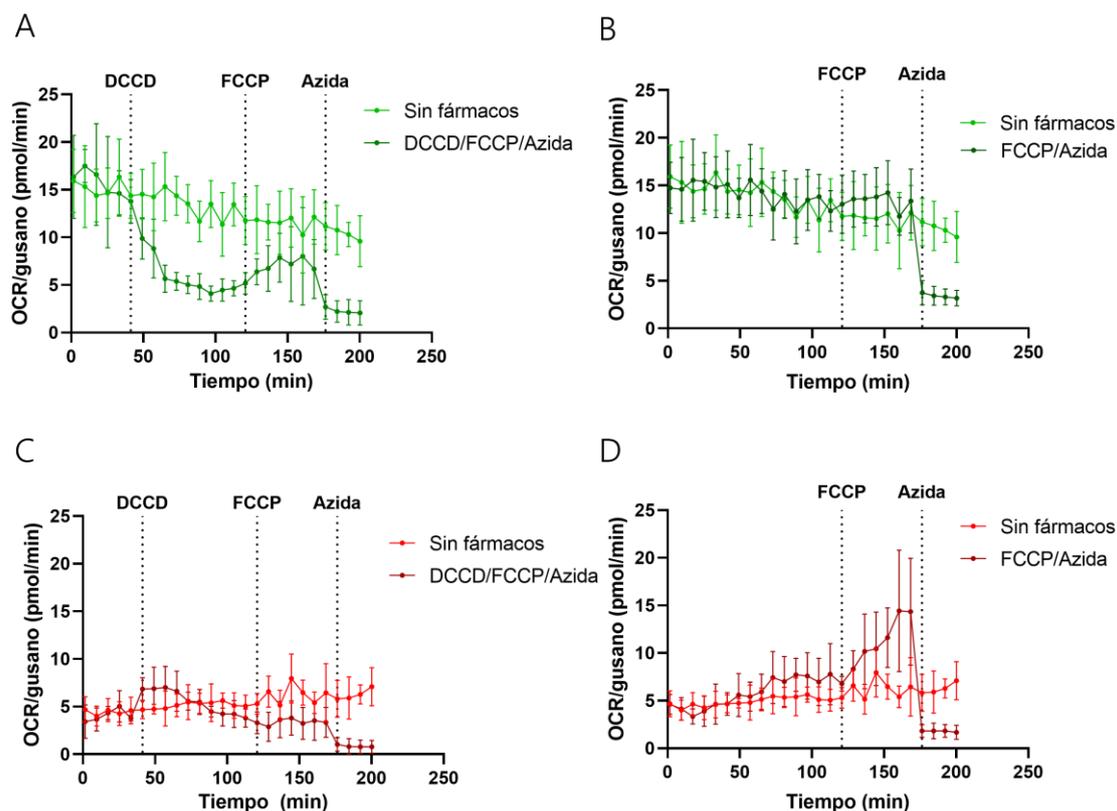


Figura 28: OCR por gusano en el tiempo para el mutante en *clk-1;kynu-1* (a) y (b) y N2 (c) y (d). Se utilizaron los inhibidores DCCD 80 μ M, FCCP 20 μ M y azida 80 mM. El mutante en *clk-1;kynu-1* responde correctamente a DCCD, pero no así FCCP.

Discusión

La UQ, a pesar de ser muy estudiada en diversos organismos, todavía engloba muchas preguntas. En *C. elegans* se sabe que es fundamental para su desarrollo, donde los mutantes en la biosíntesis de UQ no son viables, a excepción del mutante en *clk-1*, que debido al intermediario que acumula, DMQ9 junto con la UQ8 de *E. coli*, completa su desarrollo y es fértil. La UQ de la dieta pasa a un papel central en el desarrollo; su ausencia provoca la interrupción del desarrollo en las larvas y la deficiencia provoca infertilidad (Jonassen et al., 2001). El alcance que tiene la DMQ9 es desconocido, aunque los estudios en el tema sugieren que puede transportar electrones desde el complejo II al III, pero no así del I al III de la CTE mitocondrial (Yang et al., 2011). Es

importante mencionar que *clk-1* es el único gen “coq” que afecta a la biosíntesis de UQ, pero no la de RQ. Así pues, la viabilidad del mutante en *clk-1* podría explicarse por el papel no solo de la DMQ9 junto con la UQ8 de *E. coli*, sino de estas dos y la RQ. La RQ, benzoquinona que permite el funcionamiento del complejo II como fumarato reductasa, ha sido poco estudiada y muchas veces apartada de la discusión (Takamiya et al., 1999). No hay información sobre si puede transportar electrones hacia los otros complejos. Aunque su acción sea relevante en hipoxia, también se encuentra presente de forma constitutiva en normoxia, y se sabe poco de su función. Hasta ahora sólo se ha descrito que es esencial en la respuesta al cianuro y sulfuro. Esto podría ser relevante en la respuesta a microorganismos patógenos productores de estos metabolitos (Lautens et al., 2021; Romanelli-Cedrez et al., 2024). Por último, los efectos de la UQ de la dieta no han sido estudiados en nematodos que no sinteticen RQ.

En esta tesina se estudió el rol de la UQ dietaria en un mutante que no sintetiza UQ, un mutante que no sintetiza RQ y el doble mutante que no sintetiza UQ ni RQ, a través de la alimentación con *E. coli* con UQ (OP50) y *E. coli* sin UQ (GD1). Para ayudar a comprender el metabolismo en los mutantes de *C. elegans* se realizó una puesta a punto de las respirometrías en Seahorse. Cabe mencionar que hay muy pocos estudios que hayan utilizado respirometría de organismo entero en *C. elegans*, y de éstas son escasos y recientes los ejemplos que utilizan Seahorse, en tanto en nuestro laboratorio no se había implementado antes esta metodología.

La UQ de la dieta es esencial en el mutante en *clk-1(qm30)* y el doble mutante *clk-1(qm30);kynu-1(tm4924)*

El estudio de la influencia de la UQ de la dieta fue un comienzo muy positivo, donde todo lo visto en el mutante en *clk-1* es acorde a la bibliografía. Respecto al mutante en *kynu-1* la falta de UQ en la dieta no genera dificultades y por lo tanto la RQ no es esencial para el nematodo en normoxia, en las condiciones estándares en las que usualmente se cultiva el organismo. Respecto a hipoxia hay algunos resultados preliminares realizados en nuestro laboratorio, donde el mutante en *kynu-1(tm4924)* se recupera igual que N2 de la falta de oxígeno; no así cuando la atmósfera incluye sulfuro o cianuro, donde la RQ pasa a un papel esencial. El doble mutante muestra que la RQ (y la biosíntesis *de novo* de NAD⁺, que también está afectada en este mutante) sí son importantes, ya que los fenotipos observados son más severos que en el mutante en

clk-1(qm30); los movimientos son muy lentos y desincronizados, y requieren más horas en dieta con UQ para poder llegar a adultos fértiles. En este sentido, dilucidar si la contribución al fenotipo más severo del doble mutante es por la biosíntesis de RQ o NAD⁺ es importante. Esto se podría lograr estudiando un doble mutante en *haao-1* y *clk-1* que no afecta la biosíntesis de RQ, pero sí de NAD⁺, o el doble mutante *coq2-e* y *clk-1* que no afecta la biosíntesis de NAD⁺ pero si la de RQ.

Las respirometrías en Seahorse aportaron una nueva perspectiva respecto al doble mutante *clk-1/kynu-1*

Las respirometrías, aunque con dificultades para su interpretación, muestran la complejidad de las rutas metabólicas y sus interacciones y regulación, y dan pie a la aplicación de esta técnica en futuras investigaciones con *C. elegans*. En esta tesina se realizaron ensayos que podemos considerar iniciales. Se continuará con la optimización en la estirpe silvestre, N2, para asegurar la consistencia entre las réplicas y hallar la concentración óptima de los fármacos utilizados. Es importante destacar la sensibilidad de los nematodos (y organismos en general), ya que leves variaciones en las condiciones de medida, como pueden ser el tiempo que pasen sin alimento o la mayor temperatura a la que son sometidos durante el ensayo, pueden afectar significativamente el perfil metabólico (Van Voorhies, 2002). Mantener las condiciones uniformes es esencial al momento de comparar los resultados. En particular respecto al factor temperatura, se está trabajando para termostatar la temperatura en la sala donde se encuentra el equipo y así evitar superar los 25°C durante las corridas. De los inhibidores, el FCCP es el que requiere un ajuste más fino y se propone realizar 3 inyecciones con FCCP con una mayor variedad de concentraciones en el rango de 10 µM a 40 µM finales. Asimismo, es importante definir los criterios de normalización del OCR, ya que se ha visto que, al comparar distintas cepas, la cantidad de gusanos puede no ser la mejor opción para tomar como referencia, pero tampoco se puede asegurar que la normalización por proteínas totales sea mejor (Braeckman et al., 2002; Van Voorhies, 2002). Por último, se encuentra presente la idea de aprovechar los datos de ECAR que permite medir el Seahorse. Para ello es necesario realizar las medidas en un medio no tamponado (el M9 contiene un buffer fosfato), lo que requiere poner a punto el experimento bajo esas condiciones primero, y luego analizar los datos para ver si el cambio en el pH es notorio dado que trabajamos con el organismo entero en un breve período de tiempo.

Más allá de los ajustes metodológicos, un diseño experimental más amplio, que escapaba al alcance de la tesina, puede arrojar luz para comprender mejor los fenómenos observados. En este sentido se planea realizar las respirometrías con *C. elegans* alimentados con GD1, para continuar la descriptiva realizada en la tesina. Esto es posible realizarlo en adultos que han sido cambiados de dieta de OP50 a GD1, luego de 48 hs desde sembradas las L1. Sin estas 48 hs iniciales en OP50 las cepas mutantes en *clk-1* no alcanzan el estadio adulto.

Sin dudas, el resultado más llamativo concierne a las respirometrías del doble mutante, cuyo OCR basal es más alto que el de N2. Dado que el OCR del mutante en *clk-1* es menor que en N2, algo similar podría ser esperado para el doble mutante; que podría explicarse con la falta de UQ endógena y que el DMQ9 no puede actuar en la CTE de la misma manera que la UQ. Sin embargo, la explicación puede ser más compleja y de difícil racionalización con los resultados obtenidos al momento. Recientemente en nuestro laboratorio, Rosina Comas identificó por bioinformática a *rad-8* como un nuevo gen que afecta la biosíntesis de UQ y RQ. Este mutante sintetiza muy poca UQ (menos del 10% que N2) y muy poca RQ (menos del 2% que N2). Interesantemente, estudios previos de actividades enzimáticas en este mutante indican resultados también difíciles de reconciliar con los de las actividades enzimáticas del mutante en *clk-1*. En efecto, en el mutante en *clk-1* no hay pasaje de electrones entre el complejo I y III, pero sí entre el II y III, en tanto en el mutante en *rad-8*, la transferencia de electrones entre el complejo II y III está inhibida, pero no entre los complejos I y III (Fujii et al., 2011). Así pues, la deficiencia de ambas quinonas afecta de forma diferente que la ausencia de UQ. Volviendo al doble mutante utilizado en este trabajo, claramente, la desregulación metabólica que implica para el organismo la combinación de la falta de UQ, RQ y NAD⁺ lo sitúa en la necesidad aumentar su consumo de oxígeno. La complejidad que se presenta no permite realizar afirmaciones respecto a la interpretación de los resultados y excede en largo los objetivos del trabajo de la tesina. A continuación, planteamos algunos experimentos que permitirían ayudar a racionalizar los resultados observados, más allá de la previa y necesaria repetición de los experimentos presentados.

Perspectivas

Una de las formas de abordar la problemática, es a través de las respirometrías de nematodos alimentados con GD1, para eliminar toda influencia de la UQ8. Otra forma

de comenzar a diseccionar el fenómeno será mediante el uso del mutante en *coq-2e* que sintetiza una ínfima cantidad de RQ, y permite eliminar la variable de la falta de NAD⁺ *de novo* presente en el mutante en *kynu-1*. El mutante en *haao-1* también podría aportar elementos, ya que sólo tiene afectada la biosíntesis de NAD⁺ *de novo*, pero no la de RQ. Por otra parte, el helminto *Mesocestoides corti*, que posee grandes cantidades de RQ (aproximadamente 98%) y muy poca UQ (Comas-Ghierra et al., 2023). Este helminto no cuenta con las vías de síntesis *de novo* de NAD⁺ ni la vía del glioxilato, por lo que representa un modelo más sencillo para hacer respirometrías y podría ayudar a comprender el rol de la RQ en la cadena respiratoria. Si bien ya está confirmado que el mutante en *clk-1* no sintetiza UQ y que el mutante en *kynu-1* no sintetiza RQ, no se realizó la cuantificación de benzoquinonas en el doble mutante *clk-1;kynu-1*. Dada la falta de ambas benzoquinonas la fisiología de la membrana mitocondrial interna podría verse afectada. Asimismo, más espacio teórico en dicha membrana podría ser aprovechado por UQ8 y/o DMQ9. Por otro lado, la regulación de biosíntesis podría funcionar de otra forma, afectando la producción de, por ejemplo, DMQ9. Más llamativamente, aunque no es posible descartarlo, podría ser la producción de alguna de las benzoquinonas por otra vía no manifiesta en los mutantes simples. La determinación de benzoquinonas por HPLC-MS recientemente se puso a punto en CEINBIO por el Dr. Mauricio Mastrogiovanni.

Respecto al doble mutante *clk-1;kynu-1*, recientemente se obtuvo el ensayo de longevidad, que fue encargado a Suny Biotech, reveló una duración de vida (*lifespan*) de 34 días, mayor que la reportada para el mutante en *clk-1(qm30)* de 22 días. Sin embargo, el máximo *lifespan* es mayor en el mutante en *clk-1*, con 46 contra los 41 del mutante en *clk-1;kynu-1*. En el mutante en *clk-1*, muchas de las explicaciones propuestas sobre su mayor longevidad se relacionan con una baja en el metabolismo y la menor producción de ROS. El mutante en *clk-1;kynu-1* muestra fenotipos de movimiento y desarrollo como el mutante en *clk-1*, pero su OCR basal es máximo, lo que, considerando esta hipótesis, debería tener una menor longevidad.

Finalmente, el doble mutante constituye un modelo de longevidad no deseada, en la que la vida se alarga completamente dissociada de un funcionamiento normal. En efecto, su metabolismo parece desregulado y no se desarrolla ni envejece bien: pone huevos inviables y tiene dificultades importantes de movimiento, que incluso le dificultan desplazarse hacia el alimento.

Conclusiones

Se logró estudiar la influencia de la dieta en la cepa salvaje, N2 y los mutantes en la vía de biosíntesis de UQ y/o RQ. Para el mutante en *clk-1*, los resultados obtenidos son concordantes con la bibliografía consultada; se vio el arresto si las L1 son alimentadas con dieta sin UQ, que unas 20 a 24 hs con OP50 son suficientes para que se desarrollen en adultos, pero son estériles, el retraso en el crecimiento de aproximadamente un día con respecto a N2. Para el mutante en *kynu-1*, la dieta sin UQ no es un problema. La única observación es que tiene una menor progenie respecto a N2 y, de acuerdo con la bibliografía, sería debida a la falta de NAD⁺. El doble mutante muestra los fenotipos de *clk-1*, pero en mayor intensidad, muestra que la falta de RQ junto con UQ genera más problemas.

Las respirometrías son de gran utilidad y el protocolo utilizado funciona adecuadamente, aunque requiere de algunos ajustes para que sea confiable. Permitieron una primera aproximación al estudio de la respiración en las distintas cepas, que mostraron diferencias entre sí y con respecto a N2, lo que abre nuevos caminos en la línea de investigación.

Bibliografía

- Altun, Z. F., & Hall, D. H. (2024). *Handbook of C. elegans Anatomy*. In *WormAtlas*.
<http://www.wormatlas.org/hermaphrodite/hermaphroditehomepage.htm>
- Barstead, R., Moulder, G., Cobb, B., Frazee, S., Henthorn, D., Holmes, J., Jerebie, D., Landsdale, M., Osborn, J., Pritchett, C., Robertson, J., Rummage, J., Stokes, E., Vishwanathan, M., Mitani, S., Gengyo-Ando, K., Funatsu, O., Hori, S., Imae, R., ... Zapf, R. (2012). Large-scale screening for targeted knockouts in the *Caenorhabditis elegans* genome. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 2(11), 1415–1425. <https://doi.org/10.1534/G3.112.003830/-/DC1>
- Bentinger, M., Tekle, M., & Dallner, G. (2010). Coenzyme Q - Biosynthesis and functions. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 396(1), 74–79.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.02.147>
- Bernert, A. C., Jacobs, E. J., Reinl, S. R., Choi, C. C. Y., Roberts Buceta, P. M., Culver, J. C., Goodspeed, C. R., Bradley, M. C., Clarke, C. F., Basset, G. J., & Shepherd, J. N. (2019). Recombinant RquA catalyzes the in vivo conversion of ubiquinone to rhodoquinone in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta. Molecular*

- and Cell Biology of Lipids*, 1864(9), 1226–1234.
<https://doi.org/10.1016/J.BBALIP.2019.05.007>
- Boulin, T., Etchberger, J. F., & Hobert, O. (2006). Reporter gene fusions. In *WormBook: the online review of C. elegans biology* (pp. 1–23).
<https://doi.org/https://doi.org/10.1895/wormbook.1.106.1>
- Braeckman, B. P., Houthoofd, K., & Vanfleteren, J. R. (2002). Assessing metabolic activity in aging *Caenorhabditis elegans*: concepts and controversies. In *Aging cell* (Vol. 1, Issue 2, pp. 82–88). <https://doi.org/10.1046/j.1474-9728.2002.00021.x>
- Braeckman, B. P., Houthoofd, K., & Vanfleteren, J. R. (2008). *Intermediary metabolism*.
<https://doi.org/10.1895/wormbook.1.146.1>
- Braeckman, B. P., Houthoofd, K., Vreese, A. De, Vanfleteren, J. R., Braeckman, B. P., Houthoofd, K., Vreese, A. De, & Vanfleteren, J. R. (1999). Apparent uncoupling of energy production and consumption in long-lived *Clk* mutants of *Caenorhabditis elegans*. *CBio*, 9(9), 493–497.
[https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(99\)80216-4](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(99)80216-4)
- Brenner, S. (1974). The Genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 77(1), 71–94.
<https://doi.org/10.1093/genetics/77.1.71>
- Burgess, J., Hihi, A. K., Benard, C. Y., Branicky, R., & Hekimi, S. (2003). Molecular mechanism of maternal rescue in the *clk-1* mutants of *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(49), 49555–49562. <https://doi.org/10.1074/JBC.M308507200>
- Burns, A. R., Luciani, G. M., Musso, G., Bagg, R., Yeo, M., Zhang, Y., Rajendran, L., Glavin, J., Hunter, R., Redman, E., Stasiuk, S., Schertzberg, M., Angus McQuibban, G., Caffrey, C. R., Cutler, S. R., Tyers, M., Giaever, G., Nislow, C., Fraser, A. G., ... Roy, P. J. (2015). *Caenorhabditis elegans* is a useful model for anthelmintic discovery. *Nature Communications*, 6. <https://doi.org/10.1038/NCOMMS8485>
- Campbell, A. R. M., Titus, B. R., Kuenzi, M. R., Rodriguez-Perez, F., Brunsch, A. D. L., Schroll, M. M., Owen, M. C., Cronk, J. D., Anders, K. R., & Shepherd, J. N. (2019). Investigation of candidate genes involved in the rhodospirillum biosynthetic pathway in *Rhodospirillum rubrum*. *PLoS ONE*, 14(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0217281>
- Cape, J. L., Bowman, M. K., & Kramer, D. M. (2007). A semiquinone intermediate generated at the Q o site of the cytochrome bc 1 complex: Importance for the Q-cycle and superoxide production. In *PNAS May* (Vol. 8). <https://doi.org/https://doi.org/10.1073/pnas.0702621104>
- Chalfie, M. (1995). GREEN FLUORESCENT PROTEIN. *Photochemistry and Photobiology*, 62(4), 651–656. <https://doi.org/10.1111/J.1751-1097.1995.TB08712.X>

- Comas-Ghierra, R., Alshaheeb, A., McReynolds, M. R., Shepherd, J. N., & Salinas, G. (2023). A Minimal Kynurenine Pathway Was Preserved for Rhodoquinone but Not for De Novo NAD⁺ Biosynthesis in Parasitic Worms: The Essential Role of NAD⁺ Rescue Pathways. *https://Home.Liebertpub.Com/Ars*. <https://doi.org/10.1089/ARS.2023.0293>
- Corsi, A. K., Wightman, B., & Chalfie, M. (2015). A transparent window into biology: A primer on *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, *200*(2), 387–407. <https://doi.org/10.1534/genetics.115.176099>
- Cox, M. M., & Nelson, D. L. (2008). *Lehninger Principles of Biochemistry, Cap 19* (5th ed.). W. H. Freeman.
- Del Borrello, S., Lautens, M., Dolan, K., Tan, J. H., Davie, T., Schertzberg, M., Spensley, M. A., Caudy, A. A., & Fraser, A. G. (2019). Rhodoquinone biosynthesis in 1 *C.elegans* requires precursors generated by the kynurenine pathway. *ELife*, *8*. <https://doi.org/10.7554/eLife.48165.001>
- Desbats, M. A., Lunardi, G., Doimo, M., Trevisson, E., & Salviati, L. (2015). Genetic bases and clinical manifestations of coenzyme Q10 (CoQ10) deficiency. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, *38*(1), 145–156. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s10545-014-9749-9>
- Dranka, B. P., Benavides, G. A., Diers, A. R., Giordano, S., Zelickson, B. R., Reily, C., Zou, L., Chatham, J. C., Hill, B. G., Zhang, J., Landar, A., & Darley-Usmar, V. M. (2011). Assessing bioenergetic function in response to oxidative stress by metabolic profiling. *Free Radical Biology & Medicine*, *51*(9), 1621. <https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2011.08.005>
- Earls, L. R., Hacker, M. L., Watson, J. D., & Miller, D. M. (2010). Coenzyme Q protects *Caenorhabditis elegans* GABA neurons from calcium-dependent degeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(32), 14460–14465. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0910630107>
- Erabi, T., Higuti, T., Kakuno, T., Yamashita, J., Tanaka, M., & Horio, T. (1975). Polarographic Studies on Ubiquinone-10 and Rhodoquinone Bound with Chromatophores from *Rhodospirillum rubrum*. *The Journal of Biochemistry*, *78*(4), 795–801. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a130968>
- Felkai, S., Ewbank, J. J., Lemieux, J., Labbé, J. C., Brown, G. G., & Hekimi, S. (1999). CLK-1 controls respiration, behavior and aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *The EMBO Journal*, *18*(7), 1783–1792. <https://doi.org/10.1093/EMBOJ/18.7.1783>
- Fujii, M., Yasuda, K., Hartman, P. S., Ayusawa, D., & Ishii, N. (2011). A mutation in a mitochondrial dehydrogenase/reductase gene causes an increased sensitivity to oxidative stress and

- mitochondrial defects in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms*, 16(10), 1022–1034. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2443.2011.01547.X>
- Gallagher, L. A., & Manoil, C. (2001). *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 kills *Caenorhabditis elegans* by cyanide poisoning. *Journal of Bacteriology*, 183(21), 6207–6214. <https://doi.org/10.1128/JB.183.21.6207-6214.2001>
- Gavilán, Á., Asencio, C., Cabello, J., Rodríguez-Aguilera, J. C., Schnabel, R., & Navas, P. (2005). *C. elegans* knockouts in ubiquinone biosynthesis genes result in different phenotypes during larval development. *BioFactors*, 25(1–4), 21–29. <https://doi.org/10.1002/BIOF.5520250104>
- Hartman, P. S., & Herman, R. K. (1982). Radiation-sensitive mutants of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 102(2), 159–178. <https://doi.org/10.1093/genetics/102.2.159>
- Hihi, A. K., Gao, Y., & Hekimi, S. (2002). Ubiquinone Is Necessary for *Caenorhabditis elegans* Development at Mitochondrial and Non-mitochondrial Sites. *Journal of Biological Chemistry*, 277(3), 2202–2206. <https://doi.org/10.1074/JBC.M109034200>
- Hihi, A. K., Kébir, H., & Hekimi, S. (2003). Sensitivity of *Caenorhabditis elegans* *clk-1* Mutants to Ubiquinone Side-chain Length Reveals Multiple Ubiquinone-dependent Processes. *Journal of Biological Chemistry*, 278(42), 41013–41018. <https://doi.org/10.1074/JBC.M305034200>
- How to run an assay / Agilent*. (n.d.). Retrieved March 15, 2024, from <https://www.agilent.com/en/product/cell-analysis/how-to-run-an-assay>
- Hsu, A. Y., Poon, W. W., Shepherd, J. A., Myles, D. C., & Clarke, C. F. (1996). Complementation of *coq3* Mutant Yeast by Mitochondrial Targeting of the *Escherichia coli* UbiG Polypeptide: Evidence That UbiG Catalyzes Both O-Methylation Steps in Ubiquinone Biosynthesis†. *Biochemistry*, 35(30), 9797–9806. <https://doi.org/10.1021/BI9602932>
- Hu, P. J. (2007). Dauer. In *WormBook* (pp. 1–19).
- Jonassen, T., Davis, D. E., Larsen, P. L., & Clarke, C. F. (2003). Reproductive Fitness and Quinone Content of *Caenorhabditis elegans* *clk-1* Mutants Fed Coenzyme Q Isoforms of Varying Length. *Journal of Biological Chemistry*, 278(51), 51735–51742. <https://doi.org/10.1074/jbc.M308760200>
- Jonassen, T., Larsen, P. L., Clarke, C. F., & Robert Horvitz, H. (2001). *A dietary source of coenzyme Q is essential for growth of long-lived Caenorhabditis elegans clk-1 mutants*. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.021337498

- Jonassen, T., Marbois, B. N., Faull, K. F., Clarke, C. F., & Larsen, P. L. (2002). Development and fertility in *Caenorhabditis elegans* clk-1 mutants depend upon transport of dietary coenzyme Q8 to mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(47), 45020–45027. <https://doi.org/10.1074/jbc.M204758200>
- Jonassen, T., Proft, M., Randez-Gil, F., Schultz, J. R., Marbois, B. N., Entian, K. D., & Clarke, C. F. (1998). Yeast Clk-1 homologue (Coq7/Cat5) is a mitochondrial protein in coenzyme Q synthesis. *The Journal of Biological Chemistry*, *273*(6), 3351–3357. <https://doi.org/10.1074/JBC.273.6.3351>
- Kawamukai, M. (2002). Biosynthesis, bioproduction and novel roles of ubiquinone. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *94*(6), 511–517. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(02\)80188-8](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(02)80188-8)
- Koopman, M., Michels, H., Dancy, B. M., Kamble, R., Mouchiroud, L., Auwerx, J., Nollen, E. A. A., & Houtkooper, R. H. (2016). A screening-based platform for the assessment of cellular respiration in *Caenorhabditis elegans*. *Nature Protocols* *2016 11:10*, *11*(10), 1798–1816. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.106>
- Lautens, M. J., Tan, J. H., Serrat, X., Del Borrello, S., Schertzberg, M. R., & Fraser, A. G. (2021). Identification of enzymes that have helminth-specific active sites and are required for Rhoquinone-dependent metabolism as targets for new anthelmintics. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *15*(11), e0009991. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PNTD.0009991>
- Luz, A. L., Rooney, J. P., Kubik, L. L., Gonzalez, C. P., Song, D. H., & Meyer, J. N. (2015). Mitochondrial Morphology and Fundamental Parameters of the Mitochondrial Respiratory Chain Are Altered in *Caenorhabditis elegans* Strains Deficient in Mitochondrial Dynamics and Homeostasis Processes. *PLoS ONE*, *10*(6). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0130940>
- Luz, A. L., Smith, L. L., Rooney, J. P., & Meyer, J. N. (2015). Seahorse Xfe24 Extracellular Flux Analyzer-Based Analysis of Cellular Respiration in *Caenorhabditis elegans*. *Current Protocols in Toxicology*, *66*(1), 25.7.1–25.7.15. <https://doi.org/10.1002/0471140856.TX2507S66>
- Marbois, B., Xie, L. X., Choi, S., Hirano, K., Hyman, K., & Clarke, C. F. (2010). para-aminobenzoic acid is a precursor in coenzyme Q6 biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, *285*(36), 27827–27838. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.151894>
- McReynolds, M. R., Wang, W., Holleran, L. M., & Hanna-Rose, W. (2017). Uridine monophosphate synthetase enables eukaryotic de novo NAD⁺ biosynthesis from quinolinic acid. *Journal of Biological Chemistry*, *292*(27), 11147–11153. <https://doi.org/10.1074/jbc.C117.795344>

- Meganathan, R. (2001). Ubiquinone biosynthesis in microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, 203(2), 131–139. <https://doi.org/10.1111/J.1574-6968.2001.TB10831.X>
- Meneely, P. M., Dahlberg, C. L., & Rose, J. K. (2019). Working with Worms: *Caenorhabditis elegans* as a Model Organism. *Current Protocols in Essential Laboratory Techniques*, 19(1). <https://doi.org/10.1002/cpet.35>
- Miyadera, H., Amino, H., Hiraishi, A., Taka, H., Murayama, K., Miyoshill, H., Sakamoto, K., Ishii, N., Hekimi, S., & Kita, K. (2001). Altered quinone biosynthesis in the long-lived *clk-1* mutants of *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(11), 7713–7716. <https://doi.org/10.1074/JBC.C000889200>
- Müller, M., Mentel, M., van Hellemond, J. J., Henze, K., Woehle, C., Gould, S. B., Yu, R.-Y., van der Giezen, M., Tielens, A. G. M., & Martin, W. F. (2012). Biochemistry and Evolution of Anaerobic Energy Metabolism in Eukaryotes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 76(2), 444–495. <https://doi.org/10.1128/mubr.05024-11>
- Pierrel, F., Burgardt, A., Lee, J. H., Pelosi, L., & Wendisch, V. F. (2022). Recent advances in the metabolic pathways and microbial production of coenzyme Q. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 2022 38:4, 38(4), 1–13. <https://doi.org/10.1007/S11274-022-03242-3>
- Rankin, C. H. (2002). From gene to identified neuron to behaviour in *Caenorhabditis elegans*. In *Nature Reviews Genetics* (Vol. 3, Issue 8, pp. 622–630). European Association for Cardio-Thoracic Surgery. <https://doi.org/10.1038/nrg864>
- Roberts Buceta, P. M., Romanelli-Cedrez, L., Babcock, S. J., Xun, H., VonPaige, M. L., Higley, T. W., Schlatter, T. D., Davis, D. C., Drexelius, J. A., Culver, J. C., Carrera, I., Shepherd, J. N., & Salinas, G. (2019). The kynurenine pathway is essential for rholoquinone biosynthesis in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Biological Chemistry*, 294(28), 11047–11053. <https://doi.org/10.1074/jbc.AC119.009475>
- Rodríguez-Aguilera, J. C., Asencio, C., Ruiz-Ferrer, M., Vela, J., & Navas, P. (2003). *Caenorhabditis elegans* ubiquinone biosynthesis genes. *BioFactors (Oxford, England)*, 18(1–4), 237–244. <https://doi.org/10.1002/BIOF.5520180226>
- Romanelli-Cedrez, L., vairoletti, F., & Salinas, G. (2024). Rholoquinone-dependent electron transport chain is essential for *C. elegans* survival in hydrogen sulfide environments. *BioRxiv*, 2024.02.23.581771. <https://doi.org/10.1101/2024.02.23.581771>
- Saiki, R., Lunceford, A. L., Bixler, T., Dang, P., Lee, W., Furukawa, S., Larsen, P. L., & Clarke, C. F. (2008). Altered bacterial metabolism, not coenzyme Q content, is responsible for the

- lifespan extension in *Caenorhabditis elegans* fed an *Escherichia coli* diet lacking coenzyme Q. *Aging Cell*, *7*(3), 291–304. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2008.00378.x>
- Salinas, G., Langelaan, D. N., & Shepherd, J. N. (2020). Rhodoquinone in bacteria and animals: Two distinct pathways for biosynthesis of this key electron transporter used in anaerobic bioenergetics. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, *1861*(11). <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2020.148278>
- Sansbury, B. E., Jones, S. P., Riggs, D. W., Darley-Usmar, V. M., & Hill, B. G. (2011). Bioenergetic function in cardiovascular cells: The importance of the reserve capacity and its biological regulation. *Chemico-Biological Interactions*, *191*, 288–295. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2010.12.002>
- Shen, C., Nettleton, D., Jiang, M., Kim, S. K., & Powell-Coffman, J. A. (2005). Roles of the HIF-1 Hypoxia-inducible Factor during Hypoxia Response in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(21), 20580–20588. <https://doi.org/10.1074/JBC.M501894200>
- Takamiya, S., Matsui, T., Taka, H., Murayama, K., Matsuda, M., & Aoki, T. (1999). Free-Living Nematodes *Caenorhabditis elegans* Possess in Their Mitochondria an Additional Rhodoquinone, an Essential Component of the Eukaryotic Fumarate Reductase System. In *Archives of Biochemistry and Biophysics* (Vol. 371, Issue 2). <http://www.idealibrary.comon>
- Tan, J. H., Lautens, M., Romanelli-Cedrez, L., Wang, J., Schertzberg, M. R., Reinl, S. R., Davis, R. E., Shepherd, J. N., Fraser, A. G., & Salinas, G. (2020). Alternative splicing of *coq-2* controls the levels of rhodoquinone in animals. *ELife*, *9*, 1–19. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.56376>
- The *C. elegans* Sequencing Consortium. (1998). Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science (New York, N.Y.)*, *282*(5396), 2012–2018. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.282.5396.2012>
- Timmons, L., & Fire, A. (1998). Specific interference by ingested dsRNA. *Nature*, *395*(6705), 854. <https://doi.org/10.1038/27579>
- Turrens, J. F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. In *Journal of Physiology* (Vol. 552, Issue 2, pp. 335–344). <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.049478>
- Van Raamsdonk, J. M., Meng, Y., Camp, D., Yang, W., Jia, X., Bénard, C., & Hekimi, S. (2010). Decreased Energy Metabolism Extends Life Span in *Caenorhabditis elegans* Without Reducing Oxidative Damage. *Genetics*, *185*(2), 559. <https://doi.org/10.1534/GENETICS.110.115378>

- Van Voorhies, W. A. (2002). The influence of metabolic rate on longevity in the nematode *Caenorhabditis elegans*. In *Aging cell* (Vol. 1, Issue 2, pp. 91–101).
<https://doi.org/10.1046/j.1474-9728.2002.00022.x>
- Wang, Y., & Hekimi, S. (2013). Molecular genetics of ubiquinone biosynthesis in animals. In *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* (Vol. 48, Issue 1, pp. 69–88).
<https://doi.org/10.3109/10409238.2012.741564>
- Wang, Y., & Hekimi, S. (2016). Understanding Ubiquinone. In *Trends in Cell Biology* (Vol. 26, Issue 5, pp. 367–378). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.12.007>
- Wang, Y., & Hekimi, S. (2019). The Complexity of Making Ubiquinone. In *Trends in Endocrinology and Metabolism* (Vol. 30, Issue 12, pp. 929–943). Elsevier Inc.
<https://doi.org/10.1016/j.tem.2019.08.009>
- White, J., Southgate, E., Thomson, J., & Brenner, S. (1986). The structure of the nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 314(1165), 1–340.
<https://doi.org/10.1098/RSTB.1986.0056>
- Wong, A., Boutis, P., & Hekimi, S. (1995). Mutations in the *clk-1* gene of *Caenorhabditis elegans* affect developmental and behavioral timing. *Genetics*, 139(3), 1247–1259.
<https://doi.org/10.1093/GENETICS/139.3.1247>
- Yang, Y. Y., Vasta, V., Hahn, S., Gangoiti, J. A., Opheim, E., Sedensky, M. M., & Morgan, P. G. (2011). The role of DMQ9 in the long-lived mutant *clk-1*. *Mechanisms of Ageing and Development*, 132(6–7), 331–339. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2011.06.009>