



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

**LA HELICASA DE RNA VBH-1 PARTICIPA EN LA RESPUESTA AL ESTRÉS
EN *C. elegans***

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA
DANIEL PAZ GÓMEZ

TUTOR PRINCIPAL
DRA. ROSA E. NAVARRO GONZÁLEZ
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

COMITÉ TUTORAL
DR. FÉLIX RECILLAS TARGA
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

DRA MARÍA IMELDA LÓPEZ VILLASEÑOR
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

MÉXICO, D. F. ENERO DEL 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo se realizó bajo la dirección de la Dra. Rosa Estela Navarro González en el Departamento de Biología Celular y del Desarrollo del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Este trabajo recibió apoyo de proyectos de SEP-CONACyT (50896-Q y 103856-Q), y del Programa de Apoyo a la Innovación e Investigación Tecnológica (PAPIIT-UNAM IN225509 e IN207412).

Daniel Paz Gómez recibió una beca durante la realización de sus estudios de Doctorado por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, México) con número de registro 230349 y una beca para la conclusión de estudios del Programa de Apoyo a la Innovación e Investigación Tecnológica (PAPIIT-UNAM IN207412).

Agradecimientos académicos

- A la UNAM, en especial a la comunidad del Instituto de Fisiología Celular

- Al posgrado en Ciencias Biomédicas

- A CONACyT por otorgarme la beca que me permitió llevar a cabo mi Doctorado.

- A mi asesora, la Dra. Rosa E. Navarro González, por aceptarme en su equipo de trabajo y por todo lo que aprendí en el laboratorio.

- A mi comité tutorial, Dr. Félix Recillas Targa, Dra Imelda López Villaseñor y Dr. Roman Vidal Tamayo Ramírez; por su paciencia y comentarios durante los tutorales.

- A los integrantes del jurado, Dr. Juan Miranda, Dra. Mina Konigsberg, Dr. Enrique Pedernera y Dr. Luis Padilla; por la revisión crítica del manuscrito.

- A la técnico del laboratorio, M.C. Laura Silvia Salinas Velázquez, por su constante apoyo en el laboratorio tanto a nivel técnico como personal.

- A la Dra. Laura Ongay Larios y al personal de la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular: Guadalupe Códiz Huerta y Minerva Mora Cabrera por la asistencia técnica en la realización de este trabajo.

- Al Dr. Jorge Ramírez Salcedo y al personal de la Unidad de Microarreglos de la UNAM: Lorena Chávez González, José Luis Santillán Torres y Simón Guzmán Torres por la construcción e hibridización de los microarreglos.

- Al personal de la Unidad de Cómputo del Instituto de Fisiología Celular: Ana María Escalante, Ivette Rosas, Gerardo Coello, Juan Manuel Barbosa y Francisco Pérez por su asistencia técnica.

- A los integrantes del laboratorio por su amistad y apoyo: Sra. Rocío, Valeria, Ari, Luis, Paulette, Gabi, Emmanuel, Javier, Isabel, Julián, Laura y Giovani.

Agradecimientos personales

- A mis padres Raquel y Rafael, por darme la vida y hacer hasta lo imposible porque la viviera feliz dándome siempre el mejor ejemplo. Te quiero mamá, te extraño mucho papá.

- A mis hermanos Eva, Maggie, Rafael y Pepe por ser mis cómplices desde niño y por darme el regalo de mis sobrinos.

- A mis sobrinos Marianita, Leo, Carlitos, Vale y Nat por recordarme lo bueno de la vida y enseñarme a no dejar de asombrarme.

- A Haydee por su amor e inmensa paciencia. Te amo

Resumen

La familia de helicasas de RNA de la familia con caja DEAD comprende un amplio número de proteínas con diversas funciones. La presencia de diferentes motivos alrededor de su dominio central de helicasa les permiten participar en prácticamente todos los pasos del metabolismo del RNA como son: transcripción, corte y empalme de mRNAs inmaduros, biogénesis del ribosoma, exportación nuclear de mRNAs maduros, traducción, expresión genética de organelos celulares y degradación de RNA. Recientemente se ha encontrado que algunas de estas helicasas de RNA con caja DEAD tienen un papel en diferentes condiciones de estrés. VBH-1 es una helicasa de esta familia que se encuentra enriquecida en la línea germinal de *Caenorhabditis elegans* en donde es importante para la fertilidad y el desarrollo embrionario. En este estudio se encontró que VBH-1 y su parólogo LAF-1 tienen una función importante para la supervivencia de *C. elegans* en condiciones de choque de calor y de estrés oxidante. El papel de VBH-1 en estas condiciones parece depender de su expresión en el soma, posiblemente en el intestino. Además, la cantidad de mRNAs de las chaperonas *hsp-1* y *sip-1* disminuye cuando se silencia a *vbh-1* y *laf-1* lo que sugiere que estos mRNAs son sus blancos y que el efecto protector de ambas helicasas durante el estrés podría depender de la regulación de estos mRNAs. La localización de VBH-1 durante un choque de calor, ayuno y detención de la ovulación en la gónada y embriones tempranos sugiere que tiene también una función protectora de la línea germinal durante el estrés. En estas condiciones VBH-1 se agregó en gránulos que podrían ser de estrés y/o cuerpos de procesamiento.

Abreviaturas utilizadas

ATP, ADP	Trifosfato de adenosina, difosfato de adenosina
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
CGH-1	Helicasa conservada de la línea germinal -1
DCAP-2	Enzima de remoción del cap -2
DDX	Helicasa de caja DEAD
DEAD	Asp-Glu-Ala-Asp
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ERO	Especies reactivas de oxígeno
GFP	Proteína verde fluorescente
GLP-4	Deficiente en la proliferación de la línea germinal -4
GST	Glutación-S transferasa
HIF-1	Factor inducible por hipoxia -1
HSF-1	Factor de choque de calor -1
HSP	Proteína de choque de calor
IRES	Sitio de entrada interna del ribosoma

LAF-1	Letal y Feminizante -1
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
NGM	Medio para el crecimiento de nematodos
NMD	Degradación mediada por mutaciones sin sentido
NTP	Nucleótido trifosfato
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
piRNA	Ácido ribonucleico que interactúa con PIWI
PV	Plásmido vacío
RNA	Ácido ribonucleico
RNAi	Ácido ribonucleico de interferencia
RNP	Complejos ribonucleoproteicos
rRNA	Ácido ribonucleico ribosomal
SIP-1	Proteína Inducida por Estrés -1
snoRNA	Ácido ribonucleico pequeño nucleolar
TAP	Proteína asociada a Tip
UTR	Región no traducida
VBH-1	Helicasa parecida a Vasa y Belle -1

Índice

1. Introducción	1
1.1 El nematodo <i>Caenorhabditis elegans</i>	1
1.1.1 <i>C. elegans</i> como modelo de estudio	2
1.1.2 Anatomía de <i>C. elegans</i>	4
1.1.2.1. Hipodermis	4
1.1.2.2 Músculo	4
1.1.2.3 Sistema nervioso	4
1.1.2.4 Gónada	5
1.1.2.5 Tracto digestivo	6
1.1.3 La respuesta al estrés en <i>C. elegans</i>	7
1.1.3.1 Choque de calor	8
1.1.3.2 Estrés oxidante	8
1.1.3.3 Hipoxia	9
1.1.3.4 Estrés osmótico	10
1.1.3.5 Estrés nutricional	10
1.2 Proteínas de choque de calor	11
1.2.1 La familia de chaperonas Hsp70	12
1.2.2 Proteínas pequeñas de choque de calor	13
1.2.3 Proteínas de choque de calor en <i>C. elegans</i>	14
1.3 Gránulos de RNA	15
1.3.1 Gránulos germinales	15
1.3.1.1 Gránulos germinales perinucleares	16
1.3.1.2 Cuerpo de Balbiani	16
1.3.1.3 Cuerpos esponjosos	17

1.3.1.4 Gránulos germinales en el plasma germinal	17
1.3.1.5 Cuerpos cromatoides	18
1.3.2 Gránulos de estrés	19
1.3.3 Cuerpos de procesamiento	19
1.3.4 Los gránulos de RNA en <i>C. elegans</i>	20
1.4 Helicasas de RNA de la familia con caja DEAD	23
1.4.1 Estructura de las helicasas de RNA	23
1.4.2 Mecanismo de acción de las helicasas de RNA	24
1.4.3 Función de las helicasa de RNA	26
1.4.4 El papel de la helicasas de RNA en el estrés	29
1.5 La helicasa DDX4/Vasa	30
1.5.1 Funciones conocidas de Vasa/DDX4 en las células germinales	32
1.5.2 La expresión de Vasa/DDX4 en células somáticas	32
1.6 La helicasa DDX3/Belle	33
1.6.1 El papel de DDX3 en la transcripción	34
1.6.2 El papel de DDX3 en el corte y empalme de RNA	34
1.6.3 El papel de DDX3 en la exportación nuclear del RNA	34
1.6.3 El papel de DDX3 en la traducción	36
1.6.4 El papel de DDX3 en el control del ciclo celular, apoptosis y génesis tumoral	37
1.7 La helicasa de RNA VBH-1	38
1.8 LAF-1, el parálogo de VBH-1	39
2. Planteamiento del problema	40
3. Justificación	40
4. Hipótesis	40
5. Objetivo general	40

5.1	Objetivos particulares	41
6.	Resultados I	41
6.1	VBH-1 y su parólogo LAF-1 son importantes para la supervivencia durante un choque de calor	41
6.2	VBH-1 y LAF-1 no actúan redundantemente para proteger a <i>C. elegans</i> del estrés	44
6.3	VBH-1 y LAF-1 son importantes también para la supervivencia durante un estrés oxidante	45
6.4	La expresión de VBH-1 en tejidos somáticos es importante para sobrevivir al choque de calor	46
6.5	VBH-1 podría expresarse en el intestino de <i>C. elegans</i>	49
6.6	Hay una disminución en la abundancia de los mRNA de las proteínas de choque de calor SIP-1 y HSP-1 en animales <i>vbh-1(RNAi)</i> y <i>laf-1(RNAi)</i>	51
6.7	VBH-1 se asocia en gránulos en las gónadas y los embriones durante el estrés	53
6.8	La localización de VBH-1 en los gránulos P depende de sus dominios helicasa y C-terminal	58
7.	Resultados II	61
7.1	La cantidad de VBH-1 no se modifica durante un choque de calor	61
7.2	VBH-1 tiene una localización nuclear en el intestino de animales mutantes <i>glp-4(bn2)</i> durante un choque de calor	61
7.3	Localización de VBH-1 cuando se silencia a <i>hsp-1</i> y <i>sip-1</i>	64
7.4	VBH-1 parece no sufrir O N-acetilglucosaminación	65
7.5	VBH-1 podría ser fosforilada	67
8.	Discusión general	68
8.1	VBH-1 protege a <i>C. elegans</i> del estrés regulando a los transcritos de los	

genes de respuesta a estrés <i>sip-1</i> y <i>hsp-1</i>	69
8.2 La expresión somática de <i>vbh-1</i> podría proteger a <i>C. elegans</i> del estrés	71
8.3 VBH-1 se asocia en gránulos con CGH-1 en gónadas y embriones en condiciones de estrés	73
8.4 VBH-1 tiene una localización nuclear en animales <i>glp-4(bn2)</i> durante un choque de calor	75
8.5 VBH-1 sufre modificaciones postraduccionales	76
9. Conclusiones	77
10. Perspectivas	77
11. Materiales y Métodos	78
12. Referencias	89
Anexo I. Artículo publicado	99

1. Introducción

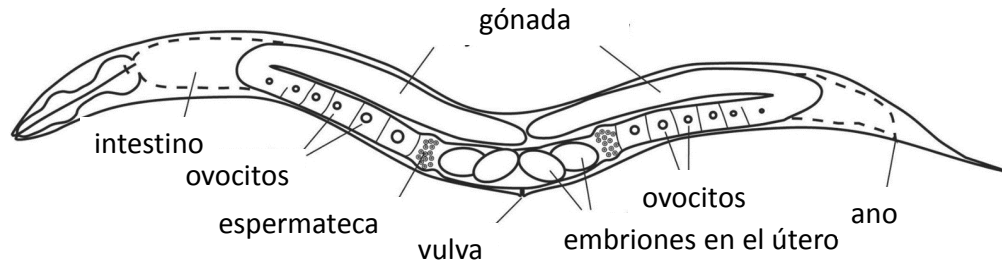
1.1 El nematodo *Caenorhabditis elegans*

C. elegans es un nematodo de vida libre que mide alrededor de 1 mm de largo en su etapa adulta y habita en suelos templados. Presenta dos sexos: hermafroditas (XX) y machos (XO), siendo estos últimos los menos abundantes ya que representan aproximadamente un 0.1% de la población (Figura 1). El hermafrodita es proterandro, es decir, que primero lleva a cabo la espermatogénesis durante su estadio larval L4 para posteriormente producir únicamente ovocitos durante su etapa adulta. El hermafrodita adulto es estructuralmente una hembra, que almacenó las espermátidas producidas durante las etapas tempranas previas. Por lo que el tamaño de la progenie está determinada por la cantidad de espermátidas almacenadas. Al cruzarse con un macho, un hermafrodita tiene la capacidad de producir una progenie de más de 1000 individuos comparada con alrededor de 300 en hermafroditas sin cruzarse [1].

C. elegans tiene un período de embriogénesis de 14 h (a 25°C) y posteriormente pasa por 4 estadios larvarios (L1 a L4) hasta llegar a adulto. Su período reproductivo dura de 3 a 4 días pudiendo vivir hasta tres semanas (Figura 2). El final de cada etapa larvaria está marcado por una muda, en la cual se sintetiza una nueva cutícula desechándose la anterior [2]. La muda consiste de 3 etapas: 1) Separación de la cutícula de la hipodermis o apolisis, 2) Formación de una nueva cutícula a partir de la hipodermis y 3) Desprendimiento de la cutícula vieja o ecdisis. La composición de la cutícula varía entre una muda y otra [1]. Antes de la apolisis se detiene la alimentación y el animal entra en una fase de letargo [3]. En condiciones especiales como una densidad poblacional elevada, temperaturas altas o la ausencia de alimento estos nemátodos pueden entrar, al final de la etapa L2, en una etapa larvaria especial denominada *dauer* (duradero en alemán) en la que pueden sobrevivir hasta 4 meses. Cuando la larva *dauer* encuentra las condiciones favorables continúa su desarrollo pasando directamente a la etapa L4. Una vez en

el estadio adulto tiene un número fijo de células de 959 en el hermafrodita y 1031 en el macho [1].

Hermafrodita XX



Macho XO

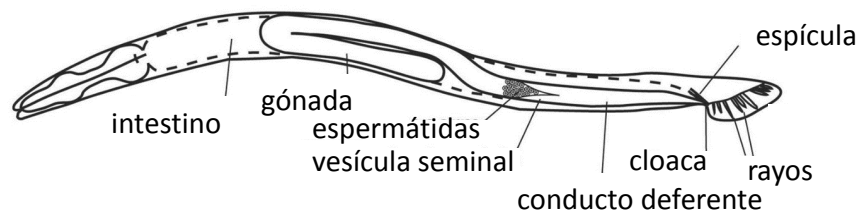


Figura 1. Anatomía básica de un hermafrodita y un macho en *C. elegans*. La diferencia anatómica entre ambos radica en su tamaño, gónada somática y cola. Las características de los principales órganos se describen en el texto. Modificado de [4]

1.1.1 *C. elegans* como modelo de estudio.

El nematodo *Caenorhabditis elegans* es un modelo de estudio con muchas ventajas tales como: tener un ciclo de vida corto, tamaño pequeño, una descendencia numerosa y poder cultivarse de manera sencilla en cajas Petri en el laboratorio alimentándose con la bacteria *E. coli*. Una gran ventaja es que las cepas de *C. elegans* se pueden almacenar congeladas en nitrógeno líquido lo que simplifica las estrategias de cultivo y reduce los costos de mantenimiento de numerosas cepas. La transparencia de su cuerpo, su desarrollo embrionario extrauterino, la constancia en el número y posición de sus células permiten analizar fácilmente mutaciones que alteran los linajes celulares [1, 5, 6].

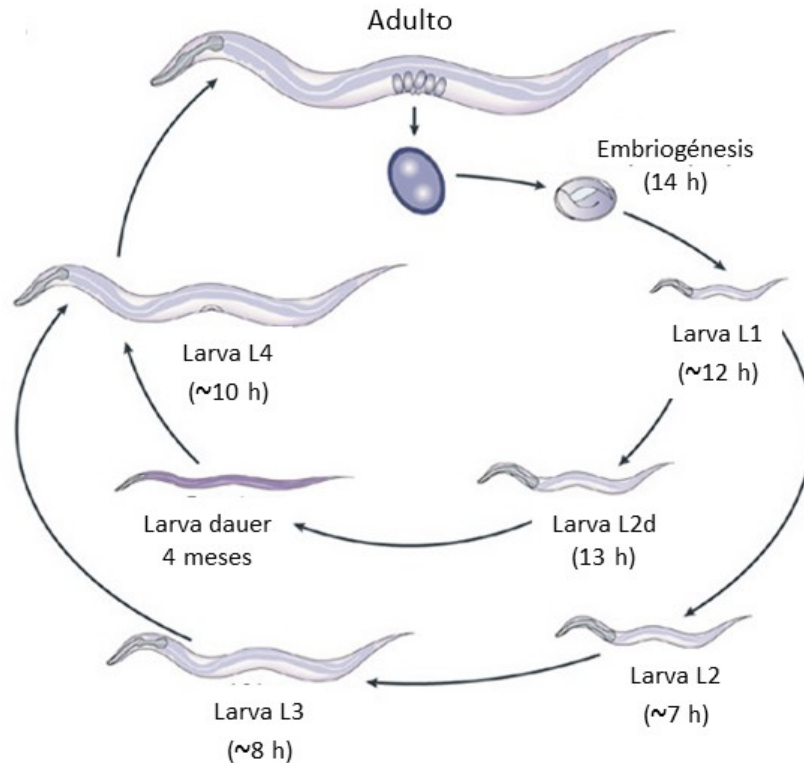


Figura 2. Ciclo de vida de *C. elegans* a 25°C. Una vez que ha sido formado el cigoto, la embriogénesis puede continuar fuera del útero y dura 14 h. El animal pasa después por cuatro etapas larvarias (L1-L4) que se separan por un período de letargo durante el cual el animal muda su cutícula. En condiciones de sobrepoblación y con una cantidad limitada de comida, la larva L1 puede entrar en una etapa alterna de desarrollo que se conoce como *dauer*, en la cual puede sobrevivir durante meses. Modificado de [7]

El genoma de *C. elegans* tiene 97 Mb y está completamente secuenciado, lo que permite realizar estudios de genómica. Su reproducción ocurre por autofertilización en gusanos hermafroditas o por medio de cruza con machos produciendo una progenie de 50% hermafroditas y 50% machos, lo que los hace excepcionalmente útiles para estudios genéticos. La autofertilización permite el aislamiento y mantenimiento de gusanos mutantes homocigotos, mientras que aparear hermafroditas con machos es esencial para transferir mutaciones entre distintas cepas.

1.1.2 Anatomía de *C. elegans*

Como todos los nematodos, *C. elegans* tiene un cuerpo cilíndrico no segmentado que se estrecha en sus extremos (Figura 1). La pared de su cuerpo consiste de una cutícula de colágeno que contiene debajo la hipodermis, músculos y nervios. Éstos están separados de los órganos internos por una cavidad llena de fluidos o pseudoceloma cuya presión hidrostática mantiene la forma del cuerpo.

1.1.2.1 Hipodermis

La hipodermis es un epitelio que subyace la cutícula. Está formada por células multinucleadas cuyas funciones son secretar la cutícula, proveer un sustrato para la migración celular y de axones, almacenar lípidos y otras moléculas, fagocitar células apoptóticas y, posiblemente, osmorregulación [6].

1.1.2.2 Músculo

C. elegans posee músculo estriado y no estriado. Los músculos estriados son el tipo muscular más numeroso que se arreglan en bandas longitudinales a lo largo de la pared corporal y son las responsables de la locomoción. El músculo no estriado se encuentra en la faringe, intestino, ano, útero, vaina y vulva. Son responsables del bombeo de la faringe, defecación, ovulación, fertilización y ovoposición. Además, el macho posee en su cola músculos no estriados especializados que participan en el apareamiento [6].

1.1.2.3 Sistema nervioso

El sistema nervioso del hermafrodita adulto contiene 302 neuronas y 56 células gliales y de soporte mientras que el del macho tiene 381 neuronas y 92 células gliales y de soporte. La mayoría de las diferencias entre ambos sexos se encuentran en la cola del macho, que tiene un papel importante en el apareamiento.

El sistema nervioso se divide en sistema nervioso central y el faríngeo. Veinte neuronas innervan y regulan la actividad de la faringe conectándose al sistema nervioso central por dos interneuronas. Los órganos sensoriales que responden a

químicos, temperatura, fuerza mecánica y osmolalidad se localizan principalmente en la cabeza y la cola [6].

1.1.2.4 Gónada

La gónada del hermafrodita está formada por dos brazos idénticos en forma de U que se conectan por la espermateca a un útero común (Figura 1). Están rodeados por células epiteliales delgadas denominadas células de la vaina. La porción distal de cada brazo contiene núcleos de células germinales que producen espermatozoides y ovocitos. Cada núcleo está rodeado por citoplasma y una membrana plasmática parcial [6, 8].

La población de núcleos germinales se mantiene por mitosis en el extremo distal de cada brazo de la gónada. Conforme adquieren una posición más proximal, las células salen del ciclo mitótico y llevan a cabo meiosis. La celularización de los núcleos germinales ocurre en la región más proximal del brazo de la gónada en donde se forman los gametos. Durante la cuarta etapa embrionaria las células germinales se diferencian en aproximadamente 150 espermatogonias por brazo de la gónada y se acumulan en la región más proximal del brazo de la gónada [6, 9].

En hermafroditas adultos, las células germinales se diferencian en ovocitos. Los ovocitos se arreglan en la porción proximal del brazo de la gónada formando una fila. Una vez formados, los ovocitos llevan a cabo la ovogénesis que es un período de actividad sintética intensa y crecimiento masivo del ovocito [6].

Los ovocitos permanecen en la diacinesis de la profase I hasta que son fecundados. Durante la etapa más tardía de la ovogénesis el ovocito localizado inmediatamente adyacente a la espermateca completa su maduración meiótica. De 5 a 6 minutos después de que inició la maduración, el ovocito es ovulado hacia la espermateca en donde es fertilizado. La primera ovulación empuja a las espermatogonias a la espermateca donde llevan a cabo la espermiogénesis y se transforman en espermatozoides. En el útero el cigoto completa las divisiones meióticas que son seguidas por la embriogénesis. En un hermafrodita maduro la ovulación ocurre cada 20 a 40 minutos en condiciones óptimas [6, 9, 10].

La gónada del macho está formada por un solo brazo en forma de U (Figura 1). Al igual que la gónada del hermafrodita, los núcleos en la región más distal llevan a cabo mitosis y conforme adquieren posiciones más proximales entran a la profase meiótica I. La espermatogénesis inicia en el extremo más proximal de la gónada. Los espermatoцитos llevan a cabo divisiones meióticas para formar las espermátidas que son almacenadas en la vesícula seminal formada por 20 células secretoras. Estas espermátidas, que tienen un tamaño mayor al que producen los hermafroditas, se mezclan con el fluido seminal durante la eyaculación y esto promueve la espermiogénesis para producir los espermatozoides maduros. La liberación de espermatozoides durante la eyaculación es controlada por el conducto deferente que está compuesto de 30 células y funciona como una válvula [9, 11, 12].

1.1.2.5 Tracto digestivo

C. elegans se alimenta por filtración y su tracto digestivo está formado por la faringe, intestino y recto (Figura 1). La faringe es un órgano muscular que bombea comida, la muele y la vierte en el intestino. Está formada por músculo, neuronas, células epiteliales y células glandulares [6].

Una válvula conecta la faringe con el intestino que es un tubo formado por 20 células con una capa densa de microvellosidades en su superficie apical. Durante el estadio L1 algunas de estas células replican su DNA sin dividirse lo que da como resultado que el intestino tenga de 30 a 34 núcleos en 20 células. Posteriormente, en cada etapa larval todas las células llevan a cabo endorreplicación de su DNA sin que ocurran divisiones celulares, lo que produce núcleos con un contenido de DNA de 32C en la etapa adulta [6, 13].

Además de secretar enzimas digestivas en el lumen y absorber los nutrientes, el intestino también es el principal órgano de almacenaje de macromoléculas. Esto puede observarse por la presencia de gránulos en su citoplasma. Algunos de estos gránulos tienen una elevada autofluorescencia y son refráctiles cuando se observan con luz polarizada [13].

El intestino participa además en la síntesis de vitelogenina que es posteriormente transportada al ovocito. Además, 2 de las células intestinales embrionarias actúan como células nodriza para las células germinales primordiales Z2 y Z3 que extienden sus pseudópodos hacia dos células del intestino. Estos pseudópodos desaparecen antes de eclosionar como si su función ya no fuera necesaria o la llevara a cabo las células de la gónada somática [13].

El recto está formado por 5 células epiteliales y se conecta al intestino por una válvula. Un músculo esfínter rodea la válvula y controla su apertura. El músculo esfínter, un músculo depresor anal y dos células musculares que rodean la región posterior del intestino controlan la defecación [6].

1.1.3 La respuesta al estrés en *C. elegans*

C. elegans vive en la tierra, donde la disponibilidad del alimento, temperatura, depredadores, población y muchas otras variables cambian constantemente. Esta perturbación de la homeostasis es de una importancia fundamental en la biología y se conoce como estrés ambiental [14].

De vital importancia son los insultos ambientales que afectan la proteostasis, la estabilidad del proteoma, cuya perturbación comienza a ser reconocida como causa de enfermedades [15]. Las proteínas son polímeros dinámicos que pueden abandonar su conformación nativa, fluctuando entre diferentes estados conformacionales similares al nativo que son propensos a agregarse [16]. Modificaciones covalentes en las proteínas o la administración de energía térmica que se presentan durante un estrés ambiental pueden modificar de manera crítica el equilibrio conformacional de una serie de proteínas hacia estados más desplegados. Esto incrementa la probabilidad de que las proteínas se agreguen como resultado por tener superficies hidrofóbicas expuestas, lo que explica la necesidad de una regulación por chaperonas moleculares en estas condiciones [14]. En los siguientes apartados se enunciarán algunos estresores comunes en *C. elegans* y las respuestas moleculares reportadas.

1.1.3.1 Choque de calor

Cuando *C. elegans* se encuentra en su temperatura ideal de crecimiento, el receptor de la vía de señalización similar a insulina DAF-2 (Formación Anormal de dauer -2) se une a su ligando. Esto inicia la vía y mantiene fosforilados a los factores transcripcionales DAF-16 y HSF-1 (Formación Anormal de dauer -16 y Factor de Choque de Calor -1), lo que hace que tengan una localización citoplásmica. Si existe un estrés por choque de calor, esta vía se interrumpe y promueve la defosforilación de estos factores permitiendo que entren al núcleo [17]. Se sabe que la localización nuclear de HSF-1 depende de que se separe de sus reguladores negativos DDL-1 y -2 (Longevidad Dependiente de DAF-16) [18]. Una vez que HSF-1 está en el núcleo activa la transcripción de proteínas pequeñas de choque de calor que mantienen la proteostasis celular y previenen el daño proteico y celular que sucede durante el estrés [19].

La respuesta al choque de calor depende de las neuronas termosensoriales AFD [20], que detectan la temperatura ambiental y regulan el comportamiento dependiente de la temperatura en *C. elegans* [21, 22]. En condiciones de choque de calor, estas neuronas son necesarias para que HSF-1 pueda inducir la transcripción de proteínas de choque de calor [20]. Los autores proponen que aunque la agregación de proteínas durante el estrés induce una respuesta celular autónoma, las neuronas AFD controlan esta respuesta en condiciones de choque de calor [20]. Este mecanismo no autónomo permitiría que las distintas células puedan tener una respuesta diferencial al choque de calor en base a los requerimientos metabólicos de los diferentes tejidos y etapas del desarrollo.

1.1.3.2 Estrés oxidante

Un incremento en la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) provocan estrés oxidante. En la mayoría de las células la fuente principal de ERO es la mitocondria debido a deficiencias en la fosforilación oxidativa. El daño que generan se da principalmente perturbando la proteostasis, aunque se sabe que puede afectar lípidos, membranas y DNA. En *C. elegans*, las alteraciones que inducen ERO pueden llevar a niveles bajos del neurotransmisor dopamina [19]. La

exposición de *C. elegans* a metilmercurio incrementa las ERO y produce defectos embrionarios, retrasos en el crecimiento, disminución en el número de hijos, neurodegeneración de neuronas dopaminérgicas y afecta la viabilidad del animal [23].

En condiciones de estrés oxidante hay un incremento en la síntesis de glutatión-S transferasas (GST-4 y GST-38) dependiente del factor transcripcional SKN-1 que se expresa en intestino y en algunas neuronas quimiosensoriales y dopaminérgicas [23]. Las glutatión-S transferasas catalizan la conjugación de una amplia gama de sustratos electrofílicos al grupo tiol de moléculas reducidas de glutatión, lo que inactiva al electrófilo y lo prepara para su excreción [24].

1.1.3.3 Hipoxia

Niveles bajos de O₂ pueden llevar a un decremento en la tasa metabólica, incremento en la glicólisis, deteniendo o ralentizando el ciclo celular. A diferencia de lo que ocurre en mamíferos, *C. elegans* no tiene órganos respiratorios especiales sino que depende de la difusión por intercambio de O₂ y CO₂. La cavidad corporal posee un fluido que permite un intercambio rápido de gases y moléculas entre las células.

Cuando *C. elegans* se encuentra en un ambiente de hipoxia severa (concentraciones de oxígeno menores a 0.3 %) se vuelve inmóvil pero se recupera completamente si se regresa a condiciones de normoxia en las primeras 4 h [25]. Si la hipoxia se mantiene por más de 4 h, se presentan defectos en el comportamiento y muerte celular, y después de 22 h de incubación > 99 % de los animales mueren [26].

La hipoxia activa la traducción del factor inducible por hipoxia (HIF-1) [27], mientras que en condiciones de normoxia la prolihidroxilasa EGL-9 (Deficiente en Desove -9) marca para su degradación a HIF-1 que se encuentra hidroxilada en estas condiciones [28]. HIF-1 es un factor transcripcional del tipo bHLH (basic helix-loop-helix) que forma heterodímeros y se requiere para la supervivencia en condiciones de hipoxia (1% O₂) [27].

1.1.3.4 Estrés osmótico

El estrés osmótico o hipertónico provoca daño en las proteínas por agregación. Durante un estrés osmótico en *C. elegans* se incrementa la expresión en el intestino e hipodermis de *gpdh-1* que codifica para una glicerol-3-fosfato deshidrogenasa. GPDH-1 induce la síntesis *de novo* de glicerol, lo que conduce a su acumulación, un respuesta típica en células sometidas a un estrés hiperosmótico [29]. Esta respuesta al estrés osmótico es bastante específica y ocurre rápidamente (<15 min) con concentraciones relativamente bajas de sal (200 mM NaCl) [30]. Los genes reguladores osmóticos como *osm-7*, *osm-11* y *osm-8* (escape osmótico anormal -7, -11 y -8) regulan la actividad enzimática de GPDH-1 y son reguladores críticos en los desórdenes osmóticos [31, 32]. Estos genes reguladores osmóticos controlan la resistencia al estrés osmótico de manera independiente a otros mecanismos de respuesta a estrés [19].

Un estrés hiperosmótico agudo genera pérdida de agua en la célula y un incremento en la fuerza iónica citoplásmica. La exposición de las superficies hidrofóbicas en las proteínas desnaturalizadas favorece que se agreguen. Esta agregación es promovida también por el encogimiento de las células, que incrementa la agrupación de macromoléculas y las interacciones proteína-proteína. Esto tiene como efecto que también se incremente la expresión de chaperonas en estas condiciones [33].

1.1.3.5 Estrés nutricional

Los hermafroditas adultos responden al ayuno activando la maquinaria de autofagia en la faringe y se cree que esto provee energía esencial para mantener el bombeo en la faringe y la supervivencia [34]. Además, estos animales retienen los embriones en el útero durante el ayuno en un proceso conocido como *bagging*. Si las condiciones continúan, las larvas eclosionan dentro del hemafrodita alimentándose de él [35]. Aunque en este proceso el adulto muere, se ha sugerido que esta estrategia incrementa las posibilidades de supervivencia de su progenie [35].

El ayuno por periodos prolongados (>10 días) en larvas L4 retrasa el inicio de la reproducción y reduce la viabilidad de los embriones. Este proceso, denominado respuesta ovogénica de la línea germinal al ayuno, permite que algunos animales eviten el *bagging* en la etapa adulta y puedan sobrevivir por más tiempo [36]. La característica más importante de esta respuesta es la reducción de la población de células germinales, observándose únicamente alrededor de 35 núcleos por brazo de la gónada [37]. Cuando estos animales ayunados por hasta 30 días se colocan nuevamente en presencia de comida, las células germinales proliferan generando una línea germinal similar a la de un adulto joven no ayunado. Esta línea germinal regenerada es capaz de producir una cantidad de progenie similar a la de animales no ayunados [37].

Si una larva eclosiona en ausencia de comida entra en un estado de detención en su desarrollo conocido como diapausa en L1. Los animales que se encuentran en estas condiciones presentan una elevada resistencia al estrés por lo que pueden ser congelados y almacenados durante mucho tiempo [38]. La detención en L1 es diferente de la detención en *dauer* ya que en el primero no se da un cambio en la morfología de la larva y la formación de la larva *dauer* depende principalmente de la densidad poblacional que es detectada por la concentración de feromonas [38, 39]. En la diapausa en L1 se da también una detención en el desarrollo de las células germinales primordiales Z2 y Z3 en la fase G2, lo que detiene su proliferación [40]. La diapausa en L1 depende de la vía de señalización similar a insulina que parece no actuar de manera autónoma en la célula sino depender de su activación en tejido nervioso, epidermis y células de la glia [41, 42].

1.2 Proteínas de choque de calor

Todos los organismos responden al incremento en la temperatura induciendo la síntesis de un grupo de proteínas conocidas como proteínas de choque de calor o HSPs. Esta respuesta puede además ser inducida por otros tipos de estrés como anoxia, exposición a etanol y a iones de metales pesados [43]. Además, las HSPs se expresan normalmente en condiciones óptimas en las células y tienen un papel

importante en el funcionamiento celular. Durante un choque de calor, se reprime la síntesis de proteínas asociadas al desarrollo normal mientras que se incrementa la síntesis de HSPs y proteínas de respuesta a estrés. Las proteínas de choque de calor se clasifican de acuerdo a su peso en kDa, debido a su importancia para el presente estudio sólo se describirán las Hsp70 y las pequeñas o Hsp20.

1.2.1 La familia de chaperonas Hsp70

Las Hsp70 son una familia de chaperonas altamente conservada que participan en una amplia gama de procesos como son el plegamiento y ensamblaje de proteínas recientemente sintetizadas, plegamiento de proteínas mal plegadas o agregadas, translocación a la membrana de proteínas de organelos o de secreción. Esto les permite tener funciones de mantenimiento en las células donde son componentes integrales de las vías de plegamiento y transducción de señales, así como de funciones de control de calidad en las que revisan la estructura de las proteínas y reparan a los confórmeros mal plegados. Todas estas actividades parecen estar basadas en la propiedad de las Hsp70 de interactuar con segmentos peptídicos hidrofóbicos de manera regulada por ATP [44].

El amplio espectro de funciones celulares de las Hsp70 se logra a través de: 1) amplificación y diversificación de genes Hsp70 durante la evolución que ha generado chaperonas Hsp70 especializadas, 2) el reclutamiento de co-chaperonas de manera selectiva por Hsp70 para realizar funciones celulares específicas, y 3) cooperación de Hsp70s con otros sistemas de chaperonas para ampliar su espectro [44].

El papel de las Hsp70 en el plegamiento de proteínas puede dividirse en tres actividades relacionadas: prevención de la agregación, promoción del plegamiento nativo, solubilización y plegamiento de proteínas agregadas [44].

Las Hsp70 poseen en su extremo N-terminal un dominio de ATPasa de 45 kDa y en su extremo C-terminal del dominio de unión a sustrato de alrededor de 25 kDa que a su vez se subdivide en un subdominio de sándwich β y un subdominio

de α -hélice. El ciclo de ATPasa de Hsp70 alterna entre el estado de ATP que posee baja afinidad y tasas de recambio elevadas, y el estado ADP con alta afinidad y tasas de recambio bajas.

El plegamiento y la prevención de la agregación de proteínas mediados por Hsp70 se pueden explicar de la siguiente manera: la unión de Hsp70 a sustratos no nativos evita su agregación al proteger transitoriamente los segmentos hidrofóbicos expuestos. Su liberación permite que las moléculas o dominios que se pliegan rápidamente puedan mover sus residuos hidrofóbicos de la superficie hacia el interior de la molécula, mientras que las moléculas que tardan más de unos segundos en plegarse correctamente vuelven a unirse a Hsp70 para evitar que se agreguen [14].

1.2.2 Proteínas pequeñas de choque de calor

Como su nombre lo sugiere, los monómeros de estas proteínas son pequeños y van de 12 kDa a 42 kDa. La secuencia primaria de las HSP pequeñas incluye una región variable N-terminal, una región C-terminal más conservada y una extensión C-terminal. La región C-terminal altamente conservada a menudo se le denomina dominio alfa cristalina o dominio Hsp20 [45]. En eucariotas multicelulares superiores cada HSP pequeña tiene una localización subcelular y/o distribución tisular específicas [46]. Las HSP pequeñas que funcionan en organelos celulares o compartimentos específicos tienen secuencias señales de tránsito, guía o señal en su N-terminal que son necesarias para llevarlas a su compartimento celular adecuado. La extensión C-terminal puede ser muy variable tanto en secuencia como en longitud y también puede contener motivos de retención organelo específicos [45].

Las HSP pequeñas son a menudo la primera línea de defensa en la célula cuando las proteínas comienzan a plegarse de manera no nativa. Los modelos actuales de la función de las HSP pequeñas en la célula sugieren que trabajan con otras chaperonas para prevenir la agregación irreversible y para volver a solubilizar

proteínas que ya se han agregado [45]. La mayoría de las HSP pequeñas se organizan estructuralmente como oligómeros grandes. Después de un estrés celular, ajustan su estado oligomérico para unirse a sustratos mal plegados [46].

Dos características funcionales de las HSP pequeñas se distinguen del resto: 1) no requieren ATP para unirse a sus proteínas sustrato y 2) tienen una alta capacidad para unirse a sustratos desnaturalizados [45]. Los sustratos varían de péptidos a proteínas oligoméricas sin especificidad por secuencia ni estructura, y dado que potencialmente al menos una molécula blanco se une por subunidad, las HSP pequeñas previenen eficientemente la desnaturalización de proteínas [47]. Los sustratos se liberan de las HSP pequeñas cuando termina el estrés, probablemente por la acción de chaperonas que requieren energía como las Hsp70 y se repliegan con la cooperación de las mismas chaperonas [47].

1.2.3 Proteínas de choque de calor en *C. elegans*

Cuando *C. elegans* se pasa de 20°C a temperaturas superiores a 28°C por periodos prolongados detiene su crecimiento, no puede reproducirse y finalmente muere. La inducción de las proteínas de choque de calor se vuelve evidente después de exponerse a temperaturas mayores a 29°C y hasta por lo menos 35°C [43]. La síntesis de proteínas normales para el desarrollo se reprime postranscripcionalmente durante un choque de calor mientras que se induce la síntesis de HSPs con pesos moleculares de 16 a 81 kDa [43].

Una característica importante de algunos genes de respuesta a choque de calor en *C. elegans* es la presencia de intrones [43]. Esto es inusual ya que los genes que son inducibles por calor no suelen estar interrumpidos por intrones. En *D. melanogaster*, la escisión de intrones de los pre-mRNA se interrumpe durante un choque de calor severo, incluida la escisión del único intrón del mRNA de *hsp83* [48]. Si los pre-mRNA no se procesan entonces no se sintetizarían las HSPs. En contraste con esta idea se ha observado que la síntesis de HSPs sí ocurre después de un choque de calor prolongado en *C. elegans* [49]. *C. elegans* podría haber

desarrollado un mecanismo de empalme resistente a este tipo de estrés que es altamente selectivo para los pre-mRNA de las HSPs. Un mecanismo similar evolucionó en *Trypanosoma* donde los pre-mRNA sufren empalme en *trans* normalmente durante el desarrollo pero sólo los pre-mRNA de las HSPs sufren empalme en *trans* durante un choque de calor [50]. El empalme en *trans* también se observa normalmente en *C. elegans* e involucra la adición de un exón codificado en otro sitio del genoma al pre-mRNA presumiblemente por mecanismos similares al empalme en *cis* [51].

Durante un estrés ocurre, además de la síntesis de HSPs, un incremento de tamaño, o la formación de, agregados de RNA y proteínas. Estos agregados o gránulos de RNA se han encontrado en diferentes organismos y existe una gran variedad de ellos tanto en condiciones control como de estrés. En el siguiente apartado describiremos los principales gránulos de RNA que se han observado en distintos organismos y los que se han descrito hasta el momento en el nematodo *C. elegans*.

1.3 Gránulos de RNA

La traducción y estabilidad de los mRNA en el citoplasma de la célula deben controlarse de una manera muy fina tanto espacial como temporalmente. Para ello, algunos mRNA silenciados traduccionalmente son almacenados en gránulos ribonucleoproteicos (RNP) los cuales carecen de membrana que los delimite y son visibles al microscopio de luz transmitida. Se han descrito diferentes clases de gránulos de RNA que comparten componentes proteicos y pueden usar mecanismos similares para regular la traducción o degradación del RNA.

1.3.1 Gránulos germinales

Los gránulos germinales, denominados gránulos P en *C. elegans*, dirigen la traducción de mRNA maternos para promover el desarrollo de la línea germinal en

el embrión temprano y establecer la línea germinal para la siguiente generación. Estos gránulos contienen mRNA y proteínas involucradas en el inicio de la traducción, control traduccional y degradación de mRNA, lo que es consistente con su papel propuesto en la regulación de la expresión de transcritos maternos [52].

Existen diferentes tipos de gránulos germinales que reciben su nombre de acuerdo al organismo o a su localización celular. Los *nuage* o perinucleares se encuentran en células germinales inmaduras y en proceso de diferenciación. En los gametos se encuentran los cuerpos esponjosos, de Balbiani y cromatoides; mientras que en los embriones se localizan gránulos asociados al plasma germinal [52]. A continuación los describiremos con mayor detalle.

1.3.1.1 Gránulos germinales perinucleares

Durante la mayor parte del desarrollo germinal los gránulos germinales aparecen como agregados fibrilares redondos (o *nuage*, del francés nube) que se acumulan alrededor de los núcleos en *D. melanogaster*, *C. elegans*, *Xenopus*, pez cebra y ratón [52]. Micrografías electrónicas de células germinales de *C. elegans* en profase meiótica muestran que los gránulos germinales recubren los poros nucleares, que corresponden con los principales sitios de exportación del mRNA al citoplasma [53]. La asociación de los *nuage* con poros nucleares también se ha reportado en *Xenopus*, pez cebra y ratón [52].

1.3.1.2 Cuerpo de Balbiani

En los gametos en proceso de diferenciación los gránulos germinales adoptan una morfología única. El cuerpo de Balbiani o nube mitocondrial es una estructura transitoria que contiene mitocondria, Golgi, retículo endoplásmico y RNA que se forma en los ovocitos previtelogénicos de insectos y vertebrados [52]. Se forman cerca del núcleo y de ahí se extienden hacia el citoplasma conforme se incrementa el volumen del ovocito.

El DNA mitocondrial acumula mutaciones que afectan el envejecimiento de células y tejidos [54] por lo que se ha propuesto que el cuerpo de Balbiani selecciona las mitocondrias que poseen un genoma funcional para incorporarlas a la línea

germinal [55]. En *Xenopus*, las mitocondrias en el plasma germinal tienen una actividad respiratoria más baja que las que están destinadas al soma [56]. Se cree que la respiración baja disminuye el estrés oxidante y el daño por mutaciones.

1.3.1.3 Cuerpos esponjosos

Durante la ovogénesis en *D. melanogaster* cada ovocito está conectado a 15 células nodriza mediante puentes intercelulares o canales de anillo. Las células nodriza y el ovocito contienen, además de gránulos perinucleares, cuerpos esponjosos que contienen retículo endoplásmico incrustado en una matriz electrodensa dispersa en el citoplasma [52, 57]. Aparentemente se derivan de fragmentos de nuage perinucleares que se asocian con membranas del retículo endoplásmico, se separan del núcleo y se entremezclan en el citoplasma con gránulos parecidos a cuerpos de procesamiento, que serán descritos más adelante [57]. Los cuerpos esponjosos se acumulan en el ovocito moviéndose a través de membranas del retículo que se extienden desde las células nodriza. Se cree que transportan material de los nuage perinucleares de las células nodriza al plasma germinal del ovocito [52]. Sin embargo, su composición es dinámica y difiere de las células nodriza y el ovocito lo que sugiere que no son sólo una versión móvil de los nuage.

Durante la fase de crecimiento del ovocito en *C. elegans*, los gránulos perinucleares germinales se separan de la envoltura nuclear, aparentemente llevándose consigo fragmentos de membrana que contienen poros nucleares [53]. Los ovocitos viejos y en condiciones de estrés forman complejos ribonucleoproteicos (RNP) citoplásmicos cuya formación se correlaciona con la formación de evaginaciones en la membrana nuclear [58]. Los cuerpos esponjosos de *D. melanogaster* también cambian su morfología en diferentes condiciones ambientales [59], lo que sugiere que estas estructuras tienen un papel protegiendo a los ovocitos del estrés.

1.3.1.4 Gránulos en el plasma germinal

En los ovocitos maduros de animales que poseen un plasma germinal, las moléculas transportadas en los cuerpos de Balbiani y esponjoso se fusionan en una

subregión de la corteza del ovocito en una posición que predice el sitio donde se formarán las células germinales primordiales en *Xenopus*, pez cebra y *D. melanogaster* [52].

En *C. elegans* los gránulos germinales se separan de los núcleos durante la ovogénesis y permanecen distribuidas uniformemente en el citoplasma durante la fertilización (Figura 3). Después de la fertilización, cuando ya se ha establecido la polaridad del embrión, los gránulos germinales se enriquecen en el polo posterior del cigoto y son heredados principalmente a la célula hija que tiene una posición más posterior en el embrión. Una vez que se forman las células fundadoras de la línea germinal los gránulos P regresan a su posición perinuclear [52, 60].

1.3.1.5 Cuerpo cromatoides

Durante la meiosis de las células germinales de ratón, los espermatocitos ensamblan un tipo especial de gránulo germinal denominado cuerpo cromatoide [61]. Este se forma de las fibras intermitocondriales que se dispersan durante las divisiones meióticas y se consolidan después de la meiosis en una sola esfera cercana al núcleo [61]. El sitio de contacto del cuerpo cromatoide con el núcleo es rico en poros nucleares y hay evidencia de que el RNA sintetizado en el núcleo se transfiere al cuerpo cromatoide [52].

El cuerpo cromatoide se mueve alrededor de núcleo y hacia las células vecinas a través de puentes citoplásmicos. Se ha propuesto que este movimiento regula el intercambio de RNAs entre espermatidas haploides [62]. El cuerpo cromatoide se relocaliza en la base del flagelo en espermatidas en elongación y se desarma más adelante durante la espermiogénesis [63]. En los espermias maduros no se han detectado gránulos germinales. Agregados parecidos a los cuerpos cromatoides se han descrito también en los neoblastos en planaria que se desensamblan cuando la progenie de los neoblastos se diferencia en linajes somáticos [52].

1.3.2 Gránulos de estrés

A diferencia de otros gránulos de RNA, los gránulos de estrés no se observan en células que crecen en condiciones óptimas sino que su formación se induce rápidamente en respuesta a un estrés ambiental [64]. Su ensamblaje depende de que las cinasas activadas por estrés fosforilen el factor de inicio de la traducción eIF2 α . Esto bloquea la traducción y promueve el desensamblaje de los polisomas [64]. Los gránulos de estrés contienen a los mRNA que codifican para la mayoría de las proteínas celulares, con excepción de aquellos que codifican para chaperonas y enzimas involucradas en la reparación de daños [64]. Contienen componentes de la traducción como factores de inicio de la traducción, factores de elongación y proteínas ribosomales [64]. Esto sugiere que los mRNA poliadenilados que contienen sean protegidos de la degradación durante el estrés y que una vez que las condiciones sean óptimas estos se liberen para su traducción.

1.3.3 Cuerpos de procesamiento

Los cuerpos de procesamiento son los sitios activos de degradación de mRNA por lo que contienen componentes de la maquinaria de degradación de mRNA de 5' a 3', de mRNA sin sentido y del complejo de silenciamiento inducido por RNA [64]. Aunque el silenciamiento de RNA por miRNA, RNAi o en la degradación mediada por mutaciones sin sentido (NMD) puede ocurrir en ausencia de cuerpos de procesamiento visibles; la oligomerización de sus componentes parece ser necesaria para que exista un silenciamiento eficiente [65].

Los cuerpos de procesamiento son complejos dinámicos cuyo ensamblaje depende de y es proporcional a la cantidad de mRNA que no se está traduciendo. Sin embargo, no todo el mRNA traducionalmente inactivo se acumula en los cuerpos de procesamiento. Por ejemplo, los mRNA cuya traducción está inhibida por la formación de una estructura en su extremo 5' que bloquea que se ensamble el ribosoma, o por puromicina, que promueve la liberación de los ribosomas durante

la elongación, no se acumulan en cuerpos de procesamiento a menos que contengan elementos que los recluten [66].

A diferencia de los gránulos de estrés que son heterogéneos en tamaño y forma, los cuerpos de procesamiento son partículas esféricas uniformes que aumentan su tamaño y número en respuesta a estrés [64]. A pesar de ser estructuras diferentes, comparten muchos componentes proteicos e interactúan entre ellas en células de mamíferos cuando son sometidas a un estrés [64].

1.3.4 Los gránulos de RNA en *C. elegans*

Los cuerpos de procesamiento y gránulos de estrés no se han caracterizado en *C. elegans*; pero recientemente se han descrito diferentes gránulos de RNA que se forman durante la ovogénesis y embriogénesis [67]. Un ejemplo lo constituyen los cuerpos de almacenaje, que se forman en el centro de la gónada y contienen a la helicasa CGH-1 (Helicasa de la línea germinal conservada -1) y a la proteína de unión al RNA CAR-1 (Citoquinesis, Apoptosis, Asociada a RNA -1) [68]. Estos gránulos pueden incrementar en tamaño y diversificarse cuando se bloquea la maduración de los ovocitos como resultado de la ausencia de esperma o en respuesta a diferentes tipos de estrés como el choque de calor y el estrés oxidante (Figura 3) [67-70]. Dependiendo de las proteínas que se asocian a los cuerpos de almacenaje en estas condiciones estos gránulos se agrupan en [67, 68, 70]:

- a) Cuerpos de procesamiento enriquecidos de enzimas de remoción del cap (cuerpos dcP). Acumulan una gran cantidad de la proteína DCAP-2 (Enzima de remoción del cap -2).
- b) Cuerpos de procesamiento asociados a la línea germinal (cuerpos grP). Acumulan mRNA reprimidos traduccionalmente, CGH-1 y CAR-1.
- c) Cuerpos de almacenaje agrandados por el estrés. Contienen a TIAR-1 (Relacionada con el Antígeno Intracelular de células T -1), que es un marcador de gránulos de estrés.

Se cree que el incremento de tamaño de estos gránulos en condiciones de estrés se debe a que en estas condiciones se disminuye la síntesis de proteínas y el mRNA que deja de traducirse se acumula en estos gránulos [67]. Esto sería equivalente al crecimiento de los gránulos de estrés y cuerpos de procesamiento que se observa cuando se reprime la traducción.

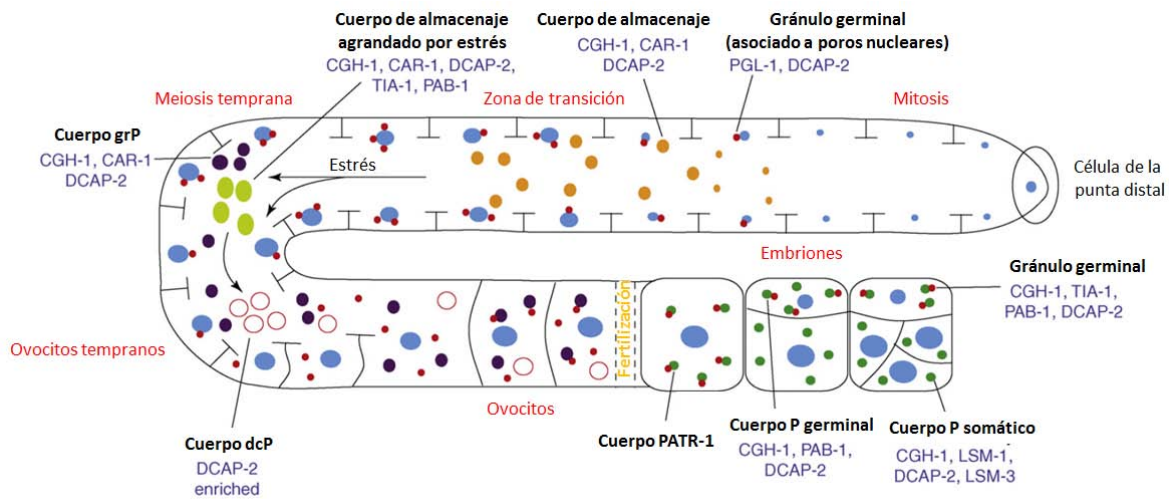


Figura 3. Gránulos de RNA en la gónada de *C. elegans*. Durante la ovogénesis y embriogénesis temprana en *C. elegans* se forman diferentes gránulos de RNA. La imagen esquematiza un brazo de la gónada con los núcleos de las células germinales en color azul. En negrita se indica los nombres de los diferentes gránulos de RNA, en letras azules se enuncian las principales proteínas que los componen y en rojo se señala el proceso que ocurre en esa región de la gónada. Cuerpo P= cuerpo de procesamiento. Modificada de [67].

Después de la fertilización, los gránulos P perinucleares se separan eventualmente de los núcleos y se acumulan de manera asimétrica en los blastómeros germinales durante la embriogénesis. Además de ellos, se han reportado gránulos pequeños que contienen DCAP-2 y PATR-1 (Relacionada con la Proteína Asociada a topo II -1) en embriones (Figura 3) [71]. PATR-1 es un componente de los cuerpos de procesamiento en levadura y células de mamíferos. Los gránulos P se acumulan en el blastómero germinal y tienden a estar acoplados a los cuerpos PATR-1. Estos gránulos P contienen proteínas que en otros organismos se encuentran en gránulos de estrés (PAB-1, TIAR-1, etc) [71]. Su

composición y asociación con los cuerpos PATR-1 que tienen propiedades similares a cuerpos de procesamiento sugiere que los gránulos P contienen mRNA en condiciones similares a los gránulos de estrés.

Algo interesante es que los cuerpos PATR-1 en blastómeros somáticos acumulan al complejo de proteínas LSM que activan la remoción del cap en el estadio de 4 células, en el cual comienza la degradación del mRNA materno en los blastómeros somáticos [71]. Puesto que los blastómeros germinales y somáticos almacenan diferentes componentes en sus cuerpos de procesamiento, se puede suponer que el ensamblaje de estos complejos y su papel controlando la degradación y traducción de mRNA se regulan dependiendo del tipo celular.

El principal problema de estudiar los gránulos de RNA es la diversidad de los diferentes gránulos, las dificultades para comprender cómo se relacionan entre si y qué papel tienen en la regulación del RNA. Una posible explicación es que cada uno de estos gránulos son diferentes y participan en una función particular o controlando a un grupo específico de mRNA. La composición de cada gránulo reflejaría entonces su función. Esta posibilidad se ve reforzada por la observación de que la formación y localización de diferentes gránulos pueden controlarse por diversos eventos durante el desarrollo. Otra posibilidad para explicar la abundancia de gránulos es que representan diferentes tipos de mRNPs que se acumulan en un ciclo ordenado de rearrreglos entre mRNPs traduccionales, cuerpos de procesamiento y gránulos parecidos a los de estrés. La composición de estos gránulos variaría entonces dependiendo del paso limitante en su formación y/o resolución [67].

Los gránulos de RNA en los diferentes organismos contienen proteínas con motivos de unión al RNA, entre las que se encuentran las helicasas de RNA. A continuación describiremos a esta familia de proteínas y su función en el metabolismo del RNA.

1.4 Helicasas de RNA de la familia con caja DEAD

Las helicasas de RNA comprenden un grupo de enzimas altamente conservadas que utilizan la energía de los enlaces de NTP y su hidrólisis para remodelar complejos de RNA o RNA-proteínas, resultando en la separación de dúplex de RNA, el desplazamiento de proteínas de moléculas de RNA, o ambos [72]. Las helicasas de RNA se agrupan junto con helicasas de DNA en seis superfamilias y familias de acuerdo a su secuencia y estructura. Dentro de la superfamilia 2 se encuentra la familia de caja DEAD que es la más numerosa y se caracteriza por la presencia de un dominio de Asp-Glu-Ala-Asp (DEAD) [73].

Aunque esta familia de helicasas se definió por su habilidad de utilizar la hidrólisis de NTP para separar dúplex de RNA, sólo en unos pocos casos esta actividad se ha demostrado *in vitro*. Recientemente se ha demostrado que la función de las helicasas de RNA no está limitada a la separación de cadenas de RNA y a desplazar proteínas de moléculas de RNA, sino que pueden alinear cadenas de RNA, localizar moléculas de RNA y estabilizar estructuras intermediarias [72]. Por ello se les ha llamado también chaperonas de RNA o RNPassas

1.4.1 Estructura de las helicasas de RNA

Las helicasas de RNA comparten motivos altamente conservados que se localizan en dos diferentes dominios (Figura 4): en el dominio 1 están los motivos I (AxxGxGKT), Ia (PTRELA), Ib (TPGR), II (DEAD) y III (SAT), y en el segundo dominio están los motivos IV (LIV), V (ARGID) y VI (HRxGRxGR). Las funciones de los motivos I (Walker A) y II (Walker B) son los mejor caracterizados y se han encontrado incluso en proteínas que no son helicasas. Ambos se requieren para la unión e hidrólisis de ATP/NTP. El motivo III se ha sugerido que acopla la unión e hidrólisis de ATP a la actividad de helicasa, El motivo VI funciona en la hidrólisis de ATP pero originalmente se había sugerido su participación en la unión a RNA. Los motivos Ia, Ib, IV y V son los menos estudiados pero hay evidencia de que se unen al RNA sustrato [72].

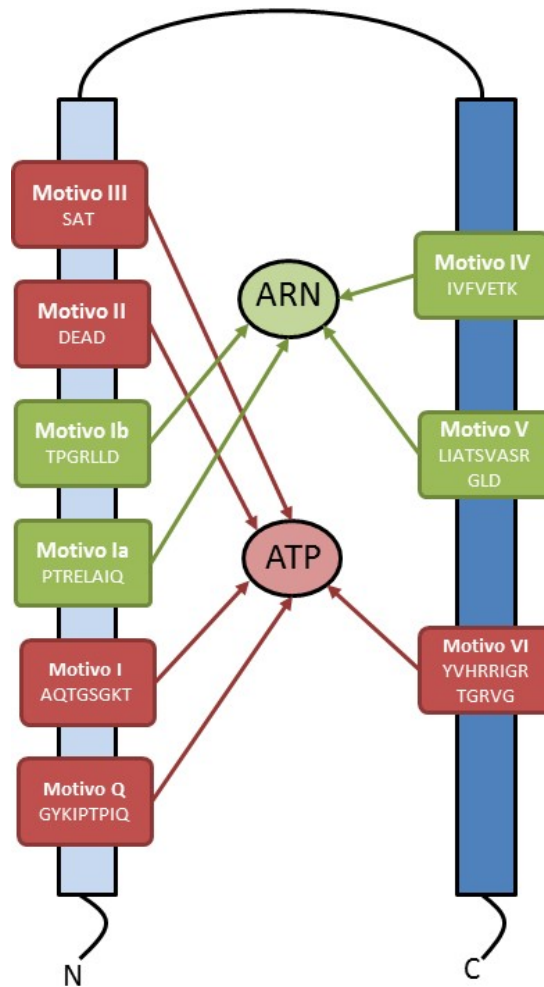


Figura 4. Estructura de las helicases de RNA de la familia DEAD. Esquema de los motivos conservados y la secuencia de aminoácidos que la componen. El dominio I se muestra en azul claro y el dominio 2 en azul oscuro. Los motivos involucrados en unión al ATP se muestran de color rojo, mientras que los que participan en la interacción con RNA se muestran en color verde. Modificado de [74]

Recientemente se ha identificado otro motivo denominado Q debido a que contiene una glutamina conservada. Dicho motivo se considera específico de las helicases de RNA de la familia DEAD y se ha sugerido que regula la unión e hidrólisis de ATP detectando el estado del ATP unido [75].

1.4.2 Mecanismo de acción de las helicases de RNA

Al igual que las helicases de DNA, las helicases de la familia DEAD utilizan ATP para unirse y desenrollar dúplex de RNA. Sin embargo, a diferencia de las helicases

de DNA, en las helicosas de la familia DEAD: 1) la extensión del desenrollamiento está restringido a un par de giros e incluso algunas helicosas sólo desdoblan dúplex de menos de 10 ó 12 pares de bases, 2) no llevan a cabo su función translocándose a través del RNA sino que se unen directamente a la región donde se encuentra el dúplex [76]. Estas diferencias les permiten a las helicosas de RNA remodelar el RNA y complejos ribonucleoproteicos (RNP) de manera muy localizada sin afectar el resto de la estructura.

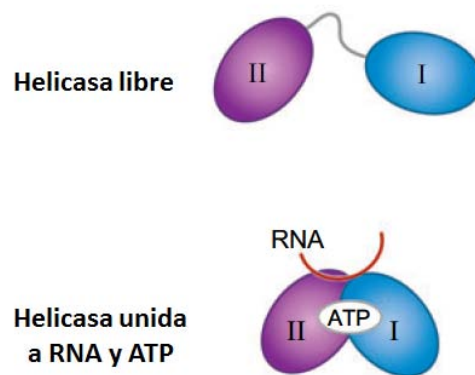


Figura 5. Modificación conformacional de las helicosas de RNA con caja DEAD. En ausencia de RNA y ATP, los dos dominios de las helicosas de RNA con caja DEAD se mueven libremente. En presencia de ATP y RNA, estas helicosas modifican su conformación y los dominios I y II forman un sitio catalítico al que se une ATP y RNA. Una vez hidrolizado el ATP se libera ADP y RNA y se repite el ciclo. Modificado de [77].

Los dos dominios de las helicosas de RNA de la familia con caja DEAD se mueven libremente y no interactúan entre sí en ausencia de RNA y ATP (Figura 5). Cuando las helicosas unen ATP en presencia de RNA adoptan una conformación compacta y cerrada con numerosos contactos intramoleculares y una alta afinidad por el RNA. En esta conformación cerrada, los dominios forman un sitio catalítico que hidroliza ATP y se une al RNA. Este complejo genera una torcedura en el esqueleto del RNA que desestabiliza de manera local el dúplex. La hidrólisis del ATP modifica entonces la afinidad de la helicasa por el RNA y permite su liberación [78].

Esta familia de helicasas de RNA también puede remover proteínas del RNA cuando las proteínas ocupan una superficie del RNA menor a 8 nucleótidos. Las proteínas que ocupan una superficie mayor no pueden ser desplazadas por helicasas de la familia DEAD mientras que otras helicasas procesivas lo hacen fácilmente. Esto limitaría la actividad de remodelaje del RNA en la célula para impedir la disociación completa de complejos RNP [76].

Muchas helicasas catalizan, además de la separación de hebras dobles de RNA, el alineamiento de hebras de RNA. La diferencia importante es que este proceso generalmente no requiere ATP [76]. Esto da como resultado que helicasas de esta familia que catalizan ambos procesos puedan promover rearrreglos complejos en el RNA.

1.4.3 Función de las helicasas de RNA

Las helicasas de caja DEAD participan en prácticamente todos los aspectos del metabolismo de RNA. En la mayoría de estos, las interacciones transitorias o inadecuadas de RNA-RNA y RNA-proteína podrían tener un efecto negativo en los pasos subsecuentes, por lo que requieren de las helicasas para permitir el ensamblaje de los complejos que garanticen que el proceso pueda continuar. La mayoría de las helicasas de esta familia tienen un papel en uno o más procesos celulares que involucran RNA. Los principales procesos celulares en los que se sabe que participan las helicasas de RNA son [79-81]:

- a) Transcripción. Pueden actuar como coactivadores o correpresores de la transcripción reclutando factores transcripcionales y otros corre reguladores o estabilizando el complejo de inicio de la transcripción a través de interacciones intermoleculares con múltiples factores del complejo. Su función depende del factor transcripcional con el que interactúen, las señales a las que responden, el contexto del promotor y el ambiente celular. Los ejemplos mejor caracterizados en eucariotas superiores lo constituyen las helicasas DDX5 y DDX17 (Helicasa de caja DEAD5 y 17) que actúan como

correpresores o coactivadores puesto que pueden interactuar con diferentes factores de transcripción y receptores nucleares [81].

- b) Corte y empalme de mRNAs inmaduros. Se requieren para que se establezca un spliceosoma funcional. Se cree que se requieren para desenrollar dúplex cortos de RNA-RNA que se forman entre los mRNA inmaduros y los snRNA; así como en la disociación de complejos RNA-proteína. Además, algunas proteínas de esta familia forman también parte del complejo de empalme del exón. En levadura, Sub2, Prp28 y Prp5 (Supresor de Brr1-1, Procesamiento de pre-mRNA²⁸ y 5) se requieren para el corte y empalme *in vivo*. En eucariontes superiores, DDX5 está involucrado en el corte y empalme constitutivo y alternativo, mientras que su homólogo DDX17 funciona únicamente durante el alternativo [79]. Prp5 se requiere en etapas tempranas del ensamblaje del pre-spliceosoma y se une a los snRNP U1 y U2 que forman un puente entre el sitio de corte 5' y en sitio de empalme. Se cree que usa la energía de la hidrólisis de ATP para reorganizar interacciones locales de RNA-RNA o RNA-proteína para permitir que el RNPsn U2 se una al complejo. DDX5 se requiere para la disociación del RNPsn U1 del sitio de corte 5' de una manera dependiente de ATP [81]
- c) Biogénesis del ribosoma. El ribosoma es un RNP altamente dinámico que requiere de helicasas de RNA para su biogénesis. Al igual que para el procesamiento de mRNA inmaduros, se cree que las helicasas de la familia DEAD regulan el desenrollamiento de dúplex cortos formados por la interacción de RNAs pequeños nucleolares (snoRNA) y RNAs ribosomales (rRNA) así como de disociar complejos RNP. En *S. cerevisiae* 14 de las 24 helicasas de la familia con caja DEAD identificadas se requieren para la formación de las subunidades ribosomales 40S y 60S. En *E. coli* se han identificado sólo 5 helicasas de esta familia y al menos tres de ellas parecen estar involucradas en la biogénesis del ribosoma [81].
- d) Exportación nuclear. Se requieren para transportar mRNA maduros del núcleo hacia el citoplasma a través de los poros nucleares. Estas helicasas

podrían disociar factores nucleares del mRNA, permitir su exportación y/o preparar el mRNA para ser traducido. En levadura Dbp5 (Proteína con caja DEAD 5) se une al RNA cotranscripcionalmente e interactúa funcionalmente con la maquinaria de transcripción. Dado que interactúa también con el complejo del poro nuclear y que puede trasladarse entre el núcleo y el citoplasma usando la proteína del poro nuclear Nup159 (Nucleoporina 159) como plataforma de unión se ha sugerido que participa en el reciclaje de factores nucleares que recubren el mRNA o funcionar como una chaperona de RNA que facilita la exportación al citoplasma [79, 81].

- e) Inicio de la traducción. El factor canónico de inicio de la traducción eIF4A está altamente conservado y actúa desenrollando estructuras secundarias en el 5' UTR del mRNA. Otras helicasas son también importantes para el inicio de la traducción promoviendo la procesividad de escaneo de la subunidad 40S, actuando junto con eIF4A para desenrollar estructuras secundarias en el RNA o facilitando la traducción de un grupo específico de mRNA. En levadura Ded1 (Proteína con caja DEAD 1) también se ha demostrado que es necesario para el inicio de la traducción [79-81].
- f) Expresión genética de organelos celulares. Algunas helicasas de RNA se requieren para la expresión de genomas mitocondriales en hongos y en algunos eucariotas superiores. En levadura, Mss116 (Sistema de Corte y Empalme Mitocondrial 116) se requiere para el corte y empalme de mRNA mitocondriales mientras que en *Trypanosoma brucei* mHe161 se requiere para que haya una edición eficiente de mRNA mitocondriales que es característica de estos organismos [79-81].
- g) Degradación de RNA. Las helicasas de la familia DEAD se requieren en la degradación del RNA en *E. coli* formando parte del degradosoma. Se cree que participan desenrollando el mRNA sustrato para promover su degradación. El ejemplo mejor conocido es el de Rh1B que facilita el movimiento de la 3' exonucleasa PNPasa a lo largo del RNA. En eucariotas, las helicasas se requieren para la eliminación del cap en el mRNA lo que

permite su posterior degradación por el exosoma, tal es el caso de Dhh1 (Homólogo de Helicasa con caja DEAD 1) en levadura [79-81].

1.4.4 El papel de las helicasas de RNA en el estrés

Diecisiete de las 25 helicasas de RNA de la familia DEAD en levadura son esenciales para su crecimiento en condiciones control en el laboratorio, mientras que la mayoría, si no todas, las helicasas de esta familia en *E. coli* son dispensables para su crecimiento [80]. Es posible que las helicasas en *E. coli* son necesarias cuando crecen en condiciones diferentes a las óptimas en un laboratorio.

La participación de las helicasas de RNA durante el estrés tomó importancia con el descubrimiento de que la expresión de algunas helicasas se modifica en respuesta a cambios ambientales. La helicasa DEAD CrhC (Helicasa Inducible por frío y Regulada por Redox) de la cianobacteria fotosintética *Anabaena sp* se transcribe exclusivamente en temperaturas subóptimas de crecimiento y se sabe que en dichas condiciones su 5' UTR es inusualmente grande y le confiere estabilidad [82]. DED1 de *Saccharomyces cerevisiae* se requiere normalmente para el inicio de la traducción y está reportada como uno de los genes que se activan de manera temprana en respuesta al frío [83]. Se propone que podría reemplazar en condiciones de choque de frío a las helicasas que llevan a cabo esa función en temperaturas óptimas de crecimiento [82]. La expresión de esta misma helicasa en *Schizosaccharomyces pombe* se induce en ausencia de nitrógeno o glucosa, choque de calor y temperatura baja pero no en respuesta a daño al DNA ni al estrés osmótico ni oxidativo [82, 84]. En *Bacillus cereus*, las helicasas CshA, CshB y CshC (Helicasas de choque de frío A, B y C) se requieren para su crecimiento en temperaturas diferentes a las óptimas, así como en condiciones de estrés oxidante y de pH básico [85]. Podría entonces argumentarse que algunas helicasas de RNA son necesarias cuando las células se encuentran en condiciones diferentes a las óptimas.

Existe también el caso contrario, en el que las helicasas STRS1 y STRS2 (Supresor de la Respuesta a Estrés 1 y 2) de *A. thaliana* regulan negativamente la respuesta a estrés. La expresión de estas helicasas se reduce en estas condiciones y mutaciones en cualquiera de estos genes incrementan la tolerancia a estrés por sales, osmótico, por calor y frío. [86]

1.5 La helicasa DDX4/Vasa

La helicasa de la familia de caja DEAD Vasa se identificó por primera vez en *D. melanogaster* donde se observó que su expresión materna era esencial para establecer los patrones en el embrión y para la especificación de la línea germinal [87, 88]. Se expresa en ovarios y testículos en *D. melanogaster* pero todos los machos mutantes son fértiles, lo que sugiere que el gen no tiene una función esencial para la espermatogénesis [87].

Vasa es un marcador canónico de células germinales en una gran variedad de animales y se ha estudiado su función en la especificación de la línea germinal y en el desarrollo de diferentes organismos [89]. Los ortólogos de Vasa se conocen globalmente como DDX4 (Helicasa de caja DEAD 4) y parecen ser exclusivos de animales multicelulares ya que no se encuentran en procariotas, plantas ni eucariotas unicelulares [90]. Las proteínas DDX4 contienen además de los motivos conservados de helicasa, una región N-terminal rica en arginina y glicina que usualmente incluye varios motivos RGG; y una región C-terminal que a menudo incluye un dominio corto altamente ácido. La región N-terminal es altamente variable incluso entre los diferentes ortólogos y algunas contienen uno o más dominios de dedos de zinc [90].

El enriquecimiento en la línea germinal de las helicasas DDX4 así como su importancia para el establecimiento y función de la línea germinal está conservada en los organismos en los que se ha caracterizado. En erizo de mar, el mRNA de *vasa* se expresa en muchos tejidos, pero la proteína sólo se acumula en los blastómeros del polo animal, denominados micrómeros, y luego se segrega a los

micrómeros pequeños que tienen características de células germinales primordiales [91]. La proteína de XVLG1 y el mRNA de *DEADSouth*, los homólogos de Vasa en *Xenopus laevis*, se localizan en el plasma germinal en el polo vegetal de los ovocitos y se segregan a las 4 células vegetales durante la divisiones celulares iniciales acumulándose en las células germinales primordiales donde son importantes para su especificación y desarrollo [92, 93]. El mRNA de *vasa* en pez cebra, pero no la proteína, es un componente del plasma germinal que se segrega de manera asimétrica durante la embriogénesis. Su localización depende de secuencias en su 3' UTR que están conservadas en otros peces y en el mRNA de *DEADSouth* en *Xenopus* [94, 95]. En algunas especies de peces como medaka, el mRNA de *vasa* no posee esta secuencia de localización por lo que su ubicación en el plasma germinal se logra restringiendo su transcripción en las células germinales primordiales durante la embriogénesis [90]. La presencia del mRNA de *vasa* en el plasma germinal de pez cebra es importante durante la gametogénesis. Además, en la especificación sexual de la línea germinal se da la expresión diferencial de dos isoformas diferentes de *vasa* [96]. En pollo, Vasa también se acumula en células germinales primordiales y su presencia en estas células es muy importante para su especificación [97].

En mamíferos también se conserva la localización de Vasa en la línea germinal; sin embargo, parece que su papel se restringe a la espermatogénesis. En ratón, el mRNA de *vasa* se encuentra en ovocitos y embriones tempranos, pero después su expresión no se vuelve a detectar hasta que las células germinales primordiales comienzan a migrar a la cresta genital. Mutaciones en *vasa* afectan la espermatogénesis en ratón [98, 99]. En humanos, *DDX4* se expresa en células germinales de embriones y adultos siendo más abundante en espermatoцитos y ovocitos maduros [100]. La hipermetilación del promotor de *DDX4* está asociada con casos de azoospermia idiopática y oligospermia severa [90, 101].

1.5.1 Funciones conocidas de Vasa/DDX4 en las células germinales

En *D. melanogaster*, Vasa es un regulador positivo de la traducción de dos mRNA específicos durante las etapas tempranas de la ovogénesis. Interacciona físicamente con el factor de inicio de la traducción eIF5B, que promueve que la subunidad grande del ribosoma sea reclutada al complejo de inicio de la traducción 48S [102]. Esto permite la traducción específica del mRNA de *gurken*, un ligando del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) en ovocitos tempranos que se requiere para establecer los patrones en el embrión. Además, Vasa se une a un motivo rico en U en la región 3' UTR del mRNA de *mei-P26* (Meiótico P26) y podría regular su traducción en el ovocito de *D. melanogaster* [103]. Mei-P26 inhibe la vía de microRNAs y regula el mantenimiento de las células troncales germinales del ovario [104, 105]

En las células germinales de ratones machos se ha observado que Vasa participa en la biogénesis de los RNAs no codificantes que interactúan con PIWI (piRNA), específicamente se requiere en el ciclo de amplificación de los piRNAs conocido como ping-pong [106]. Los piRNA protegen a la línea germinal de transposones y son importantes para el desarrollo de la línea germinal.

1.5.2 La expresión de Vasa/DDX4 en células somáticas

Aunque las helicasas Vasa/DDX4 son específicas o se encuentran enriquecidas en la línea germinal, también se ha encontrado su expresión en tejidos somáticos. Algunos platelmintos como las planarias contienen células totipotenciales llamadas neoblastos que expresan Vasa y dan origen a todos los tipos celulares del organismo [107]. Su función en el mantenimiento y diferenciación de los neoblastos parece ser importante ya que el silenciamiento de los homólogos de Vasa en estos organismos por RNAi inhibe la regeneración produciendo defectos en la diferenciación celular [90, 108, 109]. Las células I (intersticiales) grandes en *Hydra* y los arqueocitos en esponjas que dan origen a células somáticas y germinales expresan también marcadores de línea germinal como Vasa [110, 111].

Considerando esto, se ha sugerido que el programa molecular de la línea germinal, que incluye la expresión de genes como *vasa*, se originó en células multipotentes y posteriormente fue utilizada por células germinales embrionarias más especializadas.

Vasa/DDX4 también está ligado íntimamente a la formación y mantenimiento de tumores. En *D. melanogaster*, *Vasa* se encuentra sobre expresada en varios tumores cerebrales durante la génesis tumoral (como los formados en mutantes en *lethal (3) malignant brain tumor [(3)mbt]*) y su remoción experimental conduce a la regresión del tumor [112]. También muchos tumores humanos se asocian con la expresión de *DDX4*, y el nivel en el que se acumula se correlaciona con la agresividad del tumor [113-116].

Se ha propuesto que *Vasa* está involucrado en la regulación del ciclo celular en estas células de elevada proliferación [113]. Apoyando esta teoría se ha visto en células troncales germinales en *D. melanogaster* que *Vasa* es esencial para la progresión mitótica al promover la condensación de los cromosomas mitóticos [117]. Además, en embriones tempranos de erizo de mar la cantidad de *Vasa* oscila durante el ciclo celular y si se inhibe su síntesis se prolonga la fase M y hay un retraso del ciclo celular. En este organismo se ha visto que es necesaria para la traducción eficiente de la ciclina B [118].

1.6 La helicasa DDX3/Belle

Belle es una helicasa de RNA de la familia DEAD que se expresa en células germinales y somáticas de *D. melanogaster*. Se requiere para la fertilidad en hembras y machos así como para la segregación de cromosomas en las células somáticas [119]. Además, promueve la traducción del factor transcripcional inducido por ecdisona E74A [120].

Los homólogos de *Belle* en otros organismos se conocen como *DDX3*. En humanos hay dos genes que codifican para *DDX3*, uno asociado al cromosoma X y otro al cromosoma Y [121]. Mutaciones en éste último son una causa frecuente de

infertilidad en hombres ya que tiene una expresión específica en los testículos y tiene una función esencial durante la espermatogénesis [122]. En contraste, el gen DDX3 asociado al cromosoma X se expresa en varios tejidos y tiene múltiples funciones [123].

1.6.1 El papel de DDX3 en la transcripción

En líneas celulares humanas se ha visto que DDX3 puede unirse al factor transcripcional Sp1 para promover la transcripción del gen *p21^{waf1/cip1}* que codifica para un inhibidor de cinasas dependiente de ciclinas (Figura 6) [124]. DDX3 también se puede unir a los promotores de E-Caderina e interferón β (IFN β) para inhibir y promover su transcripción, respectivamente [125].

1.6.2 El papel de DDX3 en el corte y empalme de RNA

DDX3 y su homólogo en levadura Ded1 interactúan con la maquinaria de corte y empalme pero su papel aún no es claro en el empalme de RNA (Figura 6). DDX3 contiene una región en su C-terminal que se parece a los dominios RS que se encuentran en factores de empalme. Sin embargo, DDX3 se asocia sólo con mRNA empalmados de manera dependiente del complejo de unión del exón (exon junction complex, EJC). Esto sugiere que DDX3 no tiene un papel activo en el corte y empalme sino que se asocia a las RNPs después del empalme [125, 126].

1.6.3 El papel de DDX3 en la exportación nuclear del RNA

DDX3 se asocia a dos diferentes proteínas de exportación nuclear: TAP (Proteína Asociada a Tip), el principal exportador de mRNA, y el receptor CRM1 (Exportina 1) que se asocia a proteínas que contienen señales de exportación nuclear ricas en leucina y se requiere para la exportación de ciertos mRNA específicos (Figura 6) [125]. Aunque se ha visto que la exportación de DDX3 al citoplasma podría depender de su asociación con estas proteínas [127], aún no se ha descrito si

participa activamente en la exportación del RNA a través del complejo del poro nuclear.

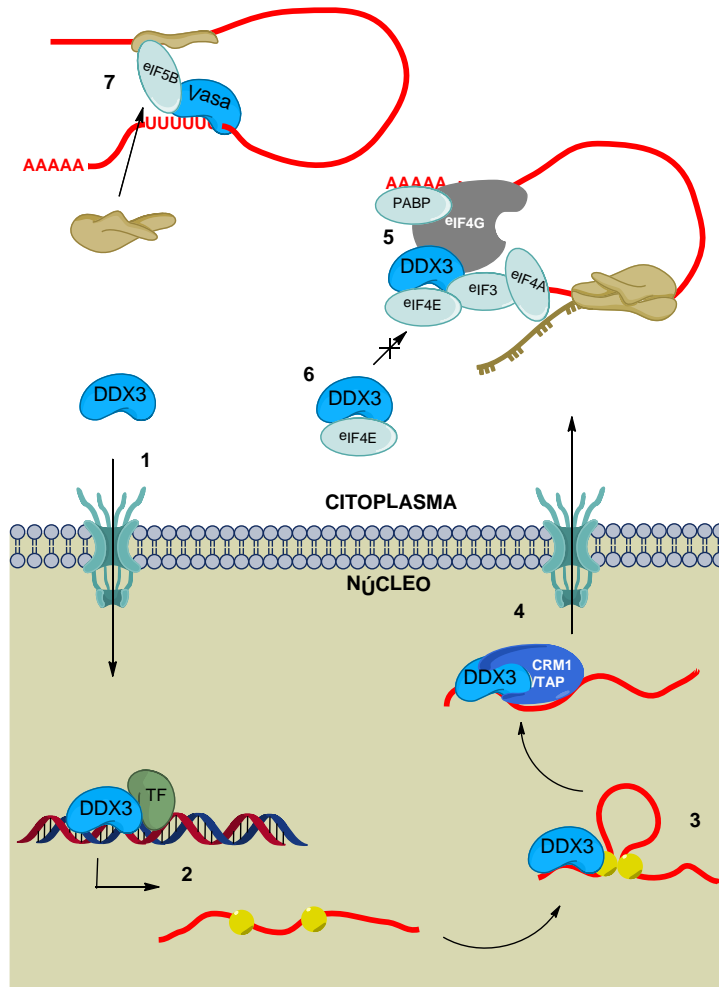


Figura 6. Funciones conocidas de Vasa y DDX3 en la regulación de la expresión genética. (1) DDX3 puede entrar al núcleo y (2) regular a los promotores de E-cadherina, IFN β y p21^{waf} posiblemente a través de su unión con diferentes factores de transcripción (TF). Después de la transcripción, (3) DDX3 interactúa con factores de corte y empalme de RNA. (4) DDX3 puede ser exportado al citoplasma junto con algunos mRNA a través de su unión con TAP y CRM1. (5) Una vez en el citoplasma DDX3 puede promover el inicio de la traducción a través de su unión con los factores eIF4E, eIF4A, eIF3 y PABP. (6) En otros estudios se ha demostrado que DDX3 puede actuar como una proteína de unión a eIF4E y reprimir la traducción dependiente de cap. (7) En *D. melanogaster*, Vasa se une a una región rica en U en el 3' UTR de los mRNA y recluta al factor de inicio de la traducción eIF5B promoviendo su traducción [125, 128].

La asociación de DDX3 a TAP no depende de la presencia de mRNA y parece no haber una contribución importante de DDX3 para la exportación general de mRNA poliadenilados [127]. Se cree que DDX3 no se requiere para la exportación general de mRNA, sino que sea necesario para la exportación de un grupo específico de mRNA asociándose a TAP.

Algunos mRNA que codifican para reguladores del ciclo celular, tales como las ciclinas contienen en su 3' UTR un elemento conservado estructuralmente que es reconocido por el factor de inicio de la traducción eIF4E. Este elemento permite que los mRNA que lo contienen sean exportados al citoplasma por un mecanismo que depende la interacción de eIF4E con CRM1 y de la presencia de un cap [121, 129]. Se ha visto que DDX3 es un componente del mRNP que se forma en estas condiciones ya que también puede interactuar con eIF4E aunque no se ha visto que se requiera para la exportación [121, 130].

El virus de inmunodeficiencia humana (HIV) utiliza la interacción de DDX3 con CRM1 para la exportación nuclear de su RNA que contiene intrones. Para hacerlo, la proteína viral Rev se une a un sitio en el extremo 3' de su RNA blanco conocido como elemento de respuesta a Rev (RRE) y posteriormente se une directamente a DDX3 para atravesar el complejo del poro nuclear [131].

1.6.4 El papel de DDX3 en la traducción

Los homólogos en levadura Ded1 y Dbp1 participan en el inicio de la traducción. En específico, Ded1 desdobla 5' UTR largos en el mRNA más rápida y eficientemente que el factor canónico de inicio de la traducción eIF4A [125, 126]. La función de Dbp1 no se ha estudiado a detalle pero debido a su homología con Ded1 se cree que podría llevar a cabo una función similar.

En humanos, DDX3 interactúa con varios factores de inicio de la traducción tales como eIF4E, eIF4A, eIF2 α , PABP y eIF3 [125]. DDX3 podría actuar como una proteína de unión a eIF4 (eIF4E-BP) previniendo la interacción de ésta con eIF4G

inhibiendo la traducción de mRNA que posee cap (Figura 6) y promoviendo la traducción de proteínas con sitios internos de entrada ribosomal (IRES).

Aunque podría pensarse que DDX3 es un inhibidor global traduccional es mayor la evidencia que sugiere que podrían participar promoviendo la traducción (Figura 6). Por ejemplo, su silenciamiento por RNAi en células HeLa y de Belle en *D. melanogaster* disminuye la traducción de un gen reportero [132] y la traducción de la ciclina E1 depende de la actividad de helicasa de DDX3 [133]. A pesar de que la disminución de la expresión de DDX3 no tiene un efecto en la síntesis global de proteína sí afecta la traducción de mRNA que contienen estructuras secundarias complejas en su 5' UTR [125, 134]. Además, DDX3 se asocia al factor de inicio de la traducción eIF3 y a la proteína de la subunidad ribosomal 40S rps6. Dado que DDX3 no se observa ni en polisomas ni en subunidades 80S libre indica que podría participar exclusivamente en el inicio de la traducción pero no durante la elongación ni en el reciclaje del ribosoma [121]. De acuerdo con esto, se ha visto que podría requerirse para el ensamblaje de ribosomas 80S funcionales posiblemente actuando como un puente entre los diferentes factores necesarios para las interacciones entre las subunidades 40S y 80S [135]. Es posible que la cantidad de DDX3 establezca si actuará como un inhibidor o activador de la traducción, dado que el estudio en el que se le identifica como represor está basado en la sobreexpresión de DDX3 [125].

1.6.5 El papel de DDX3 en el control del ciclo celular, apoptosis y génesis tumoral

Como se mencionó anteriormente, DDX3 promueve la transcripción de p21^{waf/cip1}, el cual funciona como un inhibidor del crecimiento y como un punto de control del ciclo celular. Además de modular la proliferación celular, también participa en la regulación de la apoptosis, diferenciación, respuesta a estrés y actúa como supresor de tumores [136, 137]. Esto, además del hecho de que la expresión de DDX3 se encuentre disminuida en algunas líneas celulares tumorales sugiere que DDX3 podría actuar como supresor de tumores [124]. Apoyando esto, se ha reportado que

las caspasas 6 y 9 no pueden activarse en ausencia de DDX3, lo que protegería a las células deficientes de DDX3 de la apoptosis. Sus datos sugieren que la pérdida de DDX3 produce un incremento en la proliferación celular debido a la transición de la fase G0/G1 a la fase S y una reducción en la apoptosis, condiciones que promueven la génesis tumoral [138].

En contradicción con lo anterior, en otro estudio se sugirió que DDX3 forma un complejo antiapoptótico con GSK3 y c-IAP1 (Glicógeno Sintasa Cinasa 3 y Proteína que contienen repetidos IAP de Baculovirus 1) que previene la señalización de muerte celular por apoptosis [139]. No se sabe qué papel tendría DDX3 en este complejo pero se sabe que el silenciamiento de DDX3 incrementa la señalización a través del receptor TRAIL-R2 que lleva a la activación de la caspasa 3 y, por consiguiente, a apoptosis [125, 139].

1.7 La helicasa de RNA VBH-1

VBH-1 (Helicasa parecida a Vasa y Belle -1) se identificó como una proteína en *C. elegans* que tenía una elevada homología con Vasa y Belle de *D. melanogaster*. Estudios iniciales sugerían que, al igual que Vasa, su expresión estaba restringida a la línea germinal por lo que el análisis de su función se enfocó en este linaje celular [140]. Su silenciamiento induce un cambio prematuro de espermatogénesis a ovogénesis en la gónada del hermafrodita lo que sugiere que tiene una función importante inhibiendo la ovogénesis en larvas L4 para que la espermatogénesis se lleve a cabo [140]. Esta función parece estar conservada en la especie relacionada *Caenorhabditis remanei* ya que cuando se silencia *vbh-1* en machos, estos llevan también a cabo ovogénesis y el esperma que producen presenta problemas para activarse [141].

La función de VBH-1 no sólo se restringe a la espermatogénesis sino que parece ser más amplia para garantizar la calidad del esperma y de los ovocitos ya que tanto hermafroditas como machos *vbh-1(RNAi)* muestran una fertilidad reducida cuando se cruzan con animales silvestres [140]. La importancia de VBH-1 durante

la ovogénesis podría depender en parte de su participación en promover la apoptosis fisiológica [141]. La apoptosis fisiológica es un proceso que ocurre normalmente durante la ovogénesis en el que se produce la muerte celular de alrededor de la mitad de las células germinales producidas [142]. Se cree que la función de este proceso es la de asegurar que las células que sobreviven tengan suficientes recursos disponibles para formar ovocitos viables [142]. La apoptosis fisiológica se incrementa durante un estrés ambiental y VBH-1 parece ser también importante para que se induzca en estas condiciones [141, 143]. Además de lo anterior, VBH-1 parece tener un papel importante durante la embriogénesis ya que mutantes *vbh-1* homocigas presentan letalidad embrionaria.

1.8 LAF-1, el parólogo de VBH-1

El gen que posee mayor homología con *vbh-1* en *C. elegans* es *laf-1*. LAF-1 (Letal y Feminizante -1) se expresa tanto en línea germinal como en soma [144] y promueve un destino celular masculino, por lo que es importante para la determinación sexual. Mutaciones en *laf-1* suprimen el fenotipo de una mutante XX masculinizada. Estos animales masculinizados son estériles, pero la presencia de una sola copia de un alelo mutante *laf-1* suprime la esterilidad [145]. Un pequeño porcentaje de animales hermafroditas heterocigos *laf-1* no producen esperma, mientras que algunos animales machos del mismo genotipo se feminizan parcialmente tanto en línea germinal como en el soma, lo que sugiere que LAF-1 promueve un destino masculino en todos los tejidos [145].

El papel de LAF-1 en promover la espermatogénesis en el hermafrodita parece ser parcialmente redundante con VBH-1. El silenciamiento de ambos genes en animales incrementa el porcentaje de hermafroditas feminizados que se observa cuando se silencia cualquiera de los dos por separado [144]. Las similitudes en la función de ambos genes parecen extenderse también a que ambos son importantes durante la embriogénesis [144].

2. Planteamiento del problema

Las helicasas de RNA de la familia con caja DEAD participan en una amplia gama de procesos celulares en diferentes condiciones. Una misma helicasa puede llevar a cabo varias funciones debido a la presencia de diferentes motivos adicionales en las regiones que flanquean su dominio central de helicasa. VBH-1 es una helicasa de RNA de esta familia que participa en la gametogénesis y embriogénesis temprana en *C. elegans*. Sin embargo, no se conoce la forma en la que VBH-1 lleva a cabo su función, los RNAs que regula ni si tiene otras funciones.

3. Justificación

Estudiar la función de VBH-1 podría aportar conocimiento sobre la función de las helicasas de humano con las que posee mayor homología: DDX4 y DDX3. Estas dos helicasas son de interés médico ya que ambas son importantes para la fertilidad y se encuentran sobre expresadas en diferentes líneas tumorales. Además, DDX3 es utilizado por algunos virus en su ciclo infectivo y se ha propuesto como un blanco antiviral potencial.

4. Hipótesis

VBH-1 tiene una función durante el estrés en *C. elegans* puesto que algunas helicasas de la familia con caja DEAD tienen un papel importante durante el estrés y VBH-1 se requiere para inducir la apoptosis en esas condiciones.

5. Objetivo general

Analizar la posible función de VBH-1 durante diferentes tipos de estrés en el nematodo *C. elegans*.

5.1 Objetivos particulares

- Determinar si VBH-1 se requiere para la supervivencia durante un choque de calor y en condiciones de estrés oxidante.
- Caracterizar la localización subcelular de VBH-1 en condiciones control y de estrés (choque de calor, ayuno y detención de la ovulación).
- Identificar los dominios de VBH-1 que son importantes para su localización.
- Buscar mRNAs involucrados en la respuesta a estrés que pudieran ser regulados por VBH-1.

6. Resultados I

6.1 VBH-1 y su parólogo LAF-1 son importantes para la supervivencia durante un choque de calor

Para analizar la función de *vbh-1* durante el estrés, se silenció mediante RNA de interferencia (RNAi) por alimentación. En esta técnica, se alimenta a los animales con bacterias que expresan RNA de doble cadena del gen que se desea silenciar. Para silenciar a *vbh-1* se utilizó un fragmento que corresponde a los nucleótidos 1610-1895 del marco abierto de lectura de la isoforma a de *vbh-1*. La eficiencia del silenciamiento se verificó por medio de Western blot, en el cual se comparó la abundancia relativa de VBH-1 en extractos proteicos de animales *vbh-1(RNAi)* con la de animales control (plásmido vacío PV). Para el Western blot se usó un anticuerpo policlonal anti-VBH-1 que detecta varias bandas alrededor de 70 kDa, lo que sugiere que existen modificaciones postraduccionales en VBH-1 [140]. En los extractos proteicos de animales control se observan dos bandas principales (Figura 7A), mientras que en los de animales *vbh-1(RNAi)* la banda de mayor peso molecular ya no se detecta y la de menor peso es menos abundante que en los animales control. La cantidad de extracto proteico utilizado en este estudio se

normalizó usando tubulina como control de carga. Este resultado sugiere que el silenciamiento de *vbh-1* fue eficiente (Figura 7A).

El silenciamiento de *vbh-1* se confirmó también mediante RT-PCR semicuantitativo. Usando oligonucleótidos específicos para *vbh-1* y actina (*act-4*) como control de carga encontramos una reducción en la abundancia relativa del mRNA de *vbh-1* en animales *vbh-1(RNAi)* comparada con animales control (Figura 7B). Basados en los análisis de Western blot y RT-PCR semicuantitativo concluimos que el silenciamiento de *vbh-1* mediante RNAi es eficiente en las condiciones que utilizamos.

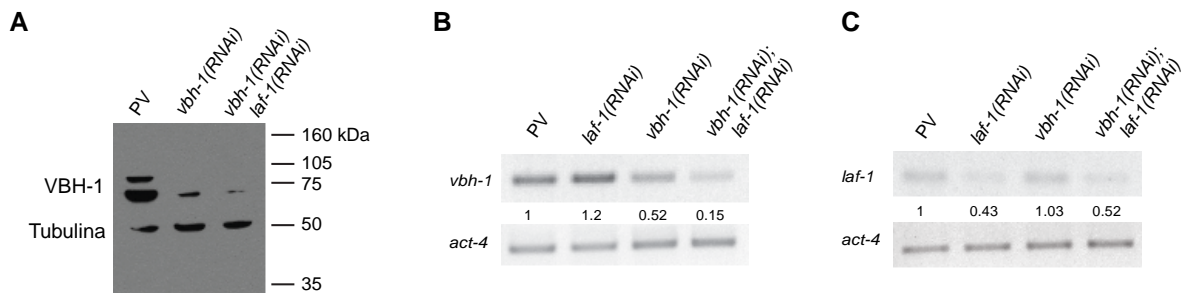


Figura 7. El silenciamiento de *vbh-1* y *laf-1* por RNAi es eficiente. (A) Western Blot utilizando extractos proteicos de 100 hermafroditas adultos de un día control (PV: plásmido vacío), *vbh-1(RNAi)* y *vbh-1(RNAi);laf-1(RNAi)* mantenidos a 25°C. La membrana se incubó con un anticuerpo anti-VBH-1 y se utilizó un anticuerpo comercial anti-tubulina como control de carga. (B-C) Análisis de RT-PCR semicuantitativo utilizando cDNA que se sintetizó a partir de extractos de RNA obtenidos de animales adultos de un día control (PV), *laf-1(RNAi)*, *vbh-1(RNAi)* y *vbh-1(RNAi);laf-1(RNAi)*. Se utilizaron oligonucleótidos específicos para amplificar a (B) *vbh-1* y (C) *laf-1*. En ambos casos se usó actina (*act-4*) como control de carga. El análisis densitométrico se realizó normalizando cada banda con su banda correspondiente de *act-4* usando el programa ImageJ.

El posible papel de *vbh-1* durante el estrés se analizó colocando animales *vbh-1(RNAi)* y control (plásmido vacío) adultos de un día en una incubadora a 36°C y cuantificando cada hora el número de animales que sobreviven. En las primeras 3 horas de incubación no hubo diferencias significativas entre ambos grupos de animales (Figura 8 y Tabla 1). Después de 4 h a 36°C, sólo el 71% de los animales

vbh-1(RNAi) seguían vivos comparados con el 96.6% de animales control vivos, y esta diferencia se incrementó gradualmente conforme avanzaban el tiempo de incubación (Figura 8 y Tabla 1). Después de 7 h, había solamente un 5% de animales *vbh-1(RNAi)* vivos comparado con más de la mitad en animales control. Esto sugiere que, en *C. elegans*, VBH-1 es importante para sobrevivir a un choque de calor.

VBH-1 y su parólogo LAF-1 son parcialmente redundantes en la determinación sexual en *C. elegans* [144] por lo que se analizó si compartían una función durante el choque de calor. Primero se silenció a *laf-1* usando RNAi por alimentación y se comprobó la eficiencia del silenciamiento mediante RT-PCR semicuantitativo. En animales *laf-1(RNAi)* se observó una disminución en la abundancia del mRNA de *laf-1* comparada con la de animales control (Figura 7C); lo que sugiere que el silenciamiento de *laf-1* es eficiente.

Debido al alto grado de homología entre *vbh-1* y *laf-1*, existía la posibilidad de que se silenciara de manera inespecífica a *laf-1* al inducir RNAi en *vbh-1*, y viceversa. Para descartar que esto estuviera ocurriendo se hizo un análisis por RT-PCR semicuantitativo. Se encontró que la cantidad relativa de los transcritos de *vbh-1* y *laf-1* no se afectaban cuando se silenciaba a *laf-1* y *vbh-1*, respectivamente (Figura 7B y C). Esto descarta que exista un silenciamiento inespecífico entre estos genes.

Cuando se incubaron animales adultos de un día *laf-1(RNAi)* a 36°C se encontró que, después de 6 h, existía una disminución estadísticamente significativa en su supervivencia con respecto los animales control de alrededor de 20% (Figura 8 y Tabla 1). El 36% de los animales *laf-1(RNAi)* seguían vivos después de 7 h de choque de calor comparado con un 54% de los animales control (Figura 8 y Tabla 1). Estos datos sugieren que LAF-1 es importante para la supervivencia de *C. elegans* durante un choque de calor.

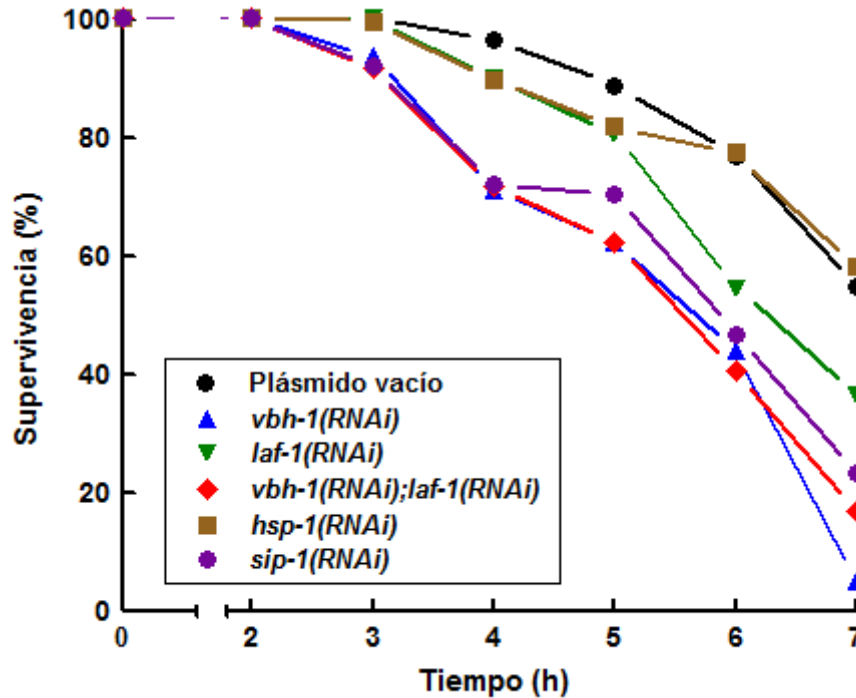


Figura 8. VBH-1 y LAF-1 son importantes para la supervivencia durante un choque de calor. Curva de supervivencia a 36°C de animales hermafroditas sincronizados a los que se les silenciaron los genes indicados. Se obtuvieron datos de diferentes experimentos y se graficó el porcentaje del total.

6.2 VBH-1 y LAF-1 no actúan redundantemente para proteger a *C. elegans* del estrés

Una vez que se había observado que *vbh-1* y *laf-1* son importantes para la supervivencia durante el choque de calor se decidió analizar si actuaban de manera redundante. Para esto se silenciaron ambos genes simultáneamente por medio de RNAi. La eficiencia del silenciamiento se analizó por Western blot y/o RT-PCR semicuantitativo. Como se muestra en las figuras 1 y 2 el silenciamiento de ambos genes se lleva a cabo de manera eficiente. Incluso, se observó que el silenciamiento de *vbh-1* era más eficiente en animales *vbh-1*(RNAi);*laf-1*(RNAi) que en animales *vbh-1*(RNAi) (Figura 7), esto podría deberse a que la gónada de los animales *vbh-1*(RNAi);*laf-1*(RNAi) se encuentra más afectada que en animales *vbh-1*(RNAi) por lo que podría haber una menor acumulación de *vbh-1* en estos animales.

Los animales *vbh-1(RNAi);laf-1(RNAi)* expuestos a un choque de calor de 36°C presentaron una supervivencia similar a la de los animales *vbh-1(RNAi)*, la única diferencia se observó a las 7 h, donde estaban vivos el 17% de los animales comparado con el 5% en animales *vbh-1(RNAi)* (Figura 8 y Tabla 1). Debido a que no se observó un incremento en la susceptibilidad de los animales al silenciar a *vbh-1* y *laf-1* simultáneamente se concluye que ambos genes no actúan redundantemente durante el estrés, a diferencia de lo que ocurre durante la determinación sexual en la línea germinal de *C. elegans* [144].

6.3 VBH-1 y LAF-1 son importantes también para la supervivencia durante un estrés oxidante

Los genes cuyos productos se requieren durante un choque de calor pueden también tener una función cuando se presentan otros tipos de estrés celular. Para determinar si este es el caso para *vbh-1* y *laf-1* se analizó el efecto que tenía su silenciamiento en animales sometidos a un estrés oxidante. Los animales adultos se colocaron en cajas NGM de 35 mm sin bacteria a las que previamente se les distribuyeron 20 µl de peróxido de hidrógeno al 15% (97.9 µmoles) en su superficie y se analizó la supervivencia después de 20 min. Se observó una supervivencia del 43% en animales *vbh-1(RNAi)* mientras que los animales *laf-1(RNAi)* tuvieron una supervivencia del 27% (Figura 9). Considerando que los animales control en las mismas condiciones tuvieron una supervivencia del 86% (Figura 9) podría concluirse que *vbh-1* y *laf-1* también son importantes para la supervivencia durante el estrés oxidante. Como podría esperarse de lo observado durante un choque de calor, el doble silenciamiento no incrementó la susceptibilidad de los animales sometidos a un estrés oxidante ya que los animales *vbh-1(RNAi);laf-1(RNAi)* tuvieron una supervivencia del 31% en estas condiciones.

6.4 La expresión de VBH-1 en tejidos somáticos es importante para sobrevivir al choque de calor

VBH-1 se encuentra enriquecido en la línea germinal de *C. elegans*. En un estudio previo no se observó VBH-1 en tejidos somáticos mediante inmunotinciones aunque su mRNA sí se detectó por medio de Northern blot en mutantes sin línea germinal [140]. Esto sugiere que *vbh-1* se puede expresar en tejidos somáticos en niveles bajos.

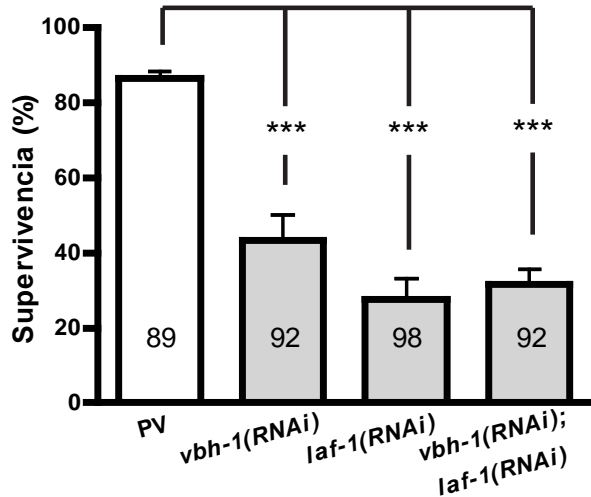


Figura 9. VBH-1 y LAF-1 son importantes para la supervivencia durante un estrés oxidante. Porcentaje de supervivencia de animales hermafroditas sincronizados a los que se les silenciaron los genes indicados y fueron posteriormente expuestos a un medio NGM que contenía 20 μ l de peróxido de hidrógeno al 15% durante 20 min. Los datos de tres diferentes experimentos se promediaron y graficaron. Las barras indican el error estándar de la media. *** significa que es estadísticamente significativo $P < 0.001$. Los números dentro de cada barra señalan el número total de animales observados.

Para discernir si un gen se expresa en línea germinal o en soma en *C. elegans* se utiliza la cepa *glp-4(bn2)* (Deficiente en la Proliferación de la Línea Germinal -4) que cuando se crece a temperatura restrictiva (25°C) su línea germinal no prolifera y se encuentra severamente reducida, por lo que se considera carente de línea germinal [146]. La hipótesis es que si *vbh-1* no se expresa en tejidos somáticos y su expresión en línea germinal es la responsable del efecto protector durante un estrés, entonces el silenciamiento de *vbh-1* en la cepa *glp-4(bn2)* a 25°C no tendrá ningún impacto en la supervivencia durante un choque de calor.

Cepa, RNAi	Tiempo (h)								
	2	3	4	5	6	7	8	9	10
N2, PV	100% ±0 (287)	100% ±0 (280)	96.6% ±1.76 (294)	88.8% ±2.97 (295)	76.9% ±3.73 (282)	54.7% 3.41 (212)	N.D.	N.D.	N.D.
N2, <i>vbh-1(RNAi)</i>	100% ±0 (165)	93.6% ±2.52 (159)	71.2% ±5.20 (163)***	62.1% ±8.47 (161)***	43.9% ±6.09 (164)***	5% ±1.71 (120)***	N.D.	N.D.	N.D.
N2, <i>laf-1(RNAi)</i>	100% ±0 (211)	100% ±0 (206)	89.9% ±2.61 (209)	80.5% ±5.95 (210)	54.6% 2.85 (185)***	36.5% ±5.77 (192)**	N.D.	N.D.	N.D.
N2, <i>vbh-1(RNAi); laf-1(RNAi)</i>	100% ±0 (120)	91.6% ±3.48 (119)	71.7% ±8.25 (120)***	62.1% ±6.01 (116)***	40.5% ±4.30 (116)***	16.7% ±8.24 (84)***	N.D.	N.D.	N.D.
N2, <i>sip-1(RNAi)</i>	100% ±0 (98)	91.9% ±4.42 (99)	72.2% ±1.25 (97)***	70.3% ±0.59 (111)*	46.8% ±16.24 (94)***	23.2% ±0.29 (95)***	N.D.	N.D.	N.D.
N2, <i>hsp-1(RNAi)</i>	100% ±0 (284)	99.6% ±0.38 (285)	89.7% ±3.34 (291)	81.7% ±2.81 (268)	77.3% 6.05 (278)	58% 6.53 (248)	N.D.	N.D.	N.D.
<i>glp-4(bn2), PV</i>	100% ±0 (84)	100% ±0 (91)	98.7% ±0.68 (149)	94% ±0.38 (151)	89% ±0.45 (191)	82.8% ±2.53 (192)	74.7% ±1.46 (87)	64.4% ±1.38 (101)	60.9% ±4.53 (110)
<i>glp-4(bn2); vbh-1(RNAi)</i>	100% ±0 (87)	98% ±0 (101)	94.2% ±1.97 (138)	83.3% ±3.20 (132)*	69.3% ±3.67 (192)***	57.6% 1.63 (184)***	49.5% 3.65 (97)***	30.7% 6.49 (101)***	18.8% 1.67 (64)***

Tabla 1. Resumen de los datos de supervivencia. Datos de supervivencia de animales sometidos a un choque de calor a 36°C de las figuras 6 y 8. Los números indican el porcentaje de animales vivos y el error estándar de la media (SEM) mientras que la cantidad de animales analizados se indica entre paréntesis. Se llevaron a cabo ocho experimentos para los animales silvestres PV y *hsp-1(RNAi)*, seis para *laf-1(RNAi)*, cinco para *vbh-1(RNAi)*, cuatro para *vbh-1(RNAi);laf-1(RNAi)* y tres para *sip-1(RNAi)* y para los animales *glp-4(bn2)*. Se llevó a cabo un análisis de ANOVA de dos vías con prueba de Bonferroni para comparar cada condición al control. * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001, N.D. no determinado.

Se observó que había un 80% de animales *glp-4(bn2)* control vivos después de 7 h a 36°C a diferencia de 54% en animales silvestres control (Tabla 1, comparar Figuras 8 y 10) lo que sugiere que los animales mutantes *glp-4(bn2)* son más resistentes al choque de calor que los animales silvestres. Esta observación hizo que fuera necesario extender el tiempo de exposición al choque de calor. A pesar

de ello, encontramos que los animales *glp-4(bn2);vbh-1(RNAi)* son más susceptibles a un choque de calor que los animales control *glp-4(bn2)* (Figura 10 y Tabla 1), ya que presentaron una supervivencia del 19% a las 10 h de estar a 36°C en comparación con 61% de animales vivos en animales control. Estas observaciones sugieren que la expresión de *vbh-1* en tejidos somáticos podría contribuir a la supervivencia de *C. elegans* durante el estrés. Sin embargo, dado que la línea germinal de las mutantes *glp-4(bn2)* no se elimina completamente en la temperatura restrictiva, es posible también que la expresión de *vbh-1* en las pocas células germinales restantes pudiera contribuir a la supervivencia durante un choque de calor.

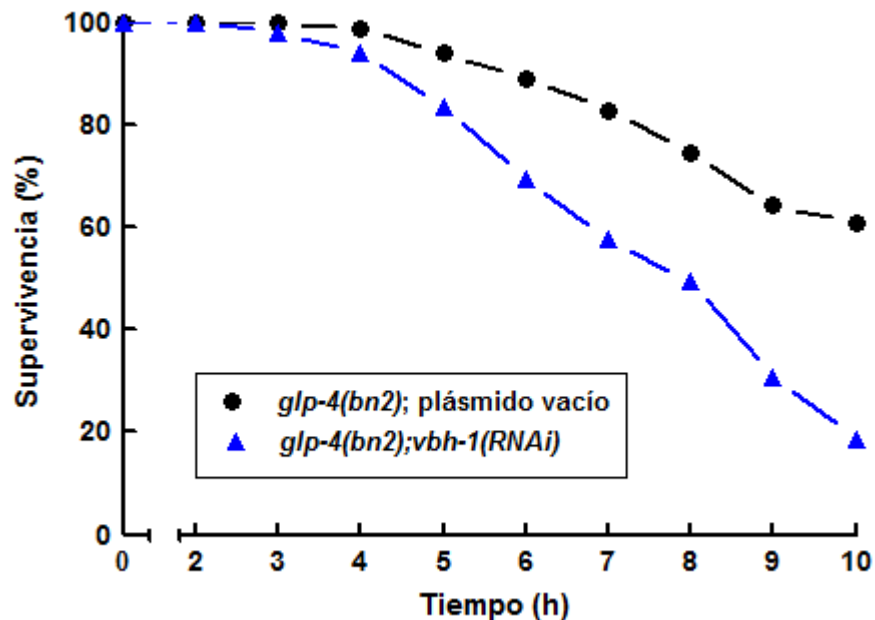


Figura 10. La expresión somática de VBH-1 podría ser importante durante un choque de calor. Curva de supervivencia a 36°C de animales *glp-4(bn2)* sincronizados mantenidos a temperatura restrictiva y a los que se les silenciaron los genes indicados. Se obtuvieron datos de 3 experimentos independiente y se graficó el porcentaje del total.

6.5 VBH-1 podría expresarse en el intestino de *C. elegans*

Para analizar la posible expresión somática de *vbh-1* se utilizó un transgen de *vbh-1* fusionado al gen reportero de la proteína verde fluorescente (GFP) que fue realizado en el laboratorio por el alumno de doctorado Emmanuel Villanueva-Chimal. El transgen se generó clonando en tándem la región intergénica río arriba de *vbh-1* (608 pb), el gen codificante para la GFP sin codón de paro y la región genómica que abarca desde el codón de inicio hasta el sitio donde termina el 3' UTR de *vbh-1* (2228 pb). Posteriormente se generaron los animales transgénicos utilizando la metodología de inserción monocopia mediada por Mos1 [147, 148]. Se obtuvieron dos líneas independientes que expresaban este transgen *Pvbh-1::GFP::vbh-1::vbh-1 3'utr*: 1) *xmSi05* con una expresión elevada tanto en soma como en línea germinal y 2) *xmSi06* cuya expresión está parcialmente silenciada en la línea germinal. El silenciamiento de transgenes en la línea germinal es un problema común en *C. elegans* que es un mecanismo de protección que requiere la vía de piRNA [149].

La expresión del transgen en animales *xmSi05* (expresión somática y línea germinal) se analizó disecando animales transgénicos y montándolos en un portaobjetos para su observación en un microscopio de epifluorescencia. En las gónadas y embriones de *C. elegans* VBH-1 se expresa en gránulos citoplásmicos, gránulos germinales perinucleares denominados gránulos P y de manera difusa en el citoplasma [140]. El transgen presenta un patrón de expresión en la gónada y embriones similar al que se observa para el gen endógeno mediante inmunotinciones (Figura 11A y C), lo que sugiere que podría reflejar la expresión de endógena de *vbh-1*.

Debido a que los animales transgénicos *xmSi05* tienen una expresión elevada en la gónada, esta no permitía una observación adecuada de los tejidos somáticos. Para evitar este problema utilizamos animales *xmSi06*, que tiene una expresión baja en la gónada. En estos animales se observó GFP::VBH-1 en el citoplasma de las células intestinales con un claro enriquecimiento en el polo apical (Figura 11F, flechas).

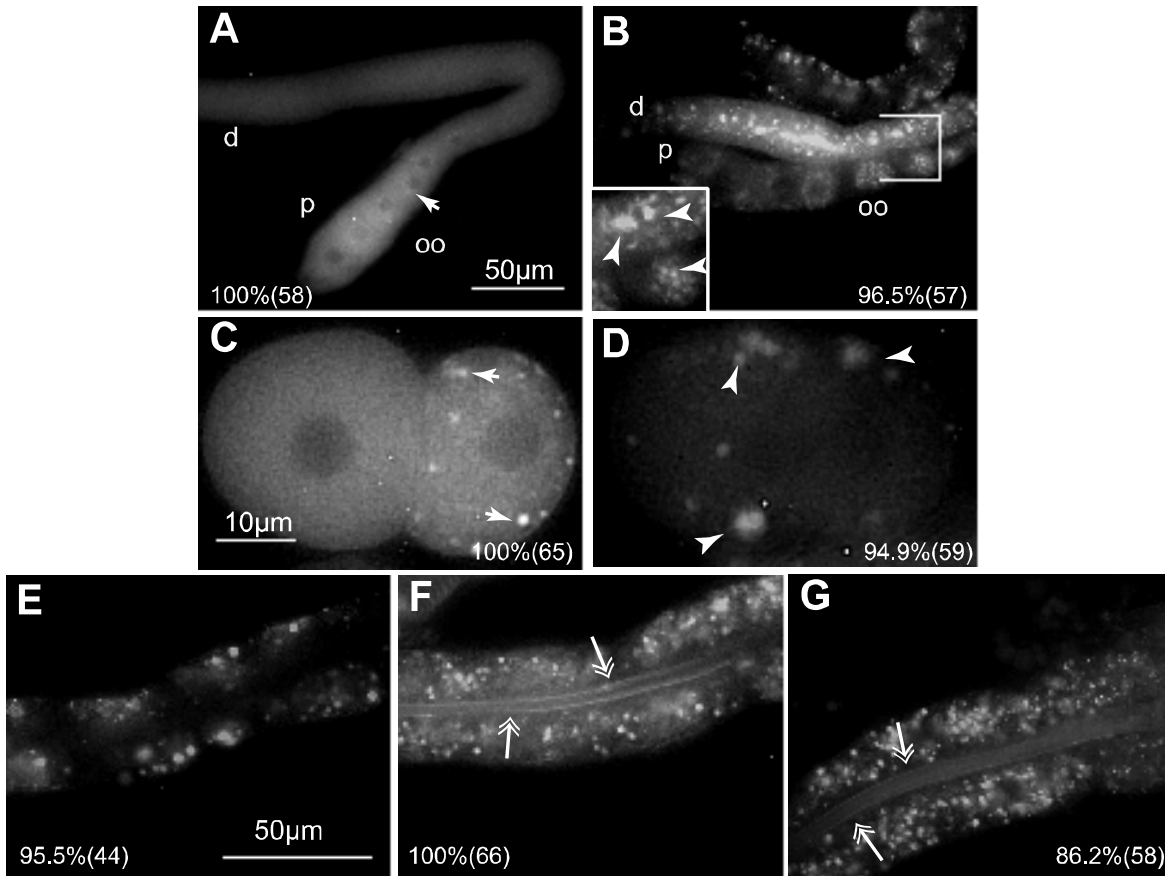


Figura 11. Expresión del transgen *Pvbh-1::GFP::vbh-1::vbh-1 3'utr*. Animales transgénicos *Pvbh-1::GFP::vbh-1::vbh-1 3'utr* adultos de un día en condiciones control y sometidos a un choque de calor de 30°C por 4 h se disecaron y observaron en un microscopio de epifluorescencia. (A) Localización de GFP::VBH-1 en gónadas de animales *XmSi05* control (B) gónadas de animales *XmSi05* sometidos a un choque de calor (C) embrión de 2 células de un animales *XmSi05* control (D) embrión de 2 células de animales *XmSi05* sometidos a choque de calor (E) intestino de animales *XmSi06; vbh-1(RNAi)*, (F) intestino de animales *XmSi06* control (G) intestino de animales *XmSi06* después de un choque de calor. d = distal, p = proximal, oo = ovocitos, las flechas señalan gránulos P, las cabezas de flecha indican los gránulos formados después de un choque de calor, las flechas dobles apuntan hacia el polo apical de las células intestinales. Los números en la esquina inferior de cada imagen indican el porcentaje en el que se observó el fenotipo mostrado y entre paréntesis se indica el número de muestras observado.

El intestino de *C. elegans* tiene lisosomas autofluorescentes en su citoplasma que podrían confundirse con fluorescencia de la GFP [150], por lo que silenciamos el transgen mediante RNAi y comparamos la fluorescencia con animales control. En animales *xmSi06;vbh-1(RNAi)* la fluorescencia en el citoplasma estaba claramente

disminuida y no se observaba un enriquecimiento apical (Figura 11E), lo que sugiere que el transgen se expresa en el intestino.

Posteriormente se analizó si cambiaba la localización de la proteína de fusión GFP::VBH-1 durante un choque de calor. Se observó una distribución más difusa en el polo apical para GFP::VBH-1 además de una disminución en la fluorescencia citoplásmica que podrían estar asociadas a la función de VBH-1 en estas condiciones (Figura 11G). Estos datos, junto con los del apartado anterior, sugieren que VBH-1 se expresa en el intestino de *C. elegans* en donde tiene una actividad importante para protegerlo ante un estrés.

6.6 Hay una disminución en la abundancia de los mRNA de las proteínas de choque de calor SIP-1 y HSP-1 en animales *vbh-1(RNAi)* y *laf-1(RNAi)*

Como VBH-1 es importante para sobrevivir al estrés y dado que es una helicasa de RNA se decidió identificar mRNA candidatos a ser blanco de regulación por VBH-1. Con este propósito se analizaron los datos obtenidos previamente de un microarreglo de expresión en el que se compararon los transcritos de animales *vbh-1(RNAi)* adultos de un día con los de animales control de la misma edad crecidos a 20°C (datos sin publicar). Se identificaron dos mRNAs que codifican para genes de respuesta a estrés, *hsp-1* y *sip-1* cuya abundancia se ve afectada en animales *vbh-1(RNAi)*. Ambas son proteínas de choque de calor, SIP-1 (Proteína Inducida por Estrés -1) es un miembro de la familia α -cristalina/Hsp20, mientras que HSP-1 (Proteína de Choque de Calor -1) pertenece a la familia de chaperonas Hsp70 [151, 152].

Los datos obtenidos en el microarreglo se confirmaron por RT-PCR semicuantitativo en donde encontramos que la abundancia del mRNA de *sip-1* y, en menor medida, del mRNA de *hsp-1* disminuía en animales *vbh-1(RNAi)* en comparación con animales control (Figura 12A).

Dado que LAF-1 también es importante para la supervivencia de *C. elegans* durante el estrés se analizó si la abundancia de los mRNA de *sip-1* y *hsp-1* se afecta

en animales *laf-1(RNAi)*. Cuando se silenció a *laf-1* por RNAi se observó una reducción en la abundancia del mRNA de *hsp-1* y, en menor medida, del mRNA de *sip-1* (Figura 12A). Como era de esperarse, se encontró una reducción en la cantidad de los transcritos de *sip-1* y *hsp-1* cuando se silenciaban simultáneamente *laf-1* y *vbh-1* (Figura 12A). Estos resultados sugieren que VBH-1 y LAF-1 regulan la acumulación de los mRNA de las proteínas de choque de calor SIP-1 y HSP-1. Sin embargo, VBH-1 podría ser más importante para la regulación de *sip-1* mientras que LAF-1 lo sería para la regulación de *hsp-1*.

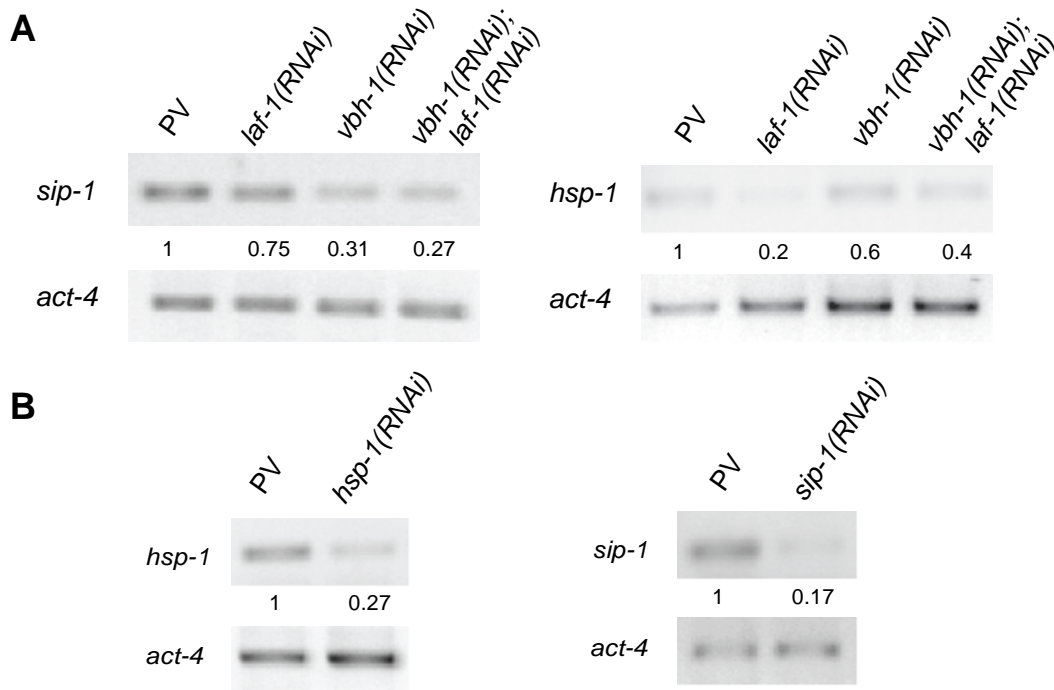


Figura 12. La cantidad de los mRNA de *sip-1* y *hsp-1* se encuentra reducida en animales *vbh-1(RNAi)* y *laf-1(RNAi)*. Análisis de RT-PCR semicuantitativo usando cDNA sintetizado a partir de extractos de RNA obtenidos de animales control (PV) y RNAi adultos de un día. Se utilizaron oligonucleótidos específicos para *sip-1* y *hsp-1*. Actina (*act-4*) se usó como control de carga. (A) Cuantificación de los transcritos de *sip-1* y *hsp-1* en animales *laf-1(RNAi)*, *vbh-1(RNAi)* y *vbh-1(RNAi);laf-1(RNAi)*, (B) Eficiencia del silenciamiento de *sip-1* y *hsp-1*. El análisis densitométrico se realizó normalizando cada banda con su banda correspondiente de *act-4* usando el programa ImageJ.

Posteriormente se analizó la importancia de SIP-1 y HSP-1 en la supervivencia de *C. elegans* durante un choque de calor a 36°C. Para esto se silenciaron ambos genes por RNAi por alimentación y se comprobó el silenciamiento por RT-PCR semicuantitativo (Figura 12B). Los animales *sip-1(RNAi)* incubados a 36°C fueron más sensibles al choque de calor que los animales control (Figura 8). En contraste, no se observaron diferencias significativas entre animales control y animales *hsp-1(RNAi)* (Figura 8). Con estas observaciones concluimos que SIP-1 es importante para la supervivencia durante un choque de calor, mientras que HSP-1 parece no ser esencial. No descartamos la posibilidad de que HSP-1 sí sea importante y que debido a que usamos RNAi en lugar de una mutación nula, no pudimos apreciar el papel de esta proteína durante el estrés.

6.7 VBH-1 se asocia en gránulos en las gónadas y los embriones durante el estrés

Una vez que se observó que VBH-1 juega un papel importante durante el estrés, se decidió analizar si su localización subcelular se modificaba en estas condiciones. Puesto que la línea germinal y los embriones son muy sensibles a las temperaturas elevadas, se utilizaron condiciones menos agresivas de choque de calor (30 y 34°C) en lugar de las utilizadas en la curva de supervivencia (36°C). Los animales sometidos al choque de calor se diseccionaron y fijaron para ser inmunoteñidos con un anticuerpo anti-VBH-1.

Como era de esperarse, a 20°C VBH-1 se observó en gránulos P y difuso en el citoplasma de las células germinales (Figura 13A, B y E, flechas) [140]. Después de un choque de calor a 30°C, VBH-1 se observó en agregados de gran tamaño en el centro de la gónada y en ovocitos (Figura 13H, I y L, cabezas de flecha) y en gránulos P de mayor tamaño comparados con los observados en animales control (Figura 13H-I, flechas). Un patrón de agregación similar se encontró para el transgen GFP::VBH-1 durante un choque de calor a 30°C (Figura 11B, cabezas de flecha).

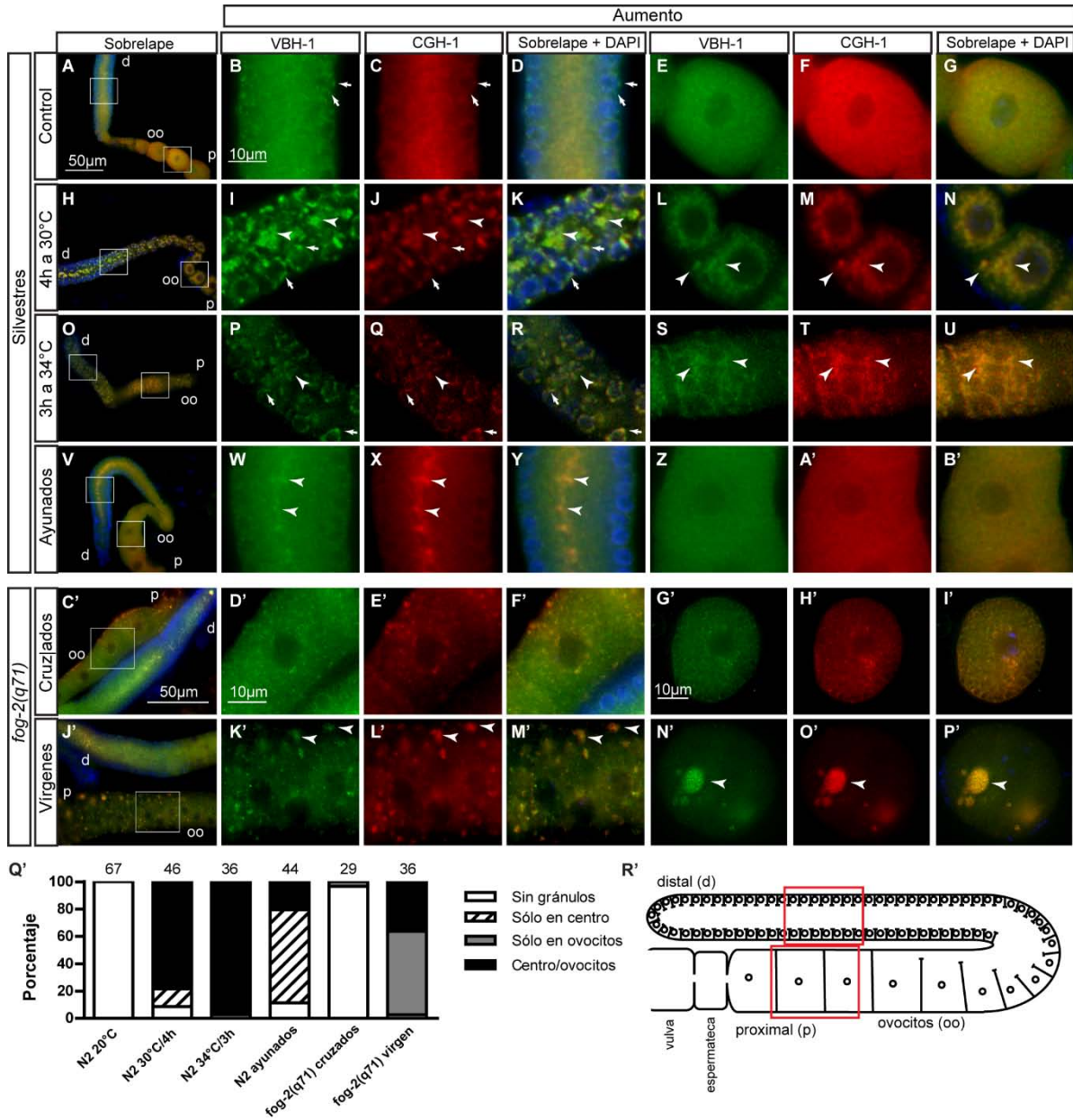


Figura 13. VBH-1 se asocia en gránulos con CGH-1 en la gónada de *C. elegans* durante el estrés. Gónadas y ovocitos diseccionados de animales hermafroditas silvestres y *fog-2(q71)* en condiciones control y de estrés se fijaron e inmunotñieron usando anticuerpos anti-VBH-1, anti-CGH-1 y DAPI para teñir DNA. (A-G) Gónadas de N2 mantenidos a 20°C, (H-N) N2 sometidos a un choque de calor de 30°C por 4 h, (O-U) N2 sometidos a un choque de calor de 34°C por 3 h, (V-B') N2 colocados en cajas con medio NGM sin bacteria por 5 h, (C'-F') hermafroditas feminizados *fog-2(q71)* apareados con machos y (J'-F') hermafroditas *fog-2(q71)* feminizados vírgenes. Ovocitos de animales (G'-I') *fog-2(q71)* apareados y (N'-P') *fog-2(q71)* vírgenes. d = distal, p = proximal, oo = ovocitos, las flechas indican gránulos P y las cabezas de flecha los gránulos que se forman después de un estrés. (Q') gráfica de barras agrupada en la que se resumen los fenotipos observados en las diferentes

condiciones, los números arriba de cada barra indican el total de animales analizados. (R') Esquema de la gónada de *C. elegans* donde se representan las diferentes regiones observadas en las inmunotinciones, los recuadros rojos señalan las regiones que se muestran aumentadas en la figura.

La formación de agregados grandes de RNPs en la gónada de *C. elegans* se ha observado previamente usando un choque de calor de 34°C en lugar de 30°C [69], por lo que se decidió analizar la localización de VBH-1 a esta temperatura para poder comparar los resultados obtenidos. Se encontró que VBH-1 también se agregaba en el centro de la gónada y ovocitos de los animales incubados a 34°C por 3 h, pero estos gránulos eran de menor tamaño y menos evidentes que los que se forman a 30°C (Figura 13O, P y S, cabezas de flecha). Sin embargo, durante la incubación a 34°C se observó que el porcentaje de animales que formaban agregados de VBH-1 tanto en el centro de la gónada como en ovocitos era mayor (Figura 13Q').

Se han descrito diferentes tipos de complejos ribonucleoproteicos en la línea germinal y embriones de *C. elegans* en condiciones control y de estrés [68-70]. Estos RNPs comparten algunas proteínas, incluida la helicasa de RNA de la familia DEAD CGH-1 (Helicasa Conservada de la Línea Germinal -1) [68-70]. Para determinar si VBH-1 se estaba asociando con estos RNPs descritos previamente, las gónadas diseccionadas también fueron inmunoteñidas usando un anticuerpo anti-CGH-1 [153]. VBH-1 colocalizó con CGH-1 en los gránulos del centro de la gónada, ovocitos y en los gránulos P que aumentaron su tamaño debido al choque de calor tanto a 30°C como a 34°C (Figura 13H-U). Esto sugiere que VBH-1 y CGH-1 se asocian a algunos de los mismos RNPs durante un choque de calor.

Para determinar si VBH-1 y CGH-1 también se agregan en gránulos durante otros tipos de estrés, se ayunaron animales adultos de un día por 5 h y se analizó la localización de VBH-1 por inmunotinciones. En las gónadas de animales ayunados, VBH-1 y CGH-1 se localizan en gránulos en el centro de la gónada (Figura 13V-Y, cabezas de flecha), pero estos gránulos son de menor tamaño que los que se forman durante un choque de calor (Figura 13H-K, cabezas de flecha).

También se observó la formación de gránulos P grandes y de agregados en ovocitos pero en una frecuencia baja (Figura 13V-B' y Q').

La detención de la ovulación induce la formación de gránulos de RNP en la gónada de *C. elegans* [69, 154]. Para analizar la localización subcelular de VBH-1 en estas condiciones se utilizaron animales hermafroditas mutantes *fog-2(q71)*. FOG-2 (Feminización de la Línea Germinal-2) es una proteína que se requiere en la gónada del hermafrodita para promover la espermatogénesis, por lo que los hermafroditas *fog-2(q71)* no producen esperma y su ovulación se detiene hasta que se aparean con un macho [155, 156]. La localización de VBH-1 y CGH-1 se analizó por inmunotinciones de animales adultos de dos días vírgenes y cruzados con machos. Se observó que VBH-1 colocaliza con CGH-1 en gránulos grandes en ovocitos de animales *fog-2(q71)* vírgenes (Figura 13J'-P'), mismos que no se observan en animales *fog-2(q71)* que fueron cruzados (Figura 13C'-I'). También se observaron gránulos en el centro de la gónada pero con una frecuencia menor a la que presentan los animales silvestres durante un choque de calor (Figura 13Q'). Estos resultados juntos muestran que VBH-1 se asocia en gránulos con CGH-1 en la gónada del hermafrodita no sólo durante un choque de calor sino como respuesta a otros tipos de estrés como el ayuno y la detención de la ovogénesis.

Durante la embriogénesis, VBH-1 se expresa de manera difusa en el citoplasma y en gránulos P en los blastómeros germinales [140]. Para analizar si durante un choque de calor VBH-1 también se agregaba durante la embriogénesis se hicieron inmunotinciones de embriones provenientes de hermafroditas sometidos a un choque de calor. A 20°C VBH-1 colocalizó con CGH-1 en gránulos P en los blastómeros germinales de embriones tempranos (Figura 14A-C, flechas). Después de un choque de calor a 30°C, VBH-1 se encontró asociado a gránulos grandes tanto en blastómeros somáticos como germinales (Figura 14D-F, cabezas de flecha). De manera interesante, la localización de CGH-1 no coincide exactamente con la de VBH-1, sino que los gránulos de CGH-1 se encontraban cerca de los de VBH-1 (Figura 14D-F). Estas observaciones muestran que VBH-1 se asocia con agregados de gran tamaño durante la embriogénesis que no colocalizan

perfectamente con CGH-1. Sin embargo, ambos agregados permanecen asociados estrechamente, lo que sugiere una interacción potencial entre ellos. El transgen GFP::VBH-1 presentó un patrón de localización similar al observado para el VBH-1 endógeno en embriones control y sometidos a choque de calor (Figura 11C-D), lo que sugiere que el transgen reproduce la expresión endógena de *vbh-1*.

Se intentó analizar también la localización de VBH-1 y CGH-1 en embriones sometidos a un choque de calor de 34°C; sin embargo, en estas condiciones la mayoría de los embriones presentaban defectos en su morfología y era posible que ya estuvieran muertos.

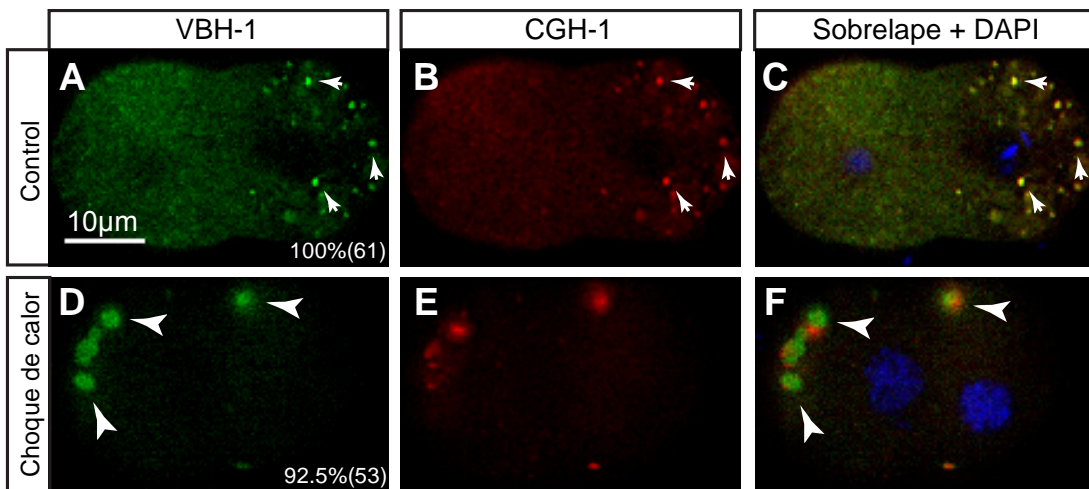


Figura 14. VBH-1 se asocia en gránulos con CGH-1 en los embriones tempranos durante un choque de calor. Embriones obtenidos de animales silvestres diseccionados fueron fijados e inmunoteñidos usando anticuerpos anti-VBH-1, anti-CGH-1 y DAPI para teñir DNA. Embriones de dos células provenientes de animales N2 (A-C) mantenidos a 20°C y (D-F) sometidos a un choque de calor de 30°C por 4 h. El polo posterior del embrión está orientado hacia la derecha. Las flechas indican los gránulos P y las cabezas de flecha los gránulos formados después de un choque de calor. Los números en la esquina inferior derecha indican el porcentaje en el que se observó el fenotipo mostrado y el número de embriones observados entre paréntesis.

6.8 La localización de VBH-1 en los gránulos P depende de sus dominios helicasa y C-terminal

Para determinar el dominio requerido para que VBH-1 se asocie a gránulos se utilizaron animales transgénicos generados por la Dra. Navarro en los que se fusionaron diferentes regiones de VBH-1 a la proteína verde fluorescente para analizar su localización. Los transgenes se generaron clonando el cDNA de las regiones N-terminal (VBH-1 N), C-terminal (VBH-1 C) y el dominio central de helicasa (VBH-1 Heli) de VBH-1 (Figura 15A) en el vector de destino pID3.01B [140]. Este vector contiene el promotor y 3' UTR del gen *pie-1* para inducir la expresión en la línea germinal y el gen codificante de la GFP en el extremo N terminal. Estas construcciones se introdujeron a *C. elegans* por biobalística usando una estrategia estándar [157]. Los animales transgénicos se mantuvieron a 24°C para evitar silenciamiento del transgen en la línea germinal [158], para posteriormente ser diseccionados para su observación en el microscopio de epifluorescencia. Los transgenes tenían una expresión baja en la región distal de la gónada debido a que se usaron las regiones reguladoras de *pie-1*, por lo que sólo se analizaron ovocitos y embriones.

En condiciones control, GFP::VBH-1 Heli y GFP::VBH-1 C se localizaron en el citoplasma y gránulos P de embriones y ovocitos (Figura 15D-E, N-O). Esta localización se asemeja a la observada para VBH-1 endógeno (Figura 13A, B y E, 8A) y para el transgen que contiene el marco abierto de lectura completo de *vbh-1* fusionado a la GFP (Figura 15B y L). Los gránulos formados por GFP::VBH-1 Heli en ovocitos eran consistentemente menos evidentes que los formados por GFP::VBH-1 C y GFP::VBH-1 completo (Figura 15L, N y O). En contraste, GFP::VBH-1 N se expresaba de manera difusa en el citoplasma de ovocitos y embriones sin asociarse a gránulos P (Figura 15C y M). Estas observaciones muestran que en condiciones control el extremo C-terminal de VBH-1 y, en menor medida, su dominio central de helicasa son suficientes para localizar a VBH-1 en gránulos P; mientras que el extremo N-terminal es dispensable para esta localización.

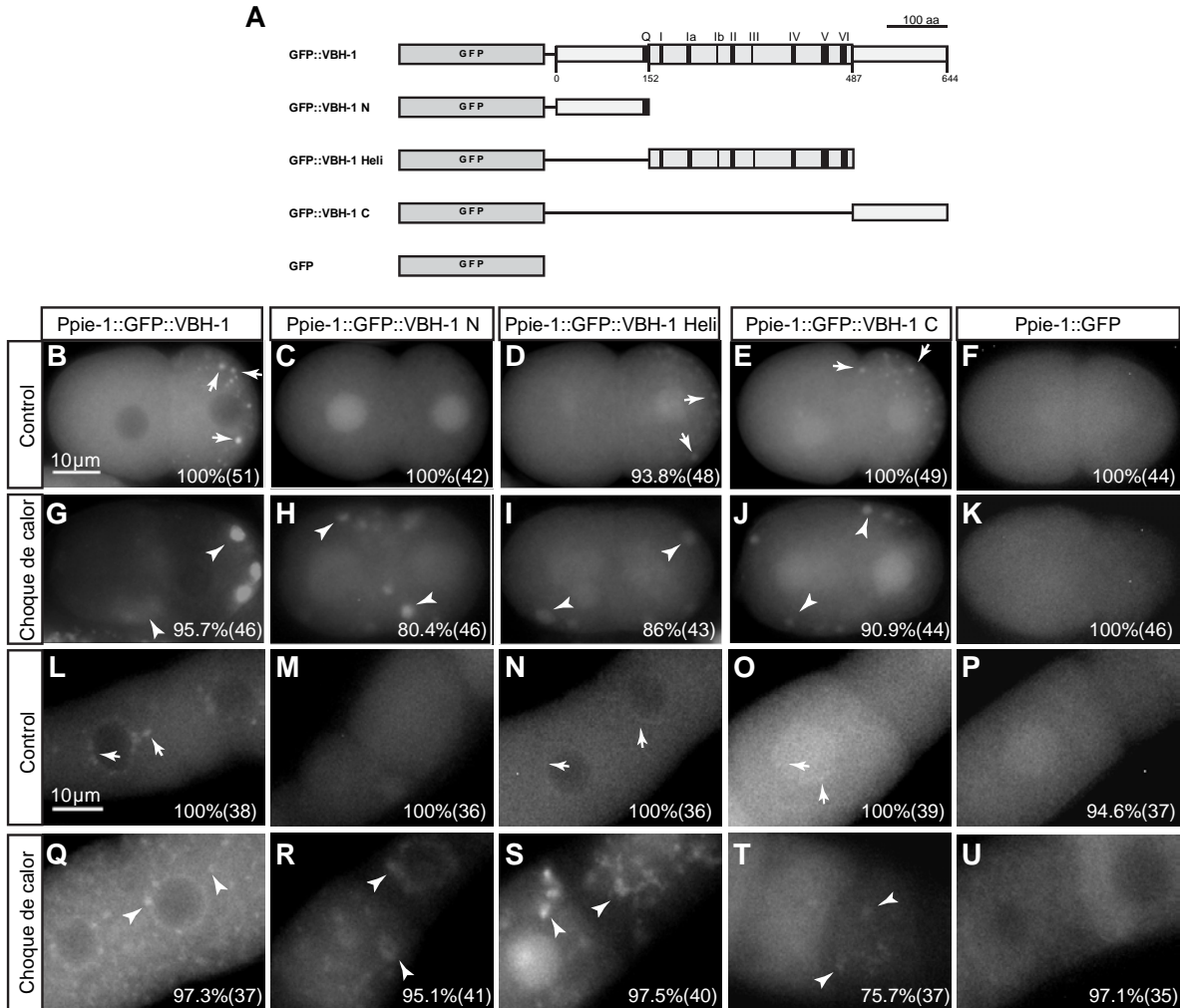


Figura 15. La asociación de VBH-1 con gránulos P depende de sus dominios de helicasa y C-terminal. (A) Diagrama de los transgenes construidos. Embriones y gónadas de animales hermafroditas que expresaban los transgenes indicados se montaron y observaron en un microscopio de fluorescencia. (B-F) Embriones de dos células de animales en condiciones control y (G-K) de choque de calor. (L-P) Ovocitos de animales en condiciones control y (Q-U) durante un choque de calor. Las flechas indican los gránulos P y las cabezas de flecha señalan los gránulos formados después de un choque de calor.

Posteriormente se analizó la localización de los transgenes en ovocitos y embriones de animales sometidos a un choque de calor a 30°C por 4 h. Los tres fragmentos de VBH-1 fusionados a GFP se agregaron en gránulos en blastómeros somáticos y germinales (Figura 15H-J) y en ovocitos (Figura 15R-T), como se

observó para el transgen que contiene a VBH-1 completo (Figura 9G y Q). Esto podría sugerir que la agregación de VBH-1 en estas condiciones no depende de un dominio específico sino que podría depender de múltiples interacciones con otras moléculas. Se encontró también que, durante un choque de calor, los gránulos formados por GFP::VBH-1 C en ovocitos eran menos frecuentes y visibles que los que formaban los otros dos fragmentos probados (Figura 15R-T). Se concluye que durante un choque de calor, el extremo N-terminal y el dominio helicasa de VBH-1 parecen ser suficientes para localizar a VBH-1 en gránulos tanto en ovocitos como embriones, mientras que el extremo C-terminal parece ser menos importante para esto.

Para descartar un artefacto de la GFP en la formación de gránulos, mi compañero de laboratorio Emmanuel Villanueva-Chimal hizo un transgen que no acarrea ningún dominio de VBH-1 (*Ppie::GFP::pie-1 3'utr*) como control negativo. No se observó la asociación de este transgen con gránulos P en condiciones control ni su agregación en gránulos de mayor tamaño durante el estrés (Figura 15F, K, P y U). Esto sugiere que la formación de agregados no se induce por la GFP sino que es el resultado de las propiedades de VBH-1. Se observó una distribución citoplásmica diferente de la GFP (Figura 15U) en los ovocitos de animales sometidos a un choque de calor, que no corresponden con los agregados de VBH-1.

Durante la realización de este trabajo se observó localización nuclear de algunos de los transgenes que contienen diferentes fragmentos de VBH-1 y, en menor medida, de la GFP sola (Figura 15). Ni la proteína VBH-1 endógena ni el transgen que contiene a VBH-1 completo localizaron en el núcleo en estas condiciones (Figura 13A-G, 12A y 13B, F, G, L y Q) por lo que es probable que la localización nuclear del transgen sea inespecífica.

7. Resultados II

7.1 La cantidad de VBH-1 no se modifica durante un choque de calor

Existe la posibilidad de que al tener VBH-1 una función durante el estrés su expresión se incremente en estas condiciones. Para probarlo se hizo un Western Blot en el que se compararon extractos proteicos de animales silvestres adultos de un día mantenidos a 20°C con extractos de animales de la misma edad que fueron sometidos a un choque de calor de 30°C por 4h. Utilizando un anticuerpo anti-VBH-1 y tubulina como control de carga no se encontraron diferencias en la abundancia relativa de VBH-1 entre animales control y los sometidos a un choque de calor (Figura 16). Esto que sugiere que no hay un incremento en la síntesis o estabilidad de VBH1 cuando *C. elegans* es sometido a un choque de calor.

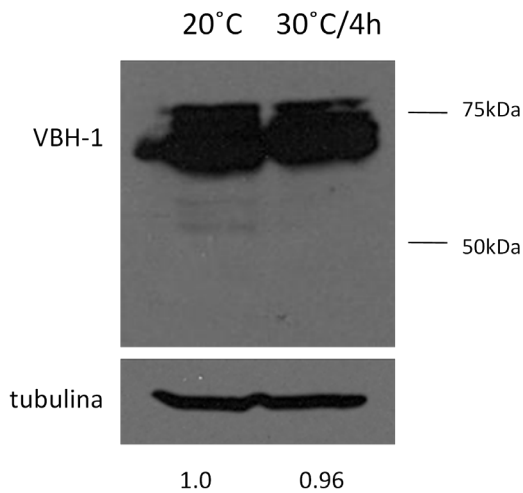


Figura 16. La cantidad de VBH-1 no se modifica durante un choque de calor. Análisis de Western blot de 100 animales silvestres en condiciones control y sometidos a un choque de calor de 30°C por 4 h. Se utilizó un anticuerpo anti-VBH-1 y anti-tubulina como control de carga. El análisis densitométrico se llevó a cabo usando el programa ImageJ.

7.2 VBH-1 tiene una localización nuclear en el intestino de animales mutantes *glp-4(bn2)* durante un choque de calor

VBH-1 es una proteína que se encuentra enriquecida en línea germinal y en estudios de inmunohistoquímica realizados anteriormente se había considerado como específica de este tejido [140] debido probablemente a que la señal en otros tejidos es tan baja que es opacada por la señal en la gónada. Para determinar la

posible ubicación de VBH-1 en el soma se decidió utilizar la mutante *glp-4(bn2)* que, como ya se mencionó previamente, a temperatura restrictiva presenta defectos de proliferación de la línea germinal y se le considera como carente de línea germinal [146]. Esta mutante nos permitió reducir la señal en la gónada para poder apreciar su posible localización en el soma.

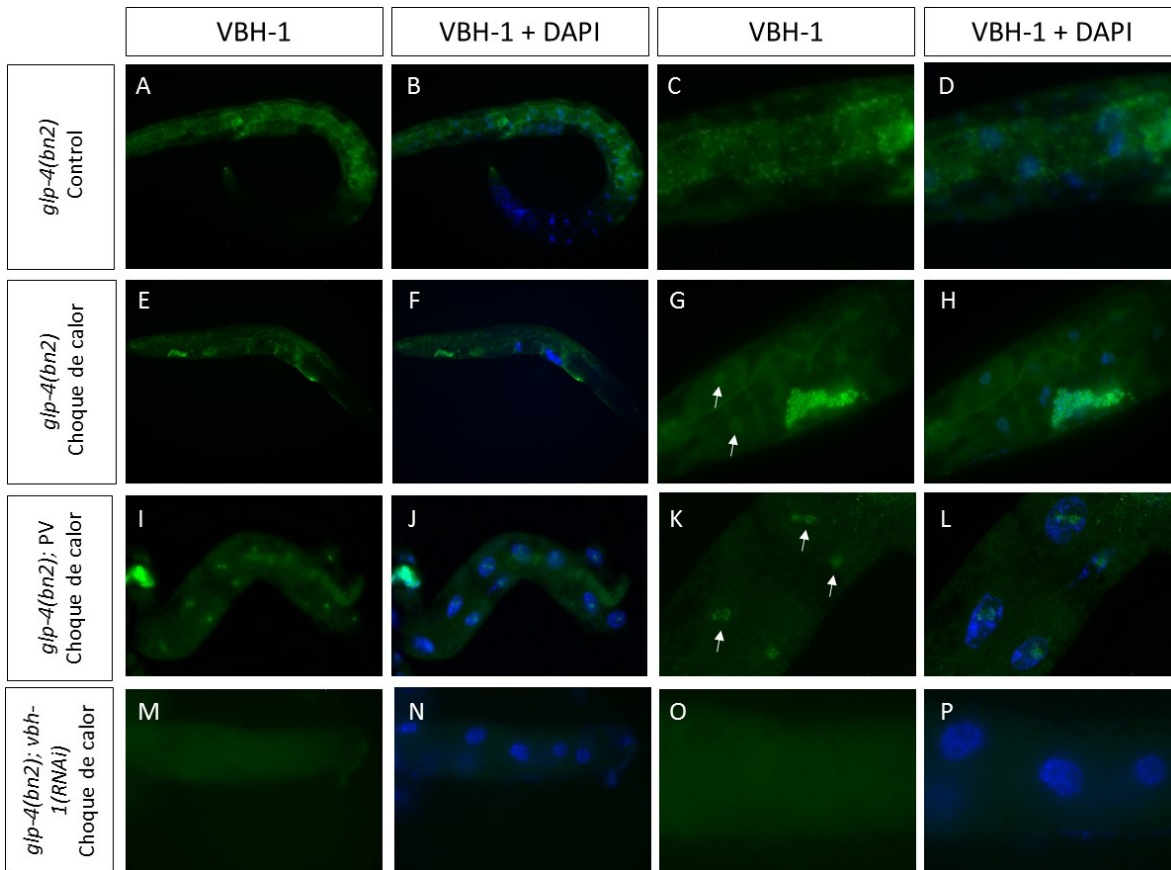


Figura 17. VBH-1 localiza en los núcleos del intestino durante un choque de calor. Animales *glp-4(bn2)* en condiciones control y de choque de calor a 30°C por 4h fueron inmunoteñidos usando un anticuerpo anti-VBH-1 y DAPI para teñir DNA. (A-D) Animales *glp-4(bn2)* completos en condiciones control y (E-H) sometidos a un choque de calor. (I-L) Intestinos disecados de animales control y (M-P) *vbh-1(RNAi)* sometidos a un choque de calor. Las flechas señalan los núcleos de los intestinos donde se observa localización de VBH-1.

En animales *glp-4(bn2)* mantenidos a temperatura control, VBH-1 parece estar difuso en el citoplasma de las células somáticas (Figura 17A-D), después de un choque de calor VBH-1 localiza en los núcleos del intestino tanto en las tinciones

de animales completos (Figura 17E-H) como en la de intestinos disecados (Figura 17 I-L). Para corroborar que esta señal es específica se analizó si la tinción permanecía en animales *vbh-1(RNAi)*. No se encontró señal en los núcleos del intestino en animales *vbh-1(RNAi)* (Figura 17M-P) lo que sugiere que la localización nuclear de VBH-1 en animales *glp-4(bn2)* es específica.

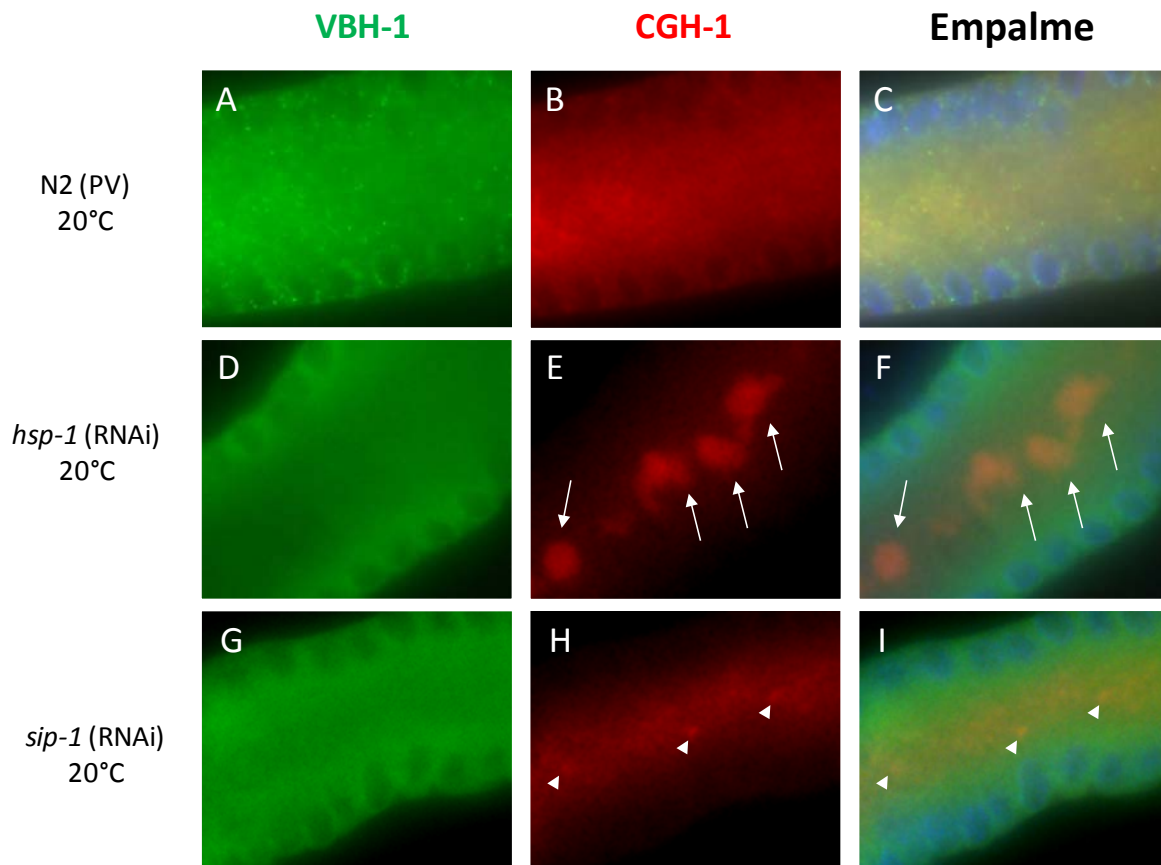


Figura 18. CGH-1 se agrega en gránulos cuando se silencia a *hsp-1* y *sip-1*. Animales adultos RNAi en los genes indicados se disecaron, fijaron y tiñieron usando anticuerpos contra VBH-1 y CGH-1, y DAPI para teñir núcleos. Se muestran el centro de la gónada de animales (A-C) control, (D-F) *hsp-1(RNAi)* y (G-I) *sip-1(RNAi)* en condiciones control. Las flechas señalan los gránulos de gran tamaño y las cabezas de flecha los gránulos pequeños observados en el centro de la gónada de animales *hsp-1(RNAi)* y *sip-1(RNAi)*, respectivamente.

7.3 Localización de VBH-1 cuando se silencia a *hsp-1* y *sip-1*

Se estudió la localización de VBH-1 cuando se silenciaba a *hsp-1* y *sip-1*. Para esto, se hizo RNAi por alimentación en estos genes y se analizó mediante inmunotinciones la localización de VBH-1 y del marcador CGH-1 en condiciones control y de choque de calor. En animales *hsp-1(RNAi)* mantenidos a temperatura control se observa que CGH-1 forma agregados de gran tamaño en el centro de la gónada (Figura 18E-F, flechas) que son similares a los observados en animales sometidos a un choque de calor. En estas mismas condiciones, sin embargo, VBH-1 no modifica su localización (Figura 18D). En los animales *sip-1(RNAi)* se observa algo similar, la localización de VBH-1 parece no modificarse mientras que CGH-1 forma agregados en el centro de la gónada (Figura 18G-I, cabezas de flecha) aunque de menor tamaño a los formados en animales cuando se silencia a *hsp-1* (Figura 18E). Se sabe que Hsp70 regula de manera negativa la formación de gránulos de estrés [159]. Esto lo lleva a cabo impidiendo que la agregación de la proteína TIA que nuclea la formación de dichos gránulos, de manera que cuando no está presente Hsp70 se forman gránulos de estrés sin necesidad de ningún otro estímulo. Esto sugiere que VBH-1 no se agrega en estas estructuras o que necesita un estímulo diferente para asociarse a estos gránulos, tal como podría ser la presencia del mRNA de estas chaperonas.

Después de un choque de calor a 30°C durante 4 h VBH-1 y CGH-1 no modifican su localización con respecto al control en animales *hsp-1(RNAi)*, ya que ambas proteínas localizan en gránulos de gran tamaño en el centro de la gónada (Figura 19D-F). Por el contrario, el silenciamiento de *sip-1* tiene como efecto que los gránulos de VBH-1 y CGH-1 en la gónada sean de un tamaño considerablemente menor que los que se forman en animales control (Figura 19G-I). Esto sugiere que el mRNA de *sip-1* o su proteína son importantes para la formación de estos agregados en la gónada.

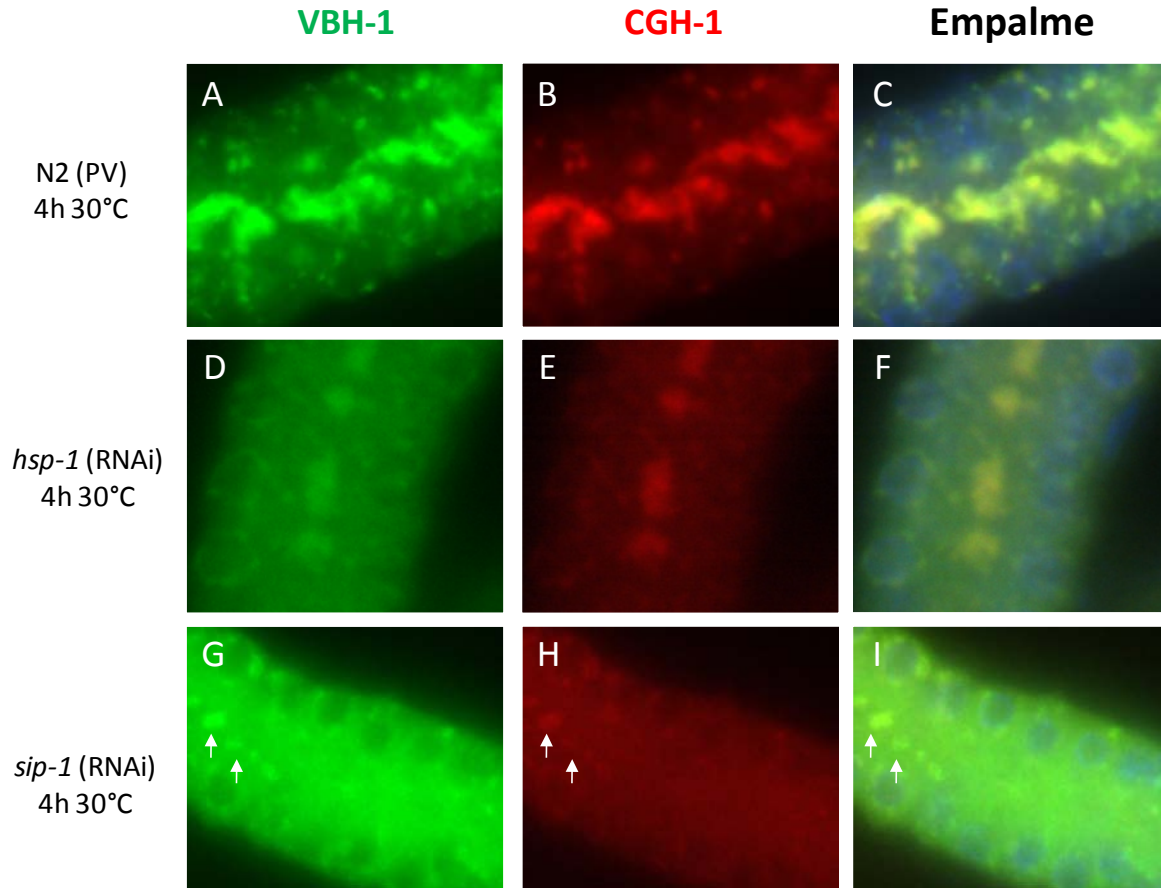


Figura 19. El silenciamiento de *sip-1* afecta la formación de gránulos de VBH-1 y CGH-1 durante un choque de calor. Animales adultos RNAi fueron diseccionados, fijados y teñidos usando anticuerpos contra VBH-1 y CGH-1, y DAPI para teñir núcleos. Se muestran el centro de la gónada de animales (A-C) control, (D-F) *hsp-1(RNAi)* y (G-I) *sip-1(RNAi)* sometidos a un choque de calor. Las flechas señalan los gránulos pequeños observados en el centro de la gónada de animales *sip-1(RNAi)*.

7.4 VBH-1 parece no sufrir O N-acetilglucosaminación

La O N-Acetilglucosaminación (O-GlcNAc) es una modificación sufrida por algunas proteínas presentes en gránulos de estrés y se sabe que impedir esta modificación tiene un efecto negativo en la formación de estos gránulos [160]. Haciendo un análisis *in silico* usando el programa YinOYang 1.2 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/YinOYang/>) se encontraron sitios predichos para

VBH-1 que podrían sufrir esta modificación (Figura 20). Además en un Western Blot usando un anticuerpo anti-VBH-1 se observan varias bandas de un peso superior al predicho para VBH-1 [140], lo que sugiere que sufre modificaciones postraduccionales.

```

MNTQYYANHNHGQQPPQQQQGQGWSSSYSQSQSNMPAGGVFYNGFANGTSPSNNGSSGYNNFADSGNGFNKRYSGAESNQ 80
WGGAPAEYSESNLFRHTDSGINFDKYENIPVEVSGDSVPAAIEHFNEAGFGPAVMENVNRSGYSKPTPVQKHSIPTLLAN 160
RDLMSCAQTGSGKTA AFLLP I IQHILAGGPD MVKPPAFTNGRRTYYP CALVLSPTRELAIQIHKEATKFSYKSNIQTAIL 240
YGGRENYRDQVNRLRAGTHIL IATPGRLIDIIEQGF IGLAGCRYLVLDEADRMLDMGFEPQIRKIVGQGMPPKPARATAM 320
FSATFPKEIQVLAKDFLKDNYIFLAVGRVSGTSENIEQRLLWVNEKRSNLMEILMNEHSENVLVVFVETKRGANELAY 400
FLNRQQIRSVSIHGDLKQIERERNLELFRSGQCPILVATAVAARGLDIPNVRHVINYDLPGDSDEVVHRIGRTGRCGNLG 480
IATSFNDKNRGIGRDLKNLIVESNQEVPEWLHQVAAEGRIGGGQRGGNRRFGATDYRVGRGGGSGFGGNFSNYNSGGAT 560
GGFGSGPAYGGSFGGGAPRRPFTNGGFGAHSLSLSTSNSSGGGGGFSGPRRGGFNSGMNRQGGGGGGFYSNPGQAPIDHWQ 640
APQA
    
```

Figura 20. Sitios de O-GlcNAc predichos para VBH-1. Secuencia de aminoácidos de VBH-1 en la que se señalan enmarcados en negro los residuos predichos con el programa YinOYang como posibles sitios de O N-Acetilglucosaminación.

C. elegans sólo posee en su genoma una O N-Acetilglucosamintransferasa (OGT-1) y una O N-acetilglucosaminidasa (OGA-1), las enzimas responsables de transferir y eliminar el grupo GlcNAc de las proteínas (<http://www.wormbase.org>, release WS236, 8 de mayo del 2013). Para saber si VBH-1 sufría esta modificación se hizo RNAi en *ogt-1* y *oga-1* y se analizó mediante Western Blot los extractos proteicos de estos animales tanto en condiciones control como en choque de calor comparando su patrón de bandas con la de animales control. No hubo una diferencia en ninguna de las condiciones, lo que sugiere que VBH-1 no es O-GlcNAcado en condiciones control ni en choque de calor (Figura 21).

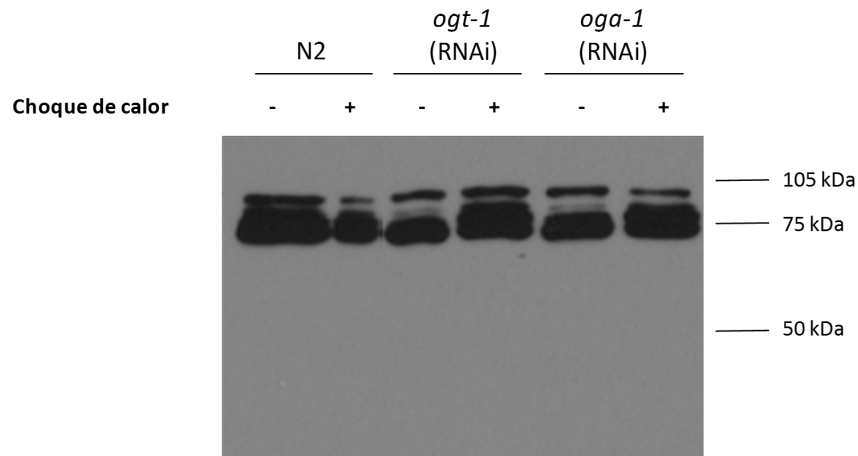


Figura 21. VBH-1 no se glucosamina. Western Blot de VBH-1 utilizando extractos proteicos provenientes de animales control, *ogt-1(RNAi)* y *oga-1(RNAi)* crecidos a temperatura control o sometidos a un choque de calor. Se utilizó un anticuerpo anti-VBH-1.

7.5 VBH-1 podría ser fosforilada

Una modificación postraducciona que podría sufrir VBH-1 y explicaría la presencia de numerosas bandas cuando se analiza mediante Western Blot es la fosforilación. Para determinar si VBH-1 se fosforila se incubaron extractos proteicos de animales silvestres adultos en presencia de fosfatasa alcalina y se comparó el patrón de bandas con el de extractos proteicos no tratados con fosfatasa alcalina. Se encontró una disminución en la cantidad de bandas observadas en los extractos tratados con fosfatasa, así como la desaparición de las bandas de mayor peso molecular y la aparición de bandas de menor peso (Figura 22). Esto sugiere que VBH-1 podría ser fosforilada en algunos residuos.

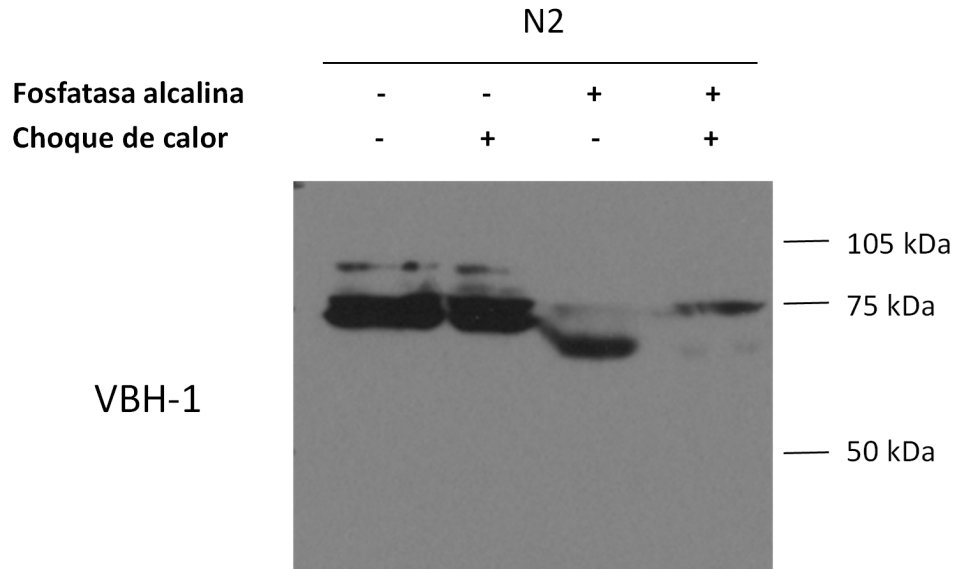


Figura 22. VBH-1 podría ser fosforilado. Western Blot utilizando extractos proteicos tratados y sin tratar con fosfatasa alcalina provenientes de animales silvestres en condiciones control y de choque de calor. Se utilizó un anticuerpo anti-VBH-1.

8. Discusión general

En este trabajo se analizó el papel de la helicasa de RNA VBH-1 durante diferentes condiciones de estrés. Se observó que VBH-1 es importante para la supervivencia de *C. elegans* cuando éste se expone a un choque de calor o a un estrés oxidante. Los resultados sugieren que una potencial expresión somática de *vbh-1* podría ser al menos parcialmente responsable de este efecto protector durante el estrés. Se encontró que los transcritos de *sip-1* y *hsp-1*, que codifican para dos proteínas de choque de calor, estaban en niveles bajos en animales *vbh-1(RNAi)*, lo que sugiere que podrían ser regulados directa o indirectamente por VBH-1. Además, se demostró que LAF-1 (una helicasa con alta homología a VBH-1) también es importante para la supervivencia de *C. elegans* durante el estrés

Además se observó que, en diferentes condiciones de estrés, VBH-1 forma gránulos P de gran tamaño y se agrega en el citoplasma de embriones tempranos, el centro de la gónada y ovocitos. Tratando de definir los dominios responsables de su localización, se encontró que su dominio central de helicasa y el C-terminal son suficientes para que se asocie a gránulos P, mientras que la agregación de VBH-1 durante un choque de calor parece no depender de un sólo motivo. Aunque sus dominios N-terminal y helicasa parecen ser más importantes que el C-terminal para esta localización.

8.1 VBH-1 protege a *C. elegans* del estrés regulando a los transcritos de los genes de respuesta a estrés *sip-1* y *hsp-1*

En este trabajo se observó que el silenciamiento de *vbh-1* tiene un efecto negativo en la supervivencia de animales durante el estrés por choque de calor y oxidante. La función protectora de VBH-1 podría darse a través de regular a los mRNA de las proteínas de choque de calor SIP-1 y HSP-1 puesto que la abundancia de los transcritos de *sip-1* y, en menor medida, de *hsp-1* se encuentra disminuida en animales *vbh-1(RNAi)*. Además, el silenciamiento de *sip-1* por RNAi afecta negativamente la supervivencia de *C. elegans* durante un choque de calor de una manera similar a la que se observa en animales *vbh-1(RNAi)*. En contraste, los animales *hsp-1(RNAi)* no fueron más sensibles a un choque de calor que los animales control, lo que podría sugerir que *hsp-1* no se requiere para la respuesta ante este estrés. Sin embargo, también es posible que el silenciamiento de *hsp-1* por RNAi no hubiera sido suficiente para erradicar por completo la función de esta proteína durante el estrés.

Los homólogos de VBH-1 en otros organismos están involucrados en la regulación de la expresión genética a través de la estabilización y traducción de mRNA [82, 128], por lo que es posible que VBH-1 regule la estabilidad y/o traducción de los transcritos de *sip-1* y *hsp-1*. A diferencia de otros genes como *hsp-1* que codifican para proteínas de choque de calor [152], la transcripción de *sip-1* no se incrementa durante un choque de calor [151]. Sin embargo, sí se incrementa su

traducción en estas condiciones [151], lo que sugiere que el mRNA de *sip-1* necesitaría de una proteína como VBH-1 para protegerlo de la degradación y promover su traducción durante el estrés.

En *D. melanogaster*, el homólogo de VBH-1 Vasa regula positivamente la traducción de mRNA que poseen regiones de poli(U) en su 3' UTR [103] y el mRNA de *hsp-1* tiene una región con esta característica en su 3' UTR (Figura 23). Esto sugiere que VBH-1 podría regular la traducción de esta proteína si el mismo mecanismo de regulación traduccional está conservado en VBH-1.

```
5' UUAUUUAUCUUCUUUUUUUGAUCCGGUUUUUUAUUUUAUUCUCUUUUCCCCAAACCC
  CUAUAUAAUGAUCUUCGCCCCUCCUGCACCCACCCAAACCGUUUUUUGGCCUAG
  AAUGGUGAACAAUUAAAAUUAAAAUAAUCC 3'
```

Figura 23. El 3' UTR del mRNA de *hsp-1* tiene regiones de poli(U). 3' UTR del mRNA de *hsp-1*, las Uridinas están señaladas en color gris.

DDX3 promueve la traducción de genes involucrados en la respuesta a estrés que poseen IRES [161]. El mRNA de *sip-1* no tiene IRES predichos en su 5' UTR [162] mientras que el 5' UTR de *hsp-1* es de sólo 5pb (<http://www.wormbase.org>, release WS236, 8 de mayo, 2013) por lo que no es probable que VBH-1 regule la traducción de estos transcritos por un mecanismo similar. Sin embargo, *hsp-3* en *C. elegans* [163] y genes que codifican para Hsp70 en *D. melanogaster* [164] y humano [165] sí tienen IRES.

Otra posibilidad es que VBH-1 controle indirectamente la estabilidad de los mRNA de *sip-1* y *hsp-1* mediante la regulación de otro gen, aunque la regulación de la expresión de proteínas de choque de calor por helicasas relacionadas con VBH-1 parece estar conservada en otros organismos. Por ejemplo, en *D. melanogaster*, Vasa coimmunoprecipita con los transcritos de 8 chaperonas, dos de las cuales pertenecen a las mismas familias que SIP-1 y HSP-1, i.e., alfa-cristalina y Hsp70 [103]. Otro ejemplo lo constituye la única helicasa de RNA de la familia DEAD que es codificada por el genoma de la cyanobacteria *Synechocystis*, CrhR, que regula

la estabilidad de los mRNA de las chaperoninas *groES*, *groEL1* y *groEL2* que se requieren para una respuesta adecuada al estrés [166].

VBH-1 es importante para la inducción de apoptosis que ocurre tanto en condiciones control como de estrés [141], lo que podría apuntar a que esta proteína tiene varios blancos durante la respuesta a estrés en *C. elegans* para asegurar la supervivencia del animal, mantener la calidad de los ovocitos y preservar la línea germinal.

LAF-1, el parólogo de VBH-1, también es importante para la supervivencia durante el estrés y para la acumulación de los mRNA de *hsp-1* y, en menor medida, de *sip-1*. Esto podría sugerir que ambas proteínas tienen una función redundante durante el estrés; sin embargo, no se observó un incremento en la sensibilidad al estrés cuando se silenciaron ambos genes simultáneamente (Figura 8). Los resultados sugieren entonces que ambos genes no son redundantes, pero dado que el silenciamiento de genes mediante RNAi no es tan eficiente como una mutación no podemos descartar lo contrario.

8.2 La expresión somática de *vbh-1* podría proteger a *C. elegans* del estrés

Utilizando la mutante *glp-4(bn2)*, que posee una línea germinal muy reducida, se observó que los animales *glp-4(bn2)* son más resistentes a un choque de calor que los animales silvestres (Figuras 8 y 10). De acuerdo con esto, se ha reportado anteriormente que los animales *glp-4(bn2)* muestran una mayor supervivencia cuando se exponen a anoxia o a patógenos bacteriales Gram negativos. Esto sugiere que las mutantes sin línea germinal podrían tener una mayor resistencia al estrés.

También se encontró que la expresión somática de *vbh-1* es importante para la supervivencia de *C. elegans* durante el estrés ya que su silenciamiento por RNAi en mutantes deficientes en su línea germinal los hace más sensibles al choque de calor. No podemos descartar que la expresión en la línea germinal de *vbh-1* también se requiera para la supervivencia en condiciones de estrés puesto que: 1) las

diferencias en las supervivencias entre animales control y *vbh-1(RNAi)* son menores en mutantes *glp-4(bn2)* que en animales silvestres, 2) a la temperatura restrictiva los animales *glp-4(bn2)* retienen alrededor de 12 núcleos germinales [146] y 3) se sabe que la línea germinal puede enviar señales al soma y controlar la longevidad [167-169].

Previamente se había reportado que VBH-1 no se detectaba en un Western Blot utilizando animales *glp-4(bn2)* crecidos a temperatura restrictiva [140] por lo que la observación de que su silenciamiento en esta misma cepa tenía un efecto negativo en su supervivencia durante el estrés fue inesperada. Sin embargo, en este mismo reporte se detectó en un Northern Blot la expresión del mRNA de *vbh-1*, aunque en una cantidad baja por lo que se había considerado que su expresión estaba restringida a la línea germinal [140]. Considerando nuestros resultados, es posible que exista una expresión baja de *vbh-1* en tejidos somáticos que no pudo detectarse en un Western Blot, o bien que VBH-1 sufra modificaciones postraduccionales en el soma que impiden que pueda ser reconocido por nuestro anticuerpo.

El transgen *Pvbh-1::GFP::vbh-1::vbh-1 3' utr* que se generó para analizar la localización de VBH-1 se expresa, además de en la línea germinal, en el intestino; un tejido en el que se sabe que se expresan proteínas de respuesta a estrés [13]. Específicamente, GFP::VBH-1 tenía un enriquecimiento en el polo apical de las células intestinales en donde se expresan, durante un estrés, las chaperonas de la familia HSP16 que pertenecen, junto con SIP-1, al grupo de chaperonas pequeñas [170]. Después de un choque de calor, el transgen mantenía su localización en el polo apical de las células intestinales aunque parecía estar un poco más difuso. Es posible que esta diferencia en su localización esté relacionada con el papel protector de VBH-1 durante el estrés. Sin embargo, no podemos descartar que la localización somática de VBH-1 sea un artefacto del transgen y no refleje la localización de la proteína endógena.

8.3 VBH-1 se asocia en gránulos con CGH-1 en gónadas y embriones en condiciones de estrés

VBH-1 se localiza de manera difusa en el citoplasma de las células germinales y asociado a gránulos P en condiciones óptimas de crecimiento [140]. En este trabajo se mostró que durante un estrés VBH-1 se agrega en gránulos en el centro de la gónada y ovocitos, donde colocaliza con la helicasa CGH-1. CGH-1 se asocia con diferentes agregados RNP que se forman en la gónada de *C. elegans* durante el estrés [67-70] por lo que el hecho de que colocalice con VBH-1 en estas condiciones sugiere que estas dos proteínas podrían encontrarse en los mismos agregados RNP. Resultados similares se han observado para la proteína homóloga a VBH-1 DDX3 que se asocia a gránulos de estrés cuando se sobreexpresa o en condiciones de estrés [134, 171, 172].

VBH-1 también se asoció en agregados grandes en blastómeros somáticos y germinales durante la embriogénesis temprana después de un choque de calor. En condiciones control, VBH-1 se asocia en gránulos P por lo que podría pensarse que durante un estrés éstos incrementan su tamaño, tal y como se observa en la gónada. Sin embargo, los agregados en los blastómeros somáticos no pueden ser gránulos P ya que estos se heredan asimétricamente a los blastómeros germinales y los pocos que permanecen en blastómeros somáticos se desensamblan y degradan por autofagia [173, 174]. Esto sugiere que VBH-1 se asocia a diferentes agregados RNP durante un estrés.

Una diferencia importante entre los agregados formados en la gónada y los que se observan en embriones tempranos es que en estos últimos VBH-1 no colocaliza exactamente con CGH-1 sino que sólo se superponen parcialmente. Dependiendo de las proteínas con las que interactúa, CGH-1 puede estabilizar el mRNA y reprimir su traducción o participar en la degradación del mRNA [67]. Podría pensarse que durante el estrés VBH-1 y CGH-1 comparten un papel en la línea germinal, mientras que después de la fertilización estas proteínas tienen funciones diferentes.

Los gránulos formados en condiciones de choque de calor por VBH-1 son de menor tamaño cuando se silencia a *sip-1* por RNAi. El hecho de que también se vean reducidos los agregados de CGH-1 sugiere que el mRNA de *sip-1* o su proteína podría ser importante para la formación de estos gránulos en la gónada de *C. elegans*.

El silenciamiento de *hsp-1* y *sip-1* no tuvo efecto en la localización de VBH-1 en condiciones control. Sin embargo, se observó que CGH-1 formaba agregados en estas condiciones. La formación de gránulos de estrés en mamíferos depende de la agregación de la proteína TIA que está mediada por sus motivos tipo prion [175]. En condiciones control, la chaperona HSP70 se une a este motivo modificando su conformación e impidiendo que se agregue [159]. En ausencia de Hsp70 o durante un estrés, TIA queda libre para formar los gránulos de estrés. Esto explicaría por qué el silenciamiento de *hsp-1* induce la formación de agregados. SIP-1 no pertenece a las Hsp70 pero es probable que también se necesite, aunque en menor medida, para evitar que TIA o algún otro factor nucleador de gránulos adquiera una conformación que le permita agregarse. Por otro lado, la ausencia de VBH-1 en estos agregados sugiere que VBH-1 requiere de una señal diferente a CGH-1 para agregarse.

Se observó que el dominio conservado de helicasa y el C-terminal de VBH-1 se asocian en gránulos P en ovocitos y embriones tempranos, lo que sugiere que ambas regiones son las responsables de localizar a VBH-1 en estas estructuras. Esto podría indicar que la localización de VBH-1 en gránulos P podría depender de su unión al RNA, ya que las dos regiones contienen motivos de unión al RNA. El fragmento C-terminal tiene tres motivos RGG ricos en glicina [140, 176], mientras que el dominio de helicasa tiene a los motivos Ia, Ib, IV y V [128].

Tres fragmentos diferentes de VBH-1 que abarcan la totalidad de la proteína se asociaron en gránulos durante un choque de calor en ovocitos y embriones tempranos. Este descubrimiento fue inesperado ya que sugiere que no hay un motivo único que localice a VBH-1 en agregados durante el estrés sino que su localización podría ser producto de varias interacciones con otras moléculas. Sin

embargo, la región C-terminal de VBH-1 tuvo una menor eficiencia para formar agregados, lo que sugiere que los fragmentos N-terminal y helicasa de VBH-1 son más importantes para su agregación durante el estrés.

8.4 VBH-1 tiene una localización nuclear en animales *glp-4(bn2)* durante un choque de calor

Los tres fragmentos de VBH-1 que se fusionaron a la proteína reportera GFP presentaron una localización nuclear en embriones tempranos y ovocitos, sin embargo, el transgen que contiene la proteína VBH-1 completa y se expresa con el mismo promotor que los fragmentos (*Ppie-1*) no tiene una localización nuclear. El transgen que contiene únicamente la proteína GFP se observó en los núcleos y en el citoplasma de embriones tempranos. Además, mediante inmunotinciones no se encontró a la proteína VBH-1 endógena en el núcleo de ovocitos ni de embriones de animales silvestres tanto en condiciones control como de estrés (Figura 13 y 14).

En humanos, DDX3, puede localizar en el núcleo para regular la transcripción de IFN β , E-Cadherina y p21^{waf} uniéndose a factores transcripcionales y además regula la exportación al citoplasma de algunos transcritos [125]. Sin embargo, a diferencia de otros miembros de la familia de Belle/DDX3 [119], VBH-1 no tiene una señal de localización nuclear predicha por lo que estas observaciones sugieren que la localización nuclear de los transgenes podría no ser específica.

Cuando se hicieron inmunotinciones en animales *glp-4(bn2)* para detectar la posible expresión de VBH-1 en células somáticas, se observó que VBH-1 tenía una localización nuclear durante un choque de calor. El factor transcripcional SKN-1 (Skinhead -1) de *C. elegans* presenta un comportamiento similar en animales silvestres en condiciones de estrés, modificando su localización citoplásmica y entrando al núcleo para promover la transcripción de algunos genes de respuesta a estrés [177]. Los animales *glp-4(bn2)* son más resistentes al estrés por lo que es posible que VBH-1 lleve a cabo funciones diferentes en estas mutantes para protegerlas del estrés.

8.5 VBH-1 sufre modificaciones postraduccionales

Se encontró que VBH-1 se fosforila, lo que explica la presencia de múltiples bandas en un Western Blot de animales adultos [140]. La fosforilación de Vasa en *D. melanogaster* en respuesta a un punto de control meiótico en la ovogénesis conduce a su inactivación [178]. En humanos, la cinasa TBK-1 fosforila en 11 residuos a DDX3 y este proceso es necesario para que promueva la transcripción de IFN β [179]. Es probable que la fosforilación de VBH-1 en diferentes residuos modifique su afinidad por diferentes moléculas afectando así su función.

En los extractos proteicos tratados con fosfatasa se observaron dos bandas principales que sugieren que VBH-1 tal vez sufra otras modificaciones postraduccionales además de la fosforilación. La metilación de algunas argininas está altamente conservado en los homólogos de Vasa/DDX4 en diferentes organismos y se cree que es importante para su función en la línea germinal [180]. Aunque no se analizó la metilación de VBH-1, es probable que sufra también esta modificación.

Una observación interesante es la diferencia que existe en la abundancia de las dos bandas observadas. En los extractos de animales en condiciones control la banda más abundante es la de menor peso molecular mientras que en condiciones de choque de calor la banda más pesada es la predominante. Esto podría sugerir que el choque de calor promueve modificaciones postraduccionales diferentes a las que ocurren en animales control.

9. Conclusiones

VBH-1 y su gen parólogo LAF-1 tienen un papel importante para la supervivencia de *C. elegans* durante el estrés. Este papel es adicional al que llevan en condiciones óptimas de crecimiento [140, 141, 144] e involucra la estabilidad de los mRNAs de las proteínas de choque de calor *hsp-1* y *sip-1*. Nuestra evidencia sugiere que la regulación de la supervivencia durante el estrés parece depender de la expresión somática de *vbh-1*, posiblemente en el intestino.

VBH-1 podría tener también un papel importante en la línea germinal y embriones durante un estrés. En diferentes condiciones de estrés VBH-1 formó agregados que colocalizaron con la helicasa CGH-1 por lo que podrían ser gránulos de estrés o cuerpos de procesamiento. Estos agregados de RNP se forman o incrementan su tamaño en condiciones de estrés y se cree que tienen un papel importante para combatir el estrés regulando la estabilidad y traducción de mRNAs.

La participación de VBH-1 en diferentes procesos podría conseguirse a través de su unión con diferentes proteínas y mRNAs. Modificaciones postraduccionales podrían permitirle a VBH-1 discriminar entre las diferentes moléculas a las que se une.

10. Perspectivas

- Analizar si VBH-1 se puede unir in vitro a los mRNAs de *hsp-1* y *sip-1*.
- Expresar transgenes de GFP fusionadas a cada una de las chaperonas y analizar su expresión cuando se silencia a *vbh-1*.
- Identificar otros mRNA candidatos a ser regulados por VBH-1 durante el estrés.
- Estudiar la función de VBH-1 en la línea germinal y durante la embriogénesis en diferentes condiciones de estrés.

11. Materiales y Métodos

11.1 Mantenimiento de *C. elegans*

Los animales se mantuvieron utilizando técnicas estándar [5]. En este trabajo se utilizaron las siguientes cepas:

Cepa	Genotipo	Referencia
Bristol N2	Silvestre	[181]
CB4108	<i>fog-2(q71) V</i>	[156]
SS104	<i>glp-4(bn2) I</i>	[146]
HT1593	<i>unc-119(ed3) III</i>	[182]
EG6699	<i>[ttTi5605 II; unc-119(ed3) III; oxEx1578]</i>	[148]
RN007	<i>xmSi05 [Pvbh-1::GFP::vbh-1::vbh-1 3'utr, Cb unc-119(+)] II</i>	[183]
RN008	<i>xmSi06 [Pvbh-1::GFP::vbh-1::vbh-1 3'utr, Cb unc-119(+)] II</i>	[183]
GFP::VBH-1	<i>Ppie-1::GFP::vbh-1::pie-1 3'utr</i>	[140]
GFP::VBH-1 N	<i>Ppie-1::GFP::vbh-1 N::pie-1 3'utr</i>	[183]
GFP::VBH-1 Heli	<i>Ppie-1::GFP::vbh-1 heli::pie-1 3'utr</i>	[183]
GFP::VBH-1 C	<i>Ppie-1::GFP::vbh-1 C::pie-1 3'utr</i>	[183]
RN013	<i>xmSi24 [Ppie-1::GFP::pie-1 3'utr]</i>	[183]

Tabla 2. Cepas utilizadas para esta tesis.

11.2 Sincronización de animales

Se colectaron animales adultos grávidos utilizando amortiguador M9 1X (42 mM Na₂HPO₄, 22 mM KH₂PO₄, 86 mM NaCl, 1 mM MgSO₄) y se lavaron con M9 1X

para quitar la mayor cantidad posible de bacteria. Posteriormente se agregaron 3/4 de volumen de una solución recién preparada de cloro comercial : NaOH 5N (2:1). La mezcla se agitó en un vórtex durante 5 min o hasta que los cuerpos de los gusanos dejaron de ser visibles a contra luz. La muestra se centrifugó inmediatamente a baja velocidad por 30 s y se lavó tres veces con amortiguador M9. Después del último lavado se retiró la mayor cantidad de amortiguador y se pasaron los embriones a un vaso de precipitados de 5 ml. Posteriormente se agregaron 3 ml de amortiguador M9, se tapó el vaso con parafilm y se incubó a 25°C durante la noche para permitir que eclosionaran las larvas L1.

11.3 Generación de plásmidos para RNAi

Los plásmidos para hacer RNAi en *vbh-1* y *laf-1* se generaron amplificando por PCR los fragmentos que corresponden a los nucleótidos 1610-1895 del marco abierto de lectura de la isoforma a de *vbh-1* y los nucleótidos 125-308 del marco abierto de lectura de *laf-1* (<http://www.wormbase.org>, release WS236, 8 de mayo del 2013). Los productos de PCR se purificaron y digirieron para *vbh-1* con BgIII y XbaI y con EcoRI y KpnI para *laf-1* y se clonaron en pPD129.36 previamente digerido con las mismas enzimas para generar pPD129.36(*vbh-1*) y pPD129.36(*laf-1*). Este plásmido posee dos promotores T7 en sentido opuesto para generar RNA de doble cadena.

Para hacer doble RNAi en *vbh-1* y *laf-1* se digirió el plásmido pPD129.36(*laf-1*) con Tfil y se purificó. El plásmido linearizado se incubó con dNTPs y el fragmento Klenow para producir un borde romo y posteriormente se digirió con PciI. Además, se digirió con Pvull y PciI al plásmido pPD129.36(*vbh-1*) obteniendo así el fragmento de *vbh-1* flanqueado por dos promotores T7. Posteriormente se subclonó este fragmento en el plásmido pPD129.36(*laf-1*) previamente digerido para generar un plásmido que contiene los fragmentos de *laf-1* y *vbh-1* cada uno flanqueado por 2 promotores T7. Todos los plásmidos se confirmaron por secuenciación antes de ser utilizados.

En el caso del RNAi de *sip-1*, *hsp-1*, *oga-1* y *ogt-1* se obtuvieron los plásmidos de una biblioteca de RNAi (Open Biosystems) [184] y se confirmaron por secuenciación.

Gen amplificado	Aplicación	Secuencia
<i>vbh-1</i>	RNAi	5'-gaagatcttcGTCGTGGTGGTGGTGGATCG-3'
		5'-gctctagagcGGAGCCTGGCCTGGGTTTG-3'
<i>laf-1</i>	RNAi	5'-gaattccGTGGAAACCGTGGATAACAATAATAATCG-3'
		5'-ggggtagccccCCATCGCCTCCATTATCCCG-3'
<i>hsp-1</i>	RT-PCR	5'-CATGGTCAACGAAGCTGAGA-3'
		5'-TTCCAATCCTTCTGTTGGTG-3'
<i>sip-1</i>	RT-PCR	5'-ACAACATCGTGCCACAACAG-3'
		5'-TGGTCATCTGTCCTTCCTTG-3'
<i>vbh-1</i>	RT-PCR	5'-CGCCAACGGAACCTCCGTCAAAC-3'
		5'-CCGGCCCAAACCAGCTTCATT-3'
<i>laf-1</i>	RT-PCR	5'-GTCGCGATCACCGTTATCAA-3'
		5'-CTCCACCAATCCTGTTGAGG-3'

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados. Los nucleótidos mostrados en letra minúscula corresponden a los sitios de restricción agregados para facilitar su posterior clonación.

11.4 RNA de interferencia

El RNAi se realizó por alimentación a 25°C utilizando técnicas estándar [185, 186]. Brevemente, se transformaron bacterias *E. coli* HT115(DE3) con diferentes plásmidos pPD129.36 para RNAi. Las bacterias transformadas se incubaron por una noche en medio LB adicionado con 50 µg/ml de ampicilina y 12.5 µg/ml de

tetraciclina. Para promover la síntesis de RNA de doble cadena se colocaron las bacterias en placas con medio NGM (20 g/l Agar, 3 g/l NaCl, 2.5 g/l peptona, 25mM amortiguador de fosfatos, 5 mg/l colesterol) suplementadas con 50 µg/ml ampicilina y 1 mM de IPTG, y se incubaron a temperatura ambiente por una noche protegidas de la luz. Posteriormente se tomaron los animales L1 sincronizados y se colocaron en estas cajas a 25°C hasta que alcanzaron su etapa adulta.

11.5 Western Blot

Para la extracción de proteína se colocaron 100 animales hermafroditas adultos de un día en 15 µl de amortiguador de carga 1X. Posteriormente se calentaron a 95°C por 5 min, se colocaron en hielo y se centrifugaron. Las muestras se cargaron en un gel de acrilamida y se transfirió la proteína en el gel a una membrana de nitrocelulosa por electroforesis. La membrana se bloqueó con 5% de leche en TBS (50mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl) con 0.5% de Tween 20. Posteriormente se incubó toda la noche a 4°C con un anticuerpo anti-VBH-1 diluido 1:1000 en 5% de leche en TBS con 0.5% de Tween 20. Al día siguiente la membrana se lavó con TBS Tween y se incubó 1 h a 4°C con un anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a peroxidasa (Thermo Scientific) diluido 1:1000 en 5% de leche en TBS con 0.5 % de Tween 20.

La membrana se lavó nuevamente y se reveló en un cuarto oscuro utilizando las especificaciones del fabricante SuperSignal West Pico Substrate (Thermo Scientific).

11.6 Curvas de supervivencia

Las larvas L1 sincronizadas durante la noche se colocaron en cajas con medio NGM con bacterias que expresan el RNA de doble cadena correspondiente y se permitió que continuaran su desarrollo a 25°C durante 40 h. Los animales *laf-1(RNAi)* y *laf-1(RNAi);vbh-1(RNAi)* presentaron un ligero retraso en el crecimiento por lo que se incubaron por 45 h en lugar de 40 h.

Los animales adultos, se colocaron en varias cajas NGM de 35 mm (30-40 animales por caja) y se incubaron a 36°C. A partir de las 2 h, se tomó una caja diferente cada hora y se contabilizaron los animales vivos y muertos utilizando un microscopio estereoscópico. Se consideraron como animales muertos a aquellos que no respondían al toque del asa y que además no presentaban bombeo en la faringe. Los datos de al menos tres experimentos diferentes se sumaron y se graficó el porcentaje de animales vivos del total.

Para el estrés oxidante los animales se colocaron en cajas NGM de 35 mm sin bacteria a las que se les distribuyeron 20 µl de peróxido de hidrógeno al 15% (97.9 µmoles) en su superficie. Veinte minutos después se contabilizaron los animales vivos y muertos. Se realizaron 3 experimentos diferentes y se graficó el promedio.

11.7 Inmunotinción de animales disecados

La inmunotinción se realizó como se describió anteriormente [153]. Brevemente, los animales adultos se diseccionaron en 30µl de M9 sobre un cubreobjetos utilizando jeringas de insulina con agujas de 25 G para liberar las gónadas, intestinos y embriones. Posteriormente se colocó el cubreobjetos con los animales hacia abajo sobre un portaobjetos con poli-L-lisina y se sumergió en nitrógeno líquido. Una vez congelados, se retiró el cubreobjetos y se fijaron las muestras en metanol a -20°C por 1 min seguido de una solución de fijado por 26 min a temperatura ambiente. Después de un lavado por 10 min en PBT (PBS 1X, 0.5% Tween 20) las muestras se bloquearon por 30 min con 30% de suero de cabra y 0.2% de azida de sodio en PBT a temperatura ambiente. A continuación se incubaron con el anticuerpo primario por una noche a 4°C, se lavaron por 10 min con PBT y se incubaron con el anticuerpo secundario por 1 h a temperatura ambiente. Finalmente se lavaron con PBT, se le adicionó medio de montaje Vectashield (Vector Labs) para prevenir fotoblanqueo y se sellaron con un cubreobjetos utilizando un esmalte acrílico.

Anticuerpo	Especie	Dilución	Referencia
Anti-VBH-1	Conejo	1:100	[140]
Anti-CGH-1	Rata	1:30	[153]
Anti-IgG de conejo conjugado con FITC	Cabra	1:100	Jackson Immunoresearch
Anti-IgG de rata conjugado con Cy3	Cabra	1:100	Jackson Immunoresearch

Tabla 4. Anticuerpos utilizados para inmunohistoquímica. Para teñir DNA se utilizó DAPI (1 ng/μl).

11.8 Inmunotinción de animales completos

Para la inmunotinción de animales completos se utilizó el protocolo de Ruvkun y Finney [187]. Los animales adultos de un día se colectaron con amortiguador M9 y se lavaron varias veces para retirar las bacterias. A los animales limpios se les retiró la mayor cantidad de sobrenadante, se agregó 1.25 ml de solución de fijado fría y se congelaron en un baño de etanol – hielo seco seguido de una incubación a 70°C. Este ciclo se repitió una vez más, se incubaron las muestras en hielo por 1 h y se lavaron con 1 ml de amortiguador TTB.

La cutícula se permeabilizó incubando las muestras en 1 ml de las siguientes soluciones con agitación: 90 min a 37°C en TTB con 1% de β-mercaptoetanol, 1 min en amortiguador de borato, 15 min en amortiguador de borato con 10 mM de DTT, 1 min en amortiguador de borato, 15 min en amortiguador de borato con 0.3% de peróxido de hidrógeno y 15 min en amortiguador Ab B.

Las muestras se resuspendieron finalmente en 100-200 μl de Ab amortiguador A y se tomaron 15 μl en un tubo de 500 μl. Se les agregaron 15 μl del

anticuerpo primario anti-VBH-1 (1:50 diluido en amortiguador Ab A) y se incubaron toda la noche a 4°C con agitación. El exceso de anticuerpo primario se lavó con 500 µl de Ab amortiguador B por 2 h y se retiró la mayor cantidad de sobrenadante. Posteriormente se agregaron 15 µl de anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a AlexaFluor 488 (1:50, 2 ng/µl DAPI en amortiguador Ab A) y se incubaron por 2 h a temperatura ambiente. Después de repetir el lavado con Ab amortiguador B, se retiró el sobrenadante y se agregaron 15 µl de Vectashield (Vector Labs). Para observar a los animales al microscopio se tomaron con una pipeta y se colocaron sobre un portaobjetos.

11.9 RT-PCR

El RNA total de animales adultos de un día se purificó utilizando TRIzol (Life Technologies) y se utilizó como templado para sintetizar cDNA con el estuche ImProm-II Reverse Transcriptase (Promega) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El cDNA se usó como molde en reacciones de PCR utilizando los oligonucleótidos mostrados en la tabla 3.

11.10 Tratamiento con fosfatasa alcalina

Para el tratamiento con fosfatasa alcalina se colectaron 100 animales adultos de un día en 10 µl de agua estéril fría. Posteriormente se machacaron con ayuda de una pipeta Pasteur con la punta sellada al mechero y se calentaron a 95°C por 5 minutos para desnaturalizar las proteasas. A la muestra se le agregaron 1/10 del volumen de Amortiguador 3 10X de New England Biolabs (concentraciones finales 100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, pH 7.9) y 40 U de Fosfatasa alcalina (CIP, New England Biolabs) y se incubó por 1 h a 37°C. Inmediatamente después de la reacción se agregó 1/10 del volumen de amortiguador de carga de proteína 10X, se incubó a 95°C por 5 min, se colocaron en hielo y se prosiguió con el protocolo de Western blot.

11.11 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos de las curvas de supervivencia se realizaron utilizando el programa Prism (GraphPad).

11.12 Procesamiento de imágenes

Las micrografías se obtuvieron en un microscopio Nikon Eclipse E600 equipado con una cámara AxioCam MRc (Zeiss). Las imágenes se capturaron utilizando el programa AxioVision (Zeiss) y se deconvolucionaron con las funciones adicionales Parallel Spectral Deconvolution y Diffraction PSF 3D del programa ImageJ [188]. Las imágenes se procesaron usando los programas ImageJ y Adobe Illustrator CS5.

11.13 Soluciones y medios utilizados

Nematode Growth Medium (NGM)

Reactivo	Concentración Final
NaCl	2 g/l
Bactotripton	4 g/l
KH ₂ PO ₄	3 g/l
K ₂ HPO ₄	0.5 g/l
Colesterol	8 mg/l
Agar	20 g/l

Amortiguador M9 1X

Reactivo	Concentración Final
Na ₂ HPO ₄	42 mM
K ₂ HPO ₄	22 mM
NaCl	86 mM
MgSO ₄	1 mM

Amortiguador de carga de proteínas

Reactivo	Concentración Final
Tris-HCl pH 6.7	122 mM
SDS	5%
Glicerol	20%
Azul de bromofenol	0.01%

TBS

Reactivo	Concentración Final
Tris HCl pH 7.6	50 mM
NaCl	137 mM
KCl	2.7 mM

La helicasa de RNA VBH-1

PBS 1X

Reactivo	Concentración Final
Na ₂ HPO ₄	10.1 mM
KH ₂ PO ₄	1.8 mM
NaCl	137 mM
KCl	2.7 mM

Solución de fijado para animales disecados

Reactivo	Concentración Final
PBS	1X
Formaldehído	3.7 % (w/v)
HEPES	80 mM
MgSO ₄	1.6 mM
EGTA	0.8 mM

PBT

Reactivo	Concentración Final
PBS	1X
Tween 20	0.5 % (v/v)

Solución de fijado para animales competos (MRWB)

Reactivo	Concentración Final
KCl	80 mM
NaCl	20 mM
EGTA	10 mM
Espermidina	5 mM
PIPES	15 mM
Metanol	25 % (v/v)
Formaldehído	1 % (w/v)

Amortiguador TTB

Reactivo	Concentración Final
Tris HCl pH 7.4	100 mM
Tritón X-100	1 % (v/v)
EDTA	1 mM

Amortiguador de borato

Reactivo	Concentración Final
H ₃ BO ₃	25 mM
NaOH	12.5 mM

Amortiguador Ab B

Reactivo	Concentración Final
PBS	1X
BSA	0.1 % (w/v)
Triton X-100	0.5 % (v/v)
NaN ₃	0.05 % (w/v)
EDTA	1 mM

Amortiguador Ab A

Reactivo	Concentración Final
PBS	1X
BSA	1 % (w/v)
Triton X-100	0.5 % (v/v)
NaN ₃	0.05 % (w/v)
EDTA	1 mM

12. Referencias

1. Wood, W.B., *The Nematode Caenorhabditis elegans*. Cold Spring Harbor monograph series. 1988, Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory. xiii, 667 p.
2. Cassada, R.C. and R.L. Russell, *The dauerlarva, a post-embryonic developmental variant of the nematode Caenorhabditis elegans*. Dev Biol, 1975. **46**(2): p. 326-42.
3. Bird, A.F. and J. Bird, *The structure of nematodes*. 2nd ed. 1991, San Diego: Academic Press. xviii, 316 p.
4. Zarkower, D., *Somatic sex determination*. WormBook, 2006: p. 1-12.

5. Brenner, S., *The genetics of Caenorhabditis elegans*. Genetics, 1974. **77**(1): p. 71-94.
6. Strange, K., *C. elegans : methods and applications*. Methods in molecular biology., 2006, Totowa, N.J.: Humana Press. xii, 292 p.
7. Jorgensen, E.M. and S.E. Mango, *The art and design of genetic screens: caenorhabditis elegans*. Nat Rev Genet, 2002. **3**(5): p. 356-69.
8. Hubbard, E.J. and D. Greenstein, *The Caenorhabditis elegans gonad: a test tube for cell and developmental biology*. Dev Dyn, 2000. **218**(1): p. 2-22.
9. L'Hernault, S.W., *Spermatogenesis*. WormBook, 2006: p. 1-14.
10. Hirsh, D., D. Oppenheim, and M. Klass, *Development of the reproductive system of Caenorhabditis elegans*. Dev Biol, 1976. **49**(1): p. 200-19.
11. Klass, M., N. Wolf, and D. Hirsh, *Development of the male reproductive system and sexual transformation in the nematode Caenorhabditis elegans*. Dev Biol, 1976. **52**(1): p. 1-18.
12. Gustafson, E.A. and G.M. Wessel, *DEAD-box helicases: posttranslational regulation and function*. Biochem Biophys Res Commun, 2010. **395**(1): p. 1-6.
13. McGhee, J.D., *The C. elegans intestine*. WormBook, 2007: p. 1-36.
14. Vabulas, R.M., et al., *Protein folding in the cytoplasm and the heat shock response*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010. **2**(12): p. a004390.
15. Balch, W.E., et al., *Adapting proteostasis for disease intervention*. Science, 2008. **319**(5865): p. 916-9.
16. Chiti, F. and C.M. Dobson, *Amyloid formation by globular proteins under native conditions*. Nat Chem Biol, 2009. **5**(1): p. 15-22.
17. Prahlad, V. and R.I. Morimoto, *Integrating the stress response: lessons for neurodegenerative diseases from C. elegans*. Trends Cell Biol, 2009. **19**(2): p. 52-61.
18. Chiang, W.C., et al., *HSF-1 regulators DDL-1/2 link insulin-like signaling to heat-shock responses and modulation of longevity*. Cell, 2012. **148**(1-2): p. 322-34.
19. Rodriguez, M., et al., *Worms under stress: C. elegans stress response and its relevance to complex human disease and aging*. Trends Genet, 2013. **29**(6): p. 367-74.
20. Prahlad, V., T. Cornelius, and R.I. Morimoto, *Regulation of the cellular heat shock response in Caenorhabditis elegans by thermosensory neurons*. Science, 2008. **320**(5877): p. 811-4.
21. Mori, I., *Genetics of chemotaxis and thermotaxis in the nematode Caenorhabditis elegans*. Annu Rev Genet, 1999. **33**: p. 399-422.
22. Clark, D.A., et al., *Temporal activity patterns in thermosensory neurons of freely moving Caenorhabditis elegans encode spatial thermal gradients*. J Neurosci, 2007. **27**(23): p. 6083-90.
23. Vanduyn, N., et al., *SKN-1/Nrf2 inhibits dopamine neuron degeneration in a Caenorhabditis elegans model of methylmercury toxicity*. Toxicol Sci, 2010. **118**(2): p. 613-24.
24. Wilce, M.C. and M.W. Parker, *Structure and function of glutathione S-transferases*. Biochim Biophys Acta, 1994. **1205**(1): p. 1-18.
25. Scott, B.A., M.S. Avidan, and C.M. Crowder, *Regulation of hypoxic death in C. elegans by the insulin/IGF receptor homolog DAF-2*. Science, 2002. **296**(5577): p. 2388-91.
26. Anderson, L.L., et al., *Survival from hypoxia in C. elegans by inactivation of aminoacyl-tRNA synthetases*. Science, 2009. **323**(5914): p. 630-3.
27. Jiang, H., R. Guo, and J.A. Powell-Coffman, *The Caenorhabditis elegans hif-1 gene encodes a bHLH-PAS protein that is required for adaptation to hypoxia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(14): p. 7916-21.
28. Shen, C., et al., *Roles of the HIF-1 hypoxia-inducible factor during hypoxia response in Caenorhabditis elegans*. J Biol Chem, 2005. **280**(21): p. 20580-8.

29. Lamitina, S.T., et al., *Adaptation of the nematode Caenorhabditis elegans to extreme osmotic stress*. Am J Physiol Cell Physiol, 2004. **286**(4): p. C785-91.
30. Lamitina, T., C.G. Huang, and K. Strange, *Genome-wide RNAi screening identifies protein damage as a regulator of osmoprotective gene expression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(32): p. 12173-8.
31. Wheeler, J.M. and J.H. Thomas, *Identification of a novel gene family involved in osmotic stress response in Caenorhabditis elegans*. Genetics, 2006. **174**(3): p. 1327-36.
32. Rohlfing, A.K., et al., *The Caenorhabditis elegans mucin-like protein OSM-8 negatively regulates osmosensitive physiology via the transmembrane protein PTR-23*. PLoS Genet, 2011. **7**(1): p. e1001267.
33. Burkewitz, K., K. Choe, and K. Strange, *Hypertonic stress induces rapid and widespread protein damage in C. elegans*. Am J Physiol Cell Physiol, 2011. **301**(3): p. C566-76.
34. Melendez, A. and B. Levine, *Autophagy in C. elegans*. WormBook, 2009: p. 1-26.
35. Chen, J. and E.P. Caswell-Chen, *Facultative Vivipary is a Life-History Trait in Caenorhabditis elegans*. J Nematol, 2004. **36**(2): p. 107-13.
36. Seidel, H.S. and J. Kimble, *The oogenic germline starvation response in C. elegans*. PLoS One, 2011. **6**(12): p. e28074.
37. Angelo, G. and M.R. Van Gilst, *Starvation protects germline stem cells and extends reproductive longevity in C. elegans*. Science, 2009. **326**(5955): p. 954-8.
38. Baugh, L.R., *To grow or not to grow: nutritional control of development during Caenorhabditis elegans L1 arrest*. Genetics, 2013. **194**(3): p. 539-55.
39. Ludewig, A.H. and F.C. Schroeder, *Ascaroside signaling in C. elegans*. WormBook, 2013: p. 1-22.
40. Fukuyama, M., A.E. Rougvie, and J.H. Rothman, *C. elegans DAF-18/PTEN mediates nutrient-dependent arrest of cell cycle and growth in the germline*. Curr Biol, 2006. **16**(8): p. 773-9.
41. Kimura, K.D., D.L. Riddle, and G. Ruvkun, *The C. elegans DAF-2 insulin-like receptor is abundantly expressed in the nervous system and regulated by nutritional status*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 2011. **76**: p. 113-20.
42. Kasuga, H., et al., *The microRNA miR-235 couples blast-cell quiescence to the nutritional state*. Nature, 2013. **497**(7450): p. 503-6.
43. Heschl, M.F. and D.L. Baillie, *The HSP70 multigene family of Caenorhabditis elegans*. Comp Biochem Physiol B, 1990. **96**(4): p. 633-7.
44. Mayer, M.P. and B. Bukau, *Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism*. Cell Mol Life Sci, 2005. **62**(6): p. 670-84.
45. Waters, E.R., *The evolution, function, structure, and expression of the plant sHSPs*. J Exp Bot, 2013. **64**(2): p. 391-403.
46. Poulain, P., J.C. Gelly, and D. Flatters, *Detection and architecture of small heat shock protein monomers*. PLoS One, 2010. **5**(4): p. e9990.
47. Sun, Y. and T.H. MacRae, *Small heat shock proteins: molecular structure and chaperone function*. Cell Mol Life Sci, 2005. **62**(21): p. 2460-76.
48. Yost, H.J. and S. Lindquist, *RNA splicing is interrupted by heat shock and is rescued by heat shock protein synthesis*. Cell, 1986. **45**(2): p. 185-93.
49. Snutch, T.P. and D.L. Baillie, *Alterations in the pattern of gene expression following heat shock in the nematode Caenorhabditis elegans*. Can J Biochem Cell Biol, 1983. **61**(6): p. 480-7.
50. Muhich, M.L. and J.C. Boothroyd, *Synthesis of trypanosome hsp70 mRNA is resistant to disruption of trans-splicing by heat shock*. J Biol Chem, 1989. **264**(13): p. 7107-10.

51. Blumenthal, T. and J. Thomas, *Cis and trans mRNA splicing in C. elegans*. Trends Genet, 1988. **4**(11): p. 305-8.
52. Voronina, E., et al., *RNA granules in germ cells*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2011. **3**(12).
53. Pitt, J.N., J.A. Schisa, and J.R. Priess, *P granules in the germ cells of Caenorhabditis elegans adults are associated with clusters of nuclear pores and contain RNA*. Dev Biol, 2000. **219**(2): p. 315-33.
54. Partridge, L. and D. Gems, *Mechanisms of ageing: public or private?* Nat Rev Genet, 2002. **3**(3): p. 165-75.
55. Cox, R.T. and A.C. Spradling, *A Balbiani body and the fusome mediate mitochondrial inheritance during Drosophila oogenesis*. Development, 2003. **130**(8): p. 1579-90.
56. Kogo, N., et al., *Germ-line mitochondria exhibit suppressed respiratory activity to support their accurate transmission to the next generation*. Dev Biol, 2011. **349**(2): p. 462-9.
57. Jaglarz, M.K., et al., *Nuage morphogenesis becomes more complex: two translocation pathways and two forms of nuage coexist in Drosophila germline syncytia*. Cell Tissue Res, 2011. **344**(1): p. 169-81.
58. Patterson, J.R., M.P. Wood, and J.A. Schisa, *Assembly of RNP granules in stressed and aging oocytes requires nucleoporins and is coordinated with nuclear membrane blebbing*. Dev Biol, 2011. **353**(2): p. 173-85.
59. Snee, M.J. and P.M. Macdonald, *Dynamic organization and plasticity of sponge bodies*. Dev Dyn, 2009. **238**(4): p. 918-30.
60. Strome, S. and W. Wood, *Immunofluorescence visualization of germ-line-specific cytoplasmic granules in embryos, larvae, and adults of Caenorhabditis elegans*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1982. **79**(5): p. 1558-62.
61. Kotaja, N. and P. Sassone-Corsi, *The chromatoid body: a germ-cell-specific RNA-processing centre*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(1): p. 85-90.
62. Ventela, S., J. Toppari, and M. Parvinen, *Intercellular organelle traffic through cytoplasmic bridges in early spermatids of the rat: mechanisms of haploid gene product sharing*. Mol Biol Cell, 2003. **14**(7): p. 2768-80.
63. Parvinen, M., *The chromatoid body in spermatogenesis*. Int J Androl, 2005. **28**(4): p. 189-201.
64. Anderson, P. and N. Kedersha, *RNA granules*. J Cell Biol, 2006. **172**(6): p. 803-8.
65. Thomas, M.G., et al., *RNA granules: the good, the bad and the ugly*. Cell Signal, 2011. **23**(2): p. 324-34.
66. Balagopal, V. and R. Parker, *Polysomes, P bodies and stress granules: states and fates of eukaryotic mRNAs*. Curr Opin Cell Biol, 2009. **21**(3): p. 403-8.
67. Rajyaguru, P. and R. Parker, *CGH-1 and the control of maternal mRNAs*. Trends Cell Biol, 2009. **19**(1): p. 24-8.
68. Boag, P.R., et al., *Protection of specific maternal messenger RNAs by the P body protein CGH-1 (Dhh1/RCK) during Caenorhabditis elegans oogenesis*. J Cell Biol, 2008. **182**(3): p. 543-57.
69. Jud, M.C., et al., *Large P body-like RNPs form in C. elegans oocytes in response to arrested ovulation, heat shock, osmotic stress, and anoxia and are regulated by the major sperm protein pathway*. Dev Biol, 2008. **318**(1): p. 38-51.
70. Noble, S.L., et al., *Maternal mRNAs are regulated by diverse P body-related mRNP granules during early Caenorhabditis elegans development*. J Cell Biol, 2008. **182**(3): p. 559-72.
71. Gallo, C., et al., *Processing bodies and germ granules are distinct RNA granules that interact in C. elegans embryos*. Dev Biol, 2008. **323**(1): p. 76-87.
72. Bleichert, F. and S.J. Baserga, *The long unwinding road of RNA helicases*. Mol Cell, 2007. **27**(3): p. 339-52.

73. Fairman-Williams, M.E., U.P. Guenther, and E. Jankowsky, *SF1 and SF2 helicases: family matters*. *Curr Opin Struct Biol*, 2010. **20**(3): p. 313-24.
74. Hardwick, S.W. and B.F. Luisi, *Rarely at rest: RNA helicases and their busy contributions to RNA degradation, regulation and quality control*. *RNA Biol*, 2013. **10**(1): p. 56-70.
75. Cordin, O., et al., *The newly discovered Q motif of DEAD-box RNA helicases regulates RNA-binding and helicase activity*. *EMBO J*, 2004. **23**(13): p. 2478-87.
76. Linder, P. and E. Jankowsky, *From unwinding to clamping - the DEAD box RNA helicase family*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2011. **12**(8): p. 505-16.
77. Pyle, A.M., *Translocation and unwinding mechanisms of RNA and DNA helicases*. *Annu Rev Biophys*, 2008. **37**: p. 317-36.
78. Hilbert, M., A.R. Karow, and D. Klostermeier, *The mechanism of ATP-dependent RNA unwinding by DEAD box proteins*. *Biol Chem*, 2009. **390**(12): p. 1237-50.
79. Linder, P., *Dead-box proteins: a family affair--active and passive players in RNP-remodeling*. *Nucleic Acids Res*, 2006. **34**(15): p. 4168-80.
80. Rocak, S. and P. Linder, *DEAD-box proteins: the driving forces behind RNA metabolism*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004. **5**(3): p. 232-41.
81. Cordin, O., et al., *The DEAD-box protein family of RNA helicases*. *Gene*, 2006. **367**: p. 17-37.
82. Owttrim, G.W., *RNA helicases and abiotic stress*. *Nucleic Acids Res*, 2006. **34**(11): p. 3220-30.
83. Schade, B., et al., *Cold adaptation in budding yeast*. *Mol Biol Cell*, 2004. **15**(12): p. 5492-502.
84. Liu, H.Y., B.S. Nefsky, and N.C. Walworth, *The Ded1 DEAD box helicase interacts with Chk1 and Cdc2*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(4): p. 2637-43.
85. Pandiani, F., et al., *Role of the five RNA helicases in the adaptive response of Bacillus cereus ATCC 14579 cells to temperature, pH, and oxidative stresses*. *Appl Environ Microbiol*, 2011. **77**(16): p. 5604-9.
86. Kant, P., et al., *STRESS RESPONSE SUPPRESSOR1 and STRESS RESPONSE SUPPRESSOR2, two DEAD-box RNA helicases that attenuate Arabidopsis responses to multiple abiotic stresses*. *Plant Physiol*, 2007. **145**(3): p. 814-30.
87. Lasko, P.F. and M. Ashburner, *Posterior localization of vasa protein correlates with, but is not sufficient for, pole cell development*. *Genes Dev*, 1990. **4**(6): p. 905-21.
88. Hay, B., L.Y. Jan, and Y.N. Jan, *A protein component of Drosophila polar granules is encoded by vasa and has extensive sequence similarity to ATP-dependent helicases*. *Cell*, 1988. **55**(4): p. 577-87.
89. Gustafson, E.A. and G.M. Wessel, *Vasa genes: Emerging roles in the germ line and in multipotent cells*. *BioEssays*, 2010. **32**(7): p. 626-637.
90. Lasko, P., *The DEAD-box helicase Vasa: evidence for a multiplicity of functions in RNA processes and developmental biology*. *Biochim Biophys Acta*, 2013. **1829**(8): p. 810-6.
91. Voronina, E., et al., *Vasa protein expression is restricted to the small micromeres of the sea urchin, but is inducible in other lineages early in development*. *Dev Biol*, 2008. **314**(2): p. 276-86.
92. Komiya, T., et al., *Isolation and characterization of a novel gene of the DEAD box protein family which is specifically expressed in germ cells of Xenopus laevis*. *Dev Biol*, 1994. **162**(2): p. 354-63.
93. MacArthur, H., et al., *DEADSouth is a germ plasm specific DEAD-box RNA helicase in Xenopus related to eIF4A*. *Mech Dev*, 2000. **95**(1-2): p. 291-5.
94. Knaut, H., et al., *Zebrafish vasa RNA but not its protein is a component of the germ plasm and segregates asymmetrically before germline specification*. *J Cell Biol*, 2000. **149**(4): p. 875-88.

95. Knaut, H., et al., *An evolutionary conserved region in the vasa 3'UTR targets RNA translation to the germ cells in the zebrafish*. *Curr Biol*, 2002. **12**(6): p. 454-66.
96. Krovel, A.V. and L.C. Olsen, *Sexual dimorphic expression pattern of a splice variant of zebrafish vasa during gonadal development*. *Dev Biol*, 2004. **271**(1): p. 190-7.
97. Laval, F., et al., *Ectopic expression of Cvh (Chicken Vasa homologue) mediates the reprogramming of chicken embryonic stem cells to a germ cell fate*. *Dev Biol*, 2009. **330**(1): p. 73-82.
98. Toyooka, Y., et al., *Expression and intracellular localization of mouse Vasa-homologue protein during germ cell development*. *Mech Dev*, 2000. **93**(1-2): p. 139-49.
99. Tanaka, S.S., et al., *The mouse homolog of Drosophila Vasa is required for the development of male germ cells*. *Genes Dev*, 2000. **14**(7): p. 841-53.
100. Castrillon, D.H., et al., *The human VASA gene is specifically expressed in the germ cell lineage*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(17): p. 9585-90.
101. Sugimoto, K., et al., *Tissue-specific differentially methylated regions of the human VASA gene are potentially associated with maturation arrest phenotype in the testis*. *J Hum Genet*, 2009. **54**(8): p. 450-6.
102. Johnstone, O. and P. Lasko, *Interaction with eIF5B is essential for Vasa function during development*. *Development*, 2004. **131**(17): p. 4167-78.
103. Liu, N., H. Han, and P. Lasko, *Vasa promotes Drosophila germline stem cell differentiation by activating mei-P26 translation by directly interacting with a (U)-rich motif in its 3' UTR*. *Genes Dev*, 2009. **23**(23): p. 2742-52.
104. Neumuller, R.A., et al., *Mei-P26 regulates microRNAs and cell growth in the Drosophila ovarian stem cell lineage*. *Nature*, 2008. **454**(7201): p. 241-5.
105. Li, Y., et al., *Mei-P26 regulates the maintenance of ovarian germline stem cells by promoting BMP signaling*. *Development*, 2012. **139**(9): p. 1547-56.
106. Kuramochi-Miyagawa, S., et al., *MVH in piRNA processing and gene silencing of retrotransposons*. *Genes Dev*, 2010. **24**(9): p. 887-92.
107. Shibata, N., et al., *Expression of vasa(vas)-related genes in germline cells and totipotent somatic stem cells of planarians*. *Dev Biol*, 1999. **206**(1): p. 73-87.
108. Rouhana, L., et al., *Different requirements for conserved post-transcriptional regulators in planarian regeneration and stem cell maintenance*. *Dev Biol*, 2010. **341**(2): p. 429-43.
109. Wagner, D.E., J.J. Ho, and P.W. Reddien, *Genetic regulators of a pluripotent adult stem cell system in planarians identified by RNAi and clonal analysis*. *Cell Stem Cell*, 2012. **10**(3): p. 299-311.
110. Mochizuki, K., C. Nishimiya-Fujisawa, and T. Fujisawa, *Universal occurrence of the vasa-related genes among metazoans and their germline expression in Hydra*. *Dev Genes Evol*, 2001. **211**(6): p. 299-308.
111. Funayama, N., *The stem cell system in demosponges: insights into the origin of somatic stem cells*. *Dev Growth Differ*, 2010. **52**(1): p. 1-14.
112. Janic, A., et al., *Ectopic expression of germline genes drives malignant brain tumor growth in Drosophila*. *Science*, 2010. **330**(6012): p. 1824-7.
113. Yajima, M. and G.M. Wessel, *The multiple hats of Vasa: Its functions in the germline and in cell cycle progression*. *Molecular Reproduction and Development*, 2011. **78**(10-11): p. 861-867.
114. Simpson, A.J., et al., *Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer*. *Nat Rev Cancer*, 2005. **5**(8): p. 615-25.
115. Caballero, O.L. and Y.T. Chen, *Cancer/testis (CT) antigens: potential targets for immunotherapy*. *Cancer Sci*, 2009. **100**(11): p. 2014-21.

116. Hashimoto, H., et al., *Germ cell specific protein VASA is over-expressed in epithelial ovarian cancer and disrupts DNA damage-induced G2 checkpoint*. *Gynecol Oncol*, 2008. **111**(2): p. 312-9.
117. Pek, J.W. and T. Kai, *A role for vasa in regulating mitotic chromosome condensation in Drosophila*. *Curr Biol*, 2011. **21**(1): p. 39-44.
118. Yajima, M. and G.M. Wessel, *The DEAD-box RNA helicase Vasa functions in embryonic mitotic progression in the sea urchin*. *Development*, 2011. **138**(11): p. 2217-22.
119. Johnstone, O., et al., *Belle is a Drosophila DEAD-box protein required for viability and in the germ line*. *Dev Biol*, 2005. **277**(1): p. 92-101.
120. Ihry, R.J., A.L. Sapiro, and A. Bashirullah, *Translational control by the DEAD Box RNA helicase belle regulates ecdysone-triggered transcriptional cascades*. *PLoS Genet*, 2012. **8**(11): p. e1003085.
121. Soto-Rifo, R. and T. Ohlmann, *The role of the DEAD-box RNA helicase DDX3 in mRNA metabolism*. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2013. **4**(4): p. 369-85.
122. Foresta, C., A. Ferlin, and E. Moro, *Deletion and expression analysis of AZFa genes on the human Y chromosome revealed a major role for DBY in male infertility*. *Hum Mol Genet*, 2000. **9**(8): p. 1161-9.
123. Park, S.H., et al., *Assignment of a human putative RNA helicase gene, DDX3, to human X chromosome bands p11.3-->p11.23*. *Cytogenet Cell Genet*, 1998. **81**(3-4): p. 178-9.
124. Chao, C.H., et al., *DDX3, a DEAD box RNA helicase with tumor growth-suppressive property and transcriptional regulation activity of the p21waf1/cip1 promoter, is a candidate tumor suppressor*. *Cancer Res*, 2006. **66**(13): p. 6579-88.
125. Schroder, M., *Human DEAD-box protein 3 has multiple functions in gene regulation and cell cycle control and is a prime target for viral manipulation*. *Biochem Pharmacol*, 2010. **79**(3): p. 297-306.
126. Tarn, W.Y. and T.H. Chang, *The current understanding of Ded1p/DDX3 homologs from yeast to human*. *RNA Biol*, 2009. **6**(1): p. 17-20.
127. Lai, M.C., Y.H. Lee, and W.Y. Tarn, *The DEAD-box RNA helicase DDX3 associates with export messenger ribonucleoproteins as well as tip-associated protein and participates in translational control*. *Mol Biol Cell*, 2008. **19**(9): p. 3847-58.
128. Parsyan, A., et al., *mRNA helicases: the tacticians of translational control*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2011. **12**(4): p. 235-45.
129. Culjkovic, B., et al., *eIF4E is a central node of an RNA regulon that governs cellular proliferation*. *J Cell Biol*, 2006. **175**(3): p. 415-26.
130. Topisirovic, I., et al., *Molecular dissection of the eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) export-competent RNP*. *EMBO J*, 2009. **28**(8): p. 1087-98.
131. Yedavalli, V.S., et al., *Requirement of DDX3 DEAD box RNA helicase for HIV-1 Rev-RRE export function*. *Cell*, 2004. **119**(3): p. 381-92.
132. Lee, C.S., et al., *Human DDX3 functions in translation and interacts with the translation initiation factor eIF3*. *Nucleic Acids Res*, 2008. **36**(14): p. 4708-18.
133. Lai, M.C., et al., *DDX3 regulates cell growth through translational control of cyclin E1*. *Mol Cell Biol*, 2010. **30**(22): p. 5444-53.
134. Lai, M., Y. Lee, and W. Tarn, *The DEAD-box RNA helicase DDX3 associates with export messenger ribonucleoproteins as well as tip-associated protein and participates in translational control*. *Mol Biol Cell*, 2008. **19**(9): p. 3847-58.
135. Geissler, R., R.P. Golbik, and S.E. Behrens, *The DEAD-box helicase DDX3 supports the assembly of functional 80S ribosomes*. *Nucleic Acids Res*, 2012. **40**(11): p. 4998-5011.

136. Lin, J., et al., *Analysis of wild-type and mutant p21WAF-1 gene activities*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(4): p. 1786-93.
137. Linares-Cruz, G., et al., *p21WAF-1 reorganizes the nucleus in tumor suppression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(3): p. 1131-5.
138. Chang, P.C., et al., *DDX3, a DEAD box RNA helicase, is deregulated in hepatitis virus-associated hepatocellular carcinoma and is involved in cell growth control*. Oncogene, 2006. **25**(14): p. 1991-2003.
139. Sun, M., et al., *Identification of an antiapoptotic protein complex at death receptors*. Cell Death Differ, 2008. **15**(12): p. 1887-900.
140. Salinas, L.S., et al., *The DEAD box RNA helicase VBH-1 is required for germ cell function in C. elegans*. Genesis, 2007. **45**(9): p. 533-46.
141. Salinas, L.S., et al., *Germ cell survival in C. elegans and C. remanei is affected when the DEAD box RNA helicases VBH-1 or Cre-VBH-1 are silenced*. Genesis, 2012. **50**(11): p. 801-18.
142. Gumienny, T.L., et al., *Genetic control of programmed cell death in the Caenorhabditis elegans hermaphrodite germline*. Development, 1999. **126**(5): p. 1011-22.
143. Salinas, L.S., E. Maldonado, and R.E. Navarro, *Stress-induced germ cell apoptosis by a p53 independent pathway in Caenorhabditis elegans*. Cell Death Differ, 2006. **13**(12): p. 2129-39.
144. Hubert, A. and P. Anderson, *The C. elegans sex determination gene laf-1 encodes a putative DEAD-box RNA helicase*. Dev Biol, 2009. **330**(2): p. 358-67.
145. Goodwin, E.B., et al., *A genetic pathway for regulation of tra-2 translation*. Development, 1997. **124**(3): p. 749-58.
146. Beanan, M.J. and S. Strome, *Characterization of a germ-line proliferation mutation in C. elegans*. Development, 1992. **116**(3): p. 755-66.
147. Frokjaer-Jensen, C., et al., *Improved Mos1-mediated transgenesis in C. elegans*. Nat Methods, 2012. **9**(2): p. 117-8.
148. Frokjaer-Jensen, C., et al., *Single-copy insertion of transgenes in Caenorhabditis elegans*. Nat Genet, 2008. **40**(11): p. 1375-83.
149. Shirayama, M., et al., *piRNAs initiate an epigenetic memory of nonself RNA in the C. elegans germline*. Cell, 2012. **150**(1): p. 65-77.
150. Clokey, G.V. and L.A. Jacobson, *The autofluorescent "lipofuscin granules" in the intestinal cells of Caenorhabditis elegans are secondary lysosomes*. Mech Ageing Dev, 1986. **35**(1): p. 79-94.
151. Linder, B., et al., *Molecular characterization of a novel, developmentally regulated small embryonic chaperone from Caenorhabditis elegans*. J Biol Chem, 1996. **271**(47): p. 30158-66.
152. Snutch, T.P., M.F. Heschl, and D.L. Baillie, *The Caenorhabditis elegans hsp70 gene family: a molecular genetic characterization*. Gene, 1988. **64**(2): p. 241-55.
153. Navarro, R.E., et al., *cgh-1, a conserved predicted RNA helicase required for gametogenesis and protection from physiological germline apoptosis in C. elegans*. Development, 2001. **128**(17): p. 3221-32.
154. Jud, M., et al., *Conservation of large foci formation in arrested oocytes of Caenorhabditis nematodes*. Dev Genes Evol, 2007. **217**(3): p. 221-6.
155. Clifford, R., et al., *FOG-2, a novel F-box containing protein, associates with the GLD-1 RNA binding protein and directs male sex determination in the C. elegans hermaphrodite germline*. Development, 2000. **127**(24): p. 5265-76.

156. Schedl, T. and J. Kimble, *fog-2, a germ-line-specific sex determination gene required for hermaphrodite spermatogenesis in Caenorhabditis elegans*. Genetics, 1988. **119**(1): p. 43-61.
157. Praitis, V., et al., *Creation of low-copy integrated transgenic lines in Caenorhabditis elegans*. Genetics, 2001. **157**(3): p. 1217-26.
158. Strome, S., et al., *Spindle dynamics and the role of gamma-tubulin in early Caenorhabditis elegans embryos*. Mol Biol Cell, 2001. **12**(6): p. 1751-64.
159. Gilks, N., et al., *Stress granule assembly is mediated by prion-like aggregation of TIA-1*. Mol Biol Cell, 2004. **15**(12): p. 5383-98.
160. Ohn, T., et al., *A functional RNAi screen links O-GlcNAc modification of ribosomal proteins to stress granule and processing body assembly*. Nat Cell Biol, 2008. **10**(10): p. 1224-31.
161. Shih, J.W., et al., *Candidate tumor suppressor DDX3 RNA helicase specifically represses cap-dependent translation by acting as an eIF4E inhibitory protein*. Oncogene, 2008. **27**(5): p. 700-14.
162. Grillo, G., et al., *UTRdb and UTRsite (RELEASE 2010): a collection of sequences and regulatory motifs of the untranslated regions of eukaryotic mRNAs*. Nucleic Acids Res, 2010. **38**(Database issue): p. D75-80.
163. Li, D. and M. Wang, *Construction of a bicistronic vector for the co-expression of two genes in Caenorhabditis elegans using a newly identified IRES*. Biotechniques, 2012. **52**(3): p. 173-6.
164. Hernandez, G., et al., *Internal ribosome entry site drives cap-independent translation of reaper and heat shock protein 70 mRNAs in Drosophila embryos*. RNA, 2004. **10**(11): p. 1783-97.
165. Rubtsova, M.P., et al., *Distinctive properties of the 5'-untranslated region of human hsp70 mRNA*. J Biol Chem, 2003. **278**(25): p. 22350-6.
166. Prakash, J.S., et al., *An RNA helicase, CrhR, regulates the low-temperature-inducible expression of heat-shock genes groES, groEL1 and groEL2 in Synechocystis sp. PCC 6803*. Microbiology, 2010. **156**(Pt 2): p. 442-51.
167. Alper, S., et al., *The Caenorhabditis elegans germ line regulates distinct signaling pathways to control lifespan and innate immunity*. J Biol Chem, 2010. **285**(3): p. 1822-8.
168. Arantes-Oliveira, N., et al., *Regulation of life-span by germ-line stem cells in Caenorhabditis elegans*. Science, 2002. **295**(5554): p. 502-5.
169. Hsin, H. and C. Kenyon, *Signals from the reproductive system regulate the lifespan of C. elegans*. Nature, 1999. **399**(6734): p. 362-6.
170. Ding, L. and E.P. Candido, *Association of several small heat-shock proteins with reproductive tissues in the nematode Caenorhabditis elegans*. Biochem J, 2000. **351**(Pt 1): p. 13-7.
171. Shih, J.W., et al., *Critical roles of RNA helicase DDX3 and its interactions with eIF4E/PABP1 in stress granule assembly and stress response*. Biochem J, 2012. **441**(1): p. 119-29.
172. Goulet, I., et al., *TDRD3, a novel Tudor domain-containing protein, localizes to cytoplasmic stress granules*. Hum Mol Genet, 2008. **17**(19): p. 3055-74.
173. Hird, S.N., J.E. Paulsen, and S. Strome, *Segregation of germ granules in living Caenorhabditis elegans embryos: cell-type-specific mechanisms for cytoplasmic localisation*. Development, 1996. **122**(4): p. 1303-12.
174. Zhang, Y., et al., *SEPA-1 mediates the specific recognition and degradation of P granule components by autophagy in C. elegans*. Cell, 2009. **136**(2): p. 308-21.
175. Kawakami, A., et al., *Identification and functional characterization of a TIA-1-related nucleolysin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(18): p. 8681-5.

176. Kiledjian, M. and G. Dreyfuss, *Primary structure and binding activity of the hnRNP U protein: binding RNA through RGG box*. EMBO J, 1992. **11**(7): p. 2655-64.
177. Inoue, H., et al., *The C. elegans p38 MAPK pathway regulates nuclear localization of the transcription factor SKN-1 in oxidative stress response*. Genes Dev, 2005. **19**(19): p. 2278-83.
178. Ghabrial, A. and T. Schupbach, *Activation of a meiotic checkpoint regulates translation of Gurken during Drosophila oogenesis*. Nat Cell Biol, 1999. **1**(6): p. 354-7.
179. Soulat, D., et al., *The DEAD-box helicase DDX3X is a critical component of the TANK-binding kinase 1-dependent innate immune response*. EMBO J, 2008. **27**(15): p. 2135-46.
180. Kirino, Y., et al., *Arginine Methylation of Vasa Protein Is Conserved across Phyla*. Journal of Biological Chemistry, 2010. **285**(11): p. 8148-8154.
181. Dougherty, E.C. and E.L. Hansen, *Axenic cultivation of Caenorhabditis briggsae (Nematoda: Rhabditidae). V. Maturation on synthetic media*. Proc Soc Exp Biol Med, 1956. **93**(2): p. 223-7.
182. Maduro, M. and D. Pilgrim, *Identification and cloning of unc-119, a gene expressed in the Caenorhabditis elegans nervous system*. Genetics, 1995. **141**(3): p. 977-88.
183. Paz-Gomez, D., E. Villanueva-Chimal, and R.E. Navarro, *The DEAD Box RNA helicase VBH-1 is a new player in the stress response in C. elegans*. PLoS One, 2014. **9**(5): p. e97924.
184. Rual, J.F., et al., *Toward improving Caenorhabditis elegans phenome mapping with an ORFeome-based RNAi library*. Genome Res, 2004. **14**(10B): p. 2162-8.
185. Conte, D., Jr. and C.C. Mello, *RNA interference in Caenorhabditis elegans*. Curr Protoc Mol Biol, 2003. **Chapter 26**: p. Unit 26 3.
186. Timmons, L., D.L. Court, and A. Fire, *Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in Caenorhabditis elegans*. Gene, 2001. **263**(1-2): p. 103-12.
187. Finney, M. and G. Ruvkun, *The unc-86 gene product couples cell lineage and cell identity in C. elegans*. Cell, 1990. **63**(5): p. 895-905.
188. Schneider, C.A., W.S. Rasband, and K.W. Eliceiri, *NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis*. Nat Methods, 2012. **9**(7): p. 671-5.

ANEXO I

The DEAD Box RNA Helicase VBH-1 Is a New Player in the Stress Response in *C. elegans*. Paz-Gómez D, Villanueva-Chimal E,

Navarro RE (2014). PLoS ONE 9(5): e97924. doi:

10.1371/journal.pone.0097924



The DEAD Box RNA Helicase VBH-1 Is a New Player in the Stress Response in *C. elegans*

Daniel Paz-Gómez, Emmanuel Villanueva-Chimal, Rosa E. Navarro*

Departamento de Biología Celular y Desarrollo, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México, Distrito Federal, México

Abstract

For several years, DEAD box RNA helicase Vasa (DDX4) has been used as a bona fide germline marker in different organisms. *C. elegans* VBH-1 is a close homolog of the Vasa protein, which plays an important role in gametogenesis, germ cell survival and embryonic development. Here, we show that VBH-1 protects nematodes from heat shock and oxidative stress. Using the germline-defective mutant *glp-4(bn2)* we found that a potential somatic expression of *vbh-1* might be important for stress survival. We also show that the VBH-1 paralog LAF-1 is important for stress survival, although this protein is not redundant with its counterpart. Furthermore, we observed that the mRNAs of the heat shock proteins *hsp-1* and *sip-1* are downregulated when *vbh-1* or *laf-1* are silenced. Previously, we reported that in *C. elegans*, VBH-1 was primarily expressed in P granules of germ cells and in the cytoplasm of all blastomeres. Here we show that during stress, VBH-1 co-localizes with CGH-1 in large aggregates in the gonad core and oocytes; however, VBH-1 aggregates do not overlap with CGH-1 foci in early embryos under the same conditions. These data demonstrate that, in addition to the previously described role for this protein in the germline, VBH-1 plays an important role during the stress response in *C. elegans* through the potential direct or indirect regulation of stress response mRNAs.

Citation: Paz-Gómez D, Villanueva-Chimal E, Navarro RE (2014) The DEAD Box RNA Helicase VBH-1 Is a New Player in the Stress Response in *C. elegans*. PLoS ONE 9(5): e97924. doi:10.1371/journal.pone.0097924

Editor: Christophe Antoniewski, CNRS UMR7622 & University Paris 6 Pierre-et-Marie-Curie, France

Received: November 8, 2013; **Accepted:** April 25, 2014; **Published:** May 20, 2014

Copyright: © 2014 Paz-Gómez et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This project was supported by grants from LOREAL/UNESCO, PAPIIT-UNAM (IN225509 and IN207412) and CONACYT-MEXICO (50896Q and 103856-Q). This study was performed in partial fulfillment of the requirements for the Ph.D. degree in Biomedical Sciences of DP at the Universidad Nacional Autónoma de México. DP received a Ph.D. fellowship from CONACYT-Mexico and a CONACYT/Grant fellowship (103856-Q) to complete his studies. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: rnavarro@ifc.unam.mx

Introduction

VBH-1 is a member of the broadly conserved family of DEAD box RNA helicases that regulate almost every step of RNA metabolism [1]. These proteins use ATP to rearrange the secondary structure of RNA and ribonucleoprotein (RNP) complexes [2]. In *C. elegans*, VBH-1 is a germline-enriched protein important for fertility and embryonic development [3]. Specifically, VBH-1 promotes the sperm-to-oocyte switch in *C. elegans* and might also be important in apoptosis during oogenesis and under stress [3–5]. Furthermore, in the related nematode *Caenorhabditis remanei*, VBH-1 participates in spermatogenesis [5]

laf-1, the paralog of *vbh-1*, is more ubiquitously expressed than *vbh-1* in *C. elegans* [6]. This protein plays a role in embryonic development, and together with VBH-1, LAF-1 promotes spermatogenesis [6]. The closest homologs to VBH-1 and LAF-1 in *D. melanogaster* are the RNA helicases Vasa and Belle, which are also important for fertility in this organism [3,7–10]. Vasa promotes mitotic chromosome segregation in the germline of *D. melanogaster* [11] and is required for embryonic patterning and female fertility, as this protein regulates germ cell specification, proliferation, and maintenance [7,9,12,13]. Although Vasa is expressed in the *D. melanogaster* testes, this protein does not play a role in spermatogenesis [13]. Vasa binds to *gurken* and *mei-P26* mRNAs in the germline of *D. melanogaster* and promotes protein translation through the recruitment of the translation initiation factor eIF5B [14–16].

Vasa and its orthologs in other species, collectively known as DDX4, are widely used as germline markers in organisms from hydra to humans [17]. However, the expression of DDX4 proteins has recently been detected in somatic tissues, such as human tumors [18], somatic blastomeres in sea urchin [19], and neoblast stem cells in the flatworms *Macrostomum lignano* and *Dugesia japonica* [20–22]. The role of DDX4 in somatic cells is not yet clear but these proteins might regulate mitotic cell cycle progression [11,23].

Belle is more ubiquitously expressed than Vasa and is required for both female and male fertility [8]. Similar to Vasa, Belle promotes mitotic chromosome segregation but in somatic cells [24]. Belle binds to the ecdysone-induced transcription factor *E74A* mRNA and positively regulates its translation [25]. The human homolog of Belle, DDX3, plays a role in tumorigenesis, regulating cell cycle control and apoptosis in somatic cells [26–28]. DED1, the homolog of VBH-1 and DDX3 in *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*, is involved in the response to the depletion of nitrogen or glucose, heat shock, and low temperature potentially through the replacement of the canonical translation initiation factor eIF4A in the unfolding of mRNAs [29–31].

In the present study, we observed that *vbh-1(RNAi)* animals are more sensitive to heat shock and oxidative stress than control nematodes, suggesting that VBH-1 plays an important role in the stress response in *C. elegans*. Using the germline-defective mutant *glp-4(bn2)*, we observed that a putative somatic expression of *vbh-1* might be important for this stress response. In addition, we observed that during stress, VBH-1 aggregates into granules in the

gonad and early embryos. Moreover, we demonstrated that the mRNAs of the heat shock proteins HSP-1 and SIP-1 are downregulated when *vbh-1* is silenced.

Results

VBH-1 is required for stress survival

We studied VBH-1 function through RNAi feeding because *vbh-1* null mutants are homozygous lethal (<http://www.wormbase.org>, release WS236, May 8, 2013). As a negative control for RNAi studies, we used the empty pPD129.36 plasmid (EP) as previously recommended [32]. To evaluate the efficiency of the RNAi, we compared the relative abundance of VBH-1 in protein extracts of control EP and *vbh-1(RNAi)* animals through Western blotting analysis (Figure 1A). An anti-VBH-1 antibody detects several bands around 70 kDa through Western blotting, reflecting posttranslational modifications [3]. In the present study, we observed two bands in the whole-protein extracts of control animals (Figure 1A). In the extracts from *vbh-1(RNAi)* animals, the higher molecular weight band was not detected, while the lower molecular weight band was less abundant than in control animals, indicating that *vbh-1* was silenced (Figure 1A). This result was further confirmed through semi-quantitative RT-PCR of control and *vbh-1(RNAi)* animals using *vbh-1* specific oligonucleotides, showing a reduction in the relative abundance of *vbh-1* mRNA (Figure 2A).

To examine the role of VBH-1 in heat shock we used a modified protocol from [33]. One-day-old *vbh-1(RNAi)* and control adult animals were incubated at 36°C, and the mortality of these animals was analyzed every hour. During the first three hours of incubation, no significant difference was observed between *vbh-1(RNAi)* and control animals (Figure 1B and Table S1). After 4 h at 36°C, there were ~25% less *vbh-1(RNAi)* animals than control animals, and this difference gradually increased with incubation time (Figure 1B and Table S1). After 7 h, only 5% *vbh-1(RNAi)* animals were alive compared with half of the control animals (Figure 1B and Table S1). These data suggest that VBH-1 is important for survival against heat shock in *C. elegans*.

VBH-1 and its paralog LAF-1 are partially redundant in germline sex determination [6]; therefore we examined the role of LAF-1 during heat shock using RNAi. Due to the lack of a specific antibody for LAF-1, the efficiency of the RNAi was examined using semi-quantitative RT-PCR analysis to compare the *laf-1* mRNA levels in control and *laf-1(RNAi)* animals. *laf-1* mRNA was less abundant in *laf-1(RNAi)* animals than in EP animals, suggesting that *laf-1* expression was silenced (Figure 2A). Because of the high degree of homology between *vbh-1* and *laf-1*, it was possible to achieve the unspecific silencing of *laf-1* using *vbh-1* RNAi and vice versa; therefore, we examined this possibility using RT-PCR. We did not observe cross silencing, as the relative amount of *vbh-1* and *laf-1* mRNA was unaffected when silencing *laf-1* and *vbh-1*, respectively (Figure 2A). The sensitivity of *laf-1(RNAi)* animals to heat shock was statistically significant after 6 h of incubation, and ~20% less animals were alive compared with the control animals. After 7 h of heat shock, only 36% of the animals were alive (Figure 1B and Table S1). These data suggest that LAF-1 is also important for the survival of animals to heat shock.

To determine whether VBH-1 and LAF-1 act redundantly, we silenced both genes using RNAi and tested the roles of these proteins during heat shock. We confirmed the efficiency of this double silencing through Western blotting for *vbh-1* (Figure 1A) and through RT-PCR analysis for *vbh-1* and *laf-1* (Figure 2A). As shown in Figures 1A and 2A, the silencing of both *vbh-1* and *laf-1* using RNAi was efficient. We observed that the silencing of *vbh-1*

was more efficient in *vbh-1(RNAi); laf-1(RNAi)* animals than in single *vbh-1(RNAi)* animals (Figures 1A and 2A). This observation potentially reflects the fact that the germline of *vbh-1(RNAi); laf-1(RNAi)* hermaphrodites is more affected than that in *vbh-1(RNAi)* animals; therefore, less *vbh-1* accumulation is observed in these animals. Up to 6 h, *vbh-1(RNAi); laf-1(RNAi)* animals exhibited survival rates similar to *vbh-1(RNAi)* animals at 36°C, but after 7 h at 36°C 17% of the animals remained alive, which was more than the *vbh-1(RNAi)* animals (5% alive) and less than the *laf-1(RNAi)* animals (36% alive, Figure 1B and Table S1). These data indicate that VBH-1 and its paralog LAF-1 are both required during heat shock and, unlike in spermatogenesis, these proteins do not act redundantly.

To determine whether VBH-1 and LAF-1 participate in other types of stress, we exposed RNAi-treated animals to oxidative stress. Control, *vbh-1(RNAi)*, *laf-1(RNAi)*, and double *vbh-1(RNAi); laf-1(RNAi)* one-day-old adult animals were placed on NGM plates with 20 µl of 15% hydrogen peroxide on top and the mortality of the animals was subsequently scored after 20 min. *vbh-1(RNAi)* animals were more sensitive to oxidative stress than control animals, as only 43% *vbh-1(RNAi)* animals were alive compared with 86% control animals (Figure 1D). *laf-1(RNAi)* and *vbh-1(RNAi); laf-1(RNAi)* animals were also more sensitive to oxidative stress than control animals, showing survival rates of 27% and 31% after treatment with hydrogen peroxide (Figure 1D). These data suggest that both VBH-1 and LAF-1 are required but not redundant in the oxidative stress response.

VBH-1 appears to be expressed in the soma which may contribute to stress protection

We have previously reported that *vbh-1* is germline enriched [3]. Although we did not detect VBH-1 in the somatic cells via immunostaining, the low levels of mRNA detected by Northern blotting suggested the possibility of low levels of protein expression [3]. To determine whether VBH-1 protective function comes from soma, germline, or both, we silenced *vbh-1* in *glp-4(bn2)* animals. The *glp-4* gene product is required for germline proliferation and, when raised at restrictive temperature, *glp-4(bn2)* hermaphrodites are severely depleted of germ cells [34]. If the expression of *vbh-1* in the germline is responsible for the effect of this protein in survival during stress, then *vbh-1* silencing in the germline-deficient mutant *glp-4(bn2)* would not impact survival under these conditions.

We observed that over 80% control *glp-4(bn2)* animals were alive after 7 h at 36°C, compared to only 54% in control wild type animals (Figure 1B and C, Table S1). This result suggests that *glp-4(bn2)* animals are more resistant to heat shock than wild type animals. Despite this, we found that *glp-4(bn2); vbh-1(RNAi)* animals were more sensitive to heat shock than *glp-4(bn2)* control animals (Figure 1C and Table S1), as only ~19% *glp-4(bn2); vbh-1(RNAi)* animals were alive after 10 h at 36°C compared with 61% control animals. These observations suggest that *vbh-1* expression in somatic tissues could contribute to the stress response. However, given that *glp-4(bn2)* mutants are not completely depleted from the germline, it is also possible that the low *vbh-1* expression in the remaining cells might contribute to survival during heat shock.

To analyze the probable somatic expression of *vbh-1*, we made a VBH-1 transgene under its own regulatory regions fused to the GFP reporter. To generate this transgene, we cloned in tandem a promoter region (608 bp), defined as the intergenic sequence upstream of *vbh-1*, the *gfp* coding gene without stop codon, and the genomic region from ATG to the end of the longest 3'UTR reported (2228 bp). Transgenic animals were generated using Mos1-mediated single copy insertion (MosSCI) [35,36]. We

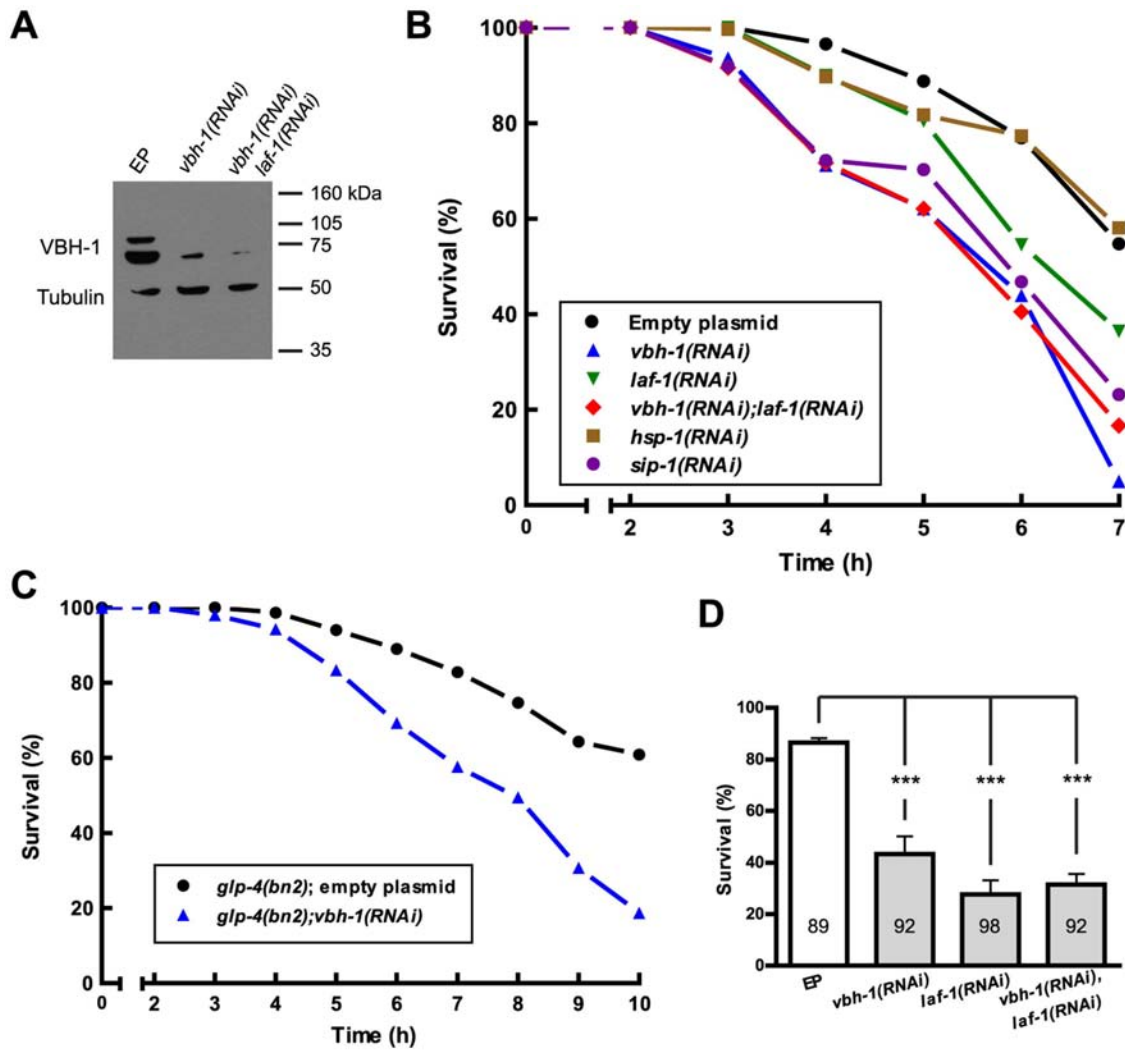


Figure 1. VBH-1 is required for stress survival. (A) Western blot analysis using whole animal protein extracts from 100 hermaphrodites of control (EP, empty plasmid), *vbh-1(RNAi)* and *vbh-1(RNAi);laf-1(RNAi)* animals grown at 25°C. The blot was probed with rabbit anti-VBH-1 and mouse anti-tubulin antibodies as a loading control. (B) Survival curve at 36°C for synchronized hermaphrodites in the indicated background. The data from different experiments were obtained and the percentage of the total was graphed. See Table S1. (C) Survival curve at 36°C for synchronized *glp-4(bn2)* hermaphrodites in the indicated background. The data from three different experiments were obtained, and the percentage of the total was graphed. (D) Survival rate for synchronized hermaphrodites in the indicated background after a 20 min exposure to NGM medium containing hydrogen peroxide. The average from three different experiments was graphed. The bars indicate SEM, *** means statistically significant $P < 0.001$, and the numbers inside each bar indicate the number of animals observed. doi:10.1371/journal.pone.0097924.g001

obtained two independent transgenic lines expressing the transgene *P_{vbh-1}::GFP::vbh-1::vbh-1 3'utr. 1) xmSi05*, with high expression in both soma and germline cells and 2) *xmSi06*, which is partially silenced in the germline. The silencing of single-copy transgenes in the germline is a known problem in *C. elegans* that has been shown to require the piRNA pathway [37].

Extruded gonads and embryos from *xmSi05* adults (soma and germline expression) were placed on a slide and observed under an epifluorescence microscope to analyze the location of the transgene. We have previously reported that VBH-1 is expressed in cytoplasmic foci, perinuclear germ granules termed P granules in germ cells, and diffusely expressed throughout the cytoplasm of all blastomeres [3]. The GFP transgene showed the same expression as the endogenous VBH-1 in germline cells and embryos (compare Figure 3A and C to Figures 4B and E, and 5A)

suggesting that the expression of the transgene was similar to endogenous VBH-1.

GFP::VBH-1 expression was observed in the intestine of *xmSi05* animals, but the high expression in the germline interfered with the observation. To overcome this complication, we used the *xmSi06* strain, which showed low expression in the germline. GFP::VBH-1 expression was observed in the cytoplasm of intestinal cells, with a clear enrichment in the apical pole in control animals (Figure 3F, arrows). The *C. elegans* intestine has autofluorescent lysosomes in the cytoplasm [38], which could be confused with GFP fluorescence. To overcome this effect, we silenced *vbh-1* with RNAi through feeding and compared the fluorescence in the intestines of RNAi animals to that in control animals. The fluorescent signal in the cytoplasm was reduced and the apical enrichment was not observed in *vbh-1(RNAi)* animals (Figure 3E), suggesting that the transgene is expressed in this

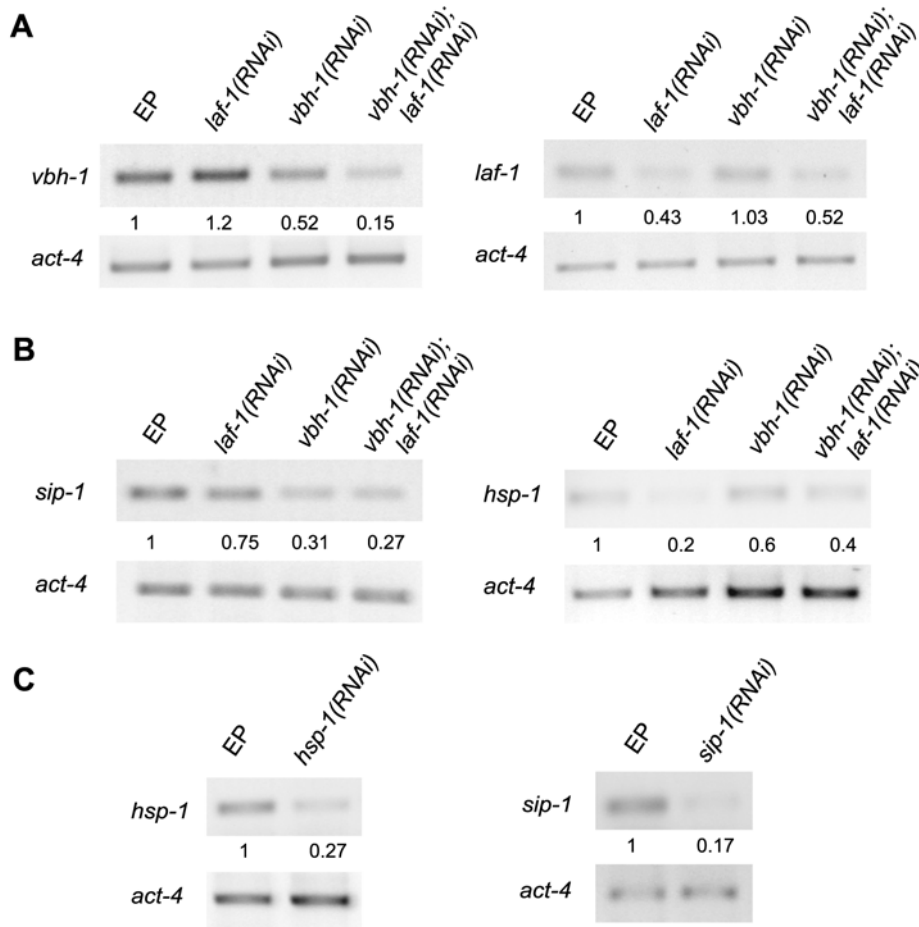


Figure 2. *sip-1* and *hsp-1* mRNAs are downregulated in *vbh-1*(RNAi) and *laf-1*(RNAi) animals. Semi-quantitative RT-PCR analysis using cDNA synthesized from RNA extracts obtained from one-day-old control (EP, empty plasmid), *laf-1*(RNAi), *vbh-1*(RNAi), *vbh-1*(RNAi);*laf-1*(RNAi), *hsp-1*(RNAi), and *sip-1*(RNAi) animals. Specific primers for *vbh-1*, *laf-1*, *hsp-1*, *sip-1*, and *act-4* were used. *act-4* was used as a loading control. (A) The efficiency of *vbh-1* and *laf-1* silencing and (B) downregulation of *sip-1* and *hsp-1* mRNAs in the indicated backgrounds. (C) The efficiency of *hsp-1* and *sip-1* silencing. Densitometric analysis was performed normalizing each band with its corresponding *act-4* band using ImageJ software. doi:10.1371/journal.pone.0097924.g002

region of the intestine. We next analyzed whether this localization changed during heat shock and observed that the cytosolic GFP signal in the intestinal cells was lower and became diffuse in the apical pole (Figure 3G, arrows). Although *xmSi06* animals show somatic *vbh-1* expression we cannot discard that this is an artifact of this transgene.

The mRNAs of the heat shock proteins SIP-1 and HSP-1 are downregulated in *vbh-1*(RNAi) and *laf-1*(RNAi) animals

Given that VBH-1 is important during the stress response, we identified putative targets in a microarray analysis in which transcripts from one-day-old *vbh-1*(RNAi) adults were compared to those of control animals of the same age at 20°C (unpublished data). Two heat shock protein mRNAs, *sip-1* and *hsp-1*, were downregulated in this analysis. SIP-1 is a member of the alpha-crystallin/Hsp20 family, while HSP-1 is a member of the Hsp70 family [39,40]. To confirm the abundance of *hsp-1* and *sip-1* mRNAs in control and *vbh-1*(RNAi) animals, we used semi-quantitative RT-PCR analysis. We observed that *sip-1* mRNA and, to a lesser extent, *hsp-1* mRNA were downregulated in *vbh-1*(RNAi) animals (Figure 2B).

Because LAF-1 was also important during stress, we decided to analyze whether these mRNAs were downregulated in *laf-1*(RNAi)

animals. We observed a reduction in the abundance of *hsp-1* mRNA and, to a lesser extent, in *sip-1* mRNA in *laf-1*(RNAi) animals (Figure 2B). As expected, we also observed that *sip-1* and *hsp-1* mRNAs were downregulated in *vbh-1*(RNAi); *laf-1*(RNAi) animals (Figure 2B). We concluded that VBH-1 and LAF-1 regulate the accumulation of *sip-1* and *hsp-1* mRNAs. However, VBH-1 might be more important for the regulation of *sip-1* mRNA, while LAF-1 could be more important for the accumulation of *hsp-1* mRNA.

To determine whether HSP-1 and SIP-1 are important for heat shock survival, we used RNAi to silence the genes encoding these proteins and assessed the survival of these animals at 36°C. First, we confirmed the efficiency of *hsp-1* and *sip-1* silencing through semi-quantitative RT-PCR (Figure 2C). Similar to *vbh-1*(RNAi) animals, *sip-1*(RNAi) animals incubated at 36°C were more sensitive than the control animals (Figure 1B and Table S1). In contrast, we did not observe statistically significant differences in *hsp-1*(RNAi) animals (Figure 1B and Table S1). We conclude that SIP-1 is important for heat shock survival, while HSP-1 appears to be not essential. It is also possible that *hsp-1* is important for the heat shock response, but because we used RNAi silencing instead of a null mutant, we did not fully appreciate the role of this protein.

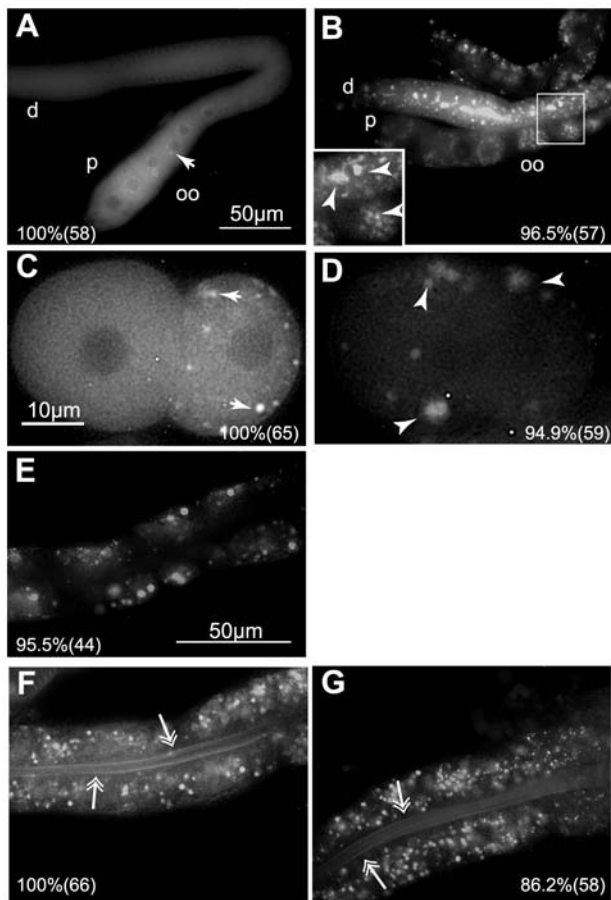


Figure 3. A *GFP::vbh-1* transgene is expressed in the intestine of *C. elegans*. Control (20°C) and heat shocked (30°C for 4 h) animals expressing the transgene *Pvvh-1::GFP::vbh-1::vbh-1 3'utr* were dissected and observed under an epifluorescence microscope. Localization of GFP::VBH-1 in (A) the gonads of control animals, (B) gonads after heat shock, (C) 2-cell embryos of control animals, (D) 2-cell embryos of heat shocked animals, and (E–G) guts of animals expressing the transgene *Pvvh-1::GFP::vbh-1::vbh-1 3'utr* (E) after *vbh-1(RNAi)*, (F) grown at 20°C, and (G) after heat shock. d = distal, p = proximal, oo = oocytes, the arrows indicate P granules, the arrowheads indicate embryonic foci formed after heat shock, the double arrows indicate the apical pole of intestinal cells. In the lower corner of each panel is indicated the percentage where the depicted phenotype was observed and the number of observed samples in parentheses.
doi:10.1371/journal.pone.0097924.g003

VBH-1 associates with large granules during stress in *C. elegans* gonads and embryos

Because the expression of *vbh-1* is higher in the germline, we analyzed the subcellular localization of VBH-1 in the gonad during heat shock. To induce heat shock, one-day-old N2 adults were incubated for 4 h at 30°C. We used a milder heat shock condition instead of the conditions used in the survival assay (36°C) because the germline and embryos are sensitive to heat shock. The extruded gonads from animals subjected to heat shock were fixed, immunostained with an anti-VBH-1 antibody and observed under an epifluorescence microscope to analyze the location of VBH-1. The gonad and regions of interest shown as insets are indicated in Figure 4A, H, O, V, C', J', and R'.

At 20°C, VBH-1 was observed in P granules and cytoplasmic foci and was diffusely expressed throughout the cytoplasm of germ cells (Figure 4 A, B, and E, arrows) as previously reported [3].

After heat shock, VBH-1 was visible as aggregates in the gonad core and oocytes [Figure 4H, I, L (arrowheads) and Q], and in large P granules in the gonad [Figure 4H, I, K (arrows), and Q]. A similar aggregation pattern was also observed for GFP::VBH-1 during heat shock (Figure 3B arrowheads). Several types of RNP complexes have been described in the germline and embryos of control and stressed *C. elegans* [41–43]. These RNPs share some proteins, including the DEAD box RNA helicase CGH-1 [41–43]. To determine whether VBH-1 associates with these previously described RNPs during heat shock, the extruded gonads were also immunostained with an anti-CGH-1 antibody [44]. VBH-1 colocalized with CGH-1 in the gonad core granules and large P granules observed during heat shock (Figure 4H–N, arrowheads). These data suggest that VBH-1 and CGH-1 associate with some of the same RNPs during heat shock.

The formation of large RNP complexes in the gonad of *C. elegans* were previously observed using a heat shock temperature of 34°C [42] instead of 30°C; therefore we decided to analyze *vbh-1* expression at this temperature. We observed that VBH-1 also aggregated with CGH-1 in the gonad core and oocytes of animals incubated at 34°C for 3 h, but these aggregates were smaller and less evident than those formed at 30°C (Figure 4O–U). However, incubation at 34°C was more efficient in terms of percentage of animals that have aggregates in both the gonad core and oocytes (Figure 4Q').

To determine whether VBH-1 and CGH-1 also aggregate in granules under other types of stress, we starved one-day-old hermaphrodites for 5 h and analyzed VBH-1 localization through immunofluorescent staining. In the gonads from starved animals, VBH-1 and CGH-1 were located in aggregates in the gonad core [Figure 4V–Y (arrowheads), and Q'], and these aggregates were smaller than those formed during heat shock (Figure 4H–K, arrowheads). Large P granules and oocyte aggregates were observed at a lower frequency under starvation (Figure 4V–B', and Q').

Ovulation arrest induces the formation of RNP granules in the *C. elegans* gonad [42,45]. To determine whether VBH-1 changes this expression pattern under this condition, we used *fog-2(q71)* hermaphrodites. FOG-2 is an F-box-containing protein required in the hermaphrodite gonad to direct spermatogenesis, and *fog-2(q71)* hermaphrodites do not make sperm and its ovulation is arrested until mating [46,47]. We immunostained the extruded gonads obtained from two-day-old mated and unmated *fog-2(q71)* adult hermaphrodites using anti-VBH-1 and anti-CGH-1 antibodies. VBH-1 colocalized with CGH-1 in large foci in the oocytes of virgin animals [Figure 4J'–P' (arrowheads), and Q'], and these foci were not observed in mated *fog-2(q71)* hermaphrodites (Figure 4C'–I'). Aggregates were observed in the distal core of the gonad, but these clusters appeared at a lower frequency compared with those formed during heat shock (Figure 4Q'). Together, these results show that VBH-1 associates in foci with CGH-1 in the hermaphrodite gonad after exposure to different types of stress.

VBH-1 is also diffusely expressed during embryogenesis in the cytoplasm of all blastomeres and P granules in germline blastomeres throughout embryogenesis [3]. To characterize the differences in the embryonic localization of VBH-1 we exposed one-day-old hermaphrodites to 30°C for 4 h, and immunostained these embryos with anti-VBH-1 and anti-CGH-1 antibodies. At 20°C, VBH-1 colocalized with CGH-1 in P granules in the germline blastomeres of early embryos (Figure 5A–C, arrows) and was diffusely expressed throughout the cytoplasm of all blastomeres (Figure 5A–C) as previously described [3]. Following heat shock, VBH-1 associated with large granules in both somatic and

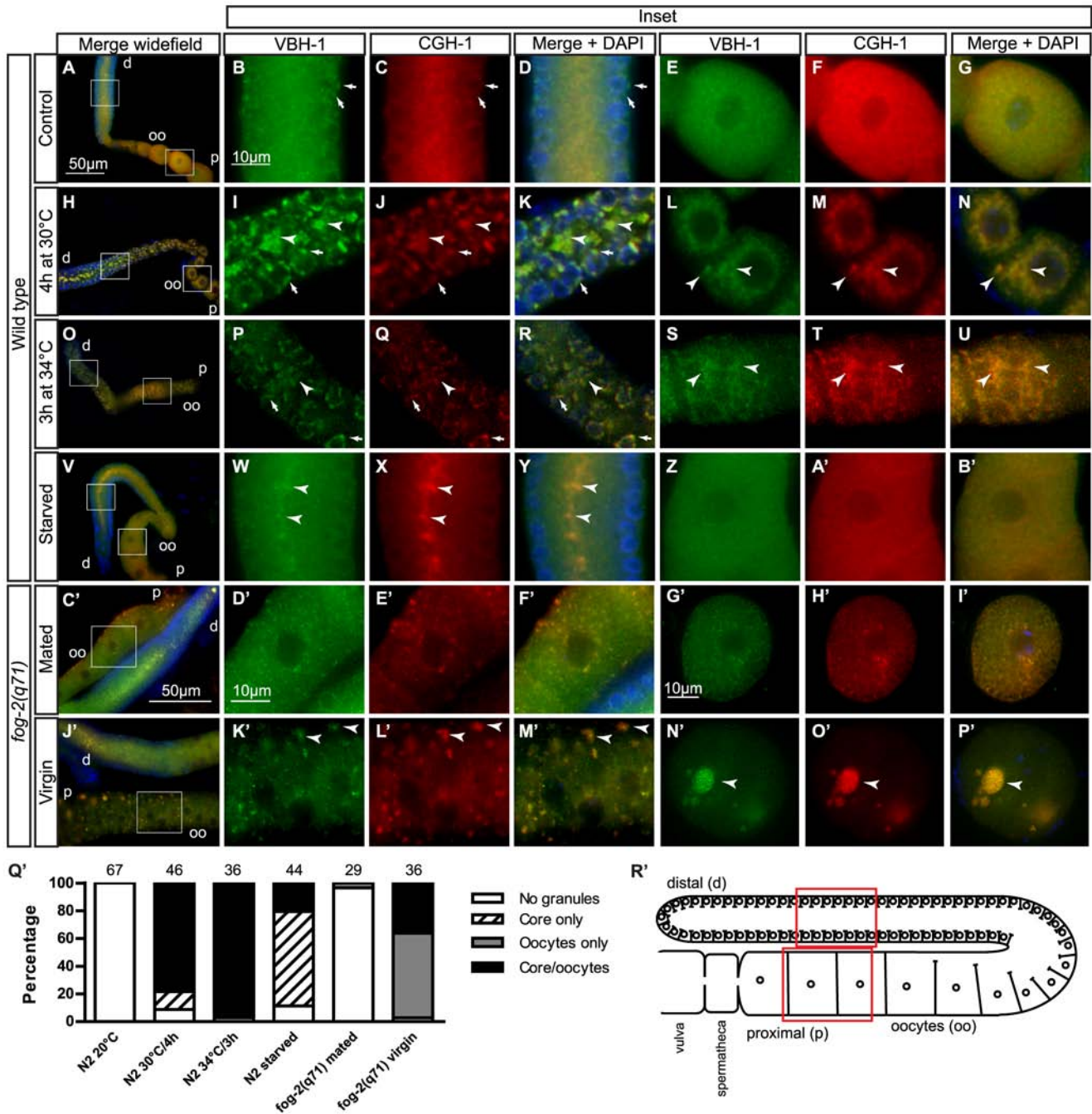


Figure 4. VBH-1 associates with CGH-1 into large foci in the gonad after stress. The extruded gonads of wild type and *fog-2(q71)* hermaphrodites were fixed and immunostained using anti-VBH-1 and anti-CGH-1 antibodies and DAPI to counterstain the DNA. Gonad of (A–G) N2 grown at 20°C, (H–N) N2 heat shocked for 4 h at 30°C, (O–U) N2 heat shocked for 3 h at 34°C, (V–B′) N2 placed on NGM plates without bacteria for 5 h, (C′–F′) feminized *fog-2(q71)* hermaphrodite mated, and (J′–M′) *fog-2(q71)* virgin animals. Oocytes from (G′–I′) *fog-2(q71)* hermaphrodite mated and (N′–P′) *fog-2(q71)* virgin animals. d = distal, p = proximal, oo = oocytes, the arrows indicate P granules, and the arrowheads indicate the formation of foci after each stress. Scale bar in A applies to all wide field images of wild type gonads (A, H, O, and V), scale bar in B applies to all insets of wild type gonads (B–G, I–N, P–U and W–B), scale bar in C′ applies also to J′. Scale bar in D′ is the same for D′–F′ and K′–M′, and scale bar in G′ is the same for H′–I′ and N′–P′. (Q′) Grouped graph summarizing the phenotypes observed, and the numbers above each bar indicate the number of animals analyzed. (R′) Cartoon of *C. elegans* gonad, representing the different regions. Red squares indicate regions of interest shown on insets. doi:10.1371/journal.pone.0097924.g004

germline blastomeres (Figure 5D, arrowheads). Interestingly, the localization of CGH-1 did not precisely overlap with VBH-1, but rather CGH-1 foci were close to VBH-1 aggregates (Figure 5D–F, arrowheads). These observations show that VBH-1 associates with large aggregates after fertilization that did not colocalize with

CGH-1 foci. However, both foci remained closely associated, suggesting a potential interaction between them. GFP::VBH-1 showed localization patterns similar to endogenous VBH-1 in control and heat shocked embryos (Figure 3C and D), suggesting that the transgene reproduces the endogenous expression of *vbh-1*.

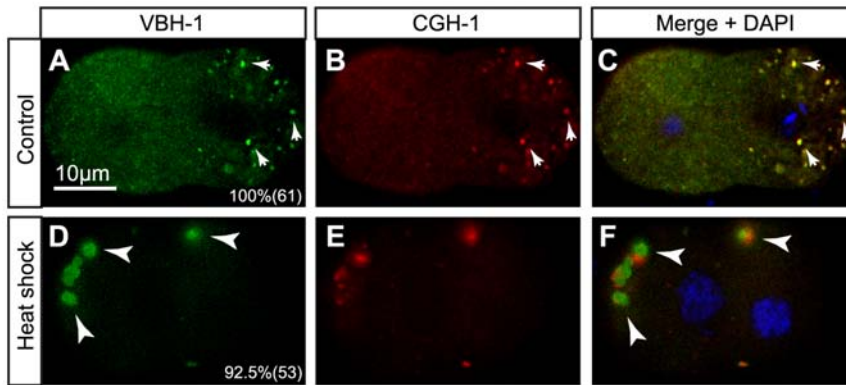


Figure 5. VBH-1 associates to large foci in early embryos after heat shock. The extruded embryos of wild type hermaphrodites were freeze cracked, fixed and immunostained using anti-VBH-1 and anti-CGH-1 antibodies and DAPI to counterstain the DNA. 2-cell embryos from N2 hermaphrodites (A–C) grown at 20°C and (D–F) heat shocked for 4 h at 30°C. The posterior pole of the embryo is oriented to the right. The arrows indicate P granules, the arrowheads indicate large foci, the numbers in the lower corner indicate the percentage where the depicted phenotype was observed and the number of embryos observed in parenthesis.
doi:10.1371/journal.pone.0097924.g005

Localization of VBH-1 to P granules depends on its helicase and C-terminus domains

To determine the domain requirement of VBH-1 for association with foci, we fused different regions of VBH-1 to green fluorescent protein (GFP) and analyzed the localization of this protein. To generate these transgenes, we cloned the N-terminus (VBH-1 N), helicase domain (VBH-1 Heli) and C-terminus (VBH-1 C) of VBH-1 (Figure 6A) into the pID3.01B destination vector [3] containing the promoter and 3'UTR of *pie-1* to drive germline expression and the GFP coding gene at the N-terminus. Constructs were introduced to *C. elegans* by standard biolistic transformation [48]. The transgenic animals were grown at 24°C to avoid germline silencing [49], followed by dissection and subsequent observation under an epifluorescence microscope. Because we used the regulatory regions of *pie-1*, these transgenes showed low expression in the distal region of the gonad, and only the oocytes and embryos were analyzed. Under control conditions, GFP::VBH-1 Heli and GFP::VBH-1 C were localized to the cytoplasm and P granules in embryos and oocytes (Figure 6D–E and N–O, arrows). This localization resembles that of endogenous VBH-1 (Figure 4E and 5A) and the transgene containing the full VBH-1 ORF (Figure 6B and L, arrows) [3]. Although the GFP::VBH-1 Heli P granules formed in oocytes were consistently less evident than GFP::VBH-1 C and full length GFP::VBH-1 P granules (Figure 6L, N–O). In contrast, GFP::VBH-1 N was diffusely expressed in the cytoplasm without association with P granules (Figure 6C and M). These observations show that under normal growth conditions, the C-terminus and, to a lesser extent, the helicase domain of VBH-1 are sufficient for VBH-1 localization into P granules, while the N-terminus was dispensable for this localization.

We next analyzed the localization of the transgenes in oocytes and embryos from animals subjected to heat shock at 30°C for 4 h. The three GFP-fused fragments of VBH-1 associated into large aggregates in somatic and germline blastomeres (Figure 6H–J, arrowheads) and oocytes (Figure 6R–T, arrowheads), as observed for the full VBH-1 transgene (Figure 6G and Q, arrowheads). This could suggest that the aggregation of VBH-1 under this condition does not depend on a specific domain but might reflect multiple interactions with other molecules. We also observed that, during heat shock, the GFP::VBH-1 C foci in oocytes were less visible and frequent than those formed by the other two fragments

tested (Figure 6R–T). We conclude that during heat shock, the N-terminus and helicase domains of VBH-1 seem to be sufficient for the localization of VBH-1 into granules in both oocytes and embryos, while the C-terminus seems to be less important for the association of VBH-1 into granules in oocytes than in early embryos.

To discard a GFP artifact in granule formation, we made a transgene that did not carry VBH-1 domains (*Ppie-1::GFP::pie-1 3'utr*) as a negative control. We did not observe the association of this transgene with P granules under control temperatures or the aggregation of this protein with large foci during stress (Figure 6F, K, P and U). These results suggest that foci or aggregations were not induced through GFP but are the results of VBH-1 properties. We observed a different cytoplasmic distribution of GFP (Figure 6U) in the oocytes of animals subjected to heat shock, which does not correspond to VBH-1 aggregates.

We observed nuclear localization of some of the transgenes carrying different VBH-1 fragments and, to a lesser extent, of the GFP transgene alone (Figure 6). Neither the endogenous VBH-1 nor the full VBH-1 transgene were localized in the nucleus (Figure 4, 5, 6B, G, L, and Q); therefore we think that the nuclear localization of the transgenes could be due to non-specific localization.

Discussion

In the present study, we analyzed the role of the DEAD box protein VBH-1 during stress. We observed that VBH-1 is important for the survival of *C. elegans* during heat shock and oxidative stress. Our results suggest a potential somatic expression of *vbh-1* that could be at least partially responsible for stress survival. We found that *sip-1* and *hsp-1* mRNAs, which encode two heat shock proteins, were downregulated in *vbh-1(RNAi)* animals, suggesting that these proteins could either be directly or indirectly regulated through VBH-1. Furthermore, we observed that LAF-1 (a close homolog of VBH-1) is also important for survival during stress, and *hsp-1* and *sip-1* mRNA were also downregulated in *laf-1(RNAi)* animals. In addition, we observed that VBH-1 aggregates in early embryos, the gonad core, oocytes and large P granules in heat-shocked animals. We also observed that the core helicase and C-terminal domains of VBH-1 are sufficient for association with P granules, while the aggregation of VBH-1 during stress does not

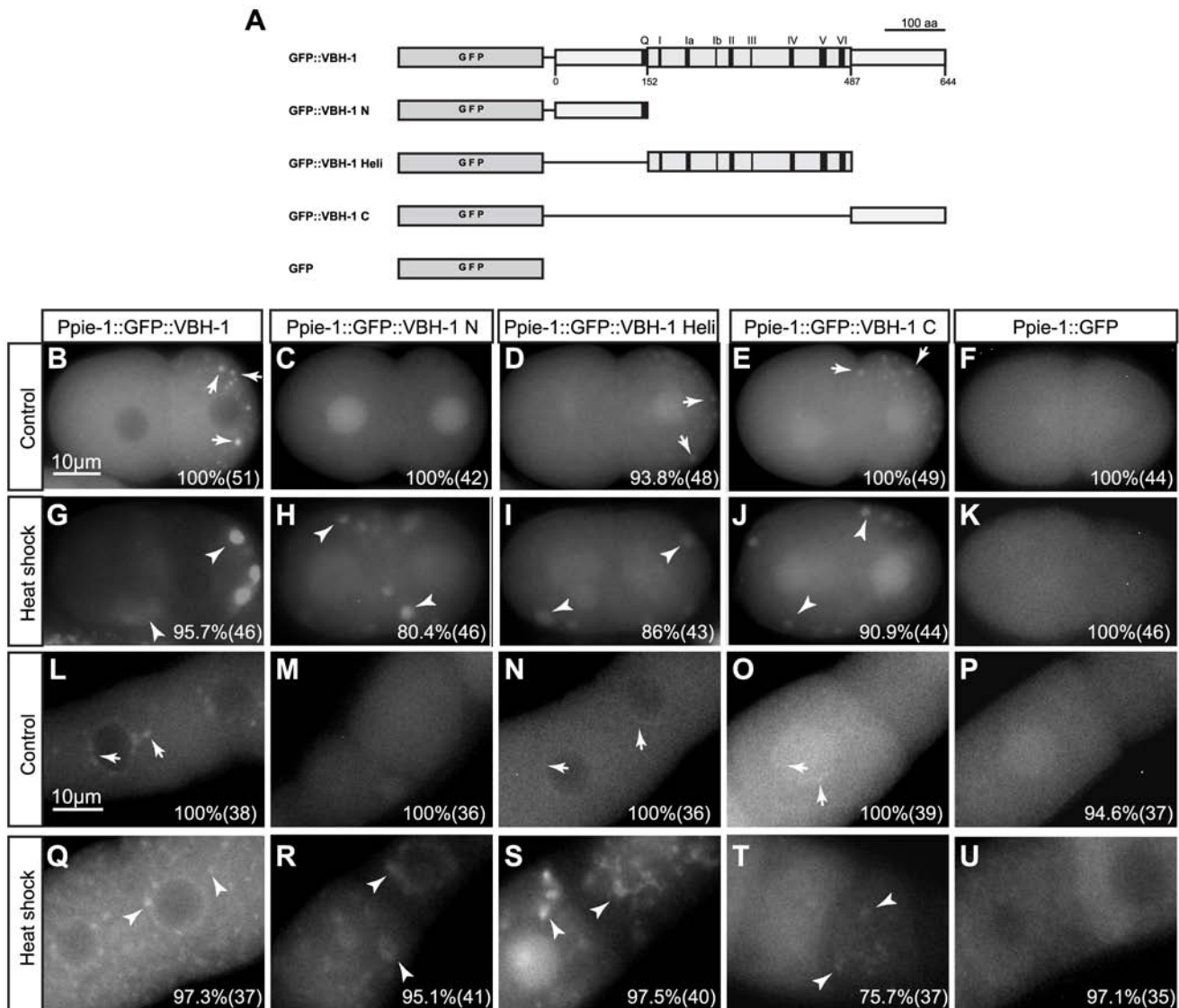


Figure 6. VBH-1 association with P granules depends on VBH-1 helicase and C-terminus domains. (A) Diagram of the transgenes constructed. Embryos from hermaphrodites expressing the indicated transgenes were mounted and microscopically observed under an epifluorescence microscope. (B–K) 2-cell embryos from (B–F) control and (G–K) heat shocked animals. (L–U) Oocytes from (L–P) control and (Q–U) heat shocked animals. The posterior pole of the embryo is oriented to the right. The arrows indicate P granules, the arrowheads indicate large foci, the numbers in the lower corner indicate the percentage where the depicted phenotype was observed and the number of samples observed is indicated in parentheses.

doi:10.1371/journal.pone.0097924.g006

depend on a specific motif. Although the N-terminus and helicase domains seem to be more important for this localization.

VBH-1 protects *C. elegans* from stress through the regulation of the stress response mRNAs *sip-1* and *hsp-1*

In the present study, we have shown that *vbh-1* silencing had a negative effect on the survival of animals during heat and oxidative stresses (Figure 1B–D). We suggest that the mRNAs of the heat shock proteins SIP-1 and HSP-1 are candidates of VBH-1 regulation during the stress response because 1) *sip-1* mRNA and, to a lesser extent, *hsp-1* mRNA were downregulated when *vbh-1* was silenced using RNAi, and 2) *sip-1* silencing negatively affected the survival of heat shocked animals in a manner similar to that of *vbh-1(RNAi)* animals. *hsp-1(RNAi)* animals were not more sensitive to heat shock than control animals, suggesting that *hsp-1*

is not required for a proper response to this stress, but it is also likely that *hsp-1(RNAi)* is not sufficient to completely eradicate the function of this protein during stress.

In other organisms, VBH-1 homologs are involved in the regulation of genetic expression through mRNA stabilization and translation [29,50]; therefore, it is possible that VBH-1 could be required for the stability or translation of *sip-1* and *hsp-1* mRNAs. It is likely that *sip-1* mRNA might require a protein, such as VBH-1, for protection from degradation as the transcription of this gene does not increase during heat shock [39], unlike other heat shock protein-coding genes, such as *hsp-1* [40].

VBH-1 could also regulate the translation of *sip-1* and *hsp-1* mRNAs. In *D. melanogaster*, the VBH-1 homolog Vasa positively regulates the translation of RNAs that have a polyU tract in the 3'UTR. Interestingly, the mRNA of *hsp-1* has a polyU tract in the

3'UTR (Figure S1), suggesting VBH-1 might regulate the translation of this protein if a similar regulation mechanism is conserved in VBH-1. In addition, the human VBH-1-related protein, DDX3, promotes the translation of stress related mRNAs possessing internal ribosome entry sites (IRES) [51]. The 5'UTR of *sip-1* mRNA does not have predicted IRES sites [52], while the 5'UTR of *hsp-1* is only 5 bp (<http://www.wormbase.org>, release WS236, May 8, 2013); therefore, it is unlikely that VBH-1 regulates the translation of these mRNAs through this mechanism. However, *hsp-3* [53] in *C. elegans* and Hsp70 proteins in *D. melanogaster* [54] and human [55] have IRES.

A third possibility is that VBH-1 might indirectly regulate the stability of *sip-1* and *hsp-1* mRNAs through the regulation of another gene, although the regulation of heat shock proteins through VBH-1-related helicases is conserved in other organisms. For example, in *D. melanogaster*, Vasa co-immunoprecipitates with the mRNAs of eight chaperones, two of which are members of the same families as SIP-1 and HSP-1, i.e., alpha-crystallin and Hsp70 [16]. Another example is the only DEAD box RNA helicase encoded in the cyanobacteria *Synechocystis* genome, CrhR, which regulates the stability of the chaperonines *groES*, *groEL1*, and *groEL2* mRNAs required for a proper response to stress [56].

The VBH-1 paralog LAF-1 is important for survival during stress and is also important for the accumulation of *hsp-1* and, to a lesser extent, *sip-1* transcripts. However, we did not observe an additive effect in survival when we silenced both genes, suggesting that the roles of VBH-1 and LAF-1 in stress responses might not be redundant. Given that RNAi-mediated silencing is not as efficient as a mutation, it is possible that both RNA helicases could be redundant during the stress response.

VBH-1 is also important in the induction of apoptosis in the germ cells under both normal and stress conditions [5], suggesting that this protein could have several targets during the stress response in *C. elegans* to ensure the survival of the animals, maintain oocyte quality, and preserve germline cells.

The potential somatic expression of *vbh-1* could protect *C. elegans* from stress

Using the germline-depleted mutant *glp-4(bn2)*, we observed that *glp-4(bn2)* animals are more resistant to heat shock than wild type animals. Accordingly, it has been reported that *glp-4(bn2)* animals show an enhanced survival when exposed to anoxia or Gram-negative bacterial pathogens [57,58]. These results suggest that germline-deficient mutants might have increased stress resistance.

We also found that the somatic expression of *vbh-1* was important for the survival of *C. elegans* under stress. We could not rule out that the expression of *vbh-1* in the germline could also play a role in stress survival given that 1) the difference between control and *vbh-1(RNAi)* animals is smaller in *glp-4(bn2)* than in wild type animals, 2) *glp-4(bn2)* grown at a restrictive temperature retains approximately 12 germ nuclei [34], and 3) the germline can signal to the soma and control lifespan [57,59,60].

This finding was unexpected because we have previously reported that VBH-1 was not detected in *glp-4(bn2)* animals based on Western blotting [3]. Although in this mutant, we detect a small expression of *vbh-1* mRNA through Northern blotting [3]. It is possible that the low somatic expression of *vbh-1* could not be detected through Western blotting or that our VBH-1 antibody does not detect somatic VBH-1 due to possible posttranslational modifications. We observed that GFP::VBH-1 is localized in the intestine of *C. elegans*, in which stress response proteins are commonly expressed [61]. Furthermore, the transgene is expressed in the apical pole of the intestinal cells, which express

HSP16 family chaperones belonging to the same group as SIP-1 under stress [62]. However, we cannot rule out that this localization is just an artifact of the transgene. Following stress, GFP::VBH-1 was enriched in the apical pole of intestinal cells, but this expression was more diffusely distributed. It is possible that this difference in the localization might be associated with the protective role of VBH-1 during stress.

VBH-1 associates with CGH-1 foci in the gonads and embryos upon stress

Under normal growth conditions, VBH-1 is diffusely expressed in the germ cell cytoplasm and associates with P granules [3]. Here, we showed that following stress, VBH-1 aggregates into foci in the gonad core and oocytes, where it associates with CGH-1. CGH-1 associates with several RNPs formed in the *C. elegans* gonad during stress [41–43,63] and the fact that VBH-1 colocalizes with CGH-1 suggests that these proteins might associate with the same RNPs during stress. Similar results have been observed with human DDX3, which associates with RNP complexes when overexpressed or after stress [64–66].

VBH-1 was also localized into large aggregates in both somatic and germline blastomeres during early embryogenesis after heat shock. The aggregates in somatic blastomeres are not P granules because these are asymmetrically inherited to the germline blastomeres and further disassembled and degraded through autophagy in somatic blastomeres [67,68]. One important difference between the aggregates formed in the gonad and those observed in early embryos is that in the latter, VBH-1 did not perfectly overlap with CGH-1; however, these proteins are closely associated. Depending on its interacting partners, CGH-1 could stabilize mRNA and repress translation or play a role in mRNA decay [63]. This suggests that during stress VBH-1 and CGH-1 could share a role in the germline, while after fertilization these proteins could play separate roles.

We observed that both the conserved helicase core and C-terminal domains of VBH-1 associate with P granules in oocytes and early embryos, suggesting that both regions are responsible to drive VBH-1 into these structures. This observation suggests that the localization of VBH-1 depends on binding to RNA, as both regions contain RNA binding motifs: the C terminal domain has three Glycine-rich RGG motifs [3,69], while the helicase region has motifs Ia, Ib, IV and V [50]. Unexpectedly, three different non-overlapping VBH-1 fragments associated into large foci during heat shock in oocytes and early embryos, suggesting that this association does not depend on a single interaction. However, the C-terminus of VBH-1 had less efficiency of foci formation in oocytes suggesting that the N-terminus and helicase domains are more important for the aggregation of VBH-1 during stress.

The three VBH-1 fragments tested were visible inside the nuclei of all blastomeres; however, the full *vbh-1* transgene expressed under the same promoter did not have nuclear localization. The GFP transgene was observed in the nuclei and cytoplasm of early embryos, but this protein was not as enriched in the nuclei as the other transgenes carrying VBH-1 fragments. In addition, immunostaining did not reveal endogenous VBH-1 in the nucleus, and VBH-1 does not have a predicted nuclear localization signal, unlike other members of the Belle/DDX3 family [8]. These findings suggest that nuclear localization of the transgenes could be due to non-specific localization.

Materials and Methods

C. elegans strains and growth conditions

C. elegans strains were maintained according to standard procedures [70]. The following *C. elegans* strains were used: the wild type variety Bristol strain N2, *fog-2(q71)* [46], *glp-4(bn2)* [34], *unc-119(ed3)* [71], EG6699 [*utTi5605 II*; *unc-119(ed3) III*; *oxEx1578*] [36], RN007 *xmSi05* [*Pvbh-1::GFP::vhh-1::vhh-1 3'utr*, *Cb unc-119(+)*] II (this study), and RN008 *xmSi06* [*Pvbh-1::GFP::vhh-1::vhh-1 3'utr*, *Cb unc-119(+)*] II (this study), *Ppie-1::GFP::vhh-1::pie-1 3'utr* [3], *Ppie-1::GFP::vhh-1 N::pie-1 3'utr* (this study), *Ppie-1::GFP::vhh-1 heli::pie-1 3'utr* (this study), *Ppie-1::GFP::vhh-1 C::pie-1 3'utr* (this study), and RN013 *xmSi24* [*Ppie-1::GFP::pie-1 3'utr*] (this study).

Cloning

Fragments corresponding to nucleotides 1610 through 1895 in the open reading frame (ORF) from the isoform a of *vhh-1* and nucleotides 125 through 308 in the ORF from the isoform a of *laf-1* (<http://www.wormbase.org>, release WS236, May 8, 2013) were PCR amplified using primers with restriction sites added to the 5' end. The following primers were used, and the restriction sites sequences are indicated in lowercase: for *vhh-1* 5'-gaa-gatcttcGTCGTGGTGGTGGTGGATCG-3' and 5'-gtcttag-gagcGGAGCCTGGCCTGGGTTTG-3'; and for *laf-1* 5'-gaattccGTGGAACCGTGGATACAATAATAATCG-3' and 5'-ggggtaccccCCATCGCCTCCATTATCCCG-3'. The purified PCR products were digested with BglII and XbaI for *vhh-1* and EcoRI and KpnI for *laf-1*. The digested fragments were cloned into the pPD129.36 vector [72] previously digested with the same restriction enzymes. For the double *vhh-1* and *laf-1* RNAi, we digested the pPD129.36(*vhh-1*) plasmid with PvuII and PciI to obtain the *vhh-1* fragment together with the flanking T7 promoters and subcloned this fragment into the region of the pPD129.36(*laf-1*) vector between the TfiI (blunt-ended) and PciI restriction sites. All plasmids were confirmed through sequencing.

RNA interference

RNAi silencing was performed through feeding at 25°C using standard methods [32,73]. Briefly, RNAi vectors were transformed into the *E. coli* strain HT115(DE3). The transformed bacteria were cultured overnight in LB broth containing 50 µg/ml ampicillin and 12.5 µg/ml tetracycline. The dsRNA synthesis was induced overnight on NGM plates supplemented with ampicillin (50 µg/ml) and IPTG (1 mM). Subsequently, gravid N2 Bristol or *glp-4(bn2)* animals were collected in M9 buffer and lysed with a mixture of 5 N NaOH and bleach (1:2) using standard procedures [74]. The obtained embryos were hatched overnight in M9. L1 larvae were placed onto NGM plates containing induced bacteria and incubated at 25°C until adulthood. To induce RNAi in *sip-1* and *hsp-1*, the clones were obtained from the RNAi library (Open Biosystems) and confirmed through sequencing [75].

Survival assays

Heat shock was performed as previously described [33], with some modifications. Briefly, synchronized L1 worms were incubated at 25°C on NGM plates prepared for RNAi for 40 h and subsequently transferred to several 35 mm NGM plates for heat shock (30–40 worms per plate). The plates were incubated for up to 10 h at 36°C, and every hour a plate was taken from the incubator to observe animals under a stereoscopic microscope. Animals without pharyngeal pumping that did not respond to touch were scored as dead, while burst animals were discarded. The data from different experiments were obtained, and the

percentage of the total was graphed. Eight experiments were conducted for EP and *hsp-1(RNAi)*, six for *laf-1 (RNAi)*, five for *vhh-1(RNAi)*, four for *vhh-1(RNAi)*; *laf-1(RNAi)*, and three experiments were conducted for *sip-1(RNAi)* and *glp-4(bn2)* animals.

To induce oxidative stress, we placed 30–40 RNAi animals onto 35 mm NGM plates layered on top with 20 µl of 15% hydrogen peroxide, and the dead animals were scored after 20 min at 25°C. The average from three different experiments was graphed. Statistical analysis and graphing were conducted using Prism software (GraphPad).

RT-PCR

The RNA was purified using TRIzol (Life Technologies) and used as a template to synthesize cDNA using the ImProm-II Reverse Transcriptase kit (Promega) according to the manufacturer's instructions. The obtained cDNA was used in a PCR reaction using the following primers: for *hsp-1* 5'-CATGGT-CAACGAAGCTGAGA-3' and 5'-TTCCAAATCCTTCTGTTGGTG-3'; for *sip-1* 5'-ACAA-CATCGTGCCACAACAG-3' and 5'-TGGTCATCTGTCTTCCTTG-3'; for *vhh-1* 5'-CGCCAACGGAACCTCCGTCAAAC-3' and 5'-CCGGCCCCAAAACCAGCTTCATT-3', and for *laf-1* 5'-GTCCGATCACCGTTATCAA-3' and 5'-CTCCAC-CAATCCTGTTGAGG-3'.

Immunostaining

Immunostaining was performed as previously described [44]. Briefly, extruded gonads and embryos were freeze-cracked and fixed with ice-cold methanol for 1 min, followed by treatment with 1X PBS, 3.7% formaldehyde, 80 mM HEPES, 1.6 mM MgSO₄ and 0.8 mM EGTA at room temperature for 20 min. The samples were washed in PBT (PBS, 0.5% Tween 20) and blocked for 30 min in 30% normal goat serum with 0.2% azide in PBT. The samples were incubated with the indicated primary antibody overnight at 4°C, followed by 1 h of incubation at room temperature with the secondary antibody. The following antibodies and dilutions were used: rabbit anti-VBH-1 (1:100) [3], rat anti-CGH-1 (1:30) [44], FITC conjugated goat anti-rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch, 1:100) and Cy3 conjugated goat anti-rat IgG (Jackson ImmunoResearch, 1:100). The DNA was counterstained with DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole, 1 ng/µl) and mounted with Vectashield Mounting Medium (Vector Labs) to prevent photobleaching.

Image acquisition and processing

The images were obtained on a Nikon Eclipse E600 microscope equipped with an AxioCam MRc camera (Zeiss). The pictures were captured using AxioVision software (Zeiss) and deconvolved using ImageJ software [76] with Parallel Spectral Deconvolution and Diffraction PSF 3D plugins. The deconvolved images were processed using ImageJ and Illustrator CS5 software (Adobe).

Transgene construction

Cloning *vhh-1* for biolistic transformation was performed using Gateway technology (Invitrogen). The cDNA clone yk624f9, obtained from the Kohara Lab, was used as a template for PCR as previously described [3]. The following primers were used: 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTAACACA-CAATATTATGCG-3' and 5'-GGGGACCACTTTTGTACAA-GAAAGCTGGGTTTTCTGGACAGGAGTCCG-3' for *vhh-1 N*, 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCC-GACTCCTGTCCAGAAAC-3' and 5'-GGGGACCACTTTG-

TACAAGAAAGCTGGGTGATTCTCGATTCTTGTC-3' for *vbh-1 heli*, and 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGACAAGAATCGAGGAATC-3' and 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTAAGCTTGTGGAGCTTG-3' for *vbh-1 C*. The PCR products were purified and cloned into the donor vector pDONR201. The fragments cloned were further recombined into the expression vector pID3.01b obtained from the Seydoux lab. The obtained plasmids were confirmed through sequencing.

The cloning of *vbh-1* for single-copy insertion was performed using the Multisite Gateway Three Fragment Vector Construction Kit (Invitrogen). For the promoter, we amplified a 608 bp fragment of the intergenic region upstream *vbh-1*, and for the coding region containing the 3'UTR, we amplified the region from the ATG to the end of the longest 3'UTR reported (<http://www.wormbase.org>, release WS236, May 8, 2013). The following primers were used: 5'-GGGGACAACCTTTGTATAGAAAAGTTGCAGCTTTTGTGGTGCCTGACC-3' and 5'-GGGGACTGCCTTTTTGTACAACTTGTCAATGTAAGACTATATCAACCG-3' for promoter; and 5'-GGGGACAGC-TTCTTTGTACAAGTGGCAATGAACACACAATATTATGCGAATCACAACCG-3' and 5'-GGGGACAACCTTTGTATAATAAAGTTGGACTATTTGTCAGGCCACAAGGGC-3' for the coding region. The PCR products were purified, and the promoter fragment was cloned through recombination in the donor vector pDONRP4-PIR, while the coding region was cloned into pDONRP2R-P3 to generate entry clones. In both cases, genomic DNA was used as a template, and the inserts were confirmed through sequencing. For the GFP sequence, we used the entry clone pCM1.53 obtained from the Seydoux Lab 2007 vector kit (Addgene plasmid 17250) [77].

For the *Ppie::GFP::pie-1 3'utr* transgene we used the following vectors from the Seydoux lab: pCM1.127 (*pie-1* promoter, Addgene plasmid 21384), pCM1.53 (GFP, Addgene plasmid 17250), and pCM5.47 (*pie-1 3'utr*, Addgene 17254). The three fragments were cloned in tandem through recombination into the pCFJ150 vector obtained from the Jorgensen lab (Addgene plasmid 19329) [36]. The plasmid were confirmed through sequencing.

Generation of transgenic strains

The fragments cloned into the pID3.01b vector were bombarded into *unc-119(ed3)* animals using standard procedures [48].

References

- Jankowsky E (2011) RNA helicases at work: binding and rearranging. *Trends Biochem Sci* 36: 19–29.
- Tanner NK, Linder P (2001) DExD/H box RNA helicases: from generic motors to specific dissociation functions. *Mol Cell* 8: 251–262.
- Salinas LS, Maldonado E, Macias-Silva M, Blackwell TK, Navarro RE (2007) The DEAD box RNA helicase VBH-1 is required for germ cell function in *C. elegans*. *Genesis* 45: 533–546.
- Salinas LS, Maldonado E, Navarro RE (2006) Stress-induced germ cell apoptosis by a p53 independent pathway in *Caenorhabditis elegans*. *Cell Death Differ* 13: 2129–2139.
- Salinas LS, Franco-Cea A, Lascarez-Lagunas LI, Villanueva-Chimal E, Maldonado E, et al. (2012) Germ cell survival in *C. elegans* and *C. remanei* is affected when the DEAD box RNA helicases VBH-1 or Cre-VBH-1 are silenced. *Genesis* 50: 801–818.
- Hubert A, Anderson P (2009) The *C. elegans* sex determination gene *laf-1* encodes a putative DEAD-box RNA helicase. *Dev Biol* 330: 358–367.
- Hay B, Jan LY, Jan YN (1988) A protein component of *Drosophila* polar granules is encoded by *vasa* and has extensive sequence similarity to ATP-dependent helicases. *Cell* 55: 577–587.
- Johnstone O, Deuring R, Bock R, Linder P, Fuller M, et al. (2005) Belle is a *Drosophila* DEAD-box protein required for viability and in the germ line. *Dev Biol* 277: 92–101.
- Lasko PF, Ashburner M (1988) The product of the *Drosophila* gene *vasa* is very similar to eukaryotic initiation factor-4A. *Nature* 335: 611–617.
- Bezares-Calderon LA, Becerra A, Salinas LS, Maldonado E, Navarro RE (2010) Bioinformatic analysis of P granule-related proteins: insights into germ granule evolution in nematodes. *Dev Genes Evol* 220: 41–52.
- Pek JW, Kai T (2011) A role for *vasa* in regulating mitotic chromosome condensation in *Drosophila*. *Curr Biol* 21: 39–44.
- Breitwieser W, Markussen FH, Horstmann H, Ephrussi A (1996) Oskar protein interaction with *Vasa* represents an essential step in polar granule assembly. *Genes & Development* 10: 2179–2188.
- Lasko PF, Ashburner M (1990) Posterior localization of *vasa* protein correlates with, but is not sufficient for, pole cell development. *Genes Dev* 4: 905–921.
- Johnstone O, Lasko P (2004) Interaction with eIF5B is essential for *Vasa* function during development. *Development* 131: 4167–4178.
- Carrera P, Johnstone O, Nakamura A, Casanova J, Jackle H, et al. (2000) VASA mediates translation through interaction with a *Drosophila* yIF2 homolog. *Mol Cell* 5: 181–187.
- Liu N, Han H, Lasko P (2009) *Vasa* promotes *Drosophila* germline stem cell differentiation by activating *mei-P26* translation by directly interacting with a (U)-rich motif in its 3' UTR. *Genes Dev* 23: 2742–2752.
- Raz E (2000) The function and regulation of *vasa*-like genes in germ-cell development. *Genome Biol* 1: REVIEWS1017.
- Hashimoto H, Sudo T, Mikami Y, Otani M, Takano M, et al. (2008) Germ cell specific protein VASA is over-expressed in epithelial ovarian cancer and disrupts DNA damage-induced G2 checkpoint. *Gynecol Oncol* 111: 312–319.

The BioRad Biolistic PDS-1000/He particle delivery system with Hepta adapter was used at 1500 psi. Animals that lost the *Unc-119* phenotype and expressed GFP were selected.

Pobb-1::GFP::vbh-1::vbh-1 3'utr transgenic animals were generated through *Mos1*-mediated single copy insertion [35,36]. Briefly, one-day-old EG6699 (*tTi5605*) adults were microinjected using a mixture containing the following plasmids: pCFJ150 with the transgene *Pobb-1::GFP::vbh-1::vbh-1 3'utr* cloned (10 ng/μl), pCFJ601 (*Peft::Mos1 transposase*, 10 ng/μl), the negative selection marker pMA122 (*Phsp-16.1::peel-1*, 10 ng/μl), and the co-injection markers pCFJ104 (*Pmyo-3::mCherry*, 10 ng/μl), pGH8 (*Prab-3::mCherry*, 10 ng/μl), and pCFJ90 (*Pmyo-2::mCherry*, 2 ng/μl). The injected worms were incubated at 24°C for several days, and the *unc-119(+)* animals were heat shocked at 34°C for 2 h. The living animals were isolated, and their progeny was analyzed using a fluorescence microscope. GFP-expressing animals with no *mCherry* expression were selected.

Ppie-1::GFP::pie-1 3'utr transgenic animals were generated in a similar manner using the following modifications in the injection mix: pCFJ150 (20 ng/μl), pCFJ601 (50 ng/μl), pMA122 (10 ng/μl), pCFJ104 (5 ng/μl), pGH8 (10 ng/μl), and pCFJ90 (2.5 ng/μl).

Supporting Information

Figure S1 The 3'UTR of *hsp-1* mRNA has polyU tracts. 3' UTR of *hsp-1* mRNA, and the Uridines are highlighted in gray for clarity.

(TIF)

Table S1 Summary of survival data.

(DOC)

Acknowledgments

The authors would like to thank Dr. Erik M. Jorgensen, C. Frøkjær-Jensen, and G. Hlopeter for kindly providing technical advice and reagents. The authors would also like to thank Laura S. Salinas for technical assistance and G. Seydoux for reagents and advice. Some strains were provided by the CGC, which is funded by NIH Office of Research Infrastructure.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: DP REN EV. Performed the experiments: DP REN EV. Analyzed the data: DP REN. Contributed reagents/materials/analysis tools: REN. Wrote the paper: DP REN.

19. Voronina E, Lopez M, Juliano CE, Gustafson E, Song JL, et al. (2008) Vasa protein expression is restricted to the small micromeres of the sea urchin, but is inducible in other lineages early in development. *Dev Biol* 314: 276–286.
20. Shibata N, Umesono Y, Orii H, Sakurai T, Watanabe K, et al. (1999) Expression of vasa(vas)-related genes in germline cells and totipotent somatic stem cells of planarians. *Dev Biol* 206: 73–87.
21. Yajima M, Wessel GM (2011) The multiple hats of Vasa: Its functions in the germline and in cell cycle progression. *Molecular Reproduction and Development* 78: 861–867.
22. Gustafson EA, Wessel GM (2010) Vasa genes: Emerging roles in the germ line and in multipotent cells. *BioEssays* 32: 626–637.
23. Yajima M, Wessel GM (2011) The DEAD-box RNA helicase Vasa functions in embryonic mitotic progression in the sea urchin. *Development* 138: 2217–2222.
24. Pek JW, Kai T (2011) DEAD-box RNA helicase Belle/DDX3 and the RNA interference pathway promote mitotic chromosome segregation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 12007–12012.
25. Ihry RJ, Sapiro AL, Bashirullah A (2012) Translational control by the DEAD Box RNA helicase belle regulates ecdysone-triggered transcriptional cascades. *PLoS Genet* 8: e1003085.
26. Chao CH, Chen CM, Cheng PL, Shih JW, Tsou AP, et al. (2006) DDX3, a DEAD box RNA helicase with tumor growth-suppressive property and transcriptional regulation activity of the p21waf1/cip1 promoter, is a candidate tumor suppressor. *Cancer Res* 66: 6579–6588.
27. Sun M, Song L, Li Y, Zhou T, Jope RS (2008) Identification of an antiapoptotic protein complex at death receptors. *Cell Death Differ* 15: 1887–1900.
28. Li Y, Wang H, Wang Z, Makhija S, Buchsbaum D, et al. (2006) Inducible resistance of tumor cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor 2-mediated apoptosis by generation of a blockade at the death domain function. *Cancer Res* 66: 8520–8528.
29. Owttrim GW (2006) RNA helicases and abiotic stress. *Nucleic Acids Res* 34: 3220–3230.
30. Liu HY, Nefsky BS, Walworth NC (2002) The Ded1 DEAD box helicase interacts with Chk1 and Cdc2. *J Biol Chem* 277: 2637–2643.
31. Schade B, Jansen G, Whiteway M, Entian KD, Thomas DY (2004) Cold adaptation in budding yeast. *Mol Biol Cell* 15: 5492–5502.
32. Conte DJr, Mello CC (2003) RNA interference in *Caenorhabditis elegans*. *Curr Protoc Mol Biol* Chapter 26: Unit 26 23.
33. Arsenovic PT, Maldonado AT, Colletuori VD, Bloss TA (2012) Depletion of the *C. elegans* NAC engages the unfolded protein response, resulting in increased chaperone expression and apoptosis. *PLoS One* 7: e44038.
34. Beanan MJ, Strome S (1992) Characterization of a germ-line proliferation mutation in *C. elegans*. *Development* 116: 755–766.
35. Frokjaer-Jensen C, Davis MW, Ailion M, Jorgensen EM (2012) Improved Mos1-mediated transgenesis in *C. elegans*. *Nat Methods* 9: 117–118.
36. Frokjaer-Jensen C, Davis MW, Hopkins CE, Newman BJ, Thummel JM, et al. (2008) Single-copy insertion of transgenes in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Genet* 40: 1375–1383.
37. Shirayama M, Seth M, Lee HC, Gu W, Ishidate T, et al. (2012) piRNAs initiate an epigenetic memory of nonself RNA in the *C. elegans* germline. *Cell* 150: 65–77.
38. Clokey GV, Jacobson LA (1986) The autofluorescent “lipofuscin granules” in the intestinal cells of *Caenorhabditis elegans* are secondary lysosomes. *Mech Ageing Dev* 35: 79–94.
39. Linder B, Jin Z, Freedman JH, Rubin CS (1996) Molecular characterization of a novel, developmentally regulated small embryonic chaperone from *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem* 271: 30158–30166.
40. Snutch TP, Heschl MF, Baillie DL (1988) The *Caenorhabditis elegans* hsp70 gene family: a molecular genetic characterization. *Gene* 64: 241–255.
41. Boag PR, Atalay A, Robida S, Reinke V, Blackwell TK (2008) Protection of specific maternal messenger RNAs by the P body protein CGH-1 (Dhh1/RCK) during *Caenorhabditis elegans* oogenesis. *J Cell Biol* 182: 543–557.
42. Jud MC, Czerwinski MJ, Wood MP, Young RA, Gallo CM, et al. (2008) Large P body-like RNPs form in *C. elegans* oocytes in response to arrested ovulation, heat shock, osmotic stress, and anoxia and are regulated by the major sperm protein pathway. *Dev Biol* 318: 38–51.
43. Noble SL, Allen BL, Goh LK, Nordick K, Evans TC (2008) Maternal mRNAs are regulated by diverse P body-related mRNP granules during early *Caenorhabditis elegans* development. *J Cell Biol* 182: 559–572.
44. Navarro RE, Shim EY, Kohara Y, Singson A, Blackwell TK (2001) cgh-1, a conserved predicted RNA helicase required for gametogenesis and protection from physiological germline apoptosis in *C. elegans*. *Development* 128: 3221–3232.
45. Jud M, Razelun J, Bickel J, Czerwinski M, Schisa J (2007) Conservation of large foci formation in arrested oocytes of *Caenorhabditis* nematodes. *Dev Genes Evol* 217: 221–226.
46. Schedl T, Kimble J (1988) fog-2, a germ-line-specific sex determination gene required for hermaphrodite spermatogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 119: 43–61.
47. Clifford R, Lee MH, Nayak S, Ohmachi M, Giorgini F, et al. (2000) FOG-2, a novel F-box containing protein, associates with the GLD-1 RNA binding protein and directs male sex determination in the *C. elegans* hermaphrodite germline. *Development* 127: 5265–5276.
48. Praitis V, Casey E, Collar D, Austin J (2001) Creation of low-copy integrated transgenic lines in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 157: 1217–1226.
49. Strome S, Powers J, Dunn M, Reese K, Malone CJ, et al. (2001) Spindle dynamics and the role of gamma-tubulin in early *Caenorhabditis elegans* embryos. *Mol Biol Cell* 12: 1751–1764.
50. Parsany A, Svitkin Y, Shahbazian D, Gkogkas C, Lasko P, et al. (2011) mRNA helicases: the tacticians of translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12: 235–245.
51. Shih JW, Tsai TY, Chao CH, Wu Lee YH (2008) Candidate tumor suppressor DDX3 RNA helicase specifically represses cap-dependent translation by acting as a eIF4E inhibitory protein. *Oncogene* 27: 700–714.
52. Grillo G, Turi A, Licciulli F, Mignone F, Liuni S, et al. (2010) UTRdb and UTRsite (RELEASE 2010): a collection of sequences and regulatory motifs of the untranslated regions of eukaryotic mRNAs. *Nucleic Acids Res* 38: D75–80.
53. Li D, Wang M (2012) Construction of a bicistronic vector for the co-expression of two genes in *Caenorhabditis elegans* using a newly identified IRES. *Biotechniques* 52: 173–176.
54. Hernandez G, Vazquez-Pianzola P, Sierra JM, Rivera-Pomar R (2004) Internal ribosome entry site drives cap-independent translation of reaper and heat shock protein 70 mRNAs in *Drosophila* embryos. *RNA* 10: 1783–1797.
55. Rubtsova MP, Sizova DV, Dmitriev SE, Ivanov DS, Prassolov VS, et al. (2003) Distinctive properties of the 5′-untranslated region of human hsp70 mRNA. *J Biol Chem* 278: 22350–22356.
56. Prakash JS, Krishna PS, Sirisha K, Kanesaki Y, Suzuki I, et al. (2010) An RNA helicase, CrhR, regulates the low-temperature-inducible expression of heat-shock genes groES, groEL1 and groEL2 in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Microbiology* 156: 442–451.
57. Alper S, McElwee MK, Apfeld J, Lackford B, Freedman JH, et al. (2010) The *Caenorhabditis elegans* germ line regulates distinct signaling pathways to control lifespan and innate immunity. *J Biol Chem* 285: 1822–1828.
58. Mendenhall AR, LeBlanc MG, Mohan DP, Padilla PA (2009) Reduction in ovulation or male sex phenotype increases long-term anoxia survival in a daf-16-independent manner in *Caenorhabditis elegans*. *Physiol Genomics* 36: 167–178.
59. Arantes-Oliveira N, Apfeld J, Dillin A, Kenyon C (2002) Regulation of life-span by germ-line stem cells in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 295: 502–505.
60. Hsin H, Kenyon C (1999) Signals from the reproductive system regulate the lifespan of *C. elegans*. *Nature* 399: 362–366.
61. McGhee JD (2007) The *C. elegans* intestine. *WormBook*: 1–36.
62. Ding L, Candido EP (2000) Association of several small heat-shock proteins with reproductive tissues in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Biochem J* 351: 13–17.
63. Rajyaguru P, Parker R (2009) CGH-1 and the control of maternal mRNAs. *Trends Cell Biol* 19: 24–28.
64. Shih JW, Wang WT, Tsai TY, Kuo CY, Li HK, et al. (2012) Critical roles of RNA helicase DDX3 and its interactions with eIF4E/PABP1 in stress granule assembly and stress response. *Biochem J* 441: 119–129.
65. Lai M, Lee Y, Tarn W (2008) The DEAD-box RNA helicase DDX3 associates with export messenger ribonucleoproteins as well as tip-associated protein and participates in translational control. *Mol Biol Cell* 19: 3847–3858.
66. Goulet I, Boisvenue S, Mokas S, Mazroui R, Cote J (2008) TDRD3, a novel Tudor domain-containing protein, localizes to cytoplasmic stress granules. *Hum Mol Genet* 17: 3055–3074.
67. Hird SN, Paulsen JE, Strome S (1996) Segregation of germ granules in living *Caenorhabditis elegans* embryos: cell-type-specific mechanisms for cytoplasmic localisation. *Development* 122: 1303–1312.
68. Zhang Y, Yan L, Zhou Z, Yang P, Tian E, et al. (2009) SEPA-1 mediates the specific recognition and degradation of P granule components by autophagy in *C. elegans*. *Cell* 136: 308–321.
69. Kiledjian M, Dreyfuss G (1992) Primary structure and binding activity of the hnRNP U protein: binding RNA through RGG box. *EMBO J* 11: 2655–2664.
70. Brenner S (1974) The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77: 71–94.
71. Maduro M, Pilgrim D (1995) Identification and cloning of unc-119, a gene expressed in the *Caenorhabditis elegans* nervous system. *Genetics* 141: 977–988.
72. Timmons L, Fire A (1998) Specific interference by ingested dsRNA. *Nature* 395: 854.
73. Timmons L, Court DL, Fire A (2001) Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Gene* 263: 103–112.
74. Stiernagle T (2006) Maintenance of *C. elegans*. *WormBook*: 1–11.
75. Rual JF, Ceron J, Koreth J, Hao T, Nicot AS, et al. (2004) Toward improving *Caenorhabditis elegans* genome mapping with an ORFeome-based RNAi library. *Genome Res* 14: 2162–2168.
76. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 9: 671–675.
77. Merritt C, Rasoloson D, Ko D, Seydoux G (2008) 3′ UTRs are the primary regulators of gene expression in the *C. elegans* germline. *Curr Biol* 18: 1476–1482.