



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

**La proteína de unión a RNA TIAR-1 protege a las células germinales del
estrés en *Caenorhabditis elegans***

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

GABRIELA HUELGAS MORALES

TUTORA

DRA. ROSA ESTELA NAVARRO GONZÁLEZ

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DRA. HILDA LOMELÍ BUYOLI

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

DR. IVÁN VELASCO VELÁZQUEZ

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

Ciudad de México, Abril de 2016



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 Desarrollo del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Este trabajo fue posible gracias a los apoyos de los proyectos de Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT-SEP) 103856-Q y 220987 y del Programa de Apoyo a la Innovación e Investigación Tecnológica (PAPIIT-UNAM) IN207412 e IN207415. Así como al apoyo de la Fundación Miguel Alemán/UNAM.

La alumna Gabriela Huelgas Morales 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 389884 y una beca para conclusión de estudios del Programa de Apoyo a la Innovación e Investigación Tecnológica (PAPIIT-UNAM) IN207415.

Parte de este trabajo se realizó en el laboratorio del Dr. David Greenstein en el Departamento de Genética, Biología Celular y Desarrollo de la Universidad de Minnesota, EUA (Estancia de investigación: Enero-Diciembre 2014).

Se agradece a los miembros del Comité Tutorial, la Dra. Hilda Lomelí Buyoli y el Dr. Iván Velasco Velázquez por sus valiosos consejos y asesoría durante la realización de este proyecto

Se agradece a los miembros del jurado, el Dr. Fernando López Casillas, el Dr. Juan Miranda Ríos, la Dra. Rosa Navarro Gonzáles, el Dr. Ernesto Soto Reyes Solís y el Dr. Marco Antonio Velasco Velázquez por sus sugerencias y críticas contribuciones para mejorar este trabajo.

Se agradece a la M. en C. Silvia Salinas Velázquez por su valiosa asistencia técnica durante la realización de este trabajo.

También se agradece al personal de las siguientes unidades del IFC por su valiosa asistencia técnica:

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.

Al Dr. Fernando García Hernández y a Marco García Aguilera de la Unidad de Imagenología.

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.

Al personal del taller Ing. Aurey Galván Lobato e Ing. Manuel Ortínez Benavides.

Al personal de la biblioteca Javier Gallegos Infante y Sandra Moncada Hernández.

DEDICATORIA

A Claudia por cada palabra de aliento, cada abrazo y cada cariñito. Por estar conmigo en los momentos felices y en los tristes. Por cada porra, cada aplauso y por cada brindis. Cada uno de ellos fue una motivación para seguir sobreviviendo al doctorado. Por enseñarme a aprender. Nada de esto habría sido posible sin ti a mi lado. Mi refugio y mi verdad.

A Jorge por plantar en mi la semilla de la curiosidad científica. Por haberme explicado el teorema de Pitágoras cuando me enseñaron a dibujar triángulos en la primaria. Por haberme explicado métrica de expansión del Universo cuando temí a los extraterrestres. Por escucharme hablar de gusanos tantas veces con interés genuino. Por todo el apoyo incondicional y el amor infinito, que es mutuo.

A Estefanía por ser mi guía, mi brújula y, a la vez, mi compañera en este viaje. Por ser aquella figura objeto de mi orgullo, inspiración y total adoración. Por traerme de vuelta a la tierra y, a la vez, soltar mis alas. Cualquiera que sea el destino, siempre juntas.

A tío Efraín por ser alguien con quien siempre he podido contar. Por innumerables discusiones que sólo entre nosotros tienen sentido. Por ayudarme a encontrar el camino. Por los consejos y la compañía.

A Jack por todas las pláticas platónicas y las cervezas de inestabilidad genética. Por ser el artista que dulcifica mi vida y me hace feliz. Por el amor que compartimos.

A mis hermanos y hermanas. Pablo, Marina, Efra, Quique, Laura, Adrián, Ashanti y Mauri. Por acompañarme en cada momento. Porque conservamos esa gran familia que no hace más que darme satisfacciones. Por llenar mis días de risas, juegos, maratones de películas y casitas del miedo.

A mis amigas Maricarmen, Cristina, Ana, Pamela, María y Laura por ser y estar. Sin importar lo lejos que estemos, nuestra historia es atemporal. Porque nuestra amistad no es una planta que pueda marchitarse. No es una planta, es amor, comprensión, empatía y perdón. Por conmigo compartir alegrías, fiestas, llantos y desvelos.

AGRADECIMIENTOS

A Rosa por la asesoría de una gran mujer en la ciencia, por sus enseñanzas y su apoyo incondicional. Por ser un ejemplo de éxito en todos los ámbitos. Ella es, sin duda, un ejemplo a seguir. Me considero afortunada de haber formado parte de su equipo de trabajo y haber compartido mi formación profesional a su lado. He escuchado que llega un punto en el que el alumno y el asesor tienen un momento de catarsis. Me alegro y enorgullezco de que entre nosotras no lo hubo porque siempre prevalecieron el respeto, el diálogo y el cariño.

A Silvia por introducirme al mundo del *C. elegans*. Por su increíble paciencia para enseñarme hasta el más mínimo detalle de cada procedimiento y técnica. Por compartirme su sabiduría y darme un ejemplo de perseverancia. Por haberme enseñado que el trabajo sabe mejor cuando va acompañado de amistad.

A David Greenstein por haberme adoptado como alumna y, de ese modo, haber tomado parte importante en mi formación. Por compartir conmigo su mente brillante, por enseñarme a pensar, cuestionar y observar como científico. Por ser un ejemplo de integridad y bondad inimaginables. Por solicitar y valorar mis pensamientos, comentarios y opiniones, así como lo hace con todos los miembros de su equipo.

A los miembros del laboratorio del Dr. Greenstein, Caroline Spike y Todd Starich. Por sus innumerables enseñanzas. Por integrarme en su equipo con tan buena disposición. Por compartir conmigo sus conocimientos desinteresadamente.

Al los miembros de mi comité tutorial, Hilda Lomelí Buyoli e Iván Velasco Velázquez. Por haber leído mis reportes semestre tras semestre. Por haber escuchado cada presentación de los avances de mi proyecto con tanta paciencia y haberme cuestionado asertivamente.

A todos los miembros del laboratorio de la Dra. Navarro, en especial a Paulette, Emmanuel, Daniel Paz, Javier, Diego, Alan, Ángel y Emilio. Por sus útiles críticas, comentarios y sugerencias a lo largo de estos 5 años. Fue con ellos y por ellos que he llegado a la conclusión de este periodo formativo tan satisfecha y feliz.

ÍNDICE

1	ABREVIATURAS	12
2	NOMENCLATURA Y SIMBOLOGÍA EN <i>C. elegans</i>	13
3	RESUMEN	14
4	INTRODUCCIÓN	15
4.1	<i>Caenorhabditis elegans</i>	15
4.1.1	Organismo modelo	15
4.1.2	Embriogénesis y desarrollo larvario	16
4.1.3	La línea germinal	
4.1.3.1	Regulación post-transcripcional en la gónada de <i>C. elegans</i>	18
4.2	Los gránulos ribonucleoprotéicos	25
4.2.1	Los gránulos germinales	26
4.2.2	Los cuerpos de procesamiento	28
4.2.3	Los gránulos de estrés	29
4.2.4	Los gránulos neuronales	30
4.2.5	Los gránulos en la gónada de <i>Caenorhabditis elegans</i>	32
4.3	Las proteínas TIA-1 y TIAR se asocian a gránulos de estrés	34
5	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	38
6	HIPÓTESIS	38
7	OBJETIVO	38
7.1	Objetivos particulares	39
8	MATERIALES Y MÉTODOS	40
8.1	Mantenimiento de cepas	40
8.2	Obtención de la cepa <i>tiar-1::gfp</i> mediante MosSCI	42
8.3	Obtención de nuevos alelos de <i>tiar-1</i> mediante edición del genoma por CRISPR-Cas9	45
8.4	Ensayos de fertilidad, letalidad embrionaria e incidencia de machos	48
8.5	Diseño de cruzas con el uso de cromosomas balanceadores	49

8.6	Retrocruza de la cepa <i>tiar-1(tm361)</i> para eliminar mutaciones cercanas	51
8.7	Condiciones de estrés	51
8.8	Ensayos de letalidad embrionaria después del estrés	52
8.9	Tratamientos con cicloheximida y puromicina	54
8.10	Procedimiento para hacer inmunotinciones	55
8.11	Microscopía	56
8.12	Análisis estadísticos	57
8.13	Sistema para la identificación de mRNAs que están siendo traducidos	58
8.13.1	Obtención de la cepa <i>rpl-1::gfp</i> mediante MosSCI	58
8.13.2	Co-inmunoprecipitación	60
8.13.3	Perfiles polisomales	65
8.13.4	Aislamiento de complejos densos	66
9	RESULTADOS	67
9.1	CAPÍTULO I. TIAR-1 contribuye a la fertilidad y desarrollo embrionario de <i>C. elegans</i>	67
9.1.1	Las mutaciones de pérdida de función en <i>tiar-1</i> afectan a la fertilidad de los animales	68
9.1.2	Los animales mutantes en <i>tiar-1</i> presentan una disminución de la fertilidad y alta letalidad embrionaria	72
9.1.3	La contribución materna y la cigótica de TIAR-1 contribuyen a la fertilidad de <i>C. elegans</i>	76
9.1.4	Los animales mutantes en <i>tiar-1</i> tienen un incremento en la frecuencia de no-disyunción de cromosomas sexuales durante la ovogénesis	78
9.1.5	Los animales mutantes en <i>tiar-1</i> acumulan vitelo en el pseudoceloma	79
9.2	CAPÍTULO II: La proteína de gránulos de estrés TIAR-1 protege a las células germinales femeninas del choque de calor	82
9.2.1	TIAR-1::GFP se expresa en la gónada y se agrega en gránulos citoplasmáticos durante el estrés	82
9.2.2	TIAR-1 y CGH-1 se asocian con los gránulos en el centro de la gónada y en los ovocitos	86

9.2.3	Los gránulos inducidos por estrés en la gónada son dinámicos y dependen de la traducción proteica	88
9.2.4	<i>tiar-1</i> se requiere para la formación de gránulos en el centro de la gónada	91
9.2.5	<i>tiar-1</i> protege a los embriones y a las células germinales femeninas del choque de calor	94
9.2.6	TIAR-1 no necesita asociarse a gránulos en el centro de la gónada para proteger a las células germinales femeninas del choque de calor	97
9.2.7	Animales mutantes <i>tiar-1(tm1543)</i> responden parcialmente al choque de calor	100
9.3	CAPÍTULO III. Sistema para purificar mRNAs asociados a ribosomas en la gónada de <i>C. elegans</i>	102
9.3.1	Diseño de la cepa transgénica <i>rpl-1::gfp</i>	102
9.3.2	La proteína de fusión RPL-1::GFP no se asocia con polisomas	104
9.3.3	Co-inmunoprecipitación de RPL-1::GFP	105
10	DISCUSIÓN	108
11	PERSPECTIVAS	112
12	REFERENCIAS	113
13	SUPLEMENTO	120
14	PRODUCCIÓN CIENTÍFICA	123

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. El ciclo de vida de <i>Caenorhabditis elegans</i>	17
Figura 2. La gónada de <i>C. elegans</i> hermafrodita.	19
Figura 3. La transición de mitosis a meiosis en la gónada de <i>C. elegans</i> es regulada mediante señalización del tipo GLP-1/Notch.	21
Figura 4. Inmunotinciones que muestran los diversos tipos de gránulos ribonucleoprotéicos.	25
Figura 5. Gránulos inducidos por estrés en la gónada de <i>C. elegans</i>	33
Figura 6. TIA-1 y TIAR tienen homólogos en diversos organismos.	34
Figura 7. Las proteínas TIA-1 y TIAR. Esquema que representa los dominios conservados de las proteínas TIA-1 y TIAR.	35
Figura 8. TIA-1 y TIAR regulan la expresión genética a diversos niveles.	36
Figura 9. Modificación del genoma mediante inserción de copia única por MosSCI.	43
Figura 10. Alelos de <i>tiar-1</i> mediante edición del genoma por CRISPR-Cas9.	47
Figura 11. Esquema de cruce con el uso de un cromosoma balanceador.	50
Figura 12. Alelos usados para el estudio de los genes <i>tiar</i> en <i>C. elegans</i>	68
Figura 13. Representación esquemática del evento de recombinación necesario para la retrocruza del alelo <i>tiar-1(tm361)</i>	70
Figura 14. Tanto la contribución materna como la cigótica de TIAR-1 favorecen la fertilidad de <i>C. elegans</i>	77
Figura 15. La proteína VIT-2 se localiza abundantemente en el pseudoceloma de animales mutantes <i>tiar-1(tm1543)</i>	80
Figura 16. El receptor RME-2 se expresa correctamente en animales mutantes <i>tiar-1(tm1543)</i> . ..	81

Figura 17. La proteína TIAR-1::GFP se expresa de manera ubicua a lo largo del desarrollo de <i>C. elegans</i> ..	83
Figura 18. TIAR-1 se asocia con gránulos citoplasmáticos en la gónada durante el estrés.	85
Figura 19. TIAR-1 y CGH-1 se asocian con gránulos en el centro de la gónada y en los ovocitos..	87
Figura 20. Los gránulos en la gónada se forman y se disuelven gradualmente antes y después de que los animales se recuperan del estrés.....	89
Figura 21. <i>tiar-1</i> se requiere para la formación de gránulos de estrés en el centro de la gónada..	92
Figura 22. <i>tiar-1</i> protege a las células germinales femeninas y a los embriones del choque de calor.....	96
Figura 23. <i>tiar-1</i> protege a células germinales femeninas y embriones del choque de calor independientemente de los gránulos del centro de la gónada.	99
Figura 24. Animales mutantes <i>tiar-1(tn1543)</i> responden parcialmente al choque de calor.	101
Figura 25. La proteína de fusión RPL-1::GFP se expresa abundantemente en la gónada de <i>C. elegans</i>	103
Figura 26. La proteína RPL-1::GFP se encontró principalmente en la fracción monosomal.....	105
Figura 27. Detección de la proteína de fusión RPL-1::GFP después de la inmunoprecipitación.	106

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Algunas proteínas de unión a RNA y los procesos que regulan en la línea germinal de <i>C. elegans</i>	23
Tabla 2. Cepas usadas en este estudio	41
Tabla 3. Plásmidos utilizados en la generación de cepas de <i>C. elegans</i>	45
Tabla 4. Infertilidad de los animales mutantes en <i>tiar-1</i> a 25°C.....	71
Tabla 5. Animales mutantes <i>tiar-1(0)</i> tienen menos progenie, letalidad embrionaria y alta incidencia de machos.	74
Tabla 6. Los fármacos inhibidores de la traducción afectan la formación de gránulos en la gónada de <i>C. elegans</i>	90
Tabla 7. <i>tiar-2</i> y <i>tiar-3</i> no se requieren para la formación de gránulos en el centro de la gónada	93
Tabla 8. Los gránulos del centro de la gónada no se forman en animales que fueron pretratados a 24°C.....	98
Tabla S 1. Oligos usados para generar la cepa <i>rpl-1::gfp</i> mediante MosSCI	120
Tabla S 2. Oligos usados para generar las cepas mediante CRISPR-Cas9	121
Tabla S 3. Oligos usados para identificar a los animales mutantes <i>tiar-1(tm1543)</i>	122

1 ABREVIATURAS

3'UTR	Región no traducida en el extremo 3' de un mRNA
AREs	Secuencias ricas en uridina y adenina que se localizan en la región 3'UTR del mRNA.
CGH-1	Helicasa de RNA en la línea germinal conservada
CRISPR	Repeticiones palindrómicas cortas, agrupadas y regularmente interespaciadas.
dcP bodies	Partículas ribonucleoprotéicas inducidas por la detención prolongada en meiosis en la gónada de <i>C. elegans</i> compuestas por DCR-2, que carecen de CGH-1 o CAR
DCR-2	Dicer-2, enzima encargada del procesamiento de RNA
GFP	Proteína verde fluorescente
GLD	Proteína de unión a RNA (<i>defective in germ line development</i>)
grP bodies	Partículas ribonucleoprotéicas inducidas por la detención prolongada en meiosis en la gónada de <i>C. elegans</i> compuestas por CGH-1, CAR-1 y DCR-2
MosSCI	Inserción monocopia por recombinación con la transposasa Mos
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
NGM	Medio normal de crecimiento de <i>C. elegans</i>
ORF	Marco de lectura abierto
PAB	Proteína de unión a secuencias de poliadenilato
pb	Pares de bases
RPM	Partícula ribonucleoprotéica
TIA-1/TIAR	Antígeno 1 de células T/relacionado

2 NOMENCLATURA Y SIMBOLOGÍA EN *C. elegans*

Nombre/Símbolo	Significado
TIAR-1	Representación de la proteína
<i>tiar-1</i>	Representación del gen
Unc	Representación del fenotipo. Este fenotipo consiste en la pérdida de coordinación normal de los nematodos (<u>Un</u> coordinated)
<i>tiar-1(tn1545)</i>	Representación del genotipo. Este genotipo tiene el alelo de <i>tiar-1</i> , mutación número 1545, que fue obtenida en el laboratorio <i>tn</i> (de David Greenstein)
<i>tiar-1::gfp</i>	Fusión transcripcional de <i>tiar-1</i> con <i>gfp</i>
<i>tnSi4(gfp::rpl-1)</i>	Genotipo que tiene el alelo <i>tnSi4</i> . Este genotipo tiene el alelo de <i>rpl-1</i> fusionado con <i>gfp</i> , inserción de copia única (Si, Single copy insertion) número 4 hecha en el laboratorio <i>tn</i> (de David Greenstein)
<i>Cbr unc-119(+)</i>	Gen <i>unc-119</i> del nematodo <i>Caenorhabditis briggsae</i> que es usado como marcador de selección positiva en la generación de animales transgénicos.
<i>tiar-1(tn1543) II ; tiar-3(ok144) X</i>	Genotipo con los alelos de <i>tiar-1</i> y <i>tiar-3</i> que están en los cromosomas II y X, respectivamente. Si los alelos están en el mismo cromosoma no se separan con “ ; ”
RN055	Nombre de la cepa con el genotipo <i>tiar-1(tn1543) II; tiar-3(ok144) X</i> . El RN indica el nombre del jefe del grupo en donde se obtuvo dicha cepa (Rosa Navarro en este caso)

Fuente: WormBase/Userguide/Nomenclature, Versión: WS252

3 RESUMEN

En respuesta al estrés, las células llevan a cabo diversos procesos regulatorios para proteger su proteoma. Entre estos procesos de protección están una disminución global de la traducción y la formación de complejos ribonucleoprotéicos, como los gránulos de estrés. Las proteínas TIA-1 y TIAR tienen un papel clave tanto en la regulación traduccional como en la formación de gránulos de estrés. Las células germinales conforman el linaje celular inmortal requerido para la reproducción. La protección contra los efectos adversos del estrés ambiental en estas células es de crítica importancia para la perpetuación de las especies. Sin embargo, se desconoce el papel que juegan los mecanismos que regulan la formación de gránulos de estrés en la reproducción animal. En este trabajo estudiamos la función de TIAR-1 y sus proteínas homólogas en la reproducción del organismo modelo *Caenorhabditis elegans*. Encontramos que la proteína TIAR-1 protege a la línea germinal femenina de los efectos negativos del choque de calor. Animales con pérdidas de función de *tiar-1* presentan una disminución de la fertilidad después del choque de calor comparados con los animales silvestres. Con el uso de un reportero de choque de calor observamos que los animales *tiar-1* mutantes tienen una respuesta deficiente al choque de calor. Adicionalmente, observamos que TIAR-1 se asocia con gránulos en el centro de la gónada así como en los ovocitos de los organismos hermafroditas durante diversos tipos de estrés. Tanto los gránulos del centro de la gónada como los de los ovocitos son dinámicos y dependen de la traducción; ya que fármacos inhibidores de la traducción alteraron su formación. De manera interesante, *tiar-1* fue requerida para la formación de los gránulos en el centro de la gónada únicamente. Sin embargo, dichos gránulos no fueron necesarios para que *tiar-1* protegiera a las células germinales del choque de calor. Nuestros resultados sugieren que TIAR-1 protege a la línea germinal independientemente de su papel en la formación de los gránulos de estrés.

4 INTRODUCCIÓN

4.1 *Caenorhabditis elegans*

4.1.1 Organismo modelo

El nematodo *Caenorhabditis elegans* es un organismo de vida libre que habita en climas templados y cálidos de todo el mundo. Sydney Brenner propuso a este organismo como modelo para estudiar procesos de genética, neurobiología, desarrollo y biología celular en 1974 (Brenner 1974). *C. elegans* es un buen sistema experimental dado su corto ciclo de vida, su transparencia y su fácil mantenimiento y propagación. El ciclo de vida de estos nematodos dura 3 días, cuando se mantienen a 25°C, desde que son embriones hasta que son adultos capaces de reproducirse. En la naturaleza, estos animales se alimentan de materia orgánica en descomposición (Félix y Braendle 2010). Sin embargo, en el laboratorio se cultivan y propagan en placas de agar alimentados con la bacteria *Escherichia coli* de la cepa OP50-1 (ver Materiales y Métodos, Apartado I).

Gracias a que estos animales son pequeños y transparentes, sus células pueden ser visualizadas con microscopía tipo Nomarski. El linaje celular completo de estos animales fue determinado y entre otros aspectos, valió a Sydney Brenner, H. Robert Horvitz y John E. Sulston el premio Nobel de medicina en 2002. Así mismo, la ultraestructura anatómica de estos nematodos ha sido cuidadosamente estudiada en imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica (Altun y Hall 2009).

Las poblaciones de *C. elegans* están compuestas principalmente por hermafroditas que se auto-fertilizan, aunque también inciden machos en la población con una frecuencia menor al 0.2%. En estos organismos, el dimorfismo sexual está determinado por la proporción de cromosomas sexuales con respecto a la de autosomas. Los hermafroditas tienen 5 pares de autosomas y dos cromosomas sexuales XX. Los machos tienen el mismo número de autosomas

pero sólo un cromosoma sexual X. La manipulación genética de estos organismos en el laboratorio es posible gracias a la fertilización cruzada (un macho con un hermafrodita).

Para el estudio de diversos procesos biológicos en los nematodos, se desarrollaron técnicas de mapeo, mutagénesis al azar y mutagénesis dirigida como herramientas genéticas (incluyendo inserciones de una sola copia con el sistema MosSCI así como ediciones del genoma por medio de CRISPR-Cas9). Adicionalmente, la comunidad científica ha trabajado en colaboración para mantener un centro genético en donde se almacenan las cepas mutantes generadas en laboratorios de todo el mundo (*Caenorhabditis* Genetic Center, GCG). El genoma de *C. elegans* fue el primer genoma de un animal en ser secuenciado y es uno de los mejores anotados hasta la fecha (The *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998).

4.1.2 Embriogénesis y desarrollo larvario

La fertilización ocurre en la espermateca, en donde los ovocitos pueden ser fertilizados por un espermatozoide del propio hermafrodita o por uno de un macho en el caso de las cruces. Treinta minutos post-fertilización, el cigoto desarrolla una membrana vitelina y dos de quitina y colágena que lo hacen impermeable y permiten su desarrollo fuera del útero (Altun y Hall 2009).

La embriogénesis de este organismo se divide principalmente en dos etapas: proliferación y organogénesis/morfogénesis. La etapa de proliferación (0-330 min post-fertilización a 22°C) abarca desde la primera división mitótica hasta que el embrión está formado por 558 células aproximadamente. Al final de la etapa de proliferación, el embrión cuenta con las tres capas germinales: ectodermo, mesodermo y endodermo. Durante la etapa de organogénesis/morfogénesis (5.5-6 a 12-14 horas) las células se diferencian sin divisiones adicionales. En esta etapa, el embrión se elonga y sus tejidos y órganos se forman.

El ciclo de vida de *C. elegans*, al igual que el de otros nematodos, consta de cuatro estadios larvarios y el adulto (**Figura 1**). El final de cada uno de los estadios larvarios se caracteriza por un breve periodo de letargo acompañado por una muda de cutícula.

4.1.3 La línea germinal

El desarrollo de las células germinales es esencial para la reproducción sexual de los animales. A diferencia de las células somáticas, las germinales son consideradas como inmortales por su contribución a través de las generaciones. Las células germinales en *C. elegans* están predeterminadas y se apartan del resto de los tejidos desde estadios tempranos del desarrollo. En la etapa L4 y el adulto, estas células proliferan y se diferencian en gametos, que deben ser capaces de producir un nuevo organismo.

La línea germinal de *C. elegans* se desarrolla a partir de una sola célula progenitora: P4. Esta célula, o blastómero, se origina como consecuencia de divisiones mitóticas asimétricas. Posteriormente, ésta célula se divide en dos células conocidas como células primordiales germinales, Z2 y Z3. En cada división ciertos RNA mensajeros, proteínas y gránulos ribonucleoprotéicos (gránulos P) segregan únicamente con las células germinales. Estos componentes son clave para la especificación y mantenimiento de la línea germinal (Strome 2005).

La especificación de la línea germinal ocurre en la ausencia de transcripción. Por ello, durante el desarrollo de la línea germinal la transcripción está estrictamente regulada. En el embrión temprano la regulación depende de factores maternos. Las proteínas OMA-1 y OMA-2 (*oocyte maturation defective*) forman un complejo con el factor transcripcional TAF-4, impidiendo que éste entre al núcleo y active la transcripción (Güven-Ozkan *et al.* 2008). En el embrión de 4 células, es la proteína PIE-1 la que previene la actividad de SKN-1 y otros factores de transcripción somáticos (Seydoux *et al.* 1996). Posteriormente, la represión transcripcional depende de modificaciones epigenéticas. A partir de que se originan Z2 y Z3, las marcas características de transcripción activa (metilación de H3K4 y acetilación de H3K8) se pierden de manera global, únicamente en la línea germinal (Schaner *et al.* 2003).

Las células germinales proliferan durante el desarrollo larvario para poblar la gónada. Durante el estadio L4 las células se diferencian en espermatogonias, que darán lugar a espermatozoides que son almacenados en la espermateca. Durante el estadio adulto, las células

se diferencian en ovocitos que serán fertilizadas por los espermatozoides almacenados previamente.

La gónada del *C. elegans* hermafrodita consta de dos tubos idénticos en forma de U (Figura 2). Cada uno de los tubos contiene una población de células troncales germinales en la parte distal, células meióticas en la porción media y gametos en la porción proximal. La mayor parte de estas células comparte el citoplasma, formando un sincicio. Las únicas células que no comparten este citoplasma son los espermatozoides y los ovocitos más proximales. La gónada del macho está formada por un solo tubo en forma de U cuya organización es similar a la de la gónada del hermafrodita (Kim *et al.* 2013).

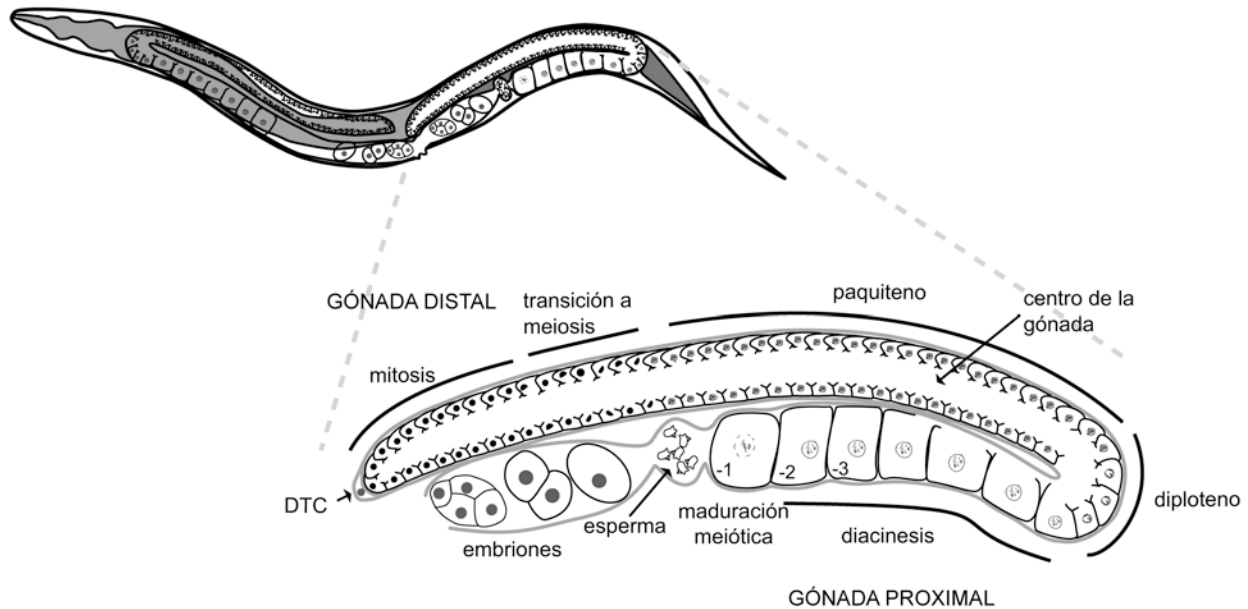


Figura 2. La gónada de *C. elegans* hermafrodita. Representación del sistema digestivo (gris oscuro) y la gónada (blanco) de un *C. elegans* adulto hermafrodita en la parte superior izquierda. Un brazo de la gónada se representa a detalle en la parte inferior derecha. La parte exterior de la gónada está formada por células somáticas (gris claro), o células de la vaina. Las células germinales comparten el citoplasma, formando un sincicio. En la porción más distal a la vulva, que contiene los embriones, se encuentran las células troncales germinales que se mantienen en mitosis por señalización de la célula de la punta distal (DTC). A medida que las células avanzan hacia la porción proximal entran en meiosis y se detienen en profase I hasta que los ovocitos son fertilizados.

Cada hermafrodita producirá una progenie de alrededor de 300 individuos, número limitado por la cantidad de espermatozoides producidos durante el estadio L4. Sin embargo, si el organismo hermafrodita se cruza con un macho, la progenie puede incrementarse hasta 1,400.

La región mitótica de la parte distal de la gónada es considerada como el nicho de células troncales germinales de *C. elegans* porque continuamente genera células que se diferencian para producir los gametos. La población de células mitóticas en este nicho se mantiene gracias a la señalización por parte de una célula somática de la punta distal de la gónada o “distal tip cell” (DTC). La pérdida de esta célula, mediante microcirugía con láser, resulta en la diferenciación de todas las células mitóticas y por lo tanto, en la pérdida del nicho de células germinales (Kimble 1981). La señalización que se lleva a cabo entre la DTC y las células germinales es del tipo GLP-1/Notch (*abnormal germline proliferation*).

La señalización del tipo Notch regula la proliferación de la línea germinal durante los estadios larvarios y su mantenimiento durante la etapa adulta (Kimble y Crittenden 2005) (**Figura 3**). La DTC expresa el ligando con un dominio transmembranal LAG-2 (*lin-12 and glp-1 phenotypes*), mientras que las células germinales expresan el receptor GLP-1 (Kadyk y Kimble 1998). A pesar de que el mRNA de *glp-1* se transcribe en toda la línea germinal, se traduce únicamente en la parte distal de la gónada. GLD-1 (*defective in germline development*) es la proteína que se encarga de la represión traduccional de *glp-1* en las células meióticas. La vía de Notch activa a los factores transcripcionales LAG-1 y LAG-3 que, a su vez, promueven que las células germinales se mantengan en mitosis mientras sigan en contacto con la DTC.

A medida que las células germinales se alejan de la DTC entran en meiosis. La decisión mitosis/meiosis está regulada a nivel traduccional por una red de proteínas de unión a RNA. Las proteínas de la familia FBF/Pumilio (FBF-2, *fem-3 mRNA binding factor*), cuya transcripción depende de Notch, reprimen traduccionalmente a GLD-2 y GLD-3; proteínas que promueven la entrada a meiosis (Crittenden *et al.* 2003; Kimble y Crittenden 2005) (**Figura 3**). Así mismo, las proteínas FBF inhiben la traducción de inhibidores de mRNAs específicos de mitosis. Por lo tanto, cuando las células germinales dejan de expresar la FBF-2 comienzan la transición hacia meiosis (**Figura 3**).

Las células germinales en meiosis darán lugar a los espermatozoides en el estadio L4 y a los ovocitos en la etapa adulta. La determinación sexual de la línea germinal depende en última instancia de los genes *fog-1* y *fog-3* (*feminization of germline*). Mutaciones en cualquiera de estos dos genes resultan en la pérdida de la espermatogénesis y los animales mutantes producen únicamente ovocitos (Ellis y Schedl 2007).

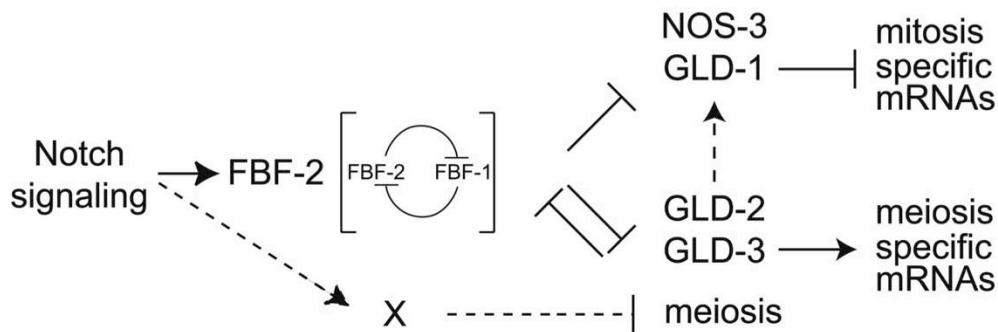


Figura 3. La transición de mitosis a meiosis en la gónada de *C. elegans* es regulada mediante señalización del tipo GLP-1/Notch. Esquema en el que se muestra los principales factores involucrados en la vía de señalización de Notch en la gónada de *C. elegans* adultos. La célula distal expresa el ligando LAG-2 que, al unirse al receptor GLP-1 de las células germinales, resulta en una cascada de regulación que promueve el programa mitótico e inhibe el meiótico. A medida que las células se alejan de la célula de la punta distal, la vía de señalización de Notch deja de ser activada y estas células comienzan el programa meiótico. Esquema modificado de Kimble y Crittenden (2005).

4.1.3.1 Regulación post-transcripcional en la gónada de *C. elegans*

El control de la traducción es la principal forma de regulación de la expresión génica en la gónada de *C. elegans*. Durante la progresión de la profase, los cromosomas se condensan en diacinesis y la transcripción se detiene. Por esta razón, la traducción de los cientos de mRNAs acumulados dentro de los ovocitos durante su desarrollo debe ser muy bien regulada, de tal modo que la embriogénesis temprana se lleve a cabo con éxito (Merritt *et al.* 2008). Entre los procesos regulados a nivel traduccional mejor descritos están la decisión mitosis/meiosis, la decisión esperma/ovocito y la maduración meiótica (Racher y Hansen 2010).

La red de regulación post-transcripcional en la gónada de *C. elegans* consiste en diversas proteínas de unión a RNA y enzimas que lo modifican (**Tabla 1**). Algunos de los dominios de unión a RNA mejor caracterizados son el “dominio de unión RNA” (RBD o RRM) “dominio de homología a K” (KH), caja RGG (Arg-Gly-Gly), dominio Sm, caja DEAD/DEAH, Pumilio/FBF (PUF o Pum-HD) y el dominio Piwi/Argonauta/Zwille (PAZ) (Glisovic *et al.* 2008). Las proteínas que cuentan con alguno de estos dominios se unen a secuencias regulatorias generalmente localizadas en las regiones no traducidas en los extremos 3' y 5' de los mRNAs (Lee y Schedl 2006).

La función de dos clases de proteínas de unión a RNA en gónada distal de *C. elegans* de ha sido bien caracterizada. La primera clase consta de las proteínas con dominios PUF : FBF-1 y FBF-2, y la segunda de las proteínas con dominios KH: MEX-3 y GLD-1. FBF-1 y FBF-2 son redundantes y se requieren para la represión traduccional de genes en la zona de mitosis tales como *fog-1*, *gld-1*, y *lip-1* (ver Introducción, La línea germinal). Por otro lado, tanto MEX-3 como GLD-1 tienen dominios KH y regulan negativamente a los mRNAs de genes como *rme-2*, *pal-1*, *mex-5*, and *puf-5*. Sin embargo, MEX-3 se expresa en la zona mitótica mientras que GLD-1 se expresa en la zona de paquíteno (Merritt *et al.* 2008).

Tabla 1. Algunas proteínas de unión a RNA y los procesos que regulan en la línea germinal de *C. elegans*

Proteína	Dominio de unión a RNA	Función en la línea germinal	Mecanismo	RNA blanco
GLD-1	Maxi-KH	Progresión de la profase meiótica femenina, determinación sexual de la línea germinal, apoptosis de células germinales, entrada al programa meiótico	Represor traduccional	Múltiples
GLD-3	Similar a KH	Determinación sexual de la línea germinal, supervivencia de la línea germinal, desarrollo embrionario	Activador traduccional?	Desconocido
FBF-1/-2	PUF	Determinación sexual de la línea germinal, mantenimiento de las células troncales germinales	Represor traduccional	<i>fem-3, gld-1, gld-3, fbf-1, fbf-2</i>
NOS-1/-2	Unión al RNA de Nanos	Supervivencia de la línea germinal (junto con <i>nos-3</i> ?)	Desconocido	Desconocido
DAZ-1	RRM	Progresión de la profase meiótica femenina	Desconocido	Desconocido
OMA-1/-2	Dedos de Zn	Maduración de ovocitos	Desconocido	Desconocido
PGL-1	Caja RGG	Mantenimiento de los gránulos P, proliferación temprana y diferenciación de las células germinales	Desconocido	Desconocido
GLH-1-4	Caja DEAD/DEAH, Zinc knuckle	Ovogénesis y espermatogénesis	Desconocido	<i>glh-1</i> a <i>glh-4</i>
PIE-1	Dedo de Zn	Especificación y mantenimiento de la línea germinal	Activador traduccional?	<i>nos-2</i> ?

FOG-1	RRM y dedo de Zn	Determinación sexual de la línea germinal	Elemento de unión a poli-adenilación	<i>fog-1?</i>
DCR-1	Caja DEAD/ DEAH, DS-RBD, PAZ	Procesamiento de pre-miRNA y de dsRNA, ovogénesis	RNasa endonucleasa	Pre-miRNA, dsRNA

Tabla modificada de Lee y Schedl (2006)

4.2 Los gránulos ribonucleoprotéicos

En organismos eucariontes, después de que el RNA es sintetizado diversas proteínas regulan su expresión a nivel post-transcripcional. En muchos casos, los transcritos se asocian en distintas clases de gránulos ribonucleoprotéicos que aseguran su traducción y degradación en el tiempo y el lugar precisos. Estos gránulos ribonucleoprotéicos son estructuras citoplasmáticas que no están delimitadas por una membrana lipídica. Además, son estructuras dinámicas que pueden interactuar entre ellas y se localizan tanto en células somáticas como en germinales. Entre los más representativos se encuentran los gránulos germinales (conocidos en *C. elegans* como gránulos P), los cuerpos de procesamiento (“P bodies”), los gránulos de estrés y los gránulos neuronales (**Figura 4**).

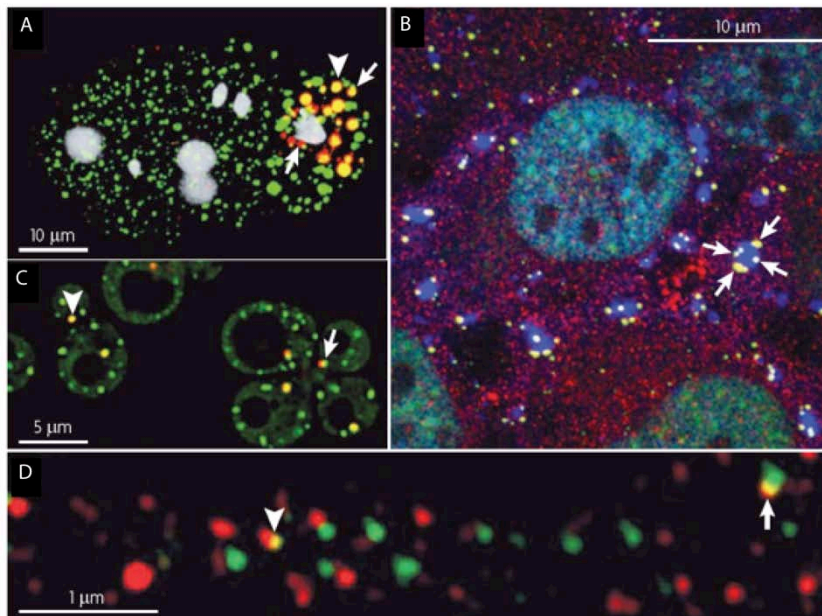


Figura 4. Inmunotinciones que muestran los diversos tipos de gránulos ribonucleoprotéicos. (a) Embrión de *C. elegans* teñidos para cuerpos de procesamiento con anti-CAR-1 (verde), para gránulos P con anti-PGL-1 (rojo) y para DNA (gris). Imagen tomada de (Boag *et al.* 2008). (b) Células DU145 tratadas con arsenito y teñidas para gránulos de estrés con anti-TIA-1 (azul), para cuerpos de procesamiento con anti-DCP1A (rojo) y anti-GE1(verde), y para DNA (cian). Imagen tomada de (Anderson y Kedersha 2009). (c) *Saccharomyces cerevisiae* transfectadas con Pab1-GFP (verde) para visualizar a los gránulos de estrés, y con Edc3-mCh (rojo) para visualizar a los cuerpos de procesamiento. Imagen tomada de (Buchan *et al.* 2008). (d) Dendrita de neurona murina teñida para cuerpos de procesamiento con anti-DCP1 (verde) y gránulos neuronales con anti-staufen 2 (rojo) Imagen tomada de (Anderson y Kedersha 2009). Las flechas indican sitios en los distintos gránulos se sobreponen total o parcialmente.

4.2.1 Los gránulos germinales

La línea germinal es un linaje celular inmortal debido a que permite la perpetuación de las especies. La información de las células germinales se transmite a través de las generaciones. Ciertos componentes citoplasmáticos segregan específicamente con la línea germinal de algunos organismos, desde las primeras divisiones celulares del embrión. Estos componentes citoplasmáticos son conocidos como plasma germinal y los gránulos germinales son algunos de sus elementos (**Figura 4A**).

Los gránulos germinales son estructuras ampliamente conservadas que han surgido varias veces en la evolución (Bezares-Calderón *et al.* 2010; Voronina *et al.* 2011). Dependiendo del momento y del organismo en donde fueron descritos, los gránulos germinales han sido designados con nombres distintos: en *C. elegans* son conocidos como gránulos P, en *Drosophila melanogaster* y otros insectos como gránulos polares, en *Xenopus laevis* como gránulos germinales y en mamíferos como cuerpos cromatoides (en células germinales masculinas) (Anderson y Kedersha, 2009; Gao y Arkov, 2013).

Entre los componentes de los gránulos germinales están proteínas de unión a RNA, RNA no codificante y mRNA. Tres tipos de proteínas se asocian comúnmente a los gránulos germinales: helicasas de RNA, proteínas con dominios Tudor y proteínas de la familia Piwi (Gao y Arkov, 2013). Las helicasas de RNA contribuyen a la remodelación de los gránulos y juegan un papel importante en la regulación traduccional. Entre las helicasas de RNA que componen los gránulos germinales están Vasa en *Drosophila* y pez cebra, CGH-1 (*conserved germline helicase*) y GLH-1-4 (*germline helicase*) en nematodos y Mvh (*F420-non-reducing hydrogenase iron-sulfur*) en ratón. Las proteínas con dominios Tudor tienen funciones estructurales o de andamiaje así como en el silenciamiento de transposones. Entre las proteínas con dominios Tudor que componen los gránulos germinales están las Tdrd en pez cebra y ratón, y Tudor en *Drosophila*. Por último, las proteínas de la familia Piwi han sido asociadas tanto al silenciamiento de transposones como a la regulación traduccional. Entre las proteínas de la familia Piwi que se asocian a gránulos germinales están PRG-1 en nematodos, Ago3 en *Drosophila* y Miwi en ratón.

Se ha propuesto que la función de los gránulos germinales es asegurar que la línea germinal retenga la capacidad de producir gametos funcionales, así como el desarrollo embrionario. Evidencia en distintos organismos apoya esta propuesta, dado que la ausencia de los componentes de estos gránulos generalmente conlleva a esterilidad (Gao y Arkov, 2013). Así mismo, se requiere que los gránulos germinales segreguen de manera asimétrica hacia el polo embrionario que dará lugar a la línea germinal. En *D. melanogaster* al menos 11 factores se requieren para la formación y polarización de los gránulos polares, y tres de ellos se localizan en dichos gránulos (Rongo y Lehmann 1996). Animales sin contribución materna de algunos de estos genes presentan letalidad embrionaria y esterilidad (Lehmann y Nüsslein-Volhard, 1986). En *C. elegans* se requiere de la contribución tanto cigótica como materna de la proteína PGL-1 (*P-granule abnormality*), que es el marcador más común de gránulos P, para que los animales sean fértiles (Kawasaki *et al.* 1998). El silenciamiento simultáneo de las proteínas MEX-3 (asociada a los gránulos germinales) y GLD-1, causa que los gránulos germinales se pierdan y las células germinales se diferencian en células somáticas, por lo que los gránulos germinales podrían estar promoviendo el mantenimiento de la totipotencialidad en las células germinales (Ciosk *et al.* 2006).

En *C. elegans*, los gránulos P se localizan alrededor de los núcleos y en el citoplasma de todas las células germinales con excepción de los espermatozoides (Pitt *et al.* 2000). Cuando los ovocitos progresan en la meiosis, los gránulos germinales que se encuentran asociados a la envoltura nuclear, se despegan y se localizan en el citoplasma. La asociación de estos gránulos con la envoltura nuclear depende de los dominios FG de las proteínas GLH-1-4, PGL-1 y PGL-3 (Wang y Seydoux 2014). Es precisamente en los sitios en donde los gránulos están asociados con la envoltura nuclear que hay un enriquecimiento de factores de exportación de mRNA. Adicionalmente, se ha observado que el RNA recién sintetizado transita a través de los gránulos P antes de dispersarse en el citoplasma (Sheth *et al.* 2010). Del mismo modo, proteínas asociadas a la regulación post-traducciona, como las pertenecientes a la familia de Argonautas, se asocian transitoriamente con los gránulos P (Shirayama *et al.* 2014). En conjunto, estas observaciones sugieren que los gránulos P son sitios en los que se protege a los mRNAs específicos de la línea germinal de ser silenciados, se promueve el silenciamiento de aquellos elementos extraños a la línea germinal como los transposones y son por donde los mRNAs transitan para ser etiquetados (Seydoux *et al.* 1996b; Schisa *et al.* 2001; Wang y Seydoux, 2014).

4.2.2 Los cuerpos de procesamiento

Los cuerpos de procesamiento, o como se conocen en inglés P bodies, están presentes en las células en condiciones normales y se caracterizan por contener componentes de la maquinaria de degradación de mRNA (**Figura 4B y C**). Además, estos gránulos acumulan mRNAs silenciados, por lo que se piensa que son sitios de almacenamiento, represión traduccional y degradación de mRNA (Olszewska *et al.* 2012).

Los componentes de los cuerpos de procesamiento han sido clasificados en tres clases: i) componentes básicos, ii) componentes específicos del organismo o las condiciones ambientales y iii) mRNAs silenciados (Parker y Sheth, 2007). Los componentes básicos son proteínas de la maquinaria de degradación de RNA, incluidos los complejos para retirar el CAP del mRNA (*decapping*) Dcp1p/Dcp2p, los activadores de *decapping* Dhh1p/RCK/p54, Pat1p, Scd6p/RAP55, Edc3p, el complejo Lsm1p-7p y la exonucleasa 5'-3' Xrn1p. Entre los componentes específicos del organismo o de las condiciones ambientales están proteínas de la maquinaria de miRNA (de los que carecen las levaduras) y proteínas involucradas en la degradación de mRNAs sin-sentido (*nonsense-mediated decay*). Cuando se hace un tratamiento a las células con RNasa A, los cuerpos de procesamiento dejan de formarse, por lo que se considera que los mRNAs también son parte estructural de los cuerpos de procesamiento (Teixeira *et al.* 2005). Consistentemente, cuando aumenta la cantidad de mRNAs silenciados, los cuerpos de procesamiento aumentan en número y tamaño (Teixeira *et al.* 2005).

Principalmente, dos observaciones sugieren que los mRNAs que se localizan en los cuerpos de procesamiento van a ser degradados. En primer lugar está la acumulación de factores para retirar el CAP del los mRNA en cuerpos de procesamiento. En segundo lugar, cuando la degradación de un mRNA es inhibida (ej. por la inserción de una secuencia que forma estructura secundaria muy estable), los intermediarios de la degradación colocan con los cuerpos de procesamiento (Sheth y Parker, 2003).

4.2.3 Los gránulos de estrés

Cuando las células se encuentran en condiciones de estrés, activan estrategias para asegurar su supervivencia. Entre estas estrategias destaca la disminución global de la traducción. Cuando el proceso de inicio de la traducción se detiene, ya sea por causa del estrés o por exposición a fármacos inhibidores de la traducción, se forman gránulos citoplasmáticos conocidos como gránulos de estrés (Buchan and Parker 2009). Los gránulos de estrés están formados por proteínas y RNA y han sido propuestos como sitios en donde los mRNA son protegidos de la degradación durante condiciones desfavorables. Estos gránulos parecen asociarse transitoriamente con cuerpos de procesamiento, lo que sugiere que ambas estructuras pueden compartir e intercambiar algunos de sus componentes (**Figura 4B y C**).

Durante condiciones de estrés ambiental, cinasas sensoras llevan a cabo la fosforilación de la subunidad α del factor de inicio de la traducción eIF2. Cuando eIF2 α está fosforilado es incapaz de mediar la unión del tRNA^{met} al ribosoma, por lo que inhibe el inicio de la traducción (Anderson y Kedersha 2002). Aquellos complejos de inicio de la traducción incompletos son conocidos como complejos no canónicos 48S, los cuales son componentes característicos de los gránulos de estrés. Dado que estos gránulos no han sido purificados bioquímicamente, la información con la que se cuenta de su composición se ha obtenido mediante tinciones e inmunoprecipitaciones (Ivanov y Nadezhdina, 2006). Dependiendo del tipo de estrés, los gránulos de estrés pueden variar ligeramente su composición proteica. Sin embargo, ciertos componentes básicos se asocian a gránulos de estrés en todos los casos, al menos en mamíferos. Entre estos componentes están: mRNAs poliadenilados, algunos factores de inicio de la traducción (eIF3, eIF4E y eIF4G) y subunidades pequeñas del ribosoma (Kedersha *et al.* 2002). Entre los factores que no se asocian con gránulos de estrés están el eIF5 y la subunidad grande del ribosoma (Ivanov y Nadezhdina, 2006).

Así como la exposición a condiciones de estrés puede inducir la formación de estos gránulos, los fármacos inhibidores de la traducción pueden alterarla. Cuando la traducción se detiene a nivel de elongación por efecto de la cicloheximida, los complejos de inicio de la traducción no están disponibles y los gránulos de estrés no se forman (Kedersha *et al.* 2000).

Cuando la traducción se detiene por efecto de la puromicina, la cantidad de complejos de inicio de la traducción se eleva y esto propicia la formación de gránulos de estrés incluso en ausencia de estrés ambiental (Kedersha *et al.* 2000; Panas *et al.* 2015).

Algunas proteínas que se asocian con los gránulos de estrés tienen un papel regulatorio en su formación. La sobre-expresión de TIA-1 (*T-cell-restricted intracellular antigen 1*), TIAR (*TIA-1 related*), G3BP (*Ras GTPase-activating protein-binding protein*) y TTP (*Tristetraprolin*) induce la formación de los gránulos en ausencia de estrés ambiental (Gilks *et al.* 2004; Stoecklin *et al.* 2004). Así mismo, la ausencia de TIA-1, G3BP, TTP, FMRP (*Fragile X mental retardation protein*) afecta la formación de los gránulos de estrés en cultivos de células humanas (Mazroui *et al.* 2002; Tourriere 2003; Gilks *et al.* 2004; Bley *et al.* 2014). En el caso de TIA-1, es el dominio con propiedades de prión (PD) el que le confiere la capacidad de formar gránulos de estrés (Gilks *et al.* 2004) (ver Introducción, Las proteínas TIA-1 y TIAR se asocian a gránulos de estrés). Estudios recientes han demostrado que la ausencia de las proteínas antes mencionadas de manera individual no es suficiente para abatir por completo la formación de los gránulos de estrés, sino que se requiere del silenciamiento de TIA-1, TIAR y G3BP simultáneamente (Bley *et al.* 2014).

4.2.4 Los gránulos neuronales

En las neuronas, los denominados gránulos neuronales están localizados en las dendritas cerca de la sinapsis (**Figura 4D**). Se ha propuesto que estos gránulos pueden influenciar la plasticidad celular. Los gránulos neuronales contienen subunidades ribosomales, mRNAs, factores de inicio de la traducción, incluidos eIF4E y eIF2 α , y proteínas de unión a RNA, como Stau, staufen y FMRP (Kiebler y Bassell, 2006; Olszewska *et al.* 2012).

Diversas observaciones indican que éstos gránulos funcionan como estructuras transportadoras de mRNAs a través de la neurona hasta el sitio en el que deben ser traducidos. Aquellos mRNAs que se asocian a gránulos neuronales tienden a tener secuencias largas en el 3'UTR, así como motivos a los que se unen proteínas formadoras de gránulos (Han *et al.* 2012). La traducción de estos mRNAs es inhibida hasta que llegan a la sinapsis, en donde usualmente

continúan con su traducción (Hüttelmaier *et al.* 2005). Tal es el caso del mRNA de la beta actina, que requiere estar localizado en las dendritas para que la neurona adquiera una morfología normal. Esto no ocurre en ausencia de la proteína de gránulos neuronales Staufen2 (Goetze *et al.* 2006). Por otro lado, la activación de los receptores de glutamato causa que los gránulos que contienen la proteína de unión a RNA FMRP sean transportados hacia las dendritas (Hüttelmaier *et al.* 2005). En conjunto, estas observaciones sustentan que mRNAs específicos son transportados en los gránulos neuronales, por lo que estos gránulos juegan un papel importante en la plasticidad neuronal y memoria.

4.2.5 Los gránulos en la gónada de *Caenorhabditis elegans*

En *C. elegans*, al igual que en otros organismos multicelulares, las condiciones de estrés como el calor, la exposición a rayos UV y el ayuno, promueven la formación de gránulos ribonucleoprotéicos. Estos gránulos inducidos por estrés son muy evidentes en la gónada de los nematodos. En condiciones de estrés por choque de calor y detención prolongada en la meiosis, diversas proteínas de unión a RNA forman agregados en el citoplasma (**Figura 5A**) (Schisa 2014). De igual manera, se ha detectado RNA asociado a estos gránulos (**Figura 5B**) (Schisa *et al.* 2001). Adicionalmente, mRNAs específicos que se encuentran silenciados traduccionalmente se asocian a los gránulos que se forman por la detención prolongada en la meiosis durante la ovogénesis (Noble *et al.* 2008). En conjunto, las observaciones sugieren que los gránulos ribonucleoprotéicos en la gónada de *C. elegans* son sitios donde los mRNAs maternos son almacenados y/o protegidos de la degradación en condiciones de estrés (Schisa 2014).

Los gránulos inducidos por estrés en la gónada de *C. elegans* han sido clasificados con base en sus componentes y localización subcelular. En condiciones de detención prolongada en la meiosis, gránulos con enriquecimiento de CGH-1, CAR-1 (*cytokinesis, apoptosis, RNA associated*) y DCAP-2 (*mRNA deccapping enzyme*) fueron denominados como cuerpos grP, mientras que aquellos con enriquecimiento de DCAP-2 y ausencia de CGH-1 o CAR-1 fueron denominados cuerpos dcP (Noble *et al.* 2008).

A pesar de que los componentes que se asocian a gránulos han sido estudiados de manera individual, las funciones de cada uno de los tipos de gránulos no está clara. Un análisis de mutantes con pérdida de función de CAR-1 mostró que esta proteína es importante para que los gránulos tengan una morfología normal (Hubstenberger *et al.* 2013). Además, CAR-1 reprime la traducción de mRNAs en sitios específicos de la gónada (Noble *et al.* 2008). CAR-1 silencia la expresión de *Notch/glp-1* en ovocitos maduros, en animales mutantes para *car-1*, la proteína CGH-1 deja de localizarse en los gránulos y GLP-1 se expresa ectópicamente en ovocitos proximales (Noble *et al.* 2008). Una gran cantidad de mRNAs que no se expresan en los ovocitos proximales se localizan en gránulos inducidos por estrés. Entre ellos están *pos-1* (*posterior segregation*), *skn-1* (*skinhead*), *par-3* (*abnormal embryonic partitioning of cytoplasm*), *nos-2* y *glp-1* (Schisa *et al.* 2001). Por otra parte, aquellos mRNAs cuya traducción es activa en los

ovocitos no se localizan en los gránulos inducidos por estrés, tal es el caso de *rme-2* (*receptor mediated endocytosis*) (Noble *et al.* 2008).

Los gránulos inducidos por estrés en la gónada de *C. elegans* son dinámicos al igual que los descritos en otros organismos. Después de una hora de choque de calor, se forman gránulos discretos la proteína MEX-3 en el centro de la gónada y en ovocitos. El tamaño de estos gránulos aumenta con el tiempo de exposición al calor. Después de una hora de recuperación, estos gránulos comienzan a disociarse (Jud *et al.* 2008). Al igual que MEX-3, otras proteínas de unión a RNA se han observado en asociación con gránulos inducidos por estrés en la gónada de *C. elegans*, como son CGH-1 (Boag *et al.* 2008) y OMA-1 (Spike *et al.* 2014).

Entre las características biofísicas de estos gránulos está una transición de fases dependientes de sus componentes. Se propone que estos gránulos llevan a cabo transiciones de fase cuidadosamente reguladas desde un estado sólido (polímero) hasta uno semilíquido, en el que tienen un comportamiento similar al de gotas de agua (Hubstenberger *et al.* 2013, 2015). Estos hallazgos sugieren que variaciones en los componentes de los gránulos tienen un papel importante en el dinamismo de su estructura, lo que podría tener un efecto en su función.

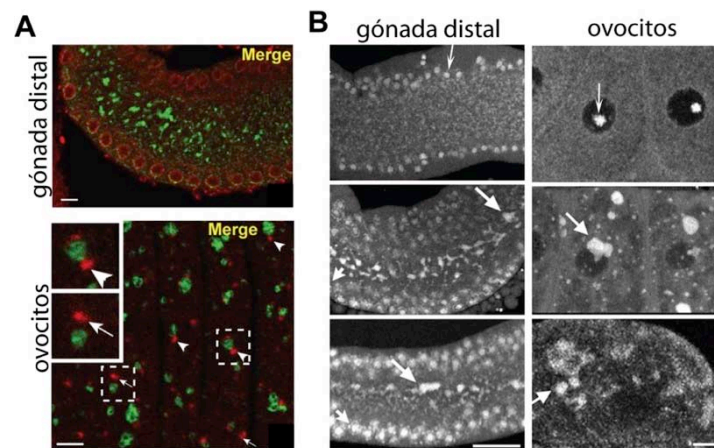


Figura 5. Gránulos inducidos por estrés en la gónada de *C. elegans*. Nematodos “hembras” (con mutaciones que inhabilitan el esperma) permanecieron sin cruzarse de tal manera que sus ovocitos fueron expuestos a estrés por detención prolongada en la meiosis. Sus gónadas fueron disecadas, fijadas y teñidas. (A) Anticuerpos contra CGH-1 (verde) y DCAP-2 (rojo) fueron usados para identificar algunos componentes de los gránulos formados en el centro de la gónada o en los ovocitos proximales. (B) El RNA fue teñido con Syto14 fluorescente en condiciones normales de desarrollo (paneles superiores) y de detención prolongada en la meiosis (paneles medio e inferiores). Imágenes tomadas de (Jud *et al.* 2008; Noble *et al.* 2008).

4.3 Las proteínas TIA-1 y TIAR se asocian a gránulos de estrés

La proteína TIA-1 (*T-cell-restricted intracellular antigen 1*) fue identificada por primera vez cuando linfocitos T CD8⁺ y células NK de ratones fueron estimulados por mitógenos y citocinas *in vitro* para encontrar moléculas efectoras en gránulos citoplasmáticos (Tian *et al.* 1991). Posteriormente, al realizar un *Northern blot* para identificar isoformas del mRNA de TIA-1, se encontró el mRNA del gen parálogo TIAR (TIA-1 related) por hibridación cruzada (Kawakami *et al.* 1992). Homólogos a las proteínas TIA-1 y TIAR humanas han sido descritos en otros organismos como *Mus musculus*, *D. melanogaster*, *C. elegans* y *S. cerevisiae*, entre otros (Brand y Bourbon, 1993; Ulbricht y Olivas, 2008) (**Figura 6**).

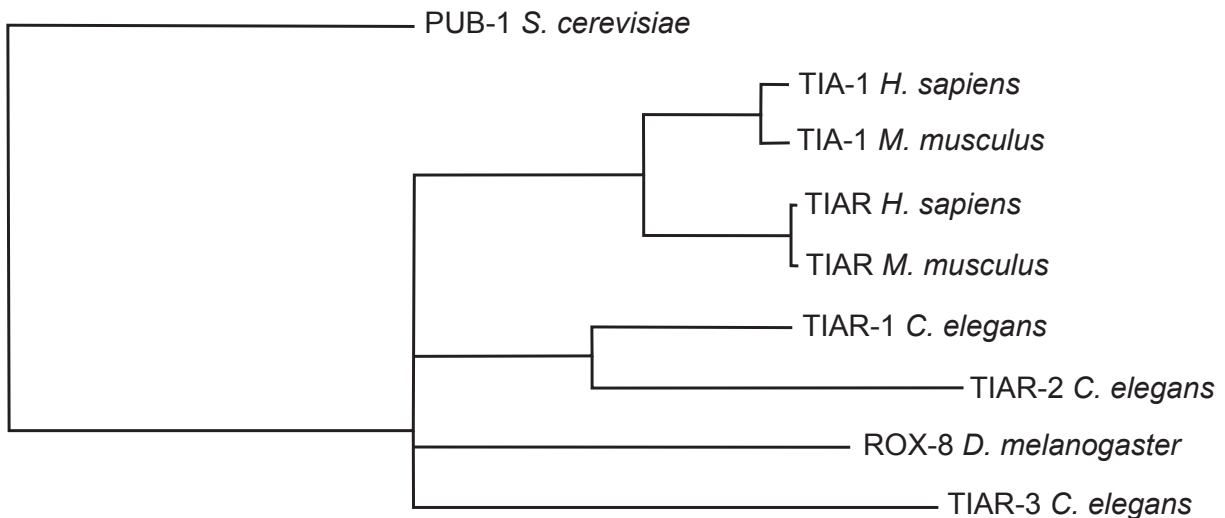


Figura 6. TIA-1 y TIAR tienen homólogos en diversos organismos. Árbol filogenético de las secuencias de las proteínas homólogas a TIA-1 y TIAR en *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* y *Saccharomyces cerevisiae*. Esta figura fue realizada con base en un alineamiento de múltiples secuencias de aminoácidos, con el software Jalview v.2.

Las proteínas TIA-1 y TIAR están formadas por tres dominios de unión a RNA y dominio rico en glutamina que se localiza en el extremo carboxilo terminal. Los tres dominios pertenecientes a la familia RRM (RNA recognition motif), de ~100 aminoácidos en el extremo amino les dan la capacidad de unirse a RNA con especificidad de secuencia. El dominio del extremo carboxilo, que es rico en glutamina que les confiere a estas proteínas propiedades de prión (Tian *et al.* 1991; Kawakami *et al.* 1992; Dember *et al.* 1996) (Figura 7). Las de prión que tienen estas proteínas con que existen en dos conformaciones, una de ellas es soluble y la otra en forma de agregados. Los priones clásicos forman agregados de manera irreversible (Prusiner 1998), sin embargo los agregados de las proteínas TIA-1 y TIAR-1 sí pueden desensamblarse (Kedersha *et al.* 1999, 2000).

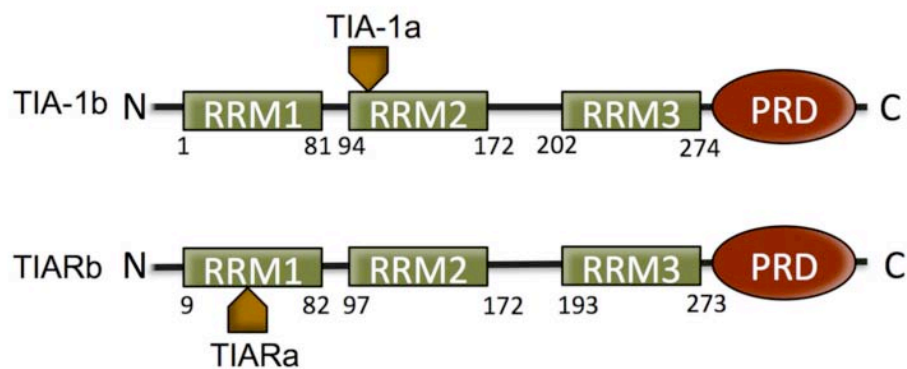


Figura 7. Las proteínas TIA-1 y TIAR. Esquema que representa los dominios conservados de las proteínas TIA-1 y TIAR. Éstas proteínas tienen tres dominios de unión a RNA (RRMs, en verde) y uno rico en glutamina en el extremo carboxilo terminal (PRD, en rojo). Ambas proteínas tienen el 80% de identidad. TIA-1a y TIARa (amarillo) representan los pequeños péptidos específicos de los dominios RRM en cada una de estas dos proteínas. Imagen tomada de (Waris *et al.* 2014).

Las proteínas TIA-1 y TIAR son reguladoras de RNA a diversos niveles, se pueden localizar tanto en el núcleo como en el citoplasma de las células (**Figura 8**). Dentro del núcleo regulan el “splicing” alternativo promoviendo la inclusión de exones. Esto ocurre mediante su unión a secuencias ricas en uracilo, entre los nucleótidos +6 y +30 río abajo de los exones, facilitando la unión del snRNP U1 y posteriormente la de la maquinaria de splicing al pre mRNA (Zhu *et al.* 2003). La inclusión del 15% de los exones objeto de “splicing” alternativo parece ser

regulada por las proteínas TIA-1 y TIAR, tales como los del receptor 2 del factor de crecimiento en fibroblastos (FGFR-2), y del CGRP (*calcitonin/calcitonin gene-related peptide*), entre otros (Aznarez *et al.* 2008) (**Figura 8A**). En el citoplasma, estas proteínas regulan la traducción de diversos mRNAs en donde se unen a elementos ricos en adenina y uracilo de ~70 nt (AREs) en el extremo 3'UTR y a motivos de oligopirimidinas (TOPs) en el extremo 5' (Damgaard y Lykke-Andersen 2011; Waris *et al.* 2014) (**Figura 8B**).

La función de TIA-1 y TIAR es especialmente relevante en condiciones de estrés ambiental, tales como el estrés oxidativo, la exposición a rayos UV, el choque de calor y el ayuno. Como se mencionó en la sección anterior, en condiciones de estrés disminuye la disponibilidad del complejo GTP-eIF2-tRNA^{met}, el complejo de inicio de la traducción no se ensambla y proteínas como TIA-1 agregan los mRNAs en gránulos de estrés (Kedersha *et al.* 2002) (**Figura 8D**). El dominio con propiedades de prión de TIA-1 es el que promueve la formación de dichos gránulos (Gilks *et al.* 2004).

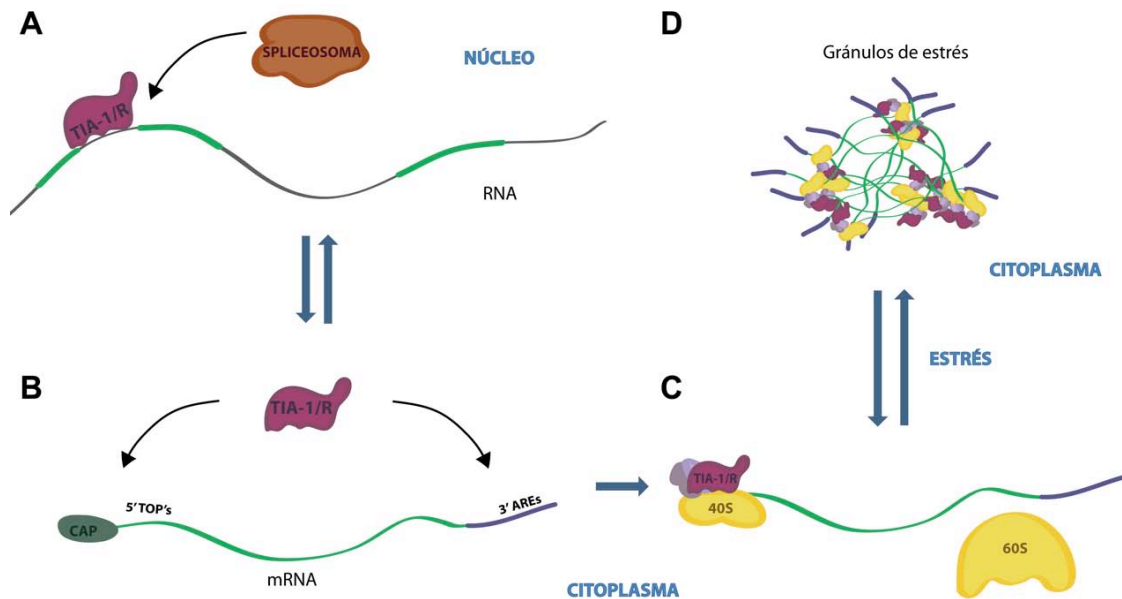


Figura 8. TIA-1 y TIAR regulan la expresión genética a diversos niveles. Las proteínas TIA-1 y TIAR regulan el corte alternativo de los transcritos. (A) Dentro del núcleo, estas proteínas se unen a moléculas de pre-mRNA y promueven la unión del spliceosoma. (B) En el citoplasma, TIA-1/R regulan la traducción de mRNA uniéndose a motivos AREs en su región 3'UTR o a motivos TOPs en su región 5'. (C y D) Durante condiciones de estrés, los complejos de inicio de la traducción se acumulan y TIA-1/R se les unen, promoviendo la formación de gránulos de estrés mediante su dominio de prión.

En búsqueda de las funciones de estas proteínas de unión a RNA, se han realizado estudios en cultivos celulares. En células HeLa, se ha demostrado que la reducción de TIA-1/TIAR resulta en un incremento de la proliferación celular (Izquierdo *et al.* 2011). En contraste, células troncales germinales embrionarias *tiar*^{-/-} de ratón mostraron un defecto en la proliferación *in vitro* (Beck *et al.* 1998).

Estas proteínas juegan un papel importante en la fertilidad en mamíferos. Ratones adultos *tiar*^{-/-} resultaron ser estériles debido a la falta de espermatogonias en machos, y de folículos y ovocitos en hembras (Beck *et al.* 1998). Así mismo, se ha demostrado que la sobreexpresión de TIAR en etapas tempranas del desarrollo conlleva a letalidad embrionaria. Sin embargo, no se descifró el mecanismo mediante el cual un proceso tan importante como la reproducción se ve afectado por la ausencia de las proteínas de unión a mRNA TIA-1 y TIAR (Kharraz *et al.* 2010).

En el nematodo *C. elegans* existen tres proteínas ortólogas a TIA-1/TIAR, las cuales han sido estudiadas en nuestro grupo. Sólo una de ellas, TIAR-1, es indispensable para la inducción de apoptosis fisiológica (Silva-García y Navarro, 2013). Además, los animales mutantes en *tiar-1* tienen menor longevidad y menor resistencia al estrés por radiación ultravioleta o del tipo oxidativo (Rousakis *et al.* 2014). Aunado a estos hallazgos, se observó que animales mutantes en el gen *tiar-1* son estériles a 25°C, temperatura en la que animales silvestres son fértiles. La localización y expresión de TIAR-1 y TIAR-2 ha sido observada mediante inmunotinciones y transgénicos no integrados de alto número de copias. TIAR-2 parece localizarse en gránulos P y en los gránulos de estrés en los ovocitos (Jud *et al.* 2008), mientras que TIAR-1 es aparentemente ubicua, se agrega en gránulos inducidos por estrés en tejidos somáticos (Rousakis *et al.* 2014) y también se localiza en los gránulos P (Silva-García y Navarro, 2013).

5 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Tanto mamíferos como nematodos presentan defectos en la línea germinal y en la respuesta al estrés cuando las proteínas de la familia TIA-1/TIAR están ausentes. Por esta razón, y dado el alto grado de conservación evolutiva en los procesos de regulación de mRNA, es importante entender la función de estas proteínas en la fertilidad. Por lo tanto, en este proyecto se estudió el papel de TIAR-1 en la fertilidad de *C. elegans* en condiciones normales de desarrollo y en condiciones de estrés.

6 HIPÓTESIS

Si las proteínas de la familia TIA-1/TIAR se requieren para la respuesta sistémica contra el estrés de los organismos entonces también deben contribuir a la protección de las células germinales en estas condiciones.

7 OBJETIVO

Estudiar la función de la proteína de unión a RNA TIAR-1 en la gónada de *C. elegans* en condiciones normales y de estrés por choque de calor, ayuno y detención prolongada en la meiosis.

7.1 Objetivos particulares

- Caracterizar los defectos en la fertilidad de *C. elegans* en mutantes de *tiar-1* en condiciones normales de crecimiento.
- Estudiar la expresión y localización sub-celular de TIAR-1 en condiciones normales de crecimiento y durante el estrés por choque de calor, ayuno y detención prolongada en la meiosis.
- Evaluar si hay un efecto protector contra el choque de calor y el ayuno de *tiar-1* en las células germinales.
- Desarrollar un sistema que permita identificar a los transcritos que modifican su expresión en ausencia de *tiar-1*.

8 MATERIALES Y MÉTODOS

APARTADO I

Métodos detallados incluidos en Huelgas-Morales G. *et al.* 2016

8.1 Mantenimiento de cepas

Las cepas de *Caenorhabditis elegans* usadas en este estudio fueron derivadas de la cepa silvestre Bristol N2. Las cepas de nematodos fueron mantenidas en cajas de Petri (60 mm de diámetro) con medio “Normal growth medium” lite (NGM-lite) (1.5 g/L NaCl, 4 g/L bactotripton, 3 g/L KH_2PO_4 , 0.5 g/L K_2HPO_4 , 8 mg/L colesterol y 20 g/L agar) (Sun y Lambie, 1997). Dicho medio sólido es una modificación al NGM de Brenner y fue inoculado con *Escherichia coli* de la cepa OP50-1, que sirve como alimento a los nematodos (Brenner 1974). La cepa de *E. coli* fue cultivada en medio Luria Bertani (LB) con estreptomicina (10 g/L tripton, 5 g/L extracto de levadura, 5 g/L NaCl, 50 $\mu\text{g/ml}$ estreptomicina) en agitación a 37°C durante toda la noche. Después se colocaron algunas gotas del cultivo de OP50-1 en las cajas de NGM-lite y se incubaron a temperatura ambiente durante toda la noche, para ser utilizadas de inmediato o ser almacenadas a 4°C por hasta dos semanas. El mantenimiento de las cepas se llevó a cabo dentro de una incubadora de temperatura constante a 20°C, que es la temperatura estándar para el mantenimiento de estos nematodos, a menos que se indique lo contrario. La **Tabla 2** contiene una lista completa de las cepas usadas en este trabajo con sus genotipos.

Tabla 2. Cepas usadas en este estudio

Nombre de la cepa	Genotipo	Referencia
BA671	<i>spe-9(hc88)</i>	(L'Hernault <i>et al.</i> 1988)
CB1120	<i>unc-4(e120)</i>	(Brenner 1974)
DG1612	<i>vab-1(dx31)/mIn1 [dpy-10(e128) mIs14] II; fog-2(q71) V</i>	(Miller <i>et al.</i> 2003)
DG3883	<i>tiar-1(tm361) unc-4(e120) II</i>	(Huelgas-Morales <i>et al.</i> 2016)
DG3886	<i>tnSi4(gfp::tev::stag::rpl-1a)</i> retrocruzada x3	Este trabajo
DG3921	<i>spe-9(hc88);tnSi4(gfp::rpl-1)</i>	Este trabajo
DG3922	<i>tiar-1(tm1545[tiar-1::gfp::tev::s]) II</i> retrocruzada x3	(Huelgas-Morales <i>et al.</i> 2016)
DG3929	<i>tiar-1(tm1543[loxPCbunc-119(+)]loxP) II</i> retrocruzada x3	Este trabajo
HT1593	<i>unc-119(ed3) III</i>	(Hochbaum <i>et al.</i> 2010)
JK987	<i>tra-2(q276)/mnC1 dpy-10(e128) unc-52(e444) II</i>	(Mendenhall <i>et al.</i> 2009)
N2	Silvestre, aislado en Bristol	(Brenner 1974)
RN040	<i>fog-2(q71)</i> proveniente de DG1612	(Huelgas-Morales <i>et al.</i> 2016)
RN041	<i>tiar-1(tm1545); spe-9(hc88)</i>	Este trabajo
RN054	<i>tiar-1(tm1545) II; fog-2(q71) V</i>	(Huelgas-Morales <i>et al.</i> 2016)
RN055	<i>tiar-1(tm1543) II; tiar-3(ok144) X</i>	(Huelgas-Morales <i>et al.</i> 2016)
RN060	<i>tiar-1(tm1543);zcls9 [hsp-60::GFP]</i>	Este trabajo
RN061	<i>tiar-1(tm1543);vit-2::GFP</i>	Este trabajo
RN062	<i>tiar-1(tm1543);hsp-4::GFP</i>	Este trabajo
RN063	<i>tiar-1(tm1543); tiar-2(tm2923) II; tiar-3(ok144) X</i>	(Huelgas-Morales <i>et al.</i> 2016)
RN064	<i>tiar-1(tm1543) tiar-2(tm2923) II</i>	(Huelgas-Morales <i>et al.</i> 2016)
RN065	<i>tiar-1(tm1543) II; gpIs1[Phsp-16.2::GFP]?</i>	(Huelgas-Morales <i>et al.</i> 2016)

Nombre de la cepa	Genotipo	Referencia
RN066	<i>tiar-1(tm1543) II; fog-2(q71) V</i>	(Huelgas-Morales <i>et al.</i> 2016)
RN067	<i>tiar-3(ok144) X</i> retrocruzada x4	(Huelgas-Morales <i>et al.</i> 2016)
RN068	<i>tiar-2(tm2923) II</i> retrocruzada x6	(Huelgas-Morales <i>et al.</i> 2016)
RN076	<i>tiar-1(tm361) II</i> retrocruzada x6	(Silva-García y Navarro 2013)
RN077	<i>tiar-1(tm361) xmSi02[Ptiar-1::tiar-1::gfp::tiar-1 3'utr; Cbr unc-119(+)] II</i>	Este trabajo
RT130	<i>pwIs23 [vit-2::GFP]</i>	(Grant y Hirsh 1999)
SJ4058	<i>zcIs9 [hsp-60::GFP + lin-15(+)] V</i>	(Yoneda <i>et al.</i> 2004)
TJ375	<i>gpIs1[Phsp-16-2::GFP]?</i>	(Rea <i>et al.</i> 2005)

8.2 Obtención de la cepa *tiar-1::gfp* mediante MosSCI

Para hacer una fusión transcripcional en el extremo 3' de *tiar-1* con GFP e insertarla en el genoma de *C. elegans* se usó la técnica de Mos Single Copy Insertion (MosSCI) (Frøkjær-Jensen *et al.* 2009). Esta técnica consiste en la inserción de la secuencia deseada en un sitio específico del genoma de *C. elegans*. Dicho sitio contiene el transposón Mos1 flanqueado por las secuencias denominadas como L y R. Cuando la enzima transposasa Mos identifica al transposón Mos1, realiza dos cortes que serán reparados por recombinación utilizando como templado de reparación la secuencia que se desea insertar flanqueada por secuencias L y R, que sirven como brazos de homología (Frøkjær-Jensen *et al.* 2008) (**Figura 9**).

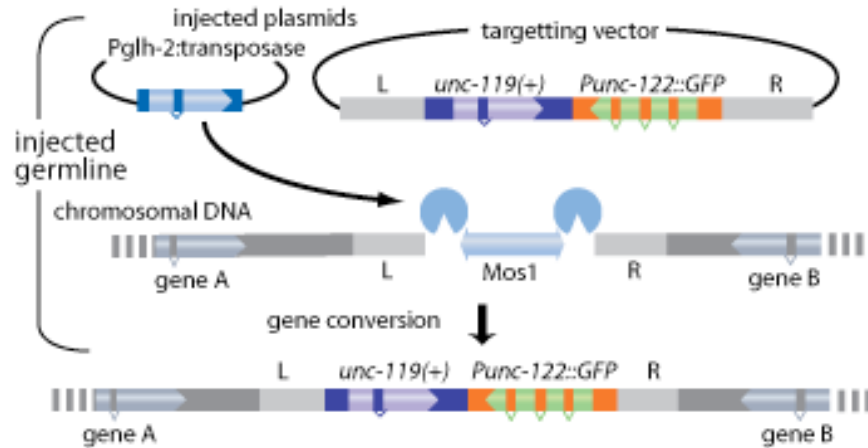


Figura 9. Modificación del genoma mediante inserción de copia única por MosSCI. La metodología de MosSCI consiste en la inserción de la secuencia deseada en un sitio específico del genoma de *C. elegans*. En este esquema el gen que se desea insertar (verde y anaranjado) es la *gfp* con el promotor de *unc-122*, y se usa el gen *unc-119* (morado) como marcador de selección positivo. La enzima transposasa Mos (azul) se expresa con el promotor de *glh-2* en la línea germinal, realiza un corte del sitio de interés y así promueve que la célula repare el daño mediante recombinación homóloga con el templado de interés (*targetting vector*). Imagen de Frøkjær-Jensen *et al.* (2009).

En primer lugar se realizó una construcción que contenía el promotor de *tiar-1* y su marco de lectura, sin el codón de paro, seguido por la secuencia de la GFP y la secuencia del 3'UTR de *tiar-1* (1500 pb río abajo del codón de paro de *tiar-1*). Dicha construcción se llevó a cabo con el sistema Gateway (Life Technologies, Carlsbad, C). Los fragmentos para dicha construcción se obtuvieron a partir de PCR de DNA genómico de la cepa silvestre y después fueron introducidos en los plásmidos BP por Giovanni García Silva (Silva-García y Navarro 2013), mientras que la secuencia de la GFP se adquirió del plásmido pCM1.53 (Addgene #17250) y el plásmido destino fue el pCFJ150 (Addgene #19329), que tiene los sitios necesarios para la recombinación homóloga (L y R) así como el gen *Cbr unc-119(+)* como marcador de selección (Frøkjær-Jensen *et al.* 2008). Para reacción LR se mezclaron 136.8 ng de pCFJ150, 40.2 ng de pCM1.53, 45.6 ng de BP promotor + gen, 27.2 ng de BP 3'UTR y 2 μ l de mix de enzima LR plus (Life Technologies, Carlsbad, C). Dicha mezcla se incubó a 25°C toda la noche en el

termociclador (tapa a 100°C). El producto de reacción se agregó a células competentes DH5- α en un tubo Eppendorf de 500 μ l (100 μ l de bacterias con 1 o 2 μ l de producto de reacción). Se mantuvo dicha mezcla en hielo por 30 min. Posteriormente, se incubó a 42°C por 45 s y se regresó al hielo por 2 min más. Después se agregaron 0.5 ml de medio SOC a la mezcla y se incubó a 37°C por 1 h. Se plaquearon 100 μ l de este cultivo en cada caja de LB+ ampicilina y se incubó a 37°C durante toda la noche. De las colonias que crecieron en estas cajas se hicieron Mini-preps para purificar los plásmidos. La identidad de los insertos (LR7) fue corroborada por ensayos de restricción. Para el ensayo de restricción, 350 ng de plásmido LR7 fueron digeridos con BamH1 y Xho1 por separado, obteniendo los fragmentos del tamaño esperado; 11051 pb y 2777 pb en el caso de BamH1 y 11647 pb y 2181 pb en el caso de Xho1.

Una vez obtenido el plásmido de recombinación con el inserto correcto, éste se introdujo mediante microinyección en adultos jóvenes de la cepa EG6699 en un solo brazo de la gónada (*unc-119* mutantes, con el sitio de recombinación de Mos en el cromosoma II *ttTi5650*) con la siguiente mezcla de plásmidos: LR7 (10 ng/ μ l), pCFJ104 (10 ng/ μ l) (Addgene plásmido # 19328), pGH8 (10 ng/ μ l) (Addgene plásmido # 19359) y pCFJ90 (2 ng/ μ l) (Addgene plásmido # 19327) y pCFJ601 (10 ng/ μ l) (Addgene plásmido # 34874). En la **Tabla 3** se detalla la lista completa de los plásmidos y las secuencias que estos contienen.

Los animales inyectados fueron colocados con cuidado en cajas medianas de NGM con bacteria OP50-1, posteriormente se incubaron a 24°C durante una semana hasta que se terminaron la comida. La expresión de la proteína mCherry (rojo) en la progenie de los animales inyectados indicó que las inyecciones se llevaron a cabo correctamente. La presencia de la proteína GFP (verde) indicó que la construcción *tiar-1::gfp* indicó que esta construcción estaba siendo correctamente expresada. Sin embargo, los animales con en donde ambas proteínas se expresaban probablemente contenían arreglos extracromosomales en vez de haberse insertado mediante recombinación por Mos (Frøkjær-Jensen *et al.* 2008). Se seleccionaron aquellos animales que presentaron una movilidad silvestre y que, al microscopio de fluorescencia sólo presentaran color verde y no el rojo, asegurando que la construcción *tiar-1::gfp* estaba integrado en el genoma. Se obtuvieron dos líneas independientes y los alelos se denominaron *xmSi02* y *xmSi03*. La cepa con el alelo *xmSi02* no se retrocruzó con animales de la cepa silvestre, sino que se procedió directamente a cruzarla con animales mutantes *tiar-1(tm361)* (cepa original).

Tabla 3. Plásmidos utilizados en la generación de cepas de *C. elegans*

Nombre del plásmido*	Número de Addgene	Secuencia que contiene
pCM1.53	17250	<i>gfp</i>
pCFJ104	19328	<i>Pmyo-3::mCherry</i>
pCFJ90	19327	<i>Pmyo-2::mCherry::unc-54utr</i>
pCFJ601	34874	<i>Peft-3::Mos1transposase</i>
pGH8	19359	<i>pRAB-3::mCherry::unc-54utr</i>
pMA122	34873	<i>Phsp-16.41::peel-1</i>
pDD162	47549	<i>Peft-3::Cas9 + sgRNA vacío</i>
pDD104	47551	<i>Peft-3::Cre</i>

*Los plásmidos usados en para la generación de los dos nuevos alelos de *tiar-1* fueron un obsequio de Arshad Desai, Bob Goldstein y Erik Jorgensen (Cheeseman y Desai, 2005; Frøkjær-Jensen *et al.* 2012; Sando *et al.* 2013).

8.3 Obtención de nuevos alelos de *tiar-1* mediante edición del genoma por CRISPR-Cas9

Para hacer nuevos alelos de *tiar-1* se usó la técnica de edición del genoma por CRISPR-Cas9 (Dickinson *et al.* 2013; Friedland *et al.* 2013). Con el objetivo de realizar las ediciones específicamente en *tiar-1* se seleccionó una secuencia específica en el último exón de *tiar-1* con el RNA guía (sgRNA) para ser cortada por Cas9. El “protospacer-associated motif” (PAM) para este sgRNA se encuentra en la posición 5713045 en el genoma de *C. elegans* (ggaaactcacagccgtactcTGG). Para generar dicho sgRNA, se diseñaron oligos cuyos extremos 5' están encontrados (**Tabla S2**). Estos oligos sirvieron como cebadores para la clonación en sentidos opuestos del sgRNA *tiar-1* dentro del plásmido pDD162 (*Peft-3::Cas9 + sgRNA vacío*) (Addgene plásmido #47549) que se realizó con el estuche de “Q-5 site directed mutagenesis” (New England BioLabs). El sgRNA clonado dentro del plásmido pDD162 fue útil para dirigir el corte de Cas-9 al locus de interés para la generación de dos alelos distintos.

En primer lugar se obtuvo un alelo en el que el marco de lectura de *tiar-1* fue eliminado del genoma. Para esto, se hizo una construcción que consistía en dos brazos de homología con el genoma a ambos lados de la secuencia del gen *Cbr unc-119(+)* flanqueado por secuencias *LoxP*

dentro del vector pBluescript KS- (ver oligos en **Tabla S2**). Esta construcción fue usada como templado de reparación y se realizó mediante una reacción de Gibson (New England BioLabs) (**Figura 10A**). Para obtener los fragmentos a unir en la construcción, se diseñaron oligos especiales con ayuda del software NEBuilder Assembly Tool (New England BioLabs). Todos los productos de PCR que sirvieron como fragmentos para la reacción de Gibson, fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 1% en TAE 1x y purificados con el estuche de QIAquick Gel Extraction (Qiagen). La reacción de Gibson se llevó a cabo con los reactivos del Gibson Assembly Master Mix (New England BioLabs) utilizando de 0.02 a 0.06 pmoles de cada fragmento (según la especificación del reactivo los fragmentos deben estar 3 veces más concentrados que el plásmido destino) para sumar un total de 0.2 pmoles de DNA en una reacción de 20 μ l.

En segundo lugar se obtuvo un alelo que consistió en la fusión transcripcional de *tiar-1* con S::TEV::GFP (Cheeseman y Desai 2005) en el extremo 3'. El templado de reparación para la inserción de GFP::TEV::S en el marco de lectura de *tiar-1* consistió en el gen *tiar-1*, el GFP::TEV::S, el codón de paro, el 3'UTR de *tiar-1*, el gen *Cbr unc-119* flanqueado por *LoxP* y una secuencia de homología río abajo del 3'UTR de *tiar-1* (ver oligos en **Tabla S2**) (**Figura 10C**). En este caso la reacción de Gibson se llevó a cabo utilizando de 0.02 a 0.06 pmoles de cada fragmento para sumar un total de 0.5 pmoles de DNA en una reacción de 20 μ l. Sin embargo, para que Cas9 no cortara este templado de reparación, se realizó una mutación del sitio PAM con el estuche de "Q-5 site directed mutagenesis" (New England BioLabs), de TGGGA a TGCA, resultando en un cambio en el aminoácido no conservado G341A.

Para generar las cepas mutantes se micro-inyectaron entre 60 y 80 nematodos jóvenes adultos de la cepa HT1593 (*unc-119 (ed3)*) en la gónada, con la siguiente mezcla de plásmidos: templado de reparación (10 ng/ μ l), pDD162 con el *tiar-1* sgRNA (50 ng/ μ l), pMA122 (10 ng/ μ l) (Addgene plásmido # 34873), pCFJ104 (5 ng/ μ l) (Addgene plásmido # 19328), pGH8 (10 ng/ μ l) (Addgene plásmido # 19359) y pCFJ90 (2.5 ng/ μ l) (Addgene plásmido # 19327) (para la lista de plásmidos ver **Tabla 3**). Los nematodos inyectados fueron recuperados e incubados a 25°C hasta que su progenie se acabó la comida de la caja Petri (aproximadamente una semana después). Posteriormente, estos nematodos fueron colocados en una incubadora a 34°C por 3h. Los nematodos que sobrevivieron y que presentaron un movimiento normal (no-Unc) fueron

seleccionados. Se obtuvo una cepa para cada uno de los alelos diseñados, una con la delección de *tiar-1* y una con la inserción de GFP.

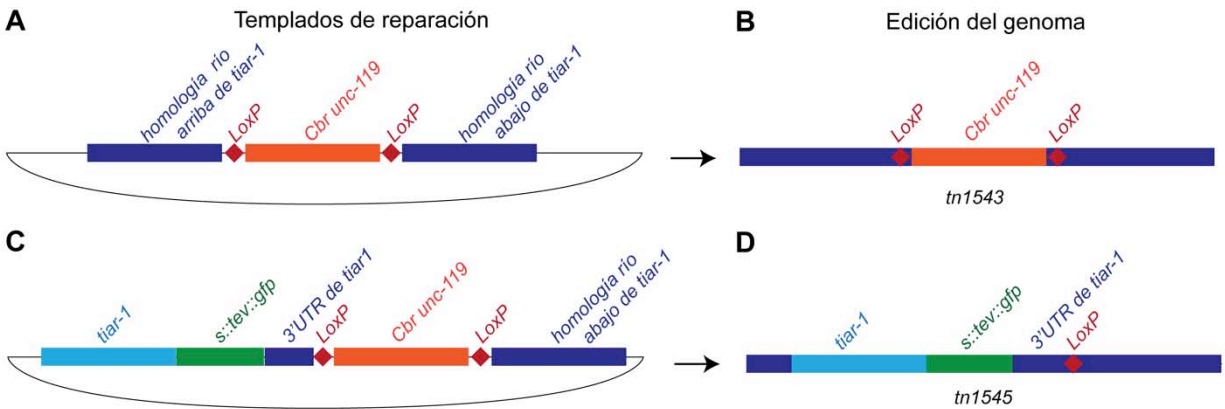


Figura 10. Alelos de *tiar-1* mediante edición del genoma por CRISPR-Cas9. Representaciones esquemáticas de las construcciones que fueron usadas como plantillas de reparación (A y C) y las secuencias tal y como quedaron después de la edición del genoma mediante CRISPR-Cas9 (B y D). (A) El template de reparación para hacer una delección del marco de lectura de *tiar-1* consta de dos brazos de homología río arriba y abajo de *tiar-1* (azul marino) a ambos lados del marcador de selección positiva *Cbr unc-119* (anaranjado). Este marcador de selección tiene sitios *LoxP* a ambos lados (rojo). (B) El alelo *tn1543* contiene el marcador de selección en lugar del marco de lectura de *tiar-1*. (C) El template de reparación para insertar la secuencia de la *s::tev::gfp* en el extremo 3' de *tiar-1* consta de el marco de lectura de *tiar-1* (azul claro), la *s::tev::gfp* (verde), el 3' UTR de *tiar-1* (azul marino), el marcador de selección flanqueado por *LoxP* (anaranjado y rojo) y un brazo de homología río abajo de *tiar-1*. (D) El alelo *tn1545* contiene a la secuencia *s::tev::gfp* en marco de lectura con *tiar-1*. Esta secuencia está seguida por el 3' UTR de *tiar-1* y posteriormente un sitio de *LoxP* que quedó como cicatriz después de la eliminación de *Cbr unc-119* con la recombinasa *Cre*.

Para remover el marcador de selección *Cbr unc-119* flanqueado por *LoxP*, se inyectaron nematodos adultos de las cepas obtenidas con la siguiente mezcla de plásmidos: pDD104 (*Peft-3::Cre*) (Addgene plásmido # 47551) (50 ng/μl) y pCFJ90 (2.5 ng/μl). Para la cepa *tiar-1::gfp::tev::s* se obtuvieron nematodos Unc en la progenie, lo que indica que el marcador de selección fue removido con éxito. Esto implicó que se obtuvo una cepa con la *gfp::tev::s* en marco de lectura con *tiar-1*, seguido por su 3' UTR y una cicatriz de *LoxP* (Figura 10D). Este

alelo (*tn1545*) fue confirmado mediante PCR y secuenciación. Por otro lado, ningún nematodo Unc fue obtenido de la progenie en el caso de la cepa de la delección de *tiar-1*. Esto indica que, por alguna razón desconocida, el marcador de selección no se removió para esta cepa. Para este alelo (*tn1543*) se logró amplificar y secuenciar exitosamente los extremos del templado de reparación insertados en la región genómica correcta de *tiar-1*, pero no logramos obtener un amplificado completo del sitio en donde ocurrió la inserción del marcador de selección mediante PCR. A pesar de esto, no fue posible detectar el gen de *tiar-1* en esta cepa mediante PCR, lo que confirma que *tiar-1* está ausente en esta cepa (**Figura 10C**). Las cepas que con los nuevos alelos de *tiar-1* generados fueron retrocruzadas con la cepa silvestre (N2) tres veces.

8.4 Ensayos de fertilidad, letalidad embrionaria e incidencia de machos

Para cuantificar la progenie, se colocaron nematodos en el estadio larvario L4 individualmente en cajas de NGM-lite con OP50-1. Estos animales se trasladaron a cajas nuevas cada 24 h. Cuando los conteos se realizaban a 20°C, los nematodos eran trasladados a cajas nuevas por 4 días. Cuando se realizaban a 25°C, los nematodos eran trasladados a cajas nuevas únicamente por 3 días debido a que, al final de este periodo, los hermafroditas habían agotado su reserva de espermatozoides y, por lo tanto, cesado la producción de embriones. La progenie total incluyó tanto a los nematodos que completan el desarrollo, así como a los embriones muertos y a las larvas que arrestan su desarrollo. Las cajas en donde los animales depositaron su progenie fueron conservadas para determinar la letalidad embrionaria y la incidencia de machos en la población posteriormente.

La letalidad embrionaria se calculó a partir de la cuantificación de los embriones que no habían eclosionado 24 h después de haber sido expulsados del útero del hermafrodita. La letalidad embrionaria fue expresada como el porcentaje de embriones que no eclosionaron del total de progenie. La incidencia de machos fue cuantificada cuando la progenie llegó al estadio L4/adulto, en donde los machos son fácilmente identificables en el microscopio estereoscópico.

La incidencia de machos está expresada como el porcentaje de nematodos machos entre la progenie que completó el desarrollo.

Para determinar si la alta incidencia de machos en poblaciones *tiar-1* mutantes se debía a problemas en la ovogénesis, se cruzaron animales *tra-2* machos XX con “hembras” *fog-2(q71);tiar-1(tm1543)* o con “hembras” *fog-2(q71)* como control. Para esto, se incubaron “hembras” de ambas cepas a 20°C y seleccionaron en el estadio L4. Estas larvas L4 se colocaron individualmente en cajas pequeñas de NGM-lite con bacterias OP15-1. Posteriormente se agregaron de 5-10 machos *tra-2* a cada caja para que se cruzaran con las “hembras”. Después de un día de incubación a 20°C, se retiraron los machos de las cajas y estas fueron incubadas a 25°C. Aquellas “hembras” que se cruzaron exitosamente fueron transferidas a cajas nuevas cada 24 h por 4 días, siempre a 25°C. Las cajas que contenían la progenie producida fueron mantenidas a 25°C durante 2 días y, al final de estos, se cuantificó la proporción de machos en la población.

8.5 Diseño de cruzas con el uso de cromosomas balanceadores

Para facilitar cruzas entre animales mutantes *tiar-1(0)* y cualquier otra mutación o transgén se usó el rearreglo cromosomal o balanceador *mIn1[dpy-10(e128) mIs14]* II. Este balanceador contribuye al genotipo con una copia silvestre del cromosoma II. Sin embargo, este balanceador no puede recombinar porque contiene una inversión en la parte central del cromosoma (Edgley *et al.* 2006). Una ventaja de *mIn1* es que contiene un reportero con GFP en la faringe y la mutación *dpy-10(128)*. De tal manera que los nematodos homocigotos para el balanceador se pueden identificar rápidamente por su fenotipo Dpy (cortos, lenta movilidad y más anchos que los animales silvestres) y por su fluorescencia en la faringe. Por otro lado, los heterocigotos pueden ser identificados por su fluorescencia en la faringe y no tener el fenotipo Dpy. La fluorescencia en la faringe pudo ser observada rápidamente con el microscopio estereoscópico con fluorescencia (Nikon SMZ1500).

Se uso el balanceador *mIn1* porque *tiar-1* se encuentra en el cromosoma II. La estrategia general para obtener dobles mutantes con *tiar-1* fue obtener nematodos machos *+/mIn1* y cruzarlos con hermafroditas homocigotos para la mutación de interés. Posteriormente se seleccionaron machos con fluorescencia en la faringe y se cruzaron con *tiar-1* mutantes homocigotos. De su progenie, se seleccionaron hermafroditas con la fluorescencia en la faringe, que eran *tiar-1/mIn1* en el cromosoma II y heterocigotos para la mutación de interés. Después se seleccionaron nematodos homocigotos para la mutación de interés por el método más sencillo (ej. fluorescencia, fenotipo o PCR). Finalmente, se seleccionaron nematodos homocigotos para *tiar-1*, que son aquellos sin fluorescencia en la faringe. Para ver el esquema general de cruza haciendo uso de balanceadores ver **Figura 11**.

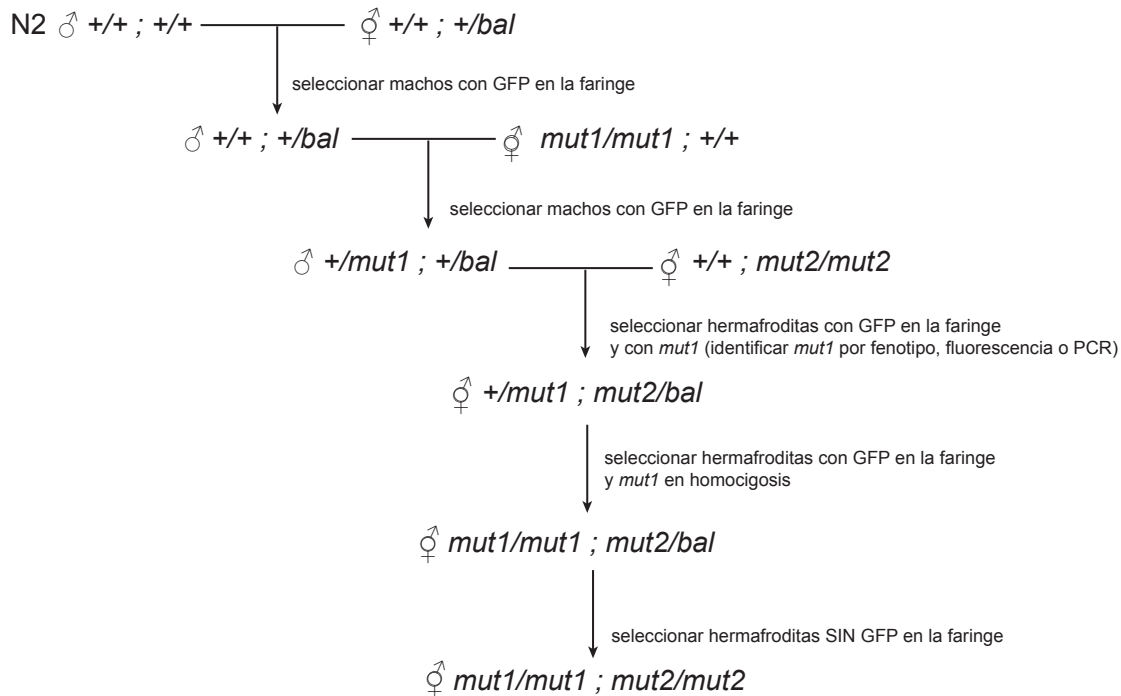


Figura 11. Esquema de cruce con el uso de un cromosoma balanceador. Los balanceadores son útiles para obtener cepas mutantes dobles para *mut1* y *mut2*, en donde *mut2* es más difícil de identificar que *mut1* (por ejemplo, si es una sustitución de un solo par de bases). Este esquema representa el uso de un balanceador que está marcado con *myo-2::gfp*, lo que facilita su identificación con el microscopio de fluorescencia. Los balanceadores hT2 (útil para balancear los cromosomas I y III) y mIn1 (útil para balancear el cromosoma II) contienen este transgén. El signo “;” se usa para indicar diferentes cromosomas, el signo “+” se usa para designar al cromosoma silvestre.

8.6 Retrocruza de la cepa *tiar-1(tm361)* para eliminar mutaciones cercanas

Para descartar la posibilidad de mutaciones ligadas al alelo *tiar-1(tm362)* se llevó a cabo una retrocruza. Esta retrocruza fue diseñada para facilitar la identificación de los eventos de recombinación que ocurrieran cerca del locus *tiar-1*. Se eligieron *vab-1(dx31)* y *unc-4(e120)* como mutaciones marcadoras porque se localizan a ambos lados de *tiar-1* en el cromosoma II. Además, los fenotipos Unc (los animales son incapaces de retroceder) y Vab (defecto en la hipodermis en el que la apertura oral se desvía lateralmente) fueron identificados fácilmente con el uso del microscopio estereoscópico. Se realizó una cruce para obtener la doble mutante *vab-1(dx31) unc-4(e120)*. Posteriormente, hermafroditas de ésta cepa se cruzaron con machos *tiar-1(tm361);xmSi02[tiar-1::gfp]* (ver Obtención de la cepa *tiar-1::gfp* mediante MosSCI). Entre los individuos de la generación filial 1 (F1) se identificaron y aislaron 12 hermafroditas con fenotipo no-Unc, no-Vab. En la generación filial 2 se seleccionaron animales con fenotipo Unc no-Vab (42/~3600), y se procedió a obtener animales homocigotos de las líneas obtenidas. Las 42 líneas Unc no-Vab se observaron al microscopio de fluorescencia para descartar a aquellas en las que el evento de recombinación que ocurrió a la derecha del sitio de la inserción MosSCI de *xmSi02(ttTi5650)*, es decir que incluyeran el transgén *tiar-1::GFP*. De las 8 líneas restantes se procedió a verificar la mutación *tm361* mediante PCR. Una sola línea cumplió con los criterios: *tiar-1(tm361) unc-4(e120)* (**Figura 13**).

8.7 Condiciones de estrés

Para inducir estrés por ayuno, animales hermafroditas adultos de un día de edad fueron colocados en medio M9 (64 mg/ml $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 15 mg/ml KH_2PO_4 , 2.5 mg/ml NaCl y 5.0 mg/ml NH_4Cl) adicionado con 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de colesterol, durante 4 h a 20°C en una caja Petri de vidrio de 5 cm de diámetro cubierta con parafilm. Los animales del grupo control se colocaron en medio M9 adicionado con 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de colesterol en las mismas condiciones mencionadas anteriormente, pero el medio líquido fue adicionado con bacterias de la cepa OP50-1 como se

describe a continuación. 20 ml de un cultivo de toda la noche fue centrifugado en una centrífuga clínica durante 5 min. Posteriormente, la pastilla de bacterias fue resuspendida una vez en 14 ml de M9 y se volvió a centrifugar. Finalmente, la pastilla de bacterias fue resuspendida en 0.5 a 1 ml de M9, de tal modo que una dilución de 1/20 de este medio de tenía una densidad óptica de 0.66 a 600 nm.

Para inducir estrés por choque de calor, animales hermafroditas adultos de un día de edad se colocaron en cajas pequeñas de NGM-lite con bacterias OP50-1. Estas cajas se sellaron con parafilm y se colocaron durante 3 h en un baño de agua de temperatura controlada a 31°C. Los animales del grupo control se mantuvieron en cajas pequeñas con comida en la incubadora a 20°C durante el mismo período de tiempo que los sometidos a choque de calor.

8.8 Ensayos de letalidad embrionaria después del estrés

Para determinar si *tiar-1* protege a las células germinales del estrés, se diseñó un ensayo que permitiera evaluar los efectos del estrés en la fertilidad de los nematodos. Hermafroditas de la cepa silvestre y *tiar-1* mutantes fueron incubados a 20°C o a 24°C (en el caso de los animales pretratados) y fueron seleccionados en el estadio L4. 18 a 20 horas después, los jóvenes adultos fueron expuestos a choque de calor (31°C por 3h) o a ayuno (4 horas en medio líquido) como se describe en la sección anterior. Inmediatamente después del estrés, los animales fueron colocados en colchones de agarosa 2% con una gota de M9 sin anestesia, cubiertos con un cubreobjetos y observados con microscopía tipo Nomarski. En cada colchón fueron montados aproximadamente 10 nematodos. Para cada uno de los animales, se cuantificó la cantidad total de embriones en el útero y de ovocitos proximales (aquellos que probablemente están celularizados, incluyendo del -1 al -3 aproximadamente) en ambos brazos de la gónada. Esta cuantificación se realizó siempre en un tiempo de 5 min o menos para evitar que los animales fueran dañados. Después de la cuantificación, se recuperaron los animales del colchón de agarosa con mucho cuidado con ayuda de una pipeta capilar con M9 y se colocaron de manera individual en cajas pequeñas de NGM-lite con bacterias, que fueron incubadas a 20°C.

La cantidad de embriones se sumó a la de ovocitos proximales que contenía cada uno de los animales observados, esta cantidad fue clasificada como Grupo I. En general, el Grupo I constó de entre 5 y 12 embriones/ovocitos por hermafrodita. Se realizó un promedio de la cantidad de embriones/ovocitos de todos los hermafroditas que fueron observados para cada una de las cepas. Posteriormente, se esperó a que la mayoría de los animales expulsaran a los embriones del Grupo I dentro de la caja en donde fueron colocados después del estrés. En ese momento, se les trasladó a una nueva caja de NGM-lite con bacterias, también a 20°C. En esta nueva caja, se les dejó durante 12 h, y los embriones producidos y expulsados durante este periodo conformaron al Grupo II. Después de estas 12 h, se trasladó a los hermafroditas a una nueva caja de NGM-lite con bacterias. En esta, se les dejó durante 24 h, y los embriones producidos durante este periodo conformaron al Grupo III. Después de estas 24 h, los hermafroditas fueron retirados de las cajas.

Todas las cajas de los Grupos I, II y III fueron incubadas a 20°C por 24 h adicionales para determinar la letalidad embrionaria como se describió anteriormente (ver Ensayos de fertilidad, letalidad embrionaria e incidencia de machos). Como control, algunos de los animales hermafroditas previamente seleccionados, fueron mantenidos a 20°C con comida. A pesar de que no fueron sometidos a estrés, los animales control también fueron montados en colchones de agarosa, cubiertos con cubreobjetos, recuperados con una pipeta capilar en cajas pequeñas y trasladados a nuevas cajas en paralelo a los animales que sí fueron sometidos a estrés.

Para facilitar la realización de este experimento, con los datos obtenidos en las primeras repeticiones se calculó la velocidad de expulsión de embriones para la cepa silvestre y *tiar-1* mutante. Algunos de los animales no sobrevivieron al tratamiento de estrés seguido por la observación al microscopio. Así mismo, algunos animales fueron afectados en su capacidad para expulsar los embriones (fenotipo Egg laying defective o Egl), sobre todo en la cepa *tiar-1* mutante. Debido a la dificultad que presentaba estudiar la letalidad de los embriones retenidos dentro del hermafrodita, los animales Egl fueron censados del estudio.

8.9 Tratamientos con cicloheximida y puromicina

Para estudiar cómo se ve afectada la formación de gránulos por fármacos inhibidores de la traducción se usaron cicloheximida y puromicina. Los tratamientos con dichos fármacos se hicieron en medio S líquido (NaCl 100 mM, K₂HPO₄ 6.5 mM, KH₂PO₄ 43.5 mM, KCO₃ 10 mM, CaCl₂ 3 mM, MgSO₄ 3 mM, EDTA 18.6 mg/L, FeSO₄·7H₂O 6.9 mg/L, MnCl₂·4H₂O 2 mg/L, ZnSO₄·7H₂O 2.9 mg/L, CuSO₄·5H₂O 0.25 mg/L, colesterol 5 mg/L). Animales de las cepas silvestre y *tiar-1(tn1545)[tiar-1::gfp]* crecidos a 20°C fueron seleccionados en el estadio L4 y colocados en cajas de NGM-lite con bacterias de OP50-1. Cuando estos animales tenían un día en la etapa adulta se les aplicaron los tratamientos descritos a continuación. Los animales control (sin estrés) fueron colocados en medio líquido S con bacterias OP50-1. Para esto, se centrifugaron 10 ml de cultivo fresco de OP50-1 (de toda la noche) en la centrífuga clínica durante 2 min. La pastilla de bacterias se resuspendió en 200 µl de medio S. Esta cantidad de bacterias fue suficiente para una muestra de 50-100 animales.

Para los tratamientos con fármacos, diluciones de cicloheximida y puromicina se prepararon frescas, justo antes de los tratamientos. La disolución “stock” de cicloheximida consistió en 20 mg de cicloheximida en 500 µl de H₂O milliQ (144mM). La concentración final usada en los tratamientos de cicloheximida fue de 30 mM en medio S. La disolución “stock” de puromicina consistió en 10 mg en 1 ml de medio S (18.23mM). La concentración final usada en los tratamientos de puromicina fue de 15 mM en medio S. Para ambos tratamientos, los animales se colocaron en una gota de 200 µl de la disolución correspondiente en una caja Petri de vidrio (5 cm de diámetro), ya sea con cicloheximida o puromicina con o sin bacterias. Las cajas Petri fueron tapadas con parafilm y se incubaron ya sea a 20°C (control), o en las condiciones de estrés descritas anteriormente. Al término del estrés, los animales se colectaron utilizando puntas de baja retención. Los animales de la cepa *tiar-1(tn1545)[tiar-1::gfp]* fueron colocados en una gota de 30 µl de M9 con tetramizol al 0.01% como anestésico sobre colchones de agarosa 2% para observarlos con el microscopio de epifluorescencia. Los animales de la cepa silvestre fueron disecados, fijados e inmunoteñidos contra CGH-1, tal como se describe a continuación.

8.10 Procedimiento para hacer inmunotinciones

Las inmunotinciones fueron hechas como se describió previamente (Navarro *et al.* 2001) con algunas modificaciones. Animales expuestos a estrés según las condiciones mencionadas anteriormente (ver Condiciones de estrés) fueron colocados en una gota de 20 μ l de M9 sobre un cubreobjetos. Posteriormente, se agregaron 5 μ l de una disolución de 0.1% de tetramisol como anestésico, se disecaron las cabezas de los animales utilizando dos jeringas. El cubreobjetos se invirtió y se colocó sobre un portaobjetos previamente tratado con poli-lisina. Después, la muestra se sumergió en nitrógeno líquido. Una vez congelado, se desprendió el cubreobjetos con un movimiento rápido. Inmediatamente después de desprender el cubreobjetos, se sumergió el portaobjetos en metanol al 100% a -20°C durante 1 min y, en seguida, en una disolución de 3.3% paraformaldehído (Sigma-Aldrich) en PBS durante 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizaron dos lavados con una disolución de PBS + 0.5% tween-20, de 10 min cada uno, y se colocaron sobre la muestra 30 μ l de PBS+ 0.5% tween-20 con 1mg/ml de BSA (Sigma-Aldrich) durante 30 min a temperatura ambiente para bloquear la muestra. Posteriormente, esos 30 μ l se absorbieron con cuidado y se desecharon. Se agregaron a la muestra otros 30 μ l con anticuerpo de rata anti-CGH-1 (Navarro *et al.* 2001) 1:25 en PBS+ 0.5% tween-20 con 1 mg/ml de BSA, y la preparación se incubó toda la noche a 4°C en una cámara húmeda. Después de la incubación, se realizó un lavado con PBS + 0.5% tween-20 de 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, las muestras se incubaron con los anticuerpos secundarios correspondientes a una concentración de 1:100 en PBS+ 0.5% tween-20 con 1mg/ml de BSA durante 2 h a temperatura ambiente. Los anticuerpos secundarios usados fueron: anticuerpo conjugado con Cy3 de burro anti-IgG de rata (Jackson, ImmunoResearch), conjugado con AlexaFluor 488 anti-IgG de ratón (A11001, Molecular Probes) y conjugado con AlexaFluor 594 anti-IgG de conejo. Para visualizar el DNA, se agregó DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) a una concentración final de 1 ng/ μ l a la disolución del anticuerpo secundario. Después de un último lavado de 10 min con PBS+ 0.5% tween-20, se agregaron 10 μ l de Vectashield (Vector laboratories) a la muestra para evitar que esta perdiera fluorescencia. Después, la muestra se cubrió con un cubreobjetos que fue sellado con barniz transparente.

En el caso de las co-inmunotinciones para TIAR-1::GFP y CGH-1, se usaron los anticuerpos primarios de conejo anti-CGH-1 (Boag *et al.* 2005) 1:1000 y de ratón anti-GFP (A11120, Molecular Probes) 1:5000 en PBS+ 0.5% tween-20 con 1mg/ml de BSA.

8.11 Microscopía

Para observar y manipular a los animales se usó un microscopio estereoscópico Nikon C-DS. Para observar y manipular los animales y observar su fluorescencia se usó un microscopio estereoscópico con una lámpara de mercurio y filtro para GFP Nikon SMZ1500, D5-Fi1. Para observar a los animales con mayor detalle y con fluorescencia, se usó un microscopio de epifluorescencia con filtro Nomarski (Nikon Eclipse E600). Las fotografías adquiridas con este equipo fueron tomadas con una cámara AxioCam MRc y software Axiovision (Zeiss). Para observar con detalle la localización subcelular de las proteínas de interés se usó un microscopio confocal FV10i (Olympus) con el objetivo de 60x (NA=1.2), tamaño 1024x1024, calidad 8x y apertura confocal de 2x.

Para la cuantificación de fluorescencia, se usó el software ImageJ (1.50b, Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA). Primero se seleccionó el área total de cada animal y luego se cuantificó la densidad integrada de esta área. Así mismo, se seleccionaron áreas del fondo y se les calculó la densidad integrada del fondo. La fluorescencia fue calculada con la fórmula siguiente: $\text{Fluorescencia total corregida} = \text{Densidad integrada} - (\text{área seleccionada} \times \text{promedio de fluorescencia de 3 áreas del fondo})$.

8.12 Análisis estadísticos

Se hicieron pruebas de homogeneidad de varianza entre grupos de los datos obtenidos para progenie, letalidad embrionaria y fluorescencia de GFP. Los datos de fluorescencia de GFP sí tenían la misma varianza de grupos, por lo tanto se hicieron análisis de varianza de una sola vía (1-way ANOVA). Para los datos con varianzas heterogéneas, se realizaron comparaciones múltiples no paramétricas con el test de Dunn (con los valores respectivos de la cepa silvestre como control) (JMP v9, Statistical Discovery, SAS). Estos datos fueron los obtenidos de las determinaciones de progenie y de letalidad embrionaria. Por otro lado, los datos obtenidos del ensayo de “letalidad embrionaria después del estrés” fueron evaluados con un modelo de mínimos cuadrados. Se determinó la variable “porcentaje de letalidad embrionaria” como la respuesta evaluada. Se identificó a cada uno de los individuos y la variable “individuo” fue agregada al modelo como efecto aleatorio. El modelo predijo que las variables “grupo”, “condición de estrés”, “genotipo” y la interacción entre estas tres variables tenían un efecto significativo en la letalidad embrionaria. Se usó el test de Tukey HSD para evaluar las diferencias entre mínimos cuadrados (JMP v9, Statistical Discovery, SAS). Para todas las pruebas realizadas $p < 0.01$ fue considerada como significativa.

APARTADO II

Métodos no publicados

8.13 Sistema para la identificación de mRNAs que están siendo traducidos

8.13.1 Obtención de la cepa *rpl-1::gfp* mediante MosSCI

Para hacer una fusión transcripcional en el extremo 5' de *rpl-1* isoforma *a* con GFP::TEV::S (Cheeseman y Desai 2005) bajo el promotor exclusivo de línea germinal *Pmex-5*, se usó la técnica de inserción de copia única MosSCI (Frøkjær-Jensen *et al.* 2008; Frøkjær-Jensen *et al.* 2012). La construcción se realizó mediante una reacción de Gibson (Gibson *et al.* 2009). Para llevar a cabo esta reacción se diseñaron oligos que contenían las secuencias de los fragmentos a unir. El diseño de los oligos fue realizado con ayuda del software NEBuilder Assembly Tool (New England BioLabs). En primer lugar se obtuvieron los fragmentos a unir mediante PCR. Para esto, se lisaron animales N2 y se amplificó el gen *rpl-1* seguido de su 3'UTR (oligos 034 y 035) en una misma reacción, y el promotor de *mex-5* (oligos 032 y 033) en otra (ver oligos en **Tabla S1**). Así mismo, se amplificó el plásmido destino pCFJ150 (oligos 036 y 043) y el GFP::TEV::S (oligos 039 y 040) (ver oligos en **Tabla S1**). Todos los productos de PCR que sirvieron como fragmentos para la reacción de Gibson, fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 1% en TAE 1x y purificados con el estuche de QIAquick Gel Extraction (Qiagen). La reacción de Gibson se llevó a cabo con los reactivos del Gibson Assembly Master Mix (New England BioLabs) utilizando de 0.02 a 0.06 pmoles de cada fragmento (según la especificación del reactivo los fragmentos deben estar 3 veces más concentrados que el plásmido destino) para sumar un total de 0.2 pmoles de DNA en una reacción de 20 µl. Posteriormente se transformó el producto de la reacción de Gibson en células DH5- α electrocompetentes (50 µl de bacterias con

1 µl de reacción). Esto se realizó por electroporación con un pulso a un voltaje de 1.75 kV. Inmediatamente después del pulso, se agregaron 900 µl de medio SOC a cada tubo y se incubaron a 37°C por 1.5 h en agitación. Posteriormente se plaquearon 100 µl de este cultivo en cada caja de LB con ampicilina y se incubó a 37°C durante toda la noche. Se realizó PCR de una colonia y digestión enzimática para verificar que las colonias contenían el plásmido. Para verificar se secuenció la construcción de los candidatos, de los cuales MosSCI7 y MosSCI 14 resultaron correctos (oligos 029-031, ver **Tabla S1**).

Una vez obtenido el plásmido de recombinación con el inserto correcto, se inyectaron animales adultos jóvenes de la cepa EG8081 (*unc-119* mutantes, con el sitio de recombinación de Mos en el cromosoma IV *Oxti177*) con la siguiente mezcla de plásmidos: MosSCI 14 (30 ng/ µl), pCFJ104 (5 ng/ µl) (Addgene plásmido # 19328), pGH8 (10 ng/ µl) (Addgene plásmido # 19359) y pCFJ90 (2 ng/ µl) (Addgene plásmido # 19327), pCFJ601 (10 ng/ µl) (Addgene plásmido # 34874) y pMA122 (10 ng/ µl) (Addgene plásmido # 34873) (para la lista de plásmidos ver **Tabla 2**).

Los animales inyectados fueron colocados en cajas medianas de NGM con bacteria OP50-1, y se incubaron en éstas a 24°C durante dos semanas hasta que se terminaron la comida. Posteriormente, se expuso a los animales a 34°C por 3 h para deshacerse de los aquellos con arreglos extracromosomales, que contienen el plásmido *Phsp-16.41::peel-1*, cuya expresión es tóxica para el animal durante el desarrollo post-embrionario. De los animales que sobrevivieron al choque de calor, se obtuvieron 8 líneas con inserciones independientes, en las que se observó fluorescencia de la GFP, de las que se conservaron 4. Los nuevos alelos se denominaron *tnSi1*, 2, 3 y 4. Las cepas con los alelos *rpl-1(tnSi1)* y *rpl-1(tnSi4)* se retrocruzaron con animales machos silvestres en 3 ocasiones. Todas las cepas fueron congeladas, pero sólo la cepa con mejor fluorescencia, DG3886 *rpl-1(tnSi4)*, fue utilizada para experimentos posteriores.

8.13.2 Co-inmunoprecipitación

8.13.2.1 Preparación de las muestras

Para purificar los complejos que contienen la subunidad grande del ribosoma (marcada con *rpl-1::GFP*) y los mRNA asociados a ésta en la gónada, se realizó una inmunoprecipitación. Las muestras se obtuvieron a partir de animales de la cepa DG3921 *rpl-1(tnSi04[Pmex-5::GFP::TEV::S::rpl-1 rpl-13'UTR]);spe-9(hc88)* y BA708 *spe-9(hc88)* como control. Este protocolo fue realizado como se describe en (Spike *et al.* 2014) con algunas modificaciones descritas detalladamente a continuación. Animales de ambas cepas fueron incubados a 20°C por dos generaciones con el objetivo de obtener muchos animales. La primera generación fue criada en 4 cajas medianas con OP50-1. Cuando los animales de la primera generación llegaron a la etapa adulta, se recolectaron y trataron con una solución de NaOH e hipoclorito de sodio para obtener a los embriones (100 µl de NaOH 5 N y 300 µl de hipoclorito de sodio comercial en 800 µl de M9). Los embriones de esta segunda generación fueron incubados en M9 durante toda la noche a 20°C de tal manera que se sincronizaron en el estadio L1. Posteriormente, los L1 sincronizados fueron repartidos en 16 cajas grandes con bacterias de la cepa de *E. coli* OP50-1. Cuando los animales de esta segunda generación llegaron a la etapa adulta, se les trató con la solución de NaOH e hipoclorito de sodio. En este caso la concentración de L1 sincronizados en M9 fue estimada a partir de la cantidad de L1 observados en 3 muestras de 1 µl. A partir de esta estimación se calculó el volumen de L1 en M9 necesario para colocar 20,000 animales por caja Jumbo, para al menos 10 cajas jumbo. Estas cajas jumbo fueron inoculadas con NA22 como alimento porque bacterias de esta cepa crecen más abundantemente que aquellas de la OP50-1. Así pues, las cajas jumbo con 20,000 animales cada una fueron incubadas a 25°C porque a ésta temperatura los animales *spe-9* mutantes son estériles. Cuando los animales de esta tercera generación llegaron al estadio adulto, se colectaron y lavaron en M9 frío (cada lavado de 5-10 min en agitación rotacional). Una vez que el M9 descartado fue transparente, se hizo un lavado en leve agitación rotacional para que los animales estuvieran libres de bacterias. Por último, se realizó un lavado con solución amortiguadora de IP 1x básico (HEPES 50 mM, EGTA 1 mM, MgCl₂ 1 mM, KCl 100 mM).

Después de los lavados, se retiró la mayor cantidad de solución amortiguadora y los animales se depositaron directamente sobre nitrógeno líquido, a manera de gotas, para obtener “perlas” (de 1 ml de muestra se obtienen alrededor de 10 perlas). Dichas perlas se colocaron en tubos Falcon de 15 ml y fueron almacenadas a -70°C (pueden permanecer congeladas por varias semanas). Las “perlas” de cada muestra fueron molidas en un mortero de cerámica y pistilo (limpios, estériles y previamente calentados a 300°C en la mufla durante toda la noche), previamente enfriados con nitrógeno líquido, hasta obtener un polvo fino. A este polvo fino se le agregó un volumen igual de solución amortiguadora de lisis 1.5 x (1.5x solución amortiguadora de IP, glicerol 15%, 200 mg/ml cicloheximida, 0.1 M DTT 0.05% triton x-100) e inhibidores de proteasa (Cocktail de Roche EDTA-free) frío, y las muestras fueron colocadas en hielo de aquí en adelante. Las muestras fueron lisadas por sonicación a una amplitud de 30%, 3 veces (15 s prendido, 45 s apagado), se enfriaron en hielo durante 2 min después de cada sonicación. Posteriormente, se repartieron las muestras en tubos Eppendorf de 1.5 ml. Para descartar los componentes insolubles de los extractos, estos se centrifugaron dos veces en una centrífuga de mesa a máxima velocidad durante 10 min a 4°C . En este punto, se guardó a -70°C una alícuota de 20 μl de cada cepa para Western blot y otra para extraer el RNA que corresponde al input. El resto de la muestra se usó para realizar la co-inmunoprecipitación.

8.13.2.2 Unión covalente de los anticuerpos a las cuentas magnéticas

En paralelo a la preparación de las muestras, se acondicionó la matriz para la inmunoprecipitación, la cual constó de 150 μl de cuentas Dynabeads Protein G (10003D, ThermoFisher Scientific) por cada ml de muestra de lisado de animales. Estas cuentas se colocaron en un tubo Eppendorf de 1.5 ml y se lavaron dos veces con 0.5 ml de solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH 8. Posteriormente se agregaron 18 μg de cada uno de los anticuerpos monoclonales anti-GFP (12A6 y 4C9 del Hybridoma bank) y solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH 8 para obtener un volumen total de 100 μl . Los tubos se incubaron a temperatura ambiente por 30 min en agitación rotacional. Después se lavaron 3

veces con solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH 8 con 0.1% tween-20 y 2 veces más con 1 ml de 0.2 M trietanolamina pH 8.2 (preparada inmediatamente antes de su uso). Las cuentas se resuspendieron con 1 ml de 20 mM DMP (dicloruro de dimetil pimelimidato) en 0.2 M trietanolamina pH 8.2 (preparado justo antes de usarse) y se incubó durante 30 min a 20°C en agitación rotacional. Posteriormente, se hicieron 4 lavados de 15 min en agitación, el primero con 1 ml de Tris 50 mM pH 7.5 y los tres últimos con PBS pH 7.4. Las cuentas con los anticuerpos unidos pueden permanecer en PBS durante varias semanas a 4°C hasta su uso.

8.13.2.3 Co- inmunoprecipitación

Cuando las muestras de extracto de animales estaban listas, las cuentas magnéticas con el anticuerpo unido se pre-eluyeron con 40 µl de citrato 0.1 M pH 3.7 durante 2 min en agitación rotacional. Posteriormente, éstas se lavaron 3 veces con solución amortiguadora de IP/lavado (solución amortiguadora de lisis 1x con KCl 300 mM) para neutralizar el pH. En el último lavado las cuentas se transfirieron a tubos de micro-centrífuga de baja retención libres de RNAsa. A partir de este momento, la co-inmunoprecipitación se realizó únicamente en este tipo de tubos.

A cada tubo de cuentas magnéticas con anticuerpos se le agregó un ml de extracto de animales y 80 µl de KCl 2.5 M. Estos tubos se incubaron durante 1 h en agitación rotacional a 4°C. Después de la incubación, se realizaron 3 lavados, de 10 min cada uno, con 1 ml de solución amortiguadora de IP/lavado a la que se adicionaron KCl 300 mM, NP-40 0.05%, 1µl de 1M DTT por cada ml de volumen, así como inhibidores de proteasa (Cocktail de Roche EDTA-free). Posteriormente se realizaron 2 lavados de 5 min con esta solución amortiguadora de IP/lavado que además contenía citrato 5 mM, y se descartó el sobrenadante.

8.13.2.4 Elución con proteasa TEV

Para realizar el corte proteolítico de la proteína GFP::*S*::TEV::*RPL-1* se adicionaron 200 μ l de la solución amortiguadora de IP/lavado (usada en la sección anterior, incluidos los inhibidores de proteasa) y se agregaron 5 μ l de proteasa AcTEV 10 U/ μ l (#12575, Invitrogen). Esta mezcla se incubó en agitación a 4°C por un mínimo de 4 h y un máximo de 12 h. Posteriormente, se recuperó el sobrenadante (que contenía la proteína y los factores que se le unen) y se colocó en un tubo nuevo. Si así se desea, se puede realizar una segunda elución del mismo modo que la anteriormente descrita, sin embargo en el presente trabajo encontramos una alta eficiencia de elución con una sola incubación con proteasa de 4 h. Se almacenaron pequeñas muestras (20-30 μ l) tanto de la elución así como de las cuentas magnéticas para posteriormente identificar las proteínas por Western blot.

8.13.2.5 Western blot

Para comprobar que la inmunoprecipitación se llevó a cabo correctamente, se realizó una electroforesis de proteínas seguida por un Western blot. Es importante recordar que el procedimiento fue realizado con dos cepas, la control negativo *spe-9(hc88)* y la cepa *rpl-1::gfp;spe-8(hc88)*. Para este experimento se requirió desnaturalizar las muestras extraídas desde el inicio del protocolo: lisado total, primera elución y cuentas magnéticas (después de la elución). La muestra de la elución (3-60 μ l del total) es útil para verificar si la proteína de interés efectivamente fue inmunoprecipitada, mientras que la muestra de las cuentas magnéticas sirve como control de la eficiencia del corte proteolítico de TEV. La desnaturalización y reducción de las proteínas se lleva a cabo en una solución amortiguadora de Laemmli 4x (#1610737, Bio Rad) a 95°C por 5 min. Posteriormente las muestras y el marcador de peso molecular (Sharp protein standard, Novex) se cargaron en geles NuPAGE Bis-Tris Precast Gels 12% (Thermo Fisher Scientific). Los geles se colocaron en la cámara de electroforesis con solución amortiguadora de

corrida y se sometieron a 200 volts a temperatura ambiente hasta que el frente llegara a la base del gel (aproximadamente 50 min).

Las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (Immobilon, Merck Millipore) en la solución amortiguadora de transferencia NuPAGE con 10% de metanol a 30 volts por 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente se bloqueó la membrana con solución amortiguadora de bloqueo PBS (Odyssey blocker solution PBS, Licor bioproducts) a 4°C toda la noche. Al día siguiente se incubó la membrana por 2 h en agitación a temperatura ambiente con anticuerpo primario de cabra anti-STag 1:2500 en la misma solución de bloqueo (Abcam ab19321). Se lavó la membrana con PBS+Tween-20 0.1% (PBST) por 20 min (3 cambios de PBST en total). Se incubó la membrana con contra IgG de cabra hecho en burro, asociado a peroxidasa 1:30,000 (Abcam ab6667) en solución de bloqueo (Odyssey blocker solution PBS, Licor bioproducts), con agitación durante 2 h a temperatura ambiente. Finalmente se lavó la membrana por 20 min con 3 cambios de PBST en total y se procedió a revelar utilizando el sustrato SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Fisher Scientific). Con este sustrato, el tiempo de exposición que se requiere para observar las bandas fue muy corto (de 5 s a 5 min).

8.13.2.6 Purificación de RNA

El RNA fue purificado de las muestras de co-inmunoprecipitación con columnas de afinidad “Absolutely RNA Nanoprep” (Agilent Technologies). Para esto, se tomaron 100 µl de cada muestra y se le agregó el mismo volumen tiocianato de guanidina 4 M. Posteriormente, se pasó cada muestra por una columna del estuche de “Absolutely RNA Nanoprep” (Agilent) conforme a las especificaciones del producto. Como lo recomienda el protocolo del producto, se realizó el tratamiento con DNAsa I durante 15 min a 37°C y después se lavó la columna con la solución amortiguadora alta en sales, provisto por el estuche. Posteriormente se lavó la columna con la solución amortiguadora baja en sales, provista por el estuche, en dos ocasiones. Finalmente, para eluir el RNA, se colocaron 10-15 µl de agua estéril a 65°C en la columna y se centrifugó en una

microcentrífuga de mesa durante 3-6 min. La concentración de las muestras de RNA fue cuantificada usando el Nanodrop y después las muestras fueron congeladas.

8.13.3 Perfiles polisomales

Los perfiles polisomales se obtuvieron a partir de lisados totales de animales hermafroditas adultos de la cepa *rpl-1::gfp;spe-8(hc88)* y *spe-9(hc88)*. Estos lisados fueron obtenidos como se describió en el apartado de Preparación de las muestras. Los gradientes de sacarosa necesarios para realizar el perfil polisomal se hicieron con ayuda de el aparato Gradient Master (BioComp) con concentraciones del 15 al 60% de sacarosa en una solución amortiguadora de gradiente (25 mM de Tris-HCl pH 8.0, 140 mM de NaCl, 10 mM de MgCl₂, 1 mM de DTT y 0.2 mg/ml de cicloheximida) dentro de tubos de ultracentrífuga (14x95 mm, Beckman Coulter). Alícuotas de lisado clareado de 0.5 ml fueron colocadas con cuidado en la superficie de los gradientes. Después, las muestras en el gradiente se centrifugaron a 38000 rpm en un rotor SW40Ti durante 2 horas a 4°C en una ultracentrífuga (Beckman TL-100). Posteriormente, se perforaron los tubos en la parte inferior con una aguja estéril y se extrajo el gradiente lentamente con una máquina que monitoreó la absorbancia a 254 nm. Las fracciones del gradiente fueron separadas en 11 fracciones de 1 ml cada una.

Las proteínas de cada una de las fracciones obtenidas del gradiente fueron precipitadas con ácido tricloroacético 100% (500 g de ácido tricloroacético en 350ml de agua). Brevemente, se añadió un volumen de ácido tricloroacético 100% por cuatro volúmenes de muestra. Después se incubó por 10 min a 4°C. Se centrifugó a máxima velocidad en una microcentrífuga durante 5 min. Se descartó el sobrenadante y se lavó la pastilla con acetona fría, después se volvió a centrifugar. Se realizaron otros dos lavados con acetona fría y luego se evaporó el resto de la acetona colocando el tubo con la pastilla de proteínas a 95°C por 5 min. Posteriormente, se disolvieron las pastillas de proteínas en PBS 1x con ayuda de una punta de plástico, se les agregó solución amortiguadora de Laemmli 4x (#1610747, BioRad) y β-mercaptoetanol (concentración final 2.5%). Finalmente, se separaron las muestras de proteína mediante electroforesis (SDS-

PAGE) y se realizó un Western Blot para identificar la proteína de interés: GFP::RPL-1 tal y como se describe anteriormente, con anticuerpos contra STag (Abcam ab19321).

8.13.4 Aislamiento de complejos densos

Para separar complejos densos, como polisomas, de proteínas libres y lípidos en una muestra se usaron colchones de sacarosa. Para hacer los colchones se usaron tubos de policarbonato 1/2x2 pulgadas (Beckman). En estos tubos se colocaron 2 ml de solución amortiguadora del colchón (0.5 M sacarosa, 20 mM Tris-HCl, 140 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 1% Triton x-100, 0.5 mM DTT, mezcla de inhibidores de proteasas (Roche, EDTA-free), 0.1 mg/ml cicloheximida y RNAsin). Posteriormente se colocaron 500 µl de extracto de animales (preparado como se describe en Preparación de las muestras) cuidadosamente sobre el colchón. Después se ultracentrifugaron las muestras en una Optima TLX Ultracentrifuge (Beckman) con un rotor TLA-100.3. Una vez centrifugado se descartó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en el volumen deseado de solución amortiguadora sin sacarosa (no más de 30 µl). La pastilla tenía un color pardo claro o amarillo, pero generalmente fue transparente y de consistencia gelatinosa, por lo que se requiere pipetear arriba y abajo la solución amortiguadora con cuidado para resuspender las muestras completamente. Estas muestras fueron usadas como sustrato de co-inmunoprecipitación.

9 RESULTADOS

9.1 CAPÍTULO I. TIAR-1 contribuye a la fertilidad y desarrollo embrionario de *C. elegans*

Para entender la función de *tiar-1* en la gónada de *C. elegans* se usaron diversos alelos. Dos de estos están caracterizados por una pérdida de función de *tiar-1* y uno contiene la fusión de *tiar-1* con la proteína verde fluorescente GFP (**Figura 12A**). El alelo *tiar-1(tm361)* consta de una delección de 581 pb que resulta en un transcrito fuera del marco de lectura, por lo que se considera como un alelo nulo (Silva-García y Navarro 2013). El alelo *tiar-1(tm1543)* consta de la sustitución del marco de lectura de *tiar-1* por el marcador de selección *unc-119* de *C. briggsae*, por lo que es un alelo nulo (ver Materiales y Métodos, Apartado I). Así mismo, se estudió la contribución de los parálogos *tiar-2* y *tiar-3* en los fenotipos observados en animales *tiar-1* mutantes. Para estudiar la contribución de *tiar-2* se uso la cepa que contiene el alelo *tm2923*; una delección de 321 pb (**Figura 12B**), y para estudiar la contribución de *tiar-3* se uso la cepa que contiene el alelo *ok144*; una delección de 1521 pb (**Figura 12C**).

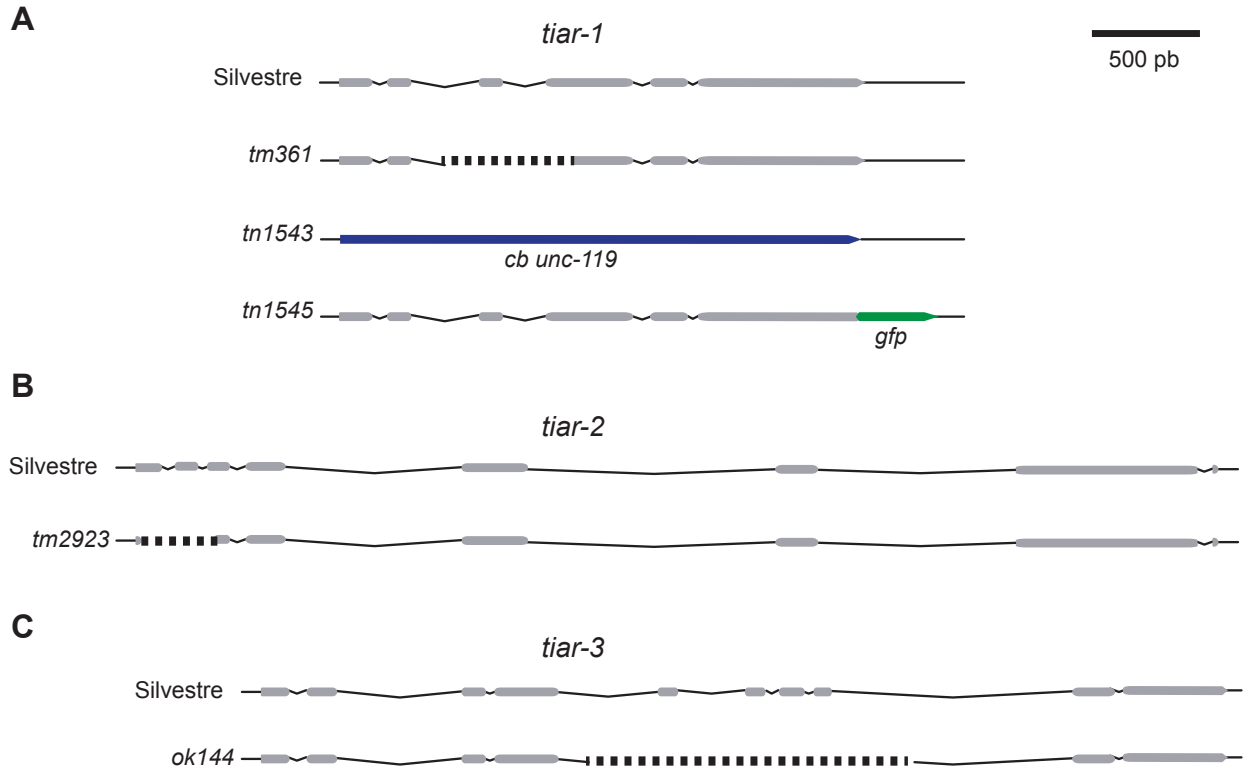


Figura 12. Alelos usados para el estudio de los genes *tiar* en *C. elegans*. (A) El gen *tiar-1* silvestre está compuesto de 6 exones (gris) y 5 intrones (líneas negras). El alelo *tm361* consiste en una deleción de 581 pb (línea punteada) que resulta en un cambio del marco de lectura. El alelo *tn1543* consiste en la sustitución del marco de lectura de *tiar-1* con el gen *unc-119* de *Caenorhabditis briggsae* (azul) como marcador de selección. El alelo *tn1545* consiste en la inserción de la secuencia de *stag::tev::gfp* (verde) en el extremo C' terminal de *tiar-1*. (B) El gen *tiar-2* silvestre está compuesto de 8 exones y 8 intrones. El alelo *tm2923* consiste en una deleción en el extremo 5' de 321 pb. (C) El gen *tiar-3* silvestre está compuesto de 10 exones y 9 intrones. El alelo *ok144* consiste en una deleción de 1521 pb.

9.1.1 Las mutaciones de pérdida de función en *tiar-1* afectan a la fertilidad de los animales

Anteriormente se encontró que los animales mutantes de la cepa *tiar-1(tm361)* tenían una disminución en la fertilidad (Silva-García y Navarro 2013; Rousakis *et al.* 2014). Sin embargo,

esta mutación fue generada mediante mutagénesis al azar, por lo que era probable que la cepa tuviera otras mutaciones que no habían sido identificadas (The *C. elegans* Deletion Mutant Consortium 2012). La cepa original con la mutación *tiar-1(tm361)* fue retrocruzada con la cepa silvestre en 6 ocasiones anteriormente (ver **Tabla 2**, RN076), sin embargo, cabía la posibilidad de que mutaciones estrechamente ligadas no se hubieran eliminado de la cepa. Para corroborar que los fenotipos previamente observados son debidos a la ausencia de *tiar-1* y no a mutación estrechamente ligada se diseñó una retrocruza para asegurar que el evento de recombinación ocurriera cerca del locus de *tiar-1* (**Figura 13**). Para facilitar la identificación de este evento de recombinación, se utilizaron mutaciones en el cromosoma II que son usadas como marcadores por producir fenotipos visuales al microscopio estereoscópico. Estas mutaciones se localizan una a cada lado de los loci de interés: *vab-1(dx31)* y *unc-4(e120)*. Se realizó la cruce entre animales que contienen cada una de estas dos mutaciones para obtener la cepa doble mutante *vab-1(dx31)unc-4(e120)*. Posteriormente, los animales hermafroditas *vab-1(dx31)unc-4(e120)* se cruzaron con machos *tiar-1(tm361)xmSi02* [inserción de *tiar-1::gfp* en el sitio del transposón *ttTi5605*] (**Figura 13**). En la segunda generación filial (F2) se identificaron animales *tiar-1(tm361)unc-4(e120)* homocigotos (**Figura 13**). La frecuencia de este evento de recombinación, dada la distancia en el mapa genético entre el locus de *tiar-1* y el *ttTi5605*, es de 1.77% (**Figura 13**).

El gen *unc-4* codifica para una proteína cuya actividad reportada hasta ahora consiste en promover la diferenciación de dos neuronas motoras de la clase A: DA y VA (Winnier *et al.* 1999). Los animales mutantes *unc-4(e120)* no tienen la capacidad de retroceder cuando se les estimula mecánicamente en la región anterior. Sin embargo, estos mutantes no tienen defectos en la fertilidad (Brenner 1974). Dado que *unc-4(e120)* es de carácter recesivo, resultó útil tenerlo ligado a *tiar-1(361)* para su uso en cruza posteriores.

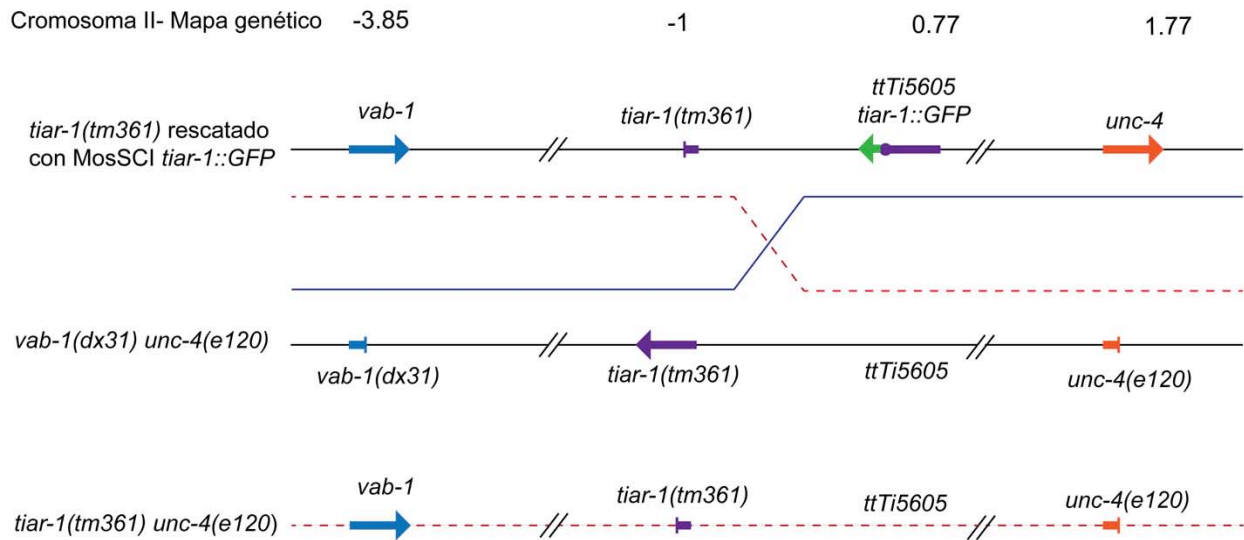


Figura 13. Representación esquemática del evento de recombinación necesario para la retrocruza del alelo *tiar-1(tm361)*. La posición en el mapa genético está expresada en Centimorgans. Los alelos *unc-4(e120)* y *vab-1(dx31)* fueron utilizados como marcadores para seguir los eventos de recombinación. El cromosoma de interés que se obtiene como resultado del evento de recombinación de interés está indicado con la línea punteada. Los genes silvestres se representan con una flecha y los mutantes con una línea corta.

Una vez obtenida la cepa *tiar-1(tm361) unc-4(e120)* se evaluó su fertilidad en la temperatura restrictiva (25°C). La cepa original *tiar-1(tm361)* tiene mayor porcentaje de animales infértiles (76%) que la cepa retrocruzada *tiar-1(tm361) unc-4(e120)* (21%) (**Tabla 4**). Esto nos indicó que la cepa original posiblemente tiene una mutación estrechamente ligada a *tiar-1* que enfatiza la esterilidad de estos animales a la temperatura restrictiva. Sin embargo, los animales de la cepa *tiar-1(tm361) unc-4(e120)* siguieron teniendo una menor cantidad de hijos que los silvestres (**Figura 14**). En conclusión la ausencia de *tiar-1* es responsable de una disminución en la progenie de *C. elegans*, aunque sólo provoca esterilidad en un porcentaje bajo de animales.

Tabla 4. Infertilidad de los animales mutantes en *tiar-1* a 25°C

Genotipo	Infertilidad (%)
<i>tiar-1(tm361)</i> ^	76 (n=71)
<i>tiar-1(tm361) unc-4(e120)</i>	21 (n=128)
<i>tiar-1(tm1543)</i>	21 (n=105)
<i>tiar-1(tm1543) tiar-2(tm2923);tiar-3(ok144)</i>	25 (n=93)

Animales hermafroditas de los genotipos indicados fueron incubados a 25°C. Cuando estos alcanzaron los dos días de adultos, fueron observados al microscopio con iluminación Nomarski para determinar su capacidad de producir progenie. Un hermafrodita fue considerado como “infértil” cuando no contenía ni un solo embrión en el útero.

^ La esterilidad de esta cepa fue determinada antes de retrocruzarla siguiendo eventos de recombinación con la cepa *unc-4(e120) vab-1(dx31)*.

9.1.2 Los animales mutantes en *tiar-1* presentan una disminución de la fertilidad y alta letalidad embrionaria

Para caracterizar con detalle los fenotipos relacionados con la fertilidad que han sido descritos para nematodos *tiar-1(tm361)*, se procedió a analizar animales de la cepa recientemente obtenida, *tiar-1(tm1543)*. Los animales de los genotipos de interés fueron incubados a 20 o 25°C. Adicionalmente, un grupo de animales que fueron incubados a 20°C fueron seleccionados en el estadio larvario L4 y transferidos a 25°C para evaluar los efectos de la alta temperatura únicamente en el proceso de ovogénesis, el cual ocurre en el estadio adulto (cambio de 20-25°C). Se cuantificó la progenie y la letalidad embrionaria de los animales y se encontró que los mutantes en *tiar-1* tienen una disminución en la progenie con respecto a los silvestres en todas las temperaturas probadas. A 20°C, animales de las dos cepas mutantes en *tiar-1* tuvieron una disminución en la progenie del 40 al 60 % con respecto a los animales silvestres (**Tabla 5**). A 25°C, la disminución en la progenie de los animales mutantes en *tiar-1* es de alrededor del 90% (**Tabla 5**). Finalmente, a 20-25°C la disminución en la progenie animales mutantes en *tiar-1* es de alrededor de 85% (**Tabla 5**). Estos resultados indican que, con respecto a la fertilidad, los dos alelos de pérdida de función de *tiar-1* tienen fenotipos similares. Adicionalmente, en todas la cepas estudiadas la progenie disminuyó conforme aumenta la temperatura. Sin embargo, la disminución en la progenie de animales silvestres es muy discreta, comparándola con la de animales mutantes en *tiar-1*.

Para asegurar que la disminución de progenie realmente se debe a la falta de *tiar-1* y no a posibles mutaciones ligadas en ambos alelos estudiados, se determinó el fenotipo de animales heterocigotos con una copia de *tiar-1(tm361) tiar-1(tm361)* y otra de *tiar-1(tm1543)*. Estos animales heterocigotos también tuvieron una disminución en la progenie de alrededor del 40% a 20°C y de 88% a 20-25°, con respecto a los animales silvestres (**Tabla 5**). Estos resultados son similares a aquellos obtenidos con las cepas homocigotas para cada uno de los alelos de pérdida de función de *tiar-1*, por lo tanto se concluyó que la disminución en la progenie se debe efectivamente a la pérdida de función de *tiar-1*.

La contribución a la fertilidad de los parálogos de *tiar-1*, *tiar-2* y *tiar-3*, también fue evaluada. Animales mutantes en *tiar-2* presentaron una disminución discreta en la progenie a

temperaturas evaluadas, al igual que los *tiar-3* mutantes. A 20°C los animales mutantes en *tiar-2* tuvieron 272 hijos y los *tiar-3* tuvieron 193 (**Tabla 5**). Sin embargo, la diferencia de la progenie de animales mutantes en *tiar-2* y *tiar-3* con respecto a la de animales silvestres no fueron significativas. A 20-25°C los animales mutantes en *tiar-2* tuvieron 181 hijos y los mutantes en *tiar-3* tuvieron 171, sin embargo las diferencias con respecto al número de hijos de animales silvestres tampoco fueron significativas (**Tabla 5**). Se evaluó el efecto de estas mutaciones en animales dobles mutantes. Animales *tiar-1 tiar-3* dobles mutantes tuvieron aproximadamente la misma cantidad de hijos que los mutantes en *tiar-1*; 105 hijos a 20°C y 32 a 20-25°C (**Tabla 5**). Animales *tiar-1 tiar-2* dobles mutantes tuvieron menos hijos que los mutantes en *tiar-1*; 70 hijos a 20°C y 17 a 20-25°C (**Tabla 5**). Por otro lado, animales *tiar-1 tiar-2 tiar-3* triple mutantes tuvieron muchos menos hijos que los dobles mutantes; 38 hijos a 20°C y 1 a 20-25°C (**Tabla 5**). En conclusión, a pesar de que *tiar-1* parece tener el mayor impacto en la fertilidad de *C. elegans*, *tiar-2* y *tiar-3* parecen ser redundantes con *tiar-1* hasta cierto punto.

El papel de *tiar-1* en el desarrollo embrionario fue evaluado determinando la letalidad embrionaria. Se encontró que la letalidad embrionaria de los animales mutantes en *tiar-1* fue mucho más alta que aquella de animales silvestres a todas las temperaturas probadas. Animales silvestres tuvieron una letalidad embrionaria de 0.4%, mientras que la de mutantes en *tiar-1* fue de 8-10% a 20°C (**Tabla 5**). A 20-25°C la letalidad embrionaria de animales silvestres fue de 0.5%, mientras que en *tiar-1(tm361)unc-4(e120)* aumentó a 8% y en *tiar-1(tm1543)* a 21% (**Tabla 5**). Los animales *tiar-1* heterocigotos tuvieron 5% de letalidad embrionaria a 20°C y 32% a 20-25°C. Estos resultados indican que hay una ligera diferencia en el comportamiento de los dos alelos de *tiar-1*, debido a que en animales *tiar-1(tm1543)* la letalidad embrionaria aumentó con la temperatura pero en animales *tiar-1(tm361)unc-4(e120)* no. Sin embargo, en todas estas cepas de pérdida de función de *tiar-1*, la letalidad embrionaria fue significativamente mayor que en animales silvestres. Esto indica que *tiar-1* tiene un papel importante en el desarrollo embrionario.

El papel de *tiar-2* y *tiar-3* en el desarrollo embrionario también fue evaluado. Se encontró que animales mutantes en *tiar-2* presentaron un discreto aumento en la letalidad embrionaria con respecto a los silvestres a las temperaturas probadas, sin embargo estas diferencias no fueron significativas. Resultados similares fueron obtenidos para animales mutantes en *tiar-3*. Por otro

lado, animales dobles mutantes tuvieron un aumento en la letalidad embrionaria con respecto a los mutantes en *tiar-1*. A 20°C *tiar-1 tiar-3* dobles mutantes tuvieron 9% de letalidad embrionaria y a 20-25°C ésta aumentó a 44% (**Tabla 5**). A 20°C *tiar-1 tiar-2* dobles mutantes tuvieron 26% de letalidad embrionaria y a 20-25°C ésta aumentó a 83% (**Tabla 5**). Además, se observó que los animales triple mutantes tuvieron aún mayor letalidad embrionaria. A 20°C, *tiar-1 tiar-2 tiar-3* triples mutantes tuvieron 38% de letalidad embrionaria y a 20-25°C tuvieron 75% (**Tabla 5**). Estos resultados sugieren que, al igual que en la progenie, *tiar-1* tiene el papel más importante de los tres homólogos en el desarrollo embrionario de *C. elegans*. Sin embargo, *tiar-2* y *tiar-3* son redundantes con *tiar-1* a cierto grado.

Tabla 5. Animales mutantes *tiar-1(0)* tienen menos progenie, letalidad embrionaria y alta incidencia de machos.

Genotipo	Temperatura	Progenie	Letalidad embrionaria %	Machos % ^a	N
Silvestre	20°C	281.9 ± 29.8	0.4 ± 0.5	0.06 ± 0.14	39
	25°C	226.0 ± 35.9	0.5 ± 0.5	0.05 ± 0.17	19
	20-25°C Shift	211.8 ± 35.9	0.6 ± 0.7	0.06 ± 0.19	39
<i>tiar-1(tm1543)</i>	20°C	108.5 ± 26.4***	10.2 ± 10.0**	0.43 ± 0.80	12
	25°C	22.9 ± 13.8***	22.7 ± 21.8***	2.01 ± 3.94	25
	20-25°C Shift	33.9 ± 15.9***	20.5 ± 19.5***	1.87 ± 3.15	67
<i>tiar-1(tm361) unc-4(e120)</i>	20°C	165.2 ± 40.3**	7.9 ± 5.6***	0.13 ± 0.41	21
	20-25°C Shift	36.2 ± 43.7***	7.5 ± 12.3***	2.07 ± 6.36	50
<i>tiar-1(tm1543)/ tiar-1(tm361) unc-4(e120)</i>	20°C	129.2 ± 25.1***	4.8 ± 3.5***	0.14 ± 0.33	25
	20-25°C Shift	24.9 ± 12.6***	31.6 ± 17.3***	1.13 ± 3.17	20
<i>tiar-2(tm2923)</i>	20°C	271.8 ± 66.7	1.3 ± 2.3	0.08 ± 0.15	20

Genotipo	Temperatura	Progenie	Letalidad embrionaria %	Machos % ^a	N
<i>tiar-3(ok144)</i>	20-25°C Shift	181.1 ± 30.7	1.9 ± 2.2	0.34 ± 0.47	20
	20°C	192.9 ± 28.3	1.1 ± 1.2	0.07 ± 0.2	15
<i>tiar-1(tn1543); tiar-3(ok144)</i>	20-25°C Shift	171.1 ± 32.8	5.5 ± 3.4	0.37 ± 0.37	15
	20°C	105.2 ± 37.3 ^{***}	9.2 ± 10.5 ^{***}	0.55 ± 0.79	50
<i>tiar-1(tn1543) tiar-2(tm2923)</i>	20-25°C Shift	32.4 ± 23.2 [*]	44.0 ± 22.4 ^{***}	2.44 ± 5.41	47
	20°C	70.2 ± 31.5 ^{***}	25.9 ± 15.9 ^{***}	0.94 ± 1.26	27
<i>tiar-1(tn1543) tiar-2 (tm2923); tiar-3(ok144)</i>	20-25°C Shift	17.4 ± 17.2 ^{***}	83.0 ± 30.3 ^{***}	ND ^b	21
	20°C	37.9 ± 18.6 ^{***}	10.1 ± 10.9 ^{***}	0.30 ± 1.61	30
hembras <i>fog-2(q71)</i> x machos <i>tra-2(q276)</i> XX	20-25°C Shift	0.8 ± 2.4 ^{***}	75.00 ± 50.0 ^{**}	ND ^b	24
	20°C	ND	ND	0.21 ± 0.51	18
hembras <i>tiar-1(tn1543); fog-2(q71)</i> x machos <i>tra-2(q276)</i> XX	20-25°C Shift	ND	ND	1.88 ± 3.05	31
	20°C	252.8 ± 46.7	1.4 ± 2.2	0.08 ± 0.22	30
<i>tiar-1(tn1545[tiar-1::gfp])</i>	20-25°C Shift	136.6 ± 28.4	5.7 ± 6.3	0.17 ± 0.42	22
	20°C	ND	ND	ND	ND

Animales hermafroditas fueron incubados a la temperatura de 20 ó 25°C durante su desarrollo. Los experimentos de Shift los animales que crecieron a 20°C fueron transferidos a 25°C durante el estadio L4. Los hermafroditas fueron seleccionados individualmente como L4 y transferidos a cajas nuevas cada 24 h durante 4 días. Progenie total, embriones muertos y machos fueron cuantificados en cada una de las cajas. Los embriones que no eclosionaron después de 24 h de haber sido expulsados fueron considerados como muertos. Dunn's test (el valor de animales silvestres se uso como control). ^{***} p<0.0001, ^{**} p<0.001.

^a Porcentaje de individuos machos en la progenie que complete el desarrollo. La incidencia de machos fue determinada observando un total de entre 467 y 10,950 animales.

^b La progenie de estos animales no alcanzó el estadio adulto.

9.1.3 La contribución materna y la cigótica de TIAR-1 contribuyen a la fertilidad de *C. elegans*

Dada la importancia de las proteínas de unión a RNA en la línea germinal para la producción de los gametos, se consideró que la contribución materna de TIAR-1 podría ser suficiente para recuperar los defectos en la fertilidad de animales mutantes en *tiar-1*. Con este objetivo, se diseñó un experimento para determinar si la contribución materna de TIAR-1 es suficiente para recuperar la fertilidad o si también es necesaria la contribución cigótica. En este experimento se aprovechó la propiedad del balanceador *mIn1* que marca la faringe de los nematodos con GFP (*Pmyo-3::GFP*) con carácter dominante y además está marcado con una mutación de carácter recesivo en *dpy-10*, lo que causa un fenotipo Dpy cuando se encuentra en homocigosis (animales cortos, anchos y de lenta movilidad). Así pues, se generaron las cepas heterocigotas *tiar-1(tm361)unc4(e120)/mIn1* y *unc-4(e120)/mIn1* como control. Estas cepas tienen por lo menos una copia silvestre de *tiar-1* en su genotipo, por lo que fueron definidas como m+c+. La generación filial 1 (F1) de los hermafroditas heterocigotos consiste de 50% de heterocigotos, 25% de homocigotos *mIn1* y 25% de homocigotos *tiar-1(tm361)unc4(e120)* o *unc-4(e120)*, según sea el caso. De la F1 aquellos hermafroditas homocigotos mutantes sólo tuvieron contribución materna de *tiar-1*, por lo que fueron definidos como m+c-. La generación filial 2 (F2) de estos animales homocigotos mutantes no tenía ninguna contribución de *tiar-1*, por lo que fueron definidos como m-c-. Para evaluar la contribución cigótica, se cruzaron animales homocigotos mutantes con machos homocigotos silvestres (m-c+). Se realizó el conteo de progenie para todas las cepas anteriormente mencionadas. La cantidad de progenie de animales m+c- y m-c+ fue mucho mayor que la de animales homocigotos mutantes m-c- (**Figura 14**). Esto indica que la contribución materna así como la contribución cigótica de *tiar-1*, son importantes para mantener una fertilidad normal en los nematodos. Sin embargo, a pesar de que la mayoría de los animales m+c- y m-c+ fueron fértiles, estos tuvieron alrededor de 50% menos progenie que los de las cepas control (N2 y *unc-4(e120)*) (**Figura 14**). Los resultados sugieren que tanto la contribución materna como la cigótica de *tiar-1* son necesarias para que los nematodos tengan una fertilidad normal.

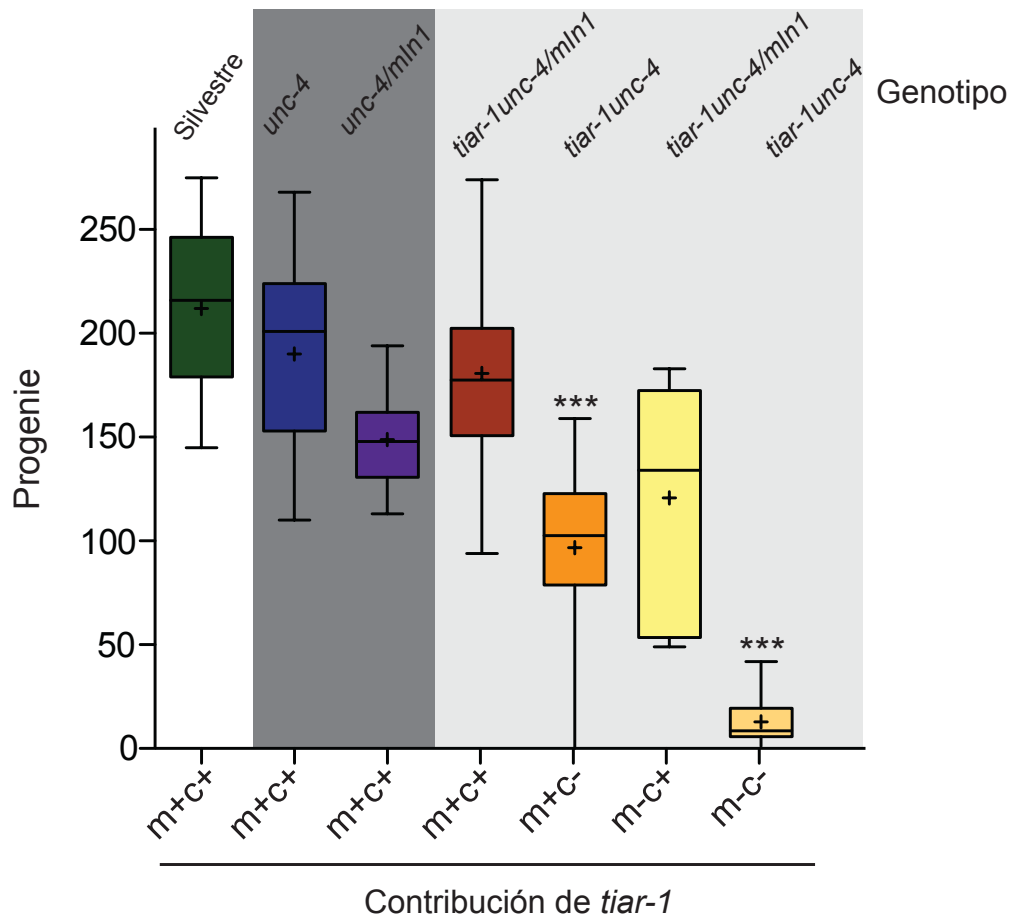


Figura 14. Tanto la contribución materna como la cigótica de TIAR-1 favorecen la fertilidad de *C. elegans*. Se cuantificó la progenie total de hermafroditas para cada genotipo a 25°C, para determinar la contribución materna (m) y cigótica (c) de *tiar-1*. Los animales m+c+ son homocigotos *unc-4(e120)* o heterocigotos *unc4(e120)/mln1*, *tiar-1(tm361)/mln1* y *tiar-1(tm361)unc4(e120)/mln1*. Los animales m+c- son los homocigotos *tiar-1* mutantes hijos de los heterocigotos. El balanceador utilizado para obtener heterocigotos fue *mln1*, éste es Dpy con carácter recesivo y expresa GFP en la faringe con carácter dominante. Conteo de progenie total de 10 o más individuos para cada uno de los genotipos indicados. T-Student ***p<0.001, *p<0.5. Los asteriscos sobre cada columna indican una diferencia significativa con respecto a su control m+c+.

9.1.4 Los animales mutantes en *tiar-1* tienen un incremento en la frecuencia de no-disyunción de cromosomas sexuales durante la ovogénesis

En *C. elegans* la determinación sexual depende la proporción de cromosomas sexuales (X) con respecto a la de autosomas. Aquellos animales XX son hermafroditas y aquellos XO son machos. Uno de los mecanismos mediante los cuales aumenta la incidencia de machos en la población es la no-disyunción de los cromosomas sexuales durante la meiosis, por lo que un aumento en la incidencia de machos es un reflejo de la fidelidad con la que la meiosis está siendo regulada.

Dado que se observaron machos en la progenie de animales hermafroditas mutantes en *tiar-1* durante el mantenimiento de estas cepas, nos propusimos a cuantificar este fenómeno de la incidencia de machos en estas cepas. Se observó que en la progenie de animales silvestres sólo el 0.06% fueron machos, tanto a 20°C como a 20-25°C (**Tabla 5**). Por el contrario, en la progenie de hermafroditas mutantes en *tiar-1* entre el 0.13 y el 0.43% fueron machos a 20°C, y entre el 1.13 y el 2.07% fueron machos a 25°C (**Tabla 5**). Es decir, en animales mutantes en *tiar-1* la incidencia de machos aumentó de 2 a 35 veces con respecto a la de animales silvestres. Estos resultados indican que los animales mutantes en *tiar-1* tienen mayor frecuencia de eventos de no-disyunción en la meiosis, es decir presentan un fenotipo conocido como Him (*high incidence of males*).

Los defectos en la meiosis de los hermafroditas mutantes en *tiar-1* podrían deberse a problemas en la espermatogénesis o en la ovogénesis. Para evaluar la contribución relativa de la ovogénesis en el fenotipo Him de los animales mutantes en *tiar-1* se determinó la incidencia de machos cuando ovocitos *tiar-1* mutantes fueron fertilizados con espermatozoides *tiar-1* silvestres. Esto fue posible con el uso de animales mutantes *tra-2(q276)*, cuyo genotipo es XX pero se desarrollan como machos completamente funcionales (Schedl y Kimble 1988). Hembras control *fog-2(q71)* y hembras *tiar-1(tn1543); fog-2(q71)* fueron cruzadas con “machos” *tra-2(q276)*, y la incidencia de machos en su progenie fue cuantificada. Se observó que la incidencia de machos fue 9 veces mayor en la progenie de las hembras *tiar-1* mutantes que en la de hembras control (**Tabla 5**). Estos resultados muestran que los eventos de no-disyunción durante la ovogénesis contribuyen de manera importante al fenotipo Him de los animales mutantes en *tiar-1*.

9.1.5 Los animales mutantes en *tiar-1* acumulan vitelo en el pseudoceloma

Uno de los fenotipos frecuentes que observamos en animales mutantes en *tiar-1* fue la presencia de estructuras semejantes a gotas lipídicas localizadas en su pseudoceloma. Dado que estas estructuras sólo aparecían en el estadio adulto aunado a la ovogénesis, se postuló la hipótesis de que estas estructuras están compuestas de vitelo que no está siendo correctamente absorbido por la gónada. Una de las herramientas que se puede usar para observar el vitelo en *C. elegans* es el transgén de la proteína VIT-2 fusionada a GFP (Grant y Hirsh 1999). Para probar la hipótesis de que las estructuras en el pseudoceloma de animales mutantes en *tiar-1* están compuestas de vitelo, se obtuvieron cepas de nematodos que expresan VIT-2::GFP en un fondo silvestre y en fondo *tiar-1(tm1543)*. Dichos animales transgénicos fueron incubados a 20°C y cuando alcanzaron la etapa adulta fueron observados con el microscopio de epifluorescencia. La proteína VIT-2::GFP se observó en el intestino de animales silvestres. Sin embargo, ésta se observó con mayor intensidad en los ovocitos más proximales a la espermateca y en los embriones (**Figura 15A y B**). Por otro lado, esta proteína de fusión tuvo un patrón de expresión en animales mutantes *tiar-1* muy distinto al de animales silvestres. En los animales *tiar-1* mutantes VIT-2::GFP se localizó de manera muy intensa en el pseudoceloma (**Figura 15C y D**). En específico, se observa con mayor intensidad en las estructuras antes descritas como gotas lipídicas (**Figura 15D**, flechas). Estos resultados indican que, efectivamente, las estructuras lipídicas en el pseudoceloma de nematodos *tiar-1* mutantes están compuestas de vitelo y sugieren que existe un posible defecto de incorporación del mismo a la gónada.

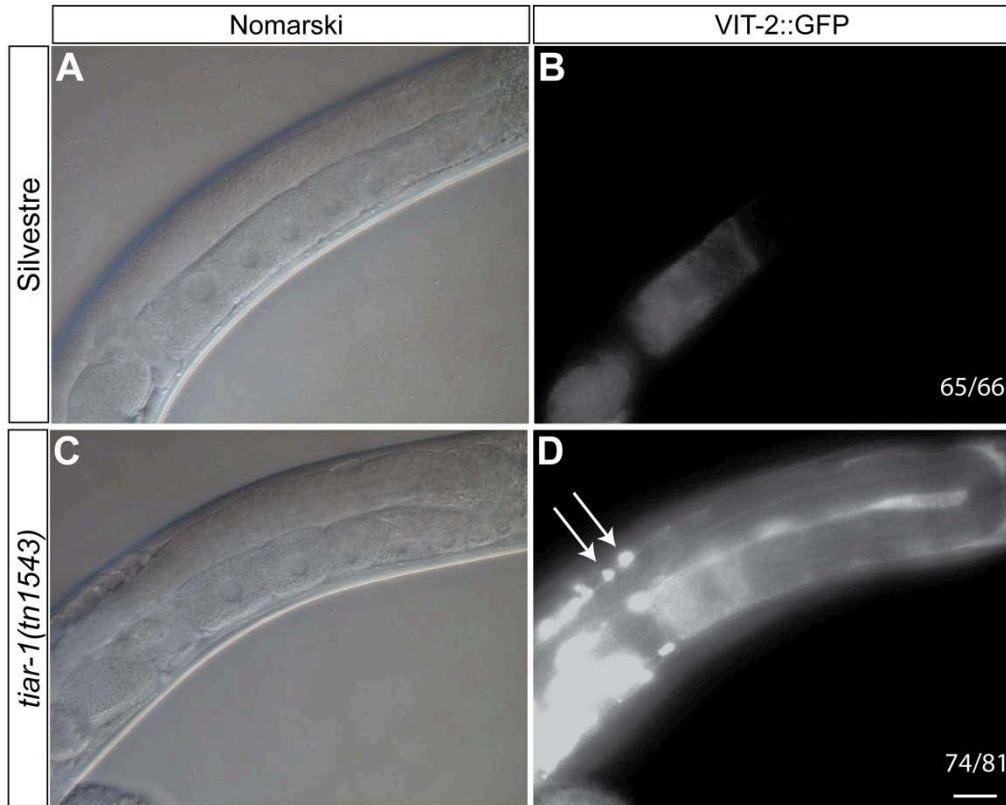


Figura 15. La proteína VIT-2 se localiza abundantemente en el pseudoceloma de animales mutantes *tiar-1(tn1543)*. Animales *tiar-1(tn1543)* y silvestres con un marcador de vitelogenina (*vit-2::gfp*) integrado fueron incubados a 20°C. Después de un día de que estos alcanzaron el estadio adulto, fueron anestesiados, montados y observados al microscopio de epifluorescencia (B y D) y con microscopía tipo Nomarski (A y C). Las imágenes son representativas de animales de cada genotipo, los números indican la proporción del total de animales con dicho fenotipo. Las flechas indican estructuras que asemejan gotas lipídicas. La barra de escala equivale a 10 μ m.

Un candidato a estudiar para entender este efecto es el receptor de vitelo RME-2, ya que es éste el que promueve la endocitosis de vitelo desde el intestino hacia los ovocitos (Grant y Hirsh 1999). Por ello decidimos probar si los animales *tiar-1* mutantes expresan este receptor correctamente. En animales silvestres, el receptor RME-2 se expresa en abundancia en la gónada de animales adultos, específicamente a partir de la zona de salida del paquíteno (asa) y hasta los ovocitos más proximales. Dentro de cada ovocito, este receptor se localiza principalmente en la membrana plasmática y en pequeñas vesículas (**Figura 16A**). En animales *tiar-1* mutantes, este receptor se expresa en la gónada tal y como lo hace en animales silvestres. Sin embargo, en cada

ovocito puede verse una ligera discontinuidad de la localización de RME-2 en la membrana plasmática y se observa en una mayor cantidad de pequeñas vesículas que en los animales silvestres (**Figura 16B**). Estas ligeras variaciones en la localización de RME-2 no parecen ser suficientes para explicar la enorme cantidad de VIT-2 que no está siendo incorporado en los ovocitos. Por lo tanto se requiere de un análisis detallado de la expresión de genes que regulan la incorporación del vitelo a los ovocitos en animales *tiar-1* mutantes para entender qué proceso está afectado.

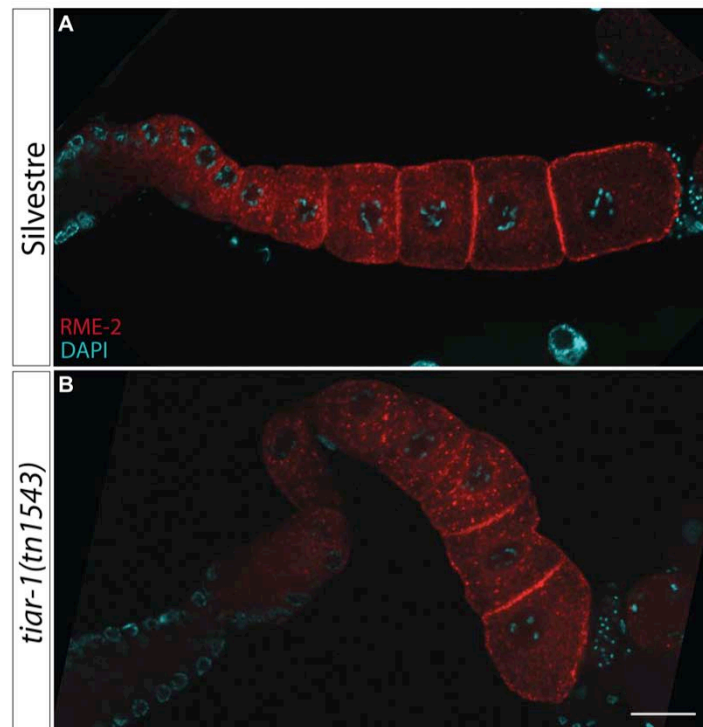


Figura 16. El receptor RME-2 se expresa correctamente en animales mutantes *tiar-1(tn1543)*. Animales silvestres (A) y *tiar-1(tn1543)* (B) fueron incubados a 20°C. Después de un día de que estos alcanzaron el estadio adulto, sus gónadas fueron disecadas, fijadas e inmuno-teñidas para el receptor de vitelo RME-2 (rojo) y DNA (cian). Las preparaciones fueron observadas al microscopio de epifluorescencia. Las imágenes son representativas de animales de cada genotipo. La barra de escala equivale a 10 µm.

9.2 CAPÍTULO II: La proteína de gránulos de estrés TIAR-1 protege a las células germinales femeninas del choque de calor

La línea germinal constituye un linaje celular inmortal que se requiere para la reproducción sexual. Distintos mecanismos han evolucionado para proteger a este linaje de los efectos negativos del estrés ambiental. Entre los mecanismos que se activan en respuesta al estrés están el arresto de la traducción y la formación de los gránulos de estrés; complejos ribonucleoprotéicos que contienen las proteínas conservadas de unión a RNA TIA-1 y TIAR. En este trabajo se muestra que TIAR-1 protege a las células germinales femeninas del estrés por choque de calor en el nematodo *Caenorhabditis elegans*. Cuando los animales son sometidos a diversos tipos de estrés, TIAR-1 se asocia con gránulos citoplasmáticos en la gónada y además se requiere para su formación. Mediante análisis genéticos, se encontró que existen dos mecanismos de protección de las células germinales del choque de calor, uno que depende de *tiar-1* y uno que no. Resulta interesante que el mecanismo que depende de *tiar-1* parece no requerir de la formación de gránulos de estrés en el centro de la gónada.

9.2.1 TIAR-1::GFP se expresa en la gónada y se agrega en gránulos citoplasmáticos durante el estrés

Para estudiar la expresión de TIAR-1 se generaron dos cepas de animales transgénicos que contienen la proteína de fusión TIAR-1::GFP. La primera cepa fue generada mediante la técnica de inserción monocopia MosSCI (Frøkjaer-Jensen *et al.* 2008) (Ver Material y Métodos, Apartado II), con la que la construcción *tiar-1::gfp* fue insertada en el cromosoma II. La segunda cepa fue generada mediante la técnica de edición del genoma CRISPR-Cas-9 (Dickinson *et al.* 2013) (Ver Material y Métodos, Apartado I), con la que se insertó la secuencia *stag::tev::gfp* en el extremo 3' del gen *tiar-1*. Los animales transgénicos fueron observados con el microscopio de epifluorescencia y se encontró que tanto la localización como el nivel de expresión de TIAR-1::GFP son muy similares en ambas cepas (**Figuras 17 y 18**). Observamos que TIAR-1::GFP se

expresó de manera ubicua durante el desarrollo en embriones, larvas y adultos (**Figura 17**). Esta proteína de fusión tuvo una alta expresión en la gónada a pesar de que también se expresó en todos los tejidos de los animales transgénicos (**Figuras 17A y 18A**). La alta expresión de esta construcción en la gónada concuerda con la importante función de TIAR-1 en la fertilidad de *C. elegans*.

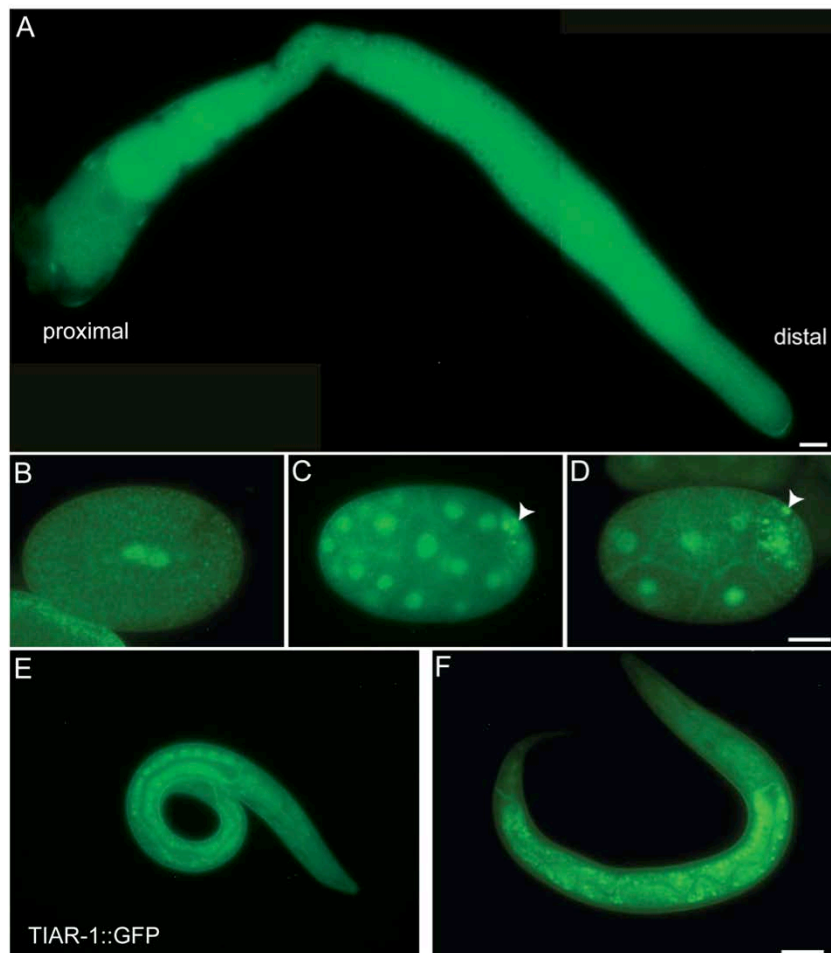


Figura 17. La proteína TIAR-1::GFP se expresa de manera ubicua a lo largo del desarrollo de *C. elegans*. Se insertó una construcción de la proteína TIAR-1 fusionada con GFP mediante la técnica de inserción de copia única MosSCI (Ver Materiales y Métodos, Apartado II). (A) Las gónadas de hermafroditas adultos fueron disecadas y (B-F) embriones y animales completos de diversas etapas del desarrollo fueron anestesiados y observados con el microscopio de epifluorescencia. Se muestran las imágenes representativas de animales con el alelo *xmSi02*: (B) cigoto recién fertilizado, (C) embrión de alrededor de 64 células, (D) embrión de 8 células, (E) larva L1 y (F) larva L2. Barras de escala: 10 μm (A-D) y 20 μm (E y F). Las cabezas de flecha indican los probables gránulos P.

Los homólogos de TIAR-1 en mamíferos son los como marcadores de gránulos de estrés más característicos. Por lo que se procedió a probar si TIAR-1::GFP cambia de localización subcelular en condiciones de estrés como el choque de calor, el ayuno y la detención prolongada en la meiosis en el nematodo. Los adultos hermafroditas de la cepa *tiar-1(tn1545)* fueron expuestos a ayuno (4 horas sin comida), choque de calor (31°C por 3 horas) o mantenidos en condiciones normales de crecimiento. Encontramos que en condiciones normales TIAR-1::GFP se localizó tanto en el citoplasma como en el núcleo de las células germinales, así como en estructuras que parecen ser gránulos germinales (**Figura 18B-E**, cabezas de flecha). En condiciones de ayuno, TIAR-1::GFP se asoció con gránulos en el centro de la gónada y en los ovocitos (**Figura 18D**). En condiciones de choque de calor TIAR-1::GFP también se asoció con gránulos en el centro de la gónada y en ovocitos, principalmente en la región perinuclear de estos últimos (**Figura 18C**). Los gránulos formados en los ovocitos durante el choque de calor fueron de mayor tamaño que los que se formaron durante el ayuno (comparar **Figura 18C y D**, triángulos). Adicionalmente, se estudió la localización subcelular de TIAR-1::GFP en condiciones de detención prolongada en la meiosis, porque se ha observado que en ausencia de esperma los ovocitos se apilan en la gónada de los hermafroditas o “hembras” y comienzan a formar gránulos que contienen proteínas como CGH-1. Con este objetivo, se obtuvo una cepa de animales “hembras” que expresaran la proteína TIAR-1::GFP, es decir *fog-2(q71); tiar-1(tn1545)*. En estas condiciones, la proteína TIAR-1::GFP también se asoció con gránulos en el centro de la gónada y en los ovocitos, principalmente en la región cortical de estos últimos (**Figura 18E**).

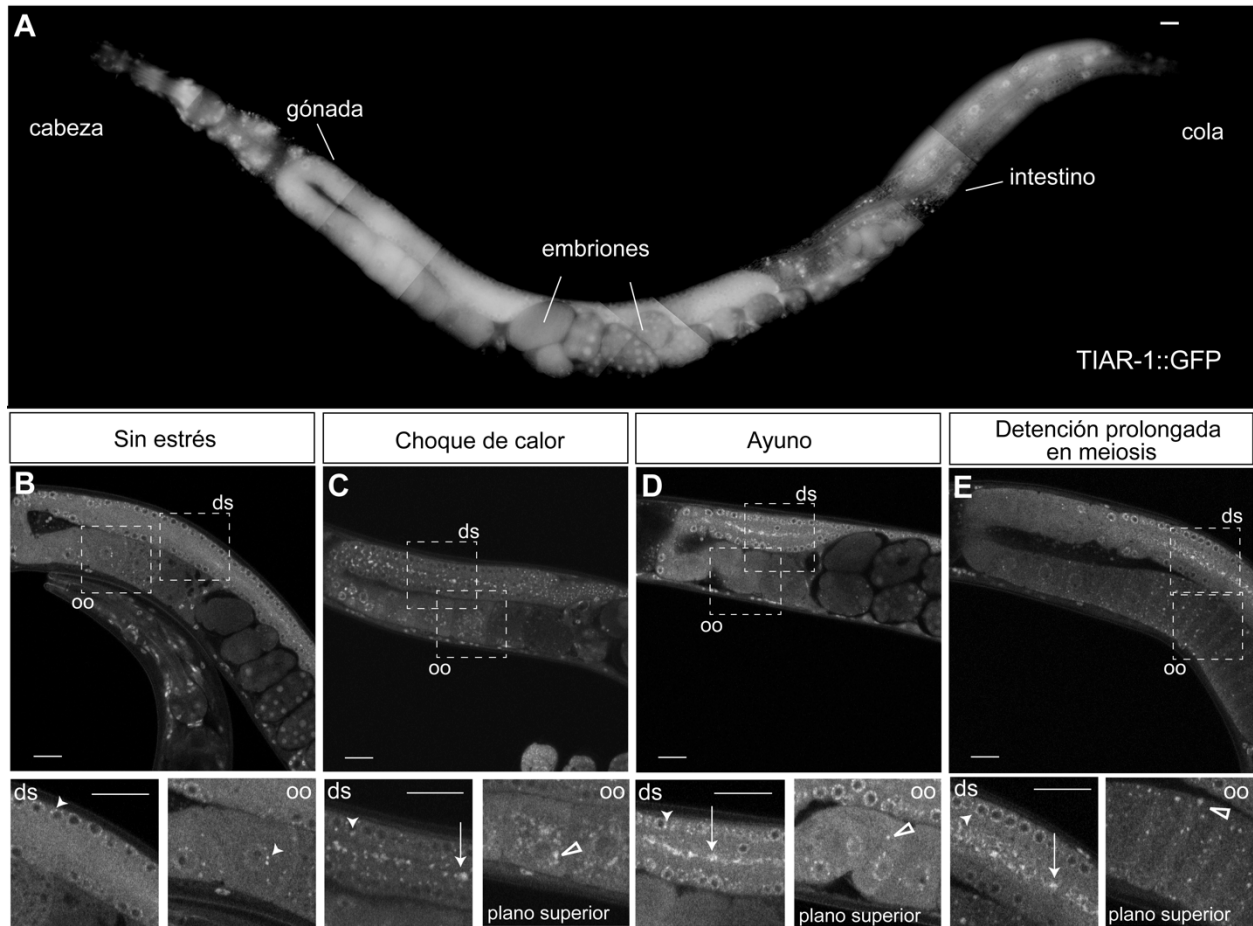


Figura 18. TIAR-1 se asocia con gránulos citoplasmáticos en la gónada durante el estrés. Animales adultos de la cepa transgénica *tiar-1(tm1545)*, en los que se expresa la proteína de fusión TIAR-1::GFP, fueron incubados a 20°C. Posteriormente fueron anestesiados y observados al microscopio. (A) Reconstrucción de imágenes sobrepuestas de un adulto de la cepa *tiar-1(tm1545)* de un día de edad en condiciones normales de crecimiento obtenidas con el microscopio de epifluorescencia. Imágenes obtenidas con el microscopio confocal de un brazo de la gónada de animales *tiar-1(tm1545)* adultos en (B) condiciones normales de crecimiento, (C) después de un choque de calor (3 horas a 31°C), (D) después de un ayuno (4 horas) y (E) después de dos días de arresto en la meiosis. Los cuadrados delimitados con líneas punteadas se muestran a detalle en las imágenes de abajo. Las cabezas de flecha indican probables gránulos P, las flechas indican gránulos en el centro de la gónada y los triángulos gránulos en los ovocitos. “ds” representa la parte distal de la gónada y “oo” los ovocitos. La barra de escala equivale a 10 μ m.

9.2.2 TIAR-1 y CGH-1 se asocian con los gránulos en el centro de la gónada y en los ovocitos

Diferentes tipos de gránulos se forman en la gónada de *C. elegans* cuando los animales son expuestos a diversas condiciones de estrés (ver Introducción, Gránulos la gónada de *Caenorhabditis elegans*). Una de las proteínas que ha sido utilizada para identificar a estos gránulos es CGH-1, dado que esta se asocia con los gránulos y además tiene un papel en su remodelación (Navarro *et al.* 2001; Boag *et al.* 2008; Hubstenberger *et al.* 2013, 2015). Para estudiar si los gránulos a los que se asocia TIAR-1 corresponden a las estructuras descritas previamente, se realizaron co-inmuntinciones para identificar a TIAR-1 y a CGH-1 simultáneamente, en condiciones normales de crecimiento y en estrés por choque de calor o ayuno. En condiciones normales, tanto TIAR-1::GFP como CGH-1 se asociaron con los que parecen ser gránulos P. Sin embargo, algunos gránulos de menor tamaño solamente contenían a TIAR-1::GFP o a CGH-1 (**Figura 19A-C'**, asteriscos y flechas abiertas). Por otro lado, en ambas condiciones de estrés probadas tanto TIAR-1::GFP como CGH-1 se asociaron a los grandes gránulos formados en el centro de la gónada, así como en los gránulos más grandes de los ovocitos (**Figura 19D-I'**, flechas). Sin embargo, así como en las condiciones normales, en condiciones de estrés algunos gránulos contienen únicamente TIAR-1::GFP y algunos otros únicamente CGH-1 (**Figura 19D-I'**, asteriscos y flechas abiertas). Estos resultados sugieren que los gránulos a los que se asocia TIAR-1 corresponden a los descritos previamente, pero una pequeña fracción de gránulos parecen tener una composición proteica diferente.

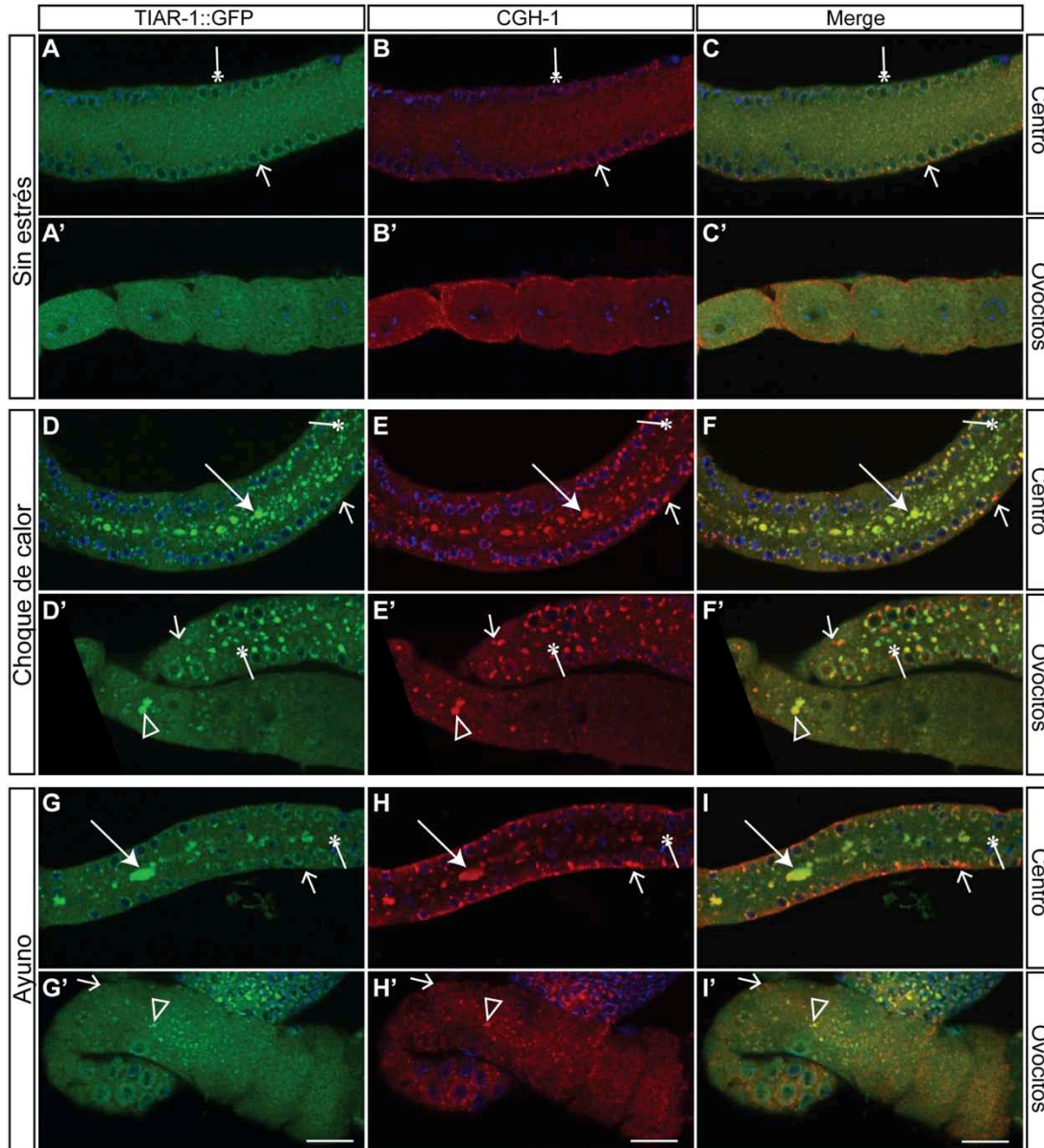


Figura 19. TIAR-1 y CGH-1 se asocian con gránulos en el centro de la gónada y en los ovocitos. Animales *tiar-1(tm1545)* hermafroditas fueron incubados en condiciones normales de crecimiento (20°C con alimento) (A-C'), expuestos a choque de calor (3 h a 31°C) (D-F') o ayunados (4 h sin alimento) (G-I'). Después de los tratamientos las gónadas de los animales fueron disecadas, fijadas e inmunoteñidas con anticuerpos contra GFP (verde) y CGH-1 (rojo) simultáneamente, y con DAPI para visualizar los núcleos (azul). Las preparaciones fueron observadas con un microscopio confocal. TIAR-1 y CGH-1 se asocian con los gránulos más grandes en el centro de la gónada (A-I) y en los ovocitos (A'-I'). Sin embargo, algunos gránulos pequeños parecen contener únicamente TIAR-1 (asteriscos) o GCH-1 (flechas abiertas). Las flechas indican los gránulos del centro de la gónada y los triángulos los gránulos de los ovocitos. La barra de escala equivale a 10 μ m.

9.2.3 La formación de gránulos inducidos por estrés en la gónada es dinámica y depende del estado de la traducción

Para estudiar si los gránulos a los que se asocia TIAR-1 en la gónada de *C. elegans* comparten las características de los gránulos de estrés descritos en mamíferos, se evaluó su dinámica de formación y el efecto que tienen sobre ésta los tratamientos con fármacos inhibidores de la traducción. Una de las características de los gránulos de estrés en células de mamíferos es que se disuelven cuando las células regresan a las condiciones normales (Kedersha *et al.* 2000). Del mismo modo, los gránulos que se forman en los ovocitos de *C. elegans* durante la detención prolongada en meiosis, se disuelven una hora después de que se completa la meiosis por influencia de la MSP (*major sperm protein*) (Jud *et al.* 2008). En este trabajo se determinó tanto la dinámica de formación como la de disolución de los gránulos de la gónada de *C. elegans* usando animales transgénicos que expresan TIAR-1::GFP. Animales de la cepa *tiar-1(tm1545)* fueron expuestos a choque de calor o a ayuno y luego fueron recuperados e incubados en condiciones normales de crecimiento. Estos animales fueron observados al microscopio de epifluorescencia en intervalos de una hora durante todo este proceso. Después de una hora de choque de calor, sólo el 30% de los animales ya habían formado gránulos en el centro de la gónada, y a las 3 horas que el 100% de los animales presentaban esta condición mientras que sólo el 75% tenían gránulos en los ovocitos (**Figura 20A**). Después de haber sido recuperados del choque de calor, la proporción de animales con gránulos de TIAR-1::GFP fue disminuyendo gradualmente hasta llegar a niveles basales después de 4 horas de recuperación (**Figura 20A**). Después de dos horas de ayuno, el 40% de los animales ya habían formado gránulos en el centro de la gónada, pero no fue hasta las 4 horas que alrededor del 90% de ellos lo lograron mientras que el 50% presentaron gránulos en los ovocitos (**Figura 20B**). Después de haber sido recuperados del ayuno, la proporción de animales con gránulos de TIAR-1::GFP fue disminuyendo gradualmente hasta llegar a niveles basales después de 3 horas de recuperación (**Figura 20B**). Estos resultados sugieren que la formación de gránulos en el centro de la gónada de *C. elegans*, al igual que los gránulos de estrés descritos previamente, se disuelven después de haber regresado a las condiciones normales. Además, los gránulos del centro de la gónada se formaron antes que los de los ovocitos en las condiciones probadas.

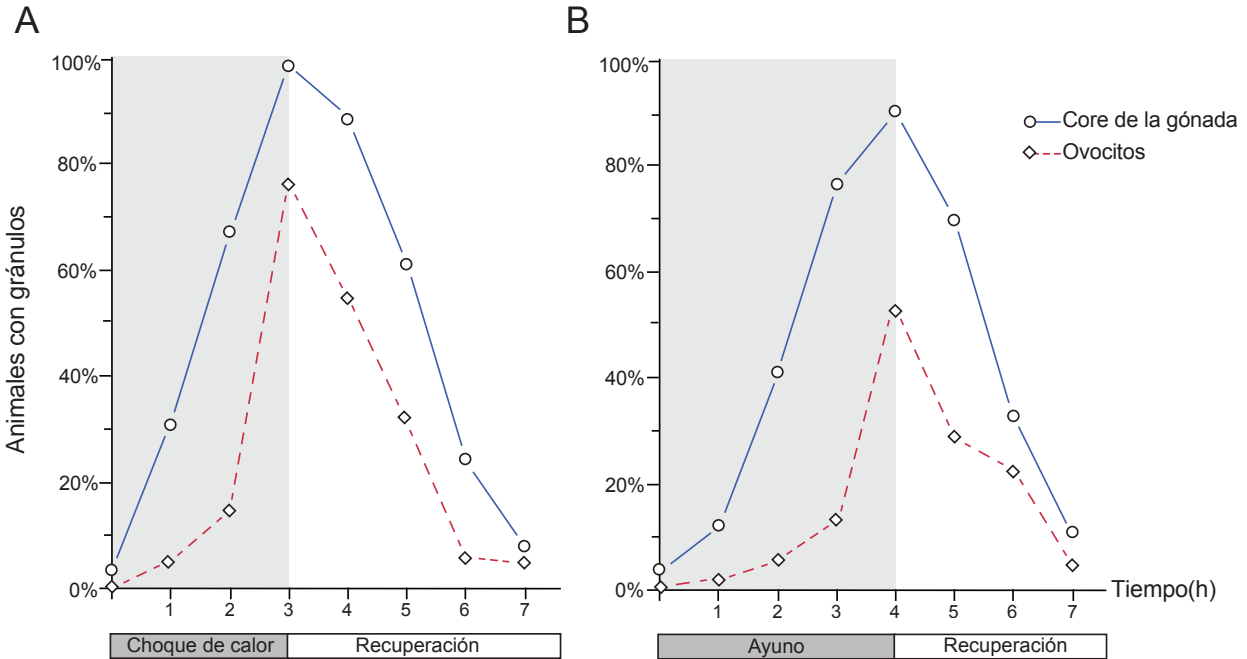


Figura 20. Los gránulos en la gónada se forman y se disuelven gradualmente antes y después de que los animales se recuperan del estrés. Animales adultos de un día de edad fueron expuestos a (A) choque de calor (3 horas a 31°C) en cajas con agar, o a (B) ayuno (4 horas) en medio líquido. Después fueron recuperados del estrés a 20°C con comida en cajas con agar. Los animales fueron anestesiados y observados al microscopio de epifluorescencia. La cantidad de animales con gránulos en el centro de la gónada (línea azul) y en los ovocitos (línea punteada roja) fue determinada cada hora durante el estrés y la recuperación. Al menos dos experimentos independientes fueron realizados con $n > 50$ para cada condición y tiempo. Una serie de los experimentos que se muestran fue realizado por la M. en C. Laura Silvia Salinas. El porcentaje promedio de animales con gránulos visibles está representado en la gráfica.

Los inhibidores de la traducción que estabilizan a los polisomas (como la cicloheximida) inhiben la formación de gránulos de estrés, mientras que los inhibidores que causan la terminación prematura de la traducción (como la puromicina) promueven la formación de dichos gránulos (Kedersha *et al.* 2000). Por lo tanto, se decidió probar la formación de gránulos de TIAR-1 en la gónada de *C. elegans* en presencia de cicloheximida y puromicina. Para esto, animales transgénicos *tiar-1(tm1545)* fueron crecidos en condiciones normales o expuestos a estrés, durante los tratamientos con puromicina o cicloheximida. Después del choque de calor o el ayuno, todos los animales que no fueron tratados con fármacos formaron gránulos de TIAR-

1::GFP en la gónada (**Tabla 6**). En contraste, cuando fueron tratados con cicloheximida, la proporción de animales expuestos a choque de calor que formaron gránulos disminuyó alrededor del 80% (**Tabla 6**). De igual modo, el tratamiento con cicloheximida provocó una disminución del 90% en la proporción de animales ayunados que formaron gránulos en la gónada (**Tabla 6**). Después de tres horas de tratamiento con puromicina, incluso en condiciones normales de crecimiento, la mayoría de los animales formaron gránulos en el centro de la gónada. Después de cuatro horas de tratamiento con puromicina, la mayoría de los animales ya habían formado gránulos tanto en el centro de la gónada como en los ovocitos. Estos resultados apoyan la hipótesis de que los gránulos a los que se asocia TIAR-1 en la gónada de *C. elegans*, al igual que los de mamíferos, dependen de la traducción proteica.

Tabla 6. Los fármacos inhibidores de la traducción afectan la formación de gránulos en la gónada de *C. elegans*

Condiciones	Tratamiento	Animales <i>tiar-1::gfp</i> con gránulos		
		Centro de la gónada	Ovocitos	N
Sin estrés	Ninguno	3.3 %	0 %	30
	Puromicina 3h	65.8 %	10.5 %	38
	Puromicina 4h	75 %	55 %	20
Choque de calor	Ninguno	100 %	100 %	40
	Cicloheximida	20 %	10 %	40
Ayuno	Ninguno	100 %	50 %	22
	Cicloheximida	5 %	0 %	40

Animales hermafroditas adultos de un día *tiar-1(tm1545)* fueron crecidos en condiciones normales de crecimiento o expuestos a estrés: choque de calor (3 h a 31°C) o ayuno (4 h sin alimento). Simultáneamente, los animales fueron tratados con puromicina 15mM o cicloheximida 30 mM. Posteriormente, los animales fueron anestesiados, montados en colchones de agar, y observados con el microscopio de epifluorescencia para cuantificar la formación de gránulos de TIAR-1::GFP en la gónada.

9.2.4 *tiar-1* se requiere para la formación de gránulos en el centro de la gónada

Previamente se encontró que mutantes *tiar-1(tm361)* no forman gránulos de estrés en el centro de la gónada en condiciones de ayuno y choque de calor (Carlos Giovanni García, tesis de doctorado). Sin embargo, se decidió confirmar este hallazgo con el nuevo alelo producido mediante CRISPR-Cas-9 : *tiar-1(tm1543)*. Con ese fin, se evaluó la formación de gránulos en la gónada en animales *tiar-1(tm1543)*. Estos animales fueron sometidos a choque de calor, a ayuno y a una detención prolongada en la meiosis (*tiar-1(tm1543); fog-2(q71)*), para después realizar una inmunotinción contra CGH-1. Encontramos que, en efecto, *tiar-1* se requiere para la formación de gránulos de CGH-1 en el centro de la gónada (**Figura 21, flechas**). Por el contrario, *tiar-1* no es necesaria para la formación de gránulos en los ovocitos (**Figura 21, triángulos**).

La contribución de las proteínas homólogas TIAR-2 y TIAR-3 a la formación de gránulos en el centro de la gónada fue evaluada de la misma manera haciendo uso de las cepas *tiar-2(tm2923)* y *tiar-3(ok144)*. Se encontró que los gránulos en el centro de la gónada de los animales de esta cepa se forman de manera normal cuando los animales son expuestos a las condiciones de estrés antes mencionadas (**Tabla 7**). Del mismo modo, se evaluó la formación de gránulos en dobles (*tiar-1 tiar-2* y *tiar-1;tiar-3*) y triple (*tiar-1 tiar-2; tiar-3*) mutantes en los genes *tiar*. La formación de gránulos en el centro de la gónada de animales dobles y triple mutantes fue muy similar a la de la formación de gránulos en animales mutantes solamente en *tiar-1*. Estos resultados sugieren que solamente TIAR-1 promueve la formación de gránulos en el centro de la gónada, y que las proteínas TIAR-2 y TIAR-3 no son redundantes con TIAR-1 en esta función.

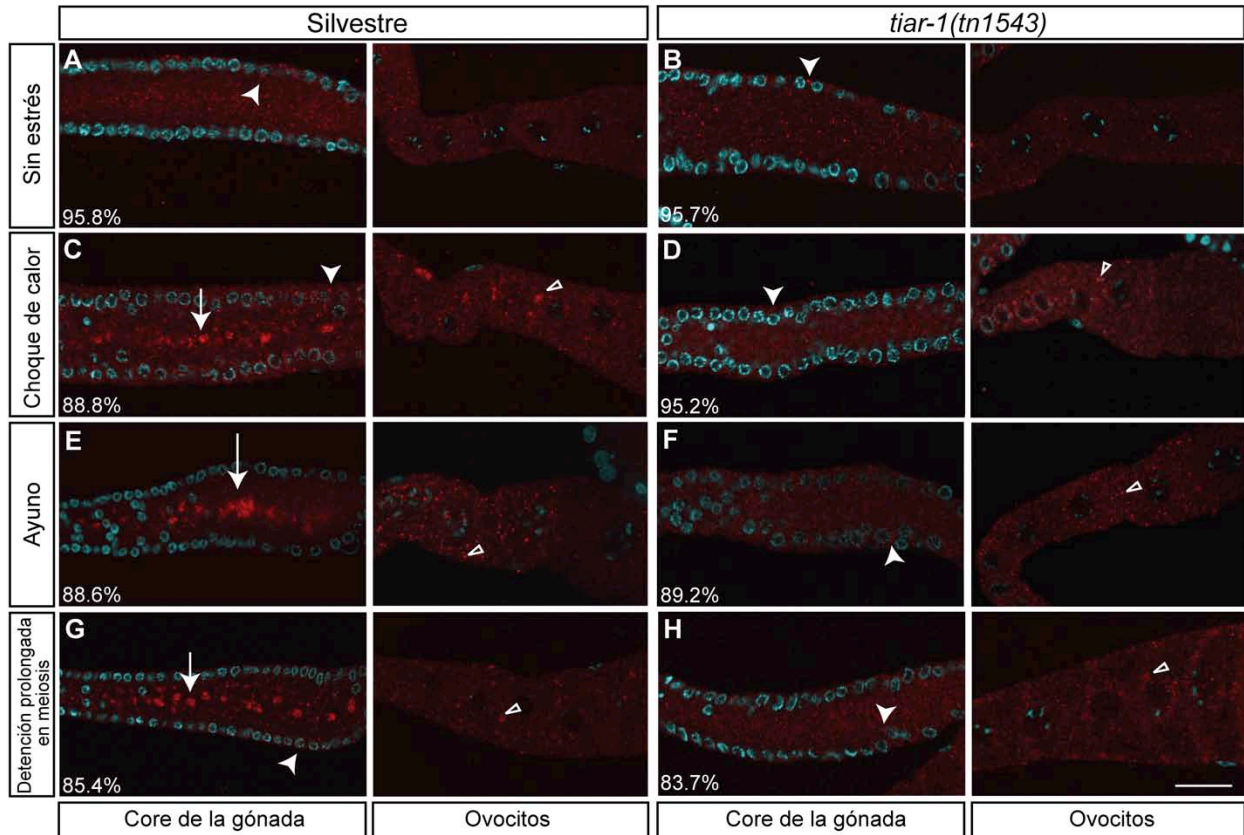


Figura 21. *tiar-1* se requiere para la formación de gránulos de estrés en el centro de la gónada.

Animales adultos de las cepas silvestre y *tiar-1(tn1543)* fueron crecidos en (A y B) condiciones normales (sin estrés), (C y D) expuestos a choque de calor (3 horas a 31°C), o (E y F) a ayuno (4 horas). Para la detención prolongada en la meiosis (G y H), “hembras” de las cepas *fog-2(q71)* y *tiar-1(tn1543);fog-2(q71)* fueron mantenidas sin cruzar con machos por dos días. Las gónadas de los animales fueron disecadas, fijadas con paraformaldehído y teñidas con un anticuerpo contra CGH-1 (rojo) y DAPI (cian). Imágenes representativas fueron adquiridas con el microscopio de epifluorescencia. “ds” distal, “oo” ovocitos. Los porcentajes representan el promedio de animales con el fenotipo que se muestra. Notar que la mayoría de los animales silvestres forman gránulos en condiciones de estrés, sin embargo, la mayoría de los *tiar-1* mutantes no los forman en el centro de la gónada pero sí en los ovocitos. Las flechas indican gránulos en el centro de la gónada, las cabezas de flecha los probables gránulos P y los triángulos los gránulos de los ovocitos. La barra de escala equivale a 10 μ m.

Tabla 7. *tiar-2* y *tiar-3* no se requieren para la formación de gránulos en el centro de la gónada

Genotipo	Animales con gránulos en el centro de la gónada ⁺		
	Sin estrés	Choque de calor	Ayuno
Silvestre	4.2% (n=119)	88.8% (n=98)	88.6% (n=79)
<i>tiar-1(tm1543)</i>	4.3% (n=46)	4.8% (n=42)	10.8% (n=37)
<i>tiar-1(tm361) unc-4(e120)</i>	0% (n=24)	15.2% (n=33)	23.5% (n=51)
<i>tiar-2(tm2923)</i>	0% (n=37)	100% (n=20)	100% (n=24)
<i>tiar-3(ok144)</i>	7.1% (n=42)	90.1% (n=22)	100% (n=27)
<i>tiar-1(tm1543) tiar-2(tm2923)</i>	0% (n=28)	5.9% (n=34)	6.5% (n=31)
<i>tiar-1(tm1543); tiar-3(ok144)</i>	0% (n=45)	9.1% (n=33)	23.5% (n=34)
<i>tiar-1(tm1543) tiar-2(tm2923); tiar-3(ok144)</i>	0% (n=24)	15.2% (n=33)	9.1% (n=33)

Animales hermafroditas adultos de las cepas indicadas fueron crecidos en condiciones normales o expuestos a choque de calor (3 h a 31°C) o a ayuno (4 h sin alimento). Las gónadas de estos animales fueron disecadas, fijadas y inmunoteñidas para CGH-1. Las preparaciones fueron observadas al microscopio de epifluorescencia y el número de gónadas con gránulos fue determinado para cada condición.

9.2.5 *tiar-1* protege a los embriones y a las células germinales femeninas del choque de calor

Dado que TIAR-1 se asocia a gránulos en la gónada en condiciones de ayuno y choque de calor, decidimos evaluar si *tiar-1* tiene un papel en la protección de las células germinales contra estas condiciones desfavorables. Para esto, se expuso a los animales silvestres y mutantes en *tiar-1* en proceso de ovogénesis a choque de calor o a ayuno y se analizó el efecto negativo que estos pudieran tener sobre la viabilidad de los embriones. El análisis realizado toma en cuenta que la gónada de *C. elegans* está organizada de manera ordenada, es decir que las células troncales germinales localizan en la parte distal de la gónada, a medida que estas células se desplazan hacia la parte proximal de la gónada se diferencian y forman los ovocitos. Dado que los embriones también se producen de manera ordenada, nuestro análisis permitió distinguir los embriones formados durante el estrés de aquellos formados posteriormente. Así fue posible separar la progenie de los animales estresados en tres grupos: I) embriones que ya estaban en el útero durante el estrés y aquellos que fueron producidos poco tiempo después del estrés a través de la fertilización de los ovocitos más proximales, II) embriones que fueron producidos en el periodo de 12 a 24 h después del estrés y III) embriones que fueron producidos en el periodo de 24 a 48 h después del estrés (**Figura 22A**). Dado que la progresión de la meiosis dentro de la gónada de *C. elegans* dura de 57 a 60 h, los embriones del grupo III probablemente corresponden a aquellos ovocitos que se encontraban en etapas tempranas de la profase I cuando el animal fue expuesto al estrés. Después de realizar la separación de los embriones en grupos, se determinó la letalidad embrionaria en cada uno de ellos.

En primer lugar, se encontró que el choque de calor tiene como consecuencia la letalidad en alrededor del 60% de los embriones del grupo I en la cepa silvestre (**Figura 22B**). En contraste, los embriones silvestres de los grupos II y III sí sobrevivieron (**Figura 22B**). Estos resultados indican que los ovocitos que se encontraban en fases tempranas de la meiosis fueron protegidos de los efectos negativos del choque de calor. Los animales mutantes en *tiar-1* tuvieron una letalidad de alrededor de 80% en los embriones del grupo I (**Figura 22B**), por lo que estos embriones parecen ser más susceptibles a los efectos negativos del choque de calor que los embriones silvestres. A diferencia de los embriones silvestres, los embriones de mutantes en

tiar-1 del grupo II mostraron una letalidad de entre el 20 y el 40% (**Figura 22B**). Estos resultados indican que los ovocitos en fases tempranas de la meiosis tienen por lo menos dos mecanismos de protección contra el choque de calor: uno que depende de *tiar-1* y uno que no. Los embriones de mutantes en *tiar-1* del grupo III mostraron una reducción de letalidad a niveles similares a los de los animales que no fueron estresados (**Figura 22B**), por lo que parece que la protección de los ovocitos más distales no depende de *tiar-1*. La viabilidad de los embriones mutantes en *tiar-1* del grupo III demuestra que estos animales no fueron dañados irreversiblemente por el choque de calor. Así mismo, los espermatozoides no fueron dañados por el choque de calor, porque fueron formados y almacenados en la espermateca del animal hermafrodita durante el estadio L4, es decir antes de los experimentos de choque de calor.

En contraste con lo observado durante y después del estrés por choque de calor, el ayuno no provocó ningún aumento en la letalidad embrionaria, en ninguna de las cepas estudiadas (**Figura 22C**). Esto sugiere que el mecanismo de protección de los ovocitos contra el choque de calor es distinto al mecanismo que los protege del ayuno.

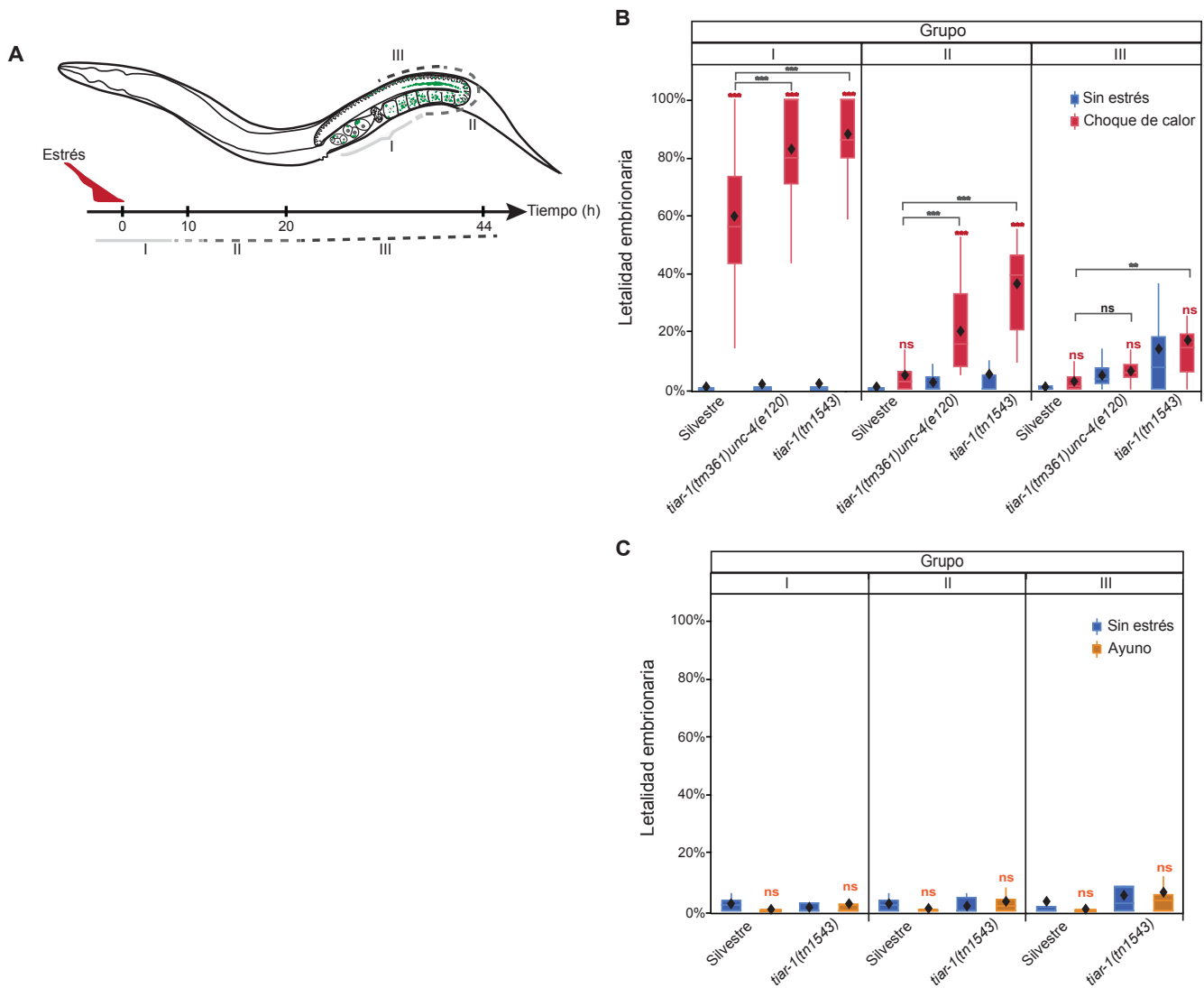


Figura 22. *tiar-1* protege a las células germinales femeninas y a los embriones del choque de calor. Animales adultos de las cepas silvestre y *tiar-1(tm1543)* fueron expuestos a choque de calor (3 h a 31°C) o ayunados (4 horas sin alimento). Después del estrés, estos animales fueron recuperados a 20°C y con alimento. Posteriormente se separó a su progenie en tres grupos: I) los embriones que fueron fertilizados antes o durante el estrés, II) los embriones que fueron producidos al poco tiempo del estrés y III) los embriones que fueron producidos mucho tiempo después del estrés. La letalidad embrionaria se determinó para cada grupo. Los embriones que no eclosionaron después de 24 h de haber sido expulsados fueron considerados como muertos. Los gráficos representan los promedios de la letalidad embrionaria de 17 a 53 animales de tres replicados independientes. Las cajas representan el rango intercuartil 25-75%, los diamantes el valor promedio, y las barras se extienden desde el valor inferior hasta el superior. El modelo estadístico usado fue el de mínimos cuadrados con comparación de Tukey HSD. Los tres asteriscos ($p < 0.001$) y ns (no significativo) provienen de comparaciones entre grupos control y estrés, mientras que los que se encuentran sobre los primeros son comparaciones entre genotipos.

9.2.6 TIAR-1 no necesita asociarse a gránulos en el centro de la gónada para proteger a las células germinales femeninas del choque de calor

Con el análisis anterior se mostró que *tiar-1* protege a las células germinales femeninas y a los embriones de los efectos dañinos del choque de calor. A continuación se decidió explorar si la formación de gránulos en la gónada por parte de TIAR-1 es la que promueve dicha protección contra el choque de calor. Durante la realización de este trabajo se encontró una condición en la que muy pocos animales forman gránulos en el centro de la gónada aún siendo expuestos al choque de calor. En esta condición fue que los animales fueron incubados a 24°C durante su desarrollo, en lugar de a 20°C. A estos animales se les llamará animales “pretratados” de aquí en adelante por simplicidad. Animales silvestres pretratados fueron expuestos a las condiciones que se describieron previamente como choque de calor (3 h a 31°C) y sus gónadas fueron disecadas, fijadas, inmunoteñidas contra CGH-1 y observadas al microscopio de epifluorescencia. Únicamente el 3% de los animales silvestres pretratados formaron gránulos en el centro de la gónada, el 22% de ellos formó gránulos pequeños y dispersos, mientras que el 57% no formaron gránulos en el centro de la gónada (resultados promedio de dos réplicas, n=32). Este hallazgo fue confirmado en animales *tiar-1(tn1545)*, que fueron observados directamente al microscopio de epifluorescencia para determinar la cantidad de animales pretratados que formaron gránulos de TIAR-1::GFP en la gónada después del choque de calor (**Tabla 8** y **Figura 23A** y **B**). Es importante resaltar que a pesar de que los gránulos del centro de la gónada no se formaron en animales pretratados, la formación de gránulos en los ovocitos de estos animales se mantuvo (**Figura 23B**, triángulo).

Animales pretratados fueron expuestos al choque de calor y se realizó el análisis de letalidad embrionaria descrito anteriormente (Materiales y Métodos, Apartado I). Los resultados obtenidos usando animales pretratados fueron muy similares a los obtenidos usando animales crecidos a 20°C. El 58% de los embriones silvestres pretratados del grupo I no sobrevivieron mientras que la mayoría de los embriones de los grupos II y III sí sobrevivieron (**Figura 23C**). Estos resultados sugieren que los gránulos del centro de la gónada no son estrictamente necesarios para la protección de células germinales femeninas contra el choque de calor. En contraste, los embriones *tiar-1(tn1543)* pretratados tuvieron porcentajes de letalidad similares a los crecidos a 20°C. La letalidad de los embriones *tiar-1(tn1543)* pretratados fue de 84% en el

grupo I, 52% en el grupo II y alrededor de 10% en el grupo III (**Figura 23C**). Estos resultados indican que TIAR-1 podría estar protegiendo a las células germinales femeninas del choque de calor independientemente de su papel en la formación de gránulos en el centro de la gónada.

Tabla 8. Los gránulos del centro de la gónada no se forman en animales que fueron pretratados a 24°C

	Choque de calor		
	Control Crecidos a 20°C (n=35)	Crecidos a 220°C (n=65)	Crecidos a 224°C (n=89)
Con gránulos normales en el centro de la gónada	0%	84.6%	6.7%
Con gránulos muy pequeños en el centro de la gónada	5.7%	13.8%	39.3%
Sin gránulos en el centro de la gónada	94.3%	1.5%	53.9%

Animales *tiar-1(tm1545)* hermafroditas de un día de edad fueron expuestos a las condiciones indicadas. Después fueron observados al microscopio de epifluorescencia. Posteriormente se cuantificó la cantidad de estos animales que tenían gránulos de TIAR-1::GFP en el centro de la gónada.

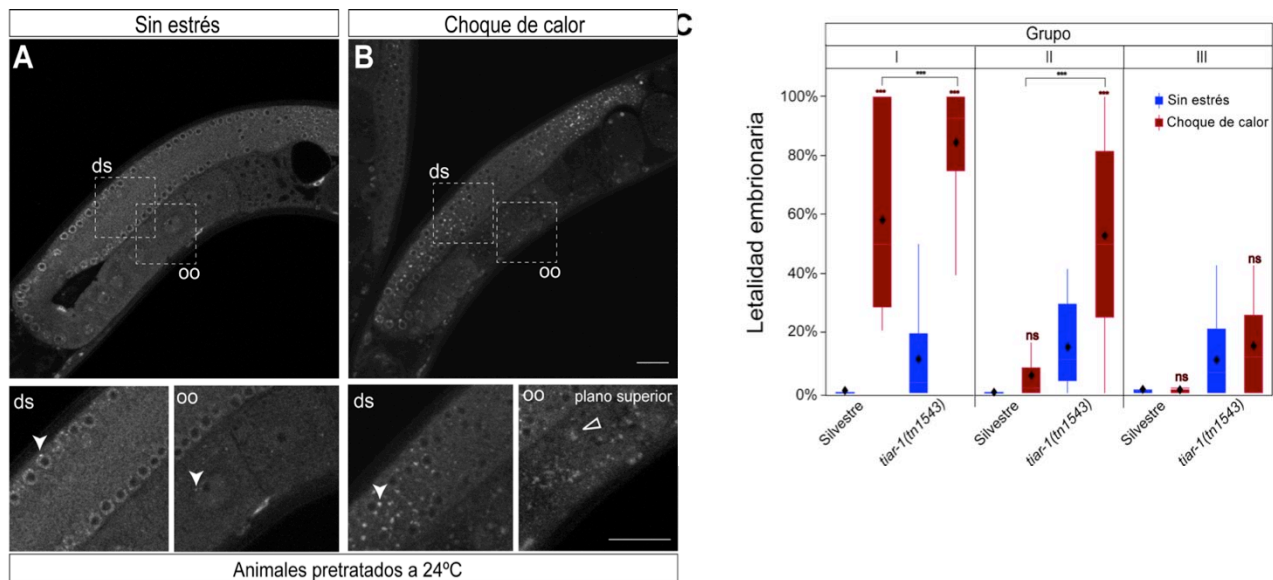


Figura 23. *tiar-1* protege a células germinales femeninas y embriones del choque de calor independientemente de los gránulos del centro de la gónada. Animales *tiar-1*(*tn1543*) pretratados (crecidos a 24°C) fueron incubados en (A) condiciones normales ó (B) expuestos a choque de calor (3 h a 31°C). Los animales fueron anestesiados, montados y observados al microscopio confocal. La fotografía en (B) es representativa de los animales que formaron pequeños gránulos en el centro de la gónada y gránulos normales en los ovocitos (39.3%). Sin embargo la mayoría de estos animales pretratados no formaron gránulos en el centro de la gónada después del choque de calor (53.9%). Las cabezas de flecha indican probables gránulos P y los triángulos gránulos en los ovocitos. La barra de escala equivale a 10 μ m. (C) Animales silvestres y *tiar-1*(*tn1543*) pretratados fueron expuestos a choque de calor (3 h a 31°C) o mantenidos a 20°C. Su progenie fue separada en tres grupos (ver **Figura 22**). La letalidad embrionaria fue cuantificada en cada grupo. Los embriones que no eclosionaron después de 24 h de haber sido expulsados fueron considerados como muertos. Las cajas representan el rango intercuartil 25-75%, los diamantes el valor promedio, y las barras se extienden desde el valor inferior hasta el superior. El modelo estadístico usado fue el de mínimos cuadrados con comparación de Tukey HSD. Los tres asteriscos ($p < 0.001$) y ns (no significativo) son comparaciones entre grupos control y estrés, mientras que aquellos que se encuentran sobre los estos son comparaciones entre genotipos.

9.2.7 Animales mutantes *tiar-1(tn1543)* responden parcialmente al choque de calor

Resultados previos indican que *tiar-1* es importante en la protección de células germinales del choque de calor, y que este papel probablemente es independiente de su papel en la formación de gránulos de estrés en la gónada. Por lo tanto decidimos explorar la posibilidad de que *tiar-1* tuviera un papel en la respuesta sistémica de los animales durante el choque de calor. Una manera de estudiar la respuesta al choque de calor en los animales completos es analizar la expresión de proteínas chaperonas que se traducen en condiciones de estrés por calor. Esto se consiguió con el transgén *gpls[Phsp-16.2::gfp]*, que ha sido usado como un biomarcador de tolerancia térmica (Rea *et al.* 2005). En condiciones normales, los animales silvestres tuvieron una expresión muy baja de *Phsp-16.2::gfp*, independientemente de la temperatura a la que fueron incubados (**Figura 24A, E, I y J**). En contraste, cuando los animales silvestres fueron expuestos al choque de calor, la expresión de *Phsp-16.2::gfp* aumentó 9 veces en animales crecidos a 20°C (**Figura 24C e I**) y hasta 10 veces en animales pretratados (**Figura 24G y J**). Estos resultados indican que los animales silvestres pretratados aún perciben y responden al choque de calor al igual que los crecidos a 20°C.

Para probar si los animales mutantes en *tiar-1* son capaces de percibir y responder al choque de calor del mismo modo que los animales silvestres, se obtuvo una cepa que contiene el transgén *Phsp-16.2::gfp* en un fondo *tiar-1(tn1543)*. Al igual que los animales silvestres, en condiciones normales los animales *tiar-1(tn1543)* tuvieron muy baja expresión de *Phsp-16.2::gfp* (**Figura 24B, F, I y J**). Por otro lado, cuando los animales *tiar-1(tn1543)* fueron expuestos al choque de calor, estos no tuvieron el mismo incremento en la expresión de *Phsp-16.2::gfp* que los animales silvestres. En animales *tiar-1(tn1543)* crecidos a 20°C la expresión de *Phsp-16.2::gfp* incrementó únicamente 3 veces, mientras que en los pretratados incrementó únicamente 3.5 veces (comparar con los incrementos de 9 y 10 veces de los animales silvestres) (**Figura 24D, H, I y J**). Estos resultados sugieren que *tiar-1* se requiere para la respuesta normal al choque de calor en *C. elegans*.

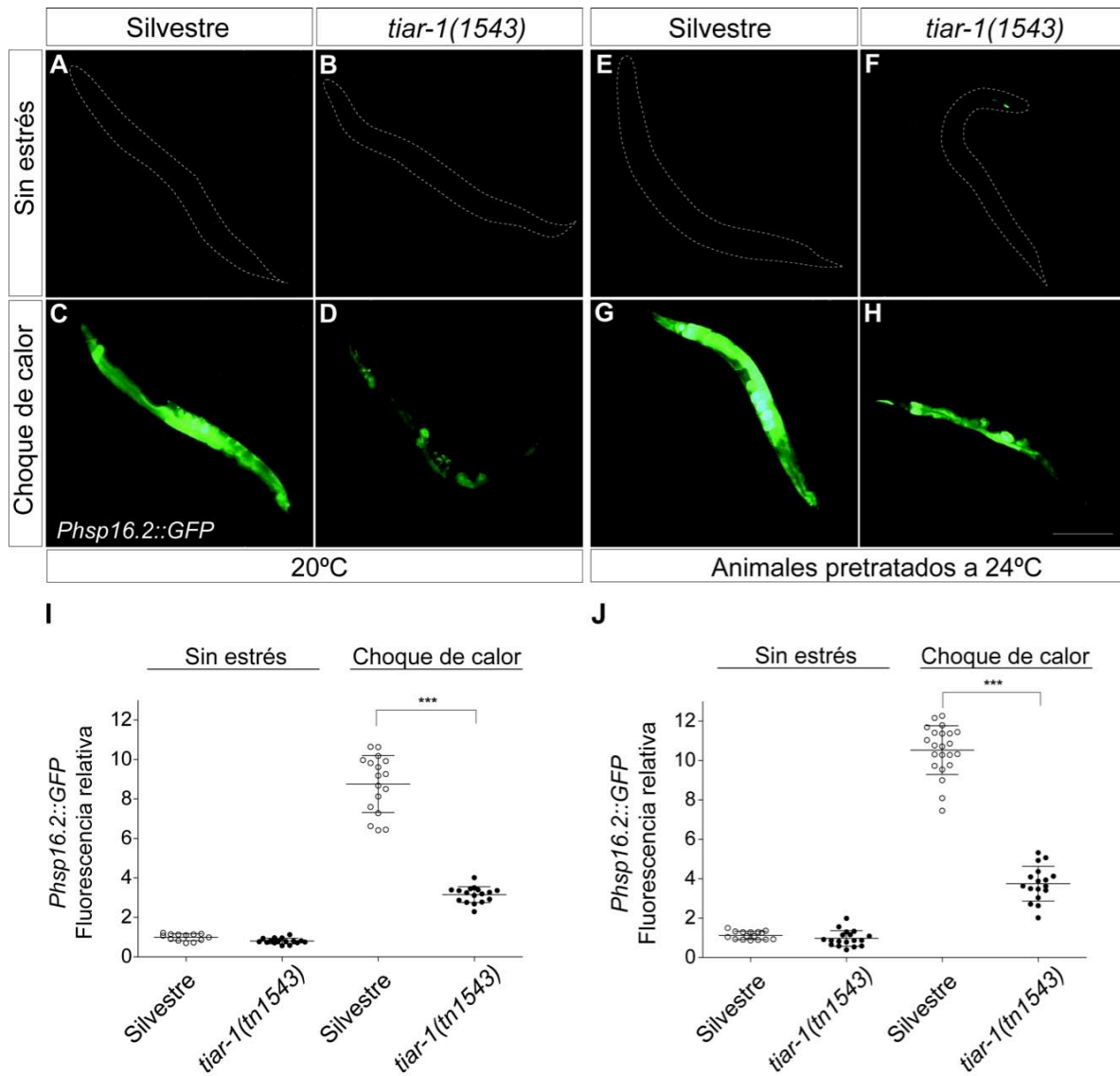


Figura 24. Animales mutantes *tiar-1(tn1543)* responden parcialmente al choque de calor. La expresión del transgén *phsp-16.2::gfp* fue medida en animales *tiar-1* mutantes y control. Las cepas con la inserción *gpls1[hsp-16.2::gfp]* fueron incubadas a 20°C o pretratadas a 24°C. Después estos animales adultos fueron cultivados en (A, B y E, F) condiciones normales o (C, D y G, H) expuestos a choque de calor (3 horas a 31°C). Posteriormente, los animales fueron anestesiados, montados y observados en el microscopio de epifluorescencia. Imágenes representativas de los animales en cada condición fueron tomadas usando la misma exposición. La fluorescencia de GFP (unidades arbitrarias) fue cuantificada para cada una de las condiciones y genotipos. Los valores fueron normalizados con el valor de fluorescencia de animales silvestres crecidos a 20°C en condiciones control. Las gráficas corresponden a datos obtenidos en uno de tres replicados con resultados similares. ANOVA de una vía, *** $p < 0.001$.

9.3 CAPÍTULO III. Sistema para purificar mRNAs asociados a ribosomas en la gónada de *C. elegans*

Uno de nuestros objetivos es identificar el mecanismo molecular mediante el cual TIAR-1 regula la traducción en la gónada de *C. elegans*. Una estrategia para identificar los mRNAs que son traducidos en presencia y en ausencia de TIAR-1, es el TRAP (Translating ribosome affinity purification) (Heiman *et al.* 2008, 2014). Este sistema consiste en expresar una proteína de la subunidad grande del ribosoma fusionada con un Tag de afinidad de tal modo que pueda realizarse una inmunoprecipitación de los ribosomas y así co-purificar los mRNAs que se encuentran asociados, y por lo tanto posiblemente siendo traducidos.

9.3.1 Diseño de la cepa transgénica *rpl-1::gfp*

Para inmunoprecipitar los ribosomas de manera tejido específica, la proteína de la subunidad grande del ribosoma L10a ha sido fusionada transcripcionalmente con GFP y diferentes promotores en organismos como el ratón y el pez cebra (Tryon *et al.* 2013; Heiman *et al.* 2014). La proteína homóloga a L10a en *C. elegans* es RPL-1, y su isoforma funcional es la *a* (Dr. Kuroyanagi Hidehito, comunicación personal). Por lo tanto, se diseñó una construcción de *rpl-1a* con *gfp::tev::s* para ser insertada mediante el sistema de inserción de copia única MosSCI (Frøkjær-Jensen *et al.* 2012). Esta construcción cuenta con un promotor específico de línea germinal (*Pmex-5*), GFP, sitio de corte de la proteasa TEV, la subunidad del ribosoma *rpl-1* y el 3'UTR de *rpl-1* (**Figura 15A**). Se obtuvieron 8 líneas transgénicas de las cuales 4 tuvieron expresión del transgén en la línea germinal. En todos los animales provenientes de estas líneas transgénicas, la proteína RPL-1::GFP se localizó en el citoplasma y en el nucléolo de las células germinales (**Figura 15B**). Esta localización subcelular ha sido observada en organismos como *Mus musculus* y *Danio rerio* (Heiman *et al.* 2008; Tryon *et al.* 2013), lo que sugiere que la proteína puede ser funcional. Una vez obtenida la cepa transgénica, se seleccionó aquella que fluorescía con mayor intensidad. Dado que nuestro interés era estudiar la regulación traduccional

en la gónada de los adultos, se procedió a obtener una línea de animales que pudieran producir gametos normales pero que no produjeran embriones. Para esto, hermafroditas de la cepa *rpl-1::GFP* se cruzaron con nematodos mutantes *spe-9(hc88)* temperatura sensibles, cuyo espermatozoide es incapaz de fertilizar el ovocito pero le permite madurar. Así que se usaron animales *rpl-1::GFP;spe-9(hc88)* para realizar la co-inmunoprecipitación de los mRNAs que están asociados a ribosomas en la gónada del adulto.



Figura 25. La proteína de fusión RPL-1::GFP se expresa abundantemente en la gónada de *C. elegans*. (A) Se diseñó el transgén con un promotor específico de línea germinal (*Pmex-5*), GFP, sitio de corte de la proteasa TEV, la subunidad del ribosoma *rpl-1* isoforma a, y el 3'UTR de *rpl-1*. (B) Se insertó la construcción en el un sitio Mos en el cromosoma IV de *C. elegans* (ver Material y métodos, Apartado II). La proteína de fusión GFP-subunidad ribosomal se expresa en la gónada. Las flechas indican los nucléolos en los ovocitos proximales. La barra de escala equivale a 10 μ m.

9.3.2 La proteína de fusión RPL-1::GFP no se asocia con polisomas

Para validar nuestro sistema se estudió si la proteína de fusión RPL-1::GFP se asociaba a los ribosomas. Con este fin, se obtuvo un perfil polisomal mediante la separación en gradientes de sacarosa. Las muestras que se adicionaron a los gradientes provenían de animales jóvenes adultos de la cepa *rpl-1::GFP;spe-9(hc88)* y, como control negativo, de la cepa *spe-9(hc88)*. Los componentes celulares fueron separados de acuerdo a su densidad por medio de ultracentrifugación y las proteínas concentradas para identificar la fracción en donde se localizó RPL-1::GFP. La proteína de fusión se encontró en mayor proporción en la fracción monosomal (fracción 6), y en menor proporción en las fracciones polisomales (fracciones 9-11) (**Figura 26**). Así mismo, hay una fracción de la proteína de fusión en las fracciones menos densas del gradiente (fracciones 1-5), que posiblemente sea proteína que no fue incorporada a la subunidad grande del ribosoma (**Figura 26**). Con el objetivo de realizar las inmunoprecipitaciones de RPL-1::GFP que estuvieran asociadas a los ribosomas se colocaron los lisados totales de los animales adultos sobre colchones de sacarosa (ver Materiales y Métodos, Apartado II), de tal modo que sólo los complejos ribonucleoprotéicos más pesados fueran usados como muestras para inmunoprecipitar.

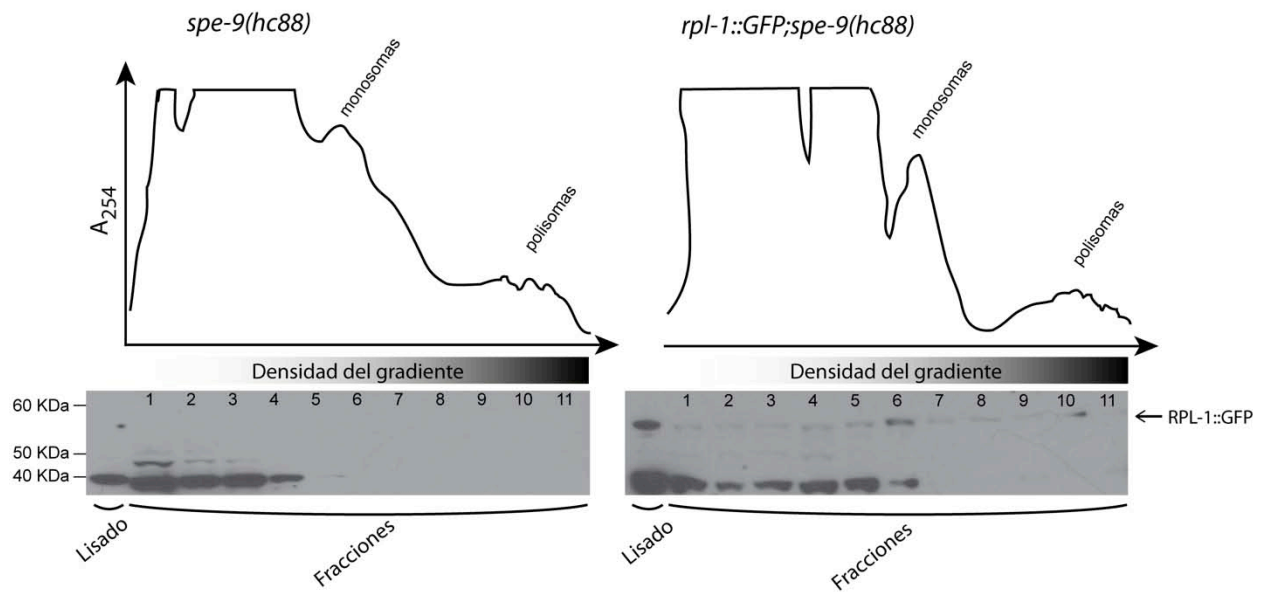


Figura 26. La proteína RPL-1::GFP se encontró principalmente en la fracción monosomal. Animales jóvenes adultos de las cepas *spe-9(hc88)* y *rpl-1::GFP;spe-9(hc88)* incubados a 25°C fueron lisados en presencia de cicloheximida. Los lisados fueron colocados sobre gradientes de sacarosa 15-60% y ultracentrifugados a 40,000 xg, posteriormente se fraccionaron las muestras y su absorbancia a 254 nm se determinó. Después de precipitar con TCA las proteínas de cada fracción, se realizó un Western Blot con anticuerpo contra S-Tag (contenido en la proteína de fusión RPL-1::GFP). La banda indicada con una flecha como RPL-1::GFP es de aproximadamente 56 KDa, mientras que las bandas inferiores (40 KDa) son inespecíficas porque se encuentran también en lisado de animales sin la proteína de fusión RPL-1::GFP.

9.3.3 Co-inmunoprecipitación de RPL-1::GFP

A pesar de que la proteína de fusión RPL-1::GFP se asoció mayoritariamente a monosomas, decidimos comprobar que el sistema de co-inmunoprecipitación funcionaba. Para esto, se llevaron a cabo pruebas utilizando matrices distintas con 4 diferentes anticuerpos monoclonales. En este reporte incluye la única combinación que funcionó adecuadamente: 12A6 y 4C9 del Hybridoma bank (ver Materiales y Métodos, Apartado II). Los anticuerpos reportados para co-inmunoprecipitación en neuronas de ratón (Heiman *et al.* 2014) (19C8 y 19F7) no funcionaron para inmunoprecipitar RPL-1::GFP. La matriz que sí funcionó estaba compuesta por Dynabeads

Protein G, con una combinación los anticuerpos monoclonales 12A6 y 4C9. Las muestras de lisado de las dos cepas *spe-9(hc88)* y *rpl-1::GFP;spe-9(h88)* se incubaron con la matriz por 2 horas. Posteriormente se realizó la elusión con un corte proteolítico con la enzima TEV para evitar purificar los mRNAs que se hayan unido inespecíficamente a la matriz. Muestras de cada paso de la co-inmunoprecipitación fueron separadas en un gel de poliacrilamida y la proteína de interés fue identificada mediante Western Blot (ver Materiales y Métodos, Apartado II). Mediante el uso de esta matriz se pudo obtener y purificar la proteína RPL-1::GFP a partir de muestras de nematodos adultos. En la muestra de inmunoprecipitación puede observarse una banda correspondiente a la proteína de fusión RPL-1::GFP completa (55.9 KDa) y después del corte con TEV (28.9 KDa) (**Figura 27**).

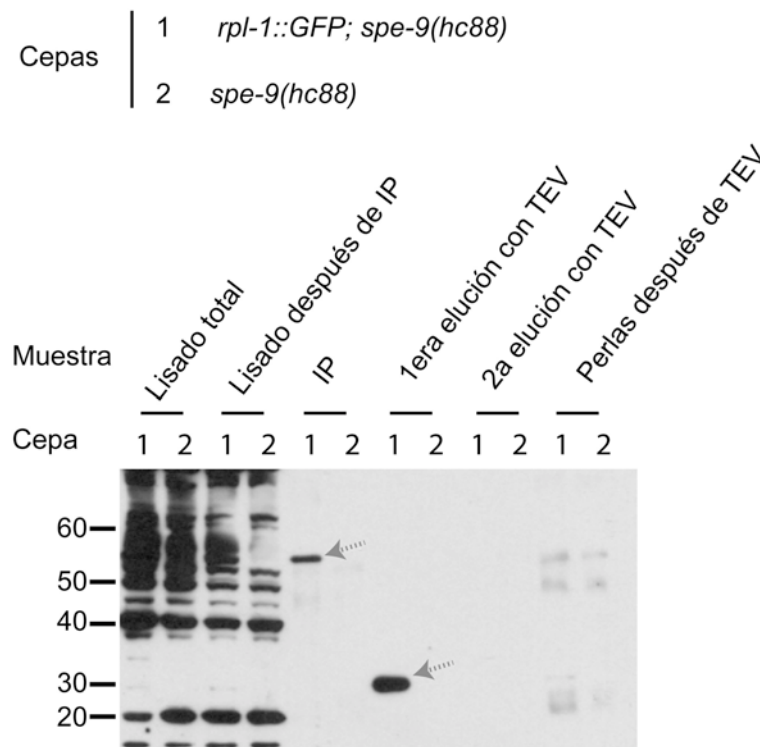


Figura 27. Detección de la proteína de fusión RPL-1::GFP después de la inmunoprecipitación. Las muestras de lisado de las dos cepas *spe-9(hc88)* y *rpl-1::GFP;spe-9(h88)* se incubaron con la matriz (Dynabeads Protein G más los anticuerpos monoclonales 6A12 y 4C9) por 2 horas. Posteriormente se realizó un corte proteolítico con la enzima TEV para eluir. Después, muestras de cada uno de los pasos del proceso fueron separados en un gel de poliacrilamida y detectados mediante Western Blot con un anticuerpo policlonal anti-S Tag. Las flechas indican las bandas del peso molecular esperado para la proteína de fusión RPL-1::GFP completa (55.9 KDa) y después del corte con TEV (28.9 KDa).

A partir de las muestras purificadas de proteína RPL-1::GFP se extrajo el RNA que estaba asociado a ésta proteína. Después de extraer y purificar el RNA se procedió a cuantificarlo. La cantidad de RNA de las muestras analizadas fue tan pequeña que no fue posible detectarla mediante densitometría ni tampoco mediante el método de cuantificación fluorométrica. Sin embargo, se procedió a sintetizar cDNA a partir de las muestras obtenidas para determinar si era posible analizar la abundancia de algunos mRNAs de la gónada con respecto a los del soma. Con este cDNA se realizaron RT-PCRs con resultados negativos. En conjunto, nuestros resultados indican que la proteína de fusión insertada en los nematodos no es funcional y por lo tanto no es utilizada por la gónada para llevar a cabo la traducción.

10 DISCUSIÓN

TIA-1 y TIAR son proteínas importantes en la regulación de la traducción de mRNA y de la formación de gránulos de estrés en cultivos celulares (Waris *et al.* 2014). Así mismo, estas proteínas son necesarias para la fertilidad y desarrollo embrionario de ratones (Beck *et al.* 1998; Piecyk *et al.* 2000; Kharraz *et al.* 2010). Hasta ahora, la función de estas proteínas en la protección de células germinales durante el estrés era desconocida. En este trabajo, mostramos que *tiar-1* juega un papel importante en la fertilidad y desarrollo embrionario de *C. elegans*, no únicamente en condiciones normales de desarrollo, sino también en estrés por choque de calor (Huelgas-Morales *et al.* 2016) (**Figura 28**).

En animales, las proteínas TIA-1/TIAR tienen un papel importante en la fertilidad. En ratones, la falta de dichas las proteínas causa letalidad embrionaria con penetrancia variable (50-100%) (Beck *et al.* 1998; Piecyk *et al.* 2000; Kharraz *et al.* 2010). Los ratones con pérdida de función tanto de *Tia-1* como de *Tiar* son incapaces de completar el desarrollo embrionario, por lo que estas proteínas parecen ser redundantes (Piecyk *et al.* 2000). En este trabajo se encontró que, en *C. elegans*, las proteínas TIAR también tienen un papel importante en el desarrollo embrionario. Entre el 10 y el 20% de los embriones mutantes *tiar-1* no fueron capaces de completar el desarrollo embrionario. Así mismo, la frecuencia de eventos de no-disyunción de cromosomas sexuales durante la ovogénesis aumentó en la cepa *tiar-1* mutante. Estos resultados sugieren que *tiar-1* tiene un papel en la meiosis femenina, lo que podría explicar la letalidad embrionaria en la cepa *tiar-1* mutante. De las tres proteínas parálogas, TIAR-1 es la que tuvo mayor relevancia en el desarrollo embrionario. Sin embargo, TIAR-2 y TIAR-3 parecen ser redundantes con TIAR-1 en dicho proceso.

La ausencia de la proteína TIAR causa esterilidad en ratones. Los ratones mutantes para *Tiar* que completan el desarrollo embrionario producen pocas células germinales, pero éstas no llegan a poblar las gónadas, lo que causa esterilidad tanto en hembras como en machos (Beck *et al.* 1998). Sin embargo, ratones mutantes para *Tia-1* son fértiles. En este trabajo, todos los nematodos *tiar-1* mutantes fueron fértiles a 20°C y alrededor del 80% a 25°C. Es interesante que la pérdida de los tres parálogos *tiar-1*, *tiar-2* y *tiar-3* resultó en una disminución aún mayor de la

fertilidad, ya que sólo el 10% de los nematodos triple mutantes fueron capaces de reproducirse. Aunque TIAR-1 tiene el papel más evidente en la fertilidad del nematodo, TIAR-2 y TIAR-3 son redundantes con TIAR-1 a cierto grado.

Una de las hipótesis que surgió a partir de los hallazgos de este trabajo es que la letalidad embrionaria de los nematodos mutantes en *tiar-1* puede deberse a aneuploidias. Nuestros resultados indican que en ausencia de las proteínas TIAR la frecuencia de eventos de no-disyunción aumenta. Esto es evidente en el caso de los cromosomas sexuales, porque se refleja en un aumento en la incidencia de machos en la población. Del mismo modo, eventos de no-disyunción en los autosomas podrían estar causando la letalidad embrionaria de animales mutantes en *tiar-1*. Si ese fuera el caso, la alta letalidad embrionaria en los ratones mutantes para *Tia-1* y *Tiar* podrían deberse también a defectos en la meiosis. Se requieren futuros estudios para describir con precisión el mecanismo molecular mediante el cual esta familia de proteínas promueve la fertilidad, la meiosis femenina y el desarrollo embrionario.

La regulación por parte de TIAR-1 contribuye a que los nematodos se adapten a las condiciones desfavorables del ambiente. Previamente, se encontró que los animales adultos mutantes para *tiar-1* tienen mayor susceptibilidad al estrés oxidativo y por radiación ultravioleta (Rousakis *et al.* 2014). Así mismo, al igual que sus contrapartes en mamíferos, TIAR-1 y TIAR-2 se asocian con gránulos citoplasmáticos en tejidos somáticos durante condiciones de estrés (Sun *et al.* 2011; Rousakis *et al.* 2014). Sin embargo, dichos estudios no describieron el papel de *tiar-1* en la gónada. En nuestro grupo de investigación, se evaluó la contribución de *tiar-1* en respuesta al estrés en la gónada. Previamente se encontró que *tiar-1* se requiere para la formación de los gránulos en el centro de la gónada (Carlos G. Silva García, tesis doctoral). En este trabajo se describe que TIAR-1 contribuye a la protección de las células germinales del estrés. En primer lugar, TIAR-1 se asocia a gránulos citoplasmáticos en la gónada inducidos por choque de calor, ayuno y detención prolongada en la meiosis. En segundo lugar, TIAR-1 promueve la fertilidad de los nematodos después del choque de calor. Y, en tercer lugar, TIAR-1 es necesaria para que los animales respondan al choque de calor con una adecuada inducción de la expresión de proteínas chaperonas (**Figura 28**). Por otro lado, nuestros resultados indican que existen mecanismos de protección de las células germinales que son independientes de TIAR-1. Debido a la importancia que tiene la regulación traduccional en la gónada de los nematodos, una

posibilidad es que otras proteínas de unión a RNA actúen de manera redundante con TIAR-1 en el proceso de protección contra el choque de calor.

Los gránulos citoplasmáticos a los que las proteínas TIA-1 y TIAR se asocian en mamíferos, han sido propuestos como sitios en donde los mRNAs son almacenados para prevenir su degradación durante condiciones desfavorables, así como sitios en donde los mRNAs son clasificados para continuar su traducción o ser trasladados hacia cuerpos de procesamiento y ser degradados (Kedersha *et al.* 2013). Sin embargo, no ha sido posible separar la función de los gránulos de estrés de la función de sus componentes. Así como hay evidencia que sugiere que tienen un papel protector contra el estrés, hay reportes que le restan importancia a los gránulos en los procesos de protección. Por ejemplo, la estabilidad de los mRNAs no se ve afectada en ausencia de los gránulos de estrés (Bley *et al.* 2014). Así mismo, la disminución global de la traducción tampoco requiere de la formación de gránulos sino que, al parecer, éstos son consecuencia de la disminución en la traducción (Ohn *et al.* 2008).

Nuestros resultados concuerdan con que las proteínas que forman los gránulos de estrés pueden ejercer su actividad protectora aún cuando no se forman gránulos. Esto porque aún en condiciones en las que los animales silvestres no formaron gránulos en el centro de la gónada después del choque de calor, estos fueron capaces de producir embriones viables. A partir de las observaciones hechas en este trabajo, se sugiere que los gránulos inducidos por estrés en el centro de la gónada no son indispensables para proteger a los gametos del choque de calor, mientras que la proteína TIAR-1 sí los protege. Dado que la formación de los gránulos de estrés es una respuesta altamente conservada, a pesar de que parecen no ser relevantes para que los embriones sobrevivan en las condiciones antes descritas, no nos es posible descartar que tengan otras funciones.

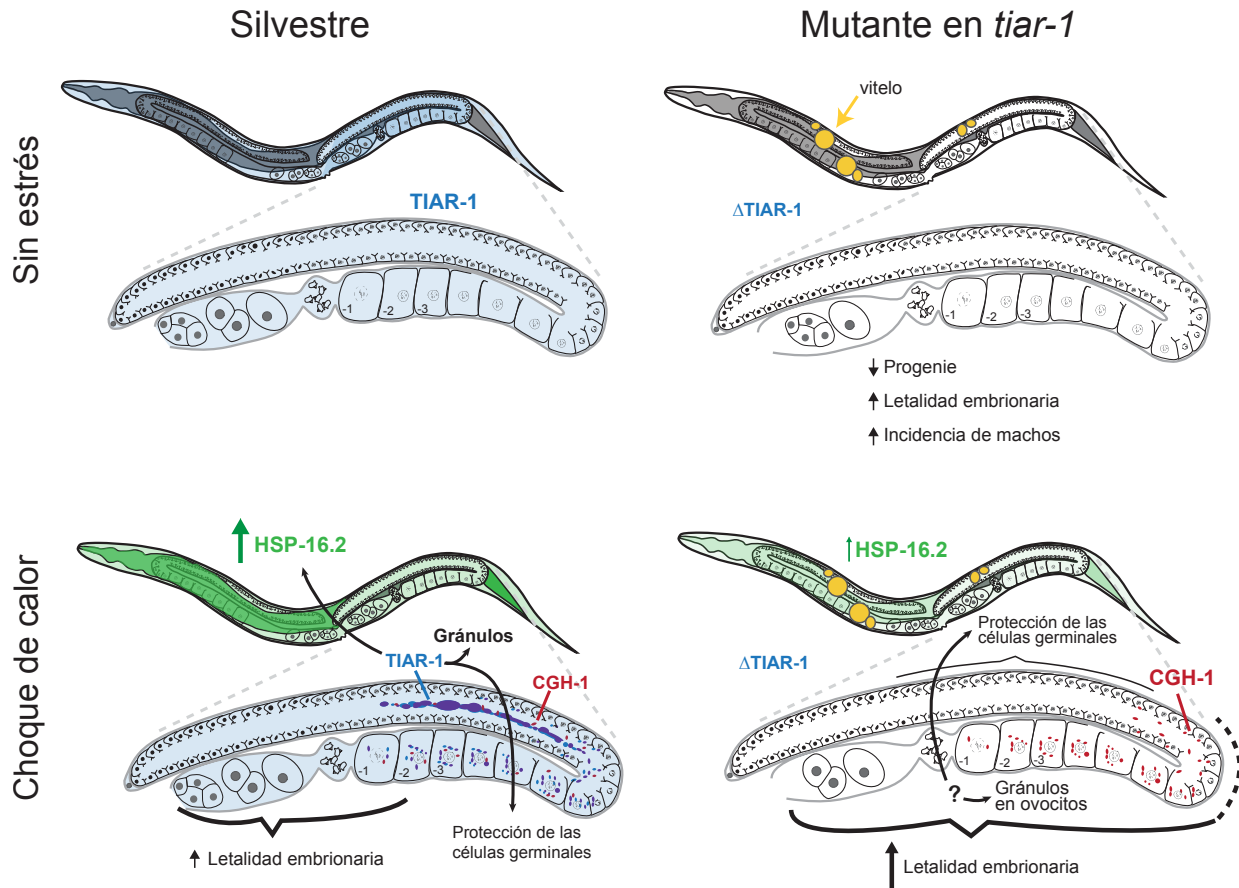


Figura 28. Representación esquemática de el papel de *tiar-1* en la gónada de *C. elegans* en condiciones normales de desarrollo y durante el choque de calor. En condiciones normales (sin estrés) los animales mutantes en *tiar-1* tienen menor fertilidad, además de letalidad embrionaria y mayor incidencia de machos que los animales silvestres. Así mismo, los animales mutantes en *tiar-1* tienen defectos en la incorporación de vitelo (amarillo) hacia la gónada. Durante el choque de calor, en animales silvestres se observa la formación de gránulos en el centro de la gónada (dependiente de *tiar-1*) y en los ovocitos. Aunque algunos embriones silvestres mueren durante el choque de calor, TIAR-1 (azul) protege a la mayoría de las células germinales de los efectos nocivos de este tipo de estrés. Además, hay un incremento en la expresión de la proteína HSP-16.2 (verde) en animales silvestres en respuesta al choque de calor. En contraste, en animales mutantes en *tiar-1* no se observa la formación de gránulos en el centro de la gónada sino únicamente en los ovocitos (gránulos de CGH-1, rojo). En estas condiciones, hay un incremento en la letalidad embrionaria, sin embargo los embriones producidos 24 h después del choque de calor sí completan el desarrollo embrionario, por lo tanto existen otros mecanismos para proteger a las células germinales que son independientes de *tiar-1* (?). Además, los mutantes en *tiar-1* no presentan el incremento en la expresión de HSP-16.2 que presentan los animales silvestres, por lo que tienen una deficiencia en la respuesta al choque de calor.

11 PERSPECTIVAS

En este trabajo se ha demostrado que *tiar-1* protege a las células germinales femeninas del choque de calor. Sin embargo, aún queda por determinarse el mecanismo molecular mediante el cual *tiar-1* protege a dichas células. Nuestra estrategia para determinar este mecanismo fue realizar un TRAP (Translating ribosome affinity purification) (Resultados, Capítulo III). Desafortunadamente, la proteína de la subunidad grande del ribosoma que fue etiquetada parece no ser funcional porque no se asocia con los polisomas (**Figura 26**). Existen diversas estrategias a seguir para obtener mejores resultados en este sistema. La primera sería re-diseñar la proteína de fusión. Podría hacerse una fusión con una etiqueta de afinidad de menor tamaño. Así mismo, la fusión podría realizarse en el extremo carboxilo terminal en vez del amino terminal. Por otro lado, podría elegirse otra proteína de la subunidad grande del ribosoma para realizar la fusión, de tal manera que el ribosoma formado por dicha proteína fuera funcional y se asociara a polisomas.

Una alternativa para definir el mecanismo molecular mediante el que *tiar-1* protege a las células germinales del choque de calor sería el identificar los mRNAs a los que se une TIAR-1 durante este tipo de estrés. Esto sería posible mediante la técnica de co-inmunoprecipitación y posterior secuenciación de los mRNAs unidos a TIAR-1.

12 REFERENCIAS

- Altun, Z. F., and D. H. Hall, 2009. Worm Atlas. Wormatlas. www.wormatlas.org consultado por última vez en Abril de 2016.
- Anderson, P., and N. Kedersha, 2009. RNA granules: post-transcriptional and epigenetic modulators of gene expression. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10: 430–436.
- Anderson, P., and N. Kedersha, 2002. Visibly stressed: the role of eIF2, TIA-1, and stress granules in protein translation. *Cell Stress Chaperones* 7: 213–21.
- Aznarez, I., Y. Barash, O. Shai, D. He, J. Zielenski *et al.*, 2008. A systematic analysis of intronic sequences downstream of 5' splice sites reveals a widespread role for U-rich motifs and TIA1/TIAL1 proteins in alternative splicing regulation. *Genome Res.* 18: 1247–58.
- Beck, A. R. P., I. J. Miller, P. Anderson, and M. Streuli, 1998. RNA-binding protein TIAR is essential for primordial germ cell development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95: 2331–6.
- Bezares-Calderón, L. A., A. Becerra, L. S. Salinas, E. Maldonado, and R. E. Navarro, 2010. Bioinformatic analysis of P granule-related proteins: insights into germ granule evolution in nematodes. *Dev. Genes Evol.* 220: 41–52.
- Bley, N., M. Lederer, B. Pfalz, C. Reinke, T. Fuchs *et al.*, 2014. Stress granules are dispensable for mRNA stabilization during cellular stress (F. Mac Gabhann, Ed.). *Nucleic Acids Res.* 43: e26–e26.
- Boag, P. R., A. Atalay, S. Robida, V. Reinke, and T. K. Blackwell, 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.
- Boag, P. R., A. Nakamura, and T. K. Blackwell, 2005. A conserved RNA-protein complex component involved in physiological germline apoptosis regulation in *C. elegans*. *Development* 132: 4975–86.
- Brand, S., and H. M. Bourbon, 1993. The developmentally-regulated Drosophila gene rox8 encodes an RRM-type RNA binding protein structurally related to human TIA-1-type nucleolysins. *Nucleic Acids Res.* 21: 3699–704.
- Brenner, S., 1974. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77: 71–94.
- Buchan, J. R., D. Muhlrud, and R. Parker, 2008. P bodies promote stress granule assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 183: 441–455.
- Buchan, J. R., and R. Parker, 2009. Eukaryotic Stress Granules: The Ins and Outs of Translation. *Mol. Cell* 36: 932–941.
- Cheeseman, I. M., and A. Desai, 2005. A combined approach for the localization and tandem affinity purification of protein complexes from metazoans. *Sci. STKE* 2005: p11.
- Ciosk, R., M. DePalma, and J. R. Priess, 2006. Translational regulators maintain totipotency in the *Caenorhabditis elegans* germline. *Science* 311: 851–3.

- Crittenden, S. L., C. R. Eckmann, L. Wang, D. S. Bernstein, M. Wickens *et al.*, 2003. Regulation of the mitosis/meiosis decision in the *Caenorhabditis elegans* germline. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 358: 1359–62.
- Damgaard, C. K., and J. Lykke-Andersen, 2011. Translational coregulation of 5' TOP mRNAs by TIA-1 and TIAR. *Genes Dev.* 25: 2057–2068.
- Dember, L. M., N. D. Kim, K. Q. Liu, and P. Anderson, 1996. Individual RNA recognition motifs of TIA-1 and TIAR have different RNA binding specificities. *J. Biol. Chem.* 271: 2783–2788.
- Dickinson, D. J., J. D. Ward, D. J. Reiner, and B. Goldstein, 2013. Engineering the *Caenorhabditis elegans* Genome Using Cas9- Triggered Homologous Recombination. *Nat. Methods* 10: 1028–1034.
- Edgley, M. L., D. L. Baillie, D. L. Riddle, and A. M. Rose, 2006. Genetic balancers. (The *C. elegans* Research Community, Ed.). *WormBook* 1–32.
- Ellis, R., and T. Schedl, 2007. Sex determination in the germ line. *WormBook* 1–13. www.wormbook.org consultado por última vez en Abril de 2016.
- Félix, M.-A., and C. Braendle, 2010. The natural history of *Caenorhabditis elegans*. *Curr. Biol.* 20: R965–R969.
- Friedland, A. E., Y. B. Tzur, K. M. Esvelt, M. P. Colaiácovo, G. M. Church *et al.*, 2013. Heritable genome editing in *C. elegans* via a CRISPR-Cas9 system. *Nat. Methods* 10: 741–3.
- Frøkjær-Jensen, C., M. W. Davis, M. Ailion, and E. M. Jorgensen, 2012. Improved Mos1-mediated transgenesis in *C. elegans*. *Nat. Methods* 9: 117–118.
- Frøkjær-Jensen, C., M. W. Davis, C. E. Hopkins, B. J. Newman, J. M. Thummel *et al.*, 2008. Single-copy insertion of transgenes in *Caenorhabditis elegans*. *Nat. Genet.* 40: 1375–83.
- Gao, M., and A. L. Arkov, 2013. Next generation organelles: Structure and role of germ granules in the germline. *Mol. Reprod. Dev.* 80: 610–623.
- Gibson, D. G., L. Young, R. Chuang, J. C. Venter, C. a Hutchison *et al.*, 2009. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat. Methods* 6: 343–5.
- Gilks, N., N. Kedersha, M. Ayodele, L. Shen, G. Stoecklin *et al.*, 2004. Stress Granule Assembly Is Mediated by Prion-like Aggregation of TIA-1. *Mol. Biol. Cell* 15: 5383–5398.
- Glisovic, T., J. L. Bachorik, J. Yong, and G. Dreyfuss, 2008. RNA-binding proteins and post-transcriptional gene regulation. *FEBS Lett.* 582: 1977–1986.
- Goetze, B., F. Tuebing, Y. Xie, M. M. Dorostkar, S. Thomas *et al.*, 2006. The brain-specific double-stranded RNA-binding protein Stauf2 is required for dendritic spine morphogenesis. *J. Cell Biol.* 172: 221–231.
- Grant, B., and D. Hirsh, 1999. Receptor-mediated endocytosis in the *Caenorhabditis elegans* oocyte. *Mol. Biol. Cell* 10: 4311–4326.
- Güven-Ozkan, T., Y. Nishi, S. M. Robertson, and R. Lin, 2008. Global Transcriptional Repression in *C. elegans* Germline Precursors by Regulated Sequestration of TAF-4. *Cell* 135: 149–160.

- Han, T. W., M. Kato, S. Xie, L. C. Wu, H. Mirzaei *et al.*, 2012. Cell-free formation of RNA granules: Bound RNAs identify features and components of cellular assemblies. *Cell* 149: 768–779.
- Heiman, M., R. Kulicke, R. J. Fenster, P. Greengard, and N. Heintz, 2014. Cell type-specific mRNA purification by translating ribosome affinity purification (TRAP). *Nat. Protoc.* 9: 1282–91.
- Heiman, M., A. Schaefer, S. Gong, J. D. Peterson, M. Day *et al.*, 2008. Development of a BACarray translational profiling approach for the molecular characterization of CNS cell types. *Cell* 135: 738–48.
- Hochbaum, D., A. Ferguson, and A. L. Fisher, 2010. Generation of transgenic *C. elegans* by biolistic transformation. *J. Vis. Exp.* 1–5.
- Hubstenberger, A., C. Cameron, S. L. Noble, S. Keenan, and T. C. Evans, 2015. Modifiers of solid RNP granules control normal RNP dynamics and mRNA activity in early development. *J. Cell Biol.* 211: 703–716.
- Hubstenberger, A., S. L. Noble, C. Cameron, and T. C. Evans, 2013. Translation repressors, an RNA helicase, and developmental cues control RNP phase transitions during early development. *Dev. Cell* 27: 161–73.
- Hüttelmaier, S., D. Zenklusen, M. Lederer, and J. Dichtenberg, 2005. Spatial regulation of [beta]-actin translation by Src-dependent phosphorylation of ZBP1 : Abstract : Nature. *Nature*.
- Ivanov, P. A., and E. S. Nadezhkina, 2006. Stress granules: RNP-containing cytoplasmic bodies springing up under stress. The structure and mechanism of organization. *Mol. Biol. (Mosk).* 40: 937–944.
- Izquierdo, J. M., J. Alcalde, I. Carrascoso, R. Reyes, and M. D. Ludeña, 2011. Knockdown of T-cell intracellular antigens triggers cell proliferation, invasion and tumour growth. *Biochem. J.* 435: 337–44.
- Jud, M. C., M. J. Czerwinski, M. P. Wood, R. A. Young, C. M. Gallo *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.
- Kadyk, L. C., and J. Kimble, 1998. Genetic regulation of entry into meiosis in *Caenorhabditis elegans*. *Development* 125: 1803–13.
- Kawakami, a, Q. Tian, X. Duan, M. Streuli, S. F. Schlossman *et al.*, 1992. Identification and functional characterization of a TIA-1-related nucleolysin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89: 8681–5.
- Kawasaki, I., Y. H. Shim, J. Kirchner, J. Kaminker, W. B. Wood *et al.*, 1998. PGL-1, a predicted RNA-binding component of germ granules, is essential for fertility in *C. elegans*. *Cell* 94: 635–645.
- Kedersha, N., S. Chen, N. Gilks, W. Li, I. J. Miller *et al.*, 2002. Evidence that ternary complex (eIF2-GTP-tRNA(i)(Met))-deficient preinitiation complexes are core constituents of mammalian stress granules. *Mol. Biol. Cell* 13: 195–210.
- Kedersha, N., M. R. Cho, W. Li, P. W. Yacono, S. Chen *et al.*, 2000. Dynamic shuttling of TIA-1 accompanies the recruitment of mRNA to mammalian stress granules. *J. Cell Biol.* 151: 1257–1268.
- Kedersha, N. L., M. Gupta, W. Li, I. Miller, and P. Anderson, 1999. RNA-binding proteins TIA-1 and TIAR link the phosphorylation of eIF-2 alpha to the assembly of mammalian stress granules. *J. Cell Biol.* 147: 1431–42.

- Kedersha, N., P. A. Ivanov, and P. Anderson, 2013. Stress granules and cell signaling: More than just a passing phase? *Trends Biochem. Sci.* 38: 494–506.
- Kharraz, Y., P.-A. Salmand, A. Camus, J. Auriol, C. Gueydan *et al.*, 2010. Impaired embryonic development in mice overexpressing the RNA-binding protein TIAR. *PLoS One* 5: e11352.
- Kiebler, M. A., and G. J. Bassell, 2006. Neuronal RNA granules: movers and makers. *Neuron* 51: 685–90.
- Kim, S., C. Spike, and D. Greenstein, 2013. Control of oocyte growth and meiotic maturation in *Caenorhabditis elegans*. *Adv. Exp. Med. Biol.* 757: 277–320.
- Kimble, J., 1981. Alterations in cell lineage following laser ablation of cells in the somatic gonad of *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* 87: 286–300.
- Kimble, J., and S. L. Crittenden, 2005. Germline proliferation and its control. *WormBook* 1–14. www.wormbook.org consultado por última vez en Abril de 2016.
- L'Hernault, S. W., D. C. Shakes, and S. Ward, 1988. Developmental genetics of chromosome I spermatogenesis-defective mutants in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 120: 435–452.
- Lee, M.-H., and T. Schedl, 2006 RNA-binding proteins. *WormBook* 1–13.
- Lehmann, R., and C. Nüsslein-Volhard, 1986. Abdominal segmentation, pole cell formation, and embryonic polarity require the localized activity of oskar, a maternal gene in *Drosophila*. *Cell* 47: 141–152.
- Mazroui, R., M.-E. Huot, S. Tremblay, C. Filion, Y. Labelle *et al.*, 2002. Trapping of messenger RNA by Fragile X Mental Retardation protein into cytoplasmic granules induces translation repression. *Hum. Mol. Genet.* 11: 3007–3017.
- Mendenhall, A. R., M. G. LeBlanc, D. P. Mohan, and P. a Padilla, 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.
- Merritt, C., D. Rasoloson, D. Ko, and G. Seydoux, 2008. 3' UTRs Are the Primary Regulators of Gene Expression in the *C. elegans* Germline. *Curr. Biol.* 18: 1476–1482.
- Miller, M. A., P. J. Ruest, M. Kosinski, S. K. Hanks, and D. Greenstein, 2003. An Eph receptor sperm-sensing control mechanism for oocyte meiotic maturation in *Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev.* 17: 187–200.
- Navarro, R. E., E. Y. Shim, Y. Kohara, A. Singson, and T. K. Blackwell, 2001. *cgh-1*, a conserved predicted RNA helicase required for gametogenesis and protection from physiological germline apoptosis in *C. elegans*. *Development* 128: 3221–3232.
- Noble, S. L., B. L. Allen, L. K. Goh, K. Nordick, and T. C. Evans, 2008. Maternal mRNAs are regulated by diverse P body-related mRNP granules during early *Caenorhabditis elegans* development. *J. Cell Biol.* 182: 559–72.
- Ohn, T., N. Kedersha, T. Hickman, S. Tisdale, and P. Anderson, 2008. A functional RNAi screen links O-GlcNAc modification of ribosomal proteins to stress granule and processing body assembly. *Nat. Cell Biol.* 10: 1224–1231.

- Olszewska, M., J. J. Bujarski, and M. Kurpisz, 2012. P-bodies and their functions during mRNA cell cycle: Mini-review. *Cell Biochem. Funct.* 30: 177–182.
- Panas, M. D., N. Kedersha, and G. M. McInerney, 2015. Methods for the characterization of stress granules in virus infected cells. *Methods*.
- Parker, R., and U. Sheth, 2007. P Bodies and the Control of mRNA Translation and Degradation. *Mol. Cell* 25: 635–646.
- Pieczyk, M., S. Wax, A. R. P. Beck, N. Kedersha, M. Gupta *et al.*, 2000. TIA-1 is a translational silencer that selectively regulates the expression of TNF-alpha. *EMBO J.* 19: 4154–63.
- Pitt, J. N., J. a Schisa, and J. R. Priess, 2000. P Granules in the Germ Cells of *Caenorhabditis elegans* Adults Are Associated with Clusters of Nuclear Pores and Contain RNA. *Dev. Biol.* 219: 315–333.
- Prusiner, S. B., 1998. Prions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 13363.
- Racher, H., and D. Hansen, 2010. Translational control in the *C. elegans* hermaphrodite germ line. *Genome* 53: 83–102.
- Rea, S. L., D. Wu, J. R. Cypser, J. W. Vaupel, and T. E. Johnson, 2005. A stress-sensitive reporter predicts longevity in isogenic populations of *Caenorhabditis elegans*. *Nat. Genet.* 37: 894–8.
- Rongo, C., and R. Lehmann, 1996. Regulated synthesis, transport and assembly of the Drosophila germ plasm. *Trends Genet.* 12: 102–109.
- Rousakis, A., A. Vlanti, F. Borbolis, F. Roumelioti, M. Kapetanou *et al.*, 2014. Diverse functions of mRNA metabolism factors in stress defense and aging of *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One* 9: e103365.
- Sando, R., K. Baumgaertel, S. Pieraut, N. Torabi-Rander, T. J. Wandless *et al.*, 2013. Inducible control of gene expression with destabilized Cre. *Nat. Methods* 10: 1085–8.
- Schaner, C. E., G. Deshpande, P. D. Schedl, and W. G. Kelly, 2003. A conserved chromatin architecture marks and maintains the restricted germ cell lineage in worms and flies. *Dev. Cell* 5: 747–757.
- Schedl, T., and J. Kimble, 1988. *fog-2*, a germ-line-specific sex determination gene required for hermaphrodite spermatogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 119: 43–61.
- Schisa, J. A., 2014. Effects of stress and aging on ribonucleoprotein assembly and function in the germ line. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* 5: 231–246.
- Schisa, J. A., J. N. Pitt, and J. R. Priess, 2001. Analysis of RNA associated with P granules in germ cells of *C. elegans* adults. *Development* 128: 1287–1298.
- Seydoux, G., C. C. Mello, J. Pettitt, W. B. Wood, J. R. Priess *et al.*, 1996. Repression of gene expression in the embryonic germ lineage of *C. elegans*. *Nature* 382: 713–716.
- Sheth, U., and R. Parker, 2003. Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies. *Science* 300: 805–8.
- Sheth, U., J. Pitt, S. Dennis, and J. R. Priess, 2010. Perinuclear P granules are the principal sites of mRNA export in adult *C. elegans* germ cells. *Development* 137: 1305–14.

- Shirayama, M., W. Stanney, W. Gu, M. Seth, and C. C. Mello, 2014. The Vasa homolog RDE-12 engages target mRNA and multiple argonaute proteins to promote RNAi in *C. elegans*. *Curr. Biol.* 24: 845–851.
- Silva-García, C. G., and R. E. Navarro, 2013. The *C. elegans* TIA-1/TIAR homolog TIAR-1 is required to induce germ cell apoptosis. *Genesis* 51: 690–707.
- Spike, C. A., D. Coetzee, Y. Nishi, T. Guven-Ozkan, M. Oldenbroek *et al.*, 2014. Translational Control of the Oogenic Program by Components of OMA Ribonucleoprotein Particles in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 198: 1513–1533.
- Stoecklin, G., T. Stubbs, N. Kedersha, S. Wax, W. F. C. Rigby *et al.*, 2004. MK2-induced tristetraprolin:14-3-3 complexes prevent stress granule association and ARE-mRNA decay. *EMBO J.* 23: 1313–24.
- Strome, S., 2005. Specification of the germ line. *WormBook* 1–10. www.wormbook.org consultado por última vez en Abril de 2016.
- Sun, A. Y., and E. J. Lambie, 1997. *gon-2*, a gene required for gonadogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 147: 1077–1089.
- Sun, Y., P. Yang, Y. Zhang, X. Bao, J. Li *et al.*, 2011. A genome-wide RNAi screen identifies genes regulating the formation of P bodies in *C. elegans* and their functions in NMD and RNAi. *Protein Cell* 2: 918–939.
- Teixeira, D., U. Sheth, M. a Valencia-Sanchez, M. Brengues, and R. Parker, 2005. Processing bodies require RNA for assembly and contain nontranslating mRNAs. *RNA* 11: 371–382.
- The *C. elegans* Deletion Mutant Consortium, 2012. Large-Scale Screening for Targeted Knockouts in the *Caenorhabditis elegans* Genome. *G3* 2: 1415–1425.
- The *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998. Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science* 282: 2012–2018.
- Tian, Q., M. Streuli, H. Saito, S. F. Schlossman, and P. Anderson, 1991. A polyadenylate binding protein localized to the granules of cytolytic lymphocytes induces DNA fragmentation in target cells. *Cell* 67: 629–639.
- Tourriere, H., 2003. The RasGAP-associated endoribonuclease G3BP assembles stress granules. *J. Cell Biol.* 160: 823–831.
- Tryon, R. C., N. Pisat, S. L. Johnson, and J. D. Dougherty, 2013. Development of translating ribosome affinity purification for zebrafish. *Genesis* 51: 187–192.
- Ulbricht, R., and W. Olivas, 2008. Puf1p acts in combination with other yeast Puf proteins to control mRNA stability. *Rna* 246–262.
- Voronina, E., G. Seydoux, P. Sassone-Corsi, and I. Nagamori, 2011. RNA Granules in Germ Cells. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*
- Wang, J. T., and G. Seydoux, 2014. P granules. *Curr. Biol.* 24: R637–8.
- Waris, S., M. C. J. Wilce, and J. Wilce, 2014. RNA Recognition and Stress Granule Formation by TIA Proteins. *Int. J. Mol. Sci.* 15: 23377–23388.

- Winnier, A. R., J. Y. J. Meir, J. M. Ross, N. Tavernarakis, M. Driscoll *et al.*, 1999. UNC-4/UNC-37-dependent repression of motor neuron-specific genes controls synaptic choice in *Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev.* 13: 2774–2786.
- Yoneda, T., C. Benedetti, F. Urano, S. G. Clark, H. P. Harding *et al.*, 2004. Compartment-specific perturbation of protein handling activates genes encoding mitochondrial chaperones. *J. Cell Sci.* 117: 4055–4066.
- Zhu, H., R. A. Hasman, K. M. Young, N. L. Kedersha, and H. Lou, 2003. U1 snRNP-dependent function of TIAR in the regulation of alternative RNA processing of the human calcitonin/CGRP pre-mRNA. *Mol. Cell. Biol.* 23: 5959.

13 SUPLEMENTO

Tabla S 1. Oligos usados para generar la cepa *rpl-1::gfp* mediante MosSCI

Nombre	Secuencia	Propósito	
032	ccaagaatcctggaaaagca	Templado de DNA genómico para <i>Pmex-5</i>	
033	tttgaggatgtgacgactgc		
034	ttgaacgttatccacttgctg	Templado de DNA genómico para <i>rpl-1</i>	
035	tccgacatctgaaagtgacg		
036	atagcttggcgtaatcatg	Fusión de <i>rpl-1a</i> con GFP Reacción de Gibson	
043	ataattcactggccgctg		
037	ccatgattacgccaagctatatctgcaagaaaatacatttctg		
038	cttactcattctctgtctgaaacattcaattg		
039	ccaagaatcctggaaaagca		
040	tttgaggatgtgacgactgc		
041	aggtggaggttcgaaggttcccgcgag		
042	aacgacggccagtgattataatcaaatcaacaatgtttattgaataac aaagtaattaataaac		
029	gagtgagctctctattcc		Secuenciación del inserto
030	caccaagtccaatcc		
031	gagttagttgagcggtttctctag		

Tabla S 2. Oligos usados para generar las cepas mediante CRISPR-Cas9

Nombre	Secuencia	Propósito
001 Nest upstream fow	ggacgcttttggctacttg	Templado de DNA genómico para <i>tiar-1</i>
002 Nest upstream rev	accgtttccgagatgaaatc	
003 Nest orf+UTR fow	tcccgcaactgtttttattgg	
004 Nest orf+UTR rev	aacctcaacccccagaaatg	
005 Nest downstream fow	ttttgcaatggcactattc	
007 Del BlueS rev	ATCGATACCGTTCGACCTC	Delección de <i>tiar-1</i> Reacción de Gibson
008 Del <i>tiar</i> upstATG fow	ggtcgacggtatcgaTTAAGAAGACCAGCAGC G	
009 Del <i>tiar</i> upstATG rev	acgaagttatGGCTTAAATGATAGATCCCTG	
010 Del unc-119 fow	atttaagccataacttcgtatagcatacattatacgaagttatCTA GAATCCTATGCTTGCAC	
011 Del unc-119 rev	acgaagttatTTATGCATCATATGAGTAGTCG	
012 Del <i>tiar-1</i> downs fow	gatgcataaataacttcgtataatgtatgctatacgaagttatATT GAGTTCGAAAATGTTTATTTCCATTTCC	
013 Del <i>tiar-1</i> downs rev	ctagaactagtggatccCGCCGGTAGGTTTCTAG C	
014 Del BlueS fow	GGATCCACTAGTTCTAGAGC	
015 Ins BlueS rev	ATCGATACCGTTCGACCTC	Fusión de <i>tiar-1</i> con GFP Reacción de Gibson
016 Ins <i>tiar</i> orf fow	tcgaggtcgacggtatcgaATGTCCTTCTTCAACC CAC	
017 Ins <i>tiar</i> orf rev	tctcctttctTTGATGTCCTCCAGAGTTC	
018 Ins <i>gfp</i> fow	aggacatcaaAGAAAGGAGACAGCTGCAG	
019 Ins <i>gfp</i> rev	atactggagtCTATTTGTATAGTTCATCCATG CC	
020 Ins <i>tiar</i> 3'utr fow	atacaaatagACTCCAGTATTTTTTAAAAACA TTTTATATG	

021 Ins tiar 3'utr rev	tacgaagttatAAGACTTTACCCTCGCATTAT TATTG	
022 Ins unc-119 fow	gtaaagtcttataacttcgtagcatatacattatacgaagttatCT AGAATCCTATGCTTGAC	
023 Ins unc-119 rev	tacgaagttatTTATGCATCATATGAGTAGTC G	
024 Ins tiar downs fow	TGATGCATAAataacttcgtagcatatacattatacgaag ttatattgagttcgaaaatgttatttc	
025 Ins tiar downs rev	gctctagaactagtggatccCGCCGGTAGGTTTCT AGC	
026 Ins BlueS fow	GGATCCACTAGTTCTAGAGC	
048 sgRNA 2 tiar-1 fow	gccgtactcGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAA G	sgRNA <i>tiar-1</i>
049 sgRNA 2 tiar-1 rev	tgtgagttcCAAGACATCTCGCAATAGG	

Tabla S 3. Oligos usados para identificar a los animales mutantes *tiar-1(tn1543)*

Nombre	Secuencia	Tamaño del fragmento amplificado
053 unc-119 fow	CATCCCAATCCATCATTTCC	Silvestre: ninguno
006 Nest downstream rev	cgtgggtacagtatgccttg	<i>tn1543</i> : 2248 pb

13 PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

The Stress Granule RNA-Binding Protein TIAR-1 Protects Female Germ Cells from Heat Shock in *Caenorhabditis elegans*

Gabriela Huelgas-Morales,* Carlos Giovanni Silva-García,*¹ Laura S. Salinas,* David Greenstein,^{†,2} and Rosa E. Navarro*²

*Departamento de Biología Celular y Desarrollo, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México. Circuito Exterior s/n., Ciudad Universitaria, Ciudad de México 04510, Mexico and [†]Department of Genetics, Cell Biology and Development, University of Minnesota Minneapolis, 55455 Minnesota

ORCID IDs: 0000-0001-8189-2087 (D.G.); 0000-0003-4992-4450 (R.E.N.)

ABSTRACT In response to stressful conditions, eukaryotic cells launch an arsenal of regulatory programs to protect the proteome. One major protective response involves the arrest of protein translation and the formation of stress granules, cytoplasmic ribonucleoprotein complexes containing the conserved RNA-binding proteins TIA-1 and TIAR. The stress granule response is thought to preserve mRNA for translation when conditions improve. For cells of the germline—the immortal cell lineage required for sexual reproduction—protection from stress is critically important for perpetuation of the species, yet how stress granule regulatory mechanisms are deployed in animal reproduction is incompletely understood. Here, we show that the stress granule protein TIAR-1 protects the *Caenorhabditis elegans* germline from the adverse effects of heat shock. Animals containing strong loss-of-function mutations in *tiar-1* exhibit significantly reduced fertility compared to the wild type following heat shock. Analysis of a heat-shock protein promoter indicates that *tiar-1* mutants display an impaired heat-shock response. We observed that TIAR-1 was associated with granules in the gonad core and oocytes during several stressful conditions. Both gonad core and oocyte granules are dynamic structures that depend on translation; protein synthesis inhibitors altered their formation. Nonetheless, *tiar-1* was required for the formation of gonad core granules only. Interestingly, the gonad core granules did not seem to be needed for the germ cells to develop viable embryos after heat shock. This suggests that TIAR-1 is able to protect the germline from heat stress independently of these structures.

KEYWORDS

stress granules
TIA-1/TIAR
germ cells
stress
C. elegans

When exposed to stress, cells undertake a series of adaptive responses to ensure survival. Among these responses are the reprogramming of gene

expression, which involves a global arrest in translation, and the formation of ribonucleoprotein complexes (RNPs). In stressful conditions, total protein synthesis decreases, but proteins needed to contend with stress continue to be translated (Arribere *et al.* 2011). Among the RNPs that form under stress are stress granules and processing bodies (P bodies) (Kedersha *et al.* 2005; Wilczynska *et al.* 2005). P bodies are thought to constitute sites of messenger RNA (mRNA) degradation, as they contain components of the 5'-to-3' mRNA decay machinery. Although P bodies are detected in normal conditions, they increase in size and number under stressful conditions (Wilczynska *et al.* 2005). Stress granules contain stalled translation initiation complexes, and have been proposed as sites where untranslated mRNAs are temporally stored (reviewed in Anderson and Kedersha 2008). After normal conditions are restored, stress granules dissociate, and mRNA translation continues (Kedersha *et al.* 2000).

The T-cell-restricted intracellular antigen proteins (TIA-1/TIAR) are central players in stress granule formation, structure, and function (Kedersha *et al.* 2000; reviewed in Anderson and Kedersha 2008). The

Copyright © 2016 Huelgas-Morales *et al.*

doi: 10.1534/g3.115.026815

Manuscript received December 29, 2015; accepted for publication February 7, 2016; published Early Online February 9, 2016.

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Supplemental Material is available online at www.g3journal.org/lookup/suppl/doi:10.1534/g3.115.026815/-/DC1

¹Current address: Escuela de Medicina, Universidad Panamericana, Ciudad de México, Mexico.

²Corresponding authors: Department of Genetics, Cell Biology, and Development, University of Minnesota, 4-208 MCB, 420 Washington Avenue, SE, Minneapolis, MN 55455. E-mail: green959@umn.edu; and Circuito Exterior s/n., Departamento de Biología Celular y Desarrollo, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad Universitaria, Ciudad de México 04510, Mexico. E-mail: mavarro@ifc.unam.mx

three RNA recognition motifs (RRM) of TIA-1/TIAR proteins enable them to selectively bind to RNA, and their prion-like domain allows them to reversibly aggregate to form stress granules (Gilks *et al.* 2004; Kumar *et al.* 2008). Overexpression of the TIA-1 prion domain is sufficient to induce the formation of stress granules (Kedersha *et al.* 1999). Additional roles of TIA-1/TIAR proteins in regulating mRNA splicing and translation have been described (Förch *et al.* 2000; Dixon *et al.* 2003; Izquierdo *et al.* 2005; Waris *et al.* 2014). Embryonic and germ cell development are compromised in the absence or overexpression of *Tia-1* and *Tiar* in mice (Beck *et al.* 1998; Piecyk *et al.* 2000; Kharraz *et al.* 2010).

The germline of the nematode *Caenorhabditis elegans* provides a strong model system for analyzing translational regulation and other aspects of RNA biology (reviewed by Nusch and Eckmann 2013; Billi *et al.* 2014). *C. elegans* has three TIA-1/TIAR homologs: *tiar-1*, -2, and -3 (WormBase release WS204). Among the three homologs, *tiar-1* is uniquely required for the induction of germ cell apoptosis under several stressful conditions (Silva-García and Navarro 2013). *tiar-1* mutant animals exhibit reduced longevity and small brood sizes and are hypersensitive to oxidative and UV stress (Silva-García and Navarro 2013; Rousakis *et al.* 2014). Additionally, TIAR-1 and -2 localize to germline-specific P granules in normal conditions (Jud *et al.* 2008; Silva-García and Navarro 2013) and to stress-induced granules in somatic tissues (Sun *et al.* 2011; Rousakis *et al.* 2014). However, the potential roles of TIA-1/TIAR-related proteins in protecting germ cells from stress are incompletely understood.

In this work, we investigated the function of TIAR-1 in *C. elegans* germline development under normal conditions and conditions of stress. We found that animals lacking *tiar-1* displayed chromosome nondisjunction during oogenesis under normal developmental conditions, resulting in infertility and embryonic lethality. When transiently exposed to a heat shock, early embryos stored in the uteri of the wild type and *tiar-1* null mutant adult hermaphrodites both exhibited a significant reduction in viability. However, embryonic lethality after heat shock was higher in *tiar-1* mutant animals than in the wild type. Remarkably, wild-type animals were able to recover completely from heat shock, such that their germ cells could produce primarily viable embryos. Conversely, *tiar-1* mutant animals continued to produce inviable embryos at an increased frequency, suggesting that *tiar-1* protects germ cells from heat-induced damage. The protective function of TIAR-1 correlated with its relocalization to cytoplasmic granules in the gonad following several stresses, including heat shock, starvation, and the inhibition of protein synthesis. We classified these stress-induced TIAR-1-containing granules into two groups based on their localization and formation dynamics, the first localized to the gonad core and the second to oocytes. The stress-induced TIAR-1-containing granules in both the gonad core and oocytes contained the CGH-1 DEAD-box helicase, which functions to regulate RNP dynamics (Hubstenberger *et al.* 2013, 2015). Gonad core and oocyte stress-induced granules displayed the following properties: they 1) dissolved upon restoration of normal conditions; 2) aggregated in the presence of puromycin, an enhancer of translational termination, even in the absence of environmental stress; and 3) dissolved in the presence of the polysome stabilizer cycloheximide. Nonetheless, *tiar-1* was required for the formation of granules in the gonad core but not in the oocytes. Gonad core granules did not seem to be needed for the germ cells to produce viable embryos after heat shock.

MATERIALS AND METHODS

Strains

C. elegans strains were maintained at 20° on NGM-Lite and fed with the *Escherichia coli* strain OP50-1 (Brenner 1974; Sun and Lambie 1997).

The following mutations were used: LGII-*tiar-1(tm361)*, *tiar-1(tn1543)*, *tiar-1(tn1545[tiar-1::s::tev:gfp])*, *unc-4(e120)*, *tra-2(q276)*, and *tiar-2(tm2923)*; LGIII-*unc-119(ed3)*; LGV-*fog-2(q71)*; and LGX-*tiar-3(ok144)*. The *gpl1[Phsp-16.2:gfp]* heat-shock reporter was also used. The following rearrangements were used: *mIn1[dpy-10(e128) mIs14] II* and *mnC1 dpy-10(e128) unc-52(e444) II*. *tiar-2(tm2923)* and *tiar-3(ok144)* mutations were confirmed by PCR and DNA sequencing. RN077 *tiar-1(tm361) xmSi02[Ptia-1::tiar-1::gfp::tiar-1 3utr; Cbr-unc-119(+)] II* was constructed using single-copy insertion methodology (Frøkjær-Jensen *et al.* 2008, 2012). Details of strain constructions are available upon request. The complete list of strains used in this study, and their genotypes, are reported in Supplemental Material, Table S1.

To link the genetic marker *unc-4(e120)* to the *tiar-1(tm361)* allele, we crossed *tiar-1(tm361) xmSi02 [Ptia-1::tiar-1::gfp::tiar-1 3utr; Cbr-unc-119(+)] II* males to *unc-4(e120) vab-1(dx31)* hermaphrodites. NonUnc, nonVab, and GFP-positive progeny were selected. Among the F2 generation, Unc, nonVab, and GFP-negative recombinant animals were selected. Finally, the lines carrying the *tiar-1(tm361)* allele were identified by PCR.

Generation of *tiar-1* alleles

CRISPR-Cas9 genome editing (Dickinson *et al.* 2013; Friedland *et al.* 2013) was used to generate the *tiar-1(tn1543)* deletion allele and the *tiar-1(tn1545[tiar-1::s::tev:gfp])* allele, which results from the insertion of S::TEV::GFP at the TIAR-1 C-terminus. We targeted a specific site in the last exon of *tiar-1* with a single-guide RNA (sgRNA) to be cut by Cas9. The protospacer-associated motif (PAM) for this sgRNA is at position 5,713,045 in the genome. To generate the *tiar-1* sgRNA, annealed primers (see Table S2) were inserted into the *Peef-1A.1-3::Cas9* empty sgRNA vector (pDD162; Addgene #47549) as described (Dickinson *et al.* 2013). Gibson assembly (New England BioLabs) was used to generate the repair templates with the pBluescript KS- vector as a backbone. The repair template for *tiar-1* deletion consisted of a 5'-upstream *tiar-1* homology arm, the *C. briggsae unc-119(+)* gene flanked by *loxP* sites, and a 3'-downstream *tiar-1* homology arm. The repair template for the *s::tev:gfp* insert consisted of the *tiar-1* gene, the *s::tev:gfp* insert, the *tiar-1* 3'-untranslated region (UTR), the *C. briggsae unc-119(+)* gene flanked by *loxP* sites, and a 3'-downstream region as a homology arm. To alter the PAM site from TGGGA to TGCA in the repair template, site-directed mutagenesis was performed with the Q5 site-directed mutagenesis kit (New England BioLabs). To generate the mutants, the repair templates (10 ng/μl), the source of Cas9 (pDD162) containing the *tiar-1* sgRNA construct (50 ng/μl), pMA122 (10 ng/μl) (Addgene plasmid #34873), pCFJ104 (5 ng/μl) (Addgene plasmid #19328), pGH8 (10 ng/μl) (Addgene plasmid #19359), and pCFJ90 (2.5 ng/μl) (Addgene plasmid #19327) were microinjected into 60–80 young adult hermaphrodites from the strain HT1593 *unc-119(ed3)*. The hermaphrodites were recovered from the injection pads and cultured individually at 25° until starved cultures were produced. The plates were heat shocked at 34° for 3 hr, and the surviving nonUnc animals were isolated. One line for each one of the constructs was obtained. To remove the selectable marker, a mix of pDD104 (*eef-1A.1::Cre*; Addgene plasmid #47551; 50 ng/μl) and pCFJ90 (2.5 ng/μl) was microinjected into young adult hermaphrodites from both lines. For the *tiar-1::s::tev:gfp* strain, Unc animals were selected from the progeny. The selectable *C. briggsae unc-119* marker was removed from the strain, leaving the *gfp* Tag in frame with *tiar-1* coding sequences, followed by its 3'-UTR and one *loxP* scar. The resulting allele was confirmed by PCR and sequencing. We were unable to excise the *C. briggsae unc-119(+)* marker for the *tiar-1* deletion allele, so it

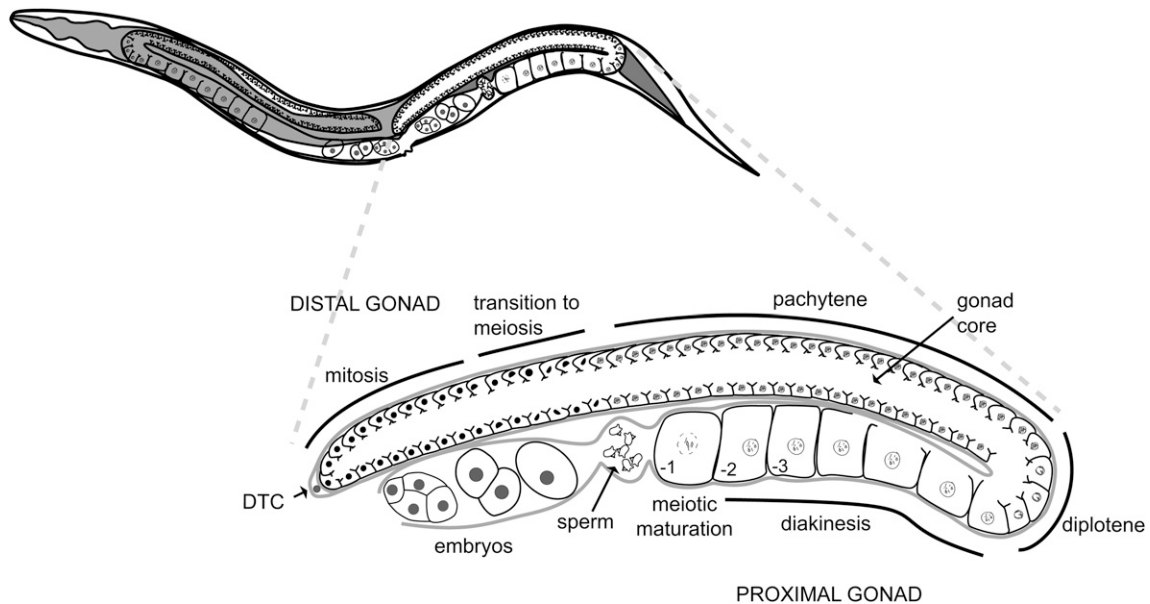


Figure 1 *C. elegans* adult hermaphrodite gonad. This model represents in detail the morphology of one of the two arms that compose the *C. elegans* adult hermaphrodite gonad. The upper picture represents a complete animal where the gonad and intestine (dark gray) are depicted. The bottom picture depicts one arm of the gonad zoomed in. Distal tip cell (DTC).

remained in the *tiar-1* locus. Sequencing data indicates that the selectable *C. briggsae unc-119(+)* marker is placed in the *tiar-1* genetic locus, and *tiar-1* coding sequences were not detected by PCR. The resulting strains were outcrossed with N2 three times.

The plasmids used were a gift from Arshad Desai, Bob Goldstein, and Erik Jorgensen (Cheeseman and Desai 2005; Frøkjær-Jensen *et al.* 2008, 2012; Sando *et al.* 2013).

Stress

Animals were grown at 20° or 24° on NGM-lite plates with NGM-lite seeded with OP50-1 bacteria until they were 1-d-old adults. The population was separated into stressed and control groups. For starvation, the animals were transferred to M9 containing cholesterol (5 µg/ml) and kept at 20° for 4 hr. For the control, animals were transferred to M9 containing cholesterol and freshly grown OP50-1 (a 1/20 dilution of a culture with a 0.66 absorbance at 600 nm). For heat shock, the animals were transferred to seeded plates, which were then sealed with Parafilm, and put into a controlled temperature water bath at 31° for 3 hr. Control (no stress) group plates were kept in the incubator at 20°. For stress recovery, the animals were returned to NGM-lite plates seeded with OP50-1 at 20°.

For drug treatments, freshly prepared stock solutions were added to S medium (Hope 1999) to a final concentration of 30 mM cycloheximide (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), or 15 mM puromycin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). For experiments in which animals were fed in S medium, a 1/20 dilution of a bacterial culture having an absorbance at 600 nm of 0.66 was added. For starvation experiments, young adults were placed in S medium with (control), or without, OP50-1 and kept at 20° for 4 hr. For heat-shock experiments, young adults were cultured in S medium with OP50-1 and placed in the controlled temperature water bath at 31° for 3 hr, or kept at 20° (control).

Quantitation of embryonic lethality after stress

Hermaphrodites were grown at 20 or 24°. They were cloned individually to plates at the mid-L4 stage; 18–20 hr later the young adult

hermaphrodites were heat shocked at 31° for 3 hr in a controlled temperature water bath, or starved in M9 containing cholesterol (5 µg/ml) for 4 hr. Control groups were kept at the initial growth conditions. Immediately after the stress, animals were mounted without any anesthetic onto 2% agarose pads with M9 and observed under the microscope. The embryos in the uterus and the fully grown oocytes (-1 to -3) in each gonad arm of every hermaphrodite were counted. Then, animals were recovered on NGM-lite seeded plates at 20° and allowed to lay as many embryos as counted earlier, constituting group I. Since *tiar-1(0)* mutant hermaphrodites laid eggs more slowly than the wild type, *tiar-1(0)* mutant hermaphrodites were left on plates longer (usually 1–2 hr), until they laid a number of embryos corresponding to those counted prior to heat shock, plus those generated from fertilization of fully grown oocytes immediately thereafter. This allowed the group I embryos of both strains to be directly comparable. Afterward, the hermaphrodites from both strains were transferred to new plates and allowed to lay embryos for 12 hr, constituting group II. Once again, the hermaphrodites were transferred to new plates and allowed to lay embryos for another 24 hr, constituting group III. The embryonic lethality was determined as the percentage of embryos that did not hatch within 24 hr of being laid. In parallel, the embryonic lethality of hermaphrodites that were not heat shocked was scored as a nonstress control. Up to 30% of *tiar-1(tn1543)* and *tiar-1(tm361) unc-4(e120)* animals became strongly egg-laying defective (Egl) after heat shock, containing live hatchlings and dead embryos in their uterus. These Egl animals were censored from the study because it was not possible to accurately count embryos in the uterus once animals hatched internally and began consuming the parent.

Immunostaining

To visualize germline granules, immunostaining against CGH-1 was performed as previously reported (Navarro *et al.* 2001). Briefly the gonads of 1-d-old animals were dissected, freeze-cracked, fixed in cold methanol for 1 min, and then in 3.3% paraformaldehyde for 30 min. For coimmunostaining with anti-CGH-1 and anti-GFP, the samples

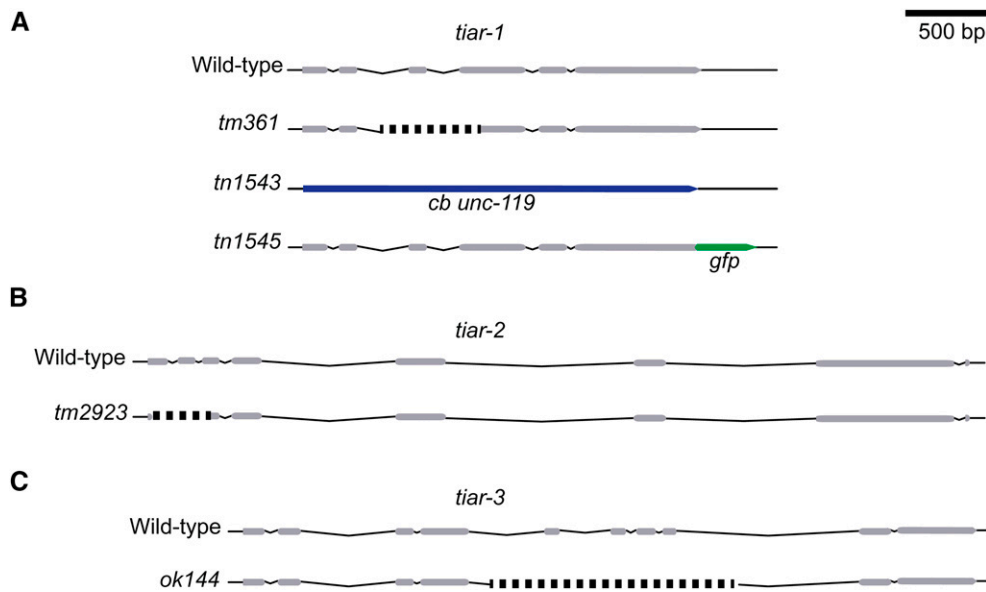


Figure 2 Alleles used to study the function of *tiar* genes in *C. elegans*. (A) The *tiar-1* wild-type allele comprises six exons (gray) and five introns (thin peaks). The *tiar-1(tm361)* allele is an out-of-frame deletion of 581 bp (dotted line). We generated a deletion and a GFP fusion allele using CRISPR-Cas9 genome editing. The strain *tiar-1(tn1543)* results from a deletion of the *tiar-1* open reading frame. In this strain, *tiar-1* sequences were replaced with the *C. briggsae unc-119* gene as a positive selection marker (blue). The strain *tiar-1(tn1545)* has an in-frame insertion of the tag S::TEV::GFP at the TIAR-1 C-terminus (green). (B) The *tiar-2* wild-type allele comprises eight exons and eight introns. The *tiar-2(tm2923)* is a deletion of 336 bp (dotted line). (C) The *tiar-3* wild-type allele comprises 10 exons and nine introns. The *tiar-3(ok144)* is a deletion of 1531 bp (dotted line).

were fixed for only 18 min. Then, the samples were blocked with 30% normal goat serum (NGS; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) in PBT for 30 min. Primary antibody incubation was performed overnight at 4° with rat anti-CGH-1 (1:25; Navarro *et al.* 2001). Coimmunostaining used rabbit anti-CGH-1 (1:1000; Boag *et al.* 2005) and mouse anti-GFP (1:5000; A11120 from Molecular Probes, Eugene, OR). Secondary antibody incubations were performed for 1.5 hr at room temperature with Cy3-conjugated donkey anti-rat IgG (1:100; H+L; 112165003, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA), or with Alexa Fluor 594-conjugated anti-rabbit IgG and Alexa Fluor 488-conjugated anti-mouse IgG (1:100; H+L; A11001, Molecular Probes, Eugene, OR). To detect DNA, 1 ng/μl 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) was used. Vectashield (Vector laboratories, Burlingame, CA) was added to avoid photo bleaching before sealing the sample.

Image acquisition and processing

The images of living animals, anesthetized with 0.01% tetramisole in M9, were acquired on a Nikon Eclipse E600 microscope equipped with an AxioCam MRC camera and Zeiss AxioVision software. The images of gonad granules were acquired on an Olympus FV10i confocal microscope with a 60x objective lens, NA = 1.2, a 1024 × 1024 size, 8x quality, and 2.0x confocal aperture. The images used to compare levels of GFP expression of the *Phsp-16.2::gfp* reporter transgene were taken with identical exposures.

Quantification of GFP fluorescence used Image J (1.50b, Wayne Rasband, National Institutes of Health). The whole area of each animal was selected, and then its integrated density was measured. The corrected total fluorescence was calculated as follows: Corrected Total Fluorescence (CTF) = integrated density – (selected area × mean fluorescence of three background readings).

Statistical analysis

Brood size, embryonic lethality, and GFP fluorescence data were tested for equality of group variance. One-way ANOVA tests were performed for those datasets that had the same group variance. For datasets with

unequal group variance, nonparametric multiple comparisons were performed using Dunn's method, with the wild-type value as a control (JMP v9, Statistical Discovery, SAS). The data obtained from the “embryonic lethality after stress” assay was fitted to a Least Squares model (JMP v9, Statistical Discovery, SAS). The response evaluated was “embryonic lethality.” Each one of the tested individuals was identified, and the “individual” variable was added to the model as a random effect. The model predicted that the variables “group,” “stress condition,” and “genotype” and the interaction of the three had a significant effect on embryonic lethality. Tukey HSD was calculated to evaluate Least Square Means differences. For all tests $P < 0.01$ was considered as statistically significant.

Data availability

Strains and sequences of DNA constructs will be provided upon request. The DNA sequences of the primers used to produce new *tiar-1* alleles with CRISPR-Cas9 genome editing are reported in Table S2.

RESULTS

TIAR-1 promotes fertility and embryonic development

The *C. elegans* hermaphrodite gonad is composed of two identical U-shaped arms (Figure 1). Each gonad arm is a tubular structure in which most germ cells share a common core cytoplasm, forming a syncytium. The germline stem cells are located at the distal end of these gonad arms. As germ cells proliferate, they move proximally (closer to the uterus) and enter meiosis. During the L4 larval stage of development, the first ~40 germ cells that enter meiosis differentiate into spermatocytes that produce ~160 sperm, which enter a sperm storage compartment (spermatheca) at ovulation and are stored for self-fertilization. During adulthood, germ cells that enter meiosis differentiate into oocytes. Oocytes undergo meiotic maturation (entry into M phase of meiosis I from prophase), ovulation, and fertilization in an assembly-line-like fashion (Kim *et al.* 2013; Pazdernik and Schedl 2013).

■ **Table 1** *tiar-1(0)* mutants exhibit embryonic lethality and high-incidence of male progeny

Genotype	T	Brood Size	Embryonic Lethality (%) ^a	Males (%) ^b	N
Wild type	20°	281.9 ± 29.8	0.4 ± 0.5	0.06 ± 0.14	39
	25°	226.0 ± 35.9	0.5 ± 0.5	0.05 ± 0.17	19
	20–25° Shift	211.8 ± 35.9	0.6 ± 0.7	0.06 ± 0.19	39
<i>tiar-1(tn1543)</i>	20°	108.5 ± 26.4***	10.2 ± 10.0**	0.43 ± 0.80	12
	25°	22.9 ± 13.8***	22.7 ± 21.8***	2.01 ± 3.94	25
	20–25° Shift	33.9 ± 15.9***	20.5 ± 19.5***	1.87 ± 3.15	67
<i>tiar-1(tm361) unc-4(e120)</i>	20°	165.2 ± 40.3**	7.9 ± 5.6***	0.13 ± 0.41	21
	20–25° Shift	36.2 ± 43.7***	7.5 ± 12.3***	2.07 ± 6.36	50
<i>tiar-1(tn1543)/tiar-1(tm361) unc-4(e120)</i>	20°	129.2 ± 25.1***	4.8 ± 3.5***	0.14 ± 0.33	25
	20–25° Shift	24.9 ± 12.6***	31.6 ± 17.3***	1.13 ± 3.17	20
<i>tiar-2(tm2923)</i>	20°	271.8 ± 66.7	1.3 ± 2.3	0.08 ± 0.15	20
	20–25° Shift	181.1 ± 30.7	1.9 ± 2.2	0.34 ± 0.47	20
<i>tiar-3(ok144)</i>	20°	192.9 ± 28.3	1.1 ± 1.2	0.07 ± 0.2	15
	20–25° Shift	171.1 ± 32.8	5.5 ± 3.4	0.37 ± 0.37	15
<i>tiar-1(tn1543); tiar-3(ok144)</i>	20°	105.2 ± 37.3***	9.2 ± 10.5***	0.55 ± 0.79	50
	20–25° Shift	32.4 ± 23.2*	44.0 ± 22.4***	2.44 ± 5.41	47
<i>tiar-1(tn1543) tiar-2(tm2923)</i>	20°	70.2 ± 31.5***	25.9 ± 15.9***	0.94 ± 1.26	27
	20–25° Shift	17.4 ± 17.2***	83.0 ± 30.3***	ND ^c	21
<i>tiar-1(tn1543) tiar-2 (tm2923); tiar-3(ok144)</i>	20°	37.9 ± 18.6***	10.1 ± 10.9***	0.30 ± 1.61	30
	20–25° Shift	0.8 ± 2.4***	75.00 ± 50.0**	ND ^c	24
<i>fog-2(q71) females x tra-2(q276) XX males</i>	20–25° Shift	ND	ND	0.21 ± 0.51	18
<i>tiar-1(tn1543); fog-2(q71) females x tra-2(q276) XX males</i>	20–25° Shift	ND	ND	1.88 ± 3.05	31
	20°	252.8 ± 46.7	1.4 ± 2.2	0.08 ± 0.22	30
<i>tiar-1(tn1545[tiar-1::gfp])</i>	20–25° Shift	136.6 ± 28.4	5.7 ± 6.3	0.17 ± 0.42	22

Hermaphrodites were incubated at a temperature (T) of 20 or 25° throughout their development. Then they were individually selected at the mid-L4 stage and transferred to new plates every 24 hr over the course of 3 d. Plates were scored for dead embryos, surviving progeny, and males. Embryos not hatching within 24 hr after being laid were considered dead. For upshift experiments, animals grown at 20° were shifted to 25° at the mid-L4 stage. Dunn's test (wild-type values as control). *** $P < 0.0001$, ** $P < 0.001$.

^a Percent of embryos among the progeny that did not hatch within 24 hr of being laid.

^b Percent of male individuals among living progeny. The incidence of males was measured by scoring between 467 and 10,950 total animals.

^c The progeny laid at 25° did not reach adulthood after 4 d.

Previously, we reported that *tiar-1(tm361)* (Figure 2A) mutant hermaphrodites are temperature-sensitive sterile (Silva-García and Navarro 2013). However, in this study we found that *tiar-1(tm361)* adult hermaphrodites exhibit reduced fertility at 25° (76% infertility; Table S3) and that there is a linked mutation in the originally studied *tiar-1(tm361)* strain that exacerbates its infertility. We used genetic recombination (see *Materials and Methods*) to remove the enhancer mutation and to link *tiar-1(tm361)* to the commonly used genetic marker *unc-4(e120)*, which confers a backward locomotion defect and has no reported effect on fertility (Brenner 1974). In contrast to the originally studied *tiar-1(tm361)* mutant strain, which exhibits 76% infertility, *tiar-1(tm361) unc-4(e120)* mutant hermaphrodites exhibit 21% infertility (Table S3). Thus, we used the backcrossed *tiar-1(tm361) unc-4(e120)* strain for our studies hereafter. As described below, we independently isolated a *tiar-1* mutant allele using CRISPR-Cas9 genome editing (Figure 2A). This allele, *tiar-1(tn1543)*, exhibited 21% infertility at 25°, similar to the *tiar-1(tm361) unc-4(e120)* strain (Table S3).

We generated a new deletion allele [*tiar-1(tn1543)*; Figure 2A] by CRISPR-Cas9 genome editing (as in Dickinson *et al.* 2013). This allele results from a replacement of the entire *tiar-1* open reading frame with the *unc-119(+)* gene from *C. briggsae* as a selectable marker (Maduro and

Pilgrim 1996). For simplicity, we refer to both *tiar-1(tm361) unc-4(e120)* and *tiar-1(tn1543)* alleles as *tiar-1(0)*. When grown at 20°, wild-type and *tiar-1(0)* hermaphrodites are fertile (Table 1). However, *tiar-1(0)* mutants produced smaller broods than the wild type at 20° (~40–60% of wild type; Table 1). *tiar-1(0)* mutant animals exhibit appreciable embryonic lethality at 20° (~10%; Table 1). Previous reports indicate that *tiar-1(tm361)* animals exhibit temperature sensitivity (Silva-García and Navarro 2013; Rousakis *et al.* 2014). Consistent with these results, *tiar-1(0)* mutant hermaphrodites grown constantly at 25° in our study exhibited low penetrance sterility, slower development, and additional somatic defects, such as protruding vulvae (Table S3; G. Huelgas-Morales and R. Navarro, unpublished results).

To more directly assess fertility defects during adulthood, *tiar-1(0)* mutants were shifted from 20° to 25° during the L4 stage (mid-L4). In these upshifted *tiar-1(0)* animals, the defects increased in severity compared to animals grown at 20°. *tiar-1(0)* upshifted animals produced broods that were ~17% the size of those of the wild type, and a fraction of their embryos did not survive (Table 1). *tiar-1(tn1543)* mutant hermaphrodites continually grown at 25° behave similarly to animals shifted to 25° at the mid-L4 stage (Table 1). This result suggests that the infertility is likely to arise from temperature-sensitive defects during oogenesis, which commences during the L4 stage, and continues into adulthood.

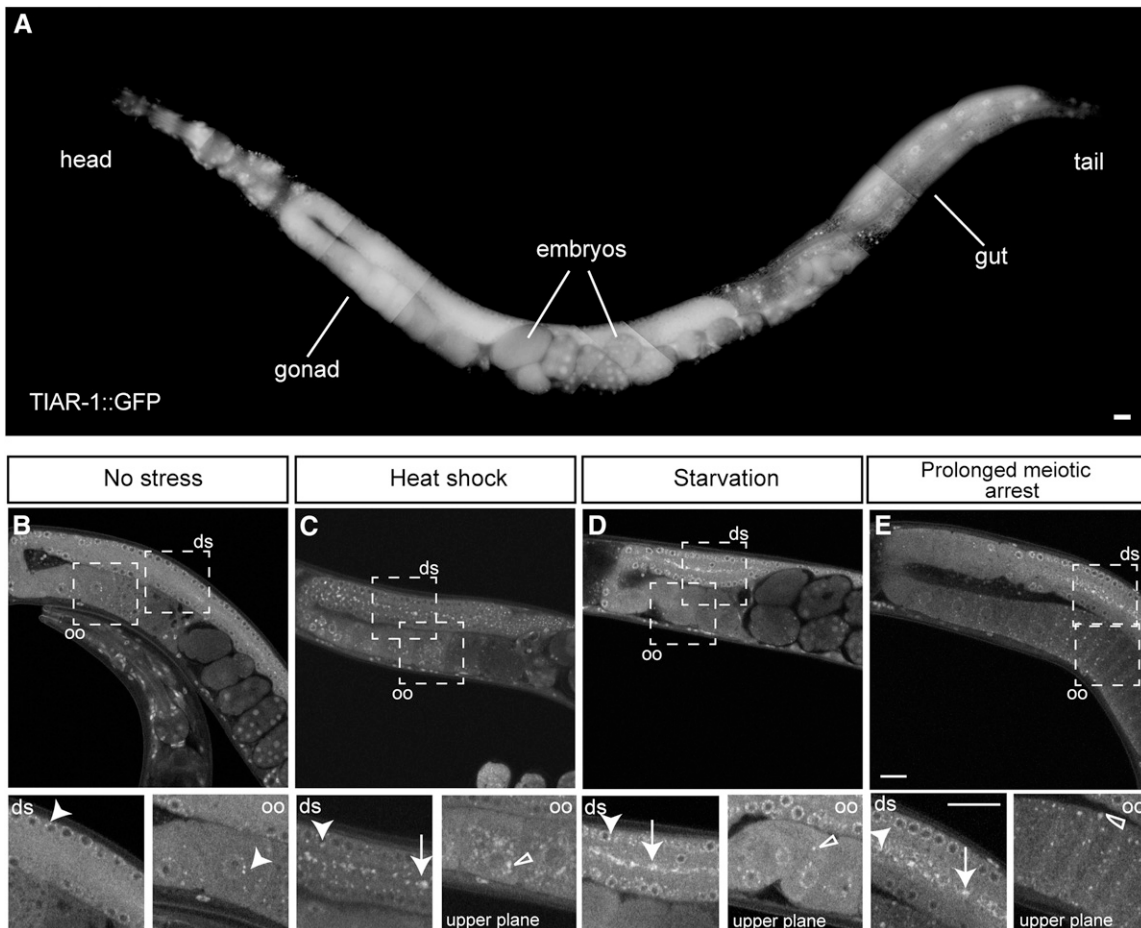


Figure 3 TIAR-1 associates with cytoplasmic granules during stress in the gonad. TIAR-1::GFP expression and localization were assessed in *tiar-1* (*tn1545*). (A) 1-d-old *tiar-1::gfp* hermaphrodites were anesthetized and observed with the fluorescence microscope. The subcellular localization of TIAR-1::GFP in the gonad was observed under normal growth conditions (B), after exposure to heat shock (3 hr at 31°) (C), and after starvation (4 hr) (D). TIAR-1::GFP subcellular localization was also observed in *tiar-1*(*tn1545*); *fog-2*(*q71*) unmated females (E). These animals were imaged using confocal microscopy. Dotted squares indicate the zoomed-in areas. ds, distal gonad; oo, oocytes. Arrowheads indicate likely P granules, arrows gonad core granules, and empty triangles oocytes granules. Scale bars, 10 μ m.

Additionally, we analyzed *tiar-1*(*tn1543*)/*tiar-1*(*tm361*) *unc-4*(*e120*) heterozygous hermaphrodites and also observed a small brood size and embryonic lethality similar to those of *tiar-1*(*tn1543*) (Table 1). These results suggest that *tiar-1* promotes fertility and embryonic development.

Since *C. elegans* has three TIA-1/TIAR homologs, we also investigated the effects of *tiar-2* and *tiar-3* on fertility and embryonic development. To this end, we used *tiar-2*(*tm2923*) and *tiar-3*(*ok144*) mutants (Figure 2, B and C). The brood size of *tiar-2* and *tiar-3* mutant animals was slightly smaller than that of the wild type at both tested temperatures (Table 1). Both *tiar-2* and *tiar-3* mutant animals displayed a very slight increase in embryonic lethality compared to the wild type (Table 1); however, these differences were not statistically significant.

To test if *tiar-2* and *tiar-3* might have redundant roles with *tiar-1*, we studied double mutants. *tiar-1*(*tn1543*); *tiar-3*(*ok144*) double mutants had a brood size similar to *tiar-1*(*tn1543*) mutants at the tested temperatures, but a higher proportion of the double mutant embryos did not survive when upshifted to 25° (Table 1). In contrast, *tiar-1*(*tn1543*) *tiar-2*(*tm2923*) double mutants had a smaller brood size than *tiar-1*(*tn1543*) mutants, and a much higher proportion of their embryos did not survive (83% when upshifted; Table 1). Thus, both *tiar-2* and *tiar-3* promote fertility and embryonic development, although *tiar-1*

appears to play a more substantial role under the conditions tested than its paralogs.

Additionally, we studied *tiar-1*(*tn1543*) *tiar-2*(*tm2923*); *tiar-3*(*ok144*) triple mutants and found that they produced very few progeny at both tested temperatures (Table 1). Embryonic lethality increased significantly upon upshift to 25° (~75% embryonic lethality). However, the proportion of infertile triple mutant and *tiar-1*(0) single mutant animals was not significantly different (Table S3). Interestingly, *tiar-1*(*tn1543*) *tiar-2*(*tm2923*) and *tiar-1*(*tn1543*) *tiar-2*(*tm2923*); *tiar-3*(*ok144*) double and triple mutant animals displayed a highly penetrant larval arrest when grown at 25°, suggesting that the three *C. elegans* TIAR paralogs play a redundant role in development. However, *tiar-1* appears to play the most evident role in promoting fertility and embryonic development.

***tiar-1*(0) mutants exhibit an increased frequency of X-chromosome nondisjunction during oogenesis**

C. elegans has two naturally occurring sexes; hermaphrodites have two sex (X) chromosomes and males have only one. Hermaphrodites produce ~99.9% hermaphrodite progeny, with rare male progeny appearing to arise through X-chromosome nondisjunction (Hodgkin

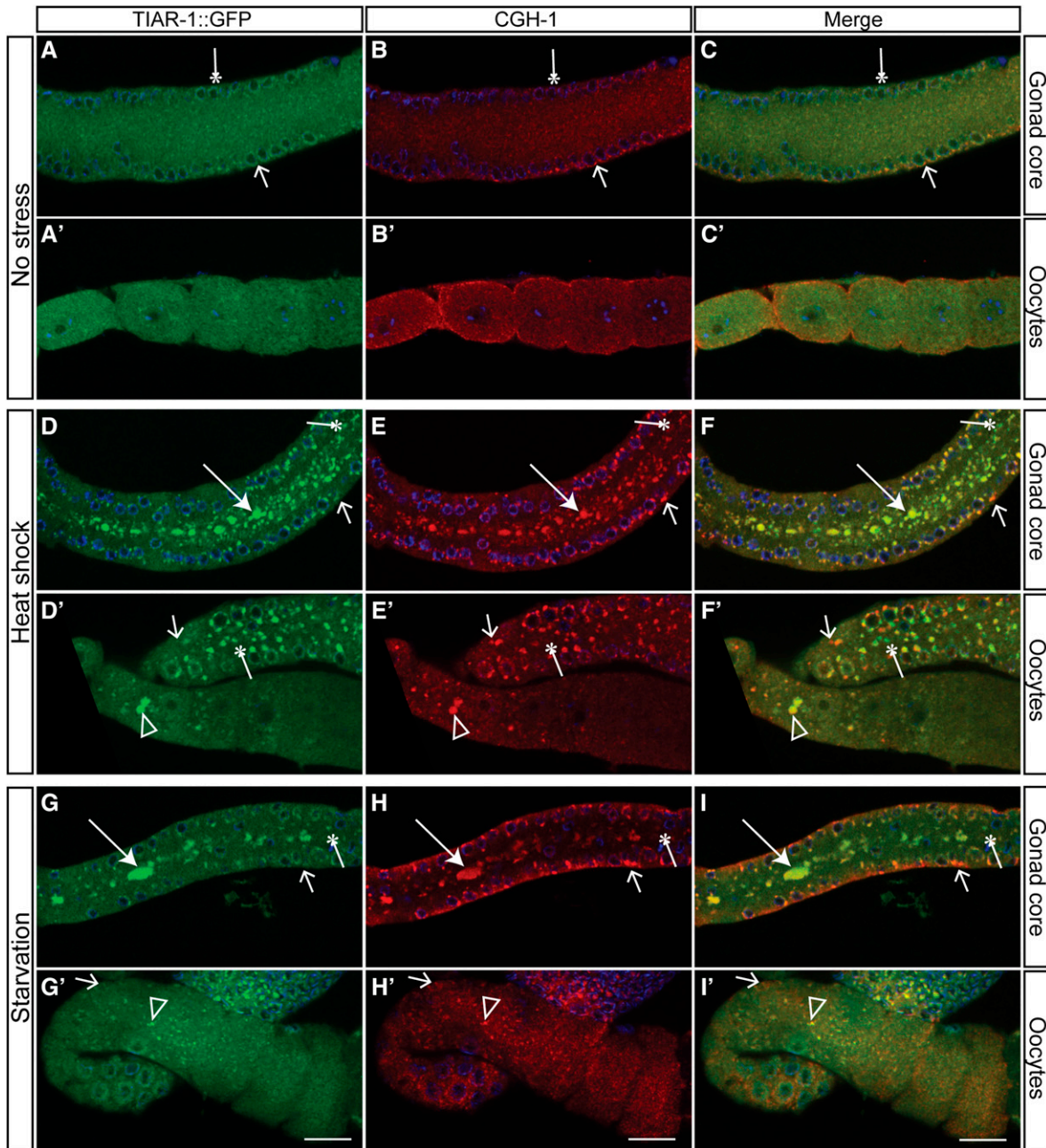


Figure 4 TIAR-1 and CGH-1 associate with large stress-induced granules in the gonad. *tiar-1(tn1545)* 1-d-old hermaphrodites were grown in normal conditions (no stress) (A–C'), exposed to heat shock (3 hr at 31°) (D–F'), or starved (4 hr without food) (G–I'). After the treatments, the animals were fixed and coimmunostained with anti-GFP, anti-CGH-1 (red), and DAPI (cyan) to visualize granules and DNA, respectively. The preparations were imaged using confocal microscopy. Note, TIAR-1 and CGH-1 associate with large stress-induced granules in the gonad core (panels A–I) and oocytes (panels A'–I'). However, some small granules appear to contain only TIAR-1 or CGH-1. Thin arrows indicate granules that appear to contain CGH-1 but not TIAR-1. Asterisks indicate granules that appear to contain TIAR-1 but not CGH-1. Arrows and empty triangles indicate granules in the gonad core and oocytes, respectively. Scale bar, 10 μ m.

et al. 1979). Mutations that cause a high incidence of males (Him) phenotype cause meiotic defects that increase the frequency of X-chromosome nondisjunction (Hodgkin *et al.* 1979; reviewed by Hillers *et al.* 2015). Since we frequently observed males among the progeny of *tiar-1(0)* mutant hermaphrodites, we quantified their incidence. Wild-type animals produced 0.06% male progeny when grown at 20°, and when upshifted to 25° at the mid-L4 stage, or continually grown at 25° (Table 1). *tiar-1(0)* mutant hermaphrodites produced

more males at both temperatures; the incidence of male progeny ranged from 0.1 to 0.4% at 20°, and from 1.1 to 2.1% at 25° (Table 1). Thus, we found that the incidence of males in the progeny of *tiar-1(0)* mutant animals was ~2–7 times higher than in the wild type at 20°, and ~10–35 times higher upon upshifting to 25°. The incidence of males in the progeny of *tiar-2* and *tiar-3* mutant hermaphrodites was slightly higher than that seen in the wild type, but noticeably smaller than that observed in *tiar-1(0)* hermaphrodites (Table 1).

The high proportion of males produced by *tiar-1(0)* mutant hermaphrodites could potentially result from defects in spermatogenesis or oogenesis. Therefore, we assessed the relative contribution of defects in oogenesis and spermatogenesis to the *tiar-1(0)* mutant Him phenotype by evaluating the frequency of X-chromosome nondisjunction events when *tiar-1(0)* mutant oocytes are fertilized by *tiar-1(+)* sperm. To this end, we used *tra-2(q276)* mutants, which are XX but develop into fully functional males (Okkema and Kimble 1991), and *fog-2(q71)* hermaphrodites, which do not produce sperm and are often referred to as females (Schedl and Kimble 1988). When crossed to *tra-2* XX males, *tiar-1(tn1543); fog-2(q71)* females produced ~9 times more X0 males than *fog-2(q71)* females [Table 1; *tra-2(q276)* is recessive]. This result supports the hypothesis that X-chromosome nondisjunction during oogenesis significantly contributes to the *tiar-1(0)* Him mutant phenotype; however, we cannot eliminate the possibility that defects in spermatogenesis might also contribute.

TIAR-1 associates with stress-induced granules in the germline

To study the expression of TIAR-1 *in vivo*, we used CRISPR-Cas9 genome editing to generate a C-terminal fusion of GFP to TIAR-1, creating *tiar-1(tn1545[tiar-1::gfp])* (Figure 2A). The brood size, embryonic lethality, and incidence of males in *tiar-1(tn1545[tiar-1::gfp])* strain displayed slight variations from those of the wild type; however, these differences were not statistically significant (Table 1). Importantly, the *tiar-1(tn1545[tiar-1::gfp])* strain was more fertile than the *tiar-1(0)* mutant strains at all temperatures examined (Table 1). These results indicate that the TIAR-1::GFP protein retains substantial function *in vivo*. Under normal growth conditions, we observed that TIAR-1::GFP is broadly expressed in both the soma and the germline, localizing to the cytoplasm and nuclei (Figure 3, A and B). In addition, TIAR-1::GFP localized to perinuclear foci that resemble P granules (arrowheads in Figure 3, A and B), consistent with previous findings (Silva-García and Navarro 2013).

In the *C. elegans* gonad, different kinds of granules are formed under a variety of stressful conditions (Boag *et al.* 2008; Jud *et al.* 2008; Noble *et al.* 2008; Paz-Gómez *et al.* 2014). Thus, we analyzed the localization of TIAR-1::GFP under several stressful conditions, including after exposure to heat shock (3 hr at 31°C), starvation (no bacteria for 4 hr), and prolonged meiotic arrest in the absence of sperm [as in *tiar-1(tn1545); fog-2(q71)* unmated females]. We found that TIAR-1::GFP associated with cytoplasmic granules under all of the tested stressful conditions (Figure 3, B–E). However, some TIAR-1::GFP remained diffuse in the cytoplasm, apparent P granules, and inside nuclei (Figure 3, B–E). TIAR-1::GFP associated with granules in two main regions: i) in the core of the gonad (Figure 3, C–E, distal gonad “ds,” arrows); and ii) in oocytes (Figure 3, C and E, oocytes “oo,” empty triangles). The TIAR-1::GFP-containing granules in the core of the gonad appear similar in shape and size in all the stressful conditions tested. However, TIAR-1-containing granules in oocytes display different characteristics depending on the nature of the stressful conditions. After heat shock, TIAR-1-containing oocyte granules are large and mainly perinuclear (Figure 3C, empty triangle). During prolonged meiotic arrest, TIAR-1-containing oocyte granules localized primarily to the cell cortex (Figure 3E, empty triangle). Following starvation, even when some TIAR-1-containing oocyte granules were visible, they were smaller and fewer in number (Figure 3D, empty triangle) than those observed under the other stressful conditions. The cytoplasmic granular localization of TIAR-1::GFP under stressful conditions is consistent with that observed for its mammalian homologs (Kedersha *et al.* 1999).

■ **Table 2 Cycloheximide treatment during stress impairs gonad granule formation**

Conditions	Treatment	<i>tiar-1::gfp</i> Animals with Granules		
		Gonad core	Oocytes	N
Heat shock	None	100%	100%	40
	Cycloheximide	20%	10%	40
Starvation	None	100%	50%	22
	Cycloheximide	5%	0%	40
No stress	None	3.3%	0%	30
	Puromycin 3h	65.8%	10.5%	38
	Puromycin 4h	75%	55%	20

tiar-1(tn1545) 1-d-old hermaphrodites were exposed to the indicated conditions in liquid medium (see *Materials and Methods*). Then the animals were mounted and observed by confocal microscopy. The number of animals with visible TIAR-1::GFP granules in the gonad core and oocytes was quantified. The data shown is the average of at least two independent experiments.

To explore whether the TIAR-1-containing granules in the gonad overlap with previously described stress-induced granules in *C. elegans*, we coimmunostained for TIAR-1::GFP and the CGH-1 DEAD-box RNA helicase, which associates with, and remodels, RNPs in the gonad under normal and stressful conditions (Navarro *et al.* 2001; Boag *et al.* 2008; Jud *et al.* 2008; Noble *et al.* 2008; Hubstenberger *et al.* 2013, 2015; Paz-Gómez *et al.* 2014). We observed that both proteins associate with large granules in the gonad core induced by heat shock or starvation (Figure 4, D–F and G–I, arrows). Likewise, the stress-induced granules in oocytes seem to largely represent overlapping structures (Figure 4, D’–F’ and G’–I’, empty triangles). However, in normal conditions, a few perinuclear granules appear to contain only TIAR-1 or CGH-1 (Figure 4, A–C, thin arrows and asterisks). These small granules, appearing to contain only one of the two proteins, became more evident under stressful conditions (Figure 4, D’–F’ and G’–I’, thin arrows and asterisks). Together, these results suggest that the TIAR-1-containing large stress-induced granules overlap with those previously described in *C. elegans* gonad, but a fraction of smaller cytoplasmic granules might have a different nature.

Disruption of protein translation affects the formation of TIAR-1-containing stress-induced granules in the gonad

Protein synthesis inhibitors that stabilize polysomes (*e.g.*, cycloheximide) hinder stress granule formation, and protein synthesis inhibitors that promote premature termination of translation (*e.g.*, puromycin) enhance stress granule assembly (Kedersha *et al.* 2000). We thus investigated whether protein synthesis inhibitors affect the formation of TIAR-1-containing granules. We treated *tiar-1(tn1545[tiar-1::gfp])* animals with either 30 mM cycloheximide or 15 mM puromycin under normal and stressful conditions. After heat shock, TIAR-1-containing granules in both the gonad core and oocytes formed in all of the nondrug-treated animals (Table 2 and Figure 5C, arrow and empty triangle). However, the fraction of heat-shocked animals that formed TIAR-1-containing granules in the gonad core and oocytes decreased substantially after cycloheximide treatment (Table 2 and Figure 5D). After starvation, TIAR-1-containing granules formed in the gonad core and in oocytes (Table 2 and Figure 5E, arrow and empty triangle). However, fewer of the starved animals formed TIAR-1-containing granules in both the gonad core and in oocytes following cycloheximide treatment (Table 2 and Figure 5F). After 3 hr of puromycin treatment, most animals formed gonad core granules, but fewer formed oocyte granules (Table 2). After 4 hr of puromycin treatment, the number of

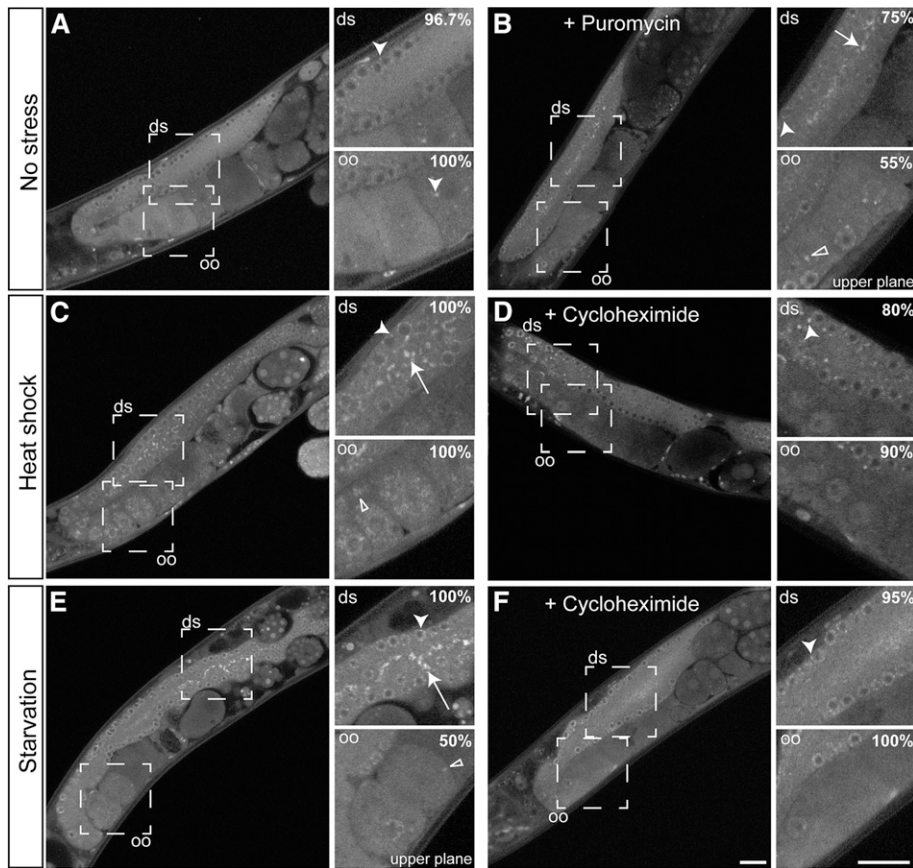


Figure 5 Cycloheximide treatment during stress impairs gonad granule formation. 1-d-old *tiar-1::gfp* hermaphrodites were grown at 20° in the absence of stress (A, B), or exposed to either heat shock (3 hr at 31°) (C) or starvation (4 hr) in liquid medium (see *Materials and Methods*) (E). *tiar-1::gfp* hermaphrodites were also incubated with 30 mM cycloheximide while being exposed to the heat shock (D) or starvation (F). Additionally, *tiar-1::gfp* hermaphrodites were treated with 15 mM puromycin in the absence of stress (B). After the incubation periods, the animals were mounted and imaged using confocal microscopy. Note, puromycin promotes granule formation in most of the nonstressed animals, while cycloheximide impairs granule formation in most of the stressed animals. Dotted squares indicate the zoomed-in areas; “upper plane” refers to a different confocal plane. ds, distal gonad; oo, oocytes. Arrowheads indicate likely P granules, arrows gonad core granules, and empty triangles oocytes granules. The percentage of animals with the depicted phenotype is shown. Scale bars, 10 μm.

animals with TIAR-1-containing granules in the gonad core and oocytes increased (Table 2 and Figure 5B). This suggests that, during the puromycin treatment, granules form first in the gonad core and then in oocytes. Together, these results suggest that TIAR-1-containing granules in the *C. elegans* germline exhibit properties established for stress granules in mammalian systems.

Another feature of stress-induced granules is that they dissociate when normal conditions are restored (Kedersha *et al.* 2000). Thus, we analyzed TIAR-1-containing granules in the hermaphrodite gonad under stressful conditions and after recovery. During heat shock, the proportion of animals with granules in the gonad core and oocytes increased gradually, such that TIAR-1-containing granules were first observed 1 hr after heat shock (Figure 6A). After 3 hr at 31°, nearly all animals formed TIAR-1-containing granules in the gonad core, and most formed oocyte granules (Figure 6A). After recovery from heat shock, the proportion of animals with gonad granules decreased progressively. It took approximately 4 hr of recovery at 20° for the proportion of animals with granules to return to basal levels (Figure 6A). During starvation, the proportion of animals with TIAR-1-containing granules in the gonad core and oocytes increased less rapidly than during heat shock (compare Figure 6, A and B). It took approximately 4 hr of starvation for most animals to form TIAR-1-containing granules in the gonad core and in oocytes (Figure 6B). It took approximately 3 hr after refeeding for the proportion of animals with granules to return to basal levels (Figure 6B). In both stressful conditions, the TIAR-1-containing granules formed first in the gonad core and took longer to dissociate than those formed in the oocytes (Figure 6). Moreover, in both stressful conditions, the proportion of animals with TIAR-1-containing granules in the gonad core was always higher than

those with granules in oocytes (Figure 6). These results suggest that TIAR-1-containing granules are dynamic structures that dissociate during recovery from stress, supporting the hypothesis that these structures behave like stress-induced granules in other organisms.

tiar-1 is required for gonad core granule formation

We evaluated whether *tiar-1* is required for formation of stress-induced granules in the gonad core and oocytes. Wild-type and *tiar-1(0)* animals were exposed to heat shock, starvation, and prolonged meiotic arrest conditions as described above. To visualize the stress-induced granules in the absence of TIAR-1, we immunostained for the CGH-1 DEAD-box RNA helicase, as described above (Figure 4). Under heat shock, starvation, and prolonged meiotic arrest conditions, wild-type animals formed large CGH-1-containing granules in both the gonad core and in oocytes (Table 3 and Figure 7, C, E, and G). In contrast, the majority of *tiar-1(0)* animals did not form gonad core granules under stressful conditions (Table 3 and Figure 7, D, F, and H). However, we observed that *tiar-2* and *tiar-3* mutant animals formed granules in the gonad core as often as wild-type animals (Table 3). Moreover, the proportion of *tiar-1(tn1543) tiar-2(tm2923)*, *tiar-1(tn1543); tiar-3(ok144)* double, and *tiar-1(tn1543) tiar-2(tm2923); tiar-3(ok144)* triple mutant animals that did not form gonad core granules was similar to that observed in *tiar-1* single mutant animals (Table 3). Interestingly, oocyte granules were still formed in *tiar-1(tn1543)* animals in all of the tested stressful conditions (Figure 7, D, F and H, empty triangles). These results demonstrate that *tiar-1* is required for formation of apparent stress granules in the gonad core, but that it might play a less critical role in the formation of granules in oocytes. Possibly, gonad core and oocyte granules form through different mechanisms. We cannot

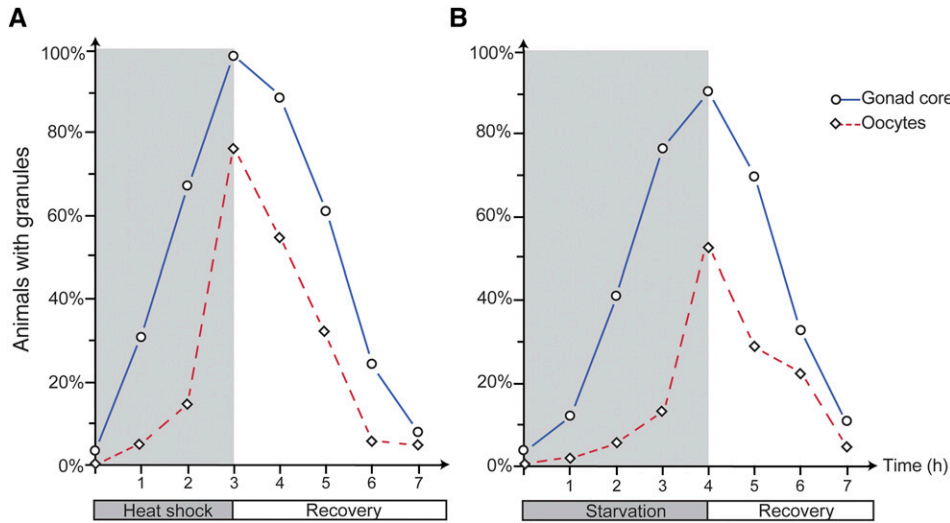


Figure 6 Gonad granules dissociate after stress recovery. *tiar-1::gfp* 1-d-old hermaphrodites were exposed to heat shock (3 hr at 31°) in agar plates (A) or starvation (4 hr with no bacteria) in liquid medium (B). Then they were recovered from stress (20° with bacteria). The animals were mounted, observed under the fluorescence microscope, and scored for presence of TIAR-1::GFP granules in the gonad core (blue solid line, circles) and in oocytes (red dotted line, diamonds) every hr during stress exposure and recovery. At least two independent experiments were conducted with $n \geq 50$ for each condition and time point. The average percentage of animals with visible granules is depicted in the graphs.

exclude a role for TIAR-1 in formation of oocyte granules under stressful conditions because TIAR-1 and CGH-1 do not exclusively colocalize under all conditions. Additionally, *tiar-2* and *tiar-3* did not seem to play a significant role in the formation of gonad core granules under the tested stressful conditions.

tiar-1 protects female germ cells and embryos from heat shock

Since TIAR-1-containing granules form in the germline under conditions of stress, we tested whether TIAR-1 might serve a protective function during gametogenesis or embryonic development. Thus, we exposed wild-type and *tiar-1(0)* mutant animals to heat shock (3 hr at 31°) and starvation (no bacteria for 4 hr) and analyzed the impact on embryonic viability at various times after alleviation of the stress (20° with bacteria). This analysis takes advantage of the spatially and temporally graded distribution of germline nuclei in the adult hermaphrodite gonad, with the proliferative stem cell population located distally, and developing oocytes progressing through the stages of meiotic prophase proximally (Figure 8A and Figure 1). At 20°, meiotic prophase during oogenesis takes approximately 54–60 hr (Jaramillo-Lambert *et al.* 2007). Because embryos are produced in an assembly-line-like fashion, we were able to distinguish between the effects of stress on full-grown oocytes and embryos from those on developing oocytes that were at earlier stages of meiotic prophase during the stress. This allowed for the sorting of the progeny of the stressed animals into three groups

(see *Materials and Methods*). Group I comprised two classes of progeny: 1) embryos that were formed during the heat stress and that were already in the uterus; and 2) embryos formed shortly after the heat stress through the fertilization of full-grown diakinesis-stage oocytes (Figure 8A). Group II comprised embryos laid between 12 and 24 hr after stress, and group III comprised those laid between 24 and 48 hr after stress (Figure 8A). Group III likely corresponds to oocytes developing at earlier stages of meiotic prophase during the stress than those of group II. Whether group III also includes premeiotic germ cells subjected to stress is uncertain; however, a consideration of cell-cycle kinetics of *C. elegans* germline stem cells (Fox *et al.* 2011; Fox and Schedl 2015) and the 54–60 hr duration of meiotic prophase during oogenesis (Jaramillo-Lambert *et al.* 2007) suggests this might not be the case. Embryonic lethality was determined for each experimental group and the respective controls.

We observed that *tiar-1(0)* mutant adults display a slower egg-laying rate than the wild type; however, we accounted for this difference by collecting the embryos that were in the uterus, and those that were newly formed from fertilization of the -1 to -3 oocytes, such that group I progeny from both strains are directly comparable (see *Materials and Methods*). Because of this difference in egg-laying rate, comparison of groups II and III between *tiar-1(0)* mutants and the wild type must be viewed as an approximation. Thus, our analysis did not focus on this specific comparison. First, we analyzed the effects of heat shock on the wild type. We found that most of the wild-type

Table 3 *tiar-2* and *tiar-3* are not required for gonad core granule formation under stress

Genotype	Animals with Gonad Core Granules		
	No Stress	Heat Shock	Starvation
Wild type	4.2% (n = 119)	88.8% (n = 98)	88.6% (n = 79)
<i>tiar-1(tn1543)</i>	4.3% (n = 46)	4.8% (n = 42)	10.8% (n = 37)
<i>tiar-1(tm361) unc-4(e120)</i>	0% (n = 24)	15.2% (n = 33)	23.5% (n = 51)
<i>tiar-2(tm2923)</i>	0% (n = 37)	100% (n = 20)	100% (n = 24)
<i>tiar-3(ok144)</i>	7.1% (n = 42)	90.1% (n = 22)	100% (n = 27)
<i>tiar-1(tn1543) tiar-2(tm2923)</i>	0% (n = 28)	5.9% (n = 34)	6.5% (n = 31)
<i>tiar-1(tn1543); tiar-3(ok144)</i>	0% (n = 45)	9.1% (n = 33)	23.5% (n = 34)
<i>tiar-1(tn1543) tiar-2(tm2923); tiar-3(ok144)</i>	0% (n = 24)	15.2% (n = 33)	9.1% (n = 33)

1-d-old hermaphrodites of the indicated genotypes were kept under normal conditions or exposed to heat shock (3 hr at 31°) and starvation (4 hr without bacteria). Afterward, their gonads were dissected, fixed, and immunostained for CGH-1 (see *Materials and Methods*). The number of gonads with visible granules in the core was quantified and the average percentage is shown.

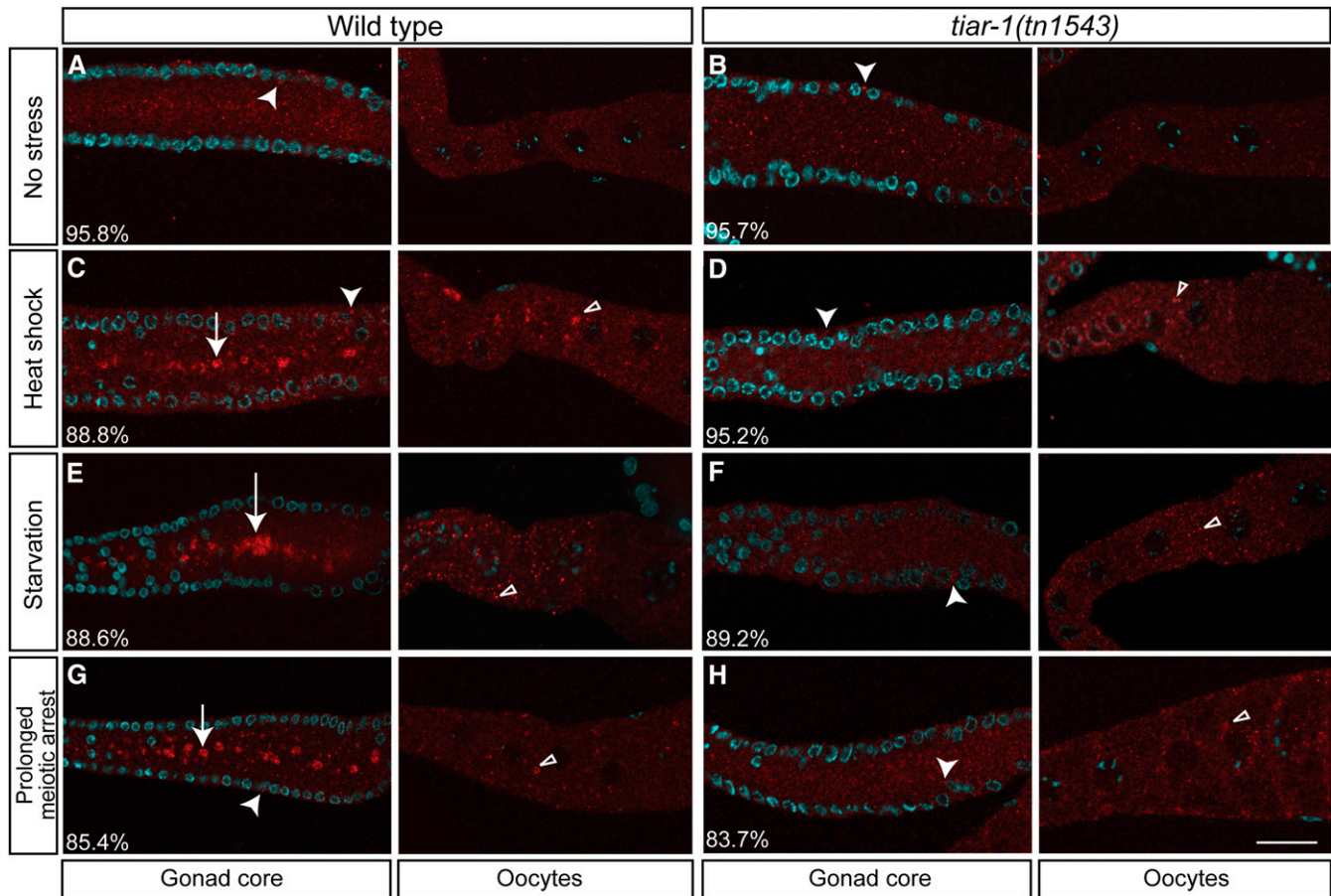


Figure 7 *tiar-1* is required for gonad core granule formation. Wild-type and *tiar-1(tn1543)* 1-d-old mutant hermaphrodites were grown in normal conditions (no stress) (A and B), exposed to heat shock (3 hr at 31°) (C and D), or starved (4 hr without food) (E and F). For prolonged meiotic arrest experiments, 1-d-old *fog-2(q71)* and *tiar-1(tn1543); fog-2(q71)* unmated females were scored (G and H). After the treatments, the animals were fixed and immunostained with anti-CGH-1 (red) and DAPI (cyan) to visualize granules and DNA, respectively. The preparations were imaged using confocal microscopy. The average percentage of animals with the depicted phenotype was calculated from data obtained in at least three independent experiments. Note, granules are formed in the gonad core and oocytes of most wild-type animals. However, most of the *tiar-1* null mutants do not form granules in the gonad core, but do in the oocytes. Arrowheads indicate likely P granules, arrows gonad core granules, and empty triangles oocytes granules. Scale bar, 10 μ m.

embryos from group I did not survive the heat shock (Figure 8B). However, the majority of wild-type embryos from groups II and III survived (Figure 8B). This result indicates that wild-type developing oocytes at earlier stages of meiotic prophase are protected from the detrimental effects of heat shock. Either these germ cells are protected from the deleterious effects of heat shock, or they possess the means to repair the resulting cellular damage (or both). Similarly, the vast majority of *tiar-1(0)* mutant embryos from group I did not survive heat shock (both *tiar-1(tn1543)* and *tiar-1(tm361)* were examined; Figure 8B). However, analysis of the embryonic lethality observed in group I embryos suggests that *tiar-1(0)* mutants are more susceptible to heat stress than the wild type (Figure 8B). In this experiment, recovery from heat shock was at 20°, a temperature at which *tiar-1(0)* mutants exhibit ~10% total embryonic lethality in the absence of heat shock (Table 1 and Figure 8B). Nonetheless, sorting embryos within broods of non-stressed animals revealed that *tiar-1(0)* mutant animals exhibit slightly higher embryonic lethality as they age (Figure 8B). Thus, the greater susceptibility of group I *tiar-1(0)* mutant embryos compared to the wild type suggests that *tiar-1* plays an important role in protecting diakinesis-stage oocytes and embryos from the deleterious effects of heat stress. Likewise, group II *tiar-1(0)* embryos exhibited appreciable embryonic

lethality after heat shock (Figure 8B); however, the degree of embryonic lethality was less than that observed for group I. This result suggests that developing oocytes at earlier stages of meiotic prophase possess *tiar-1*-dependent and *tiar-1*-independent mechanisms to protect from heat stress. By contrast, *tiar-1(0)* group III embryos exhibited embryonic lethality no different than that of nonstressed animals (Figure 8B). This result suggests that *tiar-1*-independent mechanisms are sufficient to protect germ cells composing group III from the deleterious effects of heat stress. The resolution of this experiment is unable to pinpoint the precise stages of germ cell development at which *tiar-1*-independent mechanisms are sufficiently protective. Nonetheless, the recovery of viability in *tiar-1(0)* group III embryos indicates that the *tiar-1(0)* animals were not irreversibly damaged by heat shock. Since the sperm were formed in the L4 stage prior to heat shock, sperm appear less susceptible to heat shock than developing oocytes. In contrast to heat shock, starvation did not increase embryonic lethality in either the wild type or *tiar-1(0)* mutants (Figure 8C).

Although *tiar-1* is needed for the increase in germline apoptosis caused by starvation (Silva-García and Navarro 2013), *tiar-1*-independent mechanisms are sufficient to protect the germline from starvation. In response to starvation in the L4-larval stage, adult

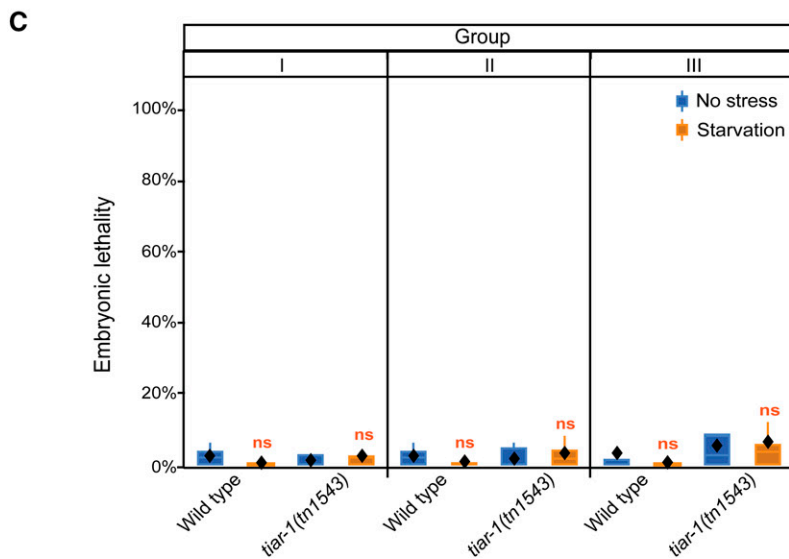
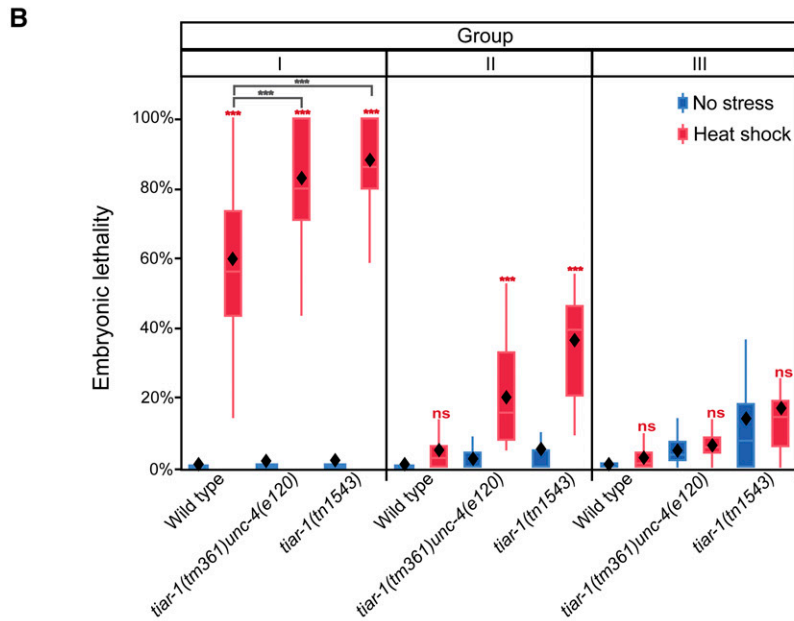
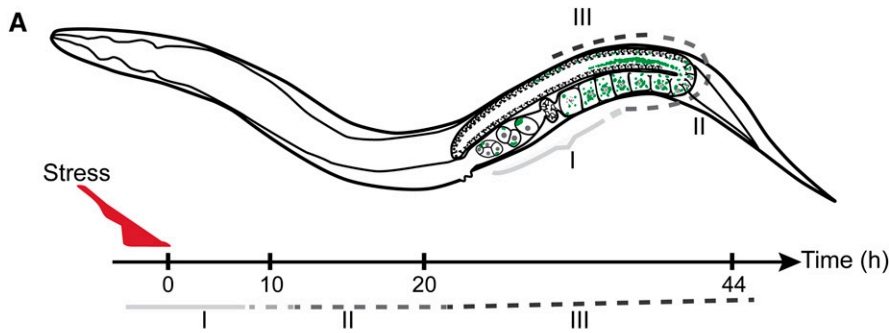


Figure 8 *tiar-1* protects embryos and germ cells from heat shock. Wild-type and *tiar-1(0)* young adult hermaphrodites were exposed to heat shock (31° for 3 hr), starved (4 hr), or kept at 20° on seeded plates as control (no stress). After stress, these animals were recovered to 20° on a seeded plate. Then their progeny were sorted into three groups: I) embryos that had been fertilized before or during stress, II) embryos that were produced shortly after stress, and III) embryos that were produced long after stress. (A) Scheme representing how the groups of embryos were assigned (see *Materials and Methods*). Embryonic lethality was quantified for all groups after heat shock (B) and starvation (C). Embryos not hatching within 24 hr of being laid were considered inviable. The graphs show the data obtained from three independent replicates. The boxes represent the 25–75% interquartile range, the diamonds the mean value, and the whiskers extend from the upper to the lower values. The *** ($P < 0.001$) and ns (nonsignificant) symbols placed on top of the boxes are comparisons between no-stress and stress groups, whereas the ones placed above them are comparisons between the stress groups. Least square means, Tukey HSD test.

hermaphrodites can undergo adult reproductive diapause (ARD), during which germline stem cells are preserved for gametogenesis after refeeding (Angelo and Van Gilst 2009; Seidel and Kimble 2011). We found that *tiar-1* was dispensable for ARD (G. Huelgas-Morales, C. Silva-García, D. Greenstein, and R. Navarro, unpublished results). Taken together, these results suggest that 1) *tiar-1* is important to protect germ cells and embryos from heat stress, and 2) there

are different mechanisms to protect germ cells and embryos from heat shock and starvation.

***tiar-1* protects female germ cells and embryos from heat shock independently of large gonad core granules**

The analysis above shows that heat stress induces the formation of TIAR-1-containing granules and that *tiar-1* protects developing oocytes

from the detrimental effects of heat stress. Therefore, we investigated whether the protective function of TIAR-1 might involve granule formation. In the course of our experiments, we found a condition in which many heat-shocked animals did not form large gonad core granules. When wild-type animals are grown at 20° and then heat shocked (31° for 3 hr), 85–100% of them form large gonad core granules (Table 2 and Table 4, and see Figure 3C, arrow). However, when these animals were grown at 24° (from hatching until adulthood) and then heat shocked (31° for 3 hr), the formation of large granules in the gonad core was reduced. For simplicity, we refer to the animals grown at 24° as pretreated. We found that only 3% of the pretreated wild-type animals formed large CGH-1-containing granules, 22% of them formed small and scattered granules, and 75% did not form gonad core granules at all (two replicates, $n = 32$). We confirmed this finding on pretreated *tiar-1(tn1545[tiar-1::gfp])* animals (Table 4; Figure 9B depicts animals that formed the small granules). Note that the formation of oocyte granules remained unaffected in these conditions (Figure 9B).

Pretreated wild-type animals were then exposed to heat shock, and their progeny were sorted into three groups and scored for embryonic lethality using the same sorting procedure described above. The results obtained for pretreated animals were similar to those for animals grown at 20°. We found that 58% of the pretreated wild-type embryos from group I did not survive heat shock (Figure 9C). However, the embryos from groups II and III did survive (Figure 9C). Thus, under conditions in which the majority of the pretreated heat-shocked animals did not form large gonad core granules (Figure 9B), most wild-type embryos from groups II and III survived (Figure 9C). This indicates that the large gonad core granules might be dispensable for germ cell protection under the tested circumstances. We cannot rule out the possibility that the small granules that are formed in some of the pretreated animals (Figure 9B) are sufficient to protect germ cells so they can later develop into viable embryos. Pretreated *tiar-1(tn1543)* animals displayed embryonic lethality similar to that of *tiar-1(0)* animals grown at 20° (84.5% for group I and 52.5% for group II). However, embryos from group III were no different to those not exposed to heat stress (Figure 9C). These results might indicate that TIAR-1 can protect germ cells and embryos from heat stress independently of its role in gonad core granule formation.

Another possibility is that pretreated animals do not sense and/or respond to stress in the same way that animals grown at 20° do. To test this possibility, we evaluated the heat-shock response by assessing the expression of the transgene *gpls1[Phsp-16.2::gfp]*, which has been used as a biomarker for thermotolerance (Rea *et al.* 2005). In normal conditions, wild-type animals showed little to no expression of *Phsp-16.2::gfp*, independently of the temperature at which they were grown (Figure 10, A and E). However, after heat shock, *Phsp-16.2::gfp* expression increased nine times in animals grown at 20° (Figure 10, C and I). When the animals were pretreated and then heat shocked, the transgene expression increased up to 10 times (Figure 10, G and J). These results indicate that pretreated animals still sense and respond to heat shock. To test if *tiar-1(0)* mutant animals sense and respond to heat shock, we evaluated *Phsp-16.2::gfp* expression in a *tiar-1(tn1543)* mutant background. In normal conditions, *tiar-1(tn1543)* showed little to no expression of *Phsp-16.2::gfp*, both when grown at 20° and when pretreated (Figure 10, B and F). Interestingly, when we exposed *tiar-1(tn1543)* to heat shock, the animals did not show the pronounced increase in *Phsp-16.2::gfp* that wild-type animals do. When *tiar-1(tn1543)* animals were grown at 20°, the expression increased only three times, compared to the nine fold increase observed in the wild-type control (Figure 10, D and I). When *tiar-1(tn1543)* mutant animals were pretreated at 24° and then heat shocked, *Phsp-16.2::gfp* expression increased only 3.5 times,

■ **Table 4 Large TIAR-1::GFP granules in the gonad core do not form in heat-shocked animals that were pretreated at 24°**

	Control at 20° (n = 35)	Heat Shock, Animals Grown at 20° (n = 65)	Heat Shock, Animals Pretreated at 24° (n = 89)
Gonad core granules	0%	85%	7%
Small gonad core granules	6%	14%	39%
No gonad core granules	94%	1%	54%

tiar-1(tn1545) hermaphrodite animals were grown at 20 or 24°. When they were 1-d-old adults, they were exposed to the indicated conditions on agar medium. Then the animals were mounted and observed with the fluorescence microscope for gonad core granule formation. The number of animals with visible granules in the gonad core was quantified for at least two independent replicates and the average percentage is shown.

compared to the 10-fold increase in the wild-type control (Figure 10, H and J). These results suggest that *tiar-1(tn1543)* mutants exhibit an impaired heat-shock response.

DISCUSSION

TIA-1 and TIAR are key proteins for mRNA regulation and stress granule formation in mammalian cells, as well as for fertility and embryonic development in mice (for review see Waris *et al.* 2014). Prior to this work, the potential involvement of TIA-1/TIAR proteins in protecting germ cells from stress was unclear. In this work, we show that *tiar-1* plays an important role in fertility and embryonic development, not only under normal conditions, but also during heat shock. Interestingly, the *tiar-1*-dependent large gonad core granules induced by heat stress appeared not to be required to protect germ cells and embryos from heat shock. Our study suggests that germ cells possess *tiar-1*-dependent and *tiar-1*-independent mechanisms to protect the germline from a variety of stresses, including heat shock and starvation.

tiar-1 is important for embryonic viability

The TIA-1/TIAR family of proteins plays an important role in fertility. In mice, *Tiar* disruption results in incompletely penetrant background-dependent embryonic lethality (Beck *et al.* 1998; Piecyk *et al.* 2000). Surviving *Tiar* null mutant mice produce few primordial germ cells, but these germ cells do not populate the gonads, leading to male and female sterility (Beck *et al.* 1998). In contrast, *Tia-1* null mice are fully fertile (Piecyk *et al.* 2000). In *C. elegans*, it had been reported that a putative loss-of-function *tiar-1* allele, *tm361*, causes temperature-sensitive sterility (Silva-García and Navarro 2013; Rousakis *et al.* 2014). In this work, we found that *tiar-1* null mutants can be fertile at all temperatures at which *C. elegans* is typically cultivated, but that a closely linked mutation likely exacerbates the infertility phenotype in the original *tiar-1(tm361)* strain. Further, we verified a role for *tiar-1* in fertility by generating a new loss-of-function allele, *tiar-1(tn1543)*, using CRISPR-Cas9 genome editing. *tiar-1(0)* mutant animals were fertile at 20°, but ~20% of them were infertile when grown at 25° (Table S3). Interestingly, the loss of the three *tiar* paralogs (*tiar-1-3*) did not lead to a substantial decrease in fertility. Importantly, the brood size of single *tiar-1*, double, and, particularly, triple mutant animals was significantly smaller than that of the wild type. Even when these mutant animals produce gametes, their fertility is severely compromised. Although *tiar-1*, the closest homolog to the mammalian genes, has the most evident role in *C. elegans* fertility, our results suggest that *tiar-2* and *tiar-3* are redundant with *tiar-1* to some degree.

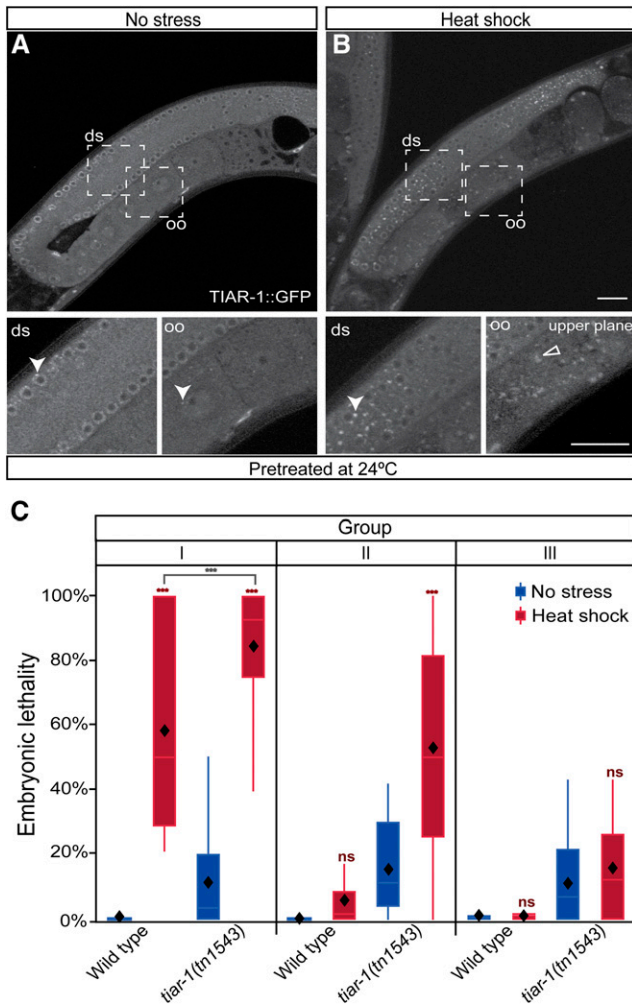


Figure 9 *tiar-1* protects female germ cells and embryos from heat shock independently of gonad core granules. Pretreated *tiar-1::gfp* animals (grown at 24°) were imaged using confocal microscopy. Representative images show gonads of animals (A) not exposed to stress, and (B) exposed to heat shock (31° for 3 hr). The photomicrograph in (B) is representative of animals that formed very small granules in the core gonad and normal granules in oocytes. However, most of the pretreated animals did not form core granules after the heat shock (Table 4). Arrowheads indicate likely P granules and empty triangles oocytes granules. Scale bar, 10 μ m. (C) Pretreated wild-type and *tiar-1(tm1543)* hermaphrodites were exposed to heat shock (3 hr at 31°) or kept at 20° as a control. After, their progeny were sorted into three groups (as in Figure 7A). Embryonic lethality was quantified for all the groups (C). Embryos not hatching within 24 hr after being laid were considered inviable. The graphs show the data obtained from three independent replicates. The *tiar-1(tm1543)* animals included in this experiment were representative of the total population (see Table 4); we did not prescreen or exclude the small fraction of animals containing small granules in the gonad core. The boxes represent the 25–75% interquartile range, the diamonds the mean value, and the whiskers extend from the upper to the lower values. The *** ($P < 0.001$) and ns (nonsignificant) symbols placed on top of the boxes are comparisons between no-stress and stress groups, whereas the ones placed above them are comparisons between the stress groups. Least square means, Tukey HSD test.

The TIA-1/TIAR-family of proteins is also important for embryonic development. Both *Tiar* and *Tia-1* null mutant mice result in incompletely penetrant embryonic lethality (50–100%), as does *Tiar* over-expression (Beck *et al.* 1998; Piecyk *et al.* 2000; Kharraz *et al.* 2010).

Moreover, mice lacking both *Tia-1* and *Tiar* die before embryonic day 7, which indicates that both of these proteins play important roles in embryonic development (Piecyk *et al.* 2000). In this work we obtained similar results to what has been reported for mice; the loss of *tiar-1* causes partially penetrant and temperature-sensitive embryonic lethality and the simultaneous loss of *tiar-1-3* further increases embryonic lethality in *C. elegans* (Table S3). Our observation of defects in meiosis during oogenesis provides a plausible explanation for this embryonic lethality. We observed a high incidence of males in *tiar-1(0)* mutants, which results from the nondisjunction of X chromosomes (Table 1). The precise role of TIAR-1 in oocyte meiosis and embryonic development remains to be determined.

TIAR-1 forms stress-induced granules in the gonad

In response to stress and prolonged meiotic arrest, cytoplasmic granules are formed in the gonad core and oocytes of *C. elegans* adults (for review, see Schisa 2014). Both kinds of granules contain mRNA and RNA-binding proteins, such as CGH-1, PUF-5, VBH-1, CAR-1, OMA-1, and MEX-3, as well as Dicer (Boag *et al.* 2008; Jud *et al.* 2008; Noble *et al.* 2008; Beshore *et al.* 2011; Schisa 2012; Paz-Gómez *et al.* 2014; Spike *et al.* 2014). Poly(A) mRNA, as well as a few specific mRNAs, have been observed to localize to RNP granules in the gonad (Schisa *et al.* 2001; Noble *et al.* 2008; Spike *et al.* 2014). For example, *rme-2* mRNA was found to be associated to the granules only where it is translationally repressed (gonad core), but was not associated to the granules where it is translated (*i.e.*, in oocytes; Noble *et al.* 2008). Besides, at least one protein has been described to associate with oocyte but not gonad core RNP granules: DCAP-2 (Noble *et al.* 2008). In this work, we demonstrated that TIAR-1 associates with both groups of granules during heat shock, starvation, and prolonged meiotic arrest conditions, which enabled us to further study the behavior of these granules.

Mammalian stress-induced granules are dynamic structures that depend on translation (Kedersha *et al.* 2000). In *C. elegans*, TIAR-1 granules in somatic cells dissociate after recovery from stress as well (Rousakis *et al.* 2014). In this work, we provide further evidence showing that the stress-induced granules in the *C. elegans* gonad behave like their mammalian counterparts. The TIAR-1-containing stress-induced granules in both the gonad core and oocytes also dissociated after recovery from stress (3 hr after starvation and 4 hr after heat shock). Similarly, oocyte granules induced by prolonged meiotic arrest dissociate within 60 min of the resumption of meiosis triggered by major sperm protein signaling (Jud *et al.* 2008). We found that the formation of TIAR-1-containing stress-induced gonad granules depended on translation. These granules dissociated in animals treated with cycloheximide, which is a polysome-stabilizer. Further, puromycin treatment, which destabilizes polysomes, induces the formation of TIAR-1-containing granules in the germline even in the absence of stress (Figure 5).

In mammalian cells, TIA-1 is required for normal stress granule formation (Kedersha *et al.* 1999; Gilks *et al.* 2004). Our results show that, in *C. elegans*, *tiar-1* is required for the formation of stress-induced granules only in the gonad core (Figure 7). Interestingly, even in the absence of *tiar-1*, oocyte granules continued to form. Further, our immunostaining experiments suggest that TIAR-1 and CGH-1 do not exclusively colocalize and that some CGH-1-containing granules form in oocytes in stressful conditions in the absence of TIAR-1. These findings suggest that gonad core and oocytes granules might form using distinct mechanisms. Consistent with this hypothesis, only oocyte RNP granules have been described as utilizing nuclear envelope blebbing and requiring nucleoporins for their formation (Patterson *et al.* 2011). Furthermore, a small proportion of *tiar-1(0)* animals still formed gonad core granules, and neither

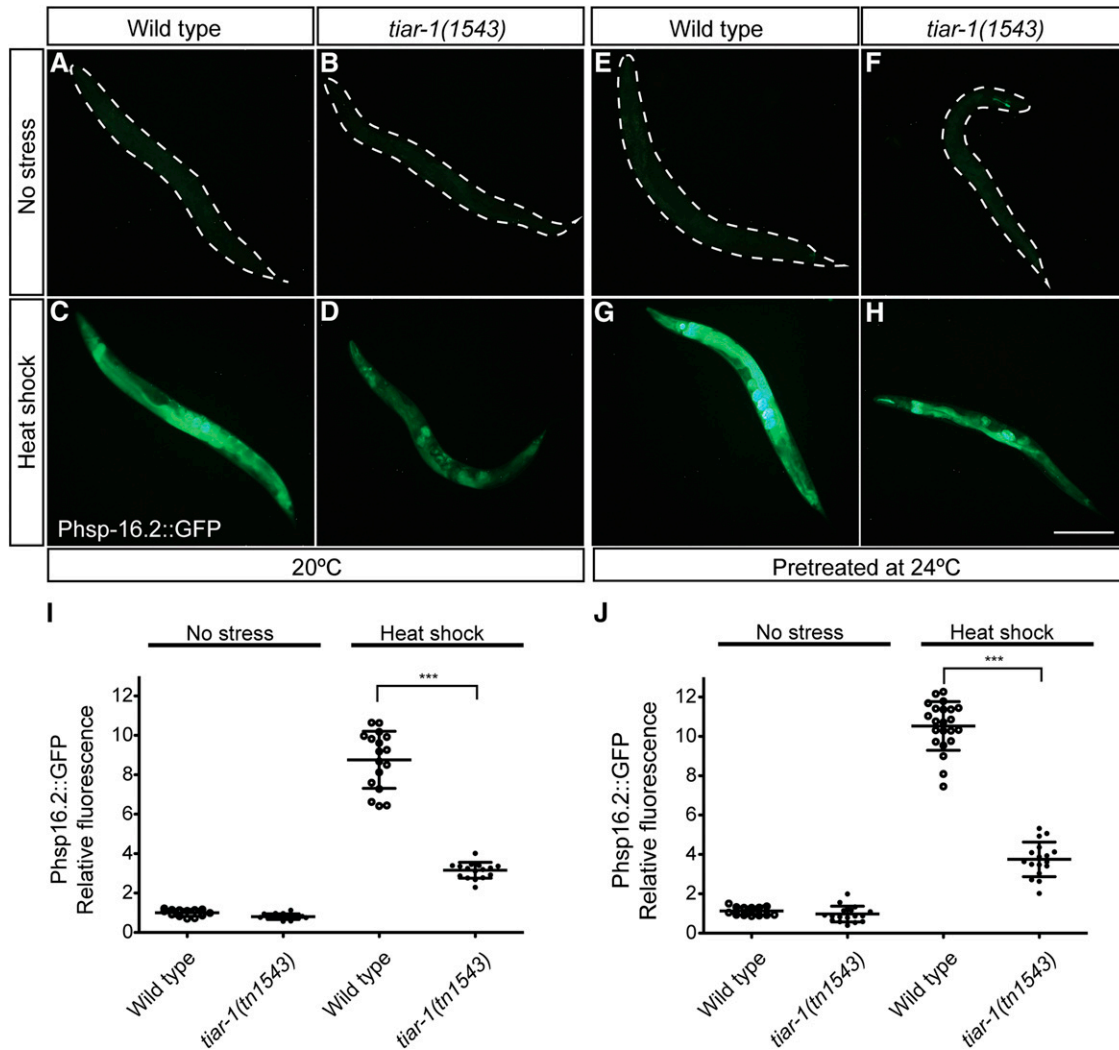


Figure 10 *tiar-1(tn1543)* mutant animals respond weakly to heat shock. Expression of *hsp-16.2::gfp* was assessed in *tiar-1(1543)* animals and normal controls. Strains carrying the *gpls1[hsp-16.2::gfp]* insertion were grown either at 20° or pretreated at 24°. Then these animals were cultured under normal conditions (no stress) (A, B and E, F) or exposed to heat shock (3 hr at 31°) (C, D and G, H). Afterward, the animals were mounted and imaged using fluorescence microscopy. Photomicrographs of representative animals for each strain and condition were taken using the same exposure settings. The fluorescence of GFP (arbitrary units) was quantified for each of the genotypes and conditions. The values were normalized relative to the fluorescence of wild-type animals, grown at 20° in normal conditions. The data of one of three independent replicates with similar results are shown. One-way ANOVA *** $P < 0.001$.

tiar-2 nor *tiar-3* significantly influenced the formation of these granules (Table 3). These results suggest the existence of a *tiar*-independent granule formation mechanism. One possibility is that P granule components also play a role in normal gonad granule formation, as has been shown for CGH-1 and CAR-1 on prolonged meiotic arrest granules (Noble *et al.* 2008; Hubstenberger *et al.* 2013, 2015). Another possibility is that other proteins with intrinsically disordered domains induce stress granule formation in the *C. elegans* gonad, just as the MEG (maternal-effect germline defective) proteins promote P-granule assembly in early *C. elegans* embryos (Wang *et al.* 2014), and G3BP, a phosphorylation-dependent endo-ribonuclease that interacts with RasGAP, promotes stress granule assembly in mammalian cells (Tourrière *et al.* 2003).

***tiar-1* protects female germ cells and embryos from heat shock**

In *C. elegans*, oocytes grow and obtain their cytoplasm, organelles, and other components via actin-dependent cytoplasmic streaming from the

gonad core (Wolke *et al.* 2007). Stress granules form in both the gonad core and oocytes (this work; Boag *et al.* 2008; Jud *et al.* 2008; Noble *et al.* 2008). It has been proposed that stress granules might protect mRNAs from degradation, which would ultimately be introduced into maturing oocytes to support embryogenesis after fertilization (for review, see Schisa 2014). This process might be crucial for embryonic development because embryos rely on maternally contributed mRNAs to start embryogenesis (for review, see Farley and Ryder 2008). Given the relevance of TIA-1/TIAR to mRNA regulation under stressful conditions, we hypothesized that a lack of *tiar-1* might have detrimental effects on germ cells and embryos exposed to stress. After recovery from the heat shock, wild-type germ cells developed into viable embryos but a significant proportion of *tiar-1(0)* germ cells did not (Figure 8B and Figure 9C). Thus, *tiar-1* promotes reproduction under heat stress. Our assay was designed to evaluate the roles of *tiar-1* in developing oocytes under heat shock. Future studies are needed to determine if *tiar-1* protects developing male germ cells from stress as well.

It has been a challenge to separate the function of stress granules from the function of their individual components (for review, see Buchan and Parker 2009). In *C. elegans*, there is evidence that the stress granules formed in oocytes during prolonged meiotic arrest are not detrimental to embryogenesis (Jud *et al.* 2008). In another study, the silencing of *kgb-1* (a member of the JNK subfamily of MAP kinases) led to a low-penetrance lack of oocyte granules (Patterson *et al.* 2011). These oocytes deficient for oocyte granules give rise to embryos that died more often than those with normal numbers of granules (Patterson *et al.* 2011). Nevertheless, the cause of the increase in embryonic lethality is unclear; some oocytes could be affected by the absence of *kgb-1* in processes that are distinct from granule formation. Unexpectedly, our results suggest that gonad core granules might be dispensable for TIAR-1 to protect oocytes from heat shock. We found that wild-type germ cells were able to form viable embryos after heat shock, even in pretreated animals in which large gonad core granules are largely absent (Figure 8B and Figure 9C, Groups II). Further, *tiar-1* mutant animals were similarly sensitive to heat shock irrespective of the temperature at which they were grown. Together, these results are consistent with the idea that large core granules are not essential for the protection of germ cells and embryos from heat stress. Nonetheless, we did observe that some pretreated animals formed small TIAR-1-containing granules in the gonad core (Figure 9B). Further, we observed that some CGH-1-containing granules could form in oocytes after heat shock in the absence of TIAR-1. Thus far, we cannot rule out the possibility that these granules are sufficient to protect germ cells from heat shock.

Interesting findings in mammalian cells suggest that the formation of stress granules is not crucial for mRNA turnover and stabilization (Ohn *et al.* 2008; Bley *et al.* 2014). mRNA turnover from the polysomal to the monosomal fraction under stress is not altered when factors needed for stress-granule formation are silenced (Ohn *et al.* 2008). Similarly, even when stress granules are not formed, the block in translation under stress remains unaffected (Bley *et al.* 2014). A parallel situation occurs with P bodies; even when their formation is disrupted, RNA-mediated gene silencing can still occur, suggesting that dispersed components are competent to perform their function (Eulalio *et al.* 2007).

It is likely that *tiar-1* is needed for the normal response to heat shock in *C. elegans*. Possibly, heat-shocked *tiar-1(0)* mutant oocytes might not be able to cope with heat stress because they sustain cellular damage or are not proficient in damage repair. Using a somatic marker for heat shock, we provide evidence that *tiar-1* mutants are defective in the systemic heat-shock response. The extent to which this systemic defect contributes to the failure of *tiar-1* mutants to form stress-induced granules and protect germ cells from stress is unclear. Alternatively, it might be that the formation of TIAR-1-containing granules contributes in some manner to the robustness of the heat-shock response. Future biochemical studies will be important for delineating the molecular mechanisms by which TIAR-1 protects female germ cells from heat stress in *C. elegans*.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the members of the Navarro and Greenstein labs for their insightful comments on the development of this project. Thanks also to Jack Powers for his helpful comments on the manuscript. We also thank WormBase release WS204 (July 29, 2009) for gathering information and making it available. This work was supported by grants from PAPIIT-UNAM (Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, Universidad Nacional Autónoma de México; IN207412 and IN207415), Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)-MEXICO (103856-Q and

220987), and Fundación Miguel Alemán in collaboration with UNAM to R.E.N. This work was also supported by National Institutes of Health (NIH) grants GM57173 and NS095109 to D.G. G.H.M. is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, UNAM, and received fellowships 315426 and 317550 from CONACyT. G.H.M. received additional financial support from the Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) program and PAPIIT-UNAM (IN207415). We thank the Caenorhabditis Genetics Center (CGC), which is funded by NIH Office of Research Infrastructure Programs (P40 OD010440), and the National Bioresource Project in Japan for kindly providing some strains used in this work.

LITERATURE CITED

- Angelo, G., and M. R. Van Gilst, 2009 Starvation protects germline stem cells and extends reproductive longevity in *C. elegans*. *Science* 326: 954–958.
- Anderson, P., and N. Kedersha, 2008 Stress granules: the Tao of RNA triage. *Trends Biochem. Sci.* 33: 141–150.
- Arribere, J. A., J. A. Doudna, and W. V. Gilbert, 2011 Reconsidering movement of eukaryotic mRNAs between polysomes and P bodies. *Mol. Cell* 44: 745–758.
- Beck, A. R. P., I. J. Miller, P. Anderson, and M. Streuli, 1998 RNA-binding protein TIAR is essential for primordial germ cell development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 2331–2336.
- Beshore, E. L., T. J. McEwen, M. C. Jud, J. K. Marshall, J. A. Schisa *et al.*, 2011 *C. elegans* Dicer interacts with the P-granule component GLH-1 and both regulate germline RNPs. *Dev. Biol.* 350: 370–381.
- Billi, A. C., S. E. J. Fischer, and J. K. Kim, 2014 Endogenous RNAi pathways in *C. elegans* (May 7, 2014), *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.170.1, <http://www.wormbook.org/10.1895/wormbook.1.170.1>
- Bley, N., M. Lederer, B. Pfalz, C. Reinke, T. Fuchs *et al.*, 2014 Stress granules are dispensable for mRNA stabilization during cellular stress. *Nucleic Acids Res.* 43: e26.
- Boag, P. R., A. Nakamura, and T. K. Blackwell, 2005 A conserved RNA-protein complex component involved in physiological germline apoptosis regulation in *C. elegans*. *Development* 132: 4975–4986.
- Boag, P. R., A. Atalay, S. Robida, V. Reinke, and T. K. Blackwell, 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.
- Brenner, S., 1974 The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77: 71–94.
- Buchan, J. R., and R. Parker, 2009 Eukaryotic stress granules: The ins and outs of translation. *Mol. Cell* 36: 932–941.
- Cheeseman, I. M., and A. Desai, 2005 A combined approach for the localization and tandem affinity purification of protein complexes from metazoans. *Sci. STKE* 2005: pl1.
- Dickinson, D. J., J. D. Ward, D. J. Reiner, and B. Goldstein, 2013 Engineering the *Caenorhabditis elegans* genome using Cas9-triggered homologous recombination. *Nat. Methods* 10: 1028–1034.
- Dixon, D. A., G. C. Balch, N. Kedersha, P. Anderson, G. A. Zimmerman *et al.*, 2003 Regulation of Cyclooxygenase-2 expression by the translational silencer TIA-1. *J. Exp. Med.* 198: 475–481.
- Eulalio, A., I. Behm-Ansmant, D. Schweizer, and E. Izaurralde, 2007 P-body formation is a consequence, not the cause, of RNA-mediated gene silencing. *Mol. Cell Biol.* 27: 3970–3981.
- Farley, B. M., and S. P. Ryder, 2008 Regulation of maternal mRNAs in early development. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 43: 135–162.
- Fox, P. M., and T. Schedl, 2015 Analysis of germline stem cell differentiation following loss of GLP-1 Notch activity in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 201: 167–184.
- Fox, P. M., V. E. Vought, M. Hanazawa, M.-H. Lee, E. M. Maine *et al.*, 2011 Cyclin E and CDK-2 regulate proliferative cell fate and cell cycle progression in the *C. elegans* germline. *Development* 138: 2223–2234.

- Förch, P., O. Puig, N. Kedersha, C. Martínez, S. Granneman *et al.*, 2000 The apoptosis-promoting factor TIA-1 is a regulator of alternative pre-mRNA splicing. *Mol. Cell* 6: 1089–1098.
- Friedland, A. E., Y. B. Tzur, K. M. Esvelt, M. P. Colaiácovo, G. M. Church *et al.*, 2013 Heritable genome editing in *C. elegans* via a CRISPR-Cas9 system. *Nat. Methods* 10: 741–743.
- Frøkjær-Jensen, C., M. W. Davis, C. E. Hopkins, B. J. Newman, J. M. Thummel *et al.*, 2008 Single-copy insertion of transgenes in *Caenorhabditis elegans*. *Nat. Genet.* 40: 1375–1383.
- Frøkjær-Jensen, C., M. W. Davis, M. Ailion, and E. M. Jorgensen, 2012 Improved Mos1-mediated transgenesis in *C. elegans*. *Nat. Methods* 9: 117–118.
- Gilks, N., N. Kedersha, M. Ayodele, L. Shen, G. Stoecklin *et al.*, 2004 Stress granule assembly is mediated by prion-like aggregation of TIA-1. *Mol. Biol. Cell* 15: 5383–5398.
- Hillers, K. J., V. Jantsch, E. Martínez-Perez, and L. Judith, 2015 Meiosis (May 26, 2015), in *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.178.1, <http://www.wormbook.org/10.1895/wormbook.1.178.1>
- Hodgkin, J., H. R. Horvitz, and S. Brenner, 1979 Nondisjunction mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 91: 67–94.
- Hope, I., 1999 *C. elegans: A practical approach*, Oxford University Press, New York.
- Hubstenberger, A., S. L. Noble, C. Cameron, and T. C. Evans, 2013 Translation repressors, an RNA helicase, and developmental cues control RNP phase transitions during early development. *Dev. Cell* 27: 161–173.
- Hubstenberger, A., C. Cameron, S. L. Noble, S. Keenan, and T. C. Evans, 2015 Modifiers of solid RNP granules control normal RNP dynamics and mRNA activity in early development. *J. Cell Biol.* 211: 703–716.
- Izquierdo, J. M., N. Majós, S. Bonnal, C. Martínez, R. Castelo *et al.*, 2005 Regulation of Fas alternative splicing by antagonistic effects of TIA-1 and PTB on exon definition. *Mol. Cell* 19: 475–484.
- Jaramillo-Lambert, A., M. Ellefson, A. M. Villeneuve, and J. Engebrecht, 2007 Differential timing of S phases, X chromosome replication, and meiotic prophase in the *C. elegans* germ line. *Dev. Biol.* 308: 206–221.
- Jud, M. C., M. J. Czerwinski, M. P. Wood, R. A. Young, C. M. Gallo *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.
- Kedersha, N. L., M. Gupta, W. Li, I. Miller, and P. Anderson, 1999 RNA-binding proteins TIA-1 and TIAR link the phosphorylation of eIF-2 α to the assembly of mammalian stress granules. *J. Cell Biol.* 147: 1431–1442.
- Kedersha, N., M. R. Cho, W. Li, P. W. Yacono, S. Chen *et al.*, 2000 Dynamic shuttling of TIA-1 accompanies the recruitment of mRNA to mammalian stress granules. *J. Cell Biol.* 151: 1257–1268.
- Kedersha, N., G. Stoecklin, M. Ayodele, P. Yacono, J. Lykke-Andersen *et al.*, 2005 Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. *J. Cell Biol.* 169: 871–884.
- Kharraz, Y., P.-A. Salmund, A. Camus, J. Auriol, C. Gueydan *et al.*, 2010 Impaired embryonic development in mice overexpressing the RNA-binding protein TIAR. *PLoS One* 5: e11352.
- Kim, S., C. Spike, and D. Greenstein, 2013 Control of oocyte growth and meiotic maturation in *Caenorhabditis elegans*. *Adv. Exp. Med. Biol.* 757: 277–320.
- Kumar, A. O., M. C. Swenson, M. M. Benning, and C. L. Kielkopf, 2008 Structure of the central RNA recognition motif of human TIA-1 at 1.95 Å resolution. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 367: 813–819.
- Maduro, M., and D. Pilgrim, 1996 Conservation of function and expression of *unc-119* from two *Caenorhabditis* species despite divergence of non-coding DNA. *Gene* 183: 77–85.
- Navarro, R. E., E. Y. Shim, Y. Kohara, A. Singson, and T. K. Blackwell, 2001 *cgh-1*, a conserved predicted RNA helicase required for gametogenesis and protection from physiological germline apoptosis in *C. elegans*. *Development* 128: 3221–3232.
- Noble, S. L., B. L. Allen, L. K. Goh, K. Nordick, and T. C. Evans, 2008 Maternal mRNAs are regulated by diverse P body-related mRNP granules during early *Caenorhabditis elegans* development. *J. Cell Biol.* 182: 559–572.
- Nousch, M., and C. R. Eckmann, 2013 Translational control in the *Caenorhabditis elegans* germ line. *Adv. Exp. Med. Biol.* 757: 205–247.
- Ohn, T., N. Kedersha, T. Hickman, S. Tisdale, and P. Anderson, 2008 A functional RNAi screen links O-GlcNAc modification of ribosomal proteins to stress granule and processing body assembly. *Nat. Cell Biol.* 10: 1224–1231.
- Okkema, P. G., and J. Kimble, 1991 Molecular analysis of *tra-2*, a sex determining gene in *C. elegans*. *EMBO J.* 10: 171–176.
- Patterson, J. R., M. P. Wood, and J. A. Schisa, 2011 Assembly of RNP granules in stressed and aging oocytes requires nucleoporins and is coordinated with nuclear membrane blebbing. *Dev. Biol.* 353: 173–185.
- Paz-Gómez, D., E. Villanueva-Chimal, and R. E. Navarro, 2014 The DEAD Box RNA helicase VBH-1 is a new player in the stress response in *C. elegans*. *PLoS One* 9: e97924.
- Pazdernik, N., and T. Schedl, 2013 Introduction to germ cell development in *Caenorhabditis elegans*. *Adv. Exp. Med. Biol.* 757: 1–16.
- Pieczyk, M., S. Wax, A. R. P. Beck, N. Kedersha, M. Gupta *et al.*, 2000 TIA-1 is a translational silencer that selectively regulates the expression of TNF- α . *EMBO J.* 19: 4154–4163.
- Rea, S. L., D. Wu, J. R. Cypser, J. W. Vaupel, and T. E. Johnson, 2005 A stress-sensitive reporter predicts longevity in isogenic populations of *Caenorhabditis elegans*. *Nat. Genet.* 37: 894–898.
- Rousakis, A., A. Vlanti, F. Borbolis, F. Roumelioti, M. Kapetanou *et al.*, 2014 Diverse functions of mRNA metabolism factors in stress defense and aging of *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One* 9: e103365.
- Sando, R., K. Baumgaertel, S. Pieraut, N. Torabi-Rander, T. J. Wandless *et al.*, 2013 Inducible control of gene expression with destabilized Cre. *Nat. Methods* 10: 1085–1088.
- Schedl, T., and J. Kimble, 1988 *fog-2*, a germ-line-specific sex determination gene required for hermaphrodite spermatogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 119: 43–61.
- Schisa, J. A., J. N. Pitt, and J. R. Priess, 2001 Analysis of RNA associated with P granules in germ cells of *C. elegans* adults. *Development* 128: 1287–1298.
- Schisa, J. A., 2012 New Insights into the regulation of RNP granule assembly in oocytes. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 295: 233–289.
- Schisa, J. A., 2014 Effects of stress and aging on ribonucleoprotein assembly and function in the germ line. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* 5: 231–246.
- Seidel, H. S., and J. Kimble, 2011 The oogenic germline starvation response in *C. elegans*. *PLoS One* 6: e28074.
- Silva-García, C. G., and R. E. Navarro, 2013 The *C. elegans* TIA-1/TIAR homolog TIAR-1 is required to induce germ cell apoptosis. *Genesis* 51: 690–707.
- Spike, C. A., D. Coetzee, Y. Nishi, T. Guven-Ozkan, M. Oldenbroek *et al.*, 2014 Translational control of the oogenic program by components of OMA ribonucleoprotein particles in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 198: 1513–1533.
- Sun, A. Y., and E. J. Lambie, 1997 *gon-2*, a gene required for gonadogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 147: 1077–1089.
- Sun, Y., P. Yang, Y. Zhang, X. Bao, J. Li *et al.*, 2011 A genome-wide RNAi screen identifies genes regulating the formation of P bodies in *C. elegans* and their functions in NMD and RNAi. *Protein Cell* 2: 918–939.
- Tourrière, H., K. Chebli, L. Zekri, B. Courselaud, J. M. Blanchard *et al.*, 2003 The RasGAP-associated endoribonuclease G3BP assembles stress granules. *J. Cell Biol.* 160: 823–831.
- Wang, J. T., J. Smith, B.-C. Chen, H. Schmidt, D. Rasoloson *et al.*, 2014 Regulation of RNA granule dynamics by phosphorylation of serine-rich, intrinsically disordered proteins in *C. elegans*. *eLife* 3: e04591.
- Waris, S., M. C. J. Wilce, and J. Wilce, 2014 RNA recognition and stress granule formation by TIA proteins. *Int. J. Mol. Sci.* 15: 23377–23388.
- Wilczynska, A., C. Aigueperse, M. Kress, F. Dautry, and D. Weil, 2005 The translational regulator CPEB1 provides a link between dcp1 bodies and stress granules. *J. Cell Sci.* 118: 981–992.
- Wolke, U., E. A. Jezuit, and J. R. Priess, 2007 Actin-dependent cytoplasmic streaming in *C. elegans* oogenesis. *Development* 134: 2227–2236.

Communicating editor: D. S. Fay