



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO

UNAM  
POSGRADO

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO  
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

**“EL PAPEL DE LA HELICASA DE RNA  
VBH-1 EN EL DESARROLLO DE LA  
LÍNEA GERMINAL DEL NEMATODO  
*Caenorhabditis elegans*”**

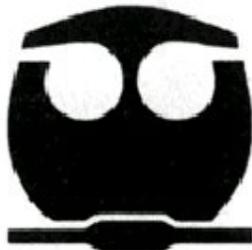
**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)**

**P R E S E N T A:**

**LAURA SILVIA SALINAS VELÁZQUEZ**



**DIRECTORA DE TESIS:**  
DRA. ROSA ESTELA NAVARRO GONZÁLEZ

México, D. F. Junio del 2008



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.



## PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

ENTIDADES ACADÉMICAS FACULTAD DE QUÍMICA  
E INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

Of. No. PMDCB/683/2007

**BIÓL. LAURA SILVIA SALINAS VELÁZQUEZ**  
Alumna del Programa en Ciencias Bioquímicas  
**P r e s e n t e**

Los miembros del Subcomité Académico, en reunión extraordinaria del día 13 de agosto del presente año, conocieron su solicitud de asignación de JURADO DE EXAMEN para optar por el grado de MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICA), con la tesis titulada "El papel de la helicasa de RNA VBH-1 en el desarrollo de la línea germinal del nematodo *Caenorhabditis elegans*", dirigida por la Dra. Rosa Estela Navarro González.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado:

PRESIDENTE	Dr. Jorge Vázquez Ramos
VOCAL	Dr. Jesús Aguirre Linares
SECRETARIO	Dra. Tzvetankla Dimitrova Dinkova
SUPLENTE	Dra. Marina Macías Silva
SUPLENTE	Dr. Jaime Iván Velasco Velázquez

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

**Atentamente**  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Cd. Universitaria, D.F., a 14 de agosto de 2007.  
**EL COORDINADOR DE LA ENTIDAD ACADÉMICA**

  
**DR. ROGELIO RODRÍGUEZ SOTRES**

C.c.p. Archivo



## DEDICATORIAS

Con especial cariño dedico este trabajo a la persona que me enseñó desde pequeña el valor de muchas cosas, a esforzarme por salir adelante cada día y a quien admiro por su gran valor y fuerza para seguir con nosotros, pese a todo. A ella, porque solo a ella le debo, admiro y quiero tanto que sin su apoyo nada hubiera sido posible. Para ti, porque aunque ya no estamos tan cerca como antes, siempre estarás conmigo. Gracias por quererme tanto. **A mi mamá**

Es común que el director de tesis reciba un agradecimiento formal por todo el apoyo que brinda a lo largo de la realización del trabajo. Pero en mi caso, además de agradecerte por todo el apoyo académico, debo señalar una dedicatoria especial y con cariño porque eres sin duda una de las personas a la que debo tantas cosas. Por apoyarme siempre, por tu confianza y por tu amistad y porque sé que la intención de cada una de tus palabras y consejos siempre son para hacer de mi una mejor persona. Por enseñarme tantas cosas y porque de verdad te aprecio. **A Rosa**

Porque en todo este tiempo has sabido apoyarme en todas aquellas cosas importantes en mi vida. Por el gran cariño y cuidado que me has brindado todos estos años y porque en esta nueva faceta eres sin duda una pieza importante tanto en mi vida como en mi corazón. Debo agradecerte de manera especial por todas esas cosas que siempre procuras hacer para que mi vida marche siempre mejor. Gracias por dejar que nuestras vidas sigan juntas y por quererme tanto como lo hago yo. **A Raúl**

## AGRADECIMIENTOS

Esta tesis de maestría se realizó bajo la dirección de la Dra. Rosa Estela Navarro González en el Departamento de Biología Celular del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El proyecto recibió apoyo de los donativos PAPIIT-UNAM IN220306 y CONACYT 41518-Q y 50896-Q. Durante los estudios de maestría goce de una beca otorgada por CONACYT para la realización de la presente tesis.

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

Agradecemos al Comité Tutorial, por asesorar el desarrollo de esta tesis así como por sus valiosas aportaciones para la realización de este trabajo, el cual estuvo formado por:

Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova	Facultad de Química, UNAM
Dr. Félix Recillas Targa	Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Agradecemos a los sinodales que formaron parte del comité evaluador por sus comentarios y sugerencias durante la revisión de este trabajo, el cual está formado por:

Dr. Jorge Vázquez Ramos	Facultad de Química, UNAM
Dr. Jesús Aguirre Linares	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova	Facultad de Química, UNAM
Dra. Marina Macías Silva	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dr. Jaime Iván Velasco Velázquez	Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Agradecemos al Dr. Ernesto Maldonado Olvera por sus excelentes aportaciones y observaciones en la realización de este trabajo.

Agradecemos a la M. en C. Marta Castro Manreza por su ayuda en la elaboración de la figura 5 de este trabajo.

## ABREVIATURAS UTILIZADAS

Ala	alanina, aminoácido
alfa-dCTP <sup>32</sup> P	nucleótido citosina marcado radiactivamente
Arg	arginina, aminoácido
Asp	ácido aspártico, aminoácido
ATP	adenosin trifosfato
BSA	albúmina de suero de bovino
cDNA	DNA complementario
Cys	cisteína, aminoácido
DAPI	4',6-diamidino-2-fenil-indol
dATP	2'-deoxi-adenosin 5'-trifosfato
DEAD	dominio conservado (Asp-Glu-Ala-Asp)
DEPC	dietilpirocarbonato
dGTP	2'-deoxi-guanosin 5'-trifosfato
DNA	ácido desoxirribonucleico
DTCs	células del extremo distal
dTTP	2'-deoxi-timidin 5'-trifosfato
dUTP-Cy3	deoxinucleótido T marcado con un fluoróforo (cianina roja)
dUTP-Cy5	deoxinucleótido T marcado con un fluoróforo (cianina verde)
EGTA	etileno glicol-bis beta-aminoetil-eter N,N,N'N'-ácido tetra acético
EtBr	bromuro de etidio
Emo	ovocitos endomitóticos
Glu	ácido glutámico, aminoácido
Gly	glicina aminoácido
HEPES	N-2-Hydroxyethyl piperazine-N'-2-etanosulfónico
IPTG	isopropil beta-tiogalactosidasa
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	fosfato de potasio dibásico
LB	Medio Luria Bertani
Lys	lisina, aminoácido
MgSO <sub>4</sub>	sulfato de magnesio
MOPS	3-N' ácido morfolino propanosulfónico
RNA <sub>m</sub>	RNA mensajero
NaF	fluoruro de sodio
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	fosfato monosódico
NaOH	hidróxido de sodio
NaPPi	pirofosfato de sodio
NaVO <sub>4</sub>	vanadato de sodio
NGM-Lite	medio para crecer gusanos (Nematode Grow medium)
OP50-1	cepa de <i>Escherichia coli</i> OP50-1
PBT	PBS + Tween
PBT/NGS	Normal Goat Serum (Suero de Cabra) en PBT
PMSF	fluoruro de fenilmetil sulfonilo

PSA	presulfato de amonio
PVP	polivinil pirrolidona
RNA	ácido ribonucléico
RNAi	interferencia de RNA
SDS	dodecil sulfato de sodio
SSC 20X	solución de hibridación para RNA
TEMED	N, N, N', N- Tetrametiletilenidaimina
Tween	Polioxietileno sorbitan-monolaurato
Z1 y Z4	precursores celulares del linaje somático
Z2 y Z3	precursores celulares de la línea germinal

## SIGLAS DE GENES

CGH-1	Por sus siglas en inglés <i>Conserved Germline Helicase</i> . Proteína necesaria para la función de ovocito y esperma así como para la prevención de la apoptosis fisiológica de las células germinales.
Ded1p	Homólogo de Vasa en <i>Sacharomyces cerevisiae</i> .
eIF4E	Por sus siglas en inglés <i>eukaryotic Initiation Factor 4E (eIF4E) Family</i> . Factor de inicio de la traducción.
eIF5B	Por sus siglas en inglés <i>eukaryotic Initiation Factor 5B (eIF5B)</i> . Factor de inicio de la traducción.
FEM-1	Por sus siglas en inglés <i>Feminization of XX and XO animal</i> . Proteína necesaria para la masculinización de la línea germinal y del linaje somático.
FEM-3	Por sus siglas en inglés <i>Feminization of XX and XO animal</i> . Proteína que promueve el desarrollo de machos.
FOG-2	Por sus siglas en inglés <i>Feminization Of Germline</i> . Proteína necesaria para promover la espermatogénesis.
GLD-1	Por sus siglas en inglés <i>Defective in Germ Line Development</i> . Codifica una proteína con un motivo de unión a RNA y cuya función es importante durante la ovogénesis y gametogénesis.
GLH (1-4)	Por sus siglas en inglés <i>Germ-Line Helicase</i> . El gen codifica una helicasa de RNA perteneciente a la familia DEAD-box, contiene dedos de zinc y es necesaria para la fertilidad y desarrollo de las células germinales. Regula la proliferación, la ovogénesis así como la producción de esperma.
GLP-4	Por sus siglas en inglés <i>abnormal Germ Line Proliferation</i> . Proteína cuya función es necesaria para la progresión y proliferación de las células germinales.
HIM-8	Por sus siglas en inglés <i>High Incidence of Males</i> . Proteína involucrada en la regulación y segregación del cromosoma X.
IFE (1-5)	Por sus siglas en inglés <i>Initiation Factor E Family</i> . Proteínas de unión al cap de los mRNAs.
MEX (1,3)	Por sus siglas en inglés <i>Muscle Excess</i> . Proteína con dedos de zinc CCCH necesaria para la segregación de los gránulos P, la formación de las células germinales y la diferenciación de las células somáticas durante la embriogénesis.

- Mvh Por sus siglas en inglés *Mouse vasa helicase*. Proteína necesaria para la determinación de las células germinales en ratón.
- NOS (1,2) Por sus siglas en inglés *Nanos related*. Proteína con dedos de zinc necesaria para el desarrollo de las células germinales primordiales.
- OMA (1-3) Por sus siglas en inglés *Oocyte Maturation defective*. Proteína con dedos de zinc necesaria para la maduración de los ovocitos.
- PAL-1 Por sus siglas en inglés *Posterior Alae in male*. Se requiere para la especificación de los linajes celulares así como para la diferenciación posterior adecuada durante la embriogénesis.
- PGL (1-3) Por sus siglas en inglés *P Granule abnormality*. Proteína con un motivo RGG necesario para la unión a mRNAs específicos.
- PIE-1 Por sus siglas en inglés *Pharynx and Intestine in Excess*. Proteína con dedos de zinc necesaria para la determinación de la línea germinal.
- POS-1 Por sus siglas en inglés *Posterior Segregation*. Proteína con dedos de zinc CCCH esencial para la especificación de las células germinales.
- RRF-1 Por sus siglas en inglés *RNA-dependent RNA polymerase Family*. Polimerasa requerida para la maquinaria de RNAi.
- SKN-1 Por sus siglas en inglés *Skinhead*. Es un factor de transcripción necesario para la especificación de los blastómeros EMS.
- VBH-1 Por sus siglas en inglés *Vasa and Belle-like Helicase*.

## INDICE

<b>R E S U M E N</b> .....	12
<b><u>1. INTRODUCCIÓN</u></b> .....	13
1.1. EL NEMÁTODO <i>Caenorhabditis elegans</i> como modelo EXPERIMENTAL .....	13
1.2. DESARROLLO DE LA GÓNADA SOMÁTICA Y LA LÍNEA GERMINAL .....	14
1.2.1. LA GÓNADA DEL HERMAFRODITA .....	18
1.2.2. LA GÓNADA DEL MACHO.....	19
1.3. LOS COMPONENTES DE LOS GRÁNULOS P EN LA LÍNEA GERMINAL DE <i>C. elegans</i> .....	20
1.4. LAS HELICASAS DE RNA DE LA FAMILIA DEAD .....	23
1.4.1. LAS HELICASAS DE RNA Y LAS CÉLULAS GERMINALES .....	24
<b><u>2. HIPÓTESIS</u></b> .....	27
<b><u>3. OBJETIVO GENERAL</u></b> .....	27
3.1. OBJETIVOS PARTICULARES .....	27
<b><u>4. MATERIALES Y MÉTODOS</u></b> .....	28
4.1. MANTENIMIENTO DE NEMÁTODOS Y CEPAS UTILIZADAS .....	28
4.2. INDUCCIÓN DE RNA DE DOBLE CADENA EN BACTERIAS PARA HACER RNAi POR ALIMENTACIÓN (PROTOCOLO EN MEDIO LÍQUIDO).....	28
4.3. INTERFERENCIA DE RNA DE GENES ESPECÍFICOS DE LÍNEA GERMINAL (PROTOCOLO EN CAJAS CON MEDIO SÓLIDO) .....	30
4.4. OBTENCIÓN DE MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS CON MICROARREGLOS DE DNA. ....	30
4.5. MONTAJE DE NEMÁTODOS EN PLACAS DE AGAR Y MICROSCOPIA TIPO NOMARSKI.....	33

	10
4.6. ENSAYOS DE INMUNOTINCIONES .....	34
4.7. TINCIÓN CON DAPI .....	35
4.8. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS .....	35
4.9. ANÁLISIS TIPO WESTERN BLOT.....	37
4.10. ANÁLISIS DE PROGENIE .....	38
4.11. ANÁLISIS TIPO NORTHERN BLOT .....	40
4.12. OBTENCIÓN DE DNA (PLÁSMIDO) PARA LA SÍNTESIS DE SONDAS RADIATIVAS.....	42
4.13. ANÁLISIS DE RESULTADOS OBTENIDOS CON MICROARREGLOS EN <i>C. elegans</i> .....	44
<b><u>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u></b> .....	<b>46</b>
5.1. VBH-1 ES UNA PROTEÍNA ESPECÍFICA DE LA LÍNEA GERMINAL DE <i>C. elegans</i> .....	46
5.2. LA FALTA DE VBH-1 CAUSA DEFECTOS EN LA FERTILIDAD Y LA EMBRIOGÉNESIS.....	49
5.3. LAS CÉLULAS GERMINALES DE LOS HERMAFRODITAS ADULTOS <i>vbh- 1(RNAi)</i> NO PRESENTAN DEFECTOS EN LA MITOSIS NI EN LA MEIOSIS.....	56
5.4. LA AUSENCIA DE VBH-1 AFECTA LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE DIVERSOS GENES.....	57
5.4.1. LA FALTA DE LAS PROTEÍNAS DE UNIÓN A RNA Y DNA AFECTA LA FUNCIÓN DE LA LÍNEA GERMINAL.....	66
5.4.3. GENES CUYA AUSENCIA CAUSA LA ACUMULACIÓN DE OVOCITOS EN LA GÓNADA ASÍ COMO NIVELES REDUCIDOS DE PROGENIE .....	70
5.4.4. EL RNAi EN VARIOS GENES DE LA VÍA DE UBIQUITINACIÓN DE PROTEÍNAS CAUSA UN FENOTIPO SIMILAR AL OBSERVADO EN LOS ANIMALES <i>vbh-1(RNAi)</i> .....	72
5.4.4.1. RNAi EN LA ENZIMA CONJUGATIVA DE UBIQUITINA (E2).....	76

5.4.4.2. ANÁLISIS DE LOS ANIMALES RNAi EN LA LIGASA DE UBIQUITINA (E3) .....	79
5.4.4.3. RNAi EN UN ADAPTADOR DE LA LIGASA DE UBIQUITINA .....	80
5.4.5. ANÁLISIS DEL PROCESO DE UBIQUITINACIÓN EN ANIMALES SILVESTRES Y <i>vbh-1</i> (RNAi).....	81
5.4.6. ANÁLISIS TIPO NORTHERN BLOT PARA CONFIRMAR LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE LOS GENES DE LA VÍA DE UBIQUITINA EN AUSENCIA DE VBH-1. ....	87
<b>6. <u>DISCUSIÓN GENERAL</u> .....</b>	<b>90</b>
<b>7. <u>CONCLUSIONES</u>.....</b>	<b>92</b>
<b>8. <u>PERSPECTIVAS</u> .....</b>	<b>94</b>
<b>9. <u>LITERATURA CITADA</u> .....</b>	<b>95</b>
<b>10. <u>APÉNDICE I</u> .....</b>	<b>100</b>
10. 1. Resumen del Artículo .....	101

## RESUMEN

Las células germinales forman a los ovocitos y a los espermatozoides, y son la base de la continuidad de las especies animales con reproducción sexual. Estas células presentan un tipo especial de citoplasma compuesto de estructuras electrodensas o gránulos conocidos en *C. elegans* como gránulos P y cuya función es el almacenamiento y procesamiento de RNAs mensajeros. En *Drosophila* uno de los componentes de estos gránulos es el producto del gen *vasa*. *Vasa* es una helicasa de RNA perteneciente a la familia DEAD la cual es esencial para la función de la línea germinal. En *C. elegans*, el homólogo de *Vasa* es conocido como VBH-1, por su alta similitud con las proteínas *Vasa* y *Belle* de *Drosophila* (*v*a*s*a and *b*e*l*l*e* *l*i*k*e-*h*e*l*i*c*a*s*e). El producto del gen *vbh-1* está presente en los gránulos P y su ausencia provoca esterilidad, sugiriendo que al igual que en otros organismos, VBH-1 es importante para el funcionamiento de la línea germinal. En un análisis tipo Western blot, utilizando la cepa silvestre y mutantes en la línea germinal sensibles a temperatura, encontramos que esta proteína se expresa específicamente en la línea germinal. Mediante el análisis de interferencia de RNA (RNAi) de *vbh-1* se encontró que los animales *vbh-1(RNAi)* presentan una reducción en la progenie, acumulación de ovocitos y un incremento en la letalidad embrionaria. Para estudiar la función de VBH-1, utilizamos un análisis de microarreglos de DNA para identificar los genes específicos de línea germinal que reducen o incrementan sus niveles de expresión en ausencia de VBH-1. Encontramos que la ausencia de esta proteína causa un cambio en los niveles de expresión de cerca de cien genes que codifican para proteínas involucradas en diversos procesos celulares, tales como: el daño a DNA, la transcripción, la ubiquitinación, la traducción, entre otros procesos. Animales RNAi, afectados en la expresión de algunos de los genes de la vía de ubiquitinación mostraron fenotipos similares a los observados en los animales *vbh-1(RNAi)* sugiriendo una correlación entre la función de VBH-1 y la regulación de la vía de ubiquitinación.

## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1. EL NEMÁTODO *Caenorhabditis elegans* como modelo EXPERIMENTAL**

En 1965, Sydney Brenner propuso al nemátodo *Caenorhabditis elegans* como un organismo modelo para hacer estudios de biología del desarrollo y neurociencias en animales. Dentro de las características que presenta este organismo, se encuentran el tener un ciclo de vida corto, un tamaño de 1 mm, poseer pocas células (~1000) ser transparente, lo cual permite su observación directa al microscopio. Además, presenta una alta producción de embriones, que en condiciones óptimas, genera entre 250-300 hijos. Por estas razones, este organismo resulta útil para realizar análisis genéticos. Puede manejarse y cultivarse en grandes cantidades en cajas Petri con medio o en cultivos líquidos, y aunque morfológicamente es simple, cuenta con sistemas digestivo, excretor, muscular, nervioso y reproductor (Wood, 1988).

El *C. elegans* es un nemátodo terrestre de vida libre y en el laboratorio se alimenta de la bacteria *Escherichia coli*. A 20°C, el nemátodo alcanza la madurez sexual a los 3 días y vive hasta 17 días más. Tiene cuatro etapas larvianas conocidas como L1-L4 las cuales se caracterizan por la presencia de mudas. Después de la cuarta muda, los adultos son fértiles (Wood, 1988). En general, el primer estadio larval consta de 558 células mientras que los estadios adultos están formados por 959 y 1031 en el caso de hermafroditas y machos, respectivamente (Wiley y Sons, 2000).

El *C. elegans* tiene 6 cromosomas, 5 autosómicos y uno sexual. Los hermafroditas son diploides para los seis cromosomas (XX), mientras que los machos lo son para los cromosomas autosómicos, presentando solo un cromosoma sexual X (X0) (Wood, 1988). El tamaño del genoma haploide es de  $8 \times 10^7$  pares de bases, lo cual representa 8 veces el tamaño de *S. cerevisiae* o la mitad del genoma de *Drosophila* (Wood, 1988). Se estima que 2/3 partes de los genes humanos poseen ortólogos representados en el genoma de este nemátodo (Riddle *et al.*, 1997).

En general, los diversos estudios que se llevan a cabo con este organismo se realizan con poblaciones de hermafroditas de los cuales hay una mayor proporción que de machos. Los machos aparecen espontáneamente dentro de poblaciones de hermafroditas. La frecuencia de aparición de machos en una población normal es de 1 por cada 500 animales (Wood, 1988) pero a partir de una cruce se puede obtener el 50% de machos.

El *C. elegans* es un organismo útil para realizar diversos estudios genéticos, entre los que se encuentran la integración eficiente de arreglos extracromosomales para la expresión específica de ciertos genes, así como diversas estrategias moleculares entre las que se incluye el uso de transposones y el RNAi. Además, es posible realizar una fusión con la proteína verde fluorescente (GFP) y promotores específicos de determinados genes para realizar ensayos sobre su patrón de expresión *in vivo* (Wiley y Sons, 2000).

## 1.2. DESARROLLO DE LA GÓNADA SOMÁTICA Y LA LÍNEA GERMINAL

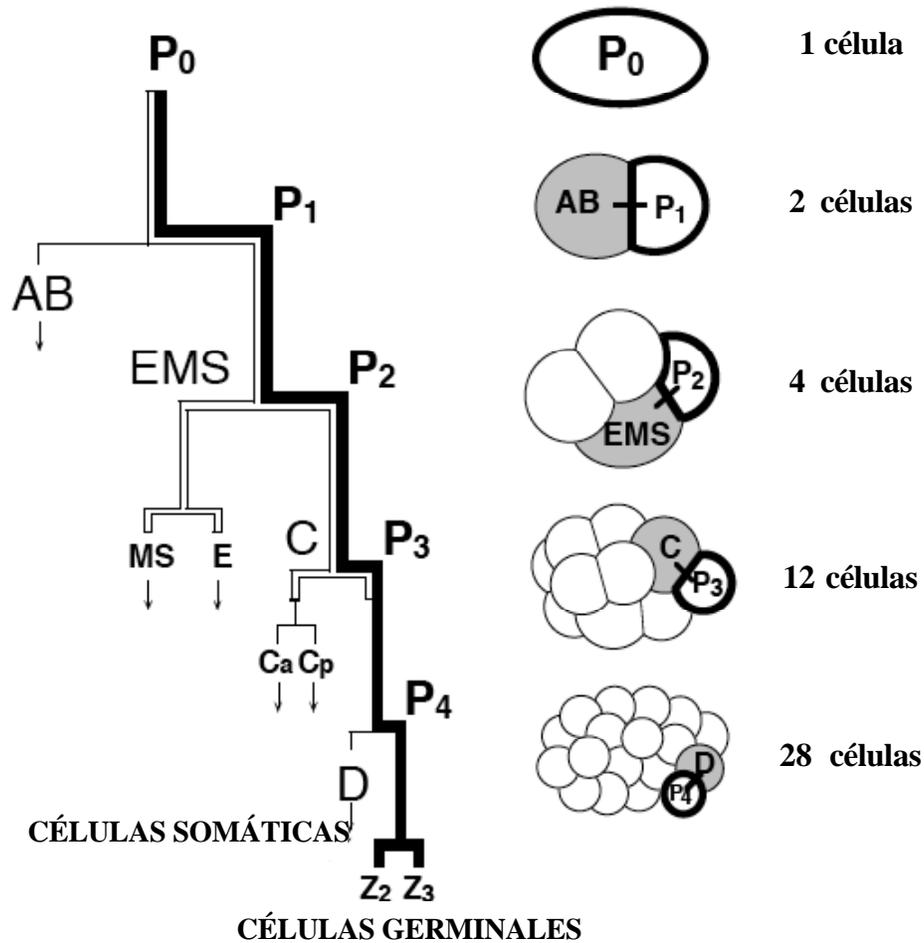
Durante el desarrollo embrionario una serie de divisiones celulares asimétricas dan lugar a la formación de la célula germinal primordial P<sub>4</sub>. Las células germinales son derivadas exclusivamente de esta célula P<sub>4</sub>, la cual es llevada al interior del embrión durante el proceso de gastrulación en el estadio de aproximadamente 28 células, se divide de forma simétrica en el estadio de 100 células, formando dos precursores de la línea germinal: sus descendientes Z2 y Z3 los cuales son conocidos como células germinales primordiales (PGCs) (Hubbart y Greenstein 2000).

Tanto los machos como los hermafroditas eclosionan con un primordio gonadal formado por 4 células. Dos de éstas, Z1 y Z4 son las precursoras de la gónada somática, mientras que las células encargadas de formar la línea germinal reciben el nombre de Z2 y Z3 (Figura 1). Z1 y Z4 forman, en el caso de los hermafroditas, las células del extremo distal (DTCs), las células de la vaina, la spermateca y el útero (Hubbart y Greenstein 2000).

En los hermafroditas, Z1 y Z4 forman 12 células durante el estadio L1. Durante L2, 10 de estas células se juntan en el centro de la gónada. Conforme

avanza el desarrollo larval, las células somáticas en el centro de la gónada continúan dividiéndose para formar el útero y la espermateca. En el estadio L3 las regiones anterior y posterior se elongan y en L4 el tejido gira 180°C formando una gónada en forma de U. Una célula somática (DTC) se localiza en el extremo de cada uno de los tubos elongados. Durante el desarrollo post-embrionario del hermafrodita, Z1 y Z4 se dividen para formar las DTCs, las células de la vaina, la espermateca y el útero (Hubbart y Greenstein, 2000).

En los machos, Z1 y Z4 generan 10 células durante los estadios larvales L1 y L2. De éstas, 8 células se mueven únicamente hacia el extremo anterior originando una estructura asimétrica. Dos células somáticas (DTCs) se localizan en el extremo distal de la gónada. El tejido gonadal se desarrolla primero con una dirección anterior y luego posteriormente hacia la cloaca (Wood 1988). Durante L3 y L4, estas células forman las células somáticas de la gónada, los vasos deferentes y la vesícula seminal. Las diversas divisiones post-embrionarias de las células Z1 y Z4 formarán un tejido celular de aproximadamente 56 células (Hubbart y Greenstein, 2000).



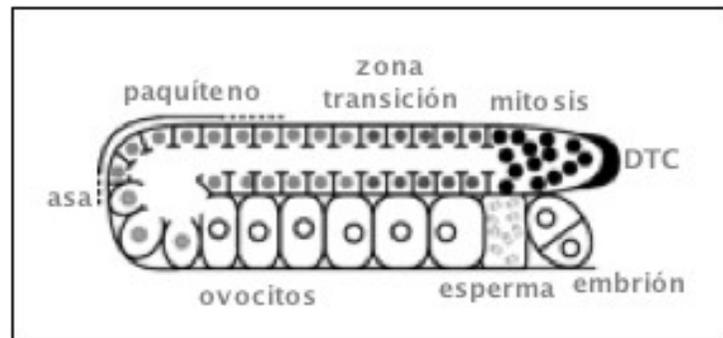
**Figura 1.** Diagrama del linaje celular (izquierda) y de las divisiones celulares (derecha) que ocurren durante la embriogénesis en *C. elegans*. En el diagrama del linaje, las líneas horizontales representan cada una de las divisiones celulares. Las líneas de color negro representan el linaje de las células que dan origen a la línea germinal, P<sub>0</sub>, P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, P<sub>3</sub> y P<sub>4</sub>. El diagrama de la izquierda representa los estadios de la embriogénesis donde se encuentra cada uno de los blastómeros (P<sub>0</sub>-P<sub>4</sub>). El linaje AB da lugar a la formación de hipodermis, neuronas, músculos faríngeos, músculos del cuerpo y glándulas. Los linajes MS y E, los cuales derivan de EMS, forman músculos del cuerpo, músculos faríngeos, neuronas y glándulas así como el intestino. El linaje que deriva de C forma hipodermis, músculos del cuerpo y neuronas. Un grupo especializado de células musculares se derivan del linaje somático D. Los precursores de la línea germinal son las células Z<sub>2</sub> y Z<sub>3</sub>. Tomado y modificado de: Guedes S. and J. Priess, 1977; Strome S. and W. B. Wood, 1982.

En general, la diferenciación de los blastómeros somáticos de los blastómeros de la línea germinal está determinada por tres propiedades generales que distinguen estos dos tipos celulares: la supresión de mRNAs de origen materno, la activación de la expresión de proteínas específicas y la presencia de estructuras electrodensas o gránulos P específicos de la línea germinal (Shimada *et al.*, 2006; Guedes y Priess, 1977). En el caso de la diferenciación del linaje somático, algunos de los destinos celulares en el embrión de estadios tempranos son especificados por los dos factores de transcripción de origen materno: SKN-1 y PAL-1. Diversos estudios han demostrado que la transcripción de los genes *skn-1* y *pal-1* durante la embriogénesis se encuentra reprimida en los blastómeros de la línea germinal. Por su parte, la represión traduccional en los blastómeros de la línea germinal requiere a la proteína de origen materno PIE-1 la cual se encuentra presente en estos blastómeros germinales. En general, las proteínas que constituyen estos gránulos P llevan a cabo funciones importantes para el establecimiento y mantenimiento del linaje germinal a partir de la diferenciación de blastómeros específicos (Guedes y Priess, 1977).

Los gránulos P son partículas citoplasmáticas que están presentes en las células germinales a lo largo de todo el ciclo de vida de *C. elegans*. Los gránulos P se distribuyen uniformemente en el ovocito y en los embriones recién fertilizados y posteriormente se localizan en la parte posterior del embrión. Los gránulos P migran a través del citoplasma y se asocian con la corteza mientras que aquellos que permanecen en la región anterior se desensamblan o degradan. De esta forma, esta localización asimétrica asegura que los gránulos P sean segregados únicamente y de manera inicial al blastómero P1 de la línea germinal (Figura 1). En las divisiones posteriores, los gránulos P continúan segregándose asimétricamente sólo a los blastómeros germinales P2 y P3. En estos blastómeros, los gránulos P se asocian con el núcleo y se mueven hacia aquella región del citoplasma destinada a formar a las células precursoras de la línea germinal, Z2 y Z3, provenientes del blastómero P4 (Tenenhaus *et al.*, 1998).

### 1.2.1. LA GÓNADA DEL HERMAFRODITA

La gónada del hermafrodita adulto esta formada por dos brazos tubulares, uno anterior y otro posterior. Cada uno de éstos presenta en el extremo proximal una espermateca y ambos se encuentran unidos a un útero común. El útero se localiza de forma ventral en el cuerpo del animal y se abre al exterior a través de la vulva. En el caso de los hermafroditas, la producción de esperma es transitoria, las primeras 40 células de cada brazo de la gónada que entran en meiosis forman aproximadamente 160 espermatozoides, los cuales se almacenan en la espermateca. Posteriormente, la espermatogénesis cesa e inicia la producción de ovocitos u ovogénesis. La fertilización se lleva a cabo cuando los ovocitos pasan a través de la espermateca y posteriormente el cigoto es depositado en el útero (Figura 2) (Wood, 1988).



**Figura 2.** Esquema de uno de los dos brazos de la gónada de *C. elegans* hermafrodita adulto que muestra el desarrollo de las células germinales a lo largo de este tejido. La célula del extremo distal o DTC mantiene a las células en constante mitosis, mientras que aquellas que se alejan de la influencia de estas células, entran a meiosis en una zona conocida como transición. Las primeras 40 células que entran a la meiosis forman 160 espermatozoides que se almacenan en la espermateca. Posteriormente, solo se forman ovocitos. Cuando las células germinales pasan por el asa se celularizan e incrementan su tamaño. Estas células inician la ovogénesis y los ovocitos formados se apilan, uno tras otro, y pasan a través de la espermateca, momento en el cual son fertilizados. Los embriones son depositados en el útero y finalmente liberados a través de la vulva. Tomado y modificado de: P. Boag *et al.*, 2005.

Cada brazo de la gónada se divide en tres porciones: una *región distal*, la cual tiene una población de células germinales en mitosis, *el asa* es la región donde las células germinales se convierten en ovocitos y la *región proximal*, sitio donde se ubican los ovocitos y la espermateca. La *región distal* esta formada por una población de células germinales que se dividen constantemente gracias a la influencia de las células somáticas distales (DTCs). Lejos de la influencia de estas células, los núcleos germinales entran en meiosis conforme se mueven hacia la parte proximal. En el *asa*, las células germinales incrementan su volumen y son delimitadas por membranas formando los ovocitos. Los ovocitos inician la meiosis y se detienen en la parte proximal de la gónada en la profase I de la meiosis (Figura 2) (Wood, 1988).

Los ovocitos reciben una señal enviada por los espermatozoides que promueve su maduración. La proteína MSP, por sus siglas en inglés *Major Sperm Protein*, es parte de esta señalización, y promueve la maduración de los ovocitos, provocando la contracción de las células de la vaina en la parte proximal de la gónada para que los ovocitos puedan ser ovulados. Una mutación en el carboxilo terminal de la proteína MSP es capaz de promover la maduración de los ovocitos, pero no la contracción de las células de la vaina, mientras que el carboxilo terminal de esta proteína es capaz de promover la contracción de las células de la vaina, pero no la maduración de los ovocitos (Miller *et al.*, 2001).

### 1.2.2. LA GÓNADA DEL MACHO

La gónada del macho solo tiene un brazo en forma de J con dos células distales (DTCs) localizadas en el extremo distal. En la región *proximal*, se localiza la espermateca, la cual almacena los espermatozoides. En el macho, la producción de espermatozoides es constante (Wood, 1988). En el extremo distal, las células germinales se encuentran en mitosis. A diferencia de los ovocitos, los espermatozoides completan las dos divisiones de la meiosis para producir espermátidas maduras, las cuales son almacenadas en la vesícula seminal y liberadas durante la cópula a través de los vasos deferentes. En la parte

posterior, el macho presenta un gancho formado de neuronas, músculo y estructuras hipodermales que se utilizan durante el apareamiento. La base de este gancho presenta 2 espículas las cuales son introducidas dentro de la vulva del hermafrodita para facilitar la transferencia de esperma (Wood, 1988).

### **1.3. LOS COMPONENTES DE LOS GRÁNULOS P EN LA LÍNEA GERMINAL DE *C. elegans***

Los gránulos P juegan un papel importante durante la especificación, el mantenimiento y el desarrollo de la línea germinal en *C. elegans*. Descubrimientos recientes han demostrado que los gránulos P se encuentran asociados a los poros nucleares en la línea germinal sugiriendo que estos gránulos tienen acceso a la mayoría de los mRNAs que se desplazan desde el núcleo hacia el citoplasma. Algunos mRNAs pueden ser retenidos específicamente en los gránulos P al permanecer unidos a proteínas con motivos de unión a RNA que se encuentran en estas estructuras electrodensas. Otra opción es que las proteínas asociadas a estos gránulos faciliten el movimiento o exportación de los mRNAs desde el núcleo hacia el citoplasma (Anahita *et al.*, 2001).

Las proteínas PGL-1, GLH-1, GLH-2, GLH-3, GLH-4, PIE-1, GLD-1, MEX-1, MEX-3 y POS-1 son algunos de los componentes que en *C. elegans* se encuentran asociados a los gránulos P. Las proteínas que se encuentran asociadas a estos gránulos son esenciales para la embriogénesis y el desarrollo de la línea germinal (Kawasaki *et al.*, 2004). La mayoría de estas proteínas presentan uno o más motivos de unión a RNA por lo que se cree que llevan a cabo funciones importantes relacionadas a esta molécula (Anahita *et al.*, 2001). A continuación se describen algunas proteínas que forman parte de estas estructuras citoplasmáticas llamadas gránulos P.

El gen *pie-1*, por sus siglas en inglés *pharynx and intestine in excess*, codifica para una proteína con dos dedos de zinc y se distribuye uniformemente en los ovocitos así como en embriones recién fertilizados. Durante la embriogénesis temprana PIE-1 se detecta sólo en los blastómeros germinales. Los embriones mutantes para este gen no desarrollan línea

germinal (Mello *et al.*, 1996). Evidencias genéticas y bioquímicas sugieren que PIE-1 reprime de manera específica la transcripción de mRNAs en los blastómeros de la línea germinal. Del mismo modo existe evidencia del papel de esta proteína en la represión traduccional de RNAs mensajeros específicos. Este sistema de represión puede ser parte de un mecanismo evolutivamente conservado que distingue la línea germinal del soma en etapas tempranas durante la embriogénesis (Tenenhaus *et al.*, 1998).

Al igual que otros componentes de los gránulos P, MEX-1 es una proteína que se requiere para el desarrollo de las células germinales. Esta proteína se encuentra presente en los blastómeros de línea germinal de embriones tempranos y es un componente específico de gránulos P. MEX-1 carece de una señal de localización nuclear por lo que se distribuye principalmente en el citoplasma. Se sabe que esta proteína está involucrada en la expresión y distribución de PIE-1 en los blastómeros que dan origen a la línea germinal debido a que, durante la embriogénesis, la falta de *mex-1* ocasiona la deslocalización de PIE-1 en múltiples blastómeros, así como una asociación reducida con gránulos P ocasionando la ausencia de línea germinal y una inadecuada diferenciación del tejido somático (Guedes y Priess, 1977).

La proteína PGL-1 es una proteína de unión a RNA que contiene en el extremo carboxilo terminal un motivo RGG comúnmente encontrado en proteínas que se unen a RNA. PGL-1 está presente en los gránulos P a lo largo de todos los estadios de desarrollo y es esencial para la fertilidad de *C. elegans*. Por análisis de tipo Northern blot se ha demostrado que el transcrito de *pgl-1* se expresa específicamente en la línea germinal tanto de machos como de hermafroditas. El gen *pgl-1*, por sus siglas en inglés *P granule abnormality*, codifica una proteína de 730 aminoácidos con un motivo RGG. Durante la ovogénesis, esta proteína se disocia de la membrana nuclear y se dispersa por todo el citoplasma. Los mutantes homocigos para el gen *pgl-1* son estériles debido a que la gónada no logra proliferar (Kawasaki *et al.*, 1998).

PGL-3 es un componente que se encuentra asociado a los gránulos P en todos los estadios del desarrollo, mientras que PGL-2 es otra proteína asociada a gránulos P exclusivamente durante el desarrollo post-embriionario. Los hermafroditas mutantes en los genes *pgl-2* y *pgl-3* muestran defectos en la proliferación de la línea germinal así como en la producción de gametos y

embriones viables. En experimentos *in vitro* se ha demostrado que las proteínas PGL-1, PGL-2 y PGL-3 interactúan entre ellas y se localizan en los gránulos P de manera independiente una de otra (Kawasaki *et al.*, 2004).

Los genes *glh*, por sus siglas en inglés *germline helicase*, presentan una alta homología con Vasa de *Drosophila*. Las proteínas GLH-1, GLH-2, GLH-3 y GLH-4 contienen nueve motivos conservados característicos de las helicasas de RNA pertenecientes a la familia DEAD, así como un extremo amino terminal rico en residuos de glicina (GFGGX<sub>n</sub>) y son redundantes para el funcionamiento de la línea germinal. Estas proteínas también muestran diferencias con Vasa y otras helicasas de RNA debido a que contienen múltiples dedos de zinc de tipo CCHC similares a aquellos encontrados en las proteínas celulares de unión a ácidos nucleicos o CNBP, los cuales permiten una unión altamente específica a las moléculas de RNA. Las proteínas GLHs se encuentran presentes de manera constitutiva en los gránulos P. Basado en experimentos de RNA de interferencia (RNAi) se ha demostrado que estas proteínas muestran funciones redundantes en la línea germinal de *C. elegans*. Los animales hermafroditas con RNAi en los genes *glh* muestran la ausencia de ovocitos debido a que las células germinales no logran continuar la meiosis y se detienen en paquíteno (Kathleen *et al.*, 2000).

OMA-1 es una familia de proteínas que presenta dos dedos de zinc CCCH cuyo papel es importante para la adecuada maduración de los ovocitos. El genoma de *C. elegans* codifica tres de estas proteínas: OMA-1, OMA-2 y OMA-3. Cada uno de los transcritos de los genes *oma* se expresan desde la parte distal hasta la región más proximal de la gónada, mientras que sus correspondientes proteínas se acumulan de manera específica en el citoplasma de los ovocitos en aquellos sitios donde se localizan los gránulos P. Del mismo modo, estas proteínas se encuentran asociadas a los gránulos P en etapas tempranas de la embriogénesis. La falta de alguno de estos tres genes causa un arresto en la maduración de los ovocitos, así como una elevada letalidad embrionaria. Diversos estudios han demostrado que las proteínas OMA son necesarias para la adecuada distribución de PGL-1, MEX-1 y PIE-1, los cuales son reguladores cruciales en la especificación de la línea germinal de *C. elegans* (Shimada *et al.*, 2006). Por otra parte, se ha descrito que CGH-1 es una proteína que se encuentra asociada a los gránulos P durante la

ovogénesis y la embriogénesis y cuyo papel es importante para una adecuada función tanto de los ovocitos como de los espermatozoides. CGH-1 protege a las células germinales de la apoptosis fisiológica (Navarro *et al.*, 2001).

Se han encontrado pocos RNAs asociados a gránulos P. Algunos de ellos son los transcritos de los genes *nos-2* y *pos-1*, los cuales son componentes de origen materno. Al igual que su homólogo en *Drosophila*, *nos-2* codifica una proteína que es un componente de los gránulos P y cuya función está relacionada a la regulación de la proliferación de las células germinales (Kawasaki *et al.*, 2004). Por su parte, *pos-1* codifica una proteína con un dominio tipo dedos de zinc y cuyo papel es importante en la proliferación de la línea germinal (Kawasaki *et al.*, 2004).

#### **1.4. LAS HELICASAS DE RNA DE LA FAMILIA DEAD**

Las proteínas de la familia DEAD han sido consideradas como helicasas de RNA debido a que desenrollan la estructura secundaria de esta molécula a través de un mecanismo dependiente de ATP. Actualmente se piensa que más que desenrollar moléculas de RNA, las helicasas de RNA remodelan complejos de ribonucleoproteínas, ya sea promoviendo la interacción entre estos, o terminando dichas interacciones (Linder, 2006). En el genoma de los eucariontes se encuentran varias de estas proteínas, las cuales están involucradas en la sobrevivencia y el desarrollo del organismo, a través de su participación en diversos procesos celulares tales como: la transcripción, la traducción, la biogénesis de los ribosomas, el splicing, la estabilidad del RNA, así como su exportación al citoplasma, la pre-edición de mRNAs, el recambio de RNA y la síntesis de RNAi (Linder y Lasko, 2006; Tanner y Linder, 2001). Vasa fue una de las primeras proteínas tipo DEAD identificada en *Drosophila* y se sabe que participa en la traducción de RNAs mensajeros específicos (Linder y Lasko, 2006).

### 1.4.1. LAS HELICASAS DE RNA Y LAS CÉLULAS GERMINALES

La línea germinal del nematodo *C. elegans*, como en el caso de varios organismos, está predeterminada. Esto quiere decir que los componentes que la forman se heredan a través de los ovocitos (Tanaka *et al.*, 2000). En *Drosophila*, los precursores de la línea germinal migran hacia el polo posterior del embrión (Bruce *et al.*, 1988). El citoplasma germinal, conocido en *Drosophila* como gránulos polares, está formado principalmente de partículas electro-densas que son ricas en moléculas de RNA y proteínas (Wylie, 2000). En *Xenopus laevis* estas partículas son llamadas gránulos germinales, mientras que en *Caenorhabditis elegans* se conocen como gránulos P (Wylie, 2000).

Entre los componentes del plasma germinal de *Drosophila*, están las proteínas Oskar, Vasa, Nanos y Tudor. El gen *vasa* es uno de los más caracterizados y codifica una helicasa de RNA dependiente de ATP perteneciente a la familia DEAD (Noce *et al.*, 2001). La proteína Vasa se requiere para el ensamblaje y la función del citoplasma germinal. Las mutantes en este gen tienen un inadecuado ensamblaje de los gránulos polares, así como una ovogénesis anormal (Tanaka *et al.*, 2000).

Las mutantes heterocigas para el gen *vasa* tienen hijos que pueden completar la embriogénesis debido a que heredan la proteína materna, sin embargo, como no pueden expresar esta proteína posteriormente en el desarrollo, se vuelven hembras estériles. Por otro lado, las mutantes en *vasa* que carecen de esta proteína durante su desarrollo embrionario se mueren durante la embriogénesis ya que la línea germinal no se forma correctamente (Tanaka *et al.*, 2000).

La proteína Vasa tiene una identidad de 27% con el factor de inicio de la traducción eIF4A. Este factor es uno de los componentes del complejo de proteínas involucrado en el reconocimiento del cap en el extremo 5' y en el desenrollamiento de los mRNAs favoreciendo la unión de éstos con los ribosomas, regulando así la traducción de mensajeros específicos. La función del factor eIF4A es unir y desenrollar mRNAs de una manera dependiente de ATP durante el inicio de la traducción de los RNAs mensajeros (Bruce *et al.*, 1988). Diversos estudios han sugerido que Vasa funciona como un regulador

traduccional de mRNAs específicos a través de la interacción con el factor de inicio de la traducción, eIF5B. Dicha interacción es necesaria para la progresión de la ovogénesis así como para la especificación de las células germinales. De manera específica, se sabe que el extremo carboxilo terminal de la proteína Vasa es necesario para la interacción con el eIF5B (Johnstone y Lasko, 2004).

En ratón, los mutantes homócigos machos en *vasa* (Mvh), son estériles a diferencia de las hembras que son fértiles. Esta diferencia se debe a que en las mutantes en Mvh, la espermatogénesis se encuentra bloqueada en la fase de leptóteno y cigóteno de la meiosis, indicando con ello que este gen juega un papel para la progresión de la espermatogénesis. En mamíferos, la proteína VASA se expresa en el citoplasma de las células germinales tanto en machos como en hembras así como en estadios tempranos de la embriogénesis (Noce *et al.*, 2001).

Belle es una helicasa de RNA tipo DEAD de *Drosophila*. Esta proteína muestra una alta homología con las proteínas Vasa de *Drosophila* y Ded1p de *Saccharomyces cerevisiae*, la cual se sabe está involucrada en el inicio de la traducción. En ensayos de complementación se ha demostrado que la función de Dep1p puede ser sustituida por la proteína Belle sugiriendo la participación de esta helicasa de RNA durante el proceso de traducción. En *Drosophila*, la ausencia de Belle causa un retraso en el crecimiento de larvas, así como esterilidad en machos. Estos últimos muestran defectos en el tamaño de los núcleos así como una incorrecta citocinesis durante la meiosis. Del mismo modo, Belle es también necesaria para la fertilidad en hembras. Las hembras mutantes homócigas para este gen llevan a cabo de manera normal el inicio de la ovogénesis, sin embargo alrededor del estadio 9 se observan defectos en este proceso y la mayoría de las cámaras de huevo degeneran. Belle co-localiza con Vasa en el plasma germinal así como en la parte posterior del ovocito en *Drosophila* (Johnstone *et al.*, 2004).

En *C. elegans* el homólogo de *vasa* es conocido como *vbh-1*, por su similitud con *vasa* y *belle* de *Drosophila*. El uso de anticuerpos contra la proteína VBH-1 ha demostrado que ésta se expresa en la línea germinal tanto de machos como de hembras. La proteína VBH-1 se localiza en el citoplasma de las células germinales y es abundante en gránulos P en ambos sexos (Salinas *et al.*, 2007). Además, a través del uso de RNAi, se ha encontrado que

el gen *vbh-1* es esencial para la función de la línea germinal en *C. elegans*. Los animales hermafroditas *vbh-1(RNAi)* tienen un número reducido de hijos y un porcentaje pequeño de embriones se mueren durante la embriogéneis (Salinas *et al.*, 2007)

## **2. HIPÓTESIS**

En varios organismos los componentes de los gránulos polares son importantes para el desarrollo de la línea germinal debido a que los animales que carecen de estas proteínas son estériles o causan letalidad embrionaria. En *C. elegans* un componente de gránulos P, llamado VBH-1, sugiere una función conservada y específica durante el desarrollo y regulación de la línea germinal.

## **3. OBJETIVO GENERAL**

Nuestro objetivo general es entender la regulación de la formación y desarrollo de la línea germinal del nemátodo *C. elegans*. En este trabajo estudiamos a VBH-1, una proteína específica de éste tejido. Proponemos que esta proteína juega un papel esencial en la regulación de la línea germinal y en la estabilidad de RNAs que participan en la formación de este tejido.

### **3.1. OBJETIVOS PARTICULARES**

- Determinar el patrón de expresión de VBH-1 en mutantes afectadas en el desarrollo de la línea germinal.
- Estudiar los efectos de la falta de expresión de *vbh-1*, utilizando RNA de interferencia.
- Identificar los genes que en ausencia de VBH-1 modifiquen su expresión, por medio de un análisis de microarreglos de DNA.
- Identificar a los genes obtenidos en el análisis del microarreglo y establecer si existe alguna relación entre estos y VBH-1, mediante RNA de interferencia.
- Seleccionar los genes cuya expresión dependa y se relacione con VBH-1 y explorar su función en la regulación de la línea germinal.

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1. MANTENIMIENTO DE NEMÁTODOS Y CEPAS UTILIZADAS**

El nemátodo *Caenorhabditis elegans* se creció en cajas con medio NGM-LITE a las cuales se les había colocado sobre la superficie unas gotas de un cultivo de la cepa OP50-1 de *Escherichia coli*. Para preparar un litro de medio NGM-LITE (por sus siglas en inglés Nematode Growth Medium) (Brenner, 1974) se agregó:

<b>NaCl</b>	2 g
<b>Bactotripton</b>	4 g
<b>Fosfato de Potasio Monobásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)</b>	3 g
<b>Fosfato de Potasio Dibásico (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)</b>	0.5 g
<b>Colesterol</b>	0.008 g

Se agregaron 20 g de agar por litro de medio y se esterilizó por autoclave durante 20 minutos a 121°C a 15 libras de presión. El medio se vació en cajas Petri las cuales fueron almacenadas a 4°C.

### **4.2. INDUCCIÓN DE RNA DE DOBLE CADENA EN BACTERIAS PARA HACER RNAi POR ALIMENTACIÓN (PROTOCOLO EN MEDIO LÍQUIDO)**

El silenciamiento de la expresión de un gen de manera transitoria puede llevarse a cabo a través de RNA de interferencia (RNAi) (Fire *et al.*, 1998; Timmons L., *et al.*, 2003). Este es un mecanismo conservado en varios organismos que consiste en el silenciamiento de la expresión de un gen a través de RNA de doble cadena no codificante. Cuando un RNA de doble cadena es introducido a un organismo, este es cortado por la enzima Dicer en fragmentos de aproximadamente 21 nucleótidos. Los fragmentos de RNA de doble cadena reciben el nombre de “RNAs pequeños de interferencia”: siRNA.

Posteriormente, estos siRNA se incorporan a un complejo de proteínas formando el “complejo silenciador inducido por RNA” o RISC por sus siglas en inglés. En este complejo los fragmentos de RNA sirven como molde para degradar el RNA mensajero complementario y por otra parte sirven como templado para la producción de más siRNA y propagar la señal de RNAi (Fraser *et al.*, 2000). Esta técnica se usa en *C. elegans* de manera exitosa debido a que estos animales pueden ser alimentados con bacterias que producen el RNA de doble cadena correspondiente al gen que se desea suprimir (Timmons *et al.*, 2001).

Para inducir la formación de RNA de doble cadena del gen *vbh-1* así como de los genes de la ubiquitinación, se realizó el siguiente protocolo: se creció un cultivo de bacterias que expresan a cada uno de los plásmidos que contienen un gen específico para hacer RNA de interferencia, obtenidas a partir de una biblioteca de RNAi (Open Biosystems) a una densidad óptica de 0.6 a 595 nm a 37° C en presencia de los antibióticos ampicilina y tetraciclina a una concentración de 50 µg/ml y 12.5 µg/ml, respectivamente. Se agregó IPTG a una concentración de 0.4 mM por 2 h a 37°C para inducir la transcripción de RNA. Cada uno de los plásmidos utilizados contiene el gen de interés flanqueado por los sitios T7 del bacteriófago lambda, por lo que al colocarse el IPTG se induce la transcripción del gen en ambos sentidos promoviendo la formación de un RNA de doble cadena, el cual servirá como molde para llevar a cabo la interferencia de un RNA mensajero específico. Al término de la incubación las bacterias se recuperaron por centrifugación, se resuspendieron en un medio compuesto por 25 ml de LB, 25 ml de glicerol al 50%, 0.4 mM de IPTG, 50 µg/ml de ampicilina y 12.5 µg/ml de tetraciclina. Finalmente se hicieron alícuotas de 1 ml, se congelaron inmediatamente y se almacenaron a -80°C. Una alícuota de las bacterias inducidas con el gen de interés se centrifugó a 8000 rpm durante 2 min. Se retiró el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 100 µl de medio LB que contenía 50 µg/ml de ampicilina, 12.5 µg/ml de tetraciclina y 0.4 mM de IPTG. Cincuenta microlitros de la mezcla bacteria-medio se colocaron sobre la superficie de las cajas con medio NGM-LITE adicionado con 30 g de agar y antibióticos y se dejaron secar a temperatura ambiente. Estas se usaron inmediatamente o se almacenaron a 4°C hasta por una semana.

#### **4.3. INTERFERENCIA DE RNA DE GENES ESPECÍFICOS DE LÍNEA GERMINAL (PROTOCOLO EN CAJAS CON MEDIO SÓLIDO)**

Para poder llevar a cabo el RNA de interferencia de varios de los genes encontrados en el análisis de microarreglos se utilizó el método de interferencia de RNA de Fraser *et al.*, (2000), el cual se describe a continuación. Para la inducción de RNA de doble cadena se colocaron 200 µl de cultivo de la bacterias que contiene el gen de interés en cajas con medio NGM-LITE el cual contenía una concentración 1 mM de IPTG y los antibióticos carbencilina y tetraciclina a una concentración final de 50 µg/ml y 12.5 µg/ml, respectivamente. La inducción se realizó durante 18 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se colocó una larva silvestre L4 y se incubó 72 h a 24°C. Durante este periodo de incubación el animal colocado en la caja Petri tuvo su descendencia que se alimentó de bacterias con RNA de doble cadena. Como control, se utilizaron animales crecidos en bacteria que contiene el plásmido sin inserto al cual denominamos plásmido vacío.

#### **4.4. OBTENCIÓN DE MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS CON MICROARREGLOS DE DNA**

Para realizar el análisis con microarreglos de DNA se realizó una extracción de RNA de animales silvestres *N2(PV)* y *vbh-1(RNAi)*. La extracción de RNA fue realizada por la bióloga Marta Castro. Se colocaron 20 animales silvestres L4 o adultos en 20 cajas Petri de 10 cm con bacteria OP50-1 y se crecieron durante 3 días a 20°C. Después de este tiempo, se tuvieron animales adultos grávidos los cuales fueron colectados en un tubo falcon de 15 ml con 10 ml de buffer M9 (Por litro: 6 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 g de NaCl y 0.25 g de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; se esteriliza por autoclave). Para limpiar las muestras de animales de las bacterias que conforman su comida, los tubos se colocaron en hielo; en estas condiciones los animales dejan de moverse y se van al fondo del tubo. Posteriormente se retiró el exceso de líquido dejando un volumen de

4 ml. A este volumen se le agregaron 400  $\mu$ l de NaOH 5 N y 800  $\mu$ l de cloro comercial y se agitó vigorosamente durante 7 min para facilitar la ruptura de los animales y la obtención de embriones. Posteriormente, la muestra se centrifugó a 500 rpm en una centrífuga clínica de mesa durante 30 seg, se retiró el sobrenadante (con cuidado de no pipetear los embriones) y se lavaron agregando 10 ml de buffer M9, se agitó la muestra y se centrifugó nuevamente. Para asegurar que los embriones se limpiaran completamente del cloro e hidróxido de sodio, los lavados se repitieron 2 veces más y al término de éstos, el total de embriones obtenidos fue colocado en un vaso de precipitado de 50 ml con un volumen de M9 de 40 ml. La muestra se cubrió con parafilm y se incubó a 20°C durante toda la noche. En este paso los embriones terminan la embriogénesis y las larvas que eclosionan detienen su crecimiento debido a la falta de alimento. Después de la incubación, alrededor de 3000 larvas fueron colocadas por caja Petri de 10 cm, las cuales contenían bacterias con el plásmido vacío (5) o bacterias con RNA de doble cadena contra el gen *vbh-1* (plásmido: pSZ1) (5); a estos animales se les llamó *N2(PV)* y *vbh-1(RNAi)*, respectivamente. Los animales fueron incubados a 20°C durante 3 días hasta que fueron adultos jóvenes. Los animales adultos de un día fueron colectados con buffer M9 y colocados en un tubo de centrífuga en un volumen final de 12 ml. Se realizaron lavados para eliminar a las bacterias y al término del último lavado, se retiró por completo el buffer M9 y se agregaron 500  $\mu$ l de Trizol (INVITROGEN), se mezcló y se congeló a -70°C.

La extracción de RNA se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante (INVITROGEN) y se describe brevemente a continuación. Las muestras fueron descongeladas y colocadas en un mortero que contenía nitrógeno líquido y una vez que la muestra se congeló, formándose una pastilla sólida, se molieron los animales con un pistilo. Este paso de trituración se repitió por lo menos 3 veces más, posteriormente la mezcla se recuperó en un tubo eppendorf y se dejó reposar por 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregaron 100  $\mu$ l de cloroformo a cada muestra, se agitó vigorosamente durante 15 segundos y se incubaron por 3 min a temperatura ambiente. Las muestras se centrifugaron a 13 400 rpm por 15 min a 4°C y se recuperó la fase acuosa (la cual contiene al RNA) y se transfirió a un tubo nuevo. A cada muestra obtenida se le agregó 250  $\mu$ l de isopropanol para

precipitar el RNA, se agitó y se incubó por 10 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 13 400 rpm por 10 min a 4°C y se retiró el sobrenadante. La pastilla se lavó con 500 µl de etanol al 70%, se centrifugó a 13 400 rpm por 5 min a temperatura ambiente y se retiró el sobrenadante. Finalmente, la pastilla se dejó secar por 5 min y se resuspendió en 60 µl de H<sub>2</sub>O tratada con DEPC. Para llevar a cabo la cuantificación de RNA se utilizaron 2 µl de muestra y 998 µl de H<sub>2</sub>O DEPC, la dilución se leyó en un espectofotómetro a una densidad óptica de 260 y 280 nm.

La unidad de Microarreglos de la UNAM a cargo del Dr. Jorge Ramírez llevó a cabo el proceso de producción de laminillas, cDNA, hibridación con los microarreglos y el análisis de datos. Las laminillas se construyeron por medio de la amplificación por PCR de genes específicos de la línea germinal utilizando oligonucleótidos diseñados por nuestra colaboradora la Dra. Valerie Reinke (Yale University). La Dra. Reinke diseñó oligonucleótidos de los genes que se expresan exclusivamente en la línea germinal y en los ovocitos (Reinke, 2000). En la unidad de Microarreglos de la UNAM se hicieron 2 rondas de PCR debido a que en la primera ronda hubo algunos genes que no se amplificaron, por lo que fue necesario realizar una segunda PCR. Los productos de PCR fueron purificados y colocados por duplicado en las laminillas. Para el marcado de la sonda, se realizó la síntesis *in vitro* de cDNA de cadena sencilla colocando el RNA total en una mezcla que incluye un oligodesoxinucleótido poli T, desoxinucleótidos A, C, G y T y una porción de desoxinucleótido T marcado con una molécula fluorescente llamada dUTP-Cy3 o cianina 3 y dUTP-Cy5 o cianina 5 tanto a la muestra experimental, como a la muestra control, respectivamente. La síntesis de cDNA se llevó a cabo agregando la enzima transcriptasa reversa y finalmente el cDNA marcado se purificó con el objetivo de eliminar el desoxinucleótido fluorescente no incorporado al cDNA. Se obtuvieron las sondas marcadas con los fluoróforos respectivos. La muestra control se marcó con el fluoróforo verde o Cy5, mientras que la muestra experimental fue marcada de color rojo con el fluoróforo Cy3.

La lectura de los microarreglos se realizó utilizando una cámara digital donde un láser excita a las moléculas fluorescentes unidas al cDNA, obteniéndose así una imagen de cada una de las muestras. Este procedimiento se realizó para cada fluoróforo y se obtuvieron dos imágenes, una para el

fluoróforo Cy3, el cual muestra un color rojo, y otra para el fluoróforo Cy5, al que se asignó un color verde. Para el análisis del microarreglo es importante saber que los puntos verdes o todas aquellas tonalidades verde claro representan todos aquellos genes que disminuyeron sus niveles de expresión, mientras que todos aquellos puntos de color rojo o tonalidades anaranjadas deben ser interpretadas como genes que aumentaron sus niveles de expresión. Finalmente, los puntos de color amarillo representan aquellos genes que muestran niveles de expresión similar tanto en la condición control como en la experimental. Para la obtención de valores cuantitativos de cada una de las señales de fluorescencia presentes en el microarreglo, se analizaron las imágenes utilizando los programas Pro-Arrays Analyzer y Gene Arise Microarrays Analyzer como un filtro para depurar las imágenes de señales no deseadas, que de manera regular se encuentran en las muestras, así como el uso de algoritmos para realizar la Normalización de los datos, respectivamente. Después de haberse establecido las áreas a cuantificar, se calculó la densidad de los píxeles en cada una de las áreas y se obtuvo una lista de datos entre los que destacan: las coordenadas, los valores de densidad, los valores de fondo y la señal para cada una de las muestras.

#### **4.5. MONTAJE DE NEMÁTODOS EN PLACAS DE AGAR Y MICROSCOPIA TIPO NOMARSKI**

La observación de los nemátodos se llevó a cabo utilizando portaobjetos con agarosa (INVITROGEN) al 2%, las cuales fueron hechas de la siguiente manera. Se pusieron dos portaobjetos, cubiertos con 3 capas de cinta adhesiva sobre cada una de sus caras para dar cierto espesor y se colocó un portaobjetos entre ellos. Se agregó una gota de agarosa al 2%, disuelta en agua, sobre el portaobjetos y se colocó otro portaobjetos sobre éste, de tal forma que la gota de agarosa se disperse. Una vez solidificada la agarosa, se retiró uno de los portaobjetos. El portaobjetos con la agarosa se utilizó posteriormente para colocar 10  $\mu$ l de azida de sodio 40 mM como anestesia y 10 animales. Una vez que éstos se dejaron de mover se colocaron 10  $\mu$ l más de anestesia, un cubreobjetos encima y las muestras se observaron en un

microscopio Nikon Eclipse E600 equipado con una cámara digital AxioCam (Zeiss).

#### 4.6. ENSAYOS DE INMUNOTINCIONES

Como parte del análisis del fenotipo de los animales RNAi para los genes de ubiquitina y *vbh-1*, se realizaron ensayos de inmunotinción utilizando anticuerpos policlonales contra la ubiquitina (SIGMA) (1:1000),  $\alpha$ -PGL-1 (1:10000) y  $\alpha$ -VBH-1 (1:1000). Para llevar a cabo las inmunotinciones se prepararon portaobjetos con polilisina de la siguiente manera: se colocaron 30  $\mu$ l de polilisina (SIGMA) en un portaobjetos nuevo y se distribuyó la solución sobre la superficie frotando con otro portaobjetos. La polilisina se secó colocando el portaobjetos sobre una plancha caliente durante 20 min. Estas placas pueden almacenarse a 4°C. Para realizar la disección de los animales, se colocó en un cubreobjetos 30  $\mu$ l de M9 y posteriormente se depositaron cerca de 30 animales adultos. Posteriormente, se colocó 1  $\mu$ l de tetramisol (0.01%) como anestesia y se liberaron las gónadas y embriones haciendo un corte a nivel de la cabeza del animal con unas agujas de jeringas. El cubreobjetos fue colocado con el líquido hacia abajo sobre un portaobjetos con polilisina y se congeló en nitrógeno líquido. El portaobjetos fue recuperado del nitrógeno, se retiró el cubreobjetos de un solo golpe (método conocido en inglés como “freezecrack”) y se incubó en metanol a -20°C por menos de 1 minuto. Para fijar las muestras se sumergieron en una solución de 1.1 g de paraformaldehído disuelto en 24.6 ml de agua grado milli Q estéril, 3 ml PBS 10 X, 2.4 ml HEPES 1 M, 48  $\mu$ l MgSO<sub>4</sub> 1 M y 96  $\mu$ l EGTA 250 mM. Para preparar la solución de fijado primero se disolvió el paraformaldehído, se le agregaron 90  $\mu$ l de NaOH 5 N, se agitó vigorosamente y se calentó la mezcla a 50°C por lo menos 5 min. Una vez disuelta la solución se agregaron los compuestos descritos anteriormente. La fijación de las muestras se realizó durante 20 min a temperatura ambiente. Al término de la fijación, las muestras se lavaron dos veces con una solución de PBT 1X (PBS 1X y Tween 0.5%) por 10 minutos. Posteriormente, para bloquear la muestra se colocaron 30  $\mu$ l de suero de cabra (SIGMA) sobre las muestras y se dejó bloquear durante 30 min a temperatura

ambiente en una cámara húmeda. Al término de este tiempo, se incubó con el anticuerpo primario en la dilución necesaria en PBT con suero de cabra al 30% durante toda la noche a 4°C en una cámara húmeda. Al día siguiente, se lavaron las muestras por 10 min en PBT 1X y se incubó con el anticuerpo secundario Alexa-Fluor 488 anti-conejo (MOLECULAR PROBES) y DAPI (50 ng/μl) diluidos en PBT con suero de cabra en una dilución 1:25 y 1:100, respectivamente durante 1 h en una cámara húmeda. Finalmente, se lavaron las muestras una vez en PBT 1X por 10 min, se secaron (excepto el área que contiene las muestras), se colocaron 10 μl de vectashield (VECTOR), se cubrieron con un cubreobjetos y el cubreobjetos se selló con barniz. Las muestras se observaron inmediatamente al microscopio de fluorescencia o se almacenaron a 4°C para su posterior análisis.

#### **4.7. TINCIÓN CON DAPI**

Para el análisis de morfología nuclear de las gónadas de los animales se utilizó el siguiente protocolo de fijación. Las gónadas se obtuvieron disecando como se describió en la sección anterior con excepción de que se fijaron en una solución que contenía 5 ml de formaldehído al 37%, 40 ml de metanol absoluto y 300 μl del buffer K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 M. Las muestras se fijaron en la solución anterior por 10 min a -20°C. Posteriormente, las muestras fueron lavadas en PBT 1X durante 10 min e incubadas con DAPI (50 ng/μl) en una dilución 1:100 en PBT con suero de cabra por 5 min a temperatura ambiente en una cámara húmeda. Las muestras se lavaron en PBT 1X por 10 min, se cubrieron con 10 μl de vectashield y se les colocó un cubreobjetos. El cubreobjetos se selló con barniz.

#### **4.8. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS**

Para llevar a cabo el análisis de proteínas por medio de Western blot se realizó la extracción de proteínas de animales silvestres (*N2*), *vbh-1(RNAi)*, *fem-1(hc17)*, *fem-3(q20gf)* y *glp-4(bn2)*. Los animales de las cepas *fem-*

*1(hc17)*, *fem-3 (q20gf)* y *glp-4 (bn2)* son mutantes sensibles a temperatura (Nelson *et al.*, 1978; Barton *et al.*, 1987; Beanan y Strome, 1992) que a 25°C producen los siguientes fenotipos: *fem-1(hc17)* produce solo ovocitos, *fem-3(q20gf)* solo esperma y *glp-4(bn2)* es una mutante que desarrolla una gónada reducida. Cuando estos animales crecen a 15°C presentan un fenotipo silvestre. Para realizar la extracción de proteínas de estas mutantes se llevó a cabo el siguiente procedimiento: se colocaron 20 animales de cada una de las cepas por caja Petri de 10 cm de diámetro con medio NGM-LITE y bacteria OP50-1 y se crecieron a 15°C por 5 días. Se colectaron los animales adultos grávidos de 10 cajas por cepa con buffer M9 y se colocaron en un tubo cónico de 15 ml. Para obtener una población homogénea de animales se siguió el protocolo de sincronización utilizado para la obtención de muestras para el análisis con microarreglos de DNA descrito anteriormente. Alrededor de 3000 larvas en estadios L1-L2 fueron colocadas por caja Petri de 10 cm de diámetro con medio NGM-LITE y bacteria OP50-1 y se incubaron a 25°C durante 2-3 días. Posteriormente, animales de 5 cajas por cepa se colectaron como adultos en un volumen de 10 ml de buffer M9. Los animales se limpiaron de bacterias como se describió anteriormente. Al término del último lavado se retiró por completo el sobrenadante y los animales fueron resuspendidos en 400 µl de buffer TNTE, el cual incluye una mezcla de inhibidores de fosfatasas (25 µl NaF 25 mM, 10 µl NaPPi 1 mM, 10 µl NaVO<sub>4</sub> 1 mM) e inhibidores de proteasas (5 µl PMSF 1 mM, 2 µl Inhibidor de Tripsina 0.1 mg/ml, 2 µl Pestatina A 0.1 mg/ml, 2 µl Leupeptina 0.1 mg/ml, 2 µl Antipaina 0.1 mg/ml, 2 µl Benzamidina 0.1 mg/ml, 10 µl NaPPi 1 mM y 10 µl NaVO<sub>4</sub> 1 mM). Posteriormente, los animales fueron lisados por sonicación utilizando tres ciclos de sonicado con una amplitud de 35% y un tiempo de lisis de 15 seg en un Sonicador (Ultrasonic Processor). El lisado de proteínas se obtuvo centrifugando a 13000 rpm por 15 min a 4°C. La cuantificación de las proteínas se llevó a cabo por el método de Bradford (BIO-RAD), se hicieron alícuotas de la solución de proteínas que se congelaron inmediatamente en hielo seco y se almacenaron a -70°C.

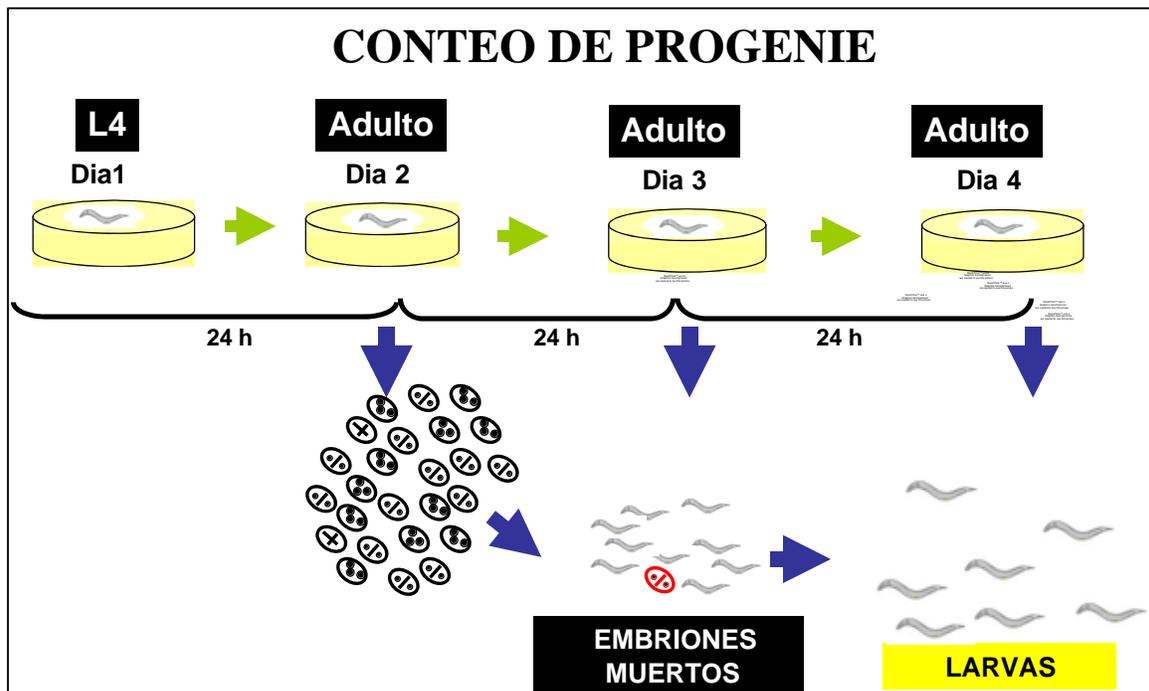
#### 4.9. ANÁLISIS TIPO WESTERN BLOT

Para la realización del Western Blot se tomaron 50 µg de extracto de proteína total para la separación en geles de poliacrilamida al 7.5%. El gel separador incluyó 625 µl de buffer separador, 1650 µl de Acrilamida-Bis 30%, 50 µl de SDS 10%, 2620 µl de agua desionizada, 50 µl de persulfato de amonio al 10% y 5 µl de TEMED. El gel concentrador fue elaborado utilizando 625 µl de buffer concentrador, 500 µl de Acrilamida-Bis 30%, 50 µl de SDS 10%, 3770 µl de agua desionizada, 50 µl de persulfato de amonio (PSA) al 10% y 5 µl de TEMED. El gel se corrió a 0.02 A hasta que el colorante llegó a la base del gel. Posteriormente, se transfirió a una membrana PVDF de Immobilon (Millipore) a 0.5 A durante 2 h a 4°C en agitación constante. Al término de la transferencia, se verificó la presencia de las proteínas en la membrana incubando con Rojo Ponceau 1X (Rojo Ponceau al 2% diluido en agua con ácido tricloroacético al 30% y ácido sulfosalicílico al 30%) durante 2 min. La membrana fue bloqueada en TBS 1X, Tween-20 al 0.1% y 5% de leche descremada en polvo (Svelty, Nestlé) por 1 h a 4°C en agitación constante. La membrana se incubó con un anticuerpo contra VBH-1 en una dilución 1:1000 en TBS 1X, Tween-20 al 0.1% y 5% de leche durante toda la noche bajo las mismas condiciones. Al término de la incubación se realizaron cinco lavados con TBS 1X, Tween-20 al 0.1% cada uno de 5 min a 4°C y se incubó con un anticuerpo secundario contra un IgG de conejo en una dilución 1:1000 (PIERCE) en TBS 1X, Tween-20 al 0.1% y 5% de leche durante 1 h a 4°C en agitación. Se hicieron cuatro lavados con TBS 1X, Tween-20 0.1% durante 5 min cada uno y posteriormente se incubó la membrana en TBS 1X por 10 min a temperatura ambiente. El anticuerpo secundario lleva acoplado a la peroxidasa, por lo que la detección del complejo de unión proteína-anticuerpo primario y anticuerpo secundario se realizó incubando la membrana en una solución de luminol (PIERCE) durante 5 min a temperatura ambiente. Finalmente, la señal de quimioluminiscencia fue detectada al poner en contacto a la membrana con una placa sensible a la luz azul (Kodak BioMax MR). Para encontrar la dilución adecuada de uso del anticuerpo de ubiquitina, se realizó un ensayo de titulación utilizando las siguientes diluciones: 1:10, 1:50, 1:100, 1:200, 1:500 y 1:1000 utilizando esta

última dilución para realizar los análisis por Western Blot. El anticuerpo contra VBH-1 se utilizó en una dilución 1:1000. Para ambos casos, se utilizó un anticuerpo secundario hecho en conejo en una dilución 1:1000 (PIERCE).

#### 4.10. ANÁLISIS DE PROGENIE

El análisis de progenie se realizó en dos niveles, por un lado se hizo el conteo del número de hijos que tiene un animal hermafrodita (Figura 3) y por el otro, se realizaron cruzas con machos. En el primer caso, se colocó un hermafrodita L4 en una caja chica (caja 1) con medio NGM-LITE y después de 24 h se cambió a una caja nueva (caja 2). Después de 24 h se movió este gusano a una caja nueva (caja 3). En este segundo día, se contó el número de larvas así como el número de embriones muertos en la caja 1.



**Figura 3.** Esquema para explicar cómo se realiza el experimento para contar progenie. El conteo de progenie se realizó colocando un animal L4 en una caja individual (caja 1) y después de 24 h este se transfirió a una caja nueva (caja 2). Después de 24 h se realizó el conteo de embriones y larvas en la caja 1, se observó si había larvas, embriones muertos o algún otro tipo de defecto. Los embriones se consideraron muertos si han eclosionado después

de que transcurrió el tiempo suficiente para que se termine la embriogénesis (14 h). El animal adulto se transfirió a una caja nueva (caja 3) y se realizó el mismo conteo. Finalmente, después de 24 h se realizó el conteo de larvas vivas y embriones muertos de la última caja. El análisis de progenie se realiza transfiriendo el animal en distintas cajas cada 24 h para facilitar el conteo y poder observar si hay embriones muertos.

Debido a que la embriogénesis dura 14 h a 20°C, todos aquellos embriones que se encuentren en la caja 1 se consideran muertos debido a que no lograron desarrollarse y eclosionar aún después de 24 h. Para el tercer día, se contaron el número de larvas de la caja 2, así como el número de embriones muertos. Finalmente, al cuarto día se realizó el conteo de larvas de la caja 3. Esta estrategia de transferir al animal a analizar en cajas nuevas cada día permite hacer un mejor conteo del número total de larvas, así como un adecuado conteo de aquellos embriones que se murieron durante el proceso de embriogénesis para saber con precisión cuántos hijos tiene un animal hermafrodita (Figura 3).

En el segundo caso, se realizaron dos tipos de cruzas. Por un lado, para determinar el número de hijos que tiene un animal hermafrodita *vbh-1(RNAi)* que se cruza con machos *him-8* cuyo esperma es silvestre, se colocó en una caja chica un hermafrodita L4 *vbh-1(RNAi)* y tres machos (caja1) y después de 24 h estos animales, tanto los machos como el hermafrodita, se transfirieron a una caja nueva (caja 2). Al día siguiente y después de 24 h más se volvieron a cambiar a una caja nueva (caja 3) y se contó el número de larvas y de embriones muertos. Después de 24 h se movió la crusa a una caja nueva (caja 4) y se contaron las larvas y embriones muertos de la caja 2. En el cuarto día, se contaron las larvas de la caja 3 y se registró también el número de embriones muertos en dicha caja. Para el quinto día, se hizo el conteo de larvas y embriones muertos de la caja 4 y finalmente después de 24 h se registraron los mismos datos para la última caja. En estas cruzas, es hasta el tercer día cuando podemos determinar cuántos de todas las cruzas que se colocaron, realmente se cruzaron con algún macho. Esto se determina al encontrar que dentro de toda la población de hijos existe una alta incidencia de machos. El otro tipo de crusa se realizó colocando un animal L4 de la cepa *fog-2* (la cual produce solo ovocitos) y 3 machos *vbh-1(RNAi)*. A diferencia de la

cruza descrita anteriormente, en estos animales sólo se cambiaron los gusanos a una caja nueva cuando se observó la presencia de embriones en la placa. Debido a que los animales *fog-2* solo producen ovocitos, entonces todos aquellos que tengan embriones en su caja serán animales que se han cruzado con machos.

#### **4.11. ANÁLISIS TIPO NORTHERN BLOT**

Las muestras de RNA utilizadas para el ensayo tipo Northern blot se obtuvieron como se describió en el apartado de "Obtención de muestras para los análisis de microarreglos". Las muestras de RNA se separaron en un gel desnaturalizante de agarosa al 1% que se preparó como se describe a continuación: se disolvieron 0.5 g de agarosa (INVITROGEN) en 36 ml de agua tratada con dietilpirocarbonato o DEPC (SIGMA) y posteriormente se agregaron 8.9 ml de formaldehído al 37% y 5 ml de MOPS 10X. El MOPS es un amortiguador para electroforesis que se preparó de la siguiente manera: 3.3 ml de acetato de sodio 3 M pH 5.2, 10 ml de EDTA 0.5 M pH 8.0 y 20.9 g de MOPS, en un volumen de 300 ml de H<sub>2</sub>O DEPC, se ajustó el pH a 7.0 con NaOH 5 N y se aforó con H<sub>2</sub>O DEPC a 500 ml. Las muestras de RNA se desnaturalizaron antes de ser separadas en la electroforesis de la siguiente forma: en un tubo de 1.5 ml se colocó 3.6 µl de H<sub>2</sub>O DEPC, 3 µl de MOPS 10X, 15 µl de formamida (SIGMA) y 5.4 µl de formaldehído al 37% y 10 µg de RNA de cada una de las muestras. El volumen final de esta mezcla que contiene RNA fue de 30 µl. Las muestras se mezclaron y se les agregó 3.5 µl de amortiguador de carga para RNA 10X y 2 µl de una solución de 1 mg/ml de bromuro de etidio (EtBr). Las muestras se desnaturalizaron a 68°C durante 15 min y posteriormente se colocaron en hielo por 2 min, se centrifugaron y se cargaron en el gel. Las muestras se corrieron a 40 Volts (5 volts por cada cm de gel). Una vez que la banda que corresponde al azul de bromofenol llegó al frente del gel se detuvo la electroforesis. Posteriormente, y con la ayuda de una pipeta Pasteur de vidrio con bulbo, se le hicieron orificios al gel para identificar la posición correspondiente a las bandas del marcador de peso molecular (RNA ladder) así como aquellas bandas de los RNAs ribosomales.

El RNA se transfirió a una membrana de Nylon Hybond-N<sup>+</sup> (AMERSHAM Pharmacia Biotech) como se describe a continuación. Para realizar la transferencia de RNA se preparó buffer de transferencia (SSC 20X) el cual se preparó de la siguiente manera: 175.3 g de NaCl y 88.2 g de citrato de sodio se disolvieron en 1 litro de H<sub>2</sub>O grado milli Q y se esterilizó por autoclave. En un refractario de vidrio se colocaron alrededor de 300 ml de SSC 20X y sobre el refractario se colocó un vidrio con la finalidad de formar un “puente”. Sobre el vidrio se colocaron 2 tiras de papel filtro (Whatman) las cuales se pusieron en contacto con el buffer de transferencia (SSC 20X). Las burbujas que se formaron entre los filtros y el vidrio fueron eliminadas deslizando sobre la superficie del papel un tubo cónico de 15 ml. Posteriormente se colocó el gel invertido sobre el papel Whatman y sobre el gel se colocó una membrana de Nylon (Amersham Pharmacia Biotech). Se retiraron las burbujas con un tubo cónico de 15 ml y para recordar la orientación de la membrana se cortó la esquina inferior derecha. Para evitar que el buffer de transferencia quede en contacto con las siguientes capas de filtros y papel, se colocaron tiras de papel Parafilm en las orillas del cuadro que contiene al gel y a la membrana. Sobre el gel se colocaron 2 pedazos de papel Whatman del mismo tamaño que el gel previamente sumergidos en SSC 20X y posteriormente 6 pedazos más de papel seco. Se colocó un paquete de papel comercial absorbente, un vidrio y sobre este un libro para hacer presión sobre la transferencia. El papel absorbente favorece la absorción del buffer de transferencia de abajo hacia arriba, lo cual promueve por capilaridad la transferencia del RNA del gel a la membrana. La transferencia se dejó toda la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente se desmontó la transferencia y antes de separar el gel de la membrana, se marcaron las bandas del peso molecular y los RNAs ribosomales, se verificó en el transiluminador la presencia de RNA y se dejó secar la membrana a temperatura ambiente. El RNA fue fijado a la membrana utilizando una lámpara de luz ultravioleta a 1400 Joules (UV Stratalinker 1800 de STRATAGENE). La membrana se pre-hibridó inmediatamente o se guardó en un sobre de papel Whatman a temperatura ambiente.

#### 4.12. OBTENCIÓN DE DNA (PLÁSMIDO) PARA LA SÍNTESIS DE SONDAS RADIATIVAS

Para llevar a cabo el análisis de la expresión por experimentos tipo Northern blot de los genes de la vía de ubiquitina (conjugativa, ligasa y el complejo de ligasa) se realizó la obtención de sondas a partir de los plásmidos que contienen dichos genes. Estos fueron obtenidos de una biblioteca para RNA de interferencia con la que cuenta nuestro laboratorio (Open Biosystems). Una vez aislados los plásmidos fueron secuenciados para verificar.

El método de obtención de plásmidos se describe a continuación. A partir de un glicerol que contiene bacterias con el plásmido de interés, se aisló una colonia distribuyendo homogéneamente las bacterias sobre cajas de LB con 50 µg/µl de ampicilina y 12.5 µg/µl de tetraciclina y se incubó toda la noche a 37°C. A partir de una colonia aislada, se hizo un cultivo líquido de 5 ml de LB con 50 µg/µl de ampicilina y se realizó la extracción del plásmido siguiendo las instrucciones del fabricante (QIAGEN).

Para aislar el gen que sirvió de sonda se digirieron 3 µg del plásmido con la enzima EcoRV y se cortó la banda esperada. La purificación de bandas a partir de un gel de agarosa se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante (QIAGEN: Estuche para extraer DNA de agarosa). Se verificó la purificación de la banda por electroforesis utilizando 4 µl de la muestra. El DNA extraído se almacenó a -20°C.

En los casos de los genes que codifican el adaptador para la enzima conjugativa y la ligasa, las sondas se aislaron a partir de productos de PCR. La estrategia de amplificación se describe a continuación. A partir de los plásmidos extraídos se hizo un PCR utilizando 1 ng/µl de este DNA extraído, 10 mM de dNTPs, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, buffer 10 X sin Mg, 1 µl Taq polimerasa y 1 ng/µl de los oligos pL4440-dest-RNAi FOR (5'GTTTTCCCAGTCACGACGTT3') y pL4440-dest-RNAi REV (5'TGGATAACCGTATTACCGCC 3') en H<sub>2</sub>O milliQ estéril. La reacción de PCR se realizó utilizando el siguiente programa: 95°C por 4 min, 95°C por 30 min, 55 °C por 45 seg, 72 °C por 4 min, 95°C por 30 min 25 veces, 72 °C por 4 min y 25 °C. Al término de la síntesis se verificó por

electroforesis la amplificación de los genes. Posteriormente se corrió la muestra de PCR para aislar la banda en un gel de electroforesis preparativo y se hizo la extracción de DNA siguiendo las instrucciones del fabricante (QIAGEN).

El marcado de la sonda se llevó a cabo con el estuche de primers al azar de INVITROGEN. Para preparar la sonda de DNA se realizó el siguiente procedimiento: se colocó en un tubo eppendorf de 1.5 ml 10  $\mu$ l de DNA el cual se obtuvo a partir de un producto de PCR y 13  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O milli Q estéril. El DNA fue hervido por 5 min y se colocó en hielo durante 2 min. Al tubo con la sonda se le agregaron 2  $\mu$ l de dATP, 2  $\mu$ l de dTTP, 2  $\mu$ l de dGTP, 15  $\mu$ l de Random Primers (INVITROGEN), 5  $\mu$ l del nucleótido radiactivo ( $\alpha$ -dCTP) (Amersham) y 1  $\mu$ l de la enzima Klenow (INVITROGEN). La reacción de síntesis de la sonda radiactiva se dejó 1 h a temperatura ambiente y el volumen total de reacción fue de 45  $\mu$ l.

Al finalizar la síntesis de la sonda radiactiva se detuvo la reacción, se agregaron 5  $\mu$ l de amortiguador final (INVITROGEN). El volumen final de esta mezcla fue de 50  $\mu$ l. Posteriormente, los nucleótidos radiactivos que no se incorporaron a la sonda se eliminaron siguiendo las instrucciones del fabricante de las columnas de Sephadex MicroSpin G-50 (Amersham Biosciences). Brevemente, para eliminar el amortiguador que contienen las columnas se agitó de una sola intención la columna y se eliminó la tapa inferior. La columna se colocó dentro de un tubo de 1.5 ml y se centrifugó a 0.7 rcf (fuerza centrífuga relativa) por 1 min en una centrífuga Eppendorf (5415D). La columna se colocó en un tubo nuevo de 1.5 ml y la mezcla de reacción se colocó en el centro de la columna y se centrifugó a 0.7 rcf por 2 min. La muestra que se recuperó fue hervida durante 5 min, se incubó en hielo por 2 min y finalmente se añadió al frasco de prehibridación que contiene la membrana.

La pre-hibridación de la membrana se realizó colocando la membrana dentro de un tubo de vidrio con 10 ml de Solución de Hibridación previamente calentada a 65°C. Para bloquear la membrana se agregaron 100  $\mu$ l de DNA de esperma de Salmón (INVITROGEN) desnaturalizado durante 5 min a 65°C (evitando colocarlos directamente sobre la superficie de la membrana) y se preincubó durante 1 h a 65°C en rotación constante (Rotor LAB-LINE Hybridation Incubator). La Solución de Hibridación se preparó como se

describe a continuación (Sambrook y Rusell, 2001): en 200 ml de H<sub>2</sub>O milli Q estéril se agregaron 15 ml de Solución Denhardt's, 150 ml de solución de fosfatos 0.1 M pH 6.5, 75 ml de SSC 20X y 6 ml de SDS 10%, se aforó a 300 ml con H<sub>2</sub>O milli Q estéril. La Solución Denhardt's se preparó mezclando 2 g de Ficoll, 2 g de Polivinil Pirrolidona o PVP y 2 g de BSA en 100 ml de H<sub>2</sub>O milli Q y fue esterilizado por filtración. La solución de fosfatos 0.1 M pH 6.5 se elaboró con 25.5 ml de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 M y 74.5 ml de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, se aforó a 1000 ml con H<sub>2</sub>O milli Q estéril y se esterilizó por filtración. La hibridación se realizó toda la noche a 65°C en rotación constante.

Al término de la hibridación, se retiró la solución de hibridación, la cual contiene a la sonda radiactiva. Para eliminar el pegado inespecífico de la sonda en la membrana, se realizaron dos lavados consecutivos. En el primero se utilizaron 200 ml de una solución previamente calentada a 65°C y que contiene 178 ml de H<sub>2</sub>O milli Q, 20 ml de SSC 20X y 2 ml de SDS 10%. Este lavado se realizó durante 30 min a 65°C en rotación constante. Posteriormente, se retiró la solución y se incubó con 200 ml de una solución previamente calentada a 65°C que contenía 193 ml de H<sub>2</sub>O milli Q, 5 ml de SSC 20X y 2 ml de SDS 10% a 65°C. Finalmente, la membrana se cubrió con un plástico y se expuso a una pantalla amplificadora sensible a radiactividad (Amersham Bioscience). La imagen fue obtenida al exponer la pantalla amplificadora en un detector de imágenes Phosphoimager (STORM-840). También se obtuvo una imagen en film exponiendo la membrana a una película sensible a radiactividad (KODAK) durante toda la noche a -70°C y revelando.

#### **4.13. ANÁLISIS DE RESULTADOS OBTENIDOS CON MICROARREGLOS EN *C. elegans***

Aunque se conocen muchos de los procesos biológicos en *C. elegans*, tan solo el 7% de los genes presentes en el genoma se encuentran asociados a procesos específicos, así como a una función bioquímica. Para incrementar el conocimiento, se han utilizado varias técnicas entre las que se incluye la interferencia de RNA (RNAi) y los microarreglos de DNA. Los microarreglos de DNA constituyen una de las técnicas más poderosas y versátiles de la

investigación genómica. Esta técnica es ampliamente utilizada debido a que el perfil de la expresión de genes puede ser comparado entre diferentes poblaciones para detectar de manera específica la expresión de determinados genes a través del uso de marcadores fluorescentes (Ramírez *et al.*, 2003).

Por medio de microarreglos, el grupo de Reinke *et al.*, (2000) identificó a los genes que se expresan específicamente en la línea germinal de *C. elegans*. La expresión de estos genes fue clasificada en 3 grupos: genes cuya expresión se encuentra enriquecida en a) los espermatozoides, b) en los ovocitos y c) o en células germinales en general, independientemente de los procesos de espermatogénesis u ovogénesis, los cuales se clasificaron como genes intrínsecos de la línea germinal. En este análisis se encontraron 650 genes específicos de los espermatozoides, 258 de los ovocitos y 508 son intrínsecos de la línea germinal (Reinke, 2000). En este estudio se encontraron genes de la línea germinal que ya habían sido estudiados anteriormente y genes nuevos. Posteriormente, en otro estudio se determinó el patrón de interacciones entre las proteínas que codifican para estos genes (Walhout *et al.*, 2002).

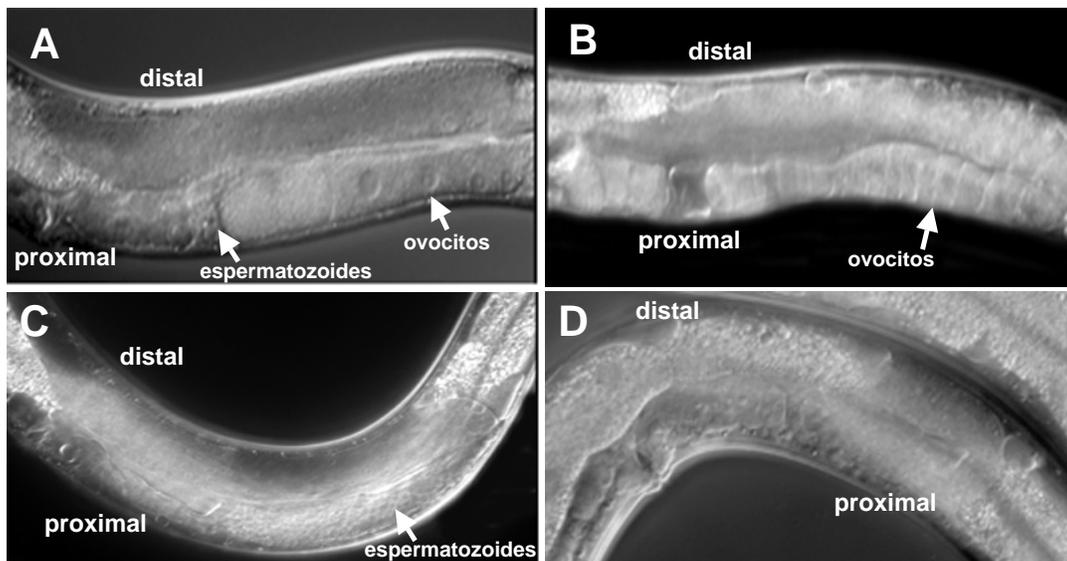
Con este antecedente se hizo un análisis de microarreglos para encontrar aquellos genes que modifican sus niveles de expresión cuando VBH-1 no se encuentra.

## **5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **5.1. VBH-1 ES UNA PROTEÍNA ESPECÍFICA DE LA LÍNEA GERMINAL DE *C. elegans***

Originalmente el gen *vasa* se identificó en *Drosophila*, como un componente materno que se requiere para la formación de los segmentos abdominales, así como para la especificación de las células germinales y cuya ausencia causa defectos durante la embriogénesis y la ovogénesis (Hay y Jan, 1990). Posteriormente, diversos grupos han identificado los ortólogos de esta proteína en otros organismos. VBH-1 es la proteína ortóloga de VASA en *C. elegans*. Con el uso de un anticuerpo comercial, el cual es específico y está dirigido contra un péptido en el carboxilo terminal de VBH-1, se ha determinado que, como en *Drosophila*, esta proteína se localiza en las células germinales y se encuentra enriquecida en los gránulos P de *C. elegans* (Salinas *et al.*, 2007).

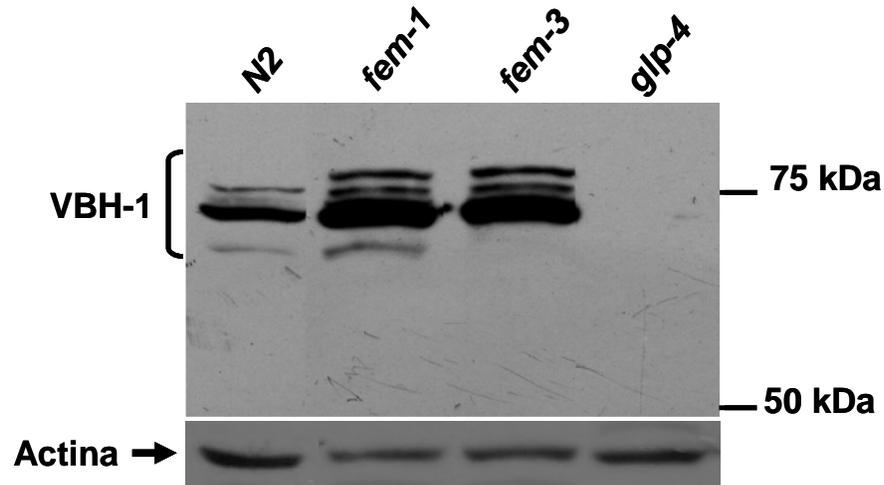
Para determinar si esta proteína se expresa específicamente en la línea germinal se realizó un análisis de su expresión por medio de Western Blot, utilizando mutantes afectadas en el desarrollo de la línea germinal y el anticuerpo específico contra VBH-1. Se utilizaron animales adultos silvestres como control (*N2*) y animales mutantes (sensibles a temperatura), de las cepas *fem-1 (hc17)*, *fem-3(q20gf)* y *glp-4(bn2)* (Figura 4) (Nelson *et al.*, 1978; Barton *et al.*, 1987; Brenan y Strome, 1992), los cuales son hermafroditas que solo producen ovocitos, solo espermatozoides o que tienen una gónada muy reducida, respectivamente.



**Figura 4.** Mutantes en la línea germinal de *C. elegans*. Fotografías tipo Nomarski de animales adultos de la cepa silvestre *N2* (A), *fem-1(hc17)* la cual produce solo ovocitos (B), *fem-3(q20gf)* la cual produce continuamente espermatozoides (C) y un animal de la cepa *glp-4(bn2)* la cual presenta una gónada muy reducida (D). La región distal es la parte más alejada a la abertura del animal (vulva), mientras que la zona más cercana a ésta se le conoce como región proximal. Fotografías tomadas por: Rosa Navarro.

En los animales *N2*, *fem-1* y *fem-3* se detectó una banda principal de mayor intensidad de un peso esperado (aproximadamente 75 kDa), también se observó una banda de peso superior en los tres casos, una banda extra de peso mayor en los animales *fem-1* y *fem-3* y finalmente una banda con peso menor a 70 kDa en animales silvestres y *fem-1*, la cual podría ser una forma específica de ovocitos ya que solo se observa en estos animales los cuales producen ovocitos durante su desarrollo (Figura 5). En el genoma de *C. elegans* se predicen tres formas alternativas de splicing que producirían proteínas de pesos moleculares de 72.6, 70.8 y 70.5 kDa. Estos pesos moleculares son difíciles de diferenciar en un gel por lo que podrían estar representados incluso en la banda mayoritaria. Las otras bandas que detectamos podrían ser otras formas alternativas de splicing que no se han reportado aún o podrían representar modificaciones post-traduccionales. No se detectó ninguna banda en el carril de los animales *glp-4(bn2)*, los cuales tienen

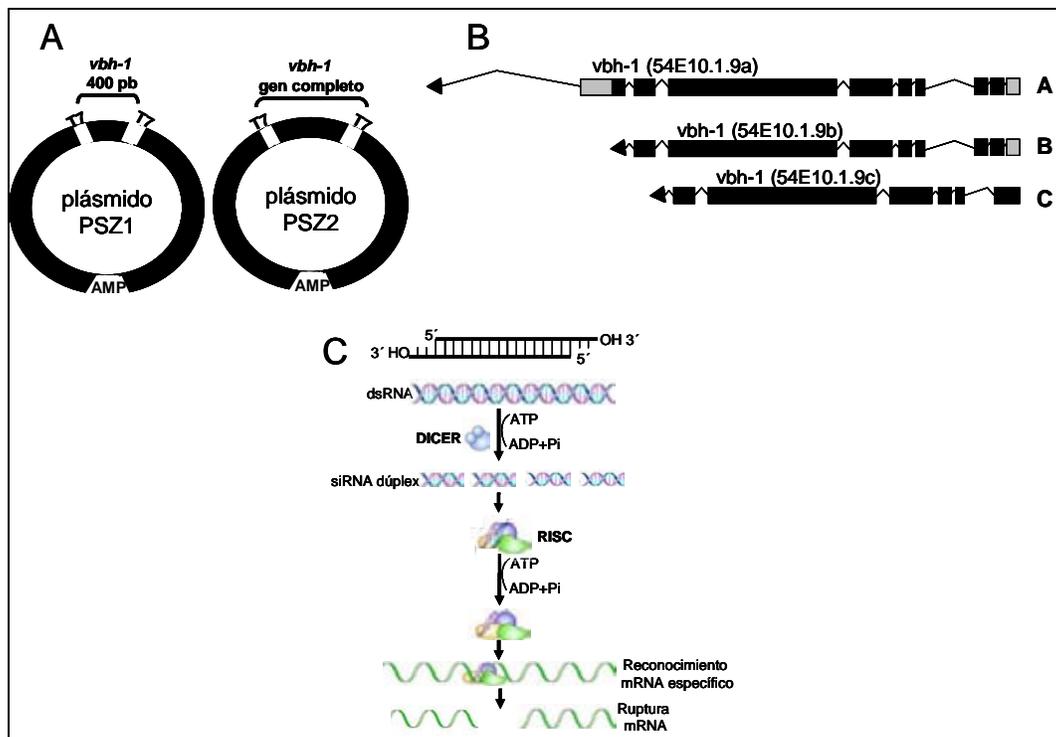
una gónada muy reducida, lo que sugiere que VBH-1 es específico de la línea germinal (Figura 5). Por otro lado, la ausencia de todas las bandas en esta cepa indica que todas ellas representan variaciones de la misma proteína. Como control de carga de proteína se utilizó un anticuerpo comercial contra actina (Santa Cruz).



**Figura 5.** VBH-1 es una proteína específica de línea germinal. La figura muestra un análisis tipo Western blot de extractos totales de proteínas de animales silvestres *N2*, *fem-1(hc17)*, *fem-3(q20gf)* y *glp-4 (bn2)* en donde se utilizó un anticuerpo específico que reconoce el extremo carboxilo terminal de VBH-1 y un anticuerpo comercial contra actina como control de carga. El análisis de proteínas revela la presencia de una banda principal de alrededor de 75 kDa, dos bandas mayores en los animales *fem-1* y *fem-3* y una banda de menor peso en aquellos animales que solo producen ovocitos, *fem-3* y silvestres sugiriendo que hay una forma específica del proceso de ovogénesis. Este resultado nos indica que VBH-1 es una proteína específica de la línea germinal debido a que en una mutante que carece de este tejido, *glp-4*, no se observa ninguna de las bandas presentes en los animales silvestres *N2*, *fem-1* y *fem-3*. La extracción y separación de las proteínas en el gel de acrilamida, así como la hibridación con el anticuerpo contra VBH-1 fue realizado por Marta Castro, mientras que la hibridación con actina como control de carga la realicé como parte de este trabajo.

## 5.2. LA FALTA DE VBH-1 CAUSA DEFECTOS EN LA FERTILIDAD Y LA EMBRIOGÉNESIS

Resultados previos mostraron que los animales *vbh-1(RNAi)* tienen menos hijos que una cepa silvestre aún cuando tienen un bajo porcentaje de letalidad durante la embriogénesis (Salinas *et al.*, 2007). Se han utilizado dos templados para hacer RNA de doble cadena para el RNA de interferencia de *vbh-1*. El primero es un fragmento de 400 pb que corresponde al extremo 5' de la forma alternativa de splicing B, la cuál esta contenida en el plásmido pSZ1 (Figura 6).

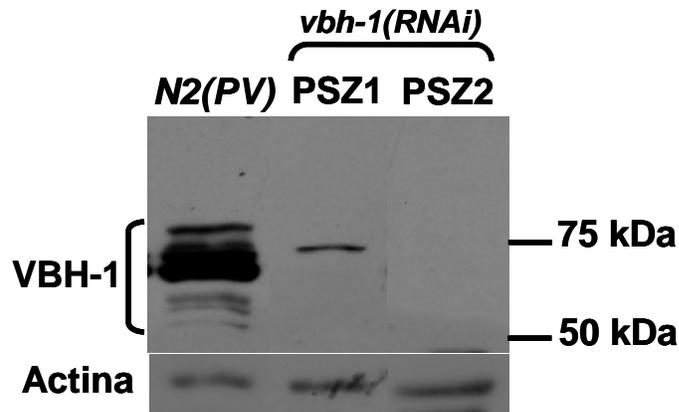


**Figura 6.** Interferencia de RNA en el *C. elegans*. (A) Los plásmidos PSZ1 y PSZ2 contienen un fragmento de 400 pb o el gen completo de *vbh-1*, respectivamente. La secuencia del gen completo, así como el fragmento, se encuentran flanqueadas por dos promotores T7 para llevar a cabo la síntesis de hebras complementarias. Estas hebras forman el RNA de doble cadena que sirve como sustrato para inducir la interferencia de RNA y silenciar específicamente la expresión del gen *vbh-1*. Ambos plásmidos tienen resistencia a ampicilina. El diagrama en B muestra las tres isoformas de *vbh-1* reportadas actualmente en la base de datos de *C. elegans* wormbase ([www.wormbase.org](http://www.wormbase.org)). (C) Diagrama que muestra el mecanismo de interferencia de

RNA a partir de una molécula de RNA de doble cadena como sustrato. A través de un paso que requiere el consumo de una molécula de ATP, el RNA de doble cadena es cortado en fragmentos de alrededor de 21 nucleótidos por la enzima DICER. Estos fragmentos son reconocidos y ensamblados en un complejo proteico denominado RISC el cual separa las hebras y utiliza una de éstas para reconocer de manera específica al mRNA blanco. Este reconocimiento promueve la degradación del mRNA.

El otro templado es la forma alternativa de splicing B completa y corresponde al plásmido pSZ2. Gran parte de la isoforma B esta contenida dentro de las isoformas A y C, por lo que al utilizarla como templado para hacer RNA de interferencia se eliminan todas las formas alternativas de splicing del gen *vbh-1*. Sin embargo, el fragmento 5' de la forma alternativa de splicing B solo está presente en las formas A y B por lo que podría ser que no elimine eficientemente a la forma C (Figura 6).

Para probar la eficiencia de estas secuencias de DNA para expresar RNA de interferencia se realizó un experimento tipo Western blot. Se extrajo proteína de animales *vbh-1(RNAi)* producidos con el fragmento de 400 pb o el gen completo, así como de animales silvestres como control alimentados con bacterias que contienen un plásmido vacío (*N2(PV)*). En este experimento, se observó que en los extractos de proteína obtenidos de animales *vbh-1(RNAi)* plásmido pSZ1, todavía se detecta una banda con el anticuerpo contra VBH-1. Esta banda parece ser parte de la banda principal observada en la cepa silvestre. Esto sugiere que ésta banda está formada por más de una proteína (Figura 7). Por otro lado, todas las bandas observadas en la cepa silvestre desaparecen cuando se utiliza el plásmido pSZ2 como templado para hacer RNAi (Figura 7). Con estos datos, concluimos que la forma alternativa de splicing B completa es más eficiente para hacer RNAi. En un futuro planeamos hacer RNAi utilizando fragmentos específicos de las formas alternativas de splicing para determinar si alguna de estas formas es específica de algún estadio o tipo celular específico.



**Figura 7.** Análisis de proteínas por Western blot a partir de extractos proteicos obtenidos de animales *N2(PV)*, *vbh-1(RNAi)* PSZ1 y *vbh-1(RNAi)* PSZ2. En la figura se muestra que el anticuerpo utilizado reconoce de manera específica a la proteína VBH-1 y que en un experimento de RNAi se eliminan la mayor parte de las isoformas de esta proteína. En ambos casos se utilizó como control de carga al anticuerpo contra actina (50 kDa).

Se hizo un análisis detallado del número de hijos que tienen los animales *vbh-1(RNAi)* y del porcentaje de letalidad embrionaria que presentan. Se siguieron animales individuales de la cepa silvestre y animales *vbh-1(RNAi)* procedientes de los plásmidos pSZ1 y pSZ2. Los animales se seleccionaron como larvas L4 de desarrollo, se colocaron individualmente en una caja Petri y se movieron aproximadamente cada 24 h a una caja nueva, hasta que dejaron de tener hijos (aproximadamente 3 días). Un día después de sacar al adulto de la caja Petri se observó la caja bajo el microscopio para detectar embriones muertos. La embriogénesis transcurre en 14 h a 20° C, por lo que si algún embrión permanece en la placa después de este periodo se considera muerto. A los dos días de sacar al animal adulto de la caja se contó el número de larvas, para permitir su desarrollo y facilitar el conteo.

Cuando se hizo RNAi utilizando el fragmento de 400 pb del gen *vbh-1* observamos una reducción de un 40% en el número de hijos y una letalidad embrionaria de 1.2% con respecto a los animales control, *N2(PV)* (Tabla 1). Encontramos los mismos resultados al utilizar el gen completo de *vbh-1* para hacer RNA de interferencia. Esta similitud en el fenotipo utilizando al gen completo o al fragmento de se debe a que este último tiene la secuencia

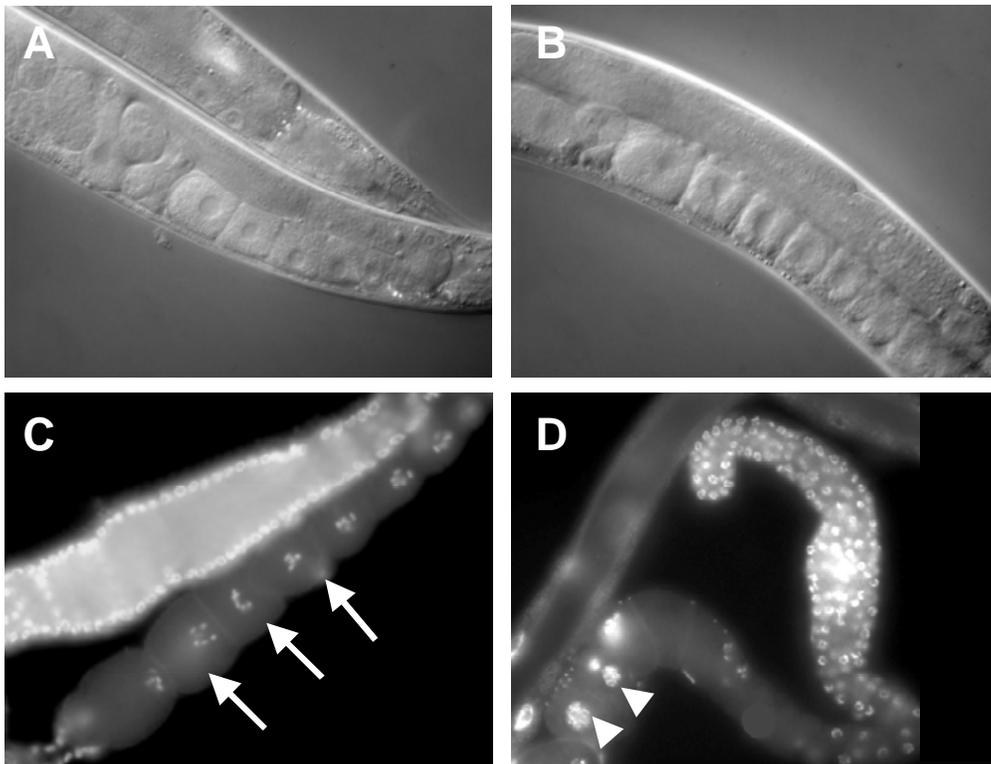
específica necesaria para bloquear por RNA de interferencia la expresión del gen *vbh-1*, mostrando una inhibición altamente eficiente.

	Progenie (%)	Larvas vivas (%)	Letalidad Embrionaria (%)
<i>N2(PV)</i>	100	99.98	0.02
<i>vbh-1(RNAi) PSZ1</i>	60	98.8	1.2
<i>vbh-1(RNAi) PSZ2</i>	55.6	97.2	2.1

**Tabla 1.** Análisis del fenotipo observado en los animales *vbh-1(RNAi)*. La falta del gen *vbh-1* causa una reducción importante en los niveles de progenie así como una reducida letalidad embrionaria. Los datos de la tabla muestran los niveles de progenie obtenidos a partir del análisis de 25, 25 y 29 individuos, respectivamente.

La letalidad embrionaria de los animales *vbh-1(RNAi)* no ocurre en una etapa específica de la embriogénesis, aunque la mayoría de los embriones se mueren en etapas avanzadas de la embriogénesis como son las etapas llamadas coma, dos vueltas y pretzel (datos que no se muestran). Aunque el porcentaje de letalidad embrionaria de los animales *vbh-1(RNAi)* es de 1.2% este valor resulta importante debido a que en condiciones silvestres este valor es de tan sólo el 0.1%. Por ello, estos resultados nos indican que VBH-1 es una proteína importante para el desarrollo de *C. elegans*. La reducción en el número de hijos en los animales *vbh-1(RNAi)* puede deberse a defectos en la ovogénesis o la espermatogénesis.

Uno de los fenotipos característicos de la falta de *vbh-1* es la acumulación de los ovocitos en la parte proximal de la gónada (Figura 8 panel B). Este fenotipo es característico de animales silvestres viejos, cuando sus espermatozoides se han acabado.



**Figura 8.** Los animales *vbh-1(RNAi)* acumulan ovocitos en la parte proximal de la gónada. La fotografía muestra una microscopía tipo Nomarski de los animales silvestres (A) y animales *vbh-1(RNAi)* (B) de la misma edad. Los animales *vbh-1(RNAi)* muestran un mayor número de ovocitos así como un apilamiento de éstos en la gónada, característica generalmente observada en aquellos animales silvestres que no tienen espermatozoides o en mutantes del proceso de espermatogénesis. En algunos casos, estos ovocitos apilados se vuelven endomitóticos debido a que llevan a cabo sucesivos eventos de replicación del DNA. En C y D se muestra una tinción con DAPI para visualizar los núcleos endomitóticos tanto de los animales silvestres (C) como de los animales *vbh-1(RNAi)* (D). Las flechas muestran ovocitos normales en la profase I, mientras que las cabezas de flechas muestran núcleos endomitóticos en animales *vbh-1(RNAi)*. Fotografías tomadas por Rosa Navarro.

La ovulación en *C. elegans* ocurre cuando una señal emitida por los espermatozoides, la proteína MSP, es liberada en la gónada proximal provocando que los ovocitos maduren y las células de la vaina que recubren a los ovocitos se contraigan (Miller *et al.*, 2001). Este movimiento ayuda a los ovocitos a entrar a la espermateca y ser fertilizados. Como las gónadas de animales hermafroditas *vbh-1(RNAi)* tienen espermatozoides existen dos

posibilidades para explicar la acumulación de ovocitos en animales *vbh-1(RNAi)*. La primera posibilidad es que los espermatozoides no sean capaces de enviar la señal de maduración y por lo tanto los ovocitos se acumulan como si no hubiera espermatozoides. La otra es que los ovocitos sean incapaces de responder a esta señalización. Para diferenciar entre estas hipótesis se cruzaron hermafroditas *vbh-1(RNAi)* con machos provenientes de la cepa mutante *him-8(e1489)*, por sus siglas en inglés *High Incidence of Males*. Esta cepa tiene una mutación que provoca que los hermafroditas (que normalmente tienen solo hijos hermafroditas) tengan un 30% de hijos machos (Phillips *et al.*, 2005). Esta mutación no altera la fertilidad ni la capacidad de fecundación de los animales. Si los espermatozoides *vbh-1(RNAi)* tienen problemas para la señalización que envían para la maduración de los ovocitos, esperamos que al cruzar a los animales *vbh-1(RNAi)* con machos silvestres la fertilidad de estos animales aumente. Por el contrario, si la infertilidad de los animales *vbh-1(RNAi)* se debe a defectos en los ovocitos, no esperamos ver un aumento en la fertilidad en estas cruces. La estrategia general de este experimento se basa en colocar, en una caja Petri chica, un hermafrodita *vbh-1(RNAi)* L4 y tres machos *him-8*. El conteo de progenie y el registro de letalidad embrionaria se realizó sólo en aquellos hermafroditas que se cruzaron. Los resultados muestran que la presencia de esperma silvestre reduce los niveles de progenie en tan solo un 35%, en comparación con aquellos machos que se cruzaron con hermafroditas *N2(PV)* (100%). Es decir, que la presencia de esperma silvestre induce un aumento del 5% en la fertilidad de los animales que carecen de VBH-1 cuando se cruzan (Tabla 2). La letalidad embrionaria no se vió afectada y siguió siendo del 1-2%. Estos resultados sugieren que la falta de VBH-1 causa defectos tanto en los ovocitos como en los espermatozoides.

	Progenie (%)	Letalidad Embrionaria (%)
<i>N2(PV)</i>	100	0.02
<i>vbh-1(RNAi)</i> PSZ1	60	1.2
<i>N2(PV)</i> X <i>him-8(e1489)</i>	100	0.1
<i>vbh-1(RNAi)</i> X <i>him-8(e1489)</i>	65.1	1.2
<i>fog-2(q71)</i> X <i>N2(PV)</i>	100	0
<i>fog-2(q72)</i> X <i>vbh-1(RNAi)</i>	52.5	1

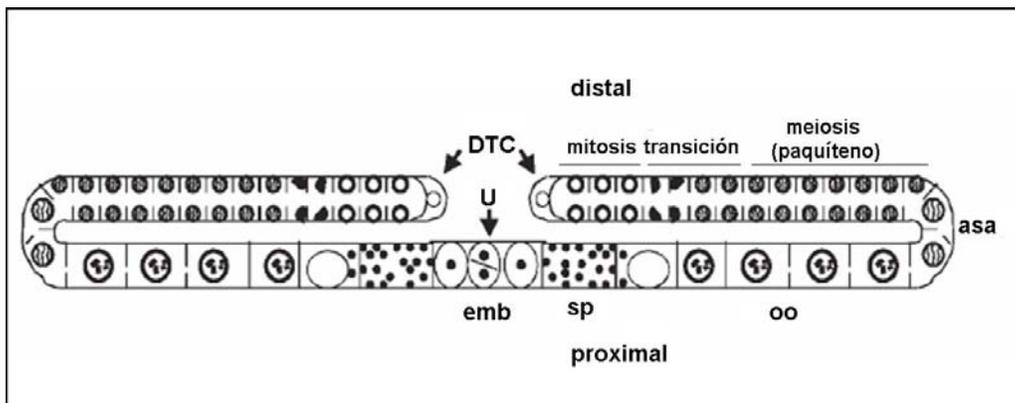
**Tabla 2.** La falta de VBH-1 causa una reducción en los niveles de progenie, así como un incremento en la letalidad embrionaria. La tabla muestra los resultados de animales *vbh-1(RNAi)* utilizando al plásmido PSZ1 para hacer RNA de interferencia. En animales hermafroditas, la falta de VBH-1 causa una reducción significativa en el número de hijos (40%) así como un incremento del 1.2% en la letalidad embrionaria. Los experimentos de cruza utilizando machos silvestres así como animales que solo producen ovocitos muestran que la falta de esta proteína afecta tanto a los ovocitos como al esperma.

Posteriormente, para saber si la falta de VBH-1 causa esterilidad en los machos *vbh-1(RNAi)*, se hicieron cruza utilizando hermafroditas de la cepa *fog-2(q71)*, la cual es una cepa que solo produce ovocitos, y machos *vbh-1(RNAi)*. En este experimento se colocó un animal L4 *fog-2* y tres machos *vbh-1(RNAi)* y la eficiencia de la crusa se verificó con la presencia de embriones en la placa. En este experimento se encontró que los machos *vbh-1(RNAi)* presentaron una reducción significativa en el número de hijos (48%) a diferencia del control (Tabla 2). La letalidad embrionaria observada en las cruza con machos *vbh-1(RNAi)* fue del 1% (Tabla 2). Estos resultados indican que VBH-1 también tiene una función en la espermatogénesis. Como se observaron niveles de letalidad embrionaria muy parecidos a los observados en hermafroditas *vbh-1(RNAi)* pensamos que defectos presentes en los espermatozoides son los causantes de esta letalidad embrionaria. Otra característica de la falta de VBH-1 es la presencia de ovocitos con núcleos endomitóticos. Este fenotipo se refiere a que los ovocitos sin fertilizar llevan a cabo múltiples eventos de replicación sin llevar a cabo la correcta separación del material genético y se le conoce como Emo por sus siglas en inglés “endomitotic oocytes” (Iwasaki *et al.*, 1996). Estos núcleos con sucesivas replicaciones provocan la acumulación de grandes cantidades de DNA, por lo que los núcleos son visualizados

fácilmente y de manera muy compacta (Figura 8 panel D). Alrededor del 15-20% de los animales *vbh-1(RNAi)* muestran ovocitos con un fenotipo Emo (Figura 8 panel D). La replicación múltiple que produce ovocitos poliploides es un proceso característico cuando existe un defecto en la ovulación, cuando no hay esperma o cuando éste último no es capaz de fertilizar al ovocito.

### 5.3. LAS CÉLULAS GERMINALES DE LOS HERMAFRODITAS ADULTOS *vbh-1(RNAi)* NO PRESENTAN DEFECTOS EN LA MITOSIS NI EN LA MEIOSIS

La gónada de *C. elegans* puede ser dividida en cuatro regiones principales debido a los procesos morfológicos que se observan: (1) la *región distal* o de mitosis está formada por una población de células germinales que se dividen constantemente por influencia de las células distales o DTCs, (2) la *región de transición* en donde las células entran en meiosis y se mueven hacia la región proximal de la gónada, (3) *zona de paquíteno*: los núcleos en paquíteno ocupan la parte media de la gónada y llegan hasta el asa. En el asa algunas células germinales incrementan su volumen citoplasmático para convertirse en ovocitos, mientras que otras se mueren por apoptosis (Wood, 1988) y (4), la *región proximal* en donde se acumulan los ovocitos en diacinesis antes de entrar a la espermateca (Figura 9).



**Figura 9.** Morfología nuclear de las células germinales de la gónada del hermafrodita de *C. elegans*. Estas regiones pueden ser visualizadas en una tinción con DAPI. La primera región incluye una población de células que se encuentran exclusivamente en mitosis, posteriormente

se encuentra la zona de transición donde existen células germinales que se encuentran en mitosis y una población de células que han iniciado la meiosis. La zona de paquíteno se localiza cerca del asa y hacia la parte más proximal de la gónada se encuentra la región que comprende a los ovocitos. DTC: célula del extremo distal; oo: ovocitos; sp: esperma; emb: embriones y U: útero. Tomado y modificado de: Navarro *et al.*,2001.

Se realizaron tinciones con DAPI para estudiar la morfología de las gónadas de animales *vbh-1(RNAi)* y determinar si éstas tienen el mismo número de células germinales que una gónada silvestre y si todas las etapas de mitosis-meiosis ocurren de manera normal. Se contó el número de células germinales en la gónada de animales silvestres y *vbh-1(RNAi)* de las cuatro diferentes regiones de la gónada y se observó la morfología nuclear para ver si había alteraciones. No se observaron diferencias entre el número de células germinales que se encuentran en cada una de las regiones analizadas ni en la morfología de los núcleos (Tabla 3), esto nos sugiere que no hay defectos en la progresión de mitosis y las diferentes etapas de meiosis.

	Distal	Transición	Paquíteno
<i>N2(PV)</i>	20.7	21.7	38.3
<i>vbh-1(RNAi)</i>	21.8	20.2	33.6

**Tabla 3.** Conteo de células germinales obtenido de las diferentes regiones de la gónada: región distal, transición, meiosis (paquíteno) y proximal (número de ovocitos). La cuantificación de células germinales en las cuatro zonas se realizó en animales *N2(PV)* y *vbh-1(RNAi)* de 1 día de adultos.

#### 5.4. LA AUSENCIA DE VBH-1 AFECTA LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE DIVERSOS GENES

Con el propósito de estudiar la función de *vbh-1* se realizó un ensayo de microarreglos de DNA. Para ello, se extrajo RNA de animales adultos jóvenes *vbh-1(RNAi)* (pSZ1) sincronizados y se comparó con el RNA de una población de animales silvestres (*N2(PV)*) crecidos en las mismas condiciones. El microarreglo que se utilizó está compuesto de genes que se expresan

exclusivamente en la línea germinal y en los ovocitos de *C. elegans* (Reinke *et al.*, 2000). Del análisis del microarreglo obtuvimos una lista de 48 genes que redujeron y 46 genes que incrementaron su expresión en ausencia del gen *vbh-1* (Tabla 4).

Los genes se identificaron en la base de datos de *C. elegans* (<http://www.wormbase.org>) y se clasificaron según su función en: genes que codifican proteínas involucradas en ubiquitinación, la respuesta al estrés, el metabolismo del RNA, relacionadas a la cromatina, la transducción de señales, el metabolismo celular, del reconocimiento celular, la transcripción, la unión a ácidos nucleicos, el transporte nuclear, la traducción, la respuesta al daño al DNA, el citoesqueleto, el transporte celular, el ciclo celular, la apoptosis y de función desconocida (Tabla 4). Algunos genes no se encontraron en la base de datos probablemente porque el nombre no es el correcto, lo cual se verificará más adelante.

## GENES QUE REDUCEN SU EXPRESIÓN EN AUSENCIA DE VBH-1

UBIQUITINACIÓN DE PROTEÍNAS	
GEN	DESCRIPCIÓN
F48C1.2	Proteína F box
ZK858.4	<i>mel-26</i> , adaptador para la ligasa de ubiquitina (E3)

RESPUESTA A ESTRÉS	
GEN	DESCRIPCIÓN
F43D9.4	<i>sip-1</i> , Proteína inducida por estrés
F26D10.3	<i>hsp-1</i> , Proteína de choque de calor

METABOLISMO DE RNA	
GEN	DESCRIPCIÓN
W08E3.1	<i>snr-2</i> , Ribonucleoproteína nuclear U1
F46F11.2	<i>cey-2</i> , Proteína Y box, involucrada en el procesamiento de RNA o en la regulación transcripcional al unirse directamente al DNA.
R13A5.12	<i>lpd-7</i> , Proteína involucrada en la biogénesis del ribosoma, en el ensamblaje nucleolar así como en la proliferación celular.

CROMATINA	
GEN	DESCRIPCIÓN
C18G1.5	Histona H1.4
C08B11.2	<i>had-2</i> , Desacetilasa de histonas
R08C7.3	<i>htz-1</i> , Homólogo de una variante de la histona H2AZ
D2096.8	<i>nap-1</i> , proteína NAP-1 involucrada en el ensamblaje del nucleosoma
Y43F4B.3	Histona H3-K9 metiltransferasa con un dominio conservado SET
F01G4.1	<i>psa-4</i> , PSA-4 es un componente del complejo SWI/SNF el cual está involucrado en el remodelaje de la cromatina.

TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES	
GEN	DESCRIPCIÓN
C14B9.4	<i>plk-1</i> , La proteína PLK-1 está involucrada en el rompimiento de la envoltura nuclear, en la formación del cuerpo polar, en la segregación de los cromosomas durante la meiosis y en el desarrollo de la línea germinal.
C38C10.4	<i>gpr-2</i> , La proteína GPR-2 actúa como un regulador positivo de la vía de señalización por proteínas G.

METABOLISMO CELULAR	
GEN	DESCRIPCIÓN
C25A1.8	<i>clec-87</i> , Lectina tipo C
W02D3.2	Dihidro-rotato deshidrogenasa
F26D10.10	<i>gln-5</i> , Glutamino sintasa

RECONOCIMIENTO CELULAR	
GEN	DESCRIPCIÓN
C07G2.1	<i>cej-1</i> , Proteína de unión celular

<b>TRANSCRIPCIÓN</b>	
<b>GEN</b> F32D1.9 H43107.2 Y116A8C.42	<b>DESCRIPCIÓN</b> Factor de poliadenilación I, contiene la subunidad FIP1 Subunidad RPA40/RPCc40 de la RNA polimerasa I y III <i>snr-1</i> , SNR-1 es un ortólogo de la familia de ribonucleoproteínas nucleares llamada Sm D3, la cual forma parte de un complejo heptamérico necesario para la biogénesis y función de las ribonucleoproteínas las cuales catalizan el splicing de diversos mRNAs.
<b>UNIÓN A ÁCIDOS NUCLEICOS</b>	
<b>GEN</b> T01C3.7	<b>DESCRIPCIÓN</b> <i>fib-1</i> , proteína nucleolar de unión a RNA perteneciente a la familia de Fibrilarinas.
<b>T02E1.3</b> <b>C16A3.4</b>	<i>gla-3</i> , proteína con dos dominios de dedos de zinc de tipo CCCH. Proteína con dedos de zinc de tipo C2H2.
<b>TRANSPORTE NUCLEAR</b>	
<b>GEN</b> M01D7.6	<b>DESCRIPCIÓN</b> <i>emr-1</i> , Proteína homóloga de la proteína integral de membrana nuclear de humanos, llamada Emerina con un dominio LEM altamente conservado en metazoarios.
<b>TRADUCCIÓN</b>	
<b>GEN</b> F53A2.6 T22F3.4 F55H2.6	<b>DESCRIPCIÓN</b> Factor de inicio de la traducción eIF4E <i>rpl11.1</i> , Proteína ribosomal. Componente de la subunidad grande. <i>clu-1</i> , Proteína homóloga de la proteína CLU de levadura relacionada a funciones mitocondriales.
<b>F54C8.4</b> <b>C43E11.4</b>	Proteína involucrada en el procesamiento de mRNA, codifica la subunidad alfa de la guanosiltransferasa. <i>tufm-2</i> , Factor de Elongación (EF-Tu)
<b>DAÑO A DNA</b>	
<b>GEN</b> C33H5.12	<b>DESCRIPCIÓN</b> <i>fcd-2</i> , Proteína ortóloga del gen FANCD2 de humano, el cual es un factor necesario en la respuesta a agentes que dañan al DNA .
<b>FUNCIÓN DESCONOCIDA</b>	
<a href="#">K08F11.6</a> , <a href="#">F31E3.6</a> , T08D2.5 , K03H1.7 , Y37D8A.12 , Y41E3.9, F57B10.9, T10C6.5, D2045.2	

**Tabla 4.** La tabla muestra las diferentes categorías en las que fueron agrupados los genes que modifican sus niveles de expresión en ausencia de VBH-1. Los genes que reducen sus niveles de expresión (48) fueron agrupados en: 1) ubiquitinación de proteínas, 2) proteínas de respuesta a estrés, 3) metabolismo de RNA, 4) cromatina, 5) transducción de señales, 6) metabolismo celular, 7) reconocimiento celular, 8) transcripción, 9) unión a ácidos nucleicos, 10) transporte nuclear, 11) traducción, 12) daño a DNA y 13) genes que codifican proteínas de función desconocida. Los 8 genes faltantes no se lograron identificar debido a un error en el nombre del gen. La información obtenida para cada uno de estos genes fue obtenida a partir de la base de datos del Wormbase ([www.wormbase.org](http://www.wormbase.org)).

## GENES QUE INCREMENTAN SU EXPRESIÓN EN AUSENCIA DE VBH-1

### UBIQUITINACIÓN

GEN	DESCRIPCIÓN
ZK856.1	<i>cul-5</i> , Proteína cullina
C41C4.6	<i>upl-4</i> , Proteasa de ubiquitina
F36A2.13	Ligasa de ubiquitina
F25H2.8	<i>ubc-25</i> , Enzima conjugativa de ubiquitina

### METABOLISMO DE RNA

GEN	DESCRIPCIÓN
F25H2.13	<i>bch-1</i> , Helicasa de tipo DEAD box
C45G9.2	t-RNA dihidrouridina sintasa
F20A1.9	Helicasa de RNA de tipo DEAD box (DDX1)

### CROMATINA

GEN	DESCRIPCIÓN
T08G11.4	Metilasa

### TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES

GEN	DESCRIPCIÓN
T23D8.9	<i>sys-1</i> , La proteína SYS-1 funciona en la vía de señalización de Wnt/MAPK como un coactivador transcripcional dependiente de beta-catenina.
F52F12.3	<i>mom-4</i> , codifica una MAPKKK cuya función es necesaria para la regulación positiva de la vía de señalización de Wnt.
T23D8.1	<i>mom-5</i> , Proteína relacionada a receptores acoplados a proteínas G.
F28D1.10	<i>gex-3</i> , codifica al homólogo de NAP1/NCKAP1 el cual es un ligando de la GTPasa Rac1 en mamíferos.

### METABOLISMO CELULAR

GEN	DESCRIPCIÓN
B0491.1	Manosiltransferasa
M110.5	<i>dab-1</i> , codifica un ortólogo de una proteína adaptadora citoplasmática. DAB-1 contiene un dominio conservado PTB y una secuencia señal que le confiere una localización en vesículas proximales al Aparato de Golgi.

### UNIÓN A ÁCIDOS NUCLEICOS

GEN	DESCRIPCIÓN
C17E4.6	Proteína de unión a DNA
F16D3.2	<i>rsd-6</i> , Proteína con dominio Tudor necesario para la interacción con RNA
F18A1.3	<i>lir-1</i> , codifica la proteína LIN-26 la cual presenta dedos de zinc y un motivo C2H2 altamente conservado.
K09H9.7	Proteína de unión a ácidos nucleicos

### TRANSPORTE NUCLEAR

GEN	DESCRIPCIÓN
C03D6.4	<i>npp-14</i> , Nucleoporina

DAÑO A DNA	
GEN	DESCRIPCIÓN
F18C5.2	<i>wrn-1</i> , La proteína WRN-1 es una helicasa de DNA RecQ, tiene función de ATPasa dependiente de DNA y función de exonucleasa. WRN-1 juega un papel importante en la replicación, recombinación y reparación del DNA.
CITOESQUELETO	
GEN	DESCRIPCIÓN
R13F6.10	Proteína del citoesqueleto (actina)
TRANSPORTE CELULAR	
GEN	DESCRIPCIÓN
F49E7.1 C52E12.3	<i>rme-6</i> , Transporte o movimiento de componentes celulares <i>sqv-7</i> , Proteína localizada en la membrana del Aparato de Golgi involucrada en el transporte de azúcares. La proteína SQV-7 promueve la biosíntesis de glicosaminoglicanos.
CICLO CELULAR	
GEN	DESCRIPCIÓN
F18H3.5	<i>cdk-4</i> , Cinasa dependiente de ciclinas.
APOPTOSIS	
GEN	DESCRIPCIÓN
C48B4.4	<i>ced-7</i> , Proteína transportadora perteneciente a la familia ABCA, involucrada en al degradación de cuerpos apoptóticos.
FUNCIÓN DESCONOCIDA	
<a href="#">C52E12.4</a> , <a href="#">Y54G11A.2</a> , <a href="#">K02B9.2</a> , <a href="#">C27C7.1</a> , <a href="#">C25A11.1</a> , <a href="#">K03H4.2</a> , <a href="#">F22D3.1</a> , <a href="#">Y106G6A.B</a> , <a href="#">C35D10.13</a> , <a href="#">T05F1.4</a> , <a href="#">B0035.6</a> , <a href="#">K10C3.4</a> , <a href="#">R05F9.2</a> , <a href="#">C08B11.9</a> , <a href="#">B0336.7</a> y <a href="#">T01H3.2</a>	

**Tabla 4.** La tabla muestra las diferentes categorías en las que fueron agrupados los genes que modifican sus niveles de expresión en ausencia de VBH-1. Los genes que incrementan sus niveles de expresión (46) se clasificaron en: 1) ubiquitinación de proteínas, 2) metabolismo de RNA, 3) cromatina, 4) transducción de señales, 5) metabolismo celular, 6) unión a ácidos nucleicos, 7) transporte nuclear, 8) daño a DNA, 9) citoesqueleto, 10) transporte celular, 11) ciclo celular, 12) apoptosis y 13) proteínas de función desconocida. Los 5 genes faltantes no se lograron identificar debido a un error en el nombre del gen. La información obtenida para cada uno de estos genes fue obtenida a partir de la base de datos del Wormbase ([www.wormbase.org](http://www.wormbase.org)).

Para encontrar si existe una relación entre los genes obtenidos en el microarreglo, los cuales modifican sus niveles de expresión en ausencia de VBH-1, y los animales *vbh-1(RNAi)* se realizó un escrutinio por RNA de interferencia. La idea es que si alguno de estos genes está en la misma vía de regulación de *vbh-1*, su eliminación por RNAi producirá un fenotipo similar, es decir la acumulación de ovocitos en animales jóvenes.

Debido a que el microarreglo mostró que alrededor de cien genes modifican sus niveles de expresión en ausencia de VBH-1, decidimos analizar algunos de estos genes por RNAi. En este trabajo se muestran los resultados de 14 genes que por RNA de interferencia fueron inhibidos en el *C. elegans*. Estos genes fueron elegidos de tal manera que se abarcaran tanto los genes que incrementan su expresión como los aquellos que la reducen, y al mismo tiempo estudiar genes que abarcaran la mayor parte de las categorías en las que fueron clasificados los genes del microarreglo. Por ello, se analizaron por RNA de interferencia 3 helicasas de DNA, 3 genes relacionados a la estructura de la cromatina, 3 genes relacionados a la vía de ubiquitinación y algunos otros genes de otras categorías.

Nuestra colaboradora, la Dra. Geraldine Seydoux, posee una biblioteca para hacer RNA de interferencia en *C. elegans* por alimentación la cual contiene cerca del 86% de los genes de *C. elegans* y amablemente nos proporcionó algunos de los genes que se aislaron en el microarreglo. Actualmente contamos con el 50% de los genes que reducen su expresión (24 de un total de 48 genes) y el 74% (34 de 46 genes en total) de aquellos que incrementan su expresión en ausencia de *vbh-1* y están listos para hacer RNAi por alimentación. Aquellos que no están en esta biblioteca, serán clonados individualmente en nuestro laboratorio. Actualmente contamos con un grupo amplio de genes clonados con los cuales se inició el análisis masivo de interferencia de RNA.

Para poder llevar a cabo un RNAi masivo se utiliza un protocolo de inducción de RNA de doble cadena en cajas con medio sólido. También decidimos utilizar la cepa *rff-1(pk1417)*, la cual es más sensible al RNA de interferencia en la línea germinal que la cepa silvestre (Sijen *et al.*, 2001). Los animales *rff-1* no muestran ningún efecto de la interferencia de RNA en el soma por lo que es posible estudiar la falta de una proteína específicamente en la línea germinal sin afectar el desarrollo del soma. Esta mutante carece de uno de los factores indispensables para llevar a cabo el silenciamiento específico de genes del soma a través del mecanismo de RNA de interferencia y es miembro de una familia de polimerasas de RNA llamadas RdRP. La mutante en este gen, a pesar de mostrar un ligero incremento en la incidencia de machos, produce animales viables y fértiles los cuales no presentan defectos

morfológicos ni anormalidades en el crecimiento. Esta mutante muestra una alta insensibilidad a la interferencia fenotípica en el tejido somático, por lo que se cree que participa de manera específica en el silenciamiento de genes de la línea germinal (Sijen *et al.*, 2001). Debido a estas características, esta mutante será utilizada para realizar el RNAi de los genes específicos de línea germinal que se obtuvieron a partir del microarreglo.

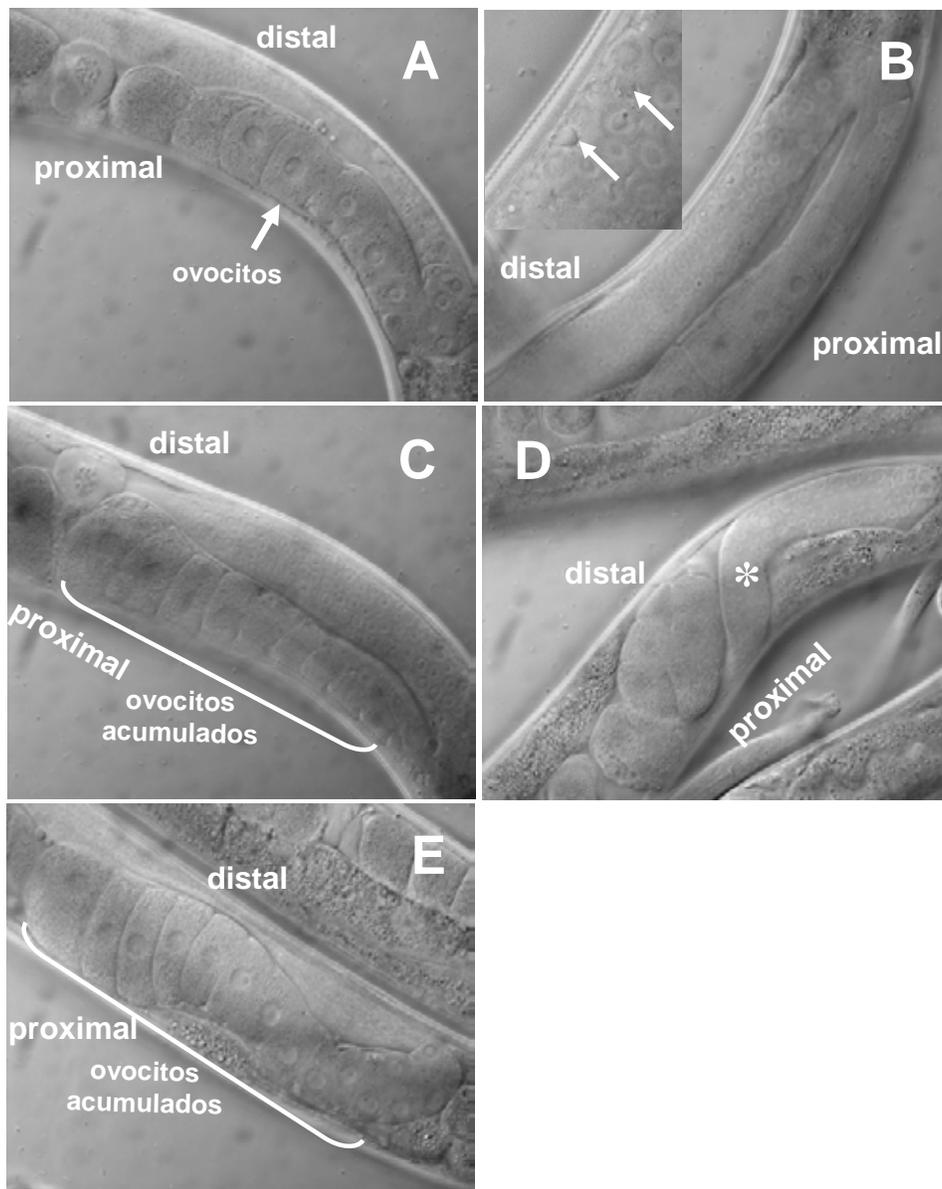
Se realizó el análisis de RNA de interferencia de catorce genes utilizando la cepa *rrf-1*. Los genes se seleccionaron por el tipo de función que desempeñan. A lo largo de esta primera parte del trabajo, se obtuvieron diversos resultados, entre los que se incluye la acumulación de ovocitos en la porción proximal de la gónada de *C. elegans*, cuyo fenotipo es similar a aquel que se observa en animales que carecen de la helicasa de RNA, VBH-1. Al igual que los animales *vbh-1(RNAi)*, se encontró que la falta de determinados genes no solo ocasiona alteraciones en los ovocitos, sino también fenotipos de esterilidad. Cabe mencionar que aún cuando se han encontrado fenotipos similares a aquellos observados en animales *vbh-1(RNAi)*, se han hallado también algunos otros. Los registros de los resultados de la interferencia de RNA de los catorce genes analizados se muestran en la Tabla 5.

GEN	FUNCIÓN	PROGENIE (%)	OVOCITOS		OTROS FENOTIPOS
			ACUMULADOS (%)	EMBRIONES MUERTOS (%)	
<b>N2(PV)</b>	condición silvestre	100	0	0.1	NO
<b><i>vbh-1RNAi</i></b> <b>(PSZ1)</b>	Helicasa de RNA	54.8	20	1.2	NO
<b>- F46F11.2</b>	Unión a RNA (Y box)	100	1	0	Apoptosis en la gónada (20%)
<b>+ F25H2.13</b>	Helicasa con dominios DEAD box	100	22	0	NO
<b>+ F18C5.2</b>	Helicasa de DNA ( <i>wrn-1</i> )	100	34	0	Migración incorrecta de la gónada (2%)
<b>- C08B11.2</b>	Desacetilasa de histonas ( <i>hda-2</i> )	100	0	0	Brazo distal largo (33%) Apoptosis gónada (25%)
<b>- R08C7.3</b>	Variante de la histona H2AZ	100	0	0	NO
<b>- D2096.8</b>	Ensamblaje de nucleosomas ( <i>nap-1</i> )	100	15	0	NO
<b>+ F18H3.5</b>	Cinasa dependiente de ciclinas	100	2	0	NO
<b>+ T23D8.9</b>	Vía de señalización de Wnt/MAPK ( <i>sys-1</i> )	42	0	0	NO
<b>+ R13F6.10</b>	Proteína del citoesqueleto	63	22	0	NO
<b>- C07G2.1</b>	Proteína de unión o reconocimiento celular	84	64	0	ovocitos pequeños (32%)
<b>+ T23D8.1</b>	Receptor acoplado a proteínas G	48	48	0	NO
<b>+ F25H2.8</b>	Enzima Conjugativa de ubiquitina	94	32	0.9	NO
<b>+ F36A2.13</b>	Ligasa de ubiquitina	95	40	4	NO
<b>- ZK858.4</b>	Adaptador para la ligasa de ubiquitina	7	60	93	NO

**Tabla 5.** La tabla muestra los resultados obtenidos al hacer RNA de interferencia en 14 genes que en ausencia de VBH-1, modifican sus niveles de expresión. La progenie, la letalidad embrionaria, así como los niveles de acumulación de ovocitos fueron algunos de los registros que se obtuvieron en cada uno de estos animales RNAi. Debido a que estos genes se encontraron a partir de un microarreglo utilizando genes específicos de línea germinal, se esperaba encontrar algunos otros fenotipos que afectan a este tejido y que no necesariamente fueran similares al fenotipo observado en los animales *vbh-1(RNAi)*. Algunos de estos fenotipos, no asociados a la falta de VBH-1 son: apoptosis, migración incorrecta y extensión de la región distal de la gónada. (-) y (+) significa la reducción o el incremento en los niveles de expresión de cada gen, respectivamente.

#### 5.4.1. LA FALTA DE LAS PROTEÍNAS DE UNIÓN A RNA Y DNA AFECTA LA FUNCIÓN DE LA LÍNEA GERMINAL

En adelante se indicará entre paréntesis con un signo de menos (-) cuando un gen disminuya su expresión o con un signo de más (+) cuando el gen aumente su expresión en ausencia de VBH-1. La interferencia de RNA de genes que codifican para proteínas de unión a RNA y/o DNA, mostró varios fenotipos entre los que se incluye la acumulación de ovocitos, así como algunas alteraciones observadas en la gónada: niveles elevados de apoptosis y migración incorrecta de la gónada (Figura 10 y Tabla 5).



**Figura 10.** Fotografías tipo Nomarski de animales RNAi en genes de unión al DNA o RNA. A) Fotografía de la gónada de un animal silvestre, B) Gónada de un animal RNAi en el gen (F46F11.2) el cual codifica para una proteína de unión a RNA y en donde se observa un incremento en los niveles de apoptosis en la gónada. Las flechas señalan los cuerpos apoptóticos. C y D) Se muestran gónadas de animales RNAi en el gen (F18C5.2) el cual codifica para una helicasa de DNA y donde se observa una elevada acumulación de ovocitos, así como también un defecto en la migración de las gónadas (asterisco en D) además de la acumulación de ovocitos. E) Gónada de un animal RNAi en el gen (F25H2.13) el cual codifica para una helicasa con dominios de unión DEAD y cuya ausencia causa la acumulación de ovocitos en la parte proximal de la gónada. Este fenotipo es similar al observado en los animales *vbh-1(RNAi)*.

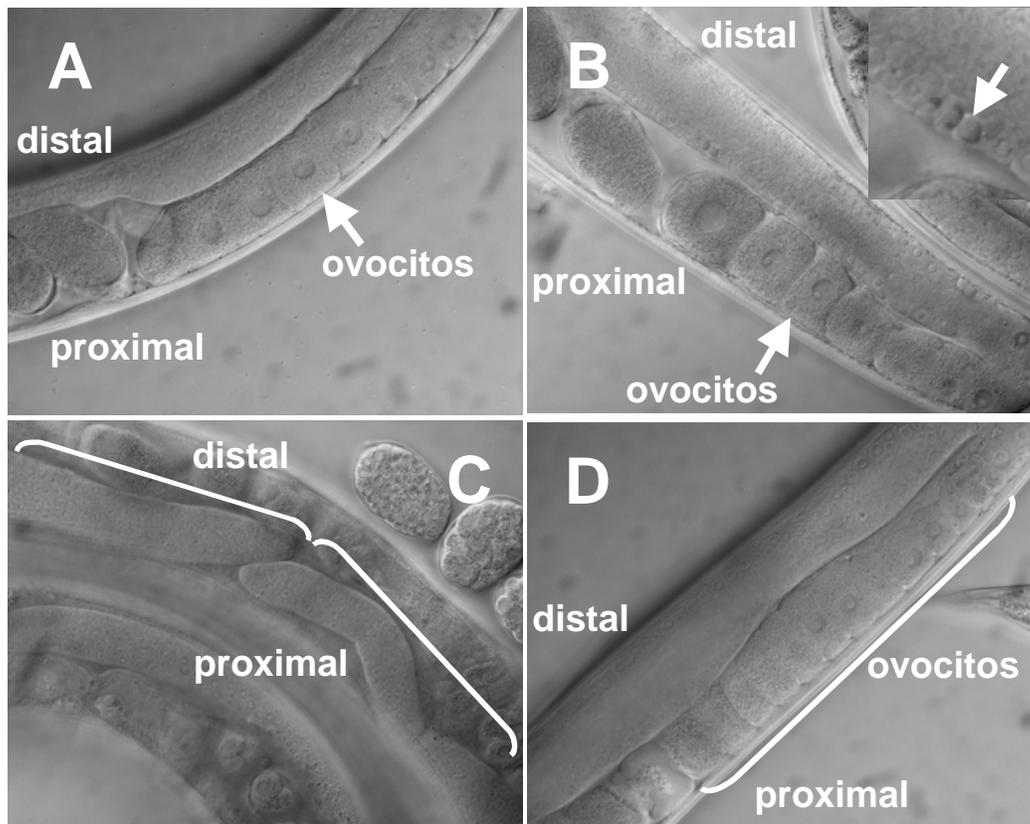
La interferencia de RNA no ocasionó problemas de esterilidad en ninguno de los siguientes casos: proteína de unión a RNA: F46F11.2 (-) (100% progenie), helicasa con dominios DEAD box: F25H2.13 (+) (100% progenie) y una helicasa de DNA: F18C5.2 (+) (100% progenie) (Tabla 5). El RNAi del gen F46F11.2, el cual codifica para una proteína involucrada en el metabolismo de RNA conocida en *Xenopus* como Y box, mostró un incremento en la muerte de células germinales (Figura 10 panel B). Los niveles de apoptosis en los animales control son prácticamente nulos mientras que se observan aproximadamente 3 cuerpos apoptóticos por gónada en los animales *Y box(RNAi)* (Tabla 5). Los animales RNAi en el gen que codifica para una helicasa de DNA, la cual se sabe que participa en respuesta a daño al DNA (F18C5.2), mostró una elevada acumulación de ovocitos (34%) (Figura 10, panel C y D, respectivamente) y una incorrecta migración de la gónada (2%) (Tabla 5). Los animales RNAi del gen que codifica la helicasa con dominios DEAD box, involucrada también en el metabolismo del RNA (F25H2.13), mostró un fenotipo de acumulación de ovocitos en la gónada en un 22% de los animales (Figura 10, panel E).

#### **5.4.2. RNAi EN GENES RELACIONADOS CON LA ESTRUCTURA DE LA CROMATINA CAUSA DEFECTOS EN LA LÍNEA GERMINAL DE *C. elegans***

La cromatina es una estructura compleja formada por DNA y proteínas donde el nucleosoma representa la unidad básica de ésta estructura. El nucleosoma está compuesto de un octámero de histonas denominadas H2A, H2B, H3 y H4, las cuales se encuentran organizadas sobre una secuencia de DNA de aproximadamente 140 pares de bases. Actualmente, los componentes del nucleosoma están bien caracterizados y se sabe su papel en la estructura de la cromatina. La histona H1, por ejemplo, es un elemento necesario para estabilizar el nucleosoma así como también para inhibir la transcripción específica de genes al promover el empaquetamiento de secuencias adyacentes. En general, la regulación de la expresión de genes es un mecanismo altamente específico que puede llevarse a cabo a nivel de la organización de la estructura de la cromatina, la cual a través de su interacción con factores activadores o represores puede promover la activación o el silenciamiento de genes, respectivamente (Scott, 2003).

La interferencia de RNA de dos genes involucrados en la estructura de la cromatina, C08B11.2 (-) y R08C7.3 (-), los cuales codifican para una desacetilasa de histonas y una variante de la histona H2AZ, respectivamente, no mostraron un fenotipo de acumulación de ovocitos en la porción proximal de la gónada (Tabla 5) (Figura 11 panel B). En el panel A de la figura 11 se muestra una gónada de un animal silvestre, mientras que cuando se hace RNAi en la desacetilasa de histonas se observa que las gónadas presentan un incremento en la apoptosis de células germinales así como una extensión en ambos brazos de la gónada (Figura 11 panel B y C, respectivamente). La presencia de cuerpos apoptóticos se indica en el recuadro en B (flecha) mientras que la extensión de la gónada se muestra con los corchetes en C. Debido a que la muerte de células germinales ocurre de manera exclusiva en las células que se encuentran en la región del asa y nosotros observamos apoptosis en regiones distales en los animales RNAi para la desacetilasa de histonas, creemos que la extensión de la gónada se debe a un mayor número

de células en meiosis y no a un aumento de células en proliferación. Por el contrario, la falta de una proteína involucrada en el ensamblaje de los nucleosomas D2096.8 (-) causa un ligero incremento en la acumulación de ovocitos en la región proximal de la gónada (15%) (Tabla 5) (Figura 11 panel D). A diferencia de los animales *vbh-1(RNAi)*, la interferencia de RNA de cualquiera de estos tres genes relacionados a cromatina no ocasiona una reducción en los niveles de progeñe (Tabla 5).



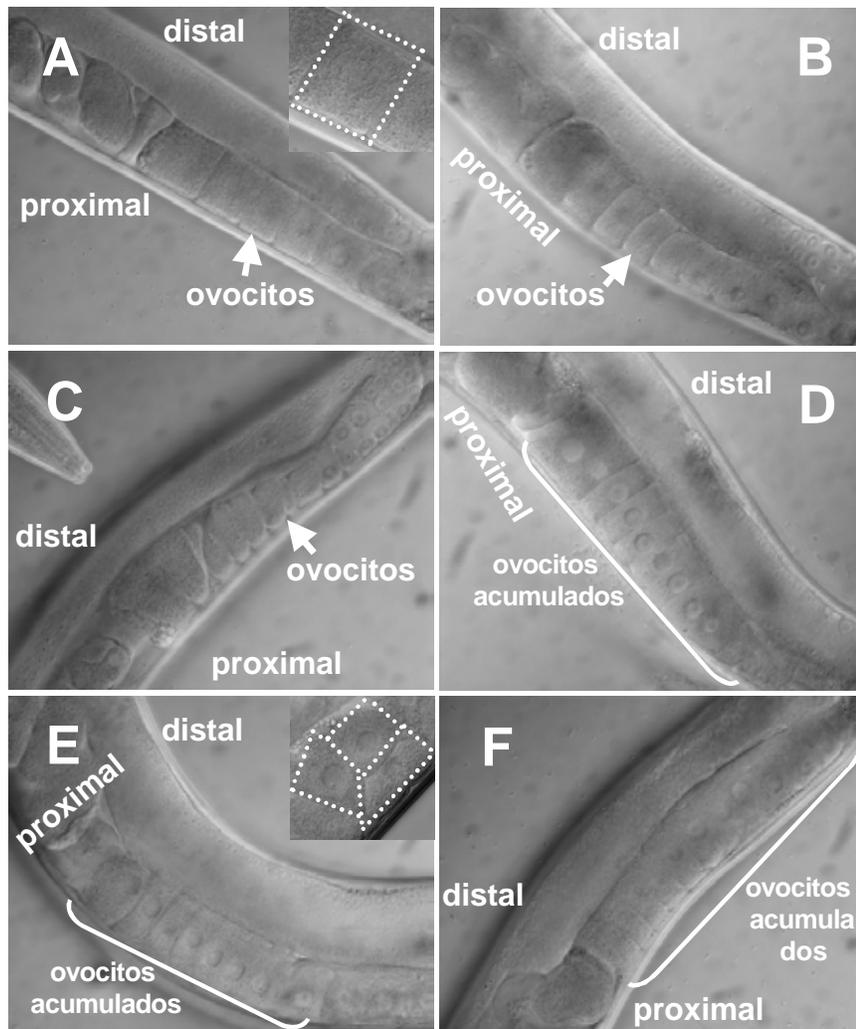
**Figura 11.** Interferencia de RNA en genes que codifican para proteínas relacionadas con la estructura de la cromatina. A) Se muestra la gónada de un animal silvestre. B y C) La falta de la desacetilasa de histonas presenta ovocitos normales (B), sin embargo se observa que la falta de esta proteína provoca un desarrollo anormal de la gónada debido a que estos animales presentan un brazo distal más largo de lo normal (C), los corchetes muestran la extensión de la porción distal de ambos brazos de la gónada. La falta de esta desacetilasa de histonas, *had-2*, mostró también un incremento en la apoptosis de las células germinales. En el recuadro en B, se señala la presencia de dos cuerpos apoptóticos (flecha). D) Se muestra la gónada de un animal RNAi en un gen que codifica una proteína involucrada en el ensamblaje de los nucleosomas (D2096.8). Estos animales acumulan un gran número de ovocitos en la parte

proximal de la gónada (corchete). Los animales RNAi para el gen que codifica una variante de la histona H2AZ no mostró ningún tipo de defecto en la gónada por lo que no se muestran.

### **5.4.3. GENES CUYA AUSENCIA CAUSA LA ACUMULACIÓN DE OVOCITOS EN LA GÓNADA ASÍ COMO NIVELES REDUCIDOS DE PROGENIE**

En vertebrados, la regulación de los procesos celulares requiere el control específico de múltiples vías involucradas en el desarrollo, la diferenciación, el ciclo celular, así como en la activación de mecanismos de respuesta a estrés y daño a DNA, entre otros. Se sabe por ejemplo que el adecuado funcionamiento en el ciclo celular se lleva a cabo a través de la transición de un estado regulatorio a otro. Estas transiciones requieren la participación de cinasas, las cuales tienen como función modificar de manera específica algunos sustratos que determinan el estado físico de la célula. Los mecanismos de control en la progresión del ciclo celular son muy complejos y se sabe que la falta de algunos componentes de la maquinaria de respuesta celular pueden ocasionar un estado fisiológico que conduzca a la muerte de la célula (Lewin, 2006). Por su parte, las vías de respuesta celular, tales como la vía de las MAPKs y la vía de Wnt, son también importantes para activar y dirigir procesos celulares relacionados a la expresión específica de ciertos genes. La vía de Wnt, por ejemplo, es una vía de señalización de respuesta a ligandos extracelulares que conduce la expresión de un factor transcripcional involucrado en el establecimiento y desarrollo del patrón corporal de los animales. Por su parte, la vía de las MAPKs, juega también un papel importante en la regulación génica debido a que en respuesta a una señal exógena es capaz de activar una cascada de fosforilaciones la cual culmina en la fosforilación de un factor transcripcional cuya activación dirige la expresión activa de genes específicos capaces de dirigir cambios en el control de diversos procesos celulares tales como el crecimiento y la regulación de proteínas de citoesqueleto, entre otros. Se sabe que la regulación de aquellas proteínas involucradas en la organización del citoesqueleto pueden, de manera directa, influenciar la estructura tanto de los organelos como de la célula misma por lo que su regulación debe ser controlada a detalle (Lewin, 2006).

Se hizo RNAi en diversos genes que codifican para proteínas que participan en múltiples procesos celulares, tales como: una cinasa dependiente de ciclinas F18H3.5 (+), una proteína de la vía de señalización de Wnt/MAPK T23D8.9 (+), un receptor acoplado a proteínas G T23D8.1 (+), una proteína de citoesqueleto R13F6.10 (+) y una proteína de unión celular C07G2.1 (-) (Figura 12 y Tabla 5). Cuando se hizo el RNAi en el gen que codifica para la cinasa dependiente de ciclinas (Figura 12 panel B) no se observaron cambios.



**Figura 12.** Fotografías tipo Nomarski de animales RNAi en diversos genes. A) Gónada de un animal silvestre. B y C) La falta de una cinasa del ciclo celular (F18H3.5), la cual participa durante el desarrollo post-embriionario, así como de una proteína de la vía de señalización de Wnt/MAPK (T23D8.9) muestran un fenotipo silvestre. D y E) La falta de un receptor transmembranal (T23D8.1) y una proteína de ensamblaje del citoesqueleto (R13F6.10) muestran una acumulación significativa de ovocitos del 48 y 22%, respectivamente. Los

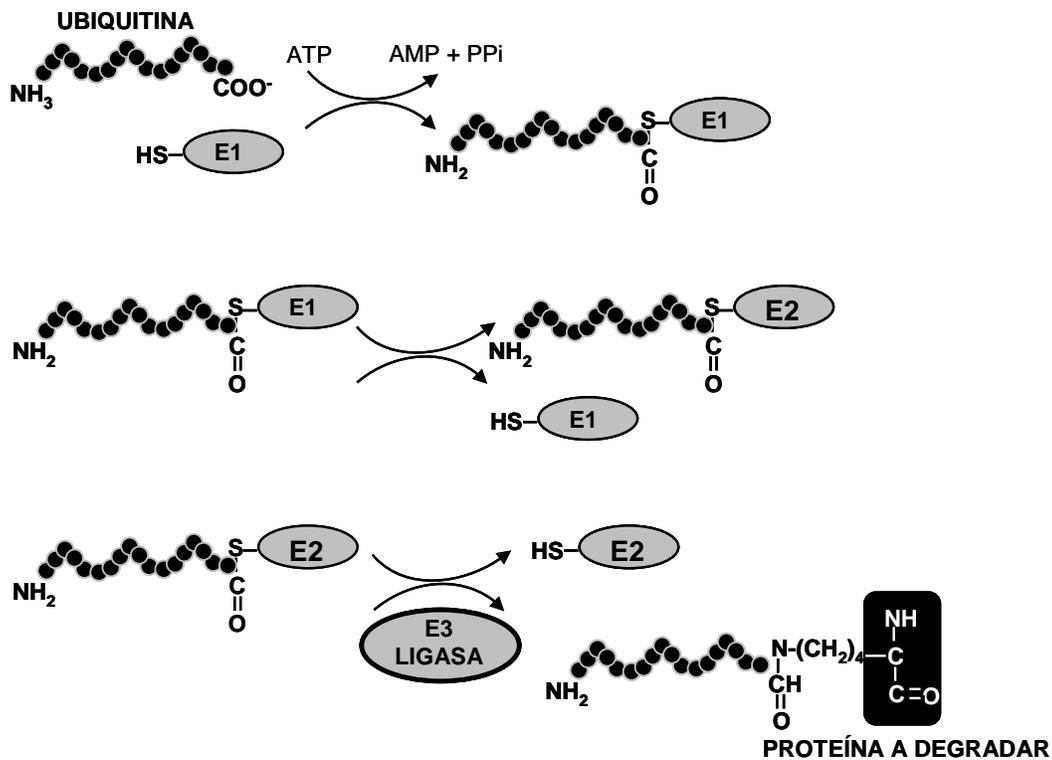
animales RNAi de estos genes mostraron una reducción en la progenie. E) RNAi en el gen que codifica para una proteína de ensamblaje del citoesqueleto (R13F6.10), mostró una población de animales cuyos ovocitos presentaron un menor tamaño (recuadro en E) en comparación con los ovocitos de los animales silvestres. F) Los animales RNAi del gen que codifica para una proteína de unión celular (C07G2.1) presentan la acumulación de ovocitos en la parte proximal de la gónada. Además de este fenotipo, los animales RNAi en este gen muestran una reducción en el número de hijos.

Cuando se analizaron los animales RNAi en el gen de la vía de Wnt/MAPK, el nivel de progenie disminuyó significativamente (42%) aunque no se observó un fenotipo parecido al producido por la falta de *vbh-1* (Tabla 5). Cuando se inhibió la expresión de la proteína del citoesqueleto, la proteína de unión celular, así como el receptor acoplado a proteínas G, se encontró un incremento en la acumulación de ovocitos en la región proximal de la gónada en un 22, 64 y 48%, respectivamente (Figura 12 panel D, E y F). La falta de cada uno de estos tres componentes celulares ocasionó una reducción en los niveles de progenie en un 63, 84 y 48%, respectivamente (Tabla 5). Estos datos sugieren que estos genes podrían participar en la misma vía de VBH-1.

#### **5.4.4. EL RNAi EN VARIOS GENES DE LA VÍA DE UBIQUITINACIÓN DE PROTEÍNAS CAUSA UN FENOTIPO SIMILAR AL OBSERVADO EN LOS ANIMALES *vbh-1*(RNAi)**

Además de la vía clásica lisosomal para la degradación de proteínas, existe un mecanismo alternativo que incluye la modificación enzimática del residuo de lisina de la proteína a degradar con una molécula de ubiquitina. La ubiquitina es un péptido de 76 residuos de aminoácidos y es la marca que reconoce la maquinaria de proteólisis conocida como el proteosoma. La vía de ubiquitinación es un proceso que ocurre en tres pasos (Figura 13). Primero, se requiere a la enzima **activadora de ubiquitina o E1**, la cual utiliza la energía liberada del rompimiento de una molécula de ATP para unirse a ubiquitina (Sutovsky, 2003; Lewin, 2006). Posteriormente, se lleva a cabo la transferencia de esta molécula a un residuo de cisteína de la **enzima conjugativa de ubiquitina o E2** y finalmente, se forma un puente peptídico entre la molécula

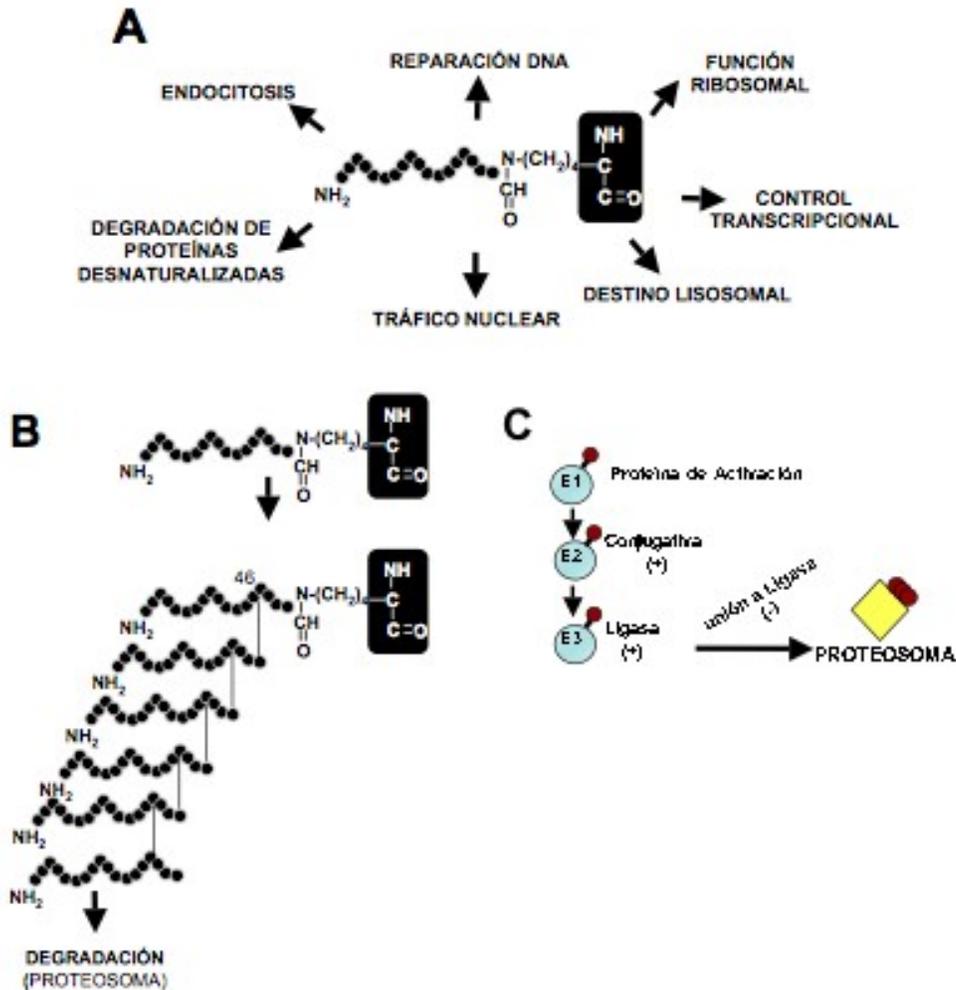
de ubiquitina unida a E2 y un residuo de lisina de la proteína blanco a degradar, a través de una reacción catalizada por una enzima llamada **ligasa de ubiquitina o E3** (Sutovsky, 2003).



**Figura 13.** Esquema del proceso de ubiquitinación de proteínas para su degradación por medio de la vía del proteosoma. La ubiquitina se une a la enzima E1 a través un paso que requiere el consumo de una molécula de ATP. Posteriormente, la ubiquitina es transferida a la enzima E2 y finalmente a la ligasa E3. La ligasa E3 realiza la transferencia de esta molécula a un residuo de Lys localizado en el extremo amino terminal de la proteína blanco.

Se sabe que la adición de un solo residuo de ubiquitina a un sustrato o proteína no es suficiente para causar su degradación. La figura 14 muestra que la adición múltiple de moléculas de ubiquitina genera una cadena poliubiquitinada, en la cual, cada ubiquitina adicionada se une a un residuo de Lys en la posición 46 de la ubiquitina que le precede. La formación de esta

cadena poliubiquitinada es una señal para que el proteosoma, el cual se encuentra distribuido en el citosol, degrade a la proteína blanco (Lewin, 2006).



**Figura 14.** Diagrama que muestra la participación de la ubiquitina en diversos procesos celulares. (A) La adición de una sola molécula de ubiquitina a la proteína blanco es un proceso que recibe el nombre de *monoubiquitinación* y es a través de este proceso que las proteínas marcadas participan en diversos procesos celulares tales como: la endocitosis, el tráfico nuclear, el control transcripcional, reparación del DNA, entre otros. (B) El diagrama representa la adición de múltiples moléculas de ubiquitina a una proteína blanco a través de un proceso llamado *poliubiquitinación*. Esta adición sucesiva es la señal para la degradación de una proteína blanco vía proteosoma. (C) El proceso de ubiquitinación involucra la participación de tres proteínas (E1, E2 y E3) para unir la molécula de ubiquitina a la proteína blanco que se va a degradar. La ubiquitina es transferida a la enzima E2 y posteriormente la enzima ligasa o E3 transfiere esta molécula a un residuo de lisina localizado en el extremo amino terminal de la proteína sustrato.

El proteosoma es un agregado de proteínas con actividad proteolítica que degrada de manera específica proteínas ubiquitinadas y es a través de estos complejos que las proteínas son fragmentadas en pequeños péptidos de alrededor de 7-8 residuos de aminoácidos (Lewin, 2006). Durante este proceso se liberan las moléculas de ubiquitina intactas, las cuales pueden volver a utilizarse en un nuevo sistema de marcado de proteínas. De manera general, se sabe que el sistema de degradación de proteínas a través del mecanismo de ubiquitinación participa en diversos procesos celulares, tales como: la eliminación de proteínas mal plegadas, proteínas con modificaciones que ocasionan un mal funcionamiento y proteínas que ya no se utilizarán (Lodish *et al.*, 2004). Por otro lado, una sola molécula de ubiquitina o la monoubiquitinación es una señal de transporte vesicular intracelular (Sutovsky, 2003).

Entre los genes identificados por el análisis de microarreglos nos interesó un grupo que codifica para moléculas que participan en la ubiquitinación. Esto debido a que en el análisis de microarreglos de DNA la falta de VBH-1 modifica los niveles de expresión de varios de los componentes que conforman la maquinaria de degradación de proteínas por ubiquitinación, por lo que nos interesó saber si esta vía, la cual está altamente conservada en eucariontes, tiene alguna relación con la función de VBH-1 al hacer RNAi en cada uno de los genes encontrados. Es importante mencionar que estos genes son específicos de línea germinal y por lo tanto no son necesarios para la maquinaria de ubiquitinación general del organismo. Entre los genes encontrados que se expresan más en ausencia de VBH-1 están una ligasa de ubiquitina F36A2.13 (+) y una enzima conjugativa de ubiquitina F25H2.8 (+). Por otro lado, se encontró un adaptador para la ligasa de ubiquitina ZK858.4 (-) el cual se expresa menos en ausencia de VBH-1. Se realizaron experimentos de interferencia de RNA en estos tres genes de la vía de ubiquitina y se analizaron los fenotipos en estos animales. La tabla 6 muestra los distintos plásmidos utilizados para hacer RNAi en estos genes de ubiquitina.

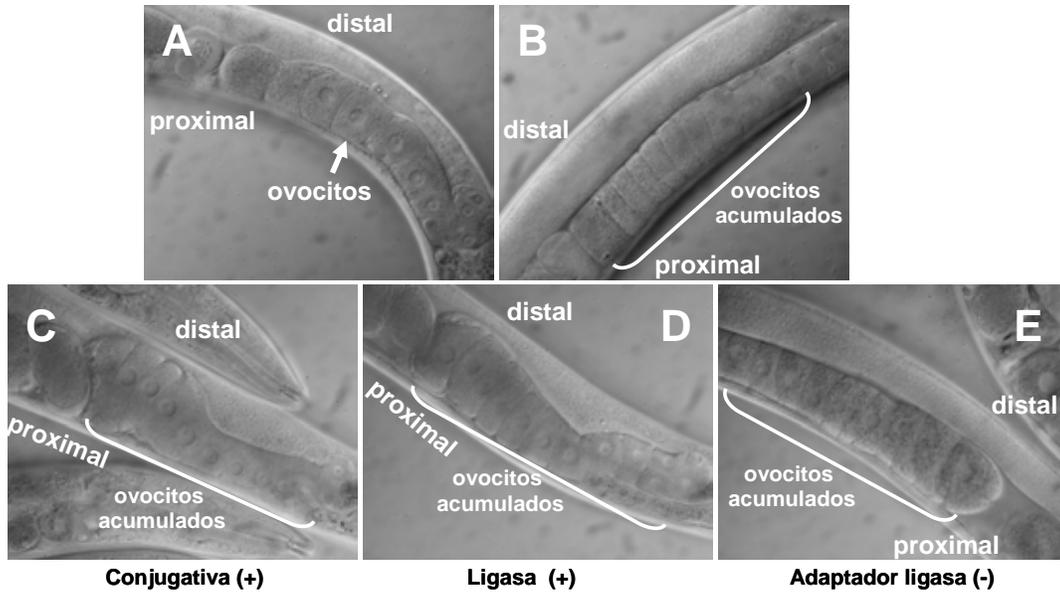
<b>GEN</b>	<b>Plásmido</b>	<b>Codifica para</b>
VBH-1b	pSZ1	VBH-1 (Homólogo de Vasa)
F36A2.13	pF36A2.13FV	Ligasa de ubiquitina
F25H2.8	pF25H2.8FV	Enzima Conjugativa de ubiquitina
ZK858.4	pZK858.4FV	Adaptador para la ligasa de ubiquitina

**Tabla 6.** La tabla muestra cada uno de los plásmidos utilizados en bacterias para hacer RNA de interferencia. PSZ1 y PSZ2 son los dos plásmidos utilizados para hacer RNA de interferencia en la isoforma b de *vbh-1*, utilizando un fragmento de 400 bases o al gen completo, respectivamente. Además se muestran los plásmidos utilizados para hacer interferencia de RNA en los componentes de la vía de ubiquitinación.

Debido a que estamos interesados en encontrar si existe o no una relación entre el papel de VBH-1 y la maquinaria de ubiquitinación, se realizaron los experimentos de RNAi buscando, en estos animales, los fenotipos observados en los animales *vbh-1(RNAi)* tales como la acumulación de ovocitos, la reducción en los niveles de progenie, la presencia de ovocitos endomitóticos así como una elevada letalidad embrionaria. El fenotipo de los ovocitos endomitóticos se observó realizando tinciones con el colorante DAPI (este colorante se intercala en el DNA). Para estudiar si los animales RNAi en los genes de la vía de ubiquitina presentan este fenotipo de ovocitos endomitóticos, se tiñeron con DAPI siguiendo el protocolo de tinción descrito en materiales y métodos.

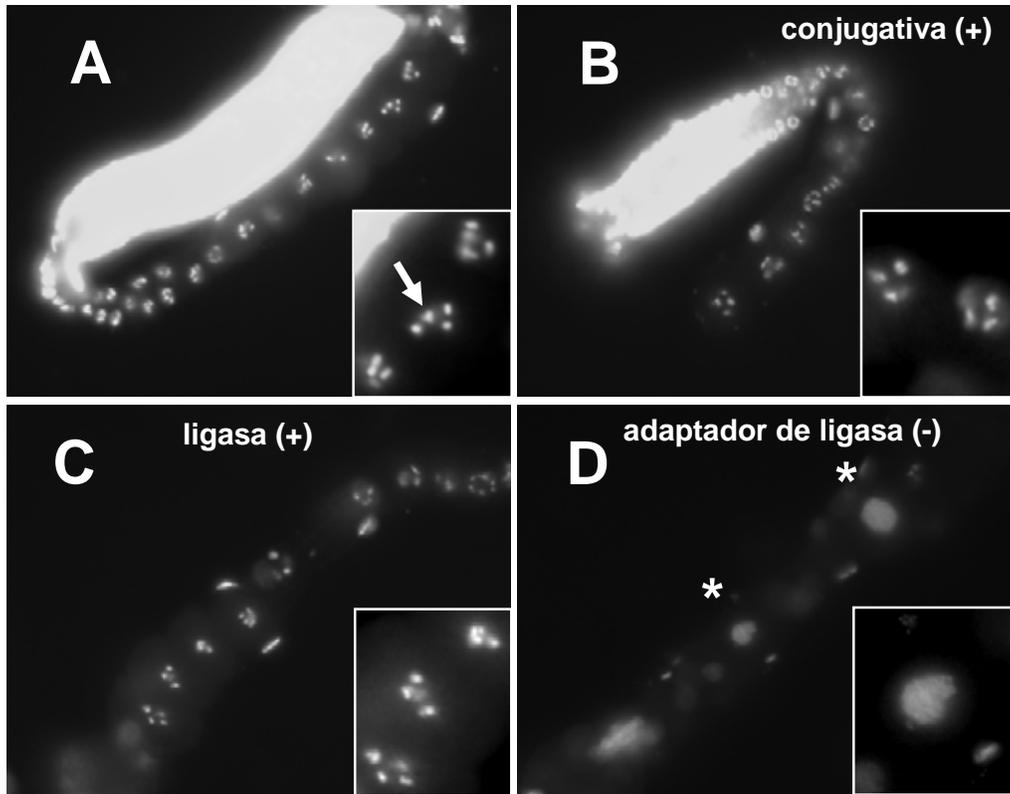
#### **5.4.4.1. RNAi EN LA ENZIMA CONJUGATIVA DE UBIQUITINA (E2)**

La ausencia de VBH-1 provoca un incremento en los niveles de expresión del gen que codifica para una enzima conjugativa o E1 F25H2.8 (+). Cuando se hizo RNA de interferencia en la enzima conjugativa se encontró un incremento en la acumulación de ovocitos en un 32% en comparación con los animales control de la cepa *rrf-1*, en donde observamos un 14% de animales con ovocitos acumulados (Figura 15 panel A y C).



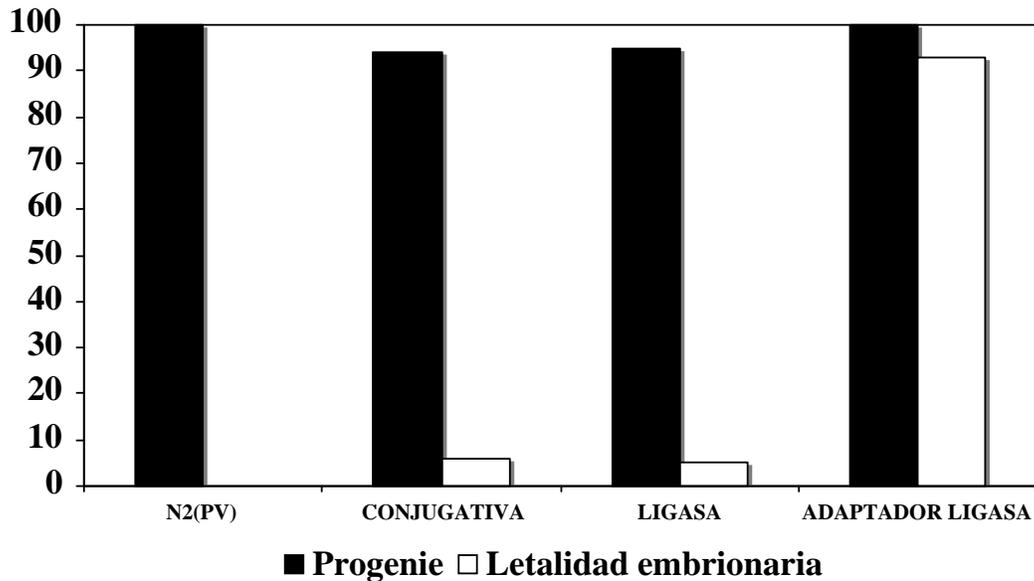
**Figura 15.** Animales RNAi en algunos genes de la vía de ubiquitinación. A) Fotografía tipo Nomarski de la gónada de un animal control. B) Gónada de animales *vbh-1(RNAi)* en donde se muestra la acumulación de ovocitos en la parte proximal. C) La falta de la enzima conjugativa (F25H2.8) causó un incremento en la acumulación de ovocitos en el 32% de los animales. D) Se muestra la acumulación de ovocitos (40%) como consecuencia de la falta de la ligasa de ubiquitina (F36A2.13). E) La acumulación de ovocitos fue más severa en los animales que carecen de un adaptador de la ligasa E3 de ubiquitina (ZK858.4).

No observamos ovocitos endomitóticos en una tinción con DAPI (Figura 16 panel B). Sin embargo, si observamos que los cromosomas de los ovocitos de estos animales muestran una morfología anormal ya que las bivalentes (cromosomas homólogos apareados durante la meiosis y que se encuentran en proceso de recombinación) se encuentran ligeramente separados, lo cual sugiere que no se está llevando a cabo de manera correcta la meiosis.



**Figura 16.** Tinción con DAPI para visualizar la morfología nuclear en la gónada. Cuando el DNA se replica sin que ocurra una división celular se dice que ocurrió una endomitosis. A) Se muestra la tinción con DAPI de la gónada de los animales silvestres. En el recuadro en A se muestran los núcleos en diacinesis en donde cada uno de los cromosomas puede visualizarse como un punto blanco. B y C) Se muestra que cuando se realiza la tinción en animales RNAi de los genes que codifican la enzima conjugativa y la ligasa de la vía de ubiquitina, respectivamente, se observan núcleos normales. D) Por el contrario, la tinción con DAPI en aquellos animales que carecen del adaptador para la ligasa de ubiquitina se observan algunos ovocitos endomitóticos los cuales son señalados con un asterisco. La presencia de ovocitos con núcleos endomitóticos es un fenotipo similar al observado en los animales que carecen de VBH-1. Los recuadros en cada panel muestran a detalle la morfología nuclear.

A diferencia los animales *vbh-1(RNAi)*, los animales RNAi en este gen no tuvieron notablemente menos hijos (Tabla 5 y Figura 17). Sin embargo, estos animales RNAi mostraron un ligero incremento en la letalidad embrionaria en comparación con los animales silvestres (Figura 17).



**Figura 17.** Gráfica que muestra el porcentaje de hijos y letalidad embrionaria que tienen la cepa silvestre y los animales RNAi de los genes relacionados a la vía de ubiquitinación. Los animales RNAi en la enzima conjugativa y en la ligasa de ubiquitina muestran una ligera reducción en el número de hijos en comparación con los animales control, mientras que la falta del adaptador de la ligasa no causó una disminución en la progenie. Por su parte, la letalidad embrionaria se vió severamente afectada únicamente en aquellos animales RNAi en el adaptador de la ligasa al mostrar una letalidad de alrededor de 93%.

#### 5.4.4.2. ANÁLISIS DE LOS ANIMALES RNAi EN LA LIGASA DE UBIQUITINA (E3)

Cuando se realizó RNAi en el gen que codifica para la ligasa de ubiquitina F36A2.13 (+), el cual incrementa su expresión en ausencia de VBH-1, se observó una acumulación de ovocitos en la parte proximal de la gónada en un 42% de los animales (Figura 15 panel D). Por medio de una tinción con DAPI observamos que la ausencia de esta ligasa de ubiquitina resultó en la presencia de ovocitos endomitóticos en un 20% de los animales observados (Figura 16 panel D), la cual es una característica similar a la que presentan los animales *vbh-1(RNAi)* (Figura 8 panel D). Por su parte, a diferencia de los

animales *vbh-1(RNAi)*, la falta de esta proteína no causó una reducción evidente en el número de hijos (Tabla 5 y Figura 17). Por el contrario, estos animales RNAi en la ligasa de ubiquitina mostraron un incremento importante en la letalidad embrionaria de alrededor del 4% (Figura 17).

#### **5.4.4.3. RNAi EN UN ADAPTADOR DE LA LIGASA DE UBIQUITINA**

Los resultados del microarreglo mostraron que la falta de VBH-1 causa una reducción en los niveles de expresión del gen que codifica un adaptador de la ligasa de ubiquitina ZK858.4 (-). La interferencia de RNA en este gen mostró un elevado número de animales (60%) con ovocitos acumulados en la región proximal de la gónada (Figura 15 panel E). Sin embargo, al analizar la morfología de los núcleos con DAPI observamos que la falta de este adaptador no ocasionó la presencia de núcleos endomitóticos (Figura 16 panel C). Los niveles de progenie de estos animales que carecen de un adaptador de ligasa son similares al de la cepa silvestre (100%) (Tabla 5 y Figura 1), mientras que la letalidad embrionaria se ve severamente afectada en estos animales al mostrar una letalidad de alrededor del 93% en comparación con los animales control (Figura 17).

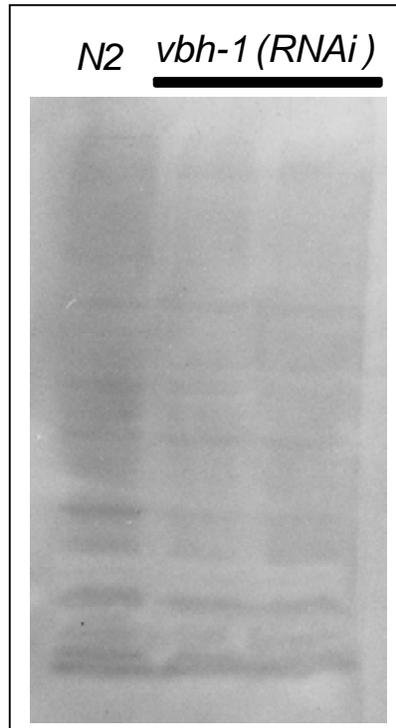
De 14 genes analizados encontramos que la falta de 9 de estos producen un fenotipo similar al de los animales *vbh-1(RNAi)* al presentar un incremento en la acumulación de ovocitos, al mostrar una reducción en el número de hijos y/o al presentar un incremento en la letalidad embrionaria. La descripción general de estos resultados se describe a continuación. De los seis genes analizados que reducen sus niveles de expresión en el microarreglo, solo dos de ellos mostraron un fenotipo similar a la ausencia de VBH-1 al presentar una reducción en la progenie y una elevada acumulación de ovocitos en la parte proximal de la gónada. Por su parte, de los 8 genes analizados que incrementan sus niveles de expresión en el microarreglo, encontramos que 7 de éstos muestran fenotipos similares al de los animales *vbh-1(RNAi)* ya que la inhibición de dos de éstos genes mostró una elevada acumulación de ovocitos, el RNAi en un gen mostró una importante reducción en los niveles de progenie, por su parte la inhibición de 2 genes presentó tanto un fenotipo de reducción de

progenie como un incremento en la acumulación de ovocitos y finalmente, el RNA de interferencia de 2 genes más mostró un incremento en la letalidad embrionaria y en la acumulación de ovocitos (Tabla 5).

Con el objetivo de entender la relación entre la función de VBH-1 y los genes encontrados en el análisis de microarreglos, decidimos enfocarnos en el estudio de los genes de la vía de la ubiquitinación debido a que la ausencia de éstos, muestra fenotipos muy similares a los observados en los animales *vbh-1(RNAi)* y también debido a que en el microarreglo se obtuvieron varios de los genes de esta vía. A continuación se describe el fenotipo de la falta de estos genes con más detalle así como su posible relación con VBH-1 y el proceso de la ubiquitinación.

#### **5.4.5. ANÁLISIS DEL PROCESO DE UBIQUITINACIÓN EN ANIMALES SILVESTRES Y *vbh-1(RNAi)***

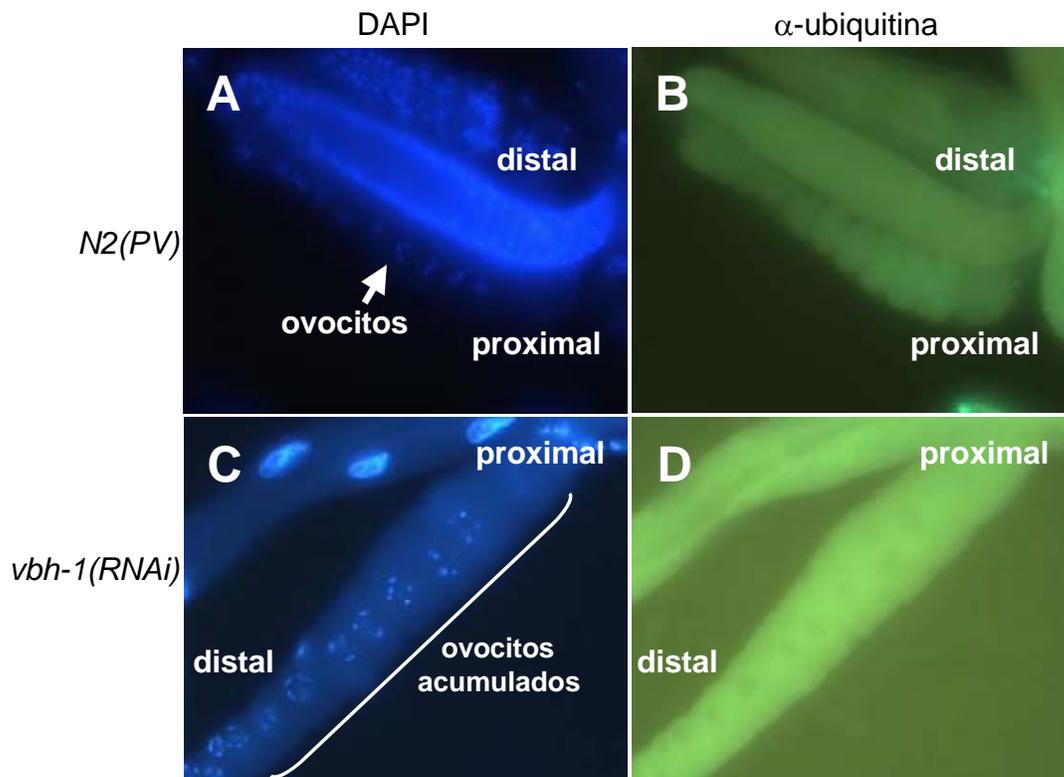
Como primer enfoque para estudiar la relación que existe entre el proceso de ubiquitinación y la función de VBH-1, decidimos estudiar el patrón de ubiquitinación en extractos totales de animales silvestres y *vbh-1(RNAi)* (pSZ1) por medio de análisis tipo Western blot. La ubiquitina es una enzima muy conservada durante la evolución, así que utilizamos un anticuerpo comercial contra la ubiquitina de ratón (SIGMA). En este experimento se trató de identificar en una escala general si las proteínas de los animales RNAi mostraban alguna diferencia en el patrón de ubiquitinación de las proteínas. Observamos que los patrones de ubiquitinación obtenidos en ambos casos no nos permite encontrar diferencias evidentes (Figura 18).



**Figura 18.** Western blot que muestra los niveles de ubiquitinación en extractos totales en diversas cepas. Se corrieron extractos de proteínas totales de la cepa silvestre (*N2*) y animales *vbh-1(RNAi)* en un gel desnaturizante para proteínas. El gel se transfirió y se incubó con un anticuerpo policlonal comercial contra la ubiquitina. No se observaron diferencias evidentes importantes en los niveles de expresión de la ubiquitina.

Como un segundo enfoque decidimos utilizar el anticuerpo contra ubiquitina en ensayos de inmunotinción para ver si detectábamos alguna diferencia en el patrón de ubiquitinación de proteínas a nivel morfológico.

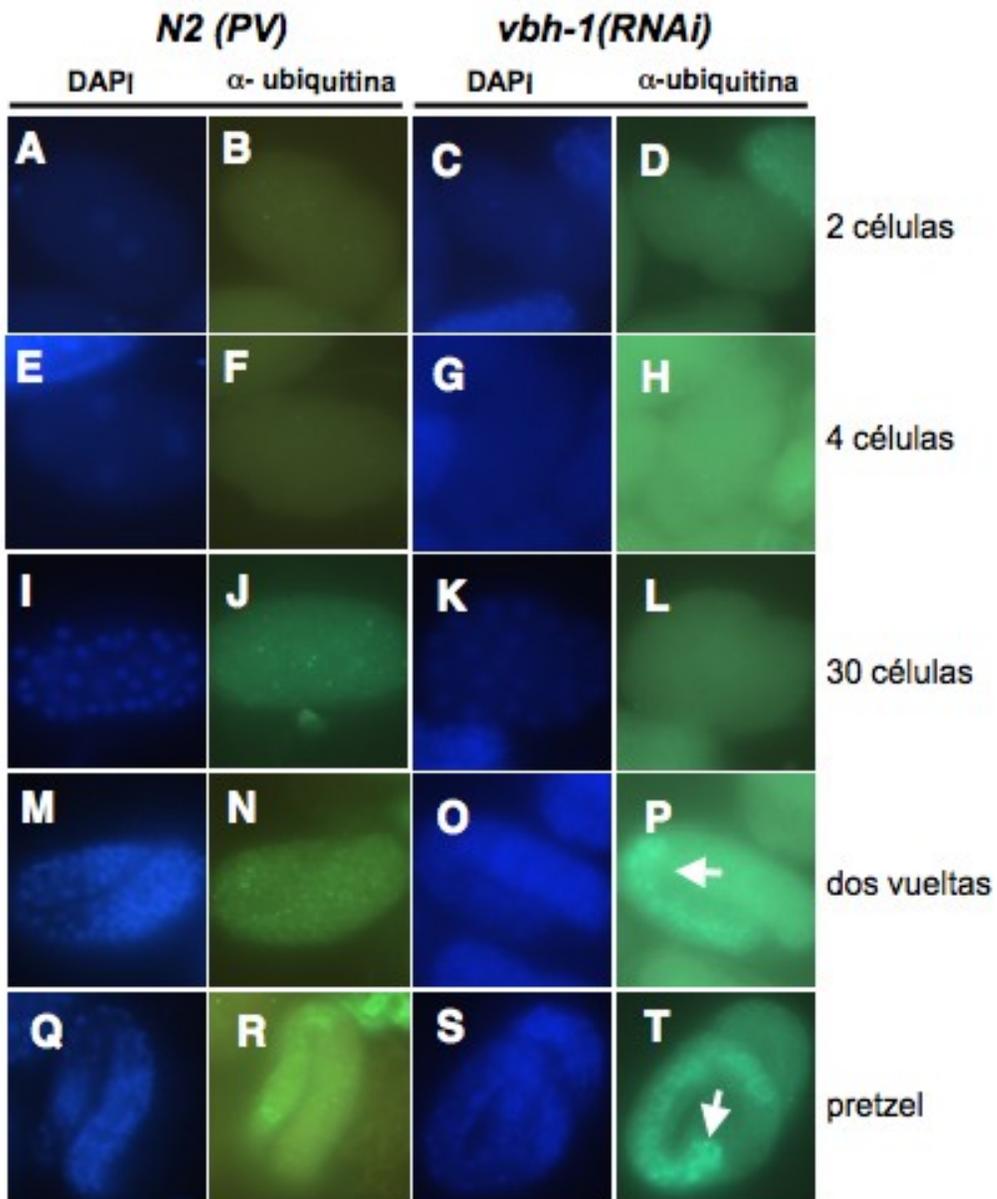
Se realizaron también los ensayos de inmunotinción en gónadas extraídas de animales silvestres y no encontramos alguna señal que evidenciara la presencia de la molécula de ubiquitina (Figura 19 panel A y B). Del mismo modo, no observamos ninguna señal de la marca de ubiquitinación en las gónadas extraídas de los animales *vbh-1(RNAi)* (pSZ1) (Figura 19 panel C y D).



**Figura 19.** Expresión de ubiquitina en las cepas silvestre *N2(PV)* y *vbh-1(RNAi)*. Se disecaron, fijaron y tiñeron gónadas de las cepas silvestre y de animales *vbh-1(RNAi)* con un anticuerpo policlonal contra ubiquitina y DAPI para visualizar los núcleos. No se observaron diferencias significativas en los patrones de expresión en gónadas.

Cuando se hizo la inmunotinción en embriones utilizando el anticuerpo contra ubiquitina observamos que un grupo de células, que aún no hemos identificado, muestra una señal de ubiquitina en algunos animales *vbh-1(RNAi)* en estadios tardíos como son dos vueltas y pretzel (Figura 20 panel P y T). Es importante mencionar que esta señal aunque es más evidente en los animales *vbh-1(RNAi)*, algunos embriones silvestres en etapas avanzadas de la embriogénesis también la presentan. La figura 20 panel N y R muestra los estadios de dos vueltas y pretzel de la cepa silvestre donde se observa una señal débil positiva para ubiquitina. La señal de ubiquitina en los embriones que carecen de VBH-1 muestran una localización en un grupo de células en el

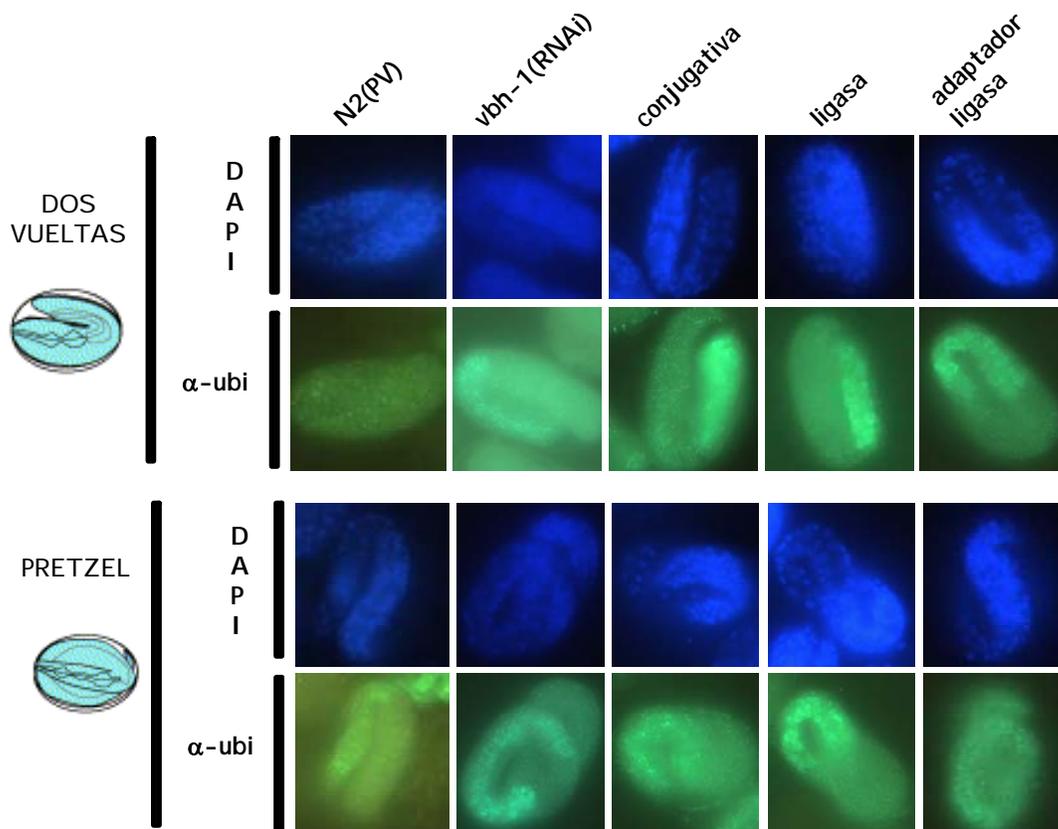
centro del cuerpo del embrión (flechas en la Figura 20). Debido a que en los embriones de los animales *vbh-1(RNAi)* se observa un ligero incremento en la señal de ubiquitina en estadios avanzados de la embriogénesis, decidimos analizar el patrón de expresión de la ubiquitina por medio de inmunotinciones en animales RNAi para cada uno de los genes de la vía de ubiquitina que fueron encontrados en el microarreglo.



**Figura 20.** Expresión de ubiquitina en las cepas silvestre *N2(PV)* y *vbh-1(RNAi)*. Se disecaron, fijaron y tiñeron embriones de las cepas silvestre y de animales *vbh-1(RNAi)* con un anticuerpo

policlonal contra ubiquitina y DAPI. No se observaron diferencias significativas en los patrones de expresión en embriones de estadios anteriores al de 30 células. Sin embargo, en estadios avanzados de la embriogénesis, como son los embriones de dos vueltas y pretzel, se observó un grupo de células que parecen ser positivas para esta señal (flechas).

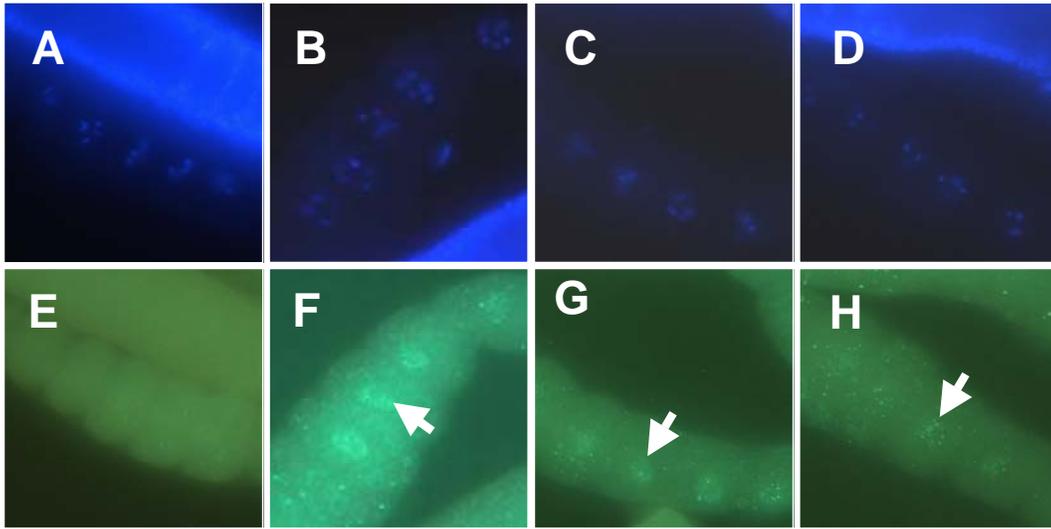
Cuando hacemos RNA de interferencia en el gen que codifica para la enzima conjugativa, la ligasa de ubiquitina y el adaptador de la ligasa, así como un análisis de inmunotinción utilizando al anticuerpo que reconoce a la ubiquitina, se encontró que al igual que en los animales *vbh-1(RNAi)*, la señal de la ubiquitina se detecta únicamente en los estadios más avanzados de la embriogénesis (Figura 21). En las etapas de 2, 4, 30 y 100 células se encontró que estos embriones no muestran diferencias en la inmunotinción en comparación con los animales silvestres (datos que no se muestran). Por el contrario, conforme avanza el desarrollo, se encontró que esta señal de ubiquitina está presente en aquellos animales que carecen de alguno de los componentes de la vía de ubiquitinación en las etapas de dos vueltas y pretzel de manera similar a lo que se observa en los animales *vbh-1(RNAi)*.



**Figura 21.** Expresión de ubiquitina durante la embriogénesis de animales silvestres, *vbh-1(RNAi)* y de los animales RNAi en el gen que codifica para la enzima conjugativa, la ligasa y el adaptador de la ligasa de ubiquitina. Las fotografías muestran embriones en las etapas avanzadas de la embriogénesis conocidas como dos vueltas y pretzel, En azul se muestra una tinción con DAPI mientras que en verde se muestra la inmunotinción utilizando el anticuerpo anti-ubiquitina. Al igual que en los animales *vbh-1(RNAi)* la falta de alguno de los componentes de la vía de ubiquitina muestran un ligero incremento en la señal positiva para la molécula de ubiquitina.

Es importante mencionar que aunque los animales silvestres llegan a presentar una señal similar en la inmunotinción esta se observa en un bajo porcentaje de embriones. Además, es importante destacar que la intensidad de la señal de ubiquitina se incrementa ligeramente cuando se hace RNAi en *vbh-1* o en cualquiera de los genes de ubiquitina. No creemos que esta señal de ubiquitina cause letalidad en los embriones ya que la letalidad embrionaria en animales *vbh-1(RNAi)* es muy baja (1.2 %). El laboratorio cuenta con la mutante de *vbh-1*, identificada como *vbh-1(ok567)*, la cual presenta una letalidad embrionaria del 100%. Debido a los resultados anteriores, resultaría interesante estudiar los patrones de ubiquitinación en esta mutante. Desafortunadamente, no es posible estudiar esta cepa debido a que presenta balanceadores genéticos que por sí solos causan letalidad embrionaria.

Después de realizar el análisis de inmunotinción en las gónadas de los animales RNAi para los tres genes de ubiquitina, se observó una mayor acumulación en la señal de ubiquitina, la cual se encuentra localizada específicamente en el núcleo del ovocito (Figura 22 panel F, G y H, respectivamente). En el núcleo de los animales silvestres (*N2PV*) y de los animales *vbh-1(RNAi)* esta señal se encuentra ausente (Figura 22 panel E). En el caso de las gónadas de los animales RNAi de la enzima conjugativa observamos que esta señal, aunque se localiza principalmente en el núcleo del ovocito, se distribuye también en el citoplasma aunque en niveles más reducidos (Figura 22 panel F), mientras que los ovocitos de los animales RNAi de la ligasa y del adaptador de la ligasa muestran esta señal localizada específicamente en el núcleo de los ovocitos (flechas).



**Figura 24.** La falta de cada uno de los tres componentes de la maquinaria de ubiquitinación causa un incremento en la señal de ubiquitina en el núcleo de los ovocitos. Gónada de animales silvestres (E) y animales RNAi en la enzima conjugativa (F), la ligasa de ubiquitina (G) y un adaptador de la ligasa de ubiquitina (H) cuyas gónadas se disecaron, fijaron y tiñeron usando un anticuerpo policlonal contra ubiquitina. Como se puede observar, los ovocitos de los animales RNAi de los tres genes de la vía de ubiquitina muestran una señal positiva para la ubiquitina.

#### 5.4.6. ANÁLISIS TIPO NORTHERN BLOT PARA CONFIRMAR LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE LOS GENES DE LA VÍA DE UBIQUITINA EN AUSENCIA DE VBH-1

A través de un análisis de microarreglos se mostró que la falta de la proteína VBH-1 modifica los niveles de expresión de tres genes que codifican para proteínas involucradas en el proceso de degradación de proteínas por ubiquitinación, la enzima conjugativa, la ligasa y un adaptador de la ligasa de ubiquitina. Los dos primeros genes incrementaron sus niveles de expresión, mientras que el último redujo sus niveles de expresión en ausencia de VBH-1. Decidimos confirmar estos cambios en los niveles de expresión por medio de experimentos de tipo Northern blot.

Se corrieron muestras de RNA total de animales silvestres (*N2PV*) y animales *vbh-1(RNAi)* adultos y se utilizaron sondas de cada uno de los tres

genes a analizar para estudiar sus niveles de expresión. No encontramos que el gen que codifica para la enzima conjugativa incrementara sus niveles de expresión en los extractos de RNA obtenidos a partir de animales *vbh-1(RNAi)* como lo mostró el análisis de microarreglos. Un análisis densitométrico indicó que el nivel de expresión de este gen es de alrededor de 0.8 en la muestra experimental (*vbh-1(RNAi)*), mientras que el nivel de expresión en la muestra control (*N2(PV)*) es de 1 (Figura 23). Esto puede deberse a que el RNA de los animales silvestres y *vbh-1(RNAi)* muestran un patrón distinto en el corrimiento del RNA. En la figura 25 se muestra que en el segundo carril, el cual representa el RNA de los animales *vbh-1(RNAi)*, existe un patrón de corrimiento del RNA distinto al que se observa en los animales silvestres. El RNA de los animales silvestres corresponde al primer carril del gel. Este corrimiento distinto se observa en la zona punteada y creemos que representa una gran cantidad de nuestro RNA de interés, ya que este patrón no se observa cuando se hibrida la membrana con el gen de actina. Debido a esto, cuando se realiza el análisis densitométrico, no es posible encontrar un incremento en los niveles de expresión de este gen, tal y como lo muestra el microarreglo. Otra posibilidad del bajo nivel de expresión de este gen en los animales *vbh-1(RNAi)* puede ser a que este gen tiene dos formas alternativas de splicing, las cuales a pesar de presentar el mismo número de residuos de aminoácidos, pudieran tener diferencias a nivel de RNA mensajeros en sus extremos 5' y 3' UTR que ocasionen estas diferencias en el gel.

Cuando realizamos el Northern blot utilizando como sonda el gen de la ligasa, encontramos que en los animales *vbh-1(RNAi)* se observa un incremento en sus niveles de expresión en comparación con los animales *N2(PV)*, lo cual corresponde a lo observado en el microarreglo. La figura 23 muestra que en los animales *vbh-1(RNAi)*, el cual se encuentra en el segundo carril, presenta un nivel de expresión de 2.1, en comparación con los animales silvestres que presentan un nivel de 1. Éstos últimos se encuentran representados en el primer carril del gel. El análisis densitométrico en la hibridación con el gen de actina mostró niveles similares en la expresión de este gen. Finalmente, el análisis densitométrico de los niveles de expresión del gen que codifica el adaptador de la ligasa de ubiquitina mostró una reducción de la expresión de este gen en aquellos animales que carecen de VBH-1, tal y

como se detectó en el microarreglo. En los animales *vbh-1(RNAi)* el nivel de expresión de este gen es de 0.5, mientras que en los animales control este nivel es de 1.

De manera comparativa con los resultados obtenidos en el análisis de microarreglos, el análisis de Northern blot mostró que de los tres genes de la vía de ubiquitinación analizados, dos de ellos presentaron un cambio en sus niveles de expresión los cuales fueron similares a los obtenidos en el microarreglo. El análisis de la expresión del gen que codifica la enzima conjugativa no pudo determinarse claramente por Northern blot en nuestro experimento, sin embargo, actualmente el Dr. Franco quien realiza una estancia posdoctoral en el laboratorio repitió este experimento confirmando que en ausencia de VBH-1 la enzima conjugativa incrementa sus niveles de expresión tal y como lo muestra el análisis de microarreglos. De esta manera, con el uso de dos técnicas diferentes pudimos confirmar que algunos de los genes que participan en la vía de ubiquitinación modifican sus niveles de expresión en ausencia de VBH-1.

## 6. DISCUSIÓN GENERAL

Las RNA helicasas incluyen un número grande de enzimas que participan en múltiples aspectos del metabolismo del RNA, tales como la transcripción, el splicing, el transporte, el procesamiento, la degradación, el RNA de interferencia y la formación del extremo 3' para la traducción del mRNA (Bleichert y Baserga, 2007). Recientemente se ha demostrado que las helicasas de RNA utilizan la energía de hidrólisis del ATP para remodelar complejos de RNA-RNA, RNA-DNA y RNA-proteínas y se sabe además que son capaces de desplazar proteínas específicas de complejos de RNA, alinear distintas cadenas de RNA, funcionar como “sujetador” entre distintas moléculas de RNA y estabilizar intermediarios específicos que de manera natural se forman durante el proceso de plegamiento de proteínas. Del mismo modo, estas helicasas son capaces de eliminar interacciones proteína-proteína (Bleichert y Baserga, 2007; Eckhard y Fairman, 2007).

Aunque diversos estudios bioquímicos, genéticos, estructurales, biofísicos y bioinformáticos han ofrecido hallazgos importantes acerca de la funcionalidad de las helicasas de RNA al estudiar la importancia de sus residuos conservados en diversos aspectos de su actividad enzimática, poco se sabe acerca de las funciones específicas que realizan estas proteínas en sistemas *in vivo* (Bleichert y Baserga, 2007). Se sabe, por ejemplo, que varias proteínas tipo DEAD son capaces de catalizar el desenrollamiento o disociación de cadenas de RNA así como también llevar a cabo la unión de estas cadenas a través de un proceso conocido como “apareamiento” o “unión”.

Entender la función de las helicasas de RNA resulta importante en el estudio de diversos mecanismos y procesos biológicos debido a que participan en múltiples funciones celulares. Por ello, creemos importante estudiar el papel de la helicasa de RNA, VBH-1, como un componente de los gránulos P en la línea germinal de *C. elegans*. En este trabajo hemos encontrado que la falta de VBH-1 causa una reducción en la progenie así como un incremento en la letalidad embrionaria. Además, a través de un análisis de microarreglos hemos

encontrado que en ausencia de esta proteína diversos genes modifican sus niveles de expresión. En general, estos genes codifican para diversas proteínas involucradas en múltiples funciones tales como la unión a ácidos nucleicos (DNA o RNA), el transporte celular, genes relacionados a la cromatina, la ubiquitinación de proteínas, entre otras. En nuestros resultados hemos encontrado que los animales RNAi en los genes de la vía de ubiquitinación muestran algunos fenotipos similares a los observados cuando se hace RNAi en VBH-1, tales como una reducción en los niveles de progeñe, un incremento en la letalidad embrionaria así como un aumento en el porcentaje de animales con ovocitos acumulados. Dado que en ausencia de VBH-1 existen alrededor de 96 genes que modifican sus niveles de expresión los cuales están involucrados en diversos procesos celulares, creemos que VBH-1 puede estar involucrada en algún otro proceso celular además del desenrollamiento de moléculas de RNA, por ejemplo en el proceso de degradación de proteínas a través del mecanismo de ubiquitinación debido a que los animales RNAi en estos genes muestran fenotipos similares a los observados en los animales *vbh-1(RNAi)*. Resulta entonces interesante entender con detalle la participación de VBH-1 en la línea germinal de *C. elegans*, por un lado para tratar de dilucidar su papel como componente de los gránulos P y por el otro lado, para establecer alguna otra función celular en la que participen estas proteínas y que no haya sido aún reportada. En resumen, aunque existen muchos estudios enfocados a determinar la función de estas proteínas, existen pocos trabajos que demuestren la multifuncionalidad de una misma RNA helicasa lo que hace interesante nuestros estudios al estudiar un componente de los precursores de la línea germinal y al utilizar, además, a *C. elegans* como un sistema biológico *in vivo*.

## **7. CONCLUSIONES**

- VBH-1 es una helicasa de RNA de la familia DEAD que se expresa específicamente en la línea germinal de *C elegans*.
- El bloqueo de la expresión de *vbh-1* se logra eficientemente al hacer la interferencia de RNA en este gen. El RNAi de *vbh-1* elimina por completo las tres isoformas conocidas de VBH-1.
- Los animales *vbh-1(RNAi)* muestran una reducción importante en los niveles de progenie en comparación con la cepa silvestre. Experimentos de cruza muestran que esta reducción en el número de hijos es debido a un defecto tanto en los ovocitos como en el esperma.
- Los animales *vbh-1(RNAi)* muestran un incremento en los niveles de letalidad embrionaria de alrededor del 1.2% en comparación con los animales silvestres, cuyo índice oscila alrededor del 0.2%. La falta de VBH-1 provoca la muerte en estadios avanzados de la embriogénesis.
- La falta de VBH-1 ocasiona una acumulación de los ovocitos en la parte proximal de la gónada lo cual resulta en la producción de ovocitos con núcleos endomitóticos, un defecto característico de ovocitos que no son fertilizados.
- En ausencia de la helicasa de RNA VBH-1, alrededor de 100 genes alteran sus niveles de expresión en un análisis de microarreglos.
- La falta de VBH-1 altera los niveles de expresión de la enzima conjugativa, la ligasa y de un adaptador de la ligasa de ubiquitina, los cuales forman parte de la vía de degradación de proteínas.
- El fenotipo de los animales *vbh-1(RNAi)* es semejante al observado en

RNAi para genes de la vía de ubiquitinación.

- La falta de la enzima conjugativa de ubiquitina causa un incremento en la acumulación de ovocitos en la parte proximal de la gónada, así como un incremento en la letalidad embrionaria.
- Los animales RNAi en la ligasa de ubiquitina muestran un incremento en la acumulación de ovocitos y en la letalidad embrionaria.
- La falta de un adaptador para la ligasa de ubiquitina causa una importante reducción en la progenie así como un incremento tanto en la acumulación de ovocitos como en la letalidad embrionaria.
- El RNAi de los genes que codifican las tres proteínas de ubiquitina, así como de *vbh-1*, causa un incremento en los niveles de expresión de ubiquitina en un grupo de células de embriones, en etapas avanzadas del desarrollo y en el núcleo de los ovocitos.

## 8. PERSPECTIVAS

1. Determinar la causa de la letalidad embrionaria en los animales que carecen de VBH-1.
2. Estudiar el papel de VBH-1 en la ovogénesis.
3. Confirmar los experimentos de los microarreglos y continuar el escrutinio para determinar la relación de VBH-1 con los genes obtenidos en estos experimentos.
4. Estudiar la relación entre la función de VBH-1 y la vía de ubiquitinación.
5. Determinar que grupo de células muestran un patrón de ubiquitinación en animales RNAi en *vbh-1* y en los diferentes genes de la vía de ubiquitinación.
6. Estudiar los fenotipos de cada uno de los animales RNAi para los diferentes genes de la vía de ubiquitinación.

## 9. LITERATURA CITADA

1. Abdelhaleem, M. **RNA Helicases: Regulators of differentiation.** Clinical Biochemistry (2005) 38:499-503
2. Anahita A., B. Keiper, I. Kawasaki, Y. Fan, Y. Kohara, R. Rhoads and S. Strome. **An isoform of eIF4E is a component of germ granules and is required for spermatogenesis in *C. elegans*.** Development (2001) 128:3899-3912
3. Beanan M. J. and S. Strome. **Characterization of a germ-line proliferation mutation in *C. elegans*.** Development (1992)116:755-766
4. Barton M. K., Schedl T.B., Kimble J. **Gain of-function mutations of fem-3, a sex determination gene in *Caenorhabditis elegans*.** Genetics (1987) 115(1):107-112
5. Bleichert F. and S. J. Baserga. **The long Unwinding Road of RNA Helicases.** Molecular Cell (2007) 27:3 339-352
6. Boag P., A. Nakamura and K. Blackwell. **A conserved RNA-protein complex component involved in physiological germline apoptosis regulation in *C. elegans*.** Development (2005) 132:4975-4986
7. Bruce, H., L. Yeh and Y. N. Jan. **A Protein Component of Drosophila Polar Granules Is Encoded by *vasa* and Has Extensive Sequence Similarity to ATP-Dependent Helicases.** Cell (1988) 55:577-587
8. Cooper, G. M. and R. E. Hausman. **The Cell: A molecular Approach.** (2004). Third Edition. Sinauer Associates, Inc. 713 pp
9. Eckhard J. and M. E. Fairman. **RNA helicases-one fold for many functions.** Current Opinion in Structural Biology (2007) 17:3 316-324
10. Fairman, M., P. A. Maroney, W. Wang, H. A. Bowers, P. Gollnick, T. W. Nilsen and E. Jankowsky. **Protein Displacement by DExD/H "RNA Helicases" Without Duplex Unwinding.** Science (2004) 304: 730-734
11. Fire A., Xu S., Montgomery M. K., Kostas S. A., Driver S. E. and Mello C. C. **Potent and Specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*.** Nature (1998) 391 (6669): 806-811
12. Fraser A. G., R. S. Kamath, P. Zpperlen, M. Martínez-Campos, M. Sohrmann and J. Ahringer. **Functional genomics analysis of *C. elegans* chromosome I by systematic RNA interference.** Nature (2000) 408: 325-330

13. Gross T., A. Siepmann, D. Sturm, M. Windgassen, J. J. Scarcelli, M. Seedorf, C. N. Cole and H. Krebber. **The DEAD-box RNA Helicase Dbp5 Functions in Translation Termination.** *Science* (2007) 315: 646-649
14. Guides S. and J. Priess. **The *C. elegans* MEX-1 protein is present in germline blastomeres and is a P granule component.** *Development* (1997) 124:731-739
15. Hay B. and Jan L. Y. **Localization of vasa, a component of *Drosophila* polar granules, in maternal-effect mutants that alter embryonic anteroposterior polarity.** *Development* (1990) 109(2): 425-433
16. Howbrook D. N., A. van der Valk, M. C. O'Shaughnessy, D. K. Sarker, S. C. Barker and A. W. Lloyd. **Developments in microarray technologies.** *Drug Discovery Today* (2003) 8(14):642-651
17. Hubbart J. A. and D. Greenstein. **The *Caenorhabditis elegans* Gonad: A Test Tube for Cell and Developmental Biology.** *Developmental Dynamics* (2000) 218: 2-22
18. Iwasaki K., McCarter J., Francis R. and Schedl T. **emo-1, a *Caenorhabditis elegans* Sec61p gamma homologue, is required for oocyte development and ovulation.** *J. Cell Biol.* (1996) 134:699-714
19. Johnstone O. and P. Lasko. **Interaction with eIF5B is essential for Vasa function during development.** *Development* (2004) 131: 4167-4178
20. Johnstone O., R. Deuring, R. Bock, P. Linder, M. T. Fuller and P. Lasko. **Belle is a *Drosophila* DEAD-box protein required for viability and in the germ line.** *Developmental Biology* (2004) 277:92-101
21. Kathleen A. K., P. Smith, W. M. Leung-Chiu, A., A. Estevez, H. Scott and K. Bennett. **Combinatorial RNA interference indicates GLH-4 can compensate for GLH-1; these two granule P components are critical for fertility in *C. elegans*.** *Development* (2000) 127:2907-2916
22. Kawasaki I., A. Imiri, Y. Fan, N. Meyer, S. Dunkelbarger, T. Motohashi, T. Karashima, O. Bossinger and S. Strome. **The PGL Family Proteins Associate with Germ Granules and Function Redundantly in *Caenorhabditis elegans* Germline Development.** *Genetics* (2004) 167:645-661
23. Kawasaki I., Y. Shim, J. Kirchner, J. Kaminker, W. B. Wood and S. Strome. **PGL-1, a Predicted RNA-Binding Component of Germ Granules, Is Essential for Fertility in *C. elegans*.** *Cell* (1998) 94: 635-645
24. Kotaja Noora, Subvendrá N. Bhattacharyya, Lukasz Jaskiewicz, Sarah Kimmins, Martti Parvinen, Witold Filipowicz and Paolo Sassone-Corsi. **The chromatoid body of male germ cells: Similarity with processing**

- bodies and presence of Dicer and microRNA pathway components.** PNAS (2006) 103(8): 2647-2652
25. Lewin B. **Genes VIII.** Pearson Prentice Hall. Upper Saddle River, N. J. (2006), 1027 pp
26. Linder, P. and Lasko P. **Bent out of Shape: RNA Unwinding by the DEAD-box Helicase Vasa.** Cell (2006) 125: 219-221
27. Lodish H., A. Berk, P. Matsudaira, C.A. Kraisler, M. Krieger, M. P. Scott, S.L. Zipurski and J. Darnell. **Molecular Cell Biology** (2004) Edit. Freeman and Company, New York
28. Lu, L., W. Diehl-Jones and P. Lasko. **Localization of vasa protein to the *Drosophila* pole plasm is independent of its RNA-binding and helicase activities.** Development (1994) 120:1201-1211
29. Mello C., C. Schubert, B. Draper, W. Zhang, R. Lobel and J. R. Priess. **The PIE-1 protein and germline specification in *C. elegans* embryos.** Nature (1996) 382: 710-712
30. Miller M. A., Viet Q. Nguyen, Min-Ho Lee, M. Kosinski, T. Schedl, R. M. Caprioli y D. Greenstein. **A Sperm Cytoskeletal Protein that Signals Oocyte Meiotic Maturation and Ovulation.** Science (2001) 291:2144-2147
31. Navarro R. E., E. Y. Shim, Y. Kohara, A. Singson and T. K. Blackwell. ***cgh-1*, a conserved predicted RNA helicase required for gametogenesis and protection from physiological germline apoptosis in *C. elegans*.** Development (2001) 128:17 3221-3232
32. Nelson C. L. and D. P. Bartel. **Interferencia de RNA.** Investigación y Ciencia (2003): 6-13
33. Nelson G. A., Lew K. K. and Ward S. **Intersex, a temperature-sensitive mutant of the nematode *Caenorhabditis elegans*.** Developmental Biology (1978) 66:386-409
34. Noce T., S. Okamoto-Ito and N. Tsunekawa. **Vasa Homolog Genes in Mammalian Germ Cell Development.** Cell Structure and Function (2001) 26:131-136
35. Phillips C., C. Wong, N. Bhalla, P. Carlton, P. Weiser, P. Meneely and A. F. Dernburg. **HIM-8 Binds to the X Chromosome Pairing Center and Mediates Chromosome-Specific Meiotic Synapsis.** Cell (2005) 123:6 1051-1063
36. Puoti A., Pugnale P., Belfiore M., Schläppi A. and Saudan Z. **RNA and sex determination in *Caenorhabditis elegans*.** Post-transcription regulation of

the sex-determining *tra-2* and *fem-3* mRNAs in the *Caenorhabditis elegans* hermafrodita. *EMBO Reports Review* (2001) 2:10 899-904

37. Ramirez, J., L. Chávez, J.L. Santillán y S. Guzmán. **Microarreglos de DNA**. Mensaje Bioquímico, Vol. XXVII. Depto. Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. México (2003) 97-119
38. Raz E. **The function and regulation of vasa-like genes in germ-cell development**. *Genome Biology* (2000) 1 (3): 1017.1-1017.6
39. Reinke V., H. E. Smith, J. Nance, J. Wang, C. van Doren, R. Begley, S. J. Jones, E. B. Davis, A. Scherer, S. Ward and S. K. Kim. **A Global Profile of Germline Gene Expression in *C. elegans***. *Molecular Cell* (2000) 6:605-616
40. Reinke V. **Functional exploration of the *C. elegans* genome using DNA microarrays**. *Nature Genetics Supplement* (2002) 32:541-546
41. Riddle D. L., T. Blumenthal, B. J. Myer and J. R. Priess. 1997. **C. ELEGANS II**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1222 pp
42. Salinas L. S., E. Maldonado, M. Macías-Silva, T.K. Blackwell and R. E. Navarro. **The DEAD Box RNA Helicase VBH-1 Is Required for Germ Cell Function in *C. elegans***. *Genesis* (2007) 45:533-546
43. Sambrook J. and D. W. Russell. (2002). **Molecular Cloning. A Laboratory Manual**. Vol. 1. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N. Y.
44. Scott G. F. (2003). **Developmental Biology**. Seventh Edition. Edit. SINAUER ASSOCIATES, INC. Sunderland, Massachusetts. 838 pp
45. Shimada M., H. Yokosawa and H. Kawahara. **OMA-1 is a P granules-associated protein that is required for germline specification in *Caenorhabditis elegans***. *Genes to Cells* (2006) 11:383-396
46. Sijen T., J. Fleenor, F. Simmer, K. L. Thijssen, S. Parrish, L. Timmons, R. H. A. Plasterk y A. Fire. **On the Role of RNA Amplification in dsRNA-Triggered Gene Silencing**. *Cell* (2001) 107:465-476
47. Strome S. and W. B. Wood. **Inmunofluorescence visualization of germline-specific cytoplasmic granules in embryos, larvae, and adults of *Caenorhabditis elegans***. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1982) 79: 1558-1562
48. Sutovsky P. **Ubiquitin-Dependent Proteolysis in Mammalian Spermatogenesis, Fertilization, and Sperm Quality Control: Killing Three Birds With One Stone**. *Microscopy Research and Technique* (2003) 61:88-102

49. Stephen H. F. and R. B. Stoughton. **Micromatices de DNA**. Investigación y Ciencia (2002) 49-57
50. Tanaka S. T., Y. Toyooka, R. Akasu, Y. Katoh-Fukui, Y. Nakahara, R. Suzuki, M. Yokoyama and T. Noce. **The mouse homolog *Drosophila Vasa* is required for the development of male germ cells**. Genes and Development (2000) 14:841-885
51. Tanner N. K. and P. Linder. **DExD/H Box RNA Helicases: From Generic Motors to Specific Dissociations Functions**. Molecular Cell (2001) 8:251-262
52. Tenenhaus C., C. Schubert and G. Seydoux. **Genetic requirements for PIE-1 localization and Inhibition of Gene Expression in the Embryonic Germ Line of *Caenorhabditis elegans***. Developmental Biology (1998) 200:212-224
53. Timmons L., D. L. Court and A. Fire. **Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans***. Gene (2001) 263:103-112
54. Timmons L., H. Tabara, C. C. Mello and A. Z. Fire. **Inducible Systematic RNA Silencing in *Caenorhabditis elegans***. Molecular Biology of the Cell (2003) 14: 2972-2983
55. Walhout, A J., J. Reboul, O. Shtanko, N. Bertin, P. Vaglio, H. Ge, H. Lee, L. Doucette-Stamm, K. C. Gunsalus, A. J. Schetter, D. G. Morton, K. J. Kemphues, V. Reinke, S. K. Kim, F. Piano and M. Vidal. **Interating Interactome, Phenome, and Transcriptome Mapping data for the *C. elegans* Germline**. Current Biology (2002) 12:1952-1958
56. Wiley J. and L. Sons. ***Caenorhabditis elegans***. Yeast (2000) 17:37-42
57. Wylie C. **Germ Cells**. Current Opinion in Genetics and Development (2000) 10:410-413
58. Wood, W. B. 1988. ***The nematode Caenorhabditis elegans***. Ed. New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press 667 pp

## 10. APÉNDICE I

Durante la escritura de esta tesis, continué haciendo experimentos para la publicación de un artículo. En este periodo encontramos datos interesantes acerca de una de las funciones de VBH-1 en la gónada de *C. elegans*. Encontramos que los animales *vbh-1(RNAi)* acumulan ovocitos porque tienen defectos durante la espermatogénesis. Durante la etapa larvaria L4 del hermafrodita se producen todos los espermatozoides que utilizará este animal en su etapa reproductiva. Al cambiar a adulto la producción de espermatozoides se detiene y únicamente se producen ovocitos (Puoti *et al.*, 2001). Se sabe que este cambio de espermatogénesis se encuentra regulado por la acumulación de las proteínas FEM-3, que promueve la espermatogénesis, y la proteína TRA-2, la cual induce la ovogénesis (Puoti *et al.*, 2001). Observamos que los animales *vbh-1(RNAi)* sufren de un cambio prematuro de la espermatogénesis a la ovogénesis en cual nos encontramos estudiando actualmente. En esta sección se incluye un artículo que fue aceptado recientemente para su publicación en la revista *Genesis*, el cual contiene los patrones de expresión de VBH-1 así como la falta de *vbh-1* por medio de RNA de interferencia. Parte de este artículo contiene datos obtenidos durante este trabajo de maestría.

### 10.1. Resumen del Artículo

Algunos de los resultados de la tesis de maestría se incluyeron en el artículo que se anexa a continuación:

**Resumen del Artículo:** La helicasa DEAD Box VBH-1 se requiere para la función de las células germinales en *C. elegans*.

Vasa y Belle RNA helicasas tipo DEAD box necesarias para la función de las células germinales. Los ortólogos de diversas especies, incluidas la de algunos mamíferos, son capaces de complementar una mutante de *S. cerevisiae* (DED1), sugiriendo que la función de estas proteínas se encuentra altamente conservada. Se ha propuesto que estas proteínas se requieren para la regulación traduccional de mRNAs, pero su mecanismo específico de acción es aún desconocido. En este trabajo, describimos la función de VBH-1, una proteína de *C. elegans* cercanamente relacionada a Belle y Vasa. VBH-1 se expresa específicamente en la línea germinal de *C. elegans*, donde se encuentra asociada con los gránulos P, la contraparte del plasma germinal. Los animales *vbh-1(RNAi)* producen menos progenie que los animales silvestres, debido a defectos en la producción de ovocitos y esperma, y la letalidad embrionaria. Encontramos también que VBH-1 participa en el cambio de espermatogénesis a ovogénesis en la gónada del hermafrodita. Concluimos que VBH-1 y sus ortólogos pueden llevar a cabo funciones conservadas en los procesos de la fertilidad y el desarrollo.

**Artículo Publicado en:** *Genesis* 45:533-546 (2007)

## ARTICLE

The DEAD Box RNA Helicase VBH-1 Is Required for Germ Cell Function in *C. elegans*L. Silvia Salinas,<sup>1</sup> Ernesto Maldonado,<sup>2</sup> Marina Macías-Silva,<sup>1</sup> T. Keith Blackwell,<sup>3,4</sup> and Rosa E. Navarro<sup>1\*</sup><sup>1</sup>Departamento de Biología Celular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad Universitaria, México D.F., 04510 México<sup>2</sup>Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad Universitaria, México D.F., 04510 México<sup>3</sup>Section on Developmental and Stem Cell Biology, Joslin Diabetes Center, One Joslin Place, Boston, Massachusetts 02215<sup>4</sup>Department of Pathology, Harvard Stem Cell Institute, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts 02215

Received 13 March 2007; Revised 13 June 2007; Accepted 20 June 2007

**Summary:** Vasa and Belle are conserved DEAD box RNA helicases required for germ cell function. Homologs of this group of proteins in several species, including mammals, are able to complement a mutation in yeast (DED1) suggesting that their function is highly conserved. It has been proposed that these proteins are required for mRNA translation regulation, but their specific mechanism of action is still unknown. Here we describe functions of VBH-1, a *C. elegans* protein closely related to Belle and Vasa. VBH-1 is expressed specifically in the *C. elegans* germline, where it is associated with P granules, the *C. elegans* germ plasm counterpart. *vbh-1(RNAi)* animals produce fewer offspring than wild type because of defects in oocyte and sperm production, and embryonic lethality. We also find that VBH-1 participates in the sperm/oocyte switch in the hermaphrodite gonad. We conclude that VBH-1 and its orthologs may perform conserved roles in fertility and development. *genesis* 45:533–546, 2007. © 2007 Wiley-Liss, Inc.

**Key words:** germline; DEAD box RNA helicase; sperm/oocyte switch

## INTRODUCTION

Germ cells from many organisms possess specialized cytoplasm composed of electron-dense granules that lack membrane and that contain mRNAs and proteins essential for germ line preservation and function. These granules are known as pole granules in *Drosophila melanogaster* and as P granules in *Caenorhabditis elegans*. Germline granules contain, among other proteins, several DEAD box RNA helicases that play important roles in germline development and function (Gruidl *et al.*, 1996; Johnstone *et al.*, 2005; Kuznicki *et al.*, 2000; Lasko and Ashburner, 1988; Navarro *et al.*, 2001). DEAD box RNA helicases belong to a conserved family of proteins,

which unwind RNA and may facilitate RNA-protein interactions in an ATP-dependent manner (Andersen *et al.*, 2006; Linder, 2006). Many members of this family are involved in mRNA metabolism and processing including transcription, splicing, ribosome biogenesis, nuclear export, mRNA turnover, ribonucleoprotein-remodeling, and RNA interference (RNAi) (reviewed by Linder, 2006).

The *Drosophila* protein Vasa was one of the first germline DEAD box RNA helicases characterized (Hay *et al.*, 1988; Lasko and Ashburner, 1988). Vasa is expressed specifically in the germline, is conserved during evolution, is essential for *Drosophila's* germline establishment during embryogenesis, and is indispensable for female fertility (Liang *et al.*, 1994; Schupbach and Wieschaus, 1986). Vasa interacts directly with translation initiation factor eIF5B, and this interaction is essential for its function (Johnstone and Lasko, 2004). Four DEAD box RNA helicases from *C. elegans*, known as GLH-1/-2/-3/-4, are closely related to Vasa and are redundantly essential for germ line development, and P granule structure (Gruidl *et al.*, 1996; Kawasaki *et al.*, 2004; Kuznicki *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2002). Vasa's mammalian homolog MVH is also germline-specific and essential for male fertility (Tanaka *et al.*, 2000). Germ cells from mice that do not express this protein fail to progress through

This article contains supplementary material available via the Internet at <http://www.interscience.wiley.com/jpages/1526-954X/suppmat>.

\*Correspondence to: Rosa E. Navarro, Circuito Exterior s/n. Departamento de Biología Celular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, México DF 04510.

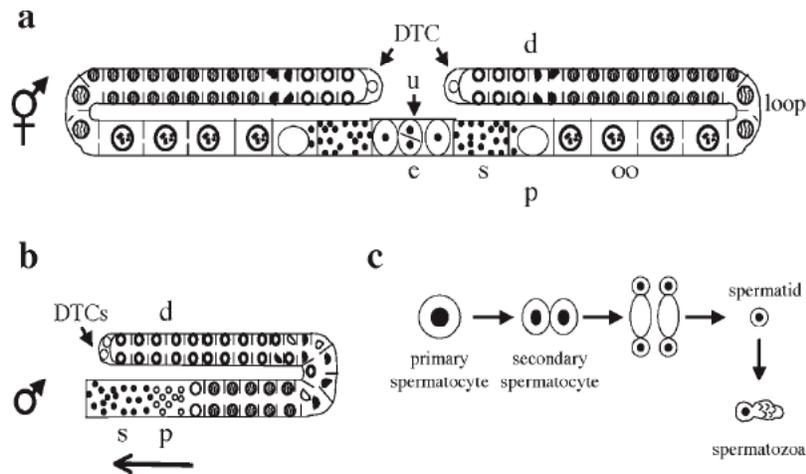
E-mail: rnavarro@ifc.unam.mx

Contract grant sponsors: NIH, UNAM-PAPIIT, CONACyT Mexico, L'OREAL/UNESCO and TWAS

Published online 14 September 2007 in

Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

DOI: 10.1002/dvg.20323



**FIG. 1.** Structure of the *C. elegans* hermaphrodite and male germline. (a) Diagram of the hermaphrodite gonad. The uterus connects two gonad arms. A somatic distal tip cell (DTC) maintains germ cell proliferation. During the L4 larval stage, the first 40 cells that enter meiosis become sperm that are stored in the spermatheca. Subsequently, only oocytes are formed. As germ cells move away from the DTC they enter meiotic prophase, thereafter germ cells progress from pachytene to diakinesis as they move proximally. Prior to fertilization, each oocyte undergoes maturation. Oocytes move through spermatheca, where they are fertilized and deposited in the uterus. (b) Diagram of the male gonad. The male gonad has a single gonad arm and produces sperm continuously. Two DTCs maintain germ cell proliferation. As germ cells approach the proximal gonad, they enter meiosis and sperm are formed. The arrow shows the direction in which spermatogenesis occurs. (c) Wild type spermatogenesis in *C. elegans*. Primary spermatocytes undergo two meiotic divisions to form secondary spermatocytes and finally spermatids. Spermatids bud away from a residual body, grow a pseudopod, and are activated to form mature spermatozoa. d = distal; p = proximal; oo = oocyte; s = spermatheca; u = uterus; e = embryos.

meiosis during spermatogenesis, and germ cells die by apoptosis.

Belle is a *Drosophila* protein that is closely related to Vasa. Belle plays an important role in female and male fertility, but is also essential for viability and growth (Johnstone *et al.*, 2005). The closest yeast-related protein to Belle is Dcd1p. DED1 is an essential gene from *Saccharomyces cerevisiae*, which participates in general translation initiation (Chuang *et al.*, 1997; de la Cruz *et al.*, 1997; lost *et al.*, 1999). Two human DED1 homologs are known as DDX3Y (DBY) and DDX3X (DBX), which are located in the Y and X chromosomes, respectively. DDX3Y protein expression is restricted to the male germline, while DDX3X is expressed in all tissues. DDX3Y deletion leads to a significant reduction in germ cell number, and sometimes to a complete absence (Ditton *et al.*, 2004; Foresta *et al.*, 2000).

Although many DEAD box RNA helicases play important roles in the germline of several organisms, we still do not understand the mechanisms that these proteins use to accomplish their function. To understand the role of these proteins in the germline, we are using the nematode *C. elegans*, which is an excellent model organism for studying many biological processes. The *C. elegans* hermaphrodite gonad consists of two identical U-shaped tubes that are connected to the uterus (Fig. 1a). During the L4 larval stage, sperm is produced and stored in the spermatheca. In adulthood, only oocytes are produced (Hubbard and Greenstein, 2000; Schedl, 1997). Males, which only possess one gonad arm, start producing

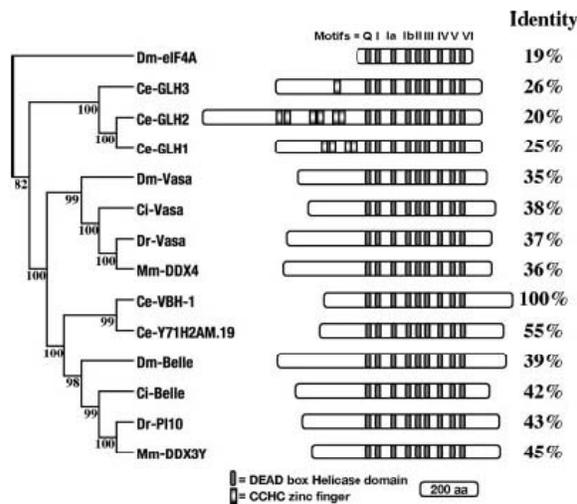
sperm in the L4 larval stage and continue throughout adult life (Fig. 1b).

Here we describe a *C. elegans* DEAD box RNA helicase that is closely related to Belle and also highly similar to Vasa, which we have called VBH-1 (Vasa and Belle-like helicase). VBH-1 is germline-specific and associates with P granules. Using RNA interference, we show that *vbb-1* is important for embryogenesis, spermatogenesis, and oocyte function. Half of the animals lacking VBH-1 are capable of producing few sperm while the other half are unable to initiate spermatogenesis. Fifty percent of *vbb-1(RNAi)* animals enter oogenesis earlier than wild type suggesting that VBH-1 participates in the sperm/oocyte switch in the *C. elegans* gonad.

## RESULTS

### VBH-1 Is a DEAD box RNA Helicase Similar to *Drosophila* Belle and Vasa

The best-characterized member of the DEAD box RNA helicase family is eIF4A, which functions to unwind mRNA to allow the beginning of translation (Linder, 2006). Looking for DEAD box RNA helicases that might have a specific function in the *C. elegans* germline, open reading frames Y54E10A.9 and Y71H2AM.19 were found to be similar to both the Vasa and the Belle subgroups of DEAD box RNA helicases (Fig. 2). A multiple sequence alignment was performed using protein sequences of the Vasa and Belle subgroups, and a phylogenetic tree



**FIG. 2.** VBH-1 is a DEAD box RNA helicase similar to the Vasa and Belle protein groups. A phylogenetic analysis and conserved domains in VBH-1 related proteins are shown. The DEAD box RNA helicase eIF4A (isoform A) from *Drosophila* was used as an outlying group to construct the phylogenetic tree. Three main groups were formed in the tree; GLH-1/-2/-3 proteins from *C. elegans*; the Vasa, and the Belle groups, which also includes VBH-1 (Y54E10A.9). An identical tree was obtained when GLH-4 was included (not shown for simplicity). Numbers at the nodes are percentages of 1,000 bootstrap replicates in which that node was recovered. The schematic representation of the proteins (on the right side) shows the proportional size for each, and grey boxes indicate positions for the most conserved domains. Only the GLH-1/-2/-3 proteins have CCHC zinc finger domains. Percentage of identity was obtained comparing VBH-1 against each protein individually. Dm: *Drosophila melanogaster*; Ce: *C. elegans*; Ci: *Ciona intestinalis*; Dr: *Danio rerio* (zebrafish); Mm: *Mus musculus*.

was built using the translation initiation factor eIF4A as the outlying group. The GLH-1/-2/-3 proteins were included, which have been previously proposed to be Vasa homologs in *C. elegans* (Gruidl *et al.*, 1996; Rousell and Bennett, 1993; Smith *et al.*, 2002). Three main subgroups appeared in the tree (Fig. 2); a GLH-1/-2/-3 protein subgroup, a Vasa subgroup, and a Belle subgroup. Y54E10A.9 and Y71H2AM.19 proteins were clearly located in the Belle subgroup. An identical tree was obtained performing a protein alignment with the subregion encompassing motifs Q to VI from the same set of proteins (data not shown).

RNA interference of Y71H2AM.19 was found to result in pleiotropic defects and embryonic lethality (data not shown). In *Y71H2AM.19(RNAi)* animals, growth was arrested; some animals were unable to move properly, a few had a blistered cuticle, and some larval lethality was also observed. This phenotype had also been previously observed in a genome-wide RNAi screen (Sonnichsen *et al.*, 2005). *Y54E10A.9(RNAi)* animals showed reduced fertility and some embryo lethality, suggesting that this gene might play a role in the germline (see later). Because our interest was to study the function of these DEAD box RNA helicases in the germline, this

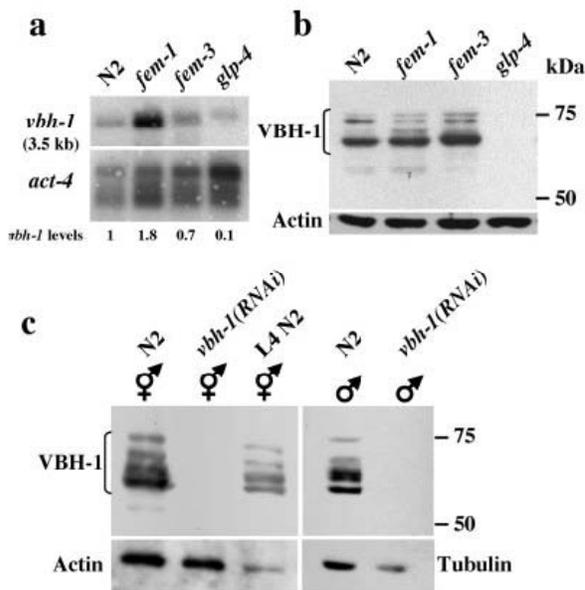
study was focus exclusively on Y54E10A.9. Because of its similarity to Vasa and Belle proteins, Y54E10A.9 was named VBH-1 (Vasa, Belle-like helicase).

Although VBH-1 is very similar to the Belle subgroup several features distinguish it from the Belle subgroup members. VBH-1 lacks some of the conserved domains in the Belle subgroup that have been previously reported to be present in all members of this subgroup (Johnstone *et al.*, 2005). Glycine-rich domains are RNA binding sites typically present in the N-terminal or C-terminal regions from DEAD box RNA helicases. Whereas all Belle proteins have Glycine-rich domains in both the N-terminal and C-terminal regions, VBH-1 has only one Glycine-rich domain located near the C-terminus (data not shown). Vasa members also have only one Glycine-rich domain; however, it is at the N-terminus. These data suggests that VBH-1 is the *C. elegans* DEAD box RNA helicase most closely related to both Belle and Vasa.

### VBH-1 Is Expressed Specifically in the Germline

The expression patterns of Vasa- and Belle-related proteins in other species predicted that VBH-1 would be expressed in the *C. elegans* germline, possibly specifically. To investigate whether the *vbb-1* mRNA is expressed in the germline, temperature sensitive mutants were analyzed in which production of oocytes, sperm, or both is impaired. At nonpermissive temperatures hermaphrodite animals from mutants *fem-1(bc17)*, *fem-3(q20gf)*, and *glp-4(bn2)* have gonads that produce only oocytes, sperm or practically no germline, respectively (Barton *et al.*, 1987; Beanan and Strome, 1992; Kimble *et al.*, 1984). An abundant band of ~3.5 kb corresponding to the predicted *vbb-1* mRNA(s) was highly expressed in animals with feminized gonads (*fem-1*) (Fig. 3a). *vbb-1* was also detected at lower levels in wild type (N2) and masculinized (*fem-3*) animals (Fig. 3a). The *vbb-1* transcript was reduced significantly in *glp-4(bn2)* adult hermaphrodites, in which the germline is underproliferated (Fig. 3a) showing that *vbb-1* mRNA is germline enriched and is expressed during both spermatogenesis and oogenesis.

To determine the expression of VBH-1 protein, rabbit antisera was raised against a carboxyl-terminal VBH-1 peptide (see Materials and Methods). An affinity-purified antiserum identified several bands with molecular weights around 70 kDa on Western blot analysis (Fig. 3b,c). These bands were consistently absent in *vbb-1(RNAi)* animals indicating that the VBH-1 antibody is specific (Fig. 3c). Three alternative splicing forms have been reported for *vbb-1* (<http://www.wormbase.org>, release WS174, May 06, 2007), and their putative protein-predicted molecular weights are 72.6, 70.8, and 70.5 kDa. More than three protein bands were observed, which varied in their relative intensities among different protein extract preparations (Fig. 3b,c; data not shown) suggesting that VBH-1 is modified post-translationally. Western blot analysis using *glp-4(bn2)* mutant protein extracts (that possess virtually no germ line) showed



**FIG. 3.** *vbh-1* mRNA and protein expression. (a) Northern blot analysis using a *vbh-1* cDNA as a probe to test its expression in adult hermaphrodites from the following strains: N2 (wild type), *fem-1(hc17)* (produce only oocytes), *fem-3(q20gf)* (produce only sperm), and *glp-4(bn2)* (underproliferated germline). Expression levels were normalized to an actin gene and are indicated at the bottom. (b) Western blot from whole-animal protein extracts prepared from synchronized adult wild type, and indicated strains grown at restricted temperature. (c) Western blot from whole-animal protein extracts prepared from a population of 100 individuals of the indicated background. All blots were probed with rabbit VBH-1 antibodies. Either rabbit actin or mouse tubulin antibodies were used as loading control. Size markers are shown on the right.

that VBH-1 expression is germline-specific (Fig. 3b). In contrast, VBH-1 was abundant in *fem-1(bc17)* and *fem-3(q20gf)* animals that produce only oocytes or only sperm, respectively (Fig. 3b). Accumulation of any specific VBH-1 isoforms, in whole animal extracts from L4 hermaphrodites, feminized animals, masculinized animals or males, was not observed (Fig. 3b,c). These experiments suggest that the VBH-1 protein is germline-specific, and is expressed during both spermatogenesis and oogenesis.

#### VBH-1 Associates with P Granules

To determine the localization of the VBH-1 protein, full-length VBH-1 was fused with green fluorescence protein (GFP) under the control of the germline-specific *pie-1* promoter (Stitzel *et al.*, 2006). Transgenic animals were generated by biolistic transformation following a standard protocol (see Materials and Methods). Transgenic animals showed VBH-1:GFP localization in the cytoplasm of both somatic and germline blastomeres during embryogenesis (Fig. 4a–d) and in oocytes (Fig. 4i). VBH-1:GFP was also observed in foci within the germline and co-localized with the P granule component

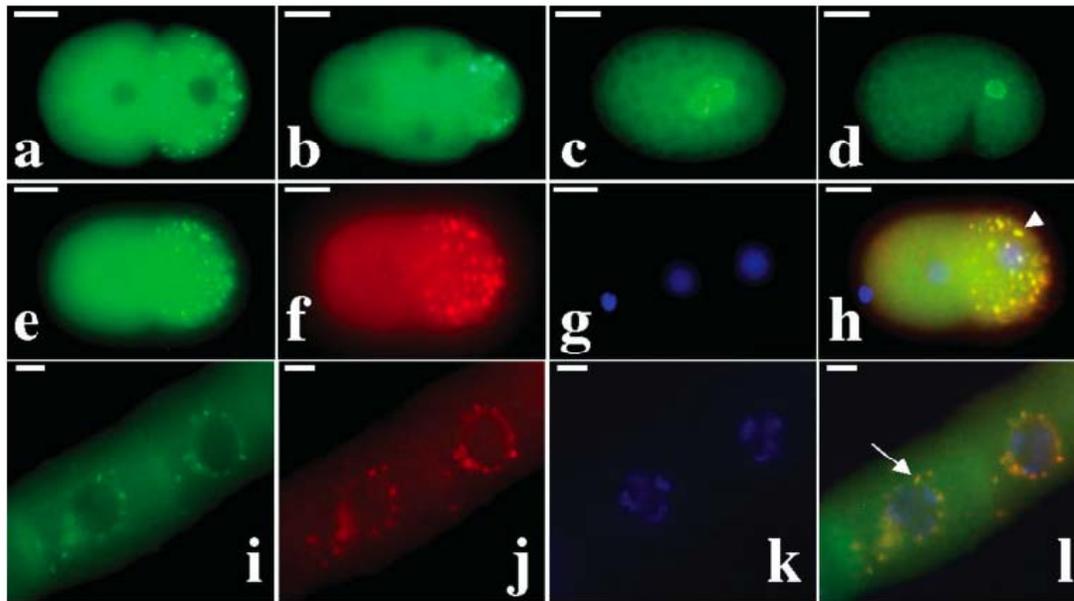
PGL-1 (Fig. 4e–l) (Kawasaki *et al.*, 1998). VBH-1 localization was not consistently observed in every P granule, particularly during oogenesis, and on occasion we observed that PGL-1 and VBH-1 overlap only partially (Fig. 4h,l). To corroborate these results, a specific VBH-1 antiserum was used in immunostaining assays. VBH-1 antibody staining showed the same localization in oocytes and embryos as observed with the VBH-1:GFP fusion (Fig. S1a, e, and i). To confirm VBH-1 antibody specificity, *vbh-1(RNAi)* gonads were stained, and showed an absence of protein expression (Fig. S2).

Extruded hermaphrodite and male gonads stained with the VBH-1 antibody showed high levels of VBH-1 expression (Fig. 5a–h). VBH-1 was observed throughout both the hermaphrodite and male gonad. In the male gonad, VBH-1 was observed in primary and secondary spermatocytes but not detected in mature sperm (Fig. 5g). VBH-1 was expressed in P granules throughout the gonad, and also diffusely in the cytoplasm. CGH-1, another DEAD box RNA helicase, is detected in P granules and also in cytoplasmic particles that may correspond to processing bodies (P bodies), structures in which many proteins involved in mRNA decay and translational control are concentrated (Boag *et al.*, 2005; Decker and Parker, 2006; Navarro and Blackwell, 2005; Navarro *et al.*, 2001). VBH-1, however, was not detected in the P-body-like particles (Fig. S1a–l).

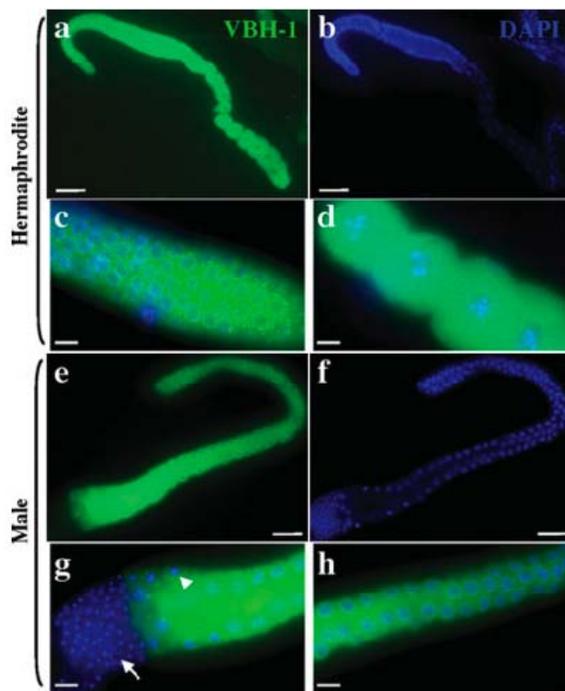
#### VBH-1 Is Important for Fertility

To study VBH-1 function its expression was inhibited using RNAi by feeding following standard protocols (Timmons *et al.*, 2001). F1 animals grown in the presence of bacteria containing an empty plasmid (EP), as control, or full-length *vbh-1* dsRNA were studied. At 20°C, *vbh-1(RNAi)* hermaphrodites had reduced fertility (54.8% of offspring compared to wild type) (Table 1). At higher temperatures (24–26°C), fertility was further reduced in *vbh-1(RNAi)* animals, with only 12% as many viable offspring as wild type (Table 1). These results indicate that VBH-1 is important for hermaphrodite fertility.

Full-length *vbh-1* and Y71H2AM.19 cDNAs do not share regions of similarity that would be sufficient to trigger RNA cross-interference (Parrish *et al.*, 2000). However to exclude the possibility that *vbh-1* RNAi experiments might interfere with another DEAD box RNA helicase particularly Y71H2AM.19, the following control was performed. A ~400 bp cDNA fragment from the *vbh-1* region that showed the lowest homology with Y71H2AM.19, and was located outside of the conserved helicase domain was used to perform RNAi (Fig. S3). Full length VBH-1 and Y71H2AM.19 cDNAs shared 54% overall identity, but within this ~400 bp fragment their identity was only 45% (Fig. S3). RNAi performed using this *vbh-1* fragment showed the same phenotypes as the full-length cDNA, reduced fertility (60%), and some embryonic lethality (1.2%) (Table 1). In addition, *Y71H2AM.19(RNAi)* animals had a pleiotropic phenotype (data not shown and Sonnichsen *et al.*, 2005).



**FIG. 4.** VBH-1 protein localization in embryos and oocytes. Live embryos of 2-cell (a), 4-cell (b), ~100-cell (c) or 1.5-fold (d) stages expressing a GFP:VBH-1 fusion protein. GFP:VBH-1 localization in fixed late 1-cell embryo and oocytes (e and i) immunostained with PGL-1 antibody (f and j) and DAPI (g and k) and examined by fluorescence microscopy. (h and l) Merged images. VBH-1 and PGL-1 overlap in the majority of granules (yellow; arrowhead), but in some granules (particularly in oocytes), they overlap only partially (arrow). White bars represent 10  $\mu\text{m}$ .



These data suggest that the RNA interference phenotype for *vbb-1* is specific to knocking down expression of this gene.

Using Nomarski microscopy many young *vbb-1(RNAi)* hermaphrodites were observed that had stacked oocytes in the proximal region of the gonad (6 and 41% at 20 and 25°C, respectively) (Table 2) (Fig. S4a,b). This phenotype is common in wild-type animals that have exhausted their sperm supply. Under these conditions, animals that are mated with wild-type males are able to resume oocyte maturation and fertility. To determine whether the reduced fertility and oocyte stacking seen in *vbb-1(RNAi)* animals derived from low sperm production, oocytes defects, or both, *vbb-*

**FIG. 5.** VBH-1 protein expression in adult hermaphrodite and male gonads. VBH-1 is expressed in the cytoplasm and P granules (perinuclear foci) throughout the hermaphrodite and male gonad. (a–h) Extruded gonads from 1-day-old wild type hermaphrodites (a–d) or males (e–h) were fixed and stained with affinity-purified rabbit VBH-1 antibody (a and e) and DAPI (b and f), then examined by fluorescence microscopy. (c and d) Details of merged images from the hermaphrodite gonad shown in different focal planes. (g and h) Details of merged images from the male gonad are shown in different focal planes. No VBH-1 staining was visible in the sperm (g). White arrow points toward mature sperm, and white arrowhead points toward primary spermatocytes. White bars represent 50  $\mu\text{m}$  (a, b, e, and f) or 10  $\mu\text{m}$  (c, d, g, and h).

**Table 1**  
Reduced Fertility in *vbh-1(RNAi)* Hermaphrodites and Males

Genotype	Temperature	Total offspring	Embryo lethality	n
Hermaphrodites				
N2 (EP)	20°C	100%	0	34
<i>vbh-1(RNAi)</i>	20°C	54.8%	2.1%	29
<i>vbh-1(RNAi)</i> (400 bp piece)	20°C	60%	1.2%	25
N2 (EP)	24°C	100%	0.1%	14
<i>vbh-1(RNAi)</i>	24°C	17.2%	1.6%	15
N2 (EP)	25°C	100%	0.1%	25
<i>vbh-1(RNAi)</i>	25°C	19.3%	5.3%	28
N2 (EP)	26°C	100%	2.1%	20
<i>vbh-1(RNAi)</i>	26°C	11.7%	23.3%	27
Hermaphrodites crossed with <i>him-8(e1489)</i> or wild type males				
N2(EP) × <i>him-8</i>	20°C	100%	0.1%	18
<i>vbh-1(RNAi)</i> × <i>him-8</i>	20°C	65.1%	1.2%	23
N2(EP) × N2	25°C	100%	0.1%	24
<i>vbh-1(RNAi)</i> × N2	25°C	35.7%	1.8%	23
<i>fog-2(q71)</i> hermaphrodites crossed with EP or <i>vbh-1(RNAi)</i> males				
<i>fog-2(q71)</i> × N2(EP)	25°C	100% (17/18)	0%	18
<i>fog-2(q71)</i> × <i>vbh-1(RNAi)</i>	25°C	52.5 (14/25)	1%	25

To study *vbh-1(RNAi)* animal fertility, hermaphrodites were individually selected as L4 specimens and then transferred to new plates every 24 h over the course of 3 days. Plates were scored for dead embryos and surviving offspring. Embryos not hatching within 24 h after being laid were considered dead. To test *vbh-1(RNAi)* hermaphrodite fertility, we crossed them with 3 *him-8(e1489)* or wild type males for 44 h and scored successful matings. Because males are not abundant within hermaphrodite progeny (1 every 300) in some experiments we used the *him-8(e1489)* strain, whose hermaphrodites produce 30% of male progeny. A successful mating was defined as production of male progeny. Progeny were scored as previously described. To test *vbh-1(RNAi)* male fertility, we crossed three animals with one *fog-2(q71)* hermaphrodite for 44 h. A successful mating was defined as production of embryos. Successful matings are indicated in parenthesis. EP = empty plasmid used as control.

**Table 2**  
*vbh-1(RNAi)* Phenotype in Adult Animals

Genotype	Temperature	n	Wild type gonads	Gonads with stacked oocytes	Gonads with small germ cells
N2 (EP)	20°C	46	100%	0%	0%
<i>vbh-1(RNAi)</i>	20°C	78	88%	6%	6%
N2 (EP)	25°C	100	100%	0%	0%
<i>vbh-1(RNAi)</i>	25°C	137	21%	41%	38%

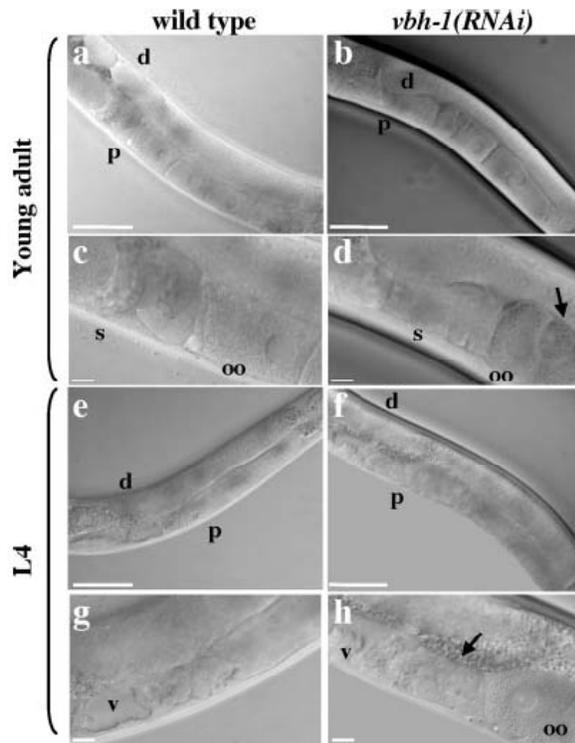
One-day old adults from the indicated background were anesthetized, mounted and observed using Nomarski microscopy to determine their phenotype. EP = empty plasmid used as control.

*1(RNAi)* hermaphrodites were mated with wild-type males. Mating increased the fertility of *vbb-1(RNAi)* hermaphrodites by only 16% compared to unmated animals (Table 1). Ovulation was restored in mated *vbb-1(RNAi)* animals, suggesting that the cause of oocyte accumulation was low sperm production (not shown). These animals continue producing fewer offspring than wild type, indicating that VBH-1 is necessary for both oocyte and sperm function (Table 1).

Besides stacking, no other oocyte defects were detected by Nomarski microscopy in *vbb-1(RNAi)* animals (Fig. 6a-d and S4b and c). Using DAPI staining some stacked *vbb-1(RNAi)* oocytes exhibited an Emo (endomitotic oocytes) phenotype (data not shown). An Emo phenotype is observed when unfertilized oocytes undergo multiple rounds of endomitotic DNA replication, resulting in aberrant polyploidy oocytes (Iwasaki *et al.*, 1996). This phenotype is characteristic of a defect in ovulation, as would be seen if sperm were absent or if the oocytes or sperm were not competent for fertiliza-

tion. Emo oocytes were not observed in *vbb-1(RNAi)* animals that contained sperm or had been mated with wild type animals (data not shown), suggesting that the Emo phenotype observed in *vbb-1(RNAi)* animals is due to insufficient sperm production rather than oocyte or somatic defects.

VBH-1 is associated with P granule components, and is similar to Vasa and the GLH-1/-2/-3/-4 proteins, which are required for Polar or P granule structure, respectively (Breitwieser *et al.*, 1996; Kawasaki *et al.*, 1998). For this reason, the expression pattern of P granule components in *vbb-1(RNAi)* animals was studied to determine if their reduced fertility might derive from P granule abnormalities. No differences in the expression patterns of immunostained *vbb-1(RNAi)* hermaphrodite gonads with antibodies that recognize PGL-1 and GLH-1 were observed (Figs. S5 and S6). This suggested that VBH-1 is not required for P granule structure. Nevertheless, VBH-1 must play a role in oocyte function and/or development because a complete fertility rescue was not observed



**FIG. 6.** *vbh-1(RNAi)* phenotypes observed by Nomarski microscopy. Young adult (a–d) and L4 larval stage (e–h) animals from wild type (empty plasmid as control) (a, c, e, and g) and *vbh-1(RNAi)* (b, d, f, and h) were grown at 25°C (c, d, g, and h). Details of gonads (a, b, e, and f; respectively) are shown. *vbh-1(RNAi)* animals had a defect in sperm production and the spermatheca is nearly empty (d) compared with the wild type (c). In panel d: A black arrow points toward a small germ cell, which presumably is a spermatocyte that did not complete spermatogenesis. (h) An oocyte in the gonad of an L4 animal can be observed, and several germ cells that may be spermatocytes that failed to progress through meiosis are shown (arrow) (note that the vulva is not yet developed, a characteristic of this stage). In wild type animals, oocytes are only produced during adulthood once spermatogenesis is completed. d = distal; p = proximal; s = spermatheca; oo = oocyte; v = vulva. White bars represent 50  $\mu$ m (a, b, e, and f) or 10  $\mu$ m (panels c, d, g, and h). Some pictures were modified using Photoshop CS (Adobe) to erase unused animals that appeared in the picture frame (f and h).

when *vbh-1(RNAi)* hermaphrodites were mated with wild type males (Table 1).

A low percentage of embryonic lethality was observed in *vbh-1(RNAi)* animals, (1.2 and 23.3% at 20 and 26°C) (Table 1). Embryonic lethality decreased after *vbh-1(RNAi)* hermaphrodites were mated with wild-type males. At 25°C, unmated animals generated 5.3% dead embryos; however, after mating this was reduced to 1.8% (Table 1). These results suggest that the embryonic lethality observed in *vbh-1(RNAi)* hermaphrodites is partially due to defects in sperm. However, *vbh-1* might play a role during embryogenesis because some embry-

**Table 3**  
*vbh-1(RNAi)* Hermaphrodites Produce Fewer Sperm Than Wild Type Animals

Genotype	Temperature	n	Gonads with no sperm	Gonads with sperm
N2 (EP)	25°C	20	0%	100% (132)
<i>vbh-1(RNAi)</i>	25°C	15	53%	47% (56)
N2 (EP)	26°C	27	0%	100% (137)
<i>vbh-1(RNAi)</i>	26°C	43	49%	51% (84)

Gonads from young adult hermaphrodites of the indicated background were extruded, fixed and DAPI stained to visualize nuclei. Sperm was counted using fluorescence microscopy. The average spermatid number is indicated in parentheses. EP = empty plasmid used as control.

onic lethality was still observed in the offspring of *vbh-1(RNAi)* hermaphrodites crossed with wild type males.

### VBH-1 Is Important for Spermatogenesis

Fifty percent of *vbh-1(RNAi)* gonads lacked sperm or produced fewer sperm than wild type (50%), and some of these animals had small germ cells in the proximal gonad (6 and 38% at 20 and 23°C, respectively) (Fig. 5c and d and Fig. 6b–d) (Tables 2 and 3). As judged by size, these small germ cells appeared to be in the early stages of spermatogenesis, suggesting that a defect during this process could be the cause of low sperm production in these animals.

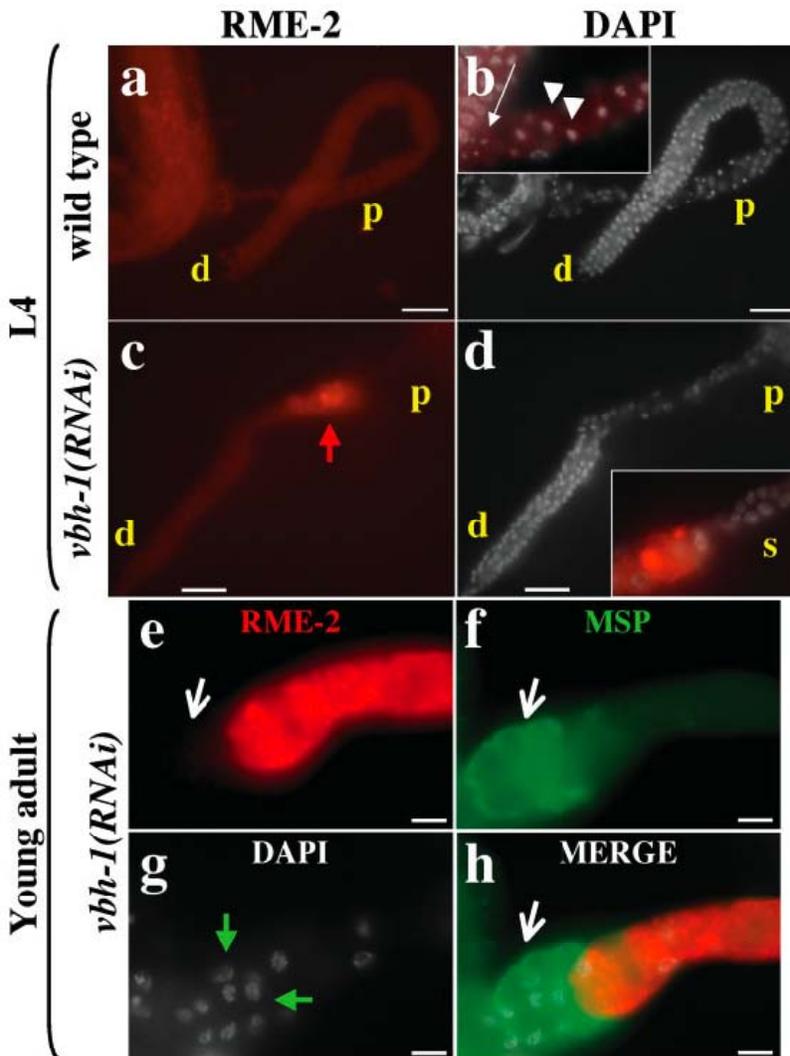
Under normal conditions the first 40 germ cells that enter meiosis differentiate into sperm during the L4 larval stage (Hubbard and Greenstein, 2000). Once sperm are formed, oogenesis begins and continues throughout adulthood (Fig. 1). To test whether any defects occur during spermatogenesis, *vbh-1(RNAi)* animals at L4 stage were studied. At 25°C, oocytes were already present in a small number of L4 *vbh-1(RNAi)* animals in whom spermatogenesis was not yet complete (4%) or in some cases, not even initiated (12%) (Table 4) (Fig. 6e–h). This phenotype was considerably more prominent at 26°C, at which nearly 50% of L4 animals had begun oogenesis without completed spermatogenesis (20%) or even initiated it (28%) (Table 4).

To confirm that oogenesis initiated prematurely in *vbh-1(RNAi)* animals gonads were stained with an oocyte marker, the yolk receptor RME-2. This protein is expressed from early oogenesis through oocyte maturation (Grant and Hirsh, 1999). Wild-type L4 hermaphrodites are not positive for RME-2 staining (Fig. 7a,b); however, L4 *vbh-1(RNAi)* gonads showed RME-2 staining even when no sperm were observed (Fig. 7c,d). Small germ cells observed in the proximal area of young adult *vbh-1(RNAi)* animals were not positive for RME-2 (Fig. 7e,g). These germ cells were positive for the sperm protein MSP, which is expressed in late stages of spermatogenesis and sperm, suggesting that these might be cells that failed to complete spermatogenesis (Fig. 7f). By DAPI staining, these germ cells appeared to be at early stages of meiosis (Fig. 7g). These data shows that VBH-1

**Table 4**  
Production of Oocytes During the L4 Larval Stage in *vbh-1(RNAi)* Animals

Genotype	Temperature	N	Wild type gonads	Few sperm + oocytes	No sperm + oocytes
N2 (EP)	25°C	49	100%	0%	0%
<i>vbh-1(RNAi)</i>	25°C	70	84%	4%	12%
N2 (EP)	26°C	43	100%	0%	0%
<i>vbh-1(RNAi)</i>	26°C	29	52%	20%	28%

Gonads from L4 larval stage animals from the indicated backgrounds were dissected, fixed and stained using RME-2 antibody and DAPI to detect *vbh-1(RNAi)* gonads that have initiated oogenesis prematurely and have formed few or no sperm.



**FIG. 7.** Expression of the yolk receptor protein RME-2 and the sperm marker MSP in the gonad of wild type and *vbh-1(RNAi)* animals. Extruded gonads from wild type (empty plasmid as control) (a and b) and *vbh-1(RNAi)* (c-h) of L4 larva (a-d) or young adults (e-h) grown at 25°C were fixed and stained with a rabbit RME-2 antibody (a, c, and e), MSP antibody (f) or DAPI (b, d, and g). Red arrow (c) shows a group of germ cells that are positive for RME-2. RME-2 is expressed specifically in developing and mature oocytes. *vbh-1(RNAi)* hermaphrodites expressed RME-2 during the L4 larval stage (c and d), whereas wild type larvae did not (a and b). Panels b and d) Small boxes show details of merged images between RME-2 staining (red) and DAPI. The thin arrow points toward spermatids, arrowheads show spermatocytes. (h) Merged image between RME-2 (e), MSP (f) and DAPI staining (g). The white open arrow points toward a group of germ cells that are present between the spermatheca and oocytes, which are positive for the sperm marker MSP, and negative for the oocyte marker RME-2. Presumably these cells are spermatocytes that failed to progress through meiosis during spermatogenesis (green arrows in g). At 25°C, 11% ( $n = 95$ ) of L4 *vbh-1(RNAi)* gonads were RME-2 positive, while at 26°C this phenotype increased to 37% ( $n = 30$ ). d = distal; p = proximal; s = spermatheca. White bars represent 50  $\mu$ M (a-d) or 10  $\mu$ M (e-h).

is important during hermaphrodite development for the continued production of sperm, and for the inhibition of oogenesis, and that in its absence germ cells make the sperm/oocyte switch prematurely.

To test whether *vbh-1(RNAi)* low penetrance in germline functions might be due to functional redundancy

between *vbh-1* and its closest homolog Y71H2AM.19 the following experiments were performed. To bypass the somatic defects seen with *Y71H2AM.19(RNAi)*, in which embryonic and larval development are abnormal, L1 larvae from the somatic RNAi resistant strain *rrf-1(ok589)* were used to perform feeding RNAi experi-

ments at 26°C (Miller *et al.*, 2003; Sijen *et al.*, 2001). *vbb-1(RNAi)* performed in *rrf-1(ok589)* showed the same phenotypes previously observed (data not shown). *rrf-1(ok589)*; *Y71H2AM.19(RNAi)* animals were able to develop into adults that were completely sterile (data not shown) indicating that *Y71H2AM.19* plays a role in germline function. Using Nomarski microscopy and RME-2 immunostaining of L4 larva, no premature sperm/oocyte switch was observed in these animals (data not shown). In contrast, an excess of sperm and small abnormal oocytes were observed in *Y71H2AM.19(RNAi)* gonads. Double RNAi in *vbb-1* and *Y71H2AM.19* produced completely sterile animals. A premature sperm/oocyte switch was observed in only 42% of these double RNAi animals (similar to *vbb-1(RNAi)* phenotype, Table 4), which also showed abnormal oocytes (data not shown). This premature sperm/oocyte switch appeared to compensate for excess sperm otherwise seen after *Y71H2AM.19(RNAi)*. These apparently opposing effects of *vbb-1* and *Y71H2AM.19* RNAi suggest that these genes are not functionally redundant.

To test whether VBH-1 plays a role in male spermatogenesis, *vbb-1(RNAi)* males were mated with *fog-2(q71)* females. *fog-2(q71)* mutant animals are unable to specify male germ cells in hermaphrodites and therefore they produce only oocytes and become sterile; when mated with wild type or *fog-2* males, they are able to produce offspring (Schedl and Kimble, 1988). *fog-2(q71)* females mated with *vbb-1(RNAi)* males showed reduced fertility and produced only 52.5% as many viable offspring compared with wild-type males (Table 1). Also upon mating with *vbb-1(RNAi)* males, half of the *fog-2(q71)* animals failed to produce offspring (Table 1). These data suggest that VBH-1 is also important for spermatogenesis in males.

P granule structure was examined in the *vbb-1(RNAi)* male gonad and appeared normal, suggesting that aberrant P granules were not the cause of male infertility (Figs. S5 and S6). Mutants in genes that control the sperm/oocyte switch sometimes show a feminization of the soma (Schedl *et al.*, 1989). However, feminization of the *vbb-1(RNAi)* male germline was not observed under Nomarski microscopy or DAPI staining (not shown and Fig. 8b), suggesting that VBH-1 function might be restricted to the germline. By DAPI staining, *vbb-1(RNAi)* males produced normal numbers of spermatozooids, which did not present any evident defects (Fig. 8a-d). Late stages of spermatogenesis also appeared unaltered in *vbb-1(RNAi)* animals and their spermatozooids moved normally (Fig. 1c and Fig. 8e-l). Although *vbb-1(RNAi)* male gonads and sperm appeared normal, VBH-1 must play some role in male germline function because *vbb-1(RNAi)* males show reduced fertility.

## DISCUSSION

Previous studies have shown that DEAD box RNA helicases, such as Vasa and Belle among others, are important for germline function in *Drosophila* and many other

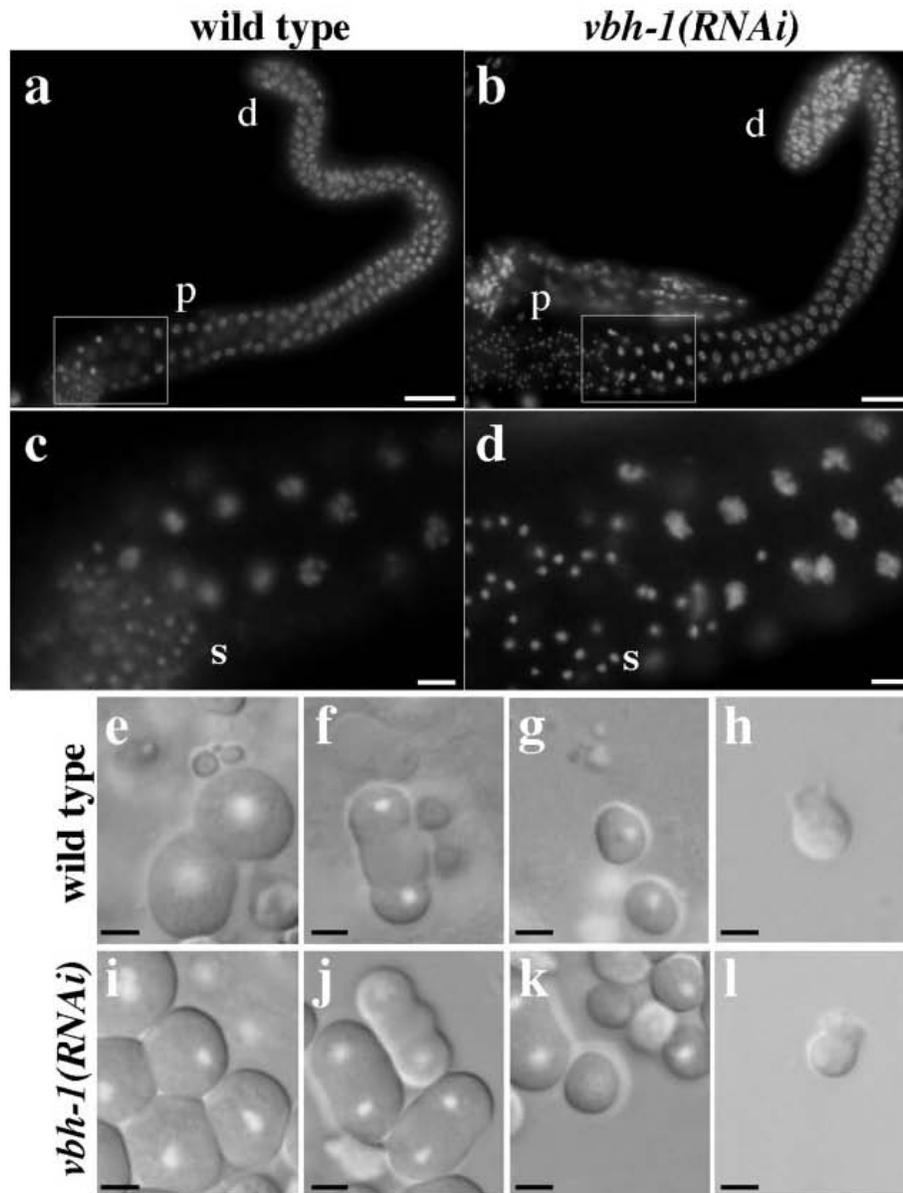
organisms (Hay *et al.*, 1988; Johnstone *et al.*, 2005; Lasko and Ashburner, 1988). Here we have shown that VBH-1, a DEAD box RNA helicase similar to both Vasa and Belle, is also required for germline function in *C. elegans*. VBH-1 is expressed specifically in the hermaphrodite and male germline. During early embryogenesis, VBH-1 is expressed in the cytoplasm of all blastomeres, but is also associated with P granules in germ cells. VBH-1 continues to be associated with P granules in the adult germline. Through RNAi studies, we found that VBH-1 is important for gamete formation and function, and embryogenesis. When maintained at 26°C, nearly 50% of *vbb-1(RNAi)* hermaphrodites were unable to produce sperm and in some cases the few germ cells that were able to enter spermatogenesis failed to progress through meiosis. Half of the *vbb-1(RNAi)* hermaphrodites made fewer sperm than wild type. *vbb-1(RNAi)* hermaphrodites also switched from spermatogenesis to oogenesis prematurely, suggesting that VBH-1 is important for the sperm/oocyte switch.

### VBH-1 Is a Germline-specific DEAD box RNA Helicase

The *Drosophila* protein Vasa is a DEAD box RNA helicase that is conserved and expressed specifically in the germline of several organisms; therefore, it is commonly used as a germ cell marker. To date, the only known Vasa homologs in *C. elegans* have been the GLH-1/-2/-3/-4 proteins (Kuznicki *et al.*, 2000). These proteins are germline-specific and are necessary for gamete formation and important for maintaining P granule structure (Gruidl *et al.*, 1996; Kawasaki *et al.*, 1998; Kuznicki *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2002). It was confirmed by means of phylogenetic analysis that the GLH-1/-2/-3/-4 proteins are closely related with *Drosophila* Vasa. However, this group of proteins has a longer amino-terminus, and they also possess several CCHC zinc finger domains that are not present in Vasa proteins from other species (Kuznicki *et al.*, 2000).

Here we show that while *C. elegans* VBH-1 is closely related with Vasa (35% identity), it is more similar to Belle (39% identity). Despite their similarity, VBH-1 and Belle differ in some aspects: (1) VBH-1 lacks some putative domains that were previously described in the Belle group (Johnstone *et al.*, 2005), including a leucine-rich nuclear export signal that is functional in the An3 protein from *Xenopus* (Askjaer *et al.*, 1999), and a second domain of unknown function; (2) Belle has Glycine-rich regions in its amino- and carboxy-terminal regions, whereas VBH-1 only possesses one glycine-rich region near its carboxy-terminus. Glycine-rich domains may represent RNA binding sites, but also mediate protein-protein interactions (Cartegni *et al.*, 1996).

A second protein closely related to VBH-1 is present in *C. elegans* (*Y71H2AM.19*). RNAi studies have shown that lack of *Y71H2AM.19* produce a pleiotropic effect and an embryonic lethal phenotype (data not shown and Sonnichsen *et al.*, 2005). This suggests that the func-



**FIG. 8.** Germ cell nuclear morphology in wild type and *vbh-1(RNAi)* males gonads. Extruded gonads from wild type (empty plasmid as control) (a and c) and *vbh-1(RNAi)* adult males (panels b and d) grown at 25 °C were fixed and stained with DAPI. Panels c and d: A detail of the proximal gonad is shown. (e–l) Germ cells undergoing spermatogenesis were obtained from wild type (e–h) and *vbh-1(RNAi)* males (i–l), and stained with DAPI. Merged images from Nomarski and fluorescence microscopy are shown. (e and i) primary spermatocytes; (f and j) secondary spermatocytes, some of which were budding from the residual body; (g and k) spermatids; (h and l) spermatocytes that were activated using pronase following standard protocols. No evident nuclear defects are observed in *vbh-1(RNAi)* male gonads or during spermatogenesis. d = distal; p = proximal; s = spermatids. Scale bars represent 50  $\mu\text{m}$  (a–d) or 10  $\mu\text{m}$  (e–l).

tions of Y71H2AM.19, in contrast to VBH-1, might not be restricted to the germline. Although Y71H2AM.19 is also required in the germline, it was also observed that is not functionally redundant with *vbb-1*.

#### VBH-1 Plays a Role in the Germline

Our RNAi experiments indicated that *vbb-1* is important for gamete function and embryogenesis. *vbb-1(RNAi)* dead embryos did not arrest at a particular

stage, but were able to develop until late stages of embryogenesis (1.5- through 3-fold stage) (not shown). One of the causes of this embryonic lethality was defective sperm, because embryo viability slightly increased when *vbb-1(RNAi)* hermaphrodites were crossed with wild type males. In addition, *fog-2(q71)* hermaphrodites crossed with *vbb-1(RNAi)* males showed 1% embryo lethality. Embryonic lethality due to defective sperm has been previously observed in a *C. elegans* mutant in gene *puf-8*, which encodes a Pumilio homolog (Subramaniam and Seydoux, 2003). Although embryonic lethality was slightly restored when *vbb-1(RNAi)* hermaphrodites were crossed with wild type males, a small percentage of dead embryos was still observed (1.8%) suggesting that VBH-1 may also play a role during embryogenesis.

The strongest *vbb-1(RNAi)* phenotype was observed at high temperatures (25–26°C), as is seen with many germline genes (Gruidl *et al.*, 1996; Kawasaki *et al.*, 2004). The GLH-1/2/3/4 proteins from *C. elegans* and Vasa from *Drosophila* are required to maintain P granule and polar granule structure, respectively (Breitwieser *et al.*, 1996; Kawasaki *et al.*, 1998). Although VBH-1 is very similar to these proteins, it is not required for the adult germline P granule structure. *vbb-1(RNAi)* oocytes also did not show an evident defect under Nomarski microscopy or DAPI staining, and no differences in physiological germ cell apoptosis were observed in *vbb-1(RNAi)* animals (data not shown). Despite these observations, VBH-1 must play a role in oocyte function because full recovery of *vbb-1(RNAi)* offspring production after mating *vbb-1(RNAi)* animals with wild-type males was not observed. In *Drosophila vasa* and *belle* null mutants, oogenesis initially proceeds normally, but later oocytes arrest and egg chambers degenerate, suggesting that these proteins might have related functions in the female germline (Johnstone *et al.*, 2005; Styhler *et al.*, 1998).

### VBH-1 Has a Role in Spermatogenesis

Nearly half of *vbb-1(RNAi)* hermaphrodites were unable to form sperm while the remainder produced fewer sperm than wild type. Some *vbb-1(RNAi)* animals also presented products of early stages of spermatogenesis in the proximal gonad, suggesting that VBH-1 is important for completing spermatogenesis. Interestingly, although VBH-1 was not detected in the nucleus, this protein was recently isolated in a screen for proteins that associated with germ cell chromatin during spermatogenesis (Chu *et al.*, 2006), suggesting that VBH-1 might play a role during this process.

*belle* mutants are male sterile and their germ cells might have defects in chromosome segregation and cytokinesis (Johnstone *et al.*, 2005). Other members of the Belle family also play important roles in spermatogenesis. In humans, lack of DDX3Y results in sterility due to low sperm production and in some cases a complete absence of sperm has been observed (Ditton *et al.*, 2004; Foresta *et al.*, 2000). In *Drosophila*, Vasa is not required

for spermatogenesis; nonetheless, MVH, the mouse Vasa homolog, is required for spermatogenesis (Tanaka *et al.*, 2000). Males homozygous for a mutation of *Mvh* produce no sperm; pre-meiotic germ cells cease differentiation before the zygotene stage and undergo apoptosis. These observations suggest that VBH-1 and its homologs are important for male germline function.

### VBH-1 Is Important to Prevent an Early Switch to Oogenesis

Almost 50% of *vbb-1(RNAi)* hermaphrodites initiated oogenesis prematurely. The pathway that regulates the sperm/oocyte switch is well established in *C. elegans* (Ellis and Schedl, 2006; Kuwabara and Perry, 2001). One of the mechanisms that controls the sperm/oocyte switch is regulated at the mRNA level (Ellis and Schedl, 2006; Kuwabara and Perry, 2001; Puoti *et al.*, 2001). *tra-2* mRNA must be negatively regulated to allow hermaphrodite spermatogenesis; subsequently, *fem-3* mRNA is also negatively regulated to permit the switch to oogenesis (Goodwin *et al.*, 1993; Zhang *et al.*, 1997). The Belle homolog in yeast, Ded1p, is an essential protein that has been implicated in regulation of general translation initiation (Chuang *et al.*, 1997; de la Cruz *et al.*, 1997). Vasa interacts directly with translation factor eIF5B/dIF2 to promote mRNA translation, and this interaction is essential for many of its developmental functions and especially for accumulation of Gurken protein (Carrera *et al.*, 2000; Johnstone and Lasko, 2004). It has been shown that a proline residue within the carboxyl-terminal domain of Vasa is required to interact with eIF5B (Johnstone and Lasko, 2004). This proline is present in VBH-1 (not shown), consistent with the idea that it might be involved in regulating translation of a factor that controls the sperm/oocyte switch.

In summary, VBH-1 is expressed specifically in the *C. elegans* germline, is important for embryogenesis, gamete function and to prevent an early sperm/oocyte switch in the hermaphrodite gonad. VBH-1 also belongs to a conserved group of proteins whose role is important for germline function in several organisms.

## MATERIALS AND METHODS

### Strains

Maintenance and genetic manipulation of *C. elegans* were carried out according to standard procedures. *C. elegans* variety Bristol, strain N2, was used as the wild type. The following strains have been described previously: *fem-1(bc17)*, *fem-3(q20gf)*, *glp-4(bn2)*, *bim-8(e1489)*, *fog-2(q71)* (Riddle *et al.*, 1997, or in the references therein), and *rrf-1(ok589)* (Sijen *et al.*, 2001).

### Sequence Comparison

To build the phylogenetic tree, a multiple sequence protein alignment was made using the clustalw program and a Blosum 30 matrix (Henikoff and Henikoff, 1992). The resulting alignment was used to build the phyloge-

netic tree with the MacVector 7.2.3 software (Accelrys Inc. CA) using the "neighbor-joining" method with uncorrected p-distance and random tie breaking. The tree's confidence was tested using bootstrapping analysis (1,000 replicates). As an outer group the eIF4A protein, isoform A from *Drosophila* was used (NP\_723137). The GLH-1/-2/-3 proteins from *C. elegans* were also included (NP\_491963, NP\_491876 and NP\_491681, respectively). The Vasa proteins from *Drosophila* (NP\_723899); *Ciona intestinalis* (Ensembl ENSCINP00000028907); Zebrafish (NP\_571132), and Mouse (Ensembl ENSMUSP00000096769). The VBH-1 protein from *C. elegans* isoform c (AAU20831), which is the largest, was used for the analysis. The *C. elegans* protein Y71H2AM.19 (NP\_497615). The Belle proteins from *Drosophila* (NP\_536783); *Ciona intestinalis* (Ensembl ENSCINP00000015656); Zebrafish (NP\_571016), and Mouse (Ensembl ENSMUSP00000088729).

### Northern Blot Analysis

To prepare RNA, the *fem-1(bc17)*, *fem-3(q20gf)*, *glp-4(bn2)*, and N2 strains were grown at 15°C for 5 days. Embryos were extracted by bleaching and synchronized following standard procedures; then, after 3 days at 25°C the animals were harvested as adults. Poly(A)<sup>+</sup> RNA was prepared from total RNA using Oligotex mRNA kit (Qiagen). Poly(A)<sup>+</sup> RNA was fractionated in a formaldehyde gel, blotted onto Hybond-N membranes (Amersham), and then hybridized with <sup>32</sup>P-labeled probes. A full-length *vbb-1* cDNA probe (1.9 kb) was isolated digesting plasmid pSZ2 with EcoRI (see below). As loading control, a probe of a ~0.9 kb fragment of actin cDNA was made (gene *act-4*; wormbase ID number: M03F4.2) digesting a clone from the *C. elegans* ORF-RNAi library (Open Biosystems) with BglII and EcoRV. Expression levels were compared by phosphoimaging (Molecular Dynamics).

### Transgene Construction

Gateway cloning (Invitrogen) was used to generate a VBH-1:GFP fusion protein. Full-length VBH-1 isoform B coding sequence was PCR-amplified from cDNA (yk624f9) and cloned into pDONR201. This construct was recombined into pID3.01B (for an N-terminal GFP fusion protein) (Stitzel *et al.*, 2006). The resulting plasmid contained the *pie-1* promoter, a fusion between GFP and *vbb-1* and the *pie-1* 3'UTR region. This construct was introduced into *C. elegans* by means of biolistic transformation (Praitis *et al.*, 2001).

### Antibody Production and Immunofluorescent Staining

Two polyclonal rabbit antisera were raised (Cocalico Biologicals) against a peptide corresponding to VBH-1 isoform B residues 581–616 plus an amino terminal cysteine (NH<sub>2</sub>-CSSLSSTNSGGGGGFSGPRRGGFNSGMNR-COOH). These antisera (1 and 2) stained gonads similarly, and the corresponding preimmune sera each

detected only a light diffuse background (not shown). No staining of either gonads or embryos was observed after affinity purified VBH-1 antisera had been depleted of specific reactivity by VBH-1 peptide (Sulfolink, Pierce). Affinity purified sera 1 and 2 were indistinguishable in their staining (not shown).

Staining with VBH-1 antibody was performed as described (Navarro *et al.*, 2001) but with fixing gonads or embryos for 20 min. Briefly, extruded gonads were frozen in liquid nitrogen and freeze-cracked, then fixed in 100% methanol at –20°C for 1 min, followed by treatment with 1× PBS, 0.08 M Hepes (pH 6.9), 1.6 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.8 mM EGTA, 3.7% paraformaldehyde for 20 min at room temperature. After washing and blocking, samples were incubated with a 1:1,000 dilution of an affinity purified rabbit VBH-1 antiserum. Antibody dilutions for reagents used in this work are described in parenthesis and methods for immunostaining are described in the following references: PGL-1 (1:10,000) (Kawasaki *et al.*, 1998), GLH-1 (1:1,000) (Kawasaki *et al.*, 2004), CGH-1 (1:100) (Navarro *et al.*, 2001), RME-2 (1:50) (Grant and Hirsh, 1999) and MSP (1:200) (Developmental Studies Hybridoma Bank) (Rose *et al.*, 1997). The following secondary antibodies were used; an alexa fluor 488 goat anti-rabbit IgG (H+L) at 1:50 (Molecular Probes); a Cy3-conjugated affinity purified goat anti-rabbit IgG (H+L) at 1:100 (Jackson); a Cy3-conjugated affinity purified donkey anti-rat IgG (H+L) (Jackson) at 1:100, and a fluorescein (FITC)-conjugated affinity purified goat anti-mouse IgG (H+L) (Jackson) at 1:100. A 1 ng/μl final concentration of DAPI was added during the final antibody incubation for DNA visualization. Images were obtained on a Nikon Eclipse E600 microscope equipped with an AxioCam digital camera (Zeiss) and were subsequently, processed in Photoshop CS (Adobe).

### Western Blot Analysis

Total protein was isolated from the *fem-1(bc17)*, *fem-3(q20gf)*, *glp-4(bn2)* and N2 strains grown under restricted conditions (see the Northern blot analysis section). Adult animals were collected and washed four times with PBS buffer and finally resuspended in 0.5% TNETE buffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.5% Triton, and 1 mM EDTA in the presence of the following protease and phosphatase inhibitors: 25 mM NaF; 1 mM NaPPi; 1 mM NaVO<sub>4</sub>; 1 mM PMSF; 0.1 mg/ml trypsin inhibitor; 0.1 mg/ml pepstatin A; 0.1 mg/ml leupeptin; 0.1 mg/ml antipain; 0.1 mg/ml benzamidin, and 0.1 mg/ml beta-glycerophosphate). Animals were immediately frozen or sonicated in an UltraSonic Processor (Cole Parmer) to extract protein. Proteins were fractionated on a 7.5% polyacrylamide gel following standard procedures. Gel was blotted onto Immobilon-P transfer membranes (Millipore), and standard Western blot procedures were used. Affinity purified VBH-1 antibody was diluted 1:1,000 and incubated overnight. A rabbit or mouse secondary antibody from Supersignal West Dura kit (Pierce) was utilized and reaction was revealed fol-

lowing manufacturer instructions. For Western blot analysis of *vbb-1(RNAi)* animals and its respective control, 100 adult animals grown at 25°C were collected and washed in PBS; PBS was later exchanged for loading buffer. To extract protein, samples were boiled for 5 min, spun for 1 min at 13,000 rpm, and supernatant was loaded into 7.5% polyacrylamide gels, this followed by Western blotting. As loading control, commercial antibodies against  $\alpha$ -tubulin (1:500) (Sigma; T9026) or actin (1:500) (Santa Cruz Biotechnologies; sc-10731) were used.

#### RNAi Studies

To study *vbb-1* function, RNA interference by feeding (RNAi) was used (Timmons *et al.*, 2001). To clone *vbb-1* into the feeding vector (pPD129.36), the following primers were utilized: (1) 5'-GCGAATTCATGAACACACAA-TATTATGC-3' and (2) 5'-CGGAATTCCTTAAGCTTGTG-GAGCTTGC-3'. The full-length *vbb-1* isoform b containing 1,922 base pairs of *vbb-1* was isolated from the *C. elegans* cDNA clone yk624f9 (courtesy of Dr. Yuji Kohara) by PCR. The *vbb-1* product was digested with EcoRI, cloned into the feeding vector, and the resulting plasmid was transformed into the *Escherichia coli* strain HT115 (pSZ2). A fragment containing the first ~400 base pairs from *vbb-1* was also isolated from clone yk624f9 by PCR and cloned into the feeding vector as previously described (pSZ1). *vbb-1* fragment was clone using primer 1 (see above) and primer 3) 5'-CGGAA-TTCTCTCCATCACAGCCGGCCC-3'.

To make RNAi in gene Y71H2AM.19, a fragment of ~1,600 bp was isolated by PCR using genomic DNA. This fragment was digested with enzymes SpeI and XhoI and cloned into the feeding vector. This fragment represents the first 400 bp of the Y71H2AM.19 coding region and is shown in Figure S3. Primers used were: (1) 5'-GACTAGTATGGAAAGTAACCAATCG-3' and (2) 5'-CCGC-TCGAGGGAAAGCTGTCCGGAG-3'.

To induce production of double stranded RNA in feeding bacteria, standard procedures were followed (Timmons *et al.*, 2001). Briefly, bacterial cultures were allowed to grow to optical density (OD) 0.6 at 37°C; after reaching this density, 0.4 mM IPTG was added to the cultures and incubation continued for 2 h at the same temperature. Bacteria were collected and resuspended (1 ml for each 10 ml of original culture) in LB containing antibiotics (50  $\mu$ g/ml ampicillin and 12.5  $\mu$ g/ml tetracycline), 0.4 mM IPTG, and 25% glycerol. One milliliter aliquots were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -70°C. When needed for experiments, aliquots were thawed, centrifuged, and the pellets were resuspended in 150  $\mu$ l LB containing antibiotics and IPTG. Fifty or 10 ml of bacteria were seeded onto each 60- or 30-mm plate of NGM containing antibiotics, respectively. Plates were stored at 4°C for up to 1 week. To perform RNAi in two genes at the same time, 25  $\mu$ l of each induced bacteria were mix, and seeded onto 60-mm plate of NGM containing antibiotics.

#### Spermatid Activation Assay

For spermatid activation, male gonads were dissected to liberate sperm in a sperm-medium salt buffer containing 200  $\mu$ g/ml of pronase (SIGMA) and immediately observed under the microscope for pseudopod formation, which occurs within minutes (L'Hernault and Roberts, 1995).

#### ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Sergio Zonszein and Marta Castro-Manreza for technical support, and Dr. Margaret Brunner for editing this manuscript. We thank Dr. Geraldine Seydoux for reagents, advice, and critically reading the manuscript. We are grateful to Dr. Jennifer Schisa for kindly editing and critically reading the manuscript. We also would like to thank Yuji Kohara, Susan Strome, Caroline Spike, and Barth Grant for kindly providing reagents. Strains were provided by the *C. elegans* Genetics Center, which is supported by NIH's National Center for Genetics Resources. The MSP monoclonal antibody developed by David Greenstein was obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank.

#### LITERATURE CITED

- Andersen CB, Ballut L, Johansen JS, Chamieh H, Nielsen KH, Oliveira CL, Pedersen JS, Seraphin B, Le Hir H, Andersen GR. 2006. Structure of the exon junction core complex with a trapped DEAD-box ATPase bound to RNA. *Science* 313:1968-1972.
- Askjaer P, Bachi A, Wilm M, Bischoff FR, Weeks DL, Ogniewski V, Ohno M, Niehrs C, Kjems J, Mattaj JW, Fornerod M. 1999. RanGTP-regulated interactions of CRM1 with nucleoporins and a shuttling DEAD-box helicase. *Mol Cell Biol* 19:6276-6285.
- Barton MK, Schedl TB, Kimble J. 1987. Gain-of-function mutations of *fem-3*, a *sex*-determination gene in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 115:107-119.
- Beanan MJ, Strome S. 1992. Characterization of a germ-line proliferation mutation in *C. elegans*. *Development* 116:755-766.
- Boag PR, Nakamura A, Blackwell TK. 2005. A conserved RNA-protein complex component involved in physiological germline apoptosis regulation in *C. elegans*. *Development* 132:4975-4986.
- Breitwieser W, Markussen FH, Horstmann H, Ephrussi A. 1996. Oskar protein interaction with vasa represents an essential step in polar granule assembly. *Genes Dev* 10:2179-2188.
- Carcera P, Johnstone O, Nakamura A, Casanova J, Jackle H, Lasko P. 2000. Vasa mediates translation through interaction with a *Drosophila* yIF2 homolog. *Mol Cell* 5:181-187.
- Cartegni L, Maconi M, Morandi E, Cobiainchi F, Riva S, Biamonti G. 1996. hnRNP A1 selectively interacts through its Gly-rich domain with different RNA-binding proteins. *J Mol Biol* 259:337-348.
- Chu DS, Liu H, Nix P, Wu TF, Ralston EJ, Yates JR, III, Meyer BJ. 2006. Sperm chromatin proteomics identifies evolutionarily conserved fertility factors. *Nature* 443:101-105.
- Chuang RY, Weaver PL, Liu Z, Chang TH. 1997. Requirement of the DEAD-box protein *ded1p* for messenger RNA translation. *Science* 275:1468-1471.
- de la Cruz J, Iost I, Kressler D, Linder P. 1997. The p20 and Ded1 proteins have antagonistic roles in eIF4E-dependent translation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:5201-5206.
- Decker CJ, Parker R. 2006. CAR-1 and trailer hitch: Driving mRNP granule function at the ER? *J Cell Biol* 173:159-163.
- Ditton HJ, Zimmer J, Kamp C, Rajpert-De Meys E, Vogt PH. 2004. The AZFa gene DBY (DDX3Y) is widely transcribed but the protein is limited to the male germ cells by translation control. *Hum Mol Genet* 13:2333-2341.

- Ellis R, Schedl T. 2006. Sex-determination in the germline. In: The *C. elegans* Research Community, editor. WormBook. p doi/10.1895/wormbook.1891.1821, <http://www.wormbook.org>.
- Foresta C, Ferlin A, Moro E. 2000. Deletion and expression analysis of AZFa genes on the human Y chromosome revealed a major role for DBY in male infertility. *Hum Mol Genet* 9:1161-1169.
- Goodwin EB, Okkema PG, Evans TC, Kimble J. 1993. Translational regulation of tra-2 by its 3' untranslated region controls sexual identity in *C. elegans*. *Cell* 75:329-339.
- Grant B, Hirsh D. 1999. Receptor-mediated endocytosis in the *Caenorhabditis elegans* oocyte. *Mol Biol Cell* 10:4311-4326.
- Gruidl ME, Smith PA, Kuznicki KA, McCrone JS, Kirchner J, Rousell DL, Strome S, Bennett KL. 1996. Multiple potential germ-line helicases are components of the germ-line-specific P granules of *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:13837-13842.
- Hay B, Jan LY, Jan YN. 1988. A protein component of Drosophila polar granules is encoded by vasa and has extensive sequence similarity to ATP-dependent helicases. *Cell* 55:577-587.
- Henikoff S, Henikoff JG. 1992. Amino acid substitution matrices from protein blocks. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:10915-10919.
- Hubbard EJ, Greenstein D. 2000. The *Caenorhabditis elegans* gonad: A test tube for cell and developmental biology. *Dev Dyn* 218:2-22.
- Iost I, Dreyfus M, Linder P. 1999. Ded1p, a DEAD-box protein required for translation initiation in *Saccharomyces cerevisiae*, is an RNA helicase. *J Biol Chem* 274:17677-17683.
- Iwasaki K, McCarter J, Francis R, Schedl T. 1996. emo-1, a *Caenorhabditis elegans* Sec61p gamma homologue, is required for oocyte development and ovulation. *J Cell Biol* 134:699-714.
- Johnstone O, Deuring R, Bock R, Linder P, Fuller MT, Lasko P. 2005. Belle is a Drosophila DEAD-box protein required for viability and in the germ line. *Dev Biol* 277:92-101.
- Johnstone O, Lasko P. 2004. Interaction with eIF5B is essential for vasa function during development. *Development* 131:4167-4178.
- Kawasaki I, Amiri A, Fan Y, Meyer N, Dunkelbarger S, Motohashi T, Karashima T, Bossinger O, Strome S. 2004. The PGL family proteins associate with germ granules and function redundantly in *Caenorhabditis elegans* germline development. *Genetics* 167:645-661.
- Kawasaki I, Shim YH, Kirchner J, Kaminker J, Wood WB, Strome S. 1998. PGL-1, a predicted RNA-binding component of germ granules, is essential for fertility in *C. elegans*. *Cell* 94:635-645.
- Kimble J, Edgar L, Hirsh D. 1984. Specification of male development in *Caenorhabditis elegans*: The fem genes. *Dev Biol* 105:234-239.
- Kuwabara PE, Perry MD. 2001. It ain't over till it's over: Germline sex determination in *C. elegans*. *Bioessays* 23:596-604.
- Kuznicki KA, Smith PA, Leung-Chiu WM, Estevez AO, Scott HC, Bennett KL. 2000. Combinatorial RNA interference indicates GLH-4 can compensate for GLH-1; these two P granule components are critical for fertility in *C. elegans*. *Development* 127:2907-2916.
- L'Hemault SW, Roberts TM. 1995. Cell biology of nematode sperm. *Methods Cell Biol* 48:273-301.
- Lasko P, Ashburner M. 1988. The product of the Drosophila gene vasa is very similar to eukaryotic initiation factor-4A. *Nature* 335:611-617.
- Liang I, Diehl-Jones W, Lasko P. 1994. Localization of vasa protein to the Drosophila pole plasm is independent of its RNA-binding and helicase activities. *Development* 120:1201-1211.
- Linder P. 2006. Dead-box proteins: A family affair—Active and passive players in RNP-remodeling. *Nucleic Acids Res* 34:4168-4180.
- Miller MA, Ruest PJ, Kosinski M, Hanks SK, Greenstein D. 2003. An Eph receptor sperm-sensing control mechanism for oocyte meiotic maturation in *Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev* 17:187-200.
- Navarro RE, Blackwell TK. 2005. Requirement for P granules and meiosis for accumulation of the germline RNA helicase CGH-1. *Genesis* 42:172-180.
- Navarro RE, Shim EY, Kohara Y, Singson A, Blackwell TK. 2001. cgh-1, a conserved predicted RNA helicase required for gametogenesis and protection from physiological germline apoptosis in *C. elegans*. *Development* 128:3221-3232.
- Parrish S, Fleenor J, Xu S, Mello C, Fire A. 2000. Functional anatomy of a dsRNA trigger: Differential requirement for the two trigger strands in RNA interference. *Mol Cell* 6:1077-1087.
- Praitis V, Casey E, Collar D, Austin J. 2001. Creation of low-copy integrated transgenic lines in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 157:1217-1226.
- Puoti A, Pugnale P, Belfiore M, Schlappe AC, Saudan Z. 2001. RNA and sex determination in *Caenorhabditis elegans*. Post-transcriptional regulation of the sex-determining tra-2 and fem-3 mRNAs in the *Caenorhabditis elegans* hermaphrodite. *EMBO Rep* 2:899-904.
- Riddle DL, Blumenthal T, Meyer BJ, Priess JR, editors. 1997. *C. elegans* II. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Rose KL, Winfrey VP, Hoffman LH, Hall DH, Furuta T, Greenstein D. 1997. The POU gene ceh-18 promotes gonadal sheath cell differentiation and function required for meiotic maturation and ovulation in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 192:59-77.
- Rousell DL, Bennett KL. 1993. glh-1, a germ-line putative RNA helicase from *Caenorhabditis*, has four zinc fingers. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:9300-9304.
- Schedl T. 1997. Developmental genetics of the germ line. In: Riddle DL, Blumenthal T, Meyer BJ, Priess JR, editors. *C. elegans* II. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Press. pp 241-170.
- Schedl T, Graham PL, Barton MK, Kimble J. 1989. Analysis of the role of tra-1 in germline sex determination in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 123:755-769.
- Schedl T, Kimble J. 1988. fog-2, a germ-line-specific sex determination gene required for hermaphrodite spermatogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 119:43-61.
- Schubbach T, Wieschaus E. 1986. Germline autonomy of maternal-effect mutations altering the embryonic body pattern of Drosophila. *Dev Biol* 113:443-448.
- Sijen T, Fleenor J, Simmer F, Thijssen KL, Parrish S, Timmons L, Plasterk RH, Fire A. 2001. On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. *Cell* 107:465-476.
- Smith P, Leung-Chiu WM, Montgomery R, Orsborn A, Kuznicki K, Gressman-Coberly E, Mutapic L, Bennett K. 2002. The GLH proteins, *Caenorhabditis elegans* P granule components, associate with CSN-5 and KGB-1, proteins necessary for fertility, and with ZYX-1, a predicted cytoskeletal protein. *Dev Biol* 251:333-347.
- Sonnichsen B, Koski LB, Walsh A, Marschall P, Neumann B, Brehm M, Alleaume AM, Artelt J, Bettencourt P, Cassin E, Hewitson M, Holz C, Khan M, Lazik S, Martin C, Nitzsche B, Ruer M, Stamford J, Winzi M, Heinkel R, Roder M, Finell J, Hantsch H, Jones SJ, Jones M, Piano F, Gunsalus KC, Oegema K, Gonczy P, Coulson A, Hyman AA, Echeverri CJ. 2005. Full-genome RNAi profiling of early embryogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 434:462-469.
- Stitzel ML, Pellettieri J, Seydoux G. 2006. The *C. elegans* DYRK kinase MBK-2 marks oocyte proteins for degradation in response to meiotic maturation. *Curr Biol* 16:56-62.
- Styhler S, Nakamura A, Swan A, Suter B, Lasko P. 1998. vasa is required for GURKEN accumulation in the oocyte, and is involved in oocyte differentiation and germline cyst development. *Development* 125:1569-1578.
- Subramaniam K, Seydoux G. 2003. Dedifferentiation of primary spermatocytes into germ cell tumors in *C. elegans* lacking the pumilio-like protein PUF-8. *Curr Biol* 13:134-139.
- Tanaka SS, Toyooka Y, Akasu R, Katoh-Fukui Y, Nakahara Y, Suzuki R, Yokoyama M, Noce T. 2000. The mouse homolog of Drosophila vasa is required for the development of male germ cells. *Genes Dev* 14:841-853.
- Timmons L, Court DL, Fire A. 2001. Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Gene* 263:103-112.
- Zhang B, Gallegos M, Puoti A, Durkin E, Fields S, Kimble J, Wickens MP. 1997. A conserved RNA-binding protein that regulates sexual fates in the *C. elegans* hermaphrodite germ line. *Nature* 390:477-484.