



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

**La proteína de unión a RNA TIAR-1 regula la respuesta
al estrés de las células germinales del nematodo
*Caenorhabditis elegans***

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

CARLOS GIOVANNI SILVA GARCÍA

TUTORA PRINCIPAL

Dra. Rosa Estela Navarro González
Instituto de Fisiología Celular

COMITÉ TUTOR

Dr. Jesus Aguirre Linares
Instituto de Fisiología Celular

Dr. Jesús Chimal Monroy
Instituto de Investigaciones Biomédicas

MÉXICO, D.F., DICIEMBRE 2013



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.

A mi familia
mi esposa, Laura
mis papas, Mary y Gerardo
mi hermano, Alejandro
los amo,
gracias por todo..

Este trabajo se realizó bajo la dirección de la Dra. Rosa Estela Navarro González en el laboratorio 206 Sur del Departamento de Biología Celular y del Desarrollo del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Carlos Giovanni Silva García contó con una beca durante la realización de sus estudios de Doctorado por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, México) con Número de Registro de Becario 44379, y con una beca del CONACYT a través del proyecto 103856-Q.

Este trabajo fue apoyado por el CONACYT a través de los donativos 50896-Q y 103856-Q, y por el Programa de Apoyo a la Innovación e Investigación Tecnológica (PAPIIT-UNAM, México) a través de los donativos IN225509 e IN207412.

Se agradece a los miembros del Comité Tutor: Dr. Jesús Aguirre Linares y Dr. Jesús Chimal Monroy por sus discusiones y sugerencias durante la realización de este proyecto.

A los miembros del jurado: Dr. Julio Morán Andrade, Dra. Susana López Charretón, Dra. Berenice García Ponce de León y Dra. Mahara Angélica Valverde Ramírez, gracias por sus valiosos comentarios.

Asimismo, se reconoce 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 hibridación de los microarreglos. También se reconoce al personal de Computo del Instituto de Fisiología Celular: Ana María Escalante, Ivette Rosas, Gerardo Coello, Juan Manuel Barbosa y Francisco Pérez. A la Dra. Laura Ongay Larios y al personal de la Unidad de Biología Molecular: Guadalupe Códiz Huerta y Minerva Mora Cabrera por su apoyo brindado durante el desarrollo de este proyecto. Y a L. Silva Salinas Velázquez por su ayuda técnica.

Finalmente, se agradecen las aportaciones técnicas e intelectuales durante la realización de este proyecto del Q. F. B. Daniel Paz Gómez y de la M. en C. Laura Ivon Láscarez Lagunas.

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| RESUMEN | 1 |
| I INTRODUCCIÓN | 3 |
| 1.1 CLASIFICACIÓN Y CICLO DE VIDA DE <i>C. ELEGANS</i> | 3 |
| 1.2 DIAPAUSAS DE <i>C. ELEGANS</i> | 5 |
| 1.3 ANATOMÍA DE LA GÓNADA DE <i>C. ELEGANS</i> | 7 |
| 1.4 GRÁNULOS DE RNA | 9 |
| 1.4.1 TIPOS DE GRÁNULOS DE RNA | 9 |
| 1.4.1.1 GRÁNULOS NEURONALES | 9 |
| 1.4.1.2 GRÁNULOS GERMINALES | 10 |
| 1.4.1.3 CUERPOS DE PROCESAMIENTO | 12 |
| 1.4.1.4 GRÁNULOS DE ESTRÉS | 14 |
| 1.4.2 TIPOS DE GRÁNULOS DE RNA EN LA LÍNEA GERMINAL DE <i>C. ELEGANS</i> | 17 |
| 1.4.2.1 GRÁNULOS P | 17 |
| 1.4.2.2 CUERPOS DE ALMACENAMIENTO | 19 |
| 1.4.2.3 FORMACIÓN DE GRÁNULOS DE RNA DURANTE EL ARRESTO DE LA OVULACIÓN Y EL ESTRÉS AMBIENTAL | 19 |

| | |
|--|-----------|
| 1.5 APOPTOSIS | 23 |
| 1.5.1 APOPTOSIS EN <i>C. ELEGANS</i> | 23 |
| 1.5.1.1 APOPTOSIS DE LAS CÉLULAS GERMINALES | 27 |
| 1.5.1.2 EL ESTRÉS AMBIENTAL INDUCE UN INCREMENTO EN LA APOPTOSIS DE LAS CÉLULAS GERMINALES | 28 |
| II PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 31 |
| III OBJETIVOS | 33 |
| 3.1 OBJETIVO GENERAL | 33 |
| 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 34 |
| IV MATERIALES Y MÉTODOS | 35 |
| 4.1 CRECIMIENTO DE LAS CEPAS | 35 |
| 4.2 RNA DE INTERFERENCIA (RNAi) | 38 |
| 4.3 CONTEO DE CUERPOS APOPTÓTICOS | 41 |
| 4.4 CONDICIONES DE ESTRÉS | 43 |

| | | |
|------|---|----|
| 4.5 | EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL | 43 |
| 4.6 | MICROARREGLO | 45 |
| 4.7 | ANÁLISIS DE LA MUTACIÓN tm361 Y CLONACIÓN DE LA DELECCIÓN ok144 | 47 |
| 4.8 | ESTUDIOS DE FENOTIPO | 48 |
| 4.9 | NORTHERN BLOT | 49 |
| 4.10 | PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL ANTICUERPO CONTRA TIAR-1 Y WESTERN BLOT | 53 |
| 4.11 | INMUNOTINCIONES | 55 |
| 4.12 | RT-PCR | 56 |
| 4.13 | CONSTRUCCIONES | 57 |
| 4.14 | BIOBALÍSTICA | 58 |
| 4.15 | INSERCIÓN MONOCOPIA (MosSCI) | 62 |
| 4.16 | PERFILES POLISOMALES | 64 |
| 4.17 | DIAPAUSA REPRODUCTIVA DEL ADULTO | 66 |
| 4.18 | MICROSCOPIA, PROCESAMIENTO DE IMÁGENES Y ESTADÍSTICA | 68 |

V RESULTADOS Y DISCUSIÓN 69

APARTADO UNO

EL PAPEL DE TIAR-1 EN LA APOPTOSIS DE LAS CÉLULAS GERMINALES

| | | |
|-------|---|----|
| 5.1 | CAPÍTULO 1 | 75 |
| | ESCRUTINIO PARA IDENTIFICAR LOS GENES QUE PARTICIPAN EN LA APOPTOSIS FISIOLÓGICA Y LA APOPTOSIS INDUCIDA POR AYUNO | |
| 5.1.1 | GENES INVOLUCRADOS EN LA APOPTOSIS FISIOLÓGICA | 75 |
| 5.1.2 | GENES INVOLUCRADOS EN LA APOPTOSIS INDUCIDA POR AYUNO | 82 |
| 5.1.3 | DISCUSIÓN | 87 |
| 5.1.4 | CONCLUSIONES | 90 |
| 5.2 | CAPÍTULO 2 | 91 |
| | EL HOMÓLOGO DE TIA-1/TIAR EN <i>C. ELEGANS</i> , TIAR-1, SE REQUIERE PARA INDUCIR APOPTOSIS DE LAS CÉLULAS GERMINALES | |

| | |
|--|------------|
| 5.3 CAPÍTULO 3 | 115 |
| MECANISMO DE INDUCCIÓN DE APOPTOSIS DE TIAR-1 | |
| 5.3.1 <i>tiar-1</i> DISMINUYE SU EXPRESIÓN DURANTE EL AYUNO | 115 |
| 5.3.2 EL mRNA DE <i>tiar-1</i> ESTA ENRIQUECIDO EN LA LÍNEA GERMINAL | 117 |
| 5.3.3 TIAR-1 NO PARTICIPA EN LA FAGOCITOSIS Y DEGRADACIÓN DE LOS CUERPOS APOPTÓTICOS | 119 |
| 5.3.4 LA AUSENCIA DE TIAR-1 NO AFECTA LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE CED-9 Y CED-4 DURANTE EL AYUNO Y CHOQUE DE CALOR | 123 |
| 5.3.5 EN LOS ANIMALES <i>tiar-1(tm361)</i> NO SE REPRIME LA TRADUCCIÓN DURANTE EL AYUNO | 127 |
| 5.3.6 LA AUSENCIA DE TIAR-1 AFECTA LA TRADUCCIÓN DE mRNAs ESPECÍFICOS DURANTE EL AYUNO | 133 |
| 5.3.7 LA AUSENCIA DE TIAR-1 AFECTA LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE CSP-2B | 135 |
| 5.3.8 DISCUSIÓN | 147 |
| 5.3.9 CONCLUSIONES | 154 |

| | |
|---|------------|
| 5.4 CAPÍTULO 4 | 155 |
| PARTICIPACIÓN DE TIAR-1 EN LA DIAPAUSA REPRODUCTIVA DEL ADULTO | |
| 5.4.1 LA AUSENCIA DE TIAR-1 NO AFECTA LA ENTRADA A LA DIAPAUSA | 155 |
| 5.4.2 LA AUSENCIA DE TIAR-1 AFECTA LA RECUPERACIÓN DE LA DIAPAUSA | 158 |
| 5.4.3 TIAR-1 REGULA LA APOPTOSIS DE LAS CÉLULAS GERMINALES LOS PRIMEROS DIAS DE LA DIAPAUSA | 160 |
| 5.4.4 DISCUSIÓN | 162 |
| 5.4.5 CONCLUSIONES | 164 |

APARTADO DOS

EL PAPEL DE TIAR-1 EN LA FORMACIÓN DE GRÁNULOS EN LA GÓNADA

| | |
|--|------------|
| 5.5 CAPÍTULO 5 | 167 |
| LA PROTEÍNA DE UNIÓN A RNA TIAR-1 SE REQUIERE PARA LA FORMACIÓN DE GRÁNULOS EN CONDICIONES DE ESTRÉS EN EL CENTRO DE LA GÓNADA DE <i>C. ELEGANS</i> | |

| | |
|--|----------------|
| 5.6 CAPÍTULO 6 | 185 |
| ALGUNOS ASPECTOS DE LA PARTICIPACIÓN DE TIAR-1 DURANTE EL ESTRÉS | |
| 5.6.1 LA EXPOSICIÓN A CICLOHEXIMIDA O PUROMICINA AFECTA LOS NIVELES DE APOPTOSIS FISIOLÓGICA Y POR AYUNO | 185 |
| 5.6.2 GLA-3 PARTICIPA EN LA FORMACIÓN DE GRÁNULOS DURANTE EL AYUNO | 187 |
| 5.6.3 EL ESTRÉS AMBIENTAL REDUCE LA FERTILIDAD DE LOS ANIMALES | 189 |
| 5.6.4 DISCUSIÓN | 192 |
| 5.6.5 CONCLUSIONES | 194 |
| VI REFERENCIAS | 195 |

RESUMEN

La reproducción sexual es la base de la continuidad en la vida animal, y la línea germinal es la encargada de mantener esta continuidad generación tras generación. La intersección entre los programas de desarrollo de las células germinales y las condiciones ambientales que alteran su fisiología es un área de creciente interés. La línea germinal de *C. elegans* ha emergido como un modelo especialmente sensible y de gran alcance para estos estudios. Diferentes trabajos han demostrado que la fisiología de las células germinales en el nematodo *C. elegans* responde a los cambios ambientales. Así, la apoptosis que ocurre de manera fisiológica en estas células puede incrementarse por diferentes tipos de estrés como la radiación UV, la exposición a patógenos, el choque de calor, el ayuno, el estrés osmótico y oxidativo. Para que ocurra la activación de la apoptosis en las células germinales se requiere que la proteína transmembranal CED-9(BCL2) libere a CED-4(APAF1), permitiendo la activación de la caspasa CED-3. En la búsqueda de factores que regulen la apoptosis de las células germinales inducida por ayuno, encontramos a *tiar-1*. TIAR-1 es uno de los ortólogos de las proteínas de unión a RNA TIA-1 y TIAR de mamíferos, las cuales han sido involucradas en diversos procesos celulares como la apoptosis, la formación de gránulos de estrés y la traducción/degradación de mRNAs. La expresión de la proteína TIAR-1 es ubicua en todos los tipos celulares de *C. elegans*; particularmente, observamos que esta proteína se expresa en el citoplasma de las células

germinales y de manera transitoria en los gránulos germinales. Los animales mutantes en *tiar-1* se mueven más lento, tienen un retraso en el crecimiento, letalidad embrionaria y son estériles debido a defectos en la ovogénesis y la espermatogénesis. Sorpresivamente, encontramos que TIAR-1 se requiere para inducir apoptosis de las células germinales por diferentes tipos de estrés que a su vez son regulados por distintas vías de señalización. Particularmente, se ha descrito que el ayuno induce una reducción en la tasa general de traducción, lo cual, junto con la disminución de los niveles de CED-9, provoca un incremento en la apoptosis de las células germinales. A diferencia de los animales silvestres, la tasa de traducción en los animales mutantes para *tiar-1* no disminuyó durante el ayuno; sin embargo, los niveles de CED-9 sí se redujeron en estos animales. Lo anterior sugiere un mecanismo distinto para que TIAR-1 induzca apoptosis por este tipo de estrés. En este sentido, hallamos que TIAR-1 actúa río abajo de CED-9 para inducir apoptosis mediante la regulación de los niveles de expresión de CSP-2B, el cual se une a la caspasa CED-3 para evitar su activación. Apoyando esta idea, encontramos que TIAR-1 y CSP-2B tienen expresiones opuestas en la gónada: donde hay más expresión de TIAR-1 observamos menos de CSP-2B. Aparte de la apoptosis, el estrés ambiental también ocasiona la formación de gránulos ribonucleoproteicos en la gónada, y encontramos que TIAR-1 regula esta formación. Las células germinales comparten atributos y componentes esenciales a lo largo de todo el filo animal. La proteína TIAR-1 está altamente conservada y se ha descrito que en mamíferos regula varios aspectos importantes de la célula. Su rol en estos aspectos aún no ha sido elucidado completamente; además, existen muy pocos estudios de su papel en la línea germinal. Este trabajo muestra diferentes funciones para TIAR-1 que anteriormente no habían sido descritas en las células germinales, lo que permitirá entender mejor la función de esta familia de proteínas

I INTRODUCCIÓN

1.1 CLASIFICACIÓN Y CICLO DE VIDA DE *C. ELEGANS*

Los nematodos, llamados también nematelmintos (gusanos redondos), constituyen el mayor filo de los asquelmintos con 12000 especies descritas que incluyen algunos de los organismos más ubicuos y numerosos de todos los animales pluricelulares [1]. Hay nematodos de vida libre en el mar, en el agua dulce y en el suelo. *Caenorhabditis elegans* es un pequeño nematodo de aproximadamente 1.2 mm de largo en estado adulto, de vida libre y que habita en el suelo. Este nematodo se distribuye prácticamente en cualquier parte del mundo y se alimenta de microorganismos, principalmente de bacterias [2]. *C. elegans* fue inicialmente descrito y nombrado por Maupas en 1900, subsecuentemente fue colocado en el subgénero *Caenorhabditis* por Osche en 1952 y finalmente se le dio el estatus de género por Dougherty en 1955 [2]. En seguida se presenta su clasificación taxonómica citada por Ruppert [1].

Reino: Animal

Filo: Nematoda

Clase: Secernentea o Phasmida

Orden: Rhabditida

Familia: Rhabditidae

Género: *Caenorhabditis*

Especie: *Caenorhabditis elegans*

El ciclo de vida de *C. elegans* está conformado por una etapa embrionaria, cuatro estadios larvales (L1, L2, L3 y L4) y un estado adulto (Figura 1). El final de cada estadio larvario está marcado por una muda en donde una nueva cutícula es sintetizada y se despoja de la vieja [3].

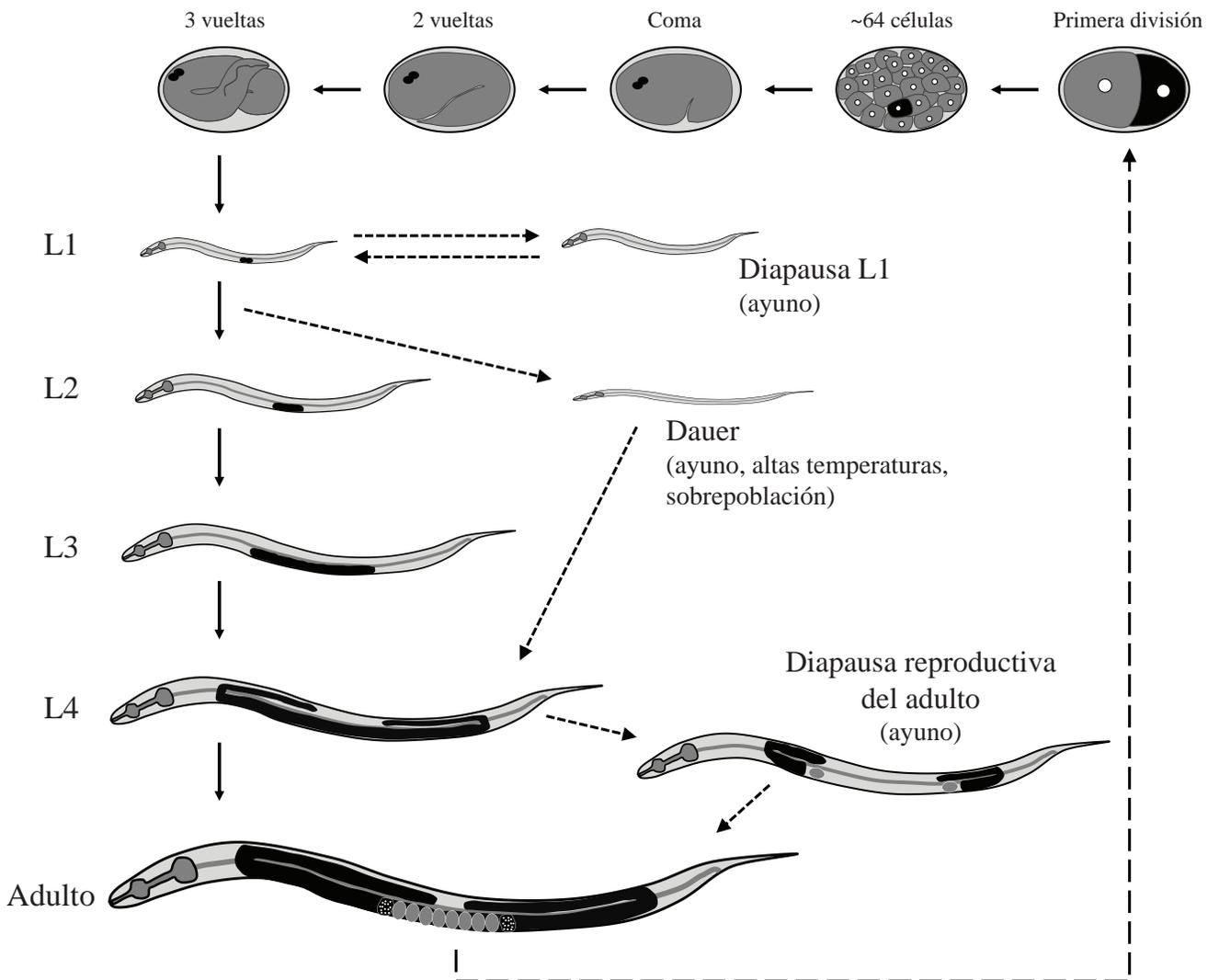


Figura 1| Ciclo de vida del nematodo *C. elegans*. En el esquema se muestran el desarrollo embrionario, las cuatro etapas larvales L1, L2, L3 y L4, y el estado adulto. En color negro se muestra el desarrollo de la línea germinal en cada una de las etapas. Si los animales son privados de comida detienen su crecimiento en tres diferentes etapas: al inicio del estadio larvario L1, a finales del estadio L1 (“dauer”) y a mediados del estadio L4 (diapausa reproductiva del adulto). Cuando las condiciones favorables de comida se restablecen, los animales continúan su desarrollo. En negro se muestra el desarrollo de la línea germinal.

1.2 DIAPAUSAS DE *C. ELEGANS*

Las condiciones adversas como la falta de alimento han llevado a este nematodo a desarrollar diferentes adaptaciones para afrontarlas. Dado que desde que eclosiona la larva empieza a comer, las diferentes adaptaciones al ayuno se pueden observar durante todo su desarrollo postembrionario. Si la larva ha eclosionado en ausencia de comida se detiene su desarrollo hasta que la comida se encuentre disponible (Figura 1), en este estado llamado diapausa L1 sobrevive alrededor de 6-10 días [4]. Después de tener acceso a la comida, el desarrollo de la larva L1 progresa normalmente. Al final del estadio larvario L1 si las condiciones del medio ambiente no son favorables para continuar con el crecimiento, el animal puede entrar en una detención del ciclo llamado “dauer” (del alemán, duradero) (Figura 1). Dentro de estas condiciones se encuentra la ausencia de comida, la presencia de feromonas (como un indicador de la densidad de la población) y la alta temperatura. Durante el estado de “dauer” el nematodo deja de comer y puede sobrevivir alrededor de cuatro meses. La diapausa “dauer” finaliza cuando el animal censa condiciones ambientales favorables [2].

Un tercer estado de diapausa ocurre cuando los animales hermafroditas del estadio L4 son expuestos al ayuno (Figura 1). Durante el estadio larvario L4 ocurre la espermatogénesis; después, en el adulto comienza la ovogénesis. Los animales hermafroditas expuestos al ayuno y que inician la ovogénesis detienen su crecimiento [5, 6]. Esta detención de su crecimiento se conoce como diapausa reproductiva del adulto y se caracteriza por una dramática reorganización de la gónada [5, 6]. Durante la diapausa reproductiva del adulto la gónada en ovogénesis reduce su tamaño y número de células germinales [5, 6]. Una gónada en ovogénesis y en condiciones normales tiene aproximadamente

125 células germinales, mientras que una gónada en la diapausa reproductiva del adulto tiene alrededor de 35 células germinales [5]. Así, aproximadamente al día 10 de ayuno la gónada reduce al máximo su tamaño y su tasa de producción de ovocitos [6]. Cuando las condiciones de comida se restablecen, la gónada vuelve a crecer a su tamaño normal y se restaura la tasa de ovogénesis y reproducción (Figura 1) [5, 6].

Se han descrito extensivamente varios componentes involucrados en la regulación de los diferentes estados de la diapausa en *C. elegans* [7], entre los que destacan las vías de señalización de insulina/IGF-1 y TGF β (en la diapausa L1 y en “dauer”) [8], así como NHR-49 (en la diapausa reproductiva del adulto) que media la oxidación de ácidos grasos y la gluconeogénesis en ausencia de comida [5]. La autofagia también se ha implicado en las diferentes diapausas de *C. elegans* [9].

La inhibición de la autofagia disminuye la sobrevivencia de los animales durante la diapausa L1. Además, la vía de señalización acetilcolina muscarínica (proteína G-acoplada al receptor de acetilcolina \rightarrow Gq α \rightarrow nPKC \rightarrow MAPK) está implicada en esta regulación mediante la activación de la autofagia durante el ayuno. Así, la inhibición de esta vía río abajo (MAPK-1 por ejemplo) reduce la autofagia, mientras que la activación río arriba (por la ausencia de GPB-2 por ejemplo) induce un exceso de autofagia por ayuno [9]. Niveles fisiológicos de autofagia promueven la sobrevivencia, mientras que la insuficiencia o el exceso de autofagia contribuyen a la muerte durante la diapausa L1. La reducción de la actividad de *daf-2* (receptor de insulina/IGF-1) causa que los animales entren en “dauer” aún en condiciones favorables. Sin embargo, la depleción simultánea de la autofagia y de *daf-2* resulta en un defecto en la formación de “dauers” y los animales mueren sugiriendo que la autofagia también juega un rol en este proceso. Aunque la autofagia ha sido descrita durante la diapausa L1 y el estadio de “dauer”, aún se

desconoce si participa en la diapausa reproductiva del adulto.

1.3 ANATOMÍA DE LA GÓNADA DE *C. ELEGANS*

En *C. elegans*, los individuos pueden ser hermafroditas (XX) o machos (XO). La estructura de un animal adulto hermafrodita es anatómicamente simple, compuesto exactamente por 959 células somáticas y el macho por 1031 células [2]. La línea germinal es un linaje de células especializadas que da origen a los ovocitos y espermatozoides. En *C. elegans*, como en muchos otros organismos, la línea germinal se separa de las células somáticas en una etapa muy temprana durante la embriogénesis (Figura 1). En seguida nos centraremos en la anatomía de la gónada del hermafrodita adulto, pues es el modelo de estudio de este trabajo.

La gónada del hermafrodita está compuesta por dos estructuras en forma de U conectadas por un útero central (Figura 2). La parte somática de la gónada consiste de una célula distal, las células de la vaina que envuelven a la gónada, la espermateca, la válvula espermática uterina y el útero [2]. Una vez que se formaron alrededor de 160 espermatozoides en la etapa larvaria L4 comienza la producción solo de ovocitos en el adulto [10]. La gónada la podemos dividir en tres regiones generales: distal, asa y proximal. En la gónada del adulto hermafrodita, los ovocitos maduros se encuentran organizados en la parte proximal de la gónada. La gónada de *C. elegans* es un sincicio, lo que quiere decir que los núcleos que van a dar origen a los ovocitos comparten un citoplasma común en la región distal. Convencionalmente a los núcleos de la gónada se les ha denominado células germinales. En la parte distal se encuentran núcleos en mitosis e indiferenciados debido

a una señal proveniente de la célula distal. Conforme los núcleos se alejan de esta célula, pasan de un estadio de profase de la meiosis I (zona de paquíteno) en el centro de la gónada hasta formar ovocitos maduros en la zona proximal (Figura 2) [11]. Una vez que el ovocito está maduro, comienza la ovulación, pasa a la espermateca donde es fertilizado y el embrión inicia las primeras divisiones dentro del útero. Durante la ovogénesis, los ovocitos acumulan una enorme cantidad de RNA mensajeros (mRNAs); algunos de ellos son traducidos y otros son silenciados para prevenir una prematura diferenciación y garantizar un correcto desarrollo embrionario [12].

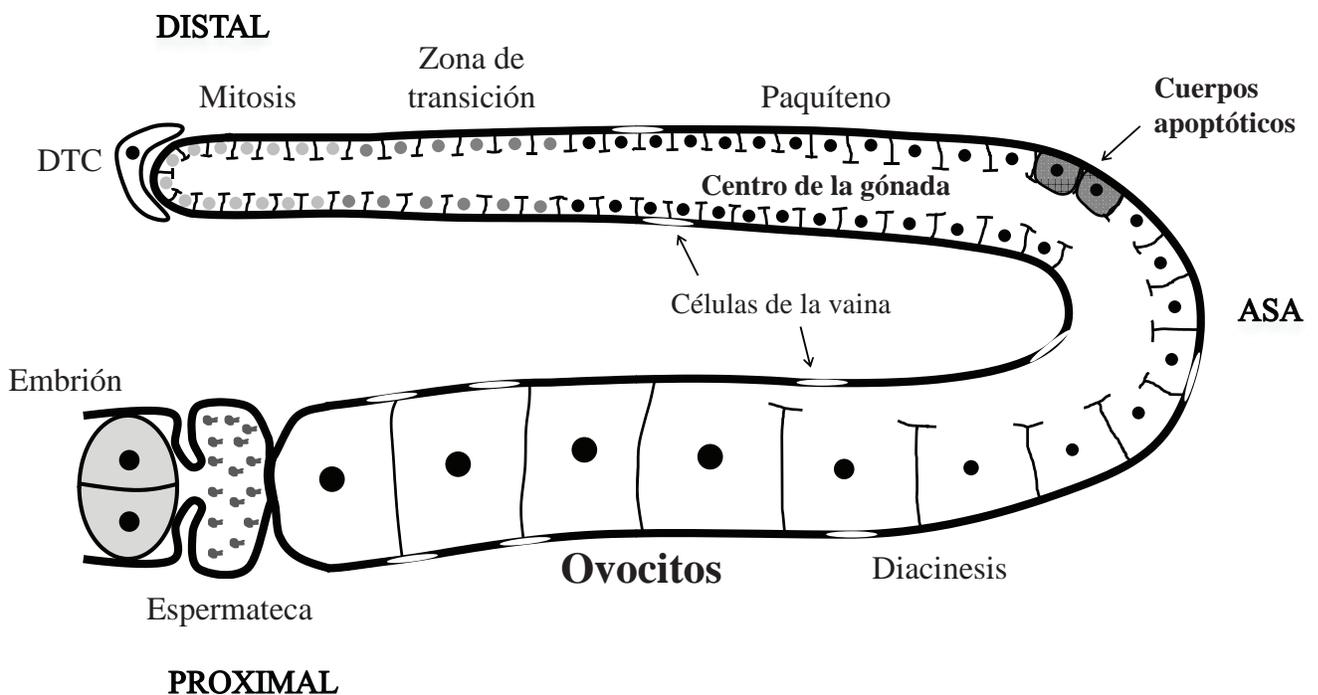


Figura 2| Esquema de un brazo de la gónada del hermafrodita adulto de *C. elegans*. El desarrollo de los ovocitos ocurre de la zona distal a la proximal. La zona de transición corresponde al estado de la célula que pasa de la mitosis y entra a la meiosis. Los espermatozoides fueron almacenados en la espermateca durante el estadio larvario L4. La apoptosis de las células germinales generalmente se observa en la zona del asa. DTC= célula distal de la punta.

1.4 GRÁNULOS DE RNA

El control traduccional del mRNA es importante en la regulación de la expresión de genes eucarióticos. Algunos mRNA son programados para su inmediata traducción, después de la traducción, los mRNAs son deadenilados, los polisomas se disocian y el mRNA es degradado o almacenado. Otros mRNAs son transcritos pero su traducción no es inmediata por lo que son transportados o almacenados hasta que sean requeridos por la célula. En ambos casos, un conjunto de mRNAs silenciados traduccionalmente son almacenados en gránulos ribonucleoproteicos que carecen de una membrana (gránulos de RNA). Aunque existe una gran variedad de gránulos de RNA, podemos clasificarlos en cuatro grandes tipos: gránulos neuronales, gránulos germinales, cuerpos de procesamiento y gránulos de estrés. Estos gránulos de RNA interacciona entre sí y quizás usan mecanismos similares para regular los mRNAs [13-20].

1.4.1 TIPOS DE GRÁNULOS DE RNA

1.4.1.1 GRÁNULOS NEURONALES

En algunas células, el secuestro de mRNAs marcados para represión o degradación necesita ser estabilizado mientras es transportado a otras regiones celulares. Por ejemplo, las neuronas contienen regiones especializadas como los axones y las dendritas que pueden extenderse a grandes distancias del cuerpo. En tales células, ciertos mRNAs son estabilizados y transportados a estas regiones hasta que una señal apropiada remueva al represor o degrade el transcrito [13].

Las estructuras encargadas de estabilizar y transportar mRNAs en las células neuronales se conocen como gránulos neuronales.

Los gránulos neuronales se identifican por la presencia de dos proteínas altamente conservadas: Staufen (una proteína de unión a RNA de doble cadena) y por FMRP (un represor traduccional denominado proteína frágil de retraso mental X) [21]. Aparte de Staufen, FMRP y mRNAs, los gránulos neuronales también contienen subunidades ribosomales, factores de inicio de la traducción (eIF4E y eIF2 α), y otras proteínas de unión a RNA que regulan la expresión de los mRNAs (HuD, G3BP, Sam68, SYNCRIP, hnRNP A2 y RNG105) [15]. En las neuronas, la traducción local del mRNA es importante para la regulación de la plasticidad sináptica como también para el desarrollo y crecimiento de los axones y dendritas [14]. Los gránulos neuronales son los encargados de asegurar que un mRNA apropiado llegue y esté disponible para su traducción transportándolo a través del citoesqueleto por la quinesina KIF5 [15]. Es muy probable que la composición de los gránulos neuronales en un tiempo específico determina si los mRNAs son transportados a una cierta zona (la sinapsis por ejemplo), traducidos localmente (en la densidad postsináptica por ejemplo), o marcados para su almacenaje y/o degradación en otros gránulos de RNA conocidos como cuerpos de procesamiento (ver más adelante) [22].

1.4.1.2 GRÁNULOS GERMINALES

Las células germinales son el linaje especializado y responsable de transmitir la información genética a la siguiente generación. A pesar de su naturaleza altamente especializada, las células germinales son totipotenciales, es decir, ellas pueden desarrollar todos los tejidos

de un organismo [23]. Interesantemente, aunque existen diferentes mecanismos para especificar el linaje de las células germinales [24], cada vez es más claro que comparten varias características importantes para su desarrollo y función. Una de estas características es la presencia de los gránulos germinales. La composición y localización de los gránulos germinales cambia durante el desarrollo. Así, podemos encontrar gránulos germinales en células germinales, gametos y embriones [17].

Los gránulos germinales en las células germinales frecuentemente se localizan alrededor de la membrana nuclear y en proximidad con los poros nucleares y mitocondrias [18]. Estos gránulos han sido nombrados dependiendo del organismo en que fueron descritos, gránulos polares en *Drosophila melanogaster*, gránulos P en *C. elegans*, gránulos germinales en *Xenopus laevis* y cuerpos cromatoides en mamíferos [16-18]. Entre los componentes de las proteínas identificadas en los gránulos germinales, tres clases de proteínas son particularmente abundantes: helicasas de RNA con caja tipo DEAD (Vasa, Belle, Me31B, Rck, eIF4A), proteínas con dominio Tudor (TDRD1, RNF17, TDRD4, TDRD6) y proteínas Piwi [16]. Además de los componentes mencionados anteriormente, los gránulos germinales también presentan otras proteínas como metiltransferasas con repetidos WD (WDR77), proteínas involucradas en el splicing (Sm), proteínas que eliminan el cap (Dcp1, Dcp2), exonucleasas (Xrn1) y complejos de inicio de la traducción (eIF4F) [17]. Los gránulos germinales contienen mRNAs maternos que son requeridos para la proliferación de las células germinales y la diferenciación durante las primeras etapas del desarrollo embrionario. Así, los gránulos germinales dirigen la localización de mRNA maternos dentro del ovocito o el embrión temprano, reprimen la traducción de ciertos mRNAs, estabilizan mRNAs específicos y activan la traducción de algunos mRNAs temporal y espacialmente [17, 18].

1.4.1.3 CUERPOS DE PROCESAMIENTO

Los cuerpos de procesamiento son estructuras que están presentes en las células en condiciones normales, pero ante diferentes estímulos (como el estrés) pueden aumentar su tamaño [19]. Actualmente se han descrito más de 60 proteínas que participan como componentes de los cuerpos de procesamiento [25]. Los mRNAs se mantienen en los cuerpos de procesamiento debido a que estas proteínas a menudo participan en procesos de eliminación del cap y represión de la traducción [26]. Entre las proteínas que se encuentran en los cuerpos de procesamiento están los activadores de la eliminación del cap Edc3 y Lsm1-7, el complejo enzimático de eliminación del cap Dcp1-Dcp2, y factores que funcionan tanto como represores de la traducción como activadores de la eliminación del cap Scd6, Rck y Pat 1 [25]. Otros factores de decaimiento como la exonucleasa 5'-3' Xrn1 y las subunidades del complejo de deadenilasa (CCR4/POP2/NOT) también se localizan en los cuerpos de procesamiento [25]. Los cuerpos de procesamiento contienen miembros de la vía de microRNAs (miRNA) como Ago2, ALG-1 y GW182; proteínas involucradas en el decaimiento mediado sin sentido (NMD) SMG7 y Dpf1-3; y el factor de inhibición de eIF4E (eIF4E-T). El eIF4E se une al eIF4E-T y esto sugiere que los cuerpos de procesamiento están asociados probablemente más con la represión que con la traducción del mRNA [25]. Recapitulando, podemos definir a los cuerpos de procesamiento como estructuras encargadas de la regulación del mRNA mediante la eliminación de su cap o mediante la represión de su traducción.

El ensamblaje de los cuerpos de procesamiento está compuesto de tres pasos [25]. 1) Componentes de los cuerpos de procesamiento se unen al mRNA tanto en el extremo 5' (Dcp1, Dcp2, Edc3 y Rck) como

en el extremo 3' (Pat1, Xrn1 y Lsm1-7). 2) Después, los dos complejos en los extremos del mRNA interaccionan plegando el transcrito y formando una estructura denominada de bucle cerrado (“closed-loop”). 3) Varias de estas estructuras se agregan a través de los dominios Edc3 Yjef-N o Pat1 N Terminal para formar gránulos citoplasmáticos visibles [25]. Diferentes experimentos sugieren que tanto la formación como el desensamble de los cuerpos de procesamiento juegan un papel esencial en el ciclo del mRNA.

La importancia de los cuerpos de procesamiento en el ciclo del mRNA fue sugerida inicialmente por varias líneas que evidenciaron que el mRNA dentro de estos gránulos puede regresar a la traducción [27, 28]. Primero, el mRNA atrapado en los polisomas por la adición de cicloheximida conduce a una reducción del tamaño de los cuerpos de procesamiento independientemente de la maquinaria de eliminación del cap, argumentando que el mRNA dentro de los cuerpos de procesamiento no está obligado a ser degradado mediante la eliminación de su cap. Segundo, durante la recuperación del estrés en mutantes defectuosas en el proceso de eliminación del cap, el resurgimiento de los polisomas estuvo acompañado por una reducción en el tamaño de los cuerpos de procesamiento. Tercero, los mRNAs acumulados en los cuerpos de procesamiento bajo condiciones de crecimiento normales o de estrés salen de ellos y entran a los polisomas debido a un cambio en las condiciones ambientales [27, 28]. Estos resultados sugieren que el mRNA que entra a los cuerpos de procesamiento puede ser degradado o puede salir de ellos para reingresar a la traducción, posiblemente a través de la transición de los cuerpos de procesamiento a otros gránulos de RNA, conocidos como gránulos de estrés (Figura 3).

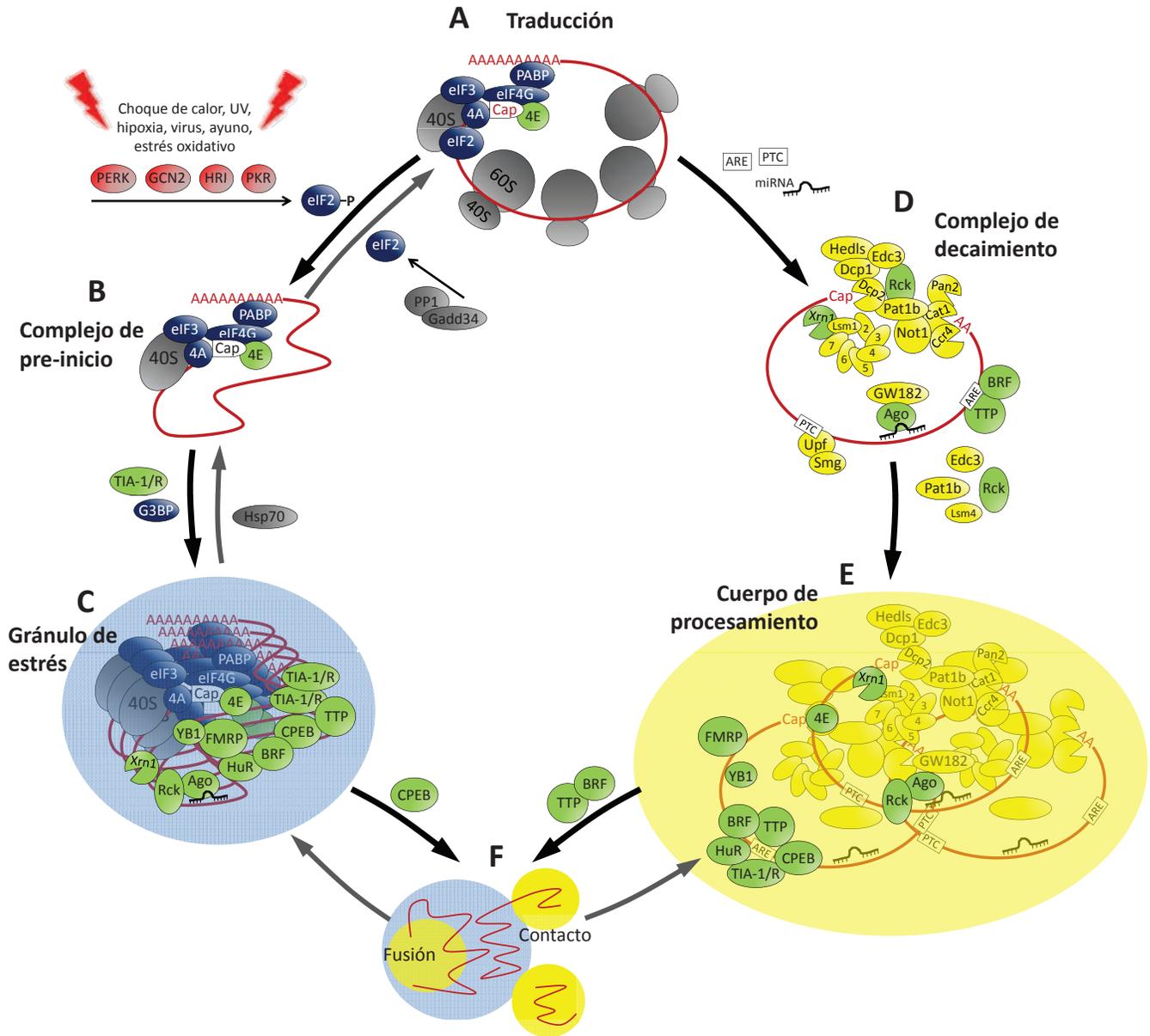
1.4.1.4 GRÁNULOS DE ESTRÉS

En mamíferos, los gránulos de estrés fueron originalmente definidos como grandes agregados citoplasmáticos de mRNA y proteínas, que llegan a ser visibles cuando la síntesis global de proteínas es inhibida en respuesta a diferentes tipos de estrés [29]. Aunque en mamíferos los gránulos de estrés y los cuerpos de procesamiento acumulan mRNAs durante el estrés, estas estructuras pueden distinguirse claramente una de otra. Primero, los cuerpos de procesamiento son detectados en la mayoría de las células somáticas bajo condiciones normales, mientras que los gránulos de estrés solo emergen en respuesta a la fosforilación del factor de inicio de la traducción eucariótico 2α (eIF2 α) inducida por el estrés. Segundo, los gránulos de estrés son definidos por los factores de inicio de la traducción que conforman el complejo de preinicio no canónico 48S (eIF3, eIF4A, eIF4G, PABP-1 y la subunidad pequeña del ribosoma), mientras que los cuerpos de procesamiento son definidos por los componentes de la maquinaria de degradación del mRNA (Dcp1, Dcp2 y Hedls; ver apartado anterior) [30].

Actualmente se conocen más de 100 proteínas en mamíferos involucradas en la formación de gránulos de estrés [31]. De manera general, el ensamblaje de los gránulos de estrés lo clasificaremos en tres etapas [20]. En la primera etapa, la fosforilación inducida por estrés de la Ser51 del eIF2 α reduce los niveles del complejo ternario eIF2–GTP–tRNA_i^{Met}. En ausencia de este complejo ternario, la formación del complejo de pre-inicio de la traducción 48S que normalmente se ensambla sobre el 5' de los mRNAs es interrumpido, produciendo un complejo 48S no canónico traduccionalmente inactivo e incapaz de reclutar la subunidad 60S del ribosoma. Así, estos acontecimientos ocasionan que disminuya la tasa de inicio de la traducción. La segunda

etapa comprende la agregación primaria y establecimiento de la estructura central de los gránulos de estrés. Esta agregación esta mediada por proteínas de unión a RNA que se unen al mRNA del complejo de inicio de la traducción no canónico 48S, tales como: TIA-1, TIAR, TTP, BRF1, FMRP, FXR1, CPEB, G3BP y SMN. Después de esta agregación, se unen otras proteínas que han perdido (o carecen) las propiedades de unirse al mRNA, éstas son reclutadas en los gránulos de estrés a través de interacciones proteína-proteína con proteínas que componen la estructura central de estos gránulos como TIA-1 (SRC3, FAST y PMR1) o con componentes ribonucleoproteicos del complejo 48S (TRAF2). En la tercera etapa, los transcritos específicos son clasificados en los gránulos de estrés para su traducción, para su almacenamiento o para ser transferidos a los cuerpos de procesamiento para su degradación (Figura 3) [20, 30]. En este último caso los mRNA son transferidos por proteínas específicas como TTP [32]. Una característica importante de los gránulos de estrés es que los procesos son reversibles, esto es, los mRNAs que están en los gránulos de estrés pueden regresar a los polisomas reiniciando su traducción, y por lo tanto los gránulos de estrés desaparecen (Figura 3).

Figura 3| Esquema general de la formación e interacción de los gránulos de estrés y los cuerpos de procesamiento. (A) Los mRNAs con cap y poliadenilados son traducidos en los polisomas. (B) Bajo condiciones de estrés, la traducción global es inhibida por la fosforilación de eIF2 a través de la activación de las cinasas de respuesta a estrés PERK, GCN2, HRI o PKR. Como consecuencia, el complejo de pre-inicio de la traducción no canónico 48S se acumula. La fosfatasa PP1 junto con su subunidad reguladora Gadd34 puede defosforilar el eIF2 y así reactivar la traducción. (C) Proteínas de unión a RNA como TIA-1 y G3BP contienen dominios tipo prion que dirigen el ensamblaje del complejo de pre-inicio de la traducción no canónico 48S dentro de los gránulos de estrés. Cuando las condiciones de estrés se superan, la chaperona Hsp70 facilita el desensamble de los gránulos de estrés. (D) Los mRNAs son específicamente degradados si tienen un codón de terminación prematuro (PTC), si se asocian a miRNAs o si contienen elementos ricos en AU (ARE). Tales mRNAs son escindidos por una endonucleasa o son rápidamente deadenilados, lo cual conduce a una eliminación del cap o a una degradación



5'-3' por la exoribonucleasa Xrn1. (E) Los mRNAs marcados para su degradación junto con enzimas claves de la degradación de mRNA se ensamblan en los cuerpos de procesamiento. La helicasa de RNA Rck y las proteínas de agregación como Pat1, Edc3 y Lsm4 son importantes para la formación de los cuerpos de procesamiento. Los miRNAs pueden suprimir la traducción de sus mRNA blancos mediante el reclutamiento de ellos hacia los cuerpos de procesamiento. (F) los cuerpos de procesamiento son frecuentemente observados en contacto con los gránulos de estrés. CPEB1, TTP y BRF1 aumentan la asociación de los cuerpos de procesamiento con los gránulos de estrés. Las proteínas de gránulos de estrés están marcadas en azul, las proteínas de cuerpos de procesamiento están en amarillo, y las proteínas de que se localizan en ambas estructuras están marcadas en verde.

1.4.2 TIPOS DE GRÁNULOS DE RNA EN LA LÍNEA GERMINAL DE *C. ELEGANS*

Un aspecto clave durante el desarrollo embrionario temprano es la regulación del mRNA materno [33]. Los mRNAs maternos son producidos durante la ovogénesis para ser almacenados en el ovocito hasta la fertilización. Estos mRNAs se acumulan a menudo en gránulos de RNA [34]. En *C. elegans*, los gránulos germinales han sido bien descritos; sin embargo, el resto de los gránulos citoplasmáticos observados en la gónada del hermafrodita aún no han sido claramente especificados.

1.4.2.1 GRÁNULOS P

Los gránulos germinales en *C. elegans* fueron nombrados como gránulos P de acuerdo al linaje embrionario en el cual fueron encontrados [35]. Los gránulos P están asociados a los poros nucleares localizándose así alrededor de la membrana nuclear durante la mayor parte del desarrollo de las células germinales; sin embargo, en ovocitos maduros, estos gránulos se despegan y son distribuidos en el citoplasma (Figura 4 A) [35, 36]. Se han descrito alrededor de 40 componentes de los gránulos P [37] y la lista continua creciendo. Algunos de los componentes de los gránulos P son constitutivos, esto es, que se encuentran en gránulos P a lo largo de todo el ciclo de vida del nematodo. Otros componentes muestran una asociación más transitoria con los gránulos P en etapas específicas [37]. Dentro de los componentes que se encuentran en los gránulos P están proteínas involucradas en el mecanismo de RNA de

interferencia (DCR-1, DRH-3, EGO-1, CSR-1, PRG-1 y WAGO-1); componentes del splicing (proteínas Sm); componentes de cuerpos de procesamiento (CGH-1 y DCP-2); componentes de gránulos de estrés (PAB-1 y TIAR-2); factores de inicio de la traducción IFE-1 (eIF4E); y otras proteínas de unión a RNA como PGL-1/2/3, GLH-1/2/3/4 y CAR-1 [17, 38, 39].

Actualmente se han identificado más de 170 genes involucrados en la estabilidad, localización y función de los gránulos P [38]. Sin embargo, algunos componentes de los gránulos P han sido colocados en la vía de ensamblaje de estos gránulos: DEPS-1→GLH-1→PGL-1→IFE-1 [37]. En la cima de esta vía se encuentra DEPS-1, una proteína específica del nematodo con un dominio C-terminal rico en serinas. En mutantes en *deps-1*, la proteína GLH-1 es reducida hasta 10 veces [40]. GLH-1 es subsecuentemente requerida para la localización de PGL-1 [41]. Así, en ausencia de DEPS-1 o GLH-1, PGL-1 se dispersa en todo el citoplasma. Al final de la vía se encuentra IFE-1, el cual es uno de los 5 homólogos en *C. elegans* de eIF4E; y en ausencia de PGL-1, IFE-2 no se localiza en los gránulos P [42].

Los gránulos P son importantes para promover el desarrollo de las células germinales en el embrión; sin embargo, se desconoce de qué manera actúan [37]. En *C. elegans*, la transcripción global está reprimida durante la maduración del ovocito, y la mayoría de la transcripción es reprimida en la línea germinal a lo largo de la embriogénesis [43]. Un modelo para explicar la función de los gránulos P consiste en que los transcritos maternos requeridos para el desarrollo de la línea germinal embrionaria son preservados en los gránulos P hasta que la transcripción se reanude durante la proliferación de la línea germinal en la larva eclosionada [37].

1.4.2.2 CUERPOS DE ALMACENAMIENTO

En la gónada de *C. elegans* existe una gran cantidad de proteínas que se expresan en el citoplasma de manera diferenciada. Algunas de estas proteínas forman agregados citoplasmáticos y han sido involucradas en la regulación del mRNA [12, 34, 39]. Sin embargo, no se ha definido claramente la naturaleza de estos agregados, esto es, no se sabe si forman parte de algún tipo específico de gránulo de RNA. A pesar de lo anterior, se ha descrito un tipo de gránulos de RNA denominados cuerpos de almacenamiento [44]. Los cuerpos de almacenamiento están presentes en el citoplasma de la gónada de *C. elegans* en condiciones normales y están compuestos por las proteínas CGH-1(Rck) y CAR-1(Lsm) (Figura 4 A) [44]. Los ortólogos en mamíferos de estas proteínas (Rck y Lsm) forman parte de los cuerpos de procesamiento (Figura 3). En contraste a la función principal de los cuerpos de procesamiento (degradación de mRNAs) [19], la función propuesta para los cuerpos de almacenamiento en *C. elegans* es la regulación de un conjunto de mRNAs maternos específicos para prevenir su degradación en la gónada [34, 44].

1.4.2.3 FORMACIÓN DE GRÁNULOS DE RNA DURANTE EL ARRESTO DE LA OVULACIÓN Y EL ESTRÉS AMBIENTAL

La ausencia de espermatozoides conduce a un arresto en la ovulación y en la meiosis, lo que ocasiona una acumulación de ovocitos en la gónada del adulto [45]. Diferentes estudios han demostrado que los

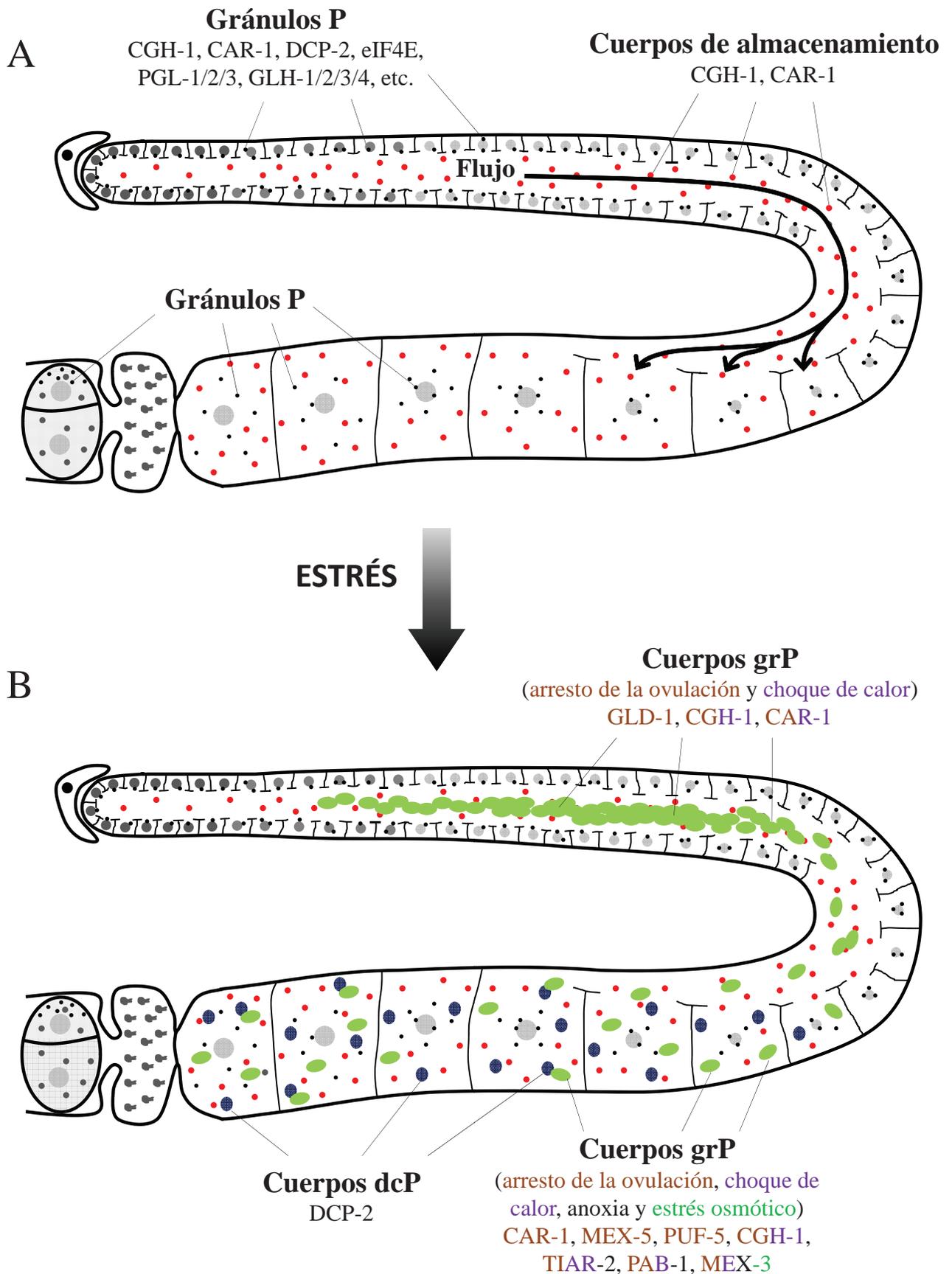
gránulos de RNA en la gónada de *C. elegans* se remodelan en respuesta al arresto en la ovulación [46, 47].

Los gránulos observados durante el arresto de la ovulación se han descrito en todas las zonas de la gónada (Figura 4 B) [44, 46, 47]. Particularmente, en el centro de la gónada se ha observado que estos gránulos poseen componentes como CGH-1, CAR-1 y GLD-1 (proteína de unión a RNA con dominio STAR/KH); sin embargo DCP-2 (Dcp2) no está presente en estos gránulos (Figura 4 B) [46, 47]. En los gránulos formados en los ovocitos después del arresto de la ovulación están presentes las proteínas CGH-1, CAR-1, PUF-5 (Pumilio), MEX-3 (proteína de unión a RNA con dominio KH), MEX-5 (proteína con motivo de dedo de zinc CCCH), PAB-1 (PABP) y TIAR-2 (TIA-1/R) (Figura 4 B) [46, 47]. Al igual que en los gránulos observados en el centro de la gónada, los gránulos de los ovocitos compuestos por CGH-1 y CAR-1 no poseen a DCP-2 (Figura 4 B) [46]. Sin embargo, en los ovocitos arrestados DCP-2 si se agrega en otros gránulos [46]. Así, los gránulos formados por CGH-1 y CAR-1 son llamados cuerpos grP (gránulos de RNA relacionados a los cuerpos de procesamiento), mientras que los gránulos formados solo por DCP-2 los denominaron cuerpos dcP (Figura 4 B) [46].

Aparte del arresto en la ovulación, también se ha visto que diferentes tipos de estrés como el choque de calor, el estrés osmótico o la anoxia inducen una formación de gránulos en los ovocitos [47]. Durante el choque de calor se ha visto que los gránulos de los ovocitos están constituidos por CGH-1, MEX-3, PAB-1 y TIAR-2 (Figura 4 B) [47]. La anoxia induce la formación de gránulos en los ovocitos compuestos por MEX-3, PAB-1 y TIAR-2 (Figura 4 B) [47]. Finalmente, en el estrés osmótico solo se ha visto a MEX-3 en los gránulos de los ovocitos (Figura 4 B) [47].

En resumen, existe una gran variedad de gránulos que se forman en la gónada de *C. elegans* durante el arresto en la ovulación y el estrés (Figura 4 B) [46, 47]. La composición y el lugar en el que se forman varía dependiendo de las condiciones [44, 46, 47]. Algunos de estos gránulos formados poseen componentes de los gránulos de estrés o los cuerpos de procesamiento de mamíferos; sin embargo, aún falta por definir claramente la naturaleza de estos gránulos. Además, aunque los gránulos formados en la gónada después del arresto de la ovulación o el estrés poseen proteínas constitutivas que en mamíferos ha sido bien definida su función, en la línea germinal de *C. elegans* pueden tener funciones distintas. Tal es el caso de CGH-1 que en mamíferos funciona en la vía de degradación del mRNA [19], mientras que en la gónada de *C. elegans* funciona como un protector de los mRNA maternos para evitar su degradación [34, 44].

Figura 4| Esquema de la gónada que muestra la distribución de gránulos de RNA en condiciones normales y de estrés. (A) Los gránulos de RNA que se observan en condiciones normales son gránulos P y los cuerpos de almacenamiento. (B) Después del arresto de la ovulación o el estrés ambiental se forman los cuerpos grP en el centro de la gónada y los ovocitos, mientras que los cuerpos dcP solo se forman en los ovocitos.



1.5 APOPTOSIS

La apoptosis es un tipo de muerte celular programada que consiste en la eliminación regulada de las células dentro de un organismo y desempeña un papel fundamental en el crecimiento y desarrollo de casi todos los eucariontes [48]. Tanto los animales como las plantas comparten características de la apoptosis tanto a nivel celular como a nivel molecular [49]. Dentro de los mecanismos conservados en el proceso de apoptosis se encuentra la condensación nuclear, la fragmentación del DNA, la condensación del citoplasma, así como la contracción de la membrana plasmática [49]. En animales, los estudios hechos en *C. elegans* han contribuido en el esclarecimiento de las vías implicadas en este tipo de muerte celular [50, 51]. Estos estudios han establecido que la apoptosis es un proceso evolutivamente conservado, normal, genéticamente determinado durante el desarrollo y que es controlado por un número específico de genes [51].

1.5.1 APOPTOSIS EN *C. ELEGANS*

El proceso de apoptosis en *C. elegans* está dividido en cuatro pasos que ocurren de manera secuencial [51] (Figura 5). El primer paso consiste en la decisión de si la célula debe morir o vivir. Segundo, si la célula morirá entonces ocurre la activación de la maquinaria central de apoptosis. El tercer paso consiste en la ejecución del proceso de apoptosis, el cual incluye la fragmentación del DNA cromosomal y la fagocitosis de la célula en apoptosis por una célula vecina. Finalmente, en el cuarto paso la célula fagocitada es degradada. Los genes que actúan en el primer paso afectan solamente a células específicas (Figura 5). En contraste,

los genes que funcionan del segundo hasta el cuarto paso actúan en la mayoría de las células que mueren por apoptosis (Figura 5) [51].

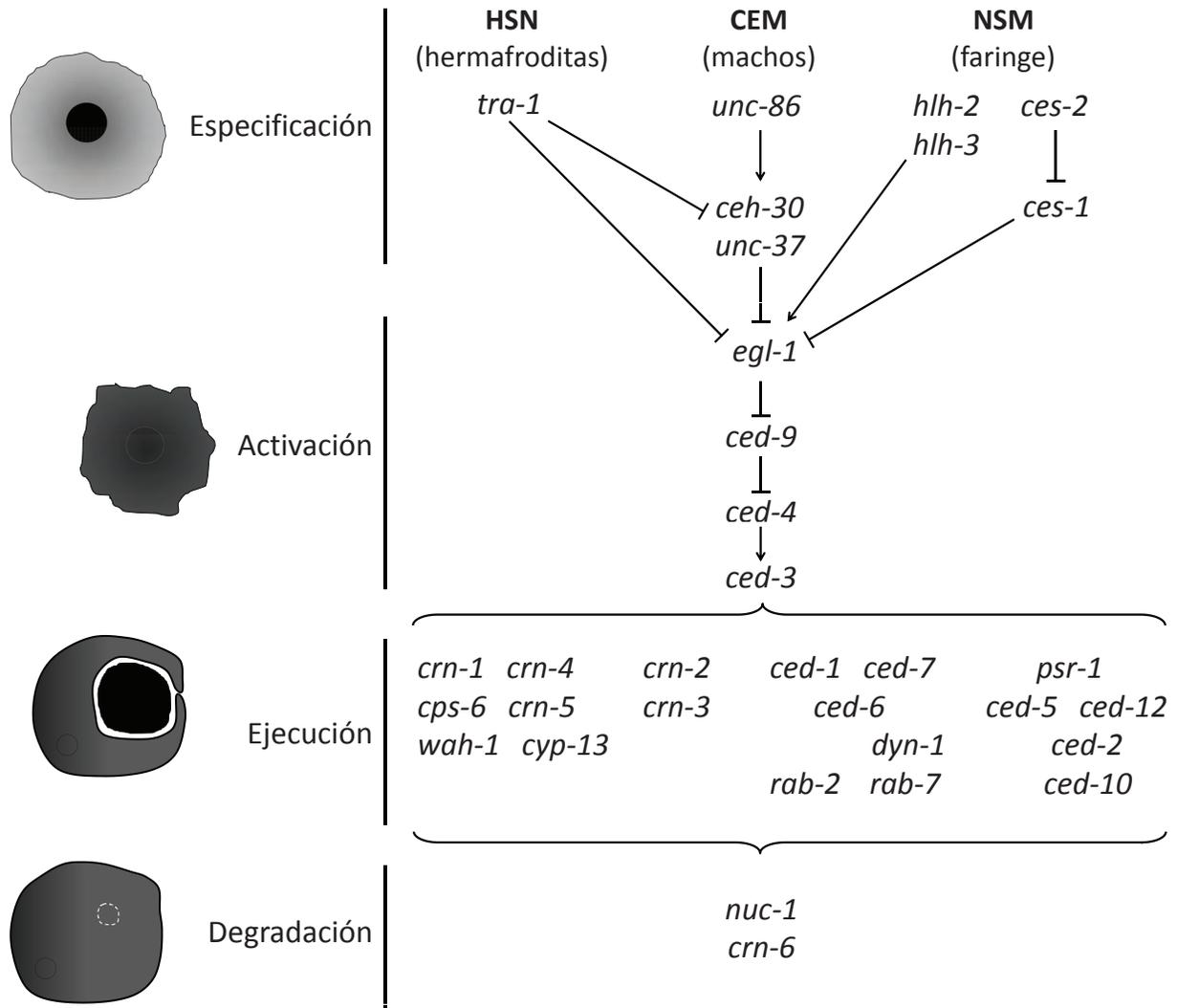


Figura 5| Vía genética de la apoptosis en *C. elegans*. Los cuatro pasos esenciales de la apoptosis están indicados. Las neuronas específicas de hermafroditas (HSN) que controlan la ovoposición en los hermafroditas son generadas en el embrión tanto en hermafroditas como en machos, pero mueren por apoptosis en los machos donde no son necesarias. En contraste, cuatro neuronas cefálicas (CEM) son específicas de los machos como resultado de su apoptosis en hermafroditas. En la faringe, dos células hermanas de las neuronas motoras neurosecretoras (NSM) también mueren por apoptosis.

El proceso de apoptosis, en la mayoría de las células en *C. elegans*, requiere de la maquinaria central de apoptosis (e. i. *ced-9*, *ced-4*, *ced-3*) [51]. El único miembro en el nematodo de la familia 2 de linfoma de células B (BCL2) CED-9 se requiere para proteger a las células de la apoptosis [52]. La pérdida de la función de *ced-9* en los animales conduce a una inapropiada apoptosis de las células que normalmente están destinadas a vivir, mientras que la ganancia de función en *ced-9* ocasiona una deficiente activación de la apoptosis en las células destinadas a morir [52]. La apoptosis en este nematodo generalmente involucra la activación transcripcional *egl-1* (que codifica a una proteína con dominio BH3) en células específicas (Figura 6) [53]. EGL-1 antagoniza a CED-9, el cual a su vez antagoniza a CED-4, el homólogo del factor activador de la proteasa apoptótica 1 (APAF1) [53, 54].

CED-4 es un proteína proapoptótica con dominio WD40 y su ausencia ocasiona que las células no mueran por apoptosis [55]. La proteína CED-9 se encuentra anclada a la superficie de la membrana externa de la mitocondria y está unida a un dímero de CED-4; de esta manera, CED-9 inhibe la apoptosis [54, 56]. Después de la inducción transcripcional, EGL-1 se une a CED-9 lo que ocasiona un cambio conformacional en CED-9 resultando en la liberación de CED-4 (Figura 6) [54]. Este evento conduce a una oligomerización de CED-4 formando un octámero, el cual a su vez se une a dos moléculas del zimógeno de la caspasa CED-3 permitiendo así su activación (Figura 6) [56].

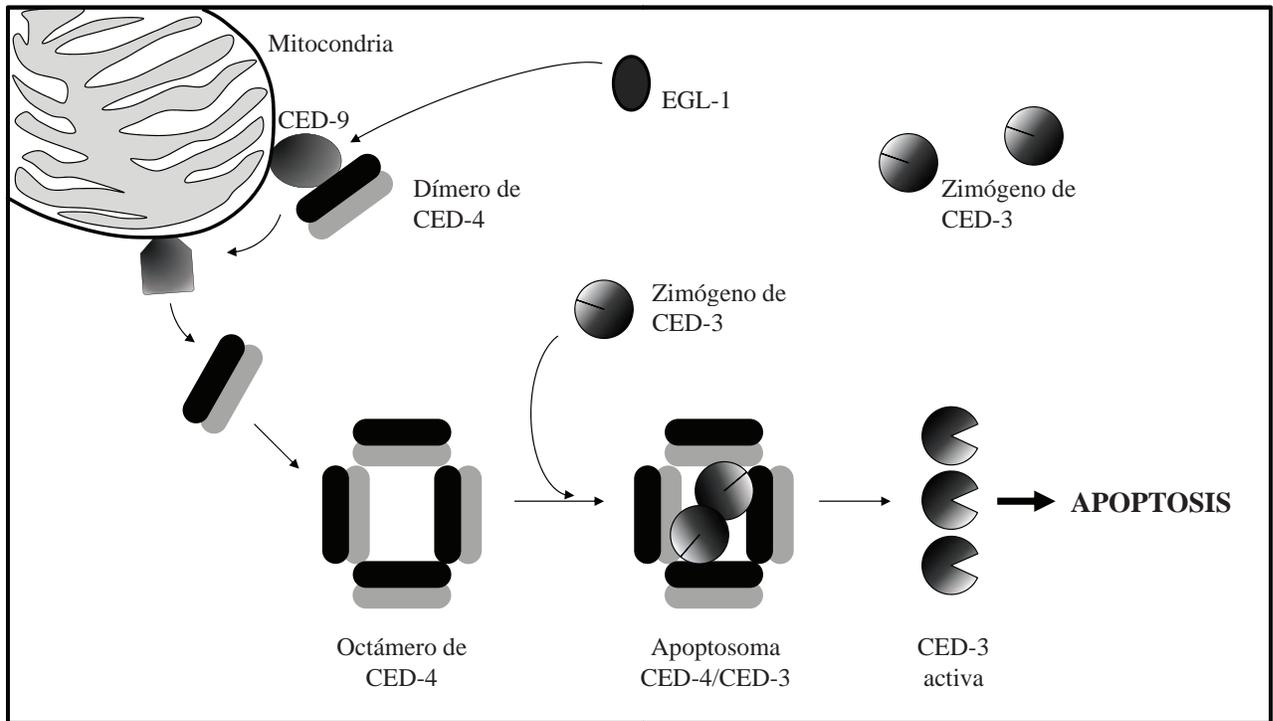


Figura 6| Modelo molecular de la activación de la apoptosis en *C. elegans*. En las células vivas, CED-9 y CED-4 forman un complejo el cual está anclado a la mitocondria a través de CED-9. En estas células, CED-3 se encuentra en su forma inactiva (zimógeno). En las células predestinadas a morir, EGL-1 ocasiona un cambio conformacional en CED-9 lo que induce la liberación de CED-4. Esta liberación origina la formación de un octámero de CED-4, el cual se une a dos moléculas del zimógeno de CED-3 formando el apoptosoma. Finalmente, este complejo permite la activación de la caspasa CED-3.

1.5.1.1 APOPTOSIS DE LAS CÉLULAS GERMINALES

Durante el ciclo de vida en *C. elegans* existen tres momentos en los cuales ocurre una apoptosis caracterizada. El primero de ellos ocurre en la embriogénesis, y el segundo sucede en la larva L2. A esta apoptosis se le conoce como apoptosis somática y depende de la proteína EGL-1 (Figuras 6 y 7) [53]. La última etapa en la cual ocurre apoptosis es observada en la línea germinal del adulto hermafrodita, durante la formación de ovocitos y es en la cual se centra este trabajo. En la ovogénesis aproximadamente el 50% de las células germinales son eliminadas por apoptosis, a este proceso se le conoce como apoptosis fisiológica [57].

La apoptosis fisiológica se desarrolla a través de la misma maquinaria apoptótica de la apoptosis somática (CED-9/CED-4/CED-3). Sin embargo, no se requiere la participación de EGL-1 para desencadenar esta apoptosis (Figura 7) [57]. Otra característica importante de la apoptosis fisiológica en *C. elegans* es que solo ocurre durante la ovogénesis, específicamente al término de la etapa de paquiteno de la profase I [57]. Animales mutantes en los que el cariotipo es hermafrodita (XX) y que solo producen espermatozoides, no presentan cuerpos apoptóticos. En contraste, machos (XO) que en vez de espermatozoides producen ovocitos, presentan una apoptosis fisiológica. Esto sugiere que la apoptosis durante la ovogénesis no es determinada por la distribución de los cromosomas sexuales sino por el proceso de producción de ovocitos [57].

Actualmente no se ha encontrado algún componente esencial que regule la apoptosis fisiológica, pero diferentes estudios han demostrado que este proceso es importante en el desarrollo de las células germinales del nematodo. La apoptosis en la línea germinal del adulto hermafrodita

mantiene la homeostasis en la gónada al eliminar el exceso de células germinales que actúan como células nodriza, las cuales proveen de los componentes citoplasmáticos esenciales a los ovocitos maduros [57, 58]. Además, Andux y Ellis [59] demostraron que la apoptosis de las células germinales juega un papel clave en el mantenimiento de la calidad de los ovocitos a través de una distribución eficiente de los recursos en los ovocitos en desarrollo.

1.5.1.2 EL ESTRÉS AMBIENTAL INDUCE UN INCREMENTO EN LA APOPTOSIS DE LAS CÉLULAS GERMINALES

La apoptosis de las células germinales puede incrementarse debido a infecciones por patógenos o a la exposición a diferentes tipos de estrés (Figura 7) [60-64]. La apoptosis de las células germinales juega un papel durante la respuesta a un ataque por patógenos como *Salmonella typhimurium* y *Salmonella enterica* ya que los animales mutantes en *ced-3* y *ced-4* son más sensibles a infecciones por estos patógenos [60, 63]. Así, la apoptosis elimina el exceso de células germinales en la gónada que podrían ser perjudiciales para el animal, siendo éste, un mecanismo de defensa del hospedero contra infecciones bacterianas [60, 63]. La apoptosis de las células germinales debida a la presencia de *S. typhimurium* y *S. enterica* requiere de la proteína con dominio BH3 EGL-1 [60, 63].

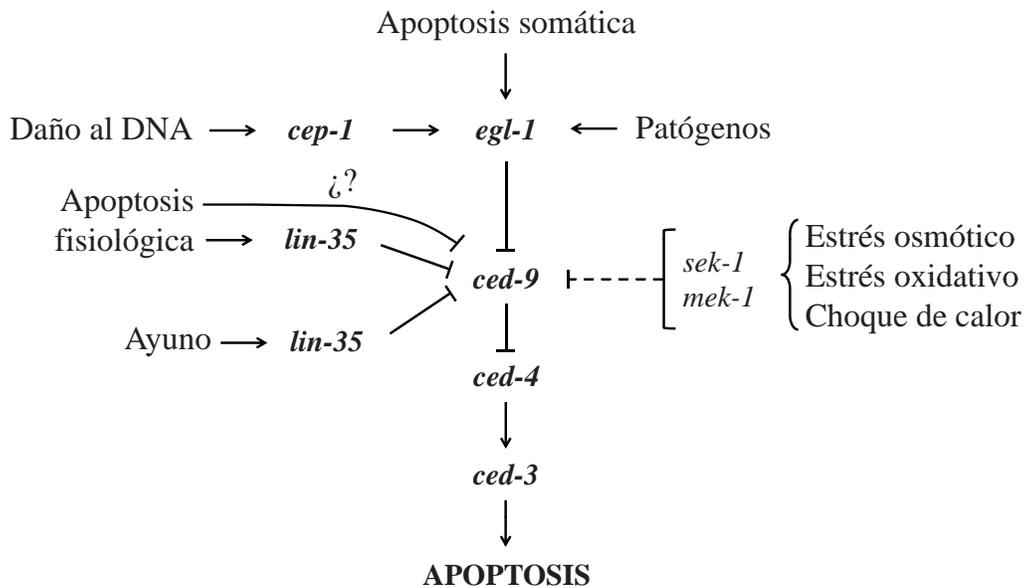


Figura 7| Tipos de apoptosis en *C. elegans*. La apoptosis somática ocurre durante el desarrollo embrionario y en la larva L2. La apoptosis fisiológica solo se presenta durante la ovogénesis en el adulto hermafrodita. La apoptosis de las células germinales puede incrementarse debido a: infecciones por patógenos, daño al DNA, estrés osmótico, estrés oxidativo, choque de calor y ayuno. —| indica una interacción negativa, —> una interacción positiva y - - una posible interacción.

Los tipos de estrés que inducen un incremento en la apoptosis de las células germinales son: el daño al DNA, el estrés osmótico, el estrés oxidativo, el choque de calor y el ayuno [61, 62, 64]. La apoptosis ocasionada por daño al DNA es dependiente del factor de transcripción CEP-1 (p53) y EGL-1 ya que animales que carecen de la expresión de estas proteínas no muestran un incremento en la apoptosis de las células germinales después de la radiación [61, 62]. CEP-1 promueve la transcripción de *egl-1* para que su proteína se una a CED-9 y rompa así la interacción CED-9-CED-4 desencadenando la apoptosis [54, 61, 62]. Otra proteína involucrada en la apoptosis por daño al DNA es CED-13 [65]. CED-13 es una proteína con dominio BH3 que puede unirse a CED-9 durante la radiación para inducir apoptosis; además, la transcripción de *ced-13* durante este tipo de estrés también depende de CEP-1 [65]. El homólogo del gen susceptible al retinoblastoma (RB) de mamíferos

LIN-35, así como los miembros de las proteínas de unión a DNA de la familia DP y E2F, DPL-1 y EFL-2 respectivamente, también están involucrados en la respuesta por daño al DNA [66]. Se ha propuesto que LIN-35, DPL-1 y EFL-2 actúan río abajo o en paralelo de CEP-1 y EGL-1 para incrementar la apoptosis de las células germinales en respuesta a la radiación [66]. En este sentido, se ha propuesto que LIN-35, DPL-1 y EFL-2 forman un complejo represor de la transcripción que reprime a un conjunto de genes, los cuales a su vez pueden bloquear la apoptosis de las células germinales debida a la radiación [66].

La exposición al estrés osmótico, estrés oxidativo y choque de calor también induce un incremento en la apoptosis de las células germinales. Sin embargo, esta apoptosis es independiente tanto de CEP-1 como de EGL-1 (Figura 7) [64]. Animales mutantes en las MAPKK *mek-1* y *sek-1* así como en la cinasa antagonista de p53 ABL-1, no respondieron a estos tres tipos de estrés [64]. Lo anterior sugiere que estas proteínas son esenciales para inducir un incremento en la apoptosis de las células germinales por estrés osmótico, estrés oxidativo y choque de calor [64].

El ayuno es otro tipo de estrés que incrementa la apoptosis de las células germinales. Este tipo de apoptosis no requiere de la participación de las proteínas CEP-1, EGL-1, MEK-1, SEK-1 ni de ABL-1 [64, 67]. La exposición al ayuno induce un incremento en los niveles de LIN-35, lo cual conduce a una represión transcripcional de *ced-9* [67]. Además, el ayuno también causa un arresto global en la traducción ocasionando que los niveles de traducción del mRNA de *ced-9* disminuyan [67]. La represión transcripcional de *ced-9* por LIN-35 más la disminución de la traducción de su mensajero en el ayuno, ocasionan que los niveles de la proteína de CED-9 disminuyan drásticamente durante este tipo de estrés [67]. Esta disminución ocasionaría entonces la liberación de CED-4 y la subsecuente activación de CED-3 [67].

II PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El estrés puede tener efectos dramáticos sobre los organismos y su línea germinal. Caracterizar los efectos que tienen el estrés sobre la línea germinal contribuirá a nuestro entendimiento de cómo las células germinales afrontan estas condiciones para poder transmitir su información genética a las siguientes generaciones. El nematodo *C. elegans* ha emergido como un buen modelo para este tipo de estudios [12, 39].

En la búsqueda de genes involucrados en la regulación de la apoptosis de las células germinales inducida por ayuno, identificamos a *tiar-1*. TIAR-1 es el ortólogo de las proteínas de mamíferos TIA-1 y TIAR; existen otros dos ortólogos de TIA-1/TIAR en *C. elegans* nombrados TIAR-2 y TIAR-3 [68]. La familia de proteínas TIA-1/TIAR se caracteriza por su capacidad de unión al RNA mediante dominios denominados RRM (RNA recognition motif). En mamíferos, estas proteínas están involucradas en una gran variedad de

procesos celulares como la apoptosis, splicing, traducción, represión de mRNAs, degradación de mRNAs y formación de gránulos de estrés [69-77]. Sin embargo, poco se sabe de la participación de TIA-1 y TIAR en la línea germinal [78, 79]. Además, en *C. elegans* esta familia de proteínas no había sido descrita. Dadas sus características estructurales y su conservación evolutiva, esperamos que la proteína TIAR-1 sea importante en la respuesta al estrés de la línea germinal del nematodo *C. elegans*.

III OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Estudiar la función de la proteína TIAR-1 en la línea germinal de *C. elegans*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Identificar mediante microarreglos los genes que cambian sus niveles de expresión durante el ayuno.

Explorar la posible participación de los genes identificados en el microarreglo en la apoptosis fisiológica y en la apoptosis por ayuno mediante RNAi.

Estudiar la expresión del gen *tiar-1* en el nematodo.

Analizar el fenotipo de los animales mutantes *tiar-1(tm361)*.

Analizar la participación de TIAR-1 en la apoptosis inducida por estrés de las células germinales.

Explorar la participación de TIAR-1 en la diapausa reproductiva del adulto.

Estudiar la participación de TIAR-1 en la formación de gránulos durante el estrés en la gónada.

IV MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 CRECIMIENTO DE LAS CEPAS

Los animales se crecieron en cajas petri con medio NGM y se alimentaron con la cepa de *Escherichia coli* OP50-1. Para mantener las cepas de *C. elegans* se seleccionaron cinco animales en estadio L4 y se colocaron en una caja mediana nueva a 15, 20 24 o 25°C dependiendo de la cepa. Un litro de medio NGM contiene los siguientes componentes: 2 g de NaCl, 4 g de bacto triptona, 3 g de KH_2PO_4 , 0.5 g de K_2HPO_4 , 0.008 g de colesterol y 20 g de agar. La mezcla se aforó a un litro y se incorporó el agar. El medio se esterilizó en autoclave durante 20 minutos, a 120°C y 15 libras de presión; después, el medio se vertió en cajas petri. Las cajas petri utilizadas para los nematodos tienen un diámetro de 8.5 cm (caja grande), 5 cm (mediana) y 3.5 cm (chica).

El medio de cultivo para bacterias que se utilizó fue LB (un litro contiene 10 g de bacto triptona, 5 g de extracto de levadura, 5 g de NaCl y 15 g de agar -medio sólido-). Una vez que se tenía el medio LB líquido estéril, se agregó 50 µg/ml de estreptomicina, se inoculó con la bacteria OP50-1 y se incubó toda la noche en agitación constante

a 37°C. Al día siguiente se colocaron unas gotas del cultivo OP50-1 sobre el medio NGM ya gelificado. Estas cajas se dejaron a temperatura ambiente hasta que el líquido se secó.

Unas de las técnicas que se utilizan en el laboratorio es la manipulación a gran escala de animales crecidos en medio líquido o en medio sólido. Para poder crecer a los animales en medio líquido se prepara buffer M9 1X o medio S [80]. El buffer M9 1X contiene: 6 g de NaHPO_4 , 3 g de KH_2PO_4 , 5 g de NaCl y 0.25 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en un litro de agua, y se esteriliza por autoclave. El medio S contiene en 1 litro: 5.85 g de NaCl , 1 g de K_2HPO_4 , 6g de KH_2PO_4 y 5 mg de colesterol, se esteriliza por autoclave; 10 ml de 1 M de citrato de potasio pH 6 (un litro estéril por autoclave contiene 20 g de ácido cítrico monohidratado y 293.5 g de citrato tri-potásico monohidratado); 10 ml de una solución de metales traza (1 litro estéril por autoclave de esta solución contiene 1.86 g de EDTA disódico, 0.69 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.29 g de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 0.025 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$); 3 ml estériles por autoclave de 1 M de CaCl_2 ; y 3 ml estériles por autoclave 1 M de MgSO_4 . En la preparación del medio S se vertieron todos los componentes en esterilidad. Cuando al medio S se le agregó comida se mantuvo una proporción de un pellet de 2.5 litros de OP50-1 por cada 25 ml de medio S.

Para poder manipular a gran escala los nematodos en medio sólido se usan cajas de huevo. Para preparar ~20 cajas de huevo se hizo un medio de 500 ml que contenía 1.5 g de NaCl , 8.5 g de agar y 1.25 g de bacto triptona; el medio se esterilizó por autoclave. Una vez que el medio se enfrió a ~50°C, se le agregó en esterilidad 12.5 ml de KPO_4 1 M, 0.5 ml de CaCl_2 1 M, 0.5 ml de MgSO_4 1 M y 0.25 ml colesterol 5 mg/ml. Se colocaron ~25 ml del medio en cada caja grande para que se solidificara.

Para preparar la mezcla de huevo y bacteria, se colocaron 50 ml de H₂O destilada estéril junto con un agitador magnético también estéril en un vaso de precipitado de 500 ml. El vaso cubierto con aluminio para que no se contamine se puso en la parrilla a calentar. Cuando el agua se calentó justo antes del punto de ebullición se le agregó en la campana un huevo previamente limpiado con etanol al 70%, se rompió la yema del huevo, el vaso se tapó con el aluminio y se puso a agitar en la parrilla durante 5 minutos sin que llegara a hervir. Esta mezcla de agua y huevo se vació a un vaso de precipitado de 500 ml colándola con un colador estéril de metal para eliminar los grumos y se agitó por 3-4 minutos con una batidora cuyas aspás también estaban estériles. Después de la agitación, la mezcla se dejó a temperatura ambiente en la campana por 15 minutos. A la mezcla anterior se le agregó un pellet de 500 ml de cultivo de la bacteria *E. coli* NA22 (50 µg/ml de ampicilina) resuspendido en 25 ml de LB; se mezcló bien y se colocaron ~4 ml de la mezcla de huevo y bacteria por cada caja grande. Las cajas se dejaron secar a temperatura ambiente por 3 noches.

Cuando los animales crecen en cajas con huevo tienen una gran cantidad de comida y para colectarlos es necesario limpiarlos con un gradiente de sacarosa. Para limpiar a los animales de la bacteria y el huevo, primero se colectaron en tubos falcon de 15 ml con H₂O Milli-Q estéril o con M9 1X. Los tubos con los animales se centrifugaron 30 segundos a 4000 rpm y se retiró en sobrenadante: este paso se repitió 3-4 veces. Después del último lavado, los animales se resuspendieron en 12 ml de agua fría y se dividieron en 6 tubos falcon de 15 ml (2 ml por tubo). Se añadió 4 ml solución estéril (por filtración) de sacarosa al 50% fría y se mezcló suavemente. Se centrifugó 5 minutos a 50 g seguido de 5 minutos más a 1000 g; esta doble centrifugación permite separar a los animales del huevo/bacteria/agar. Inmediatamente después

de la centrifugación se colectaron los animales de la parte superior con una pipeta estéril de vidrio y se transfirieron a tubos falcon de 15 ml nuevos. Después, estos animales con sacarosa se lavaron 5 veces con H₂O Milli-Q estéril centrifugando 30 segundos a 4000 rpm. Finalmente, el pellet de animales se resuspendió en M9 1X.

4.2 RNA DE INTERFERENCIA (RNAi)

El mecanismo de RNAi fue descrito por primera vez en *C. elegans* como una respuesta al ingreso de una doble cadena de RNA (dsRNA), lo que resulta en la degradación del mRNA específico para el dsRNA que entró [81]. Este mecanismo consiste en la formación de pequeños fragmentos de aproximadamente 22 pb a partir del dsRNA mediante la proteína Dicer. Estos fragmentos son incorporados a un complejo denominado RISC, el cual facilita la unión de los fragmentos de RNA al mRNA blanco y su degradación [82]. La inducción de RNAi en *C. elegans* puede hacerse a través de la inyección de unas cuantas moléculas de dsRNA en la gónada o mediante la alimentación [83]. En el vector PD129.36 de *E. coli* se inserta el gen en estudio quedando flaqueado a ambos lados por el promotor del bacteriófago T7. La inducción de este promotor (mediante IPTG) conduce a la formación del mRNA del gen en ambos sentidos de la cadena de DNA creando así el dsRNA dentro de la bacteria. La cepa de *E. coli* que se utilizó es HT115(DE3), la cual carece de RNAasa III. Los animales normalmente se alimentan de bacterias, su ingestión, trituración y subsiguiente absorción de los contenidos bacterianos en el intestino permite que los dsRNAs ingresen a sus células y se transporten a casi todo el organismo a través de la proteína transmembranal SID-1 [84].

La alimentación fue el método que se utilizó en este trabajo para inducir RNAi. La inactivación del mRNA de los genes se hizo mediante el protocolo propuesto por Fraser *et al.* [85]. Se preparó medio NGM con 30 g de agar por litro y medio de cultivo LB con 50 µg/ml de ampicilina y 12.5 µg/ml de tetraciclina para inducir RNAi en gen seleccionado. El cultivo de bacterias con el gen en estudio se colocó en cajas con medio NGM, 50 µg/ml de ampicilina, 12.5 µg/ml de tetraciclina y 1 mM de IPTG. Las cajas se dejaron a temperatura ambiente por 18 horas, tiempo en el cual se induce el dsRNA en las bacterias; después de ésta inducción, las cajas están listas para usarse. Como control del RNAi se usó el plásmido PD129.36 sin ningún gen inserto, plásmido vacío (PV).

Generalmente el RNAi es muy eficiente, sin embargo, en algunos casos nos interesa comprobar ésta eficiencia mediante RT-PCR, Western blot o inmunotinciones (ver descripción de éstas técnicas más adelante). En la mayoría de los casos durante la comprobación de la eficiencia del RNAi en el laboratorio se obtuvo resultados en donde se disminuyó la expresión del gen en estudio, pero no siempre resultó así. Particularmente cuando analizamos si disminuía el mRNA del gen *ced-9* mediante RT-PCR, encontramos que este mRNA aumentó considerablemente (Figura 8). Este resultado es muy extraño ya que veíamos que los animales RNAi en *ced-9* tenían el fenotipo de aumento de apoptosis de las células germinales que anteriormente se ha reportado para la ausencia de este gen [86]. Con el objetivo de entender este fenómeno, analizamos el experimento.

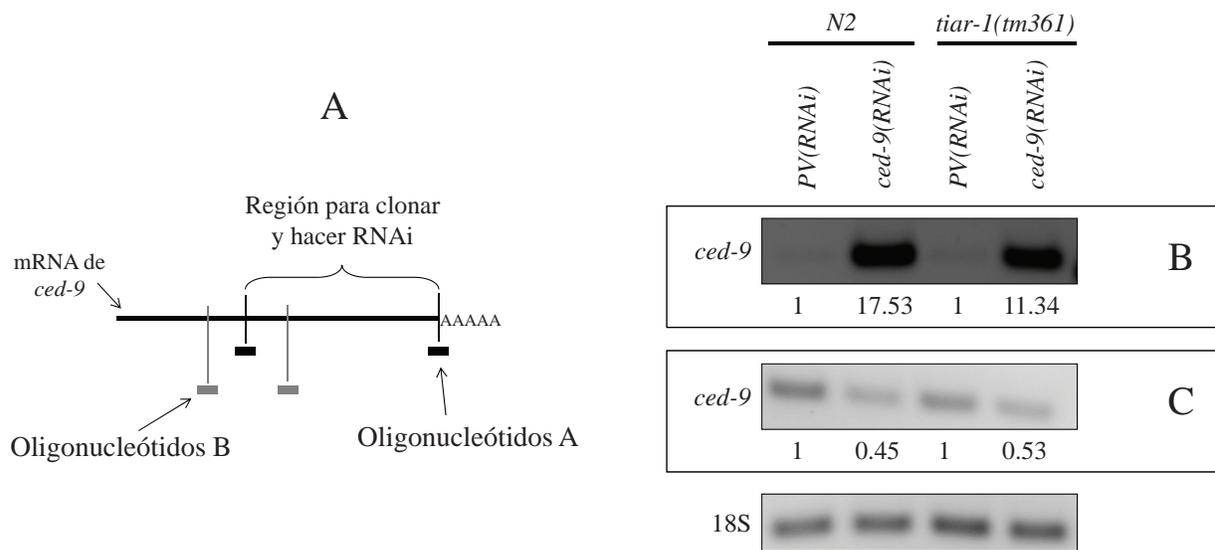


Figura 8| Eficiencia del RNAi en *ced-9*. Para realizar el RT-PCR semicuantitativo, animales de la cepa *N2* y *tiar-1(tm361)* fueron alimentados con bacteria *PV(RNAi)* y *ced-9(RNAi)*. Después de cada condición, se extrajo RNA, se sintetizó cDNA y se realizó el PCR. (A) Posición esquemática de los oligonucleótidos utilizados. (B) PCR de *ced-9* con los oligonucleótidos A. (C) PCR de *ced-9* con los oligonucleótidos B. Los números de debajo de cada panel indican los niveles de expresión. El panel inferior corresponde al control de carga del gel en donde se utilizó el gen 18S. *PV*= plásmido vacío.

Para poder hacer RNAi en el mRNA de *ced-9*, se clonó un fragmento del mRNA en el vector PD129.36 (Figura 8 A). Alimentamos a los animales de las cepas *N2* y *tiar-1(tm361)* con las baterías que tenían este plásmido [*ced-9(RNAi)*] y como control usamos el plásmido vacío [*PV(RNAi)*]. Se extrajo RNA de cada cepa y se hizo cDNA. Inicialmente analizamos los niveles del mRNA de *ced-9* mediante RT-PCR con los oligonucleótidos que se utilizaron para clonarlo (Figura 8 A), y encontramos que su expresión aumentó en los animales *ced-9(RNAi)* tanto para la cepa *N2* como para *tiar-1(tm361)* (Figura 8 B). Después, analizamos la disminución del mRNA de las mismas muestras con otros oligonucleótidos (Figura 8 A), donde uno de ellos se encontraban

fuera de la región clonada, y observamos entonces que sí disminuyó la expresión del mRNA de *ced-9* (Figura 8 C). Los resultados anteriores sugieren que, particularmente, aumentó la expresión de la región con la cual se hizo RNAi. Aunque aún desconocemos porqué está ocurriendo este fenómeno, resulta interesante estudiarlo ya que tiene un impacto para muchos grupos de investigación puesto el RNAi es una técnica ampliamente usada.

4.3 CONTEO DE CUERPOS APOPTÓTICOS

Existen diferentes técnicas para visualizar los cuerpos apoptóticos [87]. En este trabajo se utilizaron tres: microscopía Nomarski, tinción con anaranjado de acridina y fluorescencia de la construcción *ced-1::gfp* (Figura 9). La cepa MD701 tiene fusionada la proteína verde fluorescente (GFP) con CED-1 ($P_{lim-7}ced-1::gfp$). Esta construcción permite visualizar los cuerpos apoptóticos mediante la fluorescencia de la membrana de las células de la vaina que están fagocitándolos (Figura 9 A) [65]. Para contar los cuerpos apoptóticos mediante la tinción con anaranjado de acridina [88], los animales se incubaron en la oscuridad en 200 ml de M9 1X con 100 μ M de anaranjado de acridina; después, fueron recuperados por 1 h (Figura 9 B). En vista de que los cuerpos apoptóticos son refráctiles a la luz también se utilizó la microscopia de tipo Nomarski para observarlos (Figura 9 C) [57]. Para la cepa *ced-1::gfp* y la tinción con anaranjado de acridina el conteo de cuerpos apoptóticos se realizó por microscopia de fluorescencia.

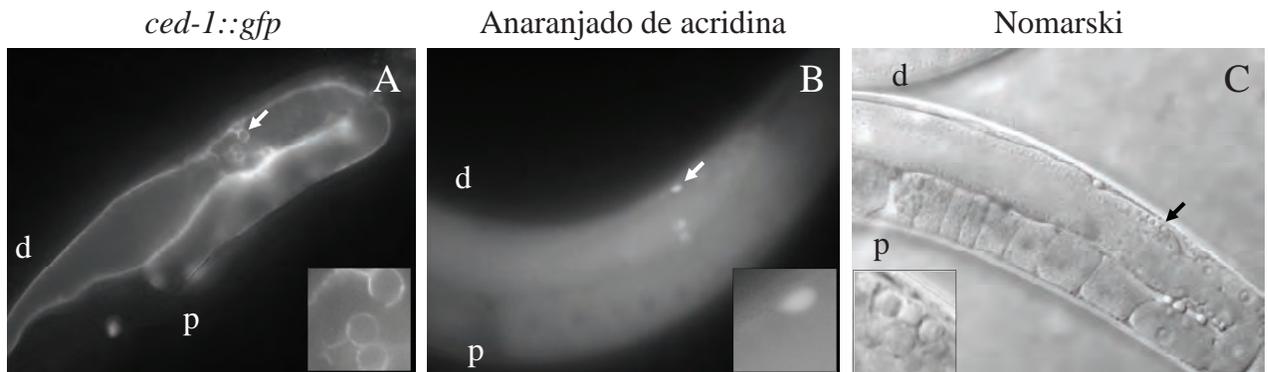


Figura 9| Métodos utilizados en esta tesis para detectar la apoptosis en la gónada de *C. elegans*. (A) La construcción *ced-1::gfp* se expresa en las células de la vaina de la gónada (Figura 2), las cuales se encargan de fagocitar los cuerpos apoptóticos. (B) El anaranjado de acridina se permeabiliza en las células apoptóticas debido a que el pH disminuye en éstas células y se intercala en el DNA de doble cadena. (C) Mediante microscopía Nomarski pueden contarse los cuerpos apoptóticos ya que son refráctiles. Las flechas señalan cuerpos apoptóticos. d= distal, p= proximal.

El montaje de los nematodos para su análisis en el microscopio inició colocando un portaobjetos en medio de otros dos que habían sido cubiertos con tres capas de cinta adhesiva sobre una de sus caras. En el portaobjetos que quedó en medio se depositó una gota de agarosa al 2% previamente disuelta en agua mediante microondas. Sobre la gota se colocó otro portaobjetos transversalmente de tal forma que la agarosa quedara aplanada. Cuando la agarosa ya estaba solidificada se retiró el portaobjetos de arriba. A la agarosa se le agregaron 15 μ l de azida de sodio (NaN_3) 40 mM como anestésico. Los animales destinados a ser analizados se colocaron en la gota de azida de sodio y un cubreobjetos encima.

4.4 CONDICIONES DE ESTRÉS

Las condiciones de estrés utilizadas en esta tesis fueron cinco: estrés oxidativo, estrés osmótico, choque de calor, ayuno y radiación UV [64, 89]. Los tratamientos de estrés osmótico y oxidativo se realizaron en medio M9 1X que contenía 10 mM de NaCl (estrés osmótico) o 10 mM de paraquat (metil viológeno diclorídrico dihidratado -estrés oxidativo-); después de esta incubación, los animales se recuperaron por 1 h. Para inducir estrés por choque de calor, las cajas con animales y alimento se sellaron con parafilm y se colocaron en un baño de agua durante 3 h a 31°C, posteriormente se recuperaron por 4.5 h. Para las condiciones de ayuno, los animales fueron transferidos a cajas sin comida (bacterias) e incubados por 6 h. Para inducir daño al DNA, los animales se irradiaron con 0.1 Joules de rayos UV en el entrecruzador (Stratalinker) modelo 1800 y recuperados por 3.5 h.

Cuando se indujo el ayuno en presencia de los reactivos cicloheximida o puromicina, las condiciones fueron distintas. Los animales fueron transferidos al medio líquido S (ver sección 4.1) sin comida e incubados por 4 h con 10 mM de cicloheximida o 10 mM de puromicina. En este caso, los animales control fueron incubados en medio S con comida y sin reactivo.

4.5 EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL

Los animales se colectaron con medio M9 1X y se hicieron lavados para eliminar el exceso de bacterias. Después, las muestras se centrifugaron y se dejó solo la pastilla de animales quitando la mayor cantidad de M9 1X. A los animales se les agregó 1 ml del reactivo TRIzol (Invitrogen)

y se transfirieron a 2 tubos eppendorf de 1.5 ml (500 μ l por cada tubo). Los tubos se congelaron en nitrógeno líquido (N_2) y se guardaron a $-70^\circ C$. Para extraer el RNA, a un mortero se le agregó N_2 para enfriar el recipiente, una vez que se consumió el N_2 se agregó la mezcla de animales/TRIZOL y más N_2 líquido. La muestra congelada se molió hasta que la pasta que se formó debido al descenso de la temperatura estuviera en fase líquida. Una vez que la muestra se volvía líquida, se le agregó más N_2 líquido para volverla a congelar, esta operación se repitió tres veces. Después, la mezcla se repartió igualmente en dos tubos eppendorf de 1.5 ml y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos.

A cada eppendorf se le agregaron 100 μ l de cloroformo y se agitó 15 segundos en el vortex, posteriormente se incubó a temperatura ambiente por 3 minutos. Después de la incubación, las muestras se centrifugaron a $4^\circ C$ a 13400 rpm durante 15 minutos. Al término de la centrifugación se observaron 3 fases, se extrajo la fase superior (en la fase superior es donde se encuentra el RNA) y se colocó en otro tubo nuevo previamente etiquetado. A cada tubo se le agregaron 250 μ l de isopropanol, se mezcló con el vortex y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se volvieron a centrifugar a 13400 rpm durante 10 minutos a $4^\circ C$, decantando el sobrenadante y se añadieron 500 μ l de etanol al 75%. Se centrifugó a 8500 rpm durante 5 minutos a $4^\circ C$. El etanol se decantó y para asegurarse que no quedara etanol se extrajo con una micropipeta. Los tubos se dejaron secar a temperatura ambiente abiertos durante 5-10 minutos. A cada tubo se le adicionaron 30 μ l de agua tratada con DEPC. Para disolver la pastilla de RNA se mezcló con el vortex e incubó a $60^\circ C$ durante 10 minutos. Posteriormente, cada muestra se cuantificó.

4.6 MICROARREGLO

RNA total extraído de animales que fueron sometidos al ayuno por 6 horas y su respectivo control, se envió a la Unidad de Microarreglos del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. El ensayo de microarreglos fue hecho por técnicos de esta unidad. La tecnología de microarreglos se basa en la capacidad de hibridación del DNA de genes específicos inmovilizados en una placa con cadenas de cDNA de la muestra marcado con un cromógeno.

Con el DNA obtenido de una biblioteca genómica (colecciones en partes o completas de los genes de un organismo, obtenidas comúnmente mediante la técnica de PCR), se generan microplacas que pueden ser de dos tipos: membranas de materiales como nitrocelulosa o nylon y laminillas de vidrio o epóxico [90]. Los oligonucleótidos utilizados durante la síntesis de DNA para las microplacas fueron donados al laboratorio por la Dra. Valerie Reinke (Universidad de Yale, E. U.). Estos oligonucleótidos pertenecen a genes que solo se expresan en ovocitos y a genes intrínsecos de la gónada (genes que se expresan en células germinales independientemente de que vayan a ser ovocitos o espermatozoides), 258 y 508 respectivamente [91].

El RNA obtenido de animales expuestos al ayuno y su control, se utilizó para sintetizar cDNA de cadena sencilla con una molécula fluorescente (como puede ser Cy3 -rojo- y Cy5 -verde-). La hibridización de los microarreglos consiste en aplicar el cDNA marcado sobre la laminilla y cubrirla con un cubreobjetos para permitir que la solución cubra todo el microarreglo. Después de la hibridización, las laminillas se lavan y se secan centrifugándolas [90].

La Unidad de Microarreglos utiliza lectores confocales para leer las laminillas. En estos lectores se hace una reconstrucción de la imagen

utilizando los principios de la microscopia confocal que consiste en la utilización de fotomultiplicadores para registrar la señal. Se utiliza un láser para excitar las moléculas fluorescentes unidas al cDNA y poder obtener una imagen de cada una de las muestras contenidas en el microarreglo. Este procedimiento se hace por cada uno de los fluoróforos obteniéndose dos imágenes, una para el fluoróforo Cy3 (rojo) y una para el Cy5 (verde). En los microarreglos se colocan controles o marcadores que se utilizan para ajustar la señal de fluorescencia para ambos fluoróforos. Una vez obtenidas las imágenes, se pueden combinar para obtener un aspecto visual del microarreglo, en el cual se pueden observar puntos amarillos, verdes, rojos y un sin número de tonalidades entre el verde y el rojo. Si, por ejemplo, para un experimento se marcó la muestra experimental en rojo y el control en verde, todos aquellos puntos que se ven rojos o tonalidades anaranjadas, pueden ser interpretados como genes que aumentaron su expresión. Los puntos verdes o tonalidades entre el amarillo y el verde serán aquellos genes que disminuyeron su expresión. Y finalmente los puntos amarillos representan a los genes que en ambas condiciones se expresan de igual forma [90].

Para la obtención de los valores cuantitativos de cada una de las señales de fluorescencia contenidas en el microarreglo, se requiere de un programa (Pro Analyzer) que analice las imágenes. La interpretación de los resultados obtenidos del estudio de las imágenes requiere de un análisis estadístico (Gen Arise Microarray) que discrimine entre los miles de datos que se obtienen. El análisis de los datos del microarreglo lo realizó el Dr. Jorge Ramírez Salcedo, encargado de la Unidad de Microarreglos.

4.7 ANÁLISIS DE LA MUTACIÓN *tm361* Y CLONACIÓN DE LA DELECCIÓN *ok144*

Aunque los animales mutantes *tiar-1(tm361)* tienen una delección genómica de 579 pb entre las posiciones 512 y 1090, se analizó si éstos expresaban un transcrito. Mediante RT-PCR se encontró que los animales *tiar-1(tm361)* expresaban un transcrito de 1054 pb (Figura 10 A). Este transcrito se clonó en el vector TOPO (Invitrogen) y se mandó a secuenciar completo. Encontramos que el transcrito no está en marco de lectura ya que pierde 232 pb del ORF original entre las posiciones 242 y 475. Analizamos informáticamente si este transcrito codificaba para una posible proteína truncada, pero no fue el caso. Los resultados anteriores sugieren que aunque los animales *tiar-1(tm361)* generan un transcrito, éste no llega a generar una proteína truncada; por lo tanto, consideramos a la delección *tm361* como nula.

Tanto la delección *tm361* como *tm2923* estaban anotadas en la base de datos de *C. elegans*; sin embargo, la delección *ok144* no estaba descrita, solo se mencionaba el tamaño de la delección y los oligonucleótidos que se utilizan para amplificarla. Debido a lo anterior, decidimos amplificar la delección con los oligonucleótidos mencionados en la base de datos a partir de DNA genómico que se extrajo de manera estándar por fenol-cloroformo de animales *tiar-3(ok144)* (Figura 10 B). Después, esta amplificación se clonó en el vector TOPO (Invitrogen) y se secuenció por completo. Encontramos una delección de 1521 pb entre las posiciones 1554 y 3074. Los oligonucleótidos usados para clonar la delección *ok144* fueron: externos, 5'-CACACATCGGTCTTCCACAC-3' y 5'-AATGAAACACCGGAAACTCG-3'; internos, 5'-TGCAATTGTGTTGCAGGAAT-3' y 5'-AA AAGAGTGGCTGGCTCGTA-3'.

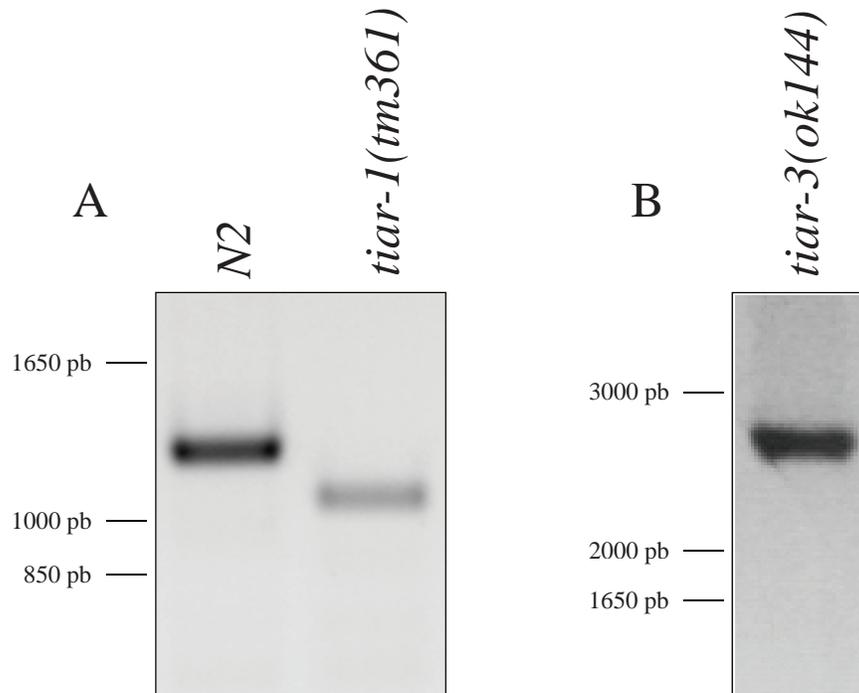


Figura 10| Expresión del mRNA de *tiar-1* en animales *tiar-1(tm361)* y delección *ok144* en animales *tiar-3(ok144)*. (A) Para realizar el RT-PCR, se extrajo RNA total de animales de la cepa *N2* y *tiar-1(tm361)*, se sintetizó cDNA y se realizó el PCR con oligonucleótidos del codón de inicio al codón de paro. (B) Se extrajo DNA genómico de la cepa *tiar-3(ok144)* y se hizo un PCR con los oligonucleótidos mencionados en la base de datos de *C. elegans* para conocer exactamente la delección. En ambos caso, los fragmentos amplificados se clonaron en el vector TOPO (Invitrogen) y se mandaron a secuenciar.

4.8 ESTUDIOS DE FENOTIPO

Para estudiar los defectos en la línea germinal de los animales *tiar-1(tm361)*, se montaron animales de un día de adultos y fueron observados en microscopía Nomarski. Cuando analizamos el fenotipo a 25°C, pusimos larvas L1 a esta temperatura debido a que los animales *tiar-1(tm361)* son estériles a esta temperatura.

Los estudios de fertilidad se hicieron colocando de manera

individual hermafroditas L4 en cajas chicas, y éstos fueron transferidos cada 24 h a cajas nuevas por tres días (25°C) o cuatro días (20°C). 24 h después de haber movido a los animales, se analizaron las cajas en busca de embriones; los embriones que encontramos se consideraron muertos debido a que no eclosionaron en ese tiempo. 48 h después de haber movido a los animales, se analizaron las cajas y se contaron las larvas (hijos). La cepa *N2* fue usada como control. Para obtener más machos usamos la cepa *him-8(e1489)*, la cual produce aproximadamente un 30% de machos [2]. Estos animales los cruzamos con la cepa *tiar-1(tm361)* y probamos la fertilidad de los machos mediante cruza con los animales *fog-2(q71)*, los cuales solo producen ovocitos [92]. De estas cruza se contó la progenie y letalidad embrionaria como se mencionó antes.

Para contar el número de hijos después del estrés, expusimos animales de un día de adultos de las cepas *N2* y *tiar-1(tm361)* a las condiciones de estrés mencionadas anteriormente. Después, se recuperaron los animales poniéndolos en cajas individuales y dejándolos toda la noche para que tuvieran hijos. Al día siguiente, se analizaron las cajas de manera individual y se contó el número de hijos que tuvieron.

4.9 NORTHERN BLOT

Para realizar el Northern blot, el RNA total de las muestras en estudio se separó en un gel desnaturizante; 50 ml del gel contiene 0.5 g de agarosa, 36.1 ml de H₂O tratada con DEPC, 8.9 ml de formaldehído al 37% y 5 ml de MOPS 10X. La solución de MOPS 10X se preparó con 3.3 ml de acetato de sodio 3 M pH 5.2, 10 ml de EDTA 0.5 M pH 8 y 20.93 g de MOPS, esto se afora a 500 ml con H₂O DEPC y se ajustó el pH a 7 con NaOH 5N. En primer orden se añadió al agua la agarosa y se

fundió en el microondas. Cuando la temperatura descendió se incorporó el formaldehído y MOPS en la campana de extracción

Una vez solidificado el gel, se vació el buffer de MOPS 1X justo al borde superior del gel, los pozos se llenaron con el mismo amortiguador utilizando una pipeta pasteur. A cada muestra se le agregó 3 μ l de MOPS 10X, 15 μ l de formamida, 5.4 μ l de formaldehido al 37%, 3.5 μ l de buffer de carga para RNA, 2 μ l de bromuro de etidio y se aforó a 30 μ l con H₂O DEPC. Antes de cargar la muestra, el RNA se desnaturalizó incubando los tubos durante 15 minutos a 68°C y posteriormente se pusieron en hielo por 2 minutos. Debido a que el gel no estaba sumergido en el amortiguador, cuando las muestras migraron alrededor de 2 cm se apagó la fuente de poder y los pozos se llenaron nuevamente con el amortiguador de electroforesis.

Para transferir las muestras del gel a la membrana, se cortaron 8 trozos correspondientes al tamaño del gel y 2 tiras de 50 cm de largo de papel para cromatografía Whatman con el mismo ancho del gel, además de un pedazo de membrana de nylon ligeramente más grande que el área del gel. En un refractario de vidrio se colocó la solución de transferencia SSC 20X (un litro contiene 175.3 g de NaCl y 88.2 g de citrato de sodio). Sobre el refractario se montó un vidrio a lo largo del refractario (el vidrio debe de ser más angosto que el ancho del refractario). Las tiras de papel Whatman se sumergieron por completo en la solución de transferencia formando un puente alrededor del vidrio. El gel se puso invertido sobre el papel de tal forma que los pozos estaban hacia abajo. Se colocaron tiras de parafilm del largo del refractario al borde de los cuatro lados de la membrana de nylon que sobresalen del gel sin que éstas se sobrepongan con el gel. Dos pedazos de papel Whatman se humedecieron con SSC 20X y se pusieron encima de la membrana de nylon, encima de estos se colocaron los otros 6 cuadros de papel

Whatman secos. Posteriormente se colocó encima un paquete de toallas absorbentes, después un vidrio de un área considerable para colocar sobre él un libro. Las toallas absorben la solución de transferencia, lo que permite que el flujo sea unidireccional del refractario de vidrio a las toallas transfiriendo el RNA hacia la membrana. Esta transferencia se dejó toda la noche y al día siguiente el RNA se fijó a la membrana con un entrecruzador (Stratalinker) de luz ultravioleta a 1400 Joules.

Para la elaboración de la sonda radiactiva se extrajo el gen en estudio del plásmido donde estaba inserto usando los kits Plasmid Midi y Qiaex II Agarose Gel Extraction Protocol (QIAGEN) y se sintetizó usando el kit Random Primers DNA Labeling System (Invitrogen). Se colocaron 5 μ l del DNA de cada gen en un tubo eppendorf y se agregaron 13 μ l de H₂O Milli-Q estéril. En otro tubo se pusieron 100 μ l de DNA de salmón, ambos tubos se hirvieron durante 5 minutos y después se pusieron en hielo por 2 minutos. Al tubo con el insertó se le agregaron 2 μ l de dATP, 2 μ l de dTTP y 2 μ l de dGTP además de 15 μ l de oligonucleótidos al azar (Random Primers). Al final, se adicionaron 5 μ l del nucleótido radiactivo α -dCTP (Amersham, R. U.) y 1 μ l de la enzima DNA polimerasa III (Klenow Fragment). Para que se sintetice la sonda, la reacción se dejó por 1 hora a temperatura ambiente y dentro de un contenedor de plomo especial para radioactividad.

La membrana se prehibridó en un tubo con tapa manteniendo la orientación del RNA hacia adentro. Al tubo se le agregaron 10 ml de la solución de hibridación previamente calentada a 60°C y los 100 μ l de DNA de salmón que se hirvieron. El frasco con la membrana se preincubó a 65°C durante 1 hora en un rotor a 9-11 rpm. La solución de hibridación se preparó de la siguiente forma: 15 ml de solución Denhardt's, 75 ml de SSC 20X, 150 ml de la solución de fosfatos 0.1 M pH 6.5 y 6 ml de SDS, aforando a 300 ml con agua Milli-Q estéril. La

solución Denhardt's está compuesta de 2 g de ficoll, 2 g de PVP y 2 g de BSA, se aforó a 100 ml y se esterilizó por filtración. La solución de fosfatos 0.1 M pH 6.5 se elaboró con 25.5 ml de Na_2HPO_4 1 M y 74.5 ml de NaH_2PO_4 1 M, estos 100 ml se llevaron a 1000 ml (0.1 M) y se esterilizó por filtración. Por último, la solución SDS se elaboró con 5 g de SDS aforando a 50 ml con agua tratada con DEPC y esterilizando por filtración.

Cuando la reacción de la sonda terminó, se agregaron 5 μl del Stop Buffer y se eliminaron los nucleótidos de la sonda no incorporados usando las columnas de Sephadex G-50 DNA Grade F (General Electric). La mezcla se colocó al centro de la columna y se centrifugó por 2 minutos a 0.7 rcf dentro de un tubo eppendorf. La muestra de DNA marcado radioactivamente se hirvió durante 5 minutos y después se puso en hielo por 2 minutos más. La sonda se añadió al frasco con la membrana y se incubó toda la noche a 65°C en rotación.

Cuando el periodo de incubación con la sonda radiactiva finalizó, la membrana se lavó con las siguientes soluciones: 1) 20 ml de SSC 20X, 2 ml de SDS 10X y 178 ml de agua Milli-Q; y 2) 5 ml de SSC 20X, 2 ml de SDS 10X y 193 ml de agua Milli-Q. La sonda radiactiva, el DNA de salmón y la solución de hibridación se recuperaron en un tubo falcon de 50 ml que se guardó en un contenedor para radiactividad a -20°C. La membrana se lavó añadiendo 15 ml de la primera solución de lavado (precalentada a 60°C) girando el frasco, después se desecha la solución. Al final se incorporó el resto de la solución de lavado y se incubó por 30 minutos a 65°C en rotación. La misma operación se realizó con la segunda solución de lavado y se desechó.

La membrana se recuperó y envolvió en plástico autoadherente para evitar que se secase. La membrana se expuso durante un día en la pantalla amplificadora de Amersham Biosciences. Para detectar la

marca, la pantalla se escaneó en el lector marca Storm 840 de Molecular Dynamics. La membrana también se expuso de uno a tres días a un film para rayos X dentro de un cassette de Spectroline a -70°C . El film se reveló en un cuarto oscuro sumergiéndolo primero en el revelador Kodak, después en agua y al final en fijador.

4.10 PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL ANTICUERPO CONTRA TIAR-1 Y WESTERN BLOT

La producción del anticuerpo contra TIAR-1 se hizo a través del uso de un péptido sintético. Para obtener la secuencia del péptido se analizó la secuencia total de la proteína TIAR-1 y de sus dos homólogos TIAR-2 y TIAR-3 ya que el parecido entre estas tres proteínas es alto. En resumen, la apropiada selección de la secuencia del péptido consistió en seleccionar áreas ricas en 2-3 aminoácidos cargados (e.i. K, R, H, D o E). Dentro de estas secuencias, se seleccionaron subsecuencias ricas en S, T, N, Q, P o Y. Finalmente, se calculó la hidrofobicidad de toda la proteína y se analizó que las secuencias seleccionadas estuviesen dentro de las zonas más hidrofílicas para asegurar la exposición del epítipo de la proteína nativa hacia el anticuerpo. También se analizó que la secuencia del péptido seleccionado para TIAR-1 no estuviera conservada en TIAR-2 y TIAR-3. La secuencia del péptido usada fue QEKPSHYNEKSYDE, ubicada entre los aminoácidos 218-231. Ésta secuencia se mandó a Sigma, y la empresa se encargó de sintetizar el péptido y de inmunizar y sangrar a los conejos.

La purificación por afinidad del anticuerpo se hizo utilizando el protocolo para el reactivo SulfoLink® Coupling Gel de PIERCE. La purificación por afinidad consiste primero en acoplar el péptido a la

resina en una columna y en segundo lugar pasar los sangrados a través de la resina para que el anticuerpo se acople al péptido. Finalmente, el anticuerpo se eluye y se almacena.

La preparación de la columna (PIERCE) se hizo insertando un filtro hasta la parte inferior; después, se agregó 2 ml de la resina SulfoLink®. La columna se equilibró con 4-6 volúmenes de coupling buffer (50 mM de Tris y 5 mM de EDTA-Na pH 8.5). Para acoplar el péptido a la resina, primero se disolvieron 4 mg del péptido en 2 ml de coupling buffer, posteriormente se agregó el péptido a la columna para que se acoplara a la resina. La columna se tapó por sus dos extremos y se agitó a temperatura ambiente por 15 minutos. Después de la agitación, la columna se drenó y se lavó 3 veces con 2 ml de coupling buffer.

Para bloquear las cargas no específicas se agregó 2 ml de quenching reagent (50 mM de L-cisteína preparada recientemente) y se agitó por 15 minutos a temperatura ambiente. Después, la columna se incubó verticalmente por 30 minutos a temperatura ambiente. Para realizar los lavados de la columna, ésta se drenó y se colocó un filtro en la parte superior de la resina con cuidado de no compactarla. Posteriormente se hacen lavados con 10-12 volúmenes de wash solution (1 M de NaCl). Después de este paso, la columna se puede almacenar verticalmente a 4°C o continuar con la purificación. La columna se lavó una vez con 6 ml de binding/wash buffer (PBS 1X) y se aplicó 1 ml del sangrado obtenido del conejo. Se agregó 200 µl de binding/wash buffer y la columna se incubó verticalmente por 1 h a temperatura ambiente para permitir la unión del anticuerpo al péptido. Después de la incubación, la columna se lavó con 16 ml de binding/wash buffer.

Para eluir el anticuerpo se agregó 8 ml de elution buffer (100 mM de glicina pH 2.5-3). Cada 1 ml del eluido se colectó en tubos eppendorf, el anticuerpo normalmente se obtiene del tubo 1-4. Las muestras se

neutralizaron agregando 50 μl de 1 M de Na_2HPO_4 . Se cuantificó la proteína por la técnica de Bradford usando 10 μl de cada muestra. La columna con el péptido acoplado se puede reusar hasta 10 veces, para ello inmediatamente después de coleccionar el anticuerpo se lava con 16 ml de binding/wash buffer. Después, se agregó 2 ml de binding/wash que contenía 0.05% de azida de sodio. La columna se tapó y se guardó verticalmente a 4°C.

Para realizar el Western blot, brevemente, 100 animales adultos de un día se coleccionaron en 9 μl de PBS 1X, 2.4 μl de buffer de carga 6X y 2.4 μl de DTT 1M. Posteriormente, las muestras incubaron 5 minutos a 95°C para extraer las proteínas. Las muestras se cargaron en un gel estándar de poliacrilamida al 10%; subsecuentemente el gel fue transferido a una membrana Immobilon-P PVDF (Millipore) mediante procedimientos estándares. Los anticuerpos primarios utilizados para incubar las membranas fueron: TIAR-1 (1:500), CED-9 (1:500) y α -tubulina (1:1000). Como anticuerpos secundarios se usaron anti-conejo (1:1000) y anti-ratón (1:1000) acoplados a HRP. El kit Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce) se usó para detectar la señal del anticuerpo secundario.

4.11 INMUNOTINCIONES

Para realizar las inmunotinciones de animales completos se usó el protocolo de Finney y Ruvkun [93]. Brevemente, los animales completos se fijaron con la solución Ruvkun (80 mM de KCl, 20 mM de NaCl, 10 mM de EGTA, 5 mM de espermidina, 15 mM de PIPES, metanol al 25% y paraformaldehído al 1%), posteriormente se congelaron lentamente en un baño de etanol y hielo seco. Las muestras

fueron tratadas con 1% de β -mercaptoetanol seguida con 10 mM de DTT y finalmente 0.3% de peróxido de hidrógeno. La concentración que se usó para el anticuerpo de TIAR-1 fue de 1:100 y 1 ng μl^{-1} de DAPI. Como anticuerpo secundario se usó un anti-conejo (1:100) Alexa Fluor 488 (Molecular Probes). Las muestras fueron montadas en medio vectashield (Vector Laboratories) para analizarlas.

Para hacer inmunotinciones de gónadas y embriones, éstos fueron diseccionados, colocados sobre placas de polilisina y congelados en nitrógeno líquido. Posteriormente, las muestras fueron sumergidas en metanol a -20°C por un minuto; después, se lavaron con PBT dos veces. Las muestras fueron fijadas en una solución que contenía PBS 1X, 3.7% de paraformaldehído, 80 mM de HEPES, 1.6 mM de MgSO_4 y 0.8 mM de EGTA por 30 minutos a temperatura ambiente. Las placas se lavaron una vez más con PBT por 10 minutos y se incubaron con el anticuerpo primario en una cámara húmeda durante toda la noche a 4°C : TIAR-1(1:100), CGH-1(1:25), PGL-1(1:10000) y RME-2 (1:100). Como anticuerpos secundarios se usó un anti-conejo (1:100) Alexa Fluor 488 (Molecular Probes) y un anti-rata (1:100) (Jackson ImmunoResearch Laboratories). Las muestras fueron montadas en medio vectashield (Vector Laboratories) para analizarlas.

4.12 RT-PCR

Con el RNA total extraído se sintetizó el cDNA usando el protocolo para la enzima retrotranscriptasa de Promega. 1 μg de muestra de RNA junto con 1 μl de oligonucleótido dT se aforaron a 5 μl , incubaron 5 minutos a 70°C y posteriormente se pusieron en hielo por otros 5 minutos. 15 μl del mix de transcripción reversa (4 μl de ImProm-II 5X

reaction buffer, 2.4 μ l de $MgCl_2$ 25 mM, 1 μ l de dNTPs 10 mM, 1 μ l de la enzima ImProm-II y se aforó a 15 μ l) se agregaron a la muestra anterior y se incubaron en el termociclador con el programa estándar para la síntesis de cDNA.

Los oligonucleótidos utilizados para los RT-PCR de los artículos están anotados en ellos y los usados en los resultados de esta tesis fueron: *ced-4C* y *L* (5'-TTCGAGAGTATCACGTGGATCGAG-3' y 5'-TACAACCTGACGTGACATGCTCCAC-3'), *ced-3* (5'-GAGCAAGATCTCGTTCTCGATCG-3' y 5'-GTCGAAAACACGGCTTATGGTTG-3'), *act-4* (5'-ATGTGTGACGACGAGGTTGCC-3' y 5'-CTGGAAGAGAGCCTCTGGGC-3') y *csp-2* (5'-ATCAGGGACTTCTTTATGGTGTAGATG-3' y 5'-CTAGACGTCGAAGAATAGTTGTTTTGTG-3').

4.13 CONSTRUCCIONES

Las construcciones de los transgenes que se generaron se hicieron usando la tecnología MultiSite Gateway® (Invitrogen) que se basa en la especificidad de recombinación del DNA. Esta metodología consiste en generar 3 plásmidos que se conocen como de entrada. El primer plásmido de entrada se llama 5' (pDONRP4-P1R), el segundo plásmido tiene la secuencia intermedia (pDONRP201/221) y el tercer plásmido se llama 3' (pDONRP2R-P3). El objetivo de tener 3 plásmidos es poder fragmentar el gen que se quiere generar y poder fusionarle una proteína fluorescente como la GFP. Cada uno de los plásmidos de entrada se genera mediante recombinación homóloga. Primero se realiza el PCR del fragmento que se quiere clonar con los extremos marcados con las secuencias de recombinación compatibles con las secuencias del

plásmido de entrada. Con los tres plásmidos de entrada listos se hace una segunda recombinación junto con otro plásmido en donde se insertará cada región del transgene (pCG150 para la biobalística o pCFJ151 para la inserción monocopia y/o biobalística). Esta recombinación genera el plásmido con las tres regiones y se denomina plásmido de expresión. El plásmido de expresión contiene la secuencia del gen de interés fusionado a la GFP y además contiene el gen de rescate *unc-119*. Los animales mutantes en el gen *unc-119* casi no se mueven y no pueden generar larvas “dauer” (Figura 1). Al insertar el plásmido de expresión en el nematodo, los animales se mueven normalmente y forman “dauer”; esto permite identificar fácilmente aquellos animales en los que se insertó el plásmido de expresión.

Los oligonucleótidos utilizados para generar los transgenes de los artículos están anotados en ellos y los usados para clonar el ORF y el 3' UTR de *csp-2B* en el plásmido 3' (pDONRP2R-P3) fueron 5'-GGGG ACAGCTTTCTTGTACAAAGTGGCCATGATGTGTGAGGACGCA TCAGATG-3' y 5'-GGGGACAACCTTTGTATAATAAAGTTGACA AATAAAACACTTTATTGACTAG-3'.

4.14 BIOBALÍSTICA

La biobalística consiste en dispararles a los animales perlas de oro, las cuales llevan en su superficie el transgene de interés y un gen de selección (*unc-119*). Esta técnica permite que el plásmido se inserte en el genoma (aunque desconocemos en que región lo hace) o que quede como arreglo extracromosomal. Todo el procedimiento se realizó lo más estéril posible ya que el protocolo dura varios días y las cajas pueden contaminarse muy fácilmente.

Para obtener los animales para la biobalística, se colectaron 4 cajas grandes de NGM de larvas L1 *unc-119* que se quedaron sin comida a 20°C. Estas larvas se distribuyeron equitativamente en 6 cajas de huevo y esperamos a que fueran adultos jóvenes. Una vez que llegaron a ser adultos, los animales se colectaron (no es necesario limpiar a los animales con sacarosa). El pellet de los animales se llevó a 3 ml con M9 1X y se repartió en 10 cajas medianas de NGM con comida NA22 repartida en toda la caja (estas cajas pueden no tener comida ya que el pellet de animales tiene la comida de las cajas de huevo y si no tienen comida se secan más rápido). Los 300 µl de gusanos se colocaron justo en el centro de la caja mediana porque conforme pasa el tiempo la gota de animales se expande. Durante el tiempo en que se secan las cajas (~15 minutos) o antes de preferencia, se puede precipitar el plásmido en las perlas de oro.

Antes de precipitar el plásmido, las perlas se hidrataron primero. Se pesó 25-50 mg de perlas de oro de 1 micron (Bio-Rad 1652263) y se colocaron en un tubo eppendorf de baja retención. Se agregó 1 ml de etanol al 70%, se vortexearon durante 5 minutos y se dejaron a temperatura ambiente durante 15 minutos. Las perlas se centrifugaron 5 segundos en la minisping y se eliminó el sobrenadante. Se agregó 1 ml de H₂O Milli-Q estéril, se vortexeó 1 minuto, se dejó a temperatura ambiente 1 minuto, se centrifugó y se quitó el sobrenadante; este lavado con H₂O Milli-Q estéril se repitió 3 veces. Al final, las perlas se resuspendieron en 500 µl de glicerol al 50% estéril. Este stock puede almacenarse a 4°C y usarse hasta por 3-4 semanas.

Para precipitar el plásmido en las perlas se tomó 100 µl del stock de perlas hidratadas en un tubo eppendorf de baja retención (asegurándose de que estuvieran bien resuspendidas a la hora de tomar los 100 µl). Mientras el tubo se agitaba en el vortex en el número 3, se le agregó

en orden lo siguiente: el plásmido de expresión (13 μg en un volumen de $\sim 30 \mu\text{l}$), 100 μl de CaCl_2 2.5 M y 40 μl de espermidina fría 0.1 M. Se continuó vortexeando la muestra por 2 minutos más a la misma velocidad y se dejó a temperatura ambiente durante 1 minuto. La muestra se centrifugó y se quitó el sobrenadante; se le agregó 280 μl de etanol al 70% y se resuspendió el botón golpeando suavemente el fondo del tubo con un dedo. La muestra se centrifugó y se quitó el sobrenadante; se le agregó 280 μl de etanol al 100% y se resuspendió el botón golpeando suavemente el fondo del tubo con un dedo. La muestra se centrifugó y se quitó el sobrenadante; se le agregó 100 μl de etanol al 100% y se resuspendió el botón golpeando suavemente el fondo del tubo con un dedo. Ésta es la preparación de DNA que se usó para la biobalística.

Una vez que teníamos las 10 cajas medianas con 300 μl de animales *unc-119* y la preparación de DNA, se bombardearon los gusanos usando el equipo BioRad Biolistic PDS-100/He. Previamente, se esterilizó por autoclave la tapa de retención, los microcarriers (son los de color ámbar), el microcarrier holder (donde van los microcarriers), las rejillas y los adaptadores de los microcarriers. Se limpió la cámara con etanol al 70%. Se abrió la válvula del tanque de helio asegurándose de que la presión del He sea >2200 psi. Para la biobalística se pueden utilizar discos de ruptura de 1500 a 2200 psi. Se prendió la cámara y la bomba de extracción. Se hizo un disparo de prueba antes de comenzar el experimento: se introdujo en isopropanol el disco de ruptura; se colocó en la tapa de retención, se puso en la cámara asegurándose de estar bien apretada y se cerró la puerta; se presionó vacío hasta 27 In de Hg y cuando alcanzó los 27 In de Hg se presionó el botón de hold; se presionó el botón de fire sosteniéndolo hasta que el disco de ruptura se rompió; se liberó el vacío (posición de vent), se abrió la puerta y se desenroscó la tapa de retención y tiró el disco de ruptura.

Para bombardear a los animales, se colocaron los microcarriers en sus adaptadores (solo hay 5 adaptadores así que se repitió esta operación para los 10 disparos). Se vortexeó la preparación de DNA en velocidad media, inmediatamente se tomaron 10 μ l de las perlas y se pusieron en el centro de cada microcarrier dejando que el etanol se evaporara. Se colocó la rejilla al fondo del microcarrier holder, después se puso boca-abajo los microcarriers con el DNA y se disparó: se introdujo en isopropanol el disco de ruptura; se colocó en la tapa de retención, se puso en la cámara asegurándose de estar bien apretada y se cerró la puerta; se presionó vacío hasta 27 In de Hg y cuando alcanzó los 27 In de Hg se presionó el botón de hold; se presionó el botón de fire sosteniéndolo hasta que el disco de ruptura se rompió; se liberó el vacío (posición de vent), se abrió la puerta y se desenroscó la tapa de retención y tiró el disco de ruptura. Estos pasos se repitieron para cada una de las 10 cajas.

Al término de los disparos, se colectaron los animales bombardeados con M9 1X y se resuspendieron en un volumen final de 15 ml. Se colocó 0.5 ml de los animales en una caja grande enriquecida con peptona y comida NA22 repartida en toda la caja (30 cajas en total); los animales se dejaron crecer a 24°C. Un litro de medio NGM enriquecido con peptona se preparó de la siguiente manera: 1.2 g de NaCl₂, 20 g de bacto triptona y 25 g de agar bacteriológico fueron aforados a 1 litro y esterilizados por autoclave; una vez que el medio se enfrió a ~50°C, se agregaron las siguientes soluciones en condiciones de esterilidad: 1 ml de colesterol 5 mg/ml, 1 ml de MgSO₄ 1 M, 25 ml de buffer de fosfatos de potasio pH 6 (este buffer se prepara mezclando 13.2 ml de K₂HPO₄ 1 M con 86.8 ml de KH₂PO₄ 1 M), 1 ml de nistatina 12.35 mg/ml y 1 ml de ampicilina 50 mg/ml. Una vez gelificadas las cajas se le agregó 1 ml de un cultivo de *E. coli* NA22 repartiéndola en toda la caja y se dejaron dos días para que se secan. A los 21 días después de bombardear a los

animales, se buscaron gusanos con fenotipo silvestre (que se movieran bien o que hayan formado “dauers”) en las cajas grandes como indicio de que el plásmido se estaba expresando.

4.15 INSERCIÓN MONOCOPIA (MosSCI)

La inserción monocopia consiste en ingresar mediante microinyección un conjunto de plásmidos que incluyen un plásmido con el transgene de interés y un gen de selección (*unc-119*). Esta técnica permite que el plásmido que lleva el transgene se inserte en una región bien definida del genoma mediante recombinación homóloga, generando así una sola copia del transgen. El resto de los plásmidos con los que se microinyecta permiten esta recombinación y sirven como marcadores positivos y negativos.

El plásmido a microinyectar se generó como se mencionó anteriormente (ver apartado de construcciones). El conjunto de plásmidos que se microinyectó contenía los siguientes componentes: 10-50 ng/μl del plásmido pCFJ151 con transgene y gen de rescate, 50 ng/μl de pCFJ601 (P_{eft-3} *transposasa*), 10 ng/μl de pMA122 (P_{hsp} *peel-1*), 10 ng/μl de pGH8 (P_{rab-3} *mCherry* -pan-neuronal-), 2.5 ng/μl de pCFJ90 (P_{myo-2} *mCherry* -músculo de la faringe-) y 5 ng/μl de pCFJ104 (P_{myo-2} *mCherry* -músculo de cuerpo-), si la concentración final de este mix no alcanza los 100 ng/μl, se agrega DNA ladder para alcanzar esta concentración.

Los animales que se inyectaron con este mix son de la cepa EG6699, los cuales son mutantes en el gen *unc-119* y tienen la secuencia de recombinación inserta en el cromosoma II que les permite recombinar solo con el plásmido pCFJ151. Esta recombinación se lleva

a cabo por la transposasa que es codificada por el plásmido pCFJ601. Los marcadores pMA122, pGH8, pCFJ90 y pCFJ104 nos permitieron hacer una correcta selección de los animales en los que ha ocurrido la inserción monocopia. Así, si los plásmidos quedaron en un arreglo extracromosomal observaríamos animales con la faringe o el músculo que envuelve al cuerpo rojos, y a nosotros nos interesan los animales que no tienen esta señal. Para facilitar la obtención de los animales con inserción monocopia y no estar montando un gran número de ellos para observarlos al microscopio en busca de los que no son rojos de la faringe o el músculo, el vector pMA122 ayuda en este proceso. Este plásmido acarrea una proteína que es letal para los animales bajo un promotor de choque de calor. Si después de la microinyección encontramos animales silvestres, ponemos a éstos bajo un choque de calor de 2 h a 34°C; después, esperamos a que se recuperen 4-6 h y buscamos a los animales que sobrevivieron. Los animales con fenotipo silvestre que tenían los plásmidos de manera extracromosomal murieron ya que tenían el plásmido pMA122 (junto con los otros 5 plásmidos), mientras que los animales silvestres que no murieron no contenían el plásmido pMA122 y la inserción monocopia se llevó a cabo correctamente.

Los animales de la cepa EG6699 se crecieron a 15°C. Un día antes de la microinyección seleccionamos a larvas L4 para tener adultos jóvenes. Esta edad es la recomendable para el experimento, ya que adultos mayores acumulan embriones dentro de ellos y hace más difícil tener acceso a la gónada. La microinyección se realizó en la gónada siguiendo los procedimientos estándares [94] y usando el microscopio invertido OLYMPUS IX51. Después de microinyectar a los animales de la cepa EG6699, éstos se pusieron a 24°C para su recuperación en cajas chicas NGM con comida (3 animales por placa). Una vez que las cajas se quedaron sin comida, se buscó animales silvestres que formaron

“dauers” y se procedió a seleccionar aquellos en los que ocurrió la inserción monocopia como se mencionó anteriormente. Dadas las características de este protocolo se recomienda cruzar a los animales transgénicos con la cepa silvestre *N2* (retrocruzas) por lo menos 3 veces.

4.16 PERFILES POLISOMALES

Para obtener los animales para los perfiles polisomales, se colectaron 8 cajas grandes de NGM de larvas L1 que se quedaron sin comida a 20°C. Estas larvas se distribuyeron equitativamente en 12 cajas de huevo (ver sección 4.1) y esperamos a que fueran adultos. Una vez que llegaron a ser adultos, los animales se colectaron y se limpiaron por sacarosa, la mitad de ellos se uso como control y la otra mitad se ayunó por 6 h en cajas NGM sin comida. Una vez que los animales del control y del ayuno se colectaron, se centrifugaron por última vez y se quitó todo el líquido sobrenadante. Con ayuda de una pipeta Pasteur de vidrio se tomó 0.5 ml del pellet de gusanos (que equivale a 0.5 g) y se gotearon en N₂ líquido. Cuando se evaporó el N₂ líquido, las gotas congeladas se transfirieron a un tubo falcon de 15 ml y se almacenaron a -70°C.

Para hacer el gradiente se prepararon soluciones al 15, 25, 35, 45 y 60% de sacarosa en buffer de gradiente (25 mM de Tris-HCl pH 8.0, 140 mM de NaCl, 10 mM de Mg Cl₂, 1 mM de DTT y 0.2 mg/ml cicloheximida). En un tubo de ultracentrífuga (14x95 mm, Beckman) se colocaron 2.2 ml de cada una de las concentraciones de mayor a menor y se dejó en posición horizontal a 4°C durante toda la noche. 0.5 g de la muestra de animales se homogenizó con un mortero, con N₂ líquido y con 800 µl de buffer de lisis (25 mM de Tris-HCl pH 8.0, 300 mM de NaCl, 10 mM de MgCl₂, 1 mM de DTT, 0.2 mg/ml de cicloheximida, 1

mM de EGTA, 200 mg/ml de heparina, 400 U/ μ l de RNasine, 2.5 mM de PMSF y 0.5% de Triton X-100). Las muestras homogenizadas se centrifugaron durante 15 minutos a 13200 rpm a 4°C, se tomó la parte clara del sobrenadante y se colocó en la parte superior del gradiente que se preparó un día antes. El gradiente se centrifugó a 38000 rpm en el rotor SW40Ti durante 2 horas a 4°C. Al término de la centrifugación, se colectaron fracciones de 1 ml en tubos eppendorf. Las fracciones más pesadas se encuentran abajo, mientras que las más ligeras se encuentran en la parte superior de los tubos.

Las fracciones fueron divididas en 2 tubos eppendorf (500 μ l cada uno). Para diluir las altas concentraciones de sacarosa se añadieron 100 μ l de H₂O DEPC. Se tomó un solo tubo (500 μ l) para la extracción de RNA. Para extraer el RNA total, a cada una de las muestras se le agregó 25 μ l de SDS 10% y 1 μ l de Proteinasa K 10 mg/ml y se incubaron 30 minutos a 37°C. Después de la incubación, a cada muestra se le agregó 500 μ l de fenol-cloroformo y se vortexeo por 15 segundos. Los tubos se centrifugaron a 12000 rpm durante 5 minutos. Se recuperó la fracción superior en un tubo eppendorf nuevo y se repitió la extracción agregando nuevamente 500 μ l de fenol-cloroformo. A las muestras se les agregó 70 μ l 10 M de LiCl y 47 μ l de isopropanol, se mezcló por inversión y se incubaron 30-60 minutos a -20°C. Los tubos se centrifugaron a 14000 rpm durante 15 minutos; cuidadosamente se eliminó el sobrenadante y el pellet se lavó con 500 μ l de etanol al 70% frío centrifugándolo a 14000 rpm durante 5 minutos. El pellet se dejó secar con los tubos abiertos a temperatura ambiente y fue resuspendido en 30 μ l de H₂O DEPC. Las muestras se cuantificaron a 260 nm y se sintetizó el cDNA a partir 2 μ g de cada una de ellas, el cual fue utilizado para los experimentos de PCR.

Los oligonucleótidos utilizados para los RT-PCRs de los perfiles

polisomales fueron los siguientes:

act-5: 5'-CGCCTCCTCCTCCTCCCTC-3' y

5'-GGTAGGTGGTCTCGTGGATTCC-3';

ced-9: 5'-GGAATTCCCGATATTTCGAGAAGAAGCACG-3' y

5'-GGGTACCCCTTACTTCAAGCTGAACATCATC-3';

ced-4: 5'-GCCGATGCCTGTTGGAGAAAAA-3' y

5'-CCTATTTCAAGAAGACGCTGCTCG-3';

ced-3: 5'-GAGCAAGATCTCGTTCTCGATCG-3' y

5'-GTCGAAAACACGGCTTATGGTTG-3'; y

csp-2: 5'-ATCAGGGACTTCTTTATGGTGTAGATG-3' y

5'-CTAGACGTCGAAGAATAGTTGTTTTGTG-3'.

Para extraer las proteínas de las fracciones polisomales, se usó 500 µl de cada muestra. A la muestra se le agregó TCA para que quedara en una concentración final de 12-15% y se dejó toda la noche a -20°C para que se precipitaran las proteínas. Al día siguiente, los tubos se centrifugaron a 13400 rpm a 4°C y se eliminó el sobrenadante. A cada tubo se le agregó 1 ml de acetona al 100% fría, se vortexearon y se centrifugaron a 13400 rpm a 4°C durante 10 minutos eliminando el sobrenadante; este paso se repitió 2 veces más, el pellet que antes no era visible ahora lo es. El pellet se resuspendió en PBS 1X, se le agregó DTT y buffer de carga; posteriormente se las muestras se corrieron en un gel de Western blot. Si las muestras no se resuspenden se les puede agregar 1 M de KOH o buffer IEF estándar.

4.17 DIAPAUSA REPRODUCTIVA DEL ADULTO

Para inducir la diapausa reproductiva del adulto se siguió el protocolo descrito previamente por Angelo y Gilst [5]. Antes de exponer a los

animales al ayuno, éstos fueron sincronizados. El objetivo de sincronizar animales consiste en obtener una población homogénea en edad. Para obtener embriones se usaron 12-15 cajas grandes con nematodos adultos que se colectaron con M9 1X en un tubo falcon de 15 ml. El pellet de animales se llevó a 8 ml y se agregó 1.4 ml de NaOH y 2.6 ml de cloro comercial. Los tubos se agitaron alternando con la mano y con el vortex durante 5 minutos, este paso permite lisar a los nematodos y obtener sus embriones. Después del lisado, los embriones se centrifugaron durante 30 segundos a 4000 rpm y se extrajo el sobrenadante con cuidado de no remover los embriones. Se hicieron otros 3 lavados con 12 ml de M9 1X cada uno. Después del último lavado se agregaron 5-10 ml de M9 1X y los embriones se colocaron en un vaso de precipitado estéril sellándolo con parafilm. Los embriones se incubaron durante toda la noche; en este periodo los embriones eclosionan y al no tener comida detienen su crecimiento en el estadio larvario L1 (Figura 1) [4].

Al día siguiente, se colocaron 3000-4000 larvas L1 en 10-15 cajas grandes NGM con comida y se incubaron hasta que llegaron a ser larvas L4. Cuando los animales llegaron a la mitad del estadio larvario L4, se colectaron con M9 1X en tubos falcon. Para limpiar los animales de las bacterias se colocaron los tubos falcon en hielo durante 5 minutos, esto permite que los animales se sedimenten, y se extrajo el líquido con bacterias. Esta operación se repite hasta que el medio se vea transparente. Una vez que estaban limpios de bacterias, los animales se pusieron en cajas grandes sin comida a una densidad de ~10000 animales por caja. El medio de estas cajas está modificado para mantener las mejores condiciones de los animales y poder inducir la diapausa reproductiva del adulto. Un litro de este medio contiene: 3 g de NaCl, 25 g de agar, 2.5 g de bacto triptona, 1 ml de CaCl_2 1 M, 1 ml de MgSO_4 1 M, 25 ml de buffer de fosfatos de potasio 1 M pH 6 (este buffer se prepara con 2.29

g de K_2HPO_4 y 11.81 g de KH_2PO_4 , se afora a 100 ml y se corrobora el pH) y 8 mg de colesterol; el medio se esteriliza por autoclave. Toda la manipulación de los animales para inducir la diapausa reproductiva del adulto se hizo bajo condiciones de estricta esterilidad ya que pueden contaminarse fácilmente.

Una vez en ayuno, los animales se incubaron para que pudieran entrar en la diapausa y se monitorearon. Los animales que ya estaban en diapausa y quiso recuperárseles, fueron seleccionados uno por uno bajo el microscopio estereoscópico y no con M9 1X. De esta manera se evita coleccionar a aquellos animales L4 que detuvieron su crecimiento y solo se coleccionan a los animales que estuvieron en la diapausa reproductiva del adulto. Los adultos en diapausa se pusieron en cajas con comida NGM y se siguió su recuperación.

4.18 MICROSCOPIA, PROCESAMIENTO DE IMÁGENES Y ESTADÍSTICA

La movilización de los animales se realizó bajo el microscopio estereoscópico Nikon C-DS. Para la microscopia de fluorescencia y Nomarski se utilizó el microscopio Nikon Eclipse E600, excepto para la observación de los animales $P_{pie-1}gfp::csp-2B$ que se hizo con el microscopio Zeiss Axio Imager.M1. Para ambos casos, las fotografías fueron tomadas con una cámara AxioCam MRc de ZEISS. Todas las imágenes fueron procesadas para mejorar su brillo y contraste usando en programa ImageJ 1.47g. Para el análisis estadístico se utilizaron los programas estadísticos R versión 2.4.0 y GraphPad Prism versión 5.01.

V RESULTADOS Y DISCUSIÓN

APARTADO UNO

EL PAPEL DE TIAR-1 EN LA APOPTOSIS DE LAS CÉLULAS GERMINALES

CAPÍTULO 1: ESCRUTINIO PARA IDENTIFICAR GENES QUE PARTICIPAN EN LA INDUCCIÓN DE LA APOPTOSIS FISIOLÓGICA Y POR AYUNO

En este capítulo se describe los resultados obtenidos del escrutinio para identificar proteínas importantes para inducir apoptosis de las células germinales mediante el silenciamiento de 64 genes que cambiaron sus niveles de expresión durante el ayuno.

CAPÍTULO 2: EL HOMÓLOGO DE TIA-1/TIAR EN *C. ELEGANS*, TIAR-1, SE REQUIERE PARA INDUCIR APOPTOSIS DE LAS CÉLULAS GERMINALES

En este artículo se describe la expresión y función de TIAR-1 en *C. elegans*. Analizamos la expresión de la proteína TIAR-1 mediante anticuerpos y fusiones con la proteína GFP, y encontramos que se expresa en el citoplasma de las células somáticas y germinales. También encontramos que los animales mutantes en *tiar-1* tienen defectos tanto somáticos como germinales. Además, demostramos que TIAR-1 induce apoptosis de las células germinales durante diferentes tipos de estrés y por debajo de CED-9.

CAPÍTULO 3: MECANISMO DE INDUCCIÓN DE APOPTOSIS DE TIAR-1

Analizamos algunos aspectos de la función y expresión de TIAR-1. Proponemos que la función de TIAR-1 en la apoptosis de las células germinales es a través de la regulación de los niveles de CSP-2B.

CAPÍTULO 4: PARTICIPACIÓN DE TIAR-1 EN LA DIAPAUSA REPRODUCTIVA DEL ADULTO

Animales en el estadio larvario L4 pueden entrar a la diapausa reproductiva del adulto cuando se les priva de comida. Esta detención de su crecimiento ocasiona una disminución en la proliferación de las células germinales, lo cual es reversible. Encontramos que TIAR-1 es importante para que los animales se recuperen de esta diapausa.

APARTADO DOS

EL PAPEL DE TIAR-1 EN LA FORMACIÓN DE GRÁNULOS EN LA GÓNADA

CAPÍTULO 5: LA PROTEÍNA DE UNIÓN A RNA TIAR-1 SE REQUIERE PARA LA FORMACIÓN DE GRÁNULOS EN CONDICIONES DE ESTRÉS EN EL CENTRO DE LA GÓNADA DE *C. ELEGANS*

Encontramos que el ayuno y choque de calor inducen la formación de gránulos en el centro de la gónada. Demostramos que los gránulos formados durante el ayuno son muy similares a los gránulos de estrés de mamíferos. También observamos que TIAR-1 es esencial para la formación de estos gránulos.

CAPÍTULO 6: ALGUNOS ASPECTOS DE LA PARTICIPACIÓN DE TIAR-1 DURANTE EL ESTRÉS

En este capítulo analizamos algunas funciones de TIAR-1 durante el estrés, particularmente en la formación de gránulos, apoptosis y fertilidad.

APARTADO UNO

EL PAPEL DE TIAR-1 EN LA APOPTOSIS DE LAS CÉLULAS GERMINALES

CAPÍTULO 1: ESCRUTINIO PARA IDENTIFICAR GENES QUE PARTICIPAN EN LA INDUCCIÓN DE LA APOPTOSIS FISIOLÓGICA Y POR AYUNO

5.1.1 GENES INVOLUCRADOS EN LA APOPTOSIS FISIOLÓGICA

En un trabajo previo en el laboratorio, se encontró que el ayuno de 6 h induce un incremento en la apoptosis de las células germinales por medio de un mecanismo desconocido [64]. Con el objetivo de encontrar los posibles reguladores de este tipo de apoptosis, se hizo un escrutinio mediante RNA de interferencia (RNAi). Para encontrar genes que alteraran sus niveles de expresión durante el ayuno se hizo un análisis de microarreglos [95]. Este análisis se hizo extrayendo el RNA total de animales control y ayunados de la cepa silvestre (cepa *N2*). El ayuno consistió en privar a los animales

solo de comida (bacterias) por 6 h mientras que los componentes del medio de cultivo no fueron alterados. El RNA extraído de los animales control y ayunados se envió a la Unidad de Microarreglos del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, y el ensayo fue hecho por personal de esta unidad. Los oligonucleótidos utilizados durante la síntesis del DNA para los microarreglos pertenecen a genes que solo se expresan en ovocitos y a genes intrínsecos de la gónada (genes que se expresan en células germinales independientemente de que vayan a ser ovocitos o espermatozoides) [91].

El análisis del microarreglo arrojó que 264 genes cambiaron su expresión cuando los animales fueron sometidos al ayuno [95]. De los 264 genes, 122 se encontraban activados mientras que 142 estaban reprimidos [95]. Para identificar genes involucrados en la apoptosis fisiológica utilizamos la cepa MD701. Esta cepa contiene el transgene *ced-1::gfp*, el cual se expresa en las células de la vaina de la gónada (Figura 10 A)[65]. CED-1 es un receptor de membrana que participa en la fagocitosis de los cuerpos apoptóticos [96]. Por lo tanto, la expresión del transgene *ced-1::gfp* permite observar aquellas células germinales que están siendo fagocitadas (Figura 10 A). Para analizar los niveles de apoptosis fisiológica, se contó el número de cuerpos apoptóticos en la gónada de animales RNAi en donde hubo silenciamiento y animales control PV (plásmido vacío) en donde no hubo silenciamiento.

Durante el escrutinio analizamos 64 genes, de los cuales 43 tenían sus niveles de expresión aumentados mientras que en 21 estaban disminuidos en el ayuno. En el escrutinio encontramos que el silenciamiento de 4 genes disminuyó significativamente los niveles de apoptosis fisiológica (\downarrow), indicando que estos genes se requieren para inducir este tipo de apoptosis (Tablas 1 y 2, Figuras 11 y 12). Por otro lado, el silenciamiento de 34 genes incrementó de manera significativa

Tabla 1| Apoptosis fisiológica obtenida al silenciar los genes que incrementan sus niveles de expresión durante el ayuno. Cada promedio de cuerpos apoptóticos está acompañado de su desviación estándar y la cifra entre paréntesis indica el número de gónadas analizadas. El nivel de inducción es el resultado de la división de la cantidad de cuerpos apoptóticos observados en el RNAi de cada gen entre el control (PV). El valor P se obtuvo del análisis con una prueba *t* Mann Whitney. ↓ indica una disminución en el número de cuerpos apoptóticos, ↑ un aumento y = significa que el incremento o disminución no son considerables. PV= plásmido vacío.

la apoptosis fisiológica (↑) (Tablas 1 y 2, Figuras 11 y 12), sugiriendo que estos genes podrían proteger a las células germinales de la apoptosis.

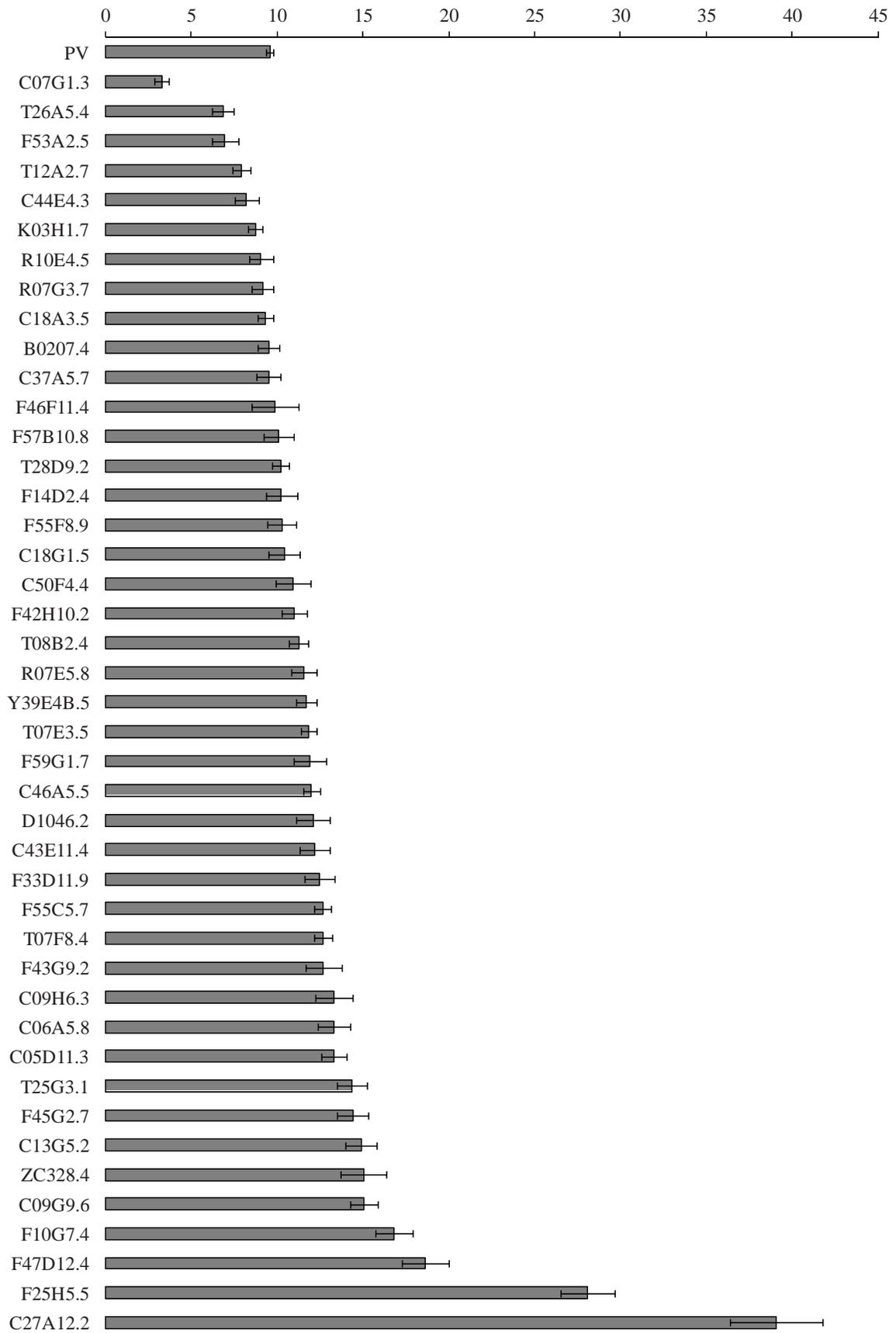
| | Gen | Promedio de cuerpos apoptóticos | Nivel de inducción | Valor P | |
|----|------------|--|-------------------------------|--------------------|---|
| | PV(RNAi) | 9.6 ± 4.3 (405) | --- | --- | |
| 1 | C07G1.3 | 3.3 ± 2.5 (37) | 0.3 | < 0.001 | ↓ |
| 2 | T26A5.4 | 6.9 ± 2.9 (20) | 0.7 | < 0.001 | ↓ |
| 3 | F53A2.5 | 7.0 ± 4.1 (29) | 0.7 | < 0.001 | ↓ |
| 4 | T12A2.7 | 7.9 ± 2.9 (29) | 0.8 | 0.004558 | = |
| 5 | C44E4.3 | 8.2 ± 3.7 (30) | 0.9 | 0.018082 | = |
| 6 | K03H1.7 | 8.7 ± 2.4 (30) | 0.9 | 0.131700 | = |
| 7 | R10E4.5 | 9.1 ± 3.6 (27) | 0.9 | 0.378683 | = |
| 8 | R07G3.7 | 9.2 ± 3.1 (25) | 1.0 | 0.475023 | = |
| 9 | C18A3.5 | 9.3 ± 3.6 (56) | 1.0 | 0.345716 | = |
| 10 | B0207.4 | 9.5 ± 2.6 (16) | 1.0 | 0.883008 | = |
| 11 | C37A5.7 | 9.5 ± 3.2 (21) | 1.0 | 0.893972 | = |
| 12 | F46F11.4 | 9.9 ± 4.3 (10) | 1.0 | 0.775269 | = |
| 13 | F57B10.8 | 10.1 ± 4.0 (22) | 1.1 | 0.485554 | = |
| 14 | T28D9.2 | 10.2 ± 2.7 (30) | 1.1 | 0.321610 | = |
| 15 | F14D2.4 | 10.3 ± 5.9 (41) | 1.0 | 0.201842 | = |
| 16 | F55F8.9 | 10.3 ± 4.2 (25) | 1.1 | 0.300654 | = |
| 17 | C18G1.5 | 10.4 ± 4.3 (22) | 1.1 | 0.244508 | = |
| 18 | C50F4.4 | 11.0 ± 4.7 (22) | 1.1 | 0.049908 | = |
| 19 | F42H10.2 | 11.0 ± 3.9 (30) | 1.4 | 0.019210 | = |
| 20 | T08B2.4 | 11.3 ± 2.8 (27) | 1.2 | 0.008165 | = |
| 21 | R07E5.8 | 11.6 ± 3.7 (24) | 1.2 | 0.002752 | = |
| 22 | Y39E4B.5 | 11.7 ± 3.0 (25) | 1.2 | 0.001373 | = |
| 23 | T07E3.5 | 11.8 ± 2.6 (30) | 1.2 | < 0.001 | ↑ |
| 24 | F59G1.7 | 11.9 ± 5.1 (30) | 1.2 | < 0.001 | ↑ |
| 25 | C46A5.5 | 12.0 ± 3.4 (49) | 1.3 | < 0.001 | ↑ |
| 26 | D1046.2 | 12.1 ± 5.2 (28) | 1.2 | < 0.001 | ↑ |
| 27 | C43E11.4 | 12.2 ± 4.3 (24) | 1.3 | < 0.001 | ↑ |
| 28 | F33D11.9 | 12.5 ± 4.5 (25) | 1.3 | < 0.001 | ↑ |
| 29 | F55C5.7 | 12.7 ± 2.6 (30) | 1.3 | < 0.001 | ↑ |
| 30 | T07F8.4 | 12.7 ± 3.3 (39) | 1.2 | < 0.001 | ↑ |
| 31 | F43G9.2 | 12.7 ± 4.3 (17) | 1.3 | < 0.001 | ↑ |
| 32 | C09H6.3 | 13.3 ± 5.0 (21) | 1.4 | < 0.001 | ↑ |
| 33 | C06A5.8 | 13.3 ± 5.3 (30) | 1.3 | < 0.001 | ↑ |
| 34 | C05D11.3 | 13.3 ± 3.6 (25) | 1.3 | < 0.001 | ↑ |
| 35 | T25G3.1 | 14.4 ± 4.1 (22) | 1.5 | < 0.001 | ↑ |
| 36 | F45G2.7 | 14.4 ± 5.0 (30) | 1.5 | < 0.001 | ↑ |
| 37 | C13G5.2 | 14.9 ± 4.9 (28) | 1.6 | < 0.001 | ↑ |
| 38 | ZC328.4 | 15.1 ± 6.0 (20) | 1.6 | < 0.001 | ↑ |
| 39 | C09G9.6 | 15.1 ± 4.7 (32) | 1.5 | < 0.001 | ↑ |
| 40 | F10G7.4 | 16.8 ± 6.7 (40) | 1.6 | < 0.001 | ↑ |
| 41 | F47D12.4 | 18.7 ± 6.1 (20) | 1.8 | < 0.001 | ↑ |
| 42 | F25H5.5 | 28.1 ± 8.6 (30) | 2.8 | < 0.001 | ↑ |
| 43 | C27A12.2 | 39.1 ± 12.1 (20) | 4.1 | < 0.001 | ↑ |

Tabla 2| Apoptosis fisiológica obtenida al silenciar genes que disminuyen sus niveles de expresión durante el ayuno. Cada promedio de cuerpos apoptóticos está acompañado de su desviación estándar y la cifra entre paréntesis indica el número de gónadas analizadas. El nivel de inducción es el resultado de la división de la cantidad de cuerpos apoptóticos observados en el RNAi de cada gen entre el control (PV). El valor P se obtuvo del análisis con una prueba *t* Mann Whitney. ↓ indica una disminución en el número de cuerpos apoptóticos, ↑ un aumento y = significa que el incremento o disminución no son considerables. PV= plásmido vacío.

| | Gen | Promedio de cuerpos apoptóticos | Nivel de Inducción | Valor P | |
|----|----------|---------------------------------|--------------------|----------|---|
| | PV(RNAi) | 9.6 ± 4.3 (405) | --- | --- | |
| 1 | T08D10.1 | 6.3 ± 2.9 (29) | 0.6 | < 0.001 | ↓ |
| 2 | R166.4 | 8.7 ± 2.7 (23) | 0.9 | 0.165470 | = |
| 3 | C25A1.8 | 9.3 ± 3.4 (55) | 1.0 | 0.465229 | = |
| 4 | C45G3.1 | 9.4 ± 4.2 (10) | 1.0 | 0.827484 | = |
| 5 | F45C12.7 | 9.5 ± 2.6 (20) | 1.0 | 0.869941 | = |
| 6 | EEED8.3 | 9.6 ± 3.7 (55) | 1.0 | 0.996760 | = |
| 7 | F20D1.4 | 10.9 ± 4.5 (25) | 1.1 | 0.049268 | = |
| 8 | F29F11.3 | 11.2 ± 3.4 (25) | 1.2 | 0.016431 | = |
| 9 | T05F1.2 | 12.8 ± 3.8 (25) | 1.3 | < 0.001 | ↑ |
| 10 | F47G3.3 | 13.5 ± 3.6 (25) | 1.4 | < 0.001 | ↑ |
| 11 | F25H2.12 | 13.6 ± 4.2 (25) | 1.4 | < 0.001 | ↑ |
| 12 | ZC404.8 | 14.2 ± 6.2 (29) | 1.4 | < 0.001 | ↑ |
| 13 | T26C11.7 | 14.6 ± 4.2 (40) | 1.4 | < 0.001 | ↑ |
| 14 | F57C2.1 | 14.7 ± 5.6 (38) | 1.4 | < 0.001 | ↑ |
| 15 | ZC168.4 | 15.0 ± 5.3 (36) | 1.5 | < 0.001 | ↑ |
| 16 | B0336.7 | 16.7 ± 6.2 (20) | 1.7 | < 0.001 | ↑ |
| 17 | R74.8 | 18.9 ± 4.9 (25) | 2.0 | < 0.001 | ↑ |
| 18 | R05H5.3 | 22.7 ± 9.1 (30) | 2.2 | < 0.001 | ↑ |
| 19 | ZC395.10 | 23.4 ± 5.7 (25) | 2.4 | < 0.001 | ↑ |
| 20 | R13F6.10 | 36.2 ± 12.9 (35) | 3.5 | < 0.001 | ↑ |
| 21 | T08G5.5 | 52.5 ± 17.4 (37) | 5.1 | < 0.001 | ↑ |

Figura 11| Promedio del número de cuerpos apoptóticos observados en la apoptosis fisiológica durante el análisis de RNAi en 43 genes que aumentan sus niveles de expresión durante el ayuno. Se silenció por RNAi cada uno de los genes anotados en la gráfica en la cepa *ced-1::gfp*. Como control del silenciamiento se usó el PV. Después, se anestesiaron y montaron los animales para contar los cuerpos apoptóticos por microscopía de fluorescencia. Las barras de error representan el error estándar. PV= plásmido vacío.

Número de cuerpos apoptóticos por brazo de la gónada



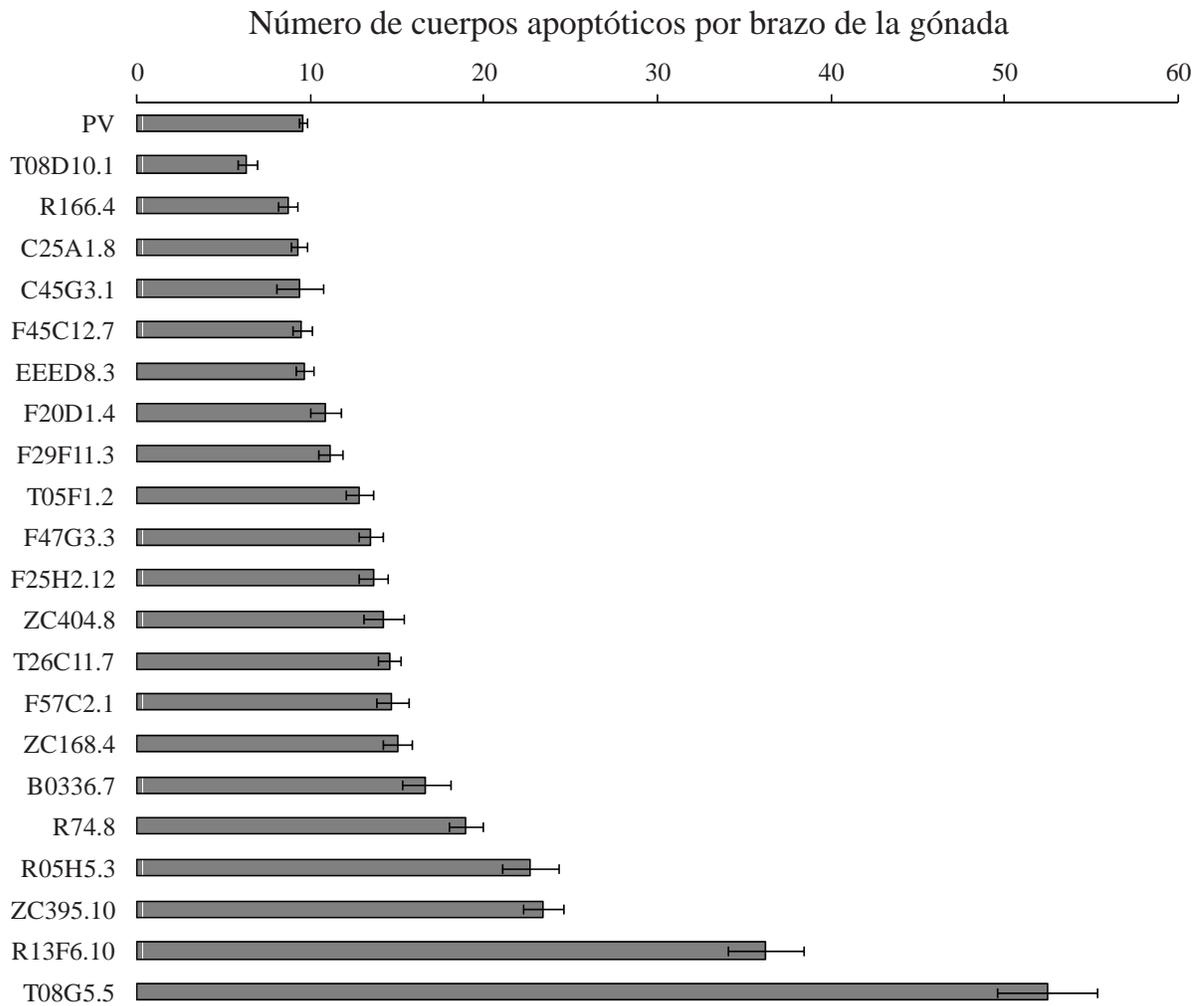


Figura 12| Promedio del número de cuerpos apoptóticos observados en la apoptosis fisiológica durante el análisis de RNAi en 21 genes que disminuyen sus niveles de expresión durante el ayuno. Se silenció por RNAi cada uno de los genes anotados en la gráfica en la cepa *ced-1::gfp*. Como control del silenciamiento se usó el PV. Después, se anestesiaron y montaron los animales para contar los cuerpos apoptóticos por microscopía de fluorescencia. Las barras de error representan el error estándar. PV= plásmido vacío.

5.1.2 GENES INVOLUCRADOS EN LA APOPTOSIS INDUCIDA POR AYUNO

Para identificar los genes involucrados en la respuesta al ayuno, se comparó la apoptosis de animales bien alimentados contra animales ayunados por 6 h y en donde se silenció cada uno de los genes seleccionados. El análisis estadístico arrojó que el silenciamiento en 36 de los 64 genes analizados no incrementó el número de cuerpos apoptóticos (=) en la gónada de los animales durante el ayuno (Tablas 3 y 4, Figuras 13 y 14). El resultado anterior sugiere que estos genes se requieren para inducir apoptosis por ayuno.

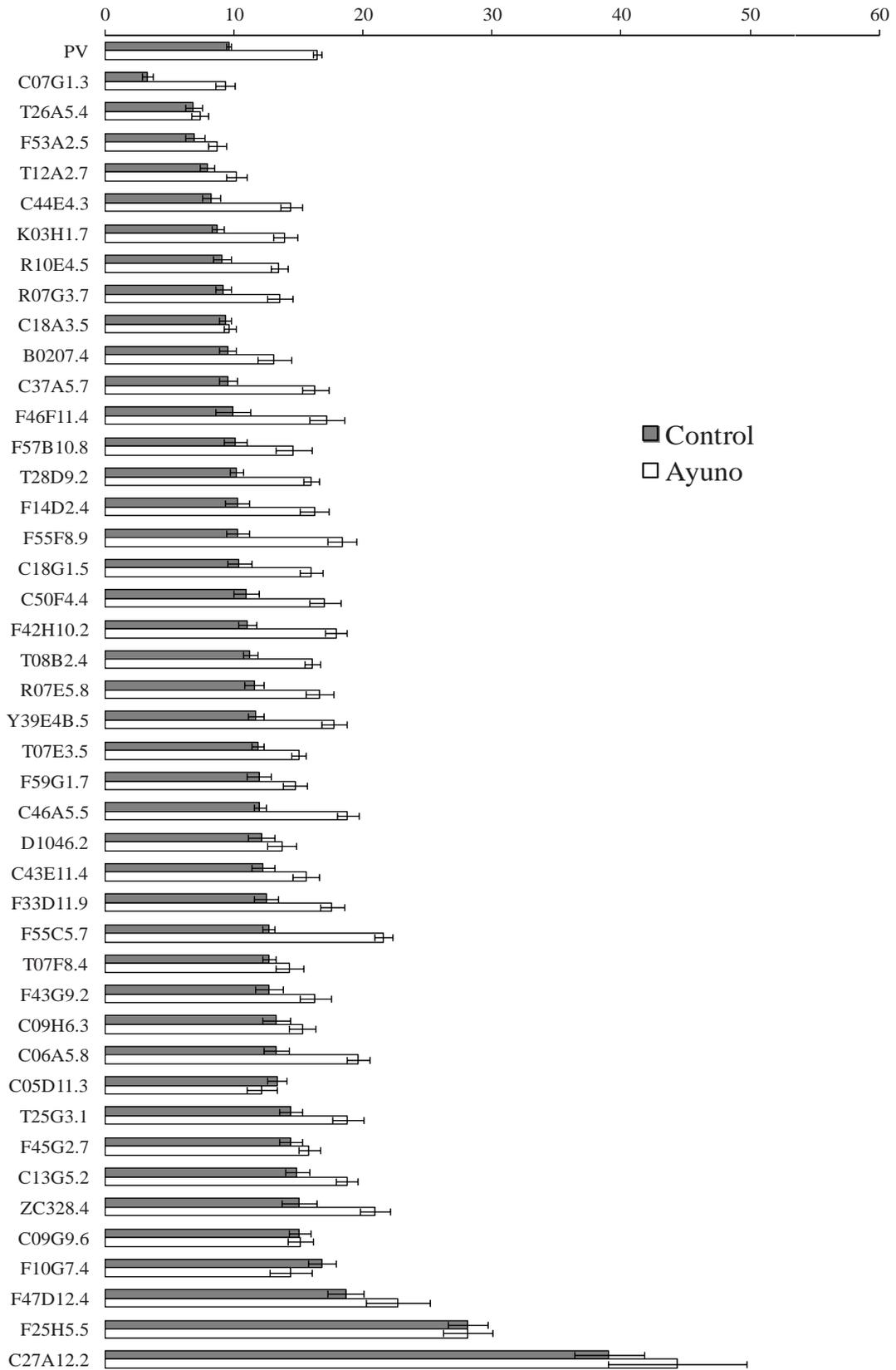
| | Gen | Control | Ayuno | Nivel de Inducción | Valor P | |
|----|----------|------------------|------------------|--------------------|----------|---|
| | PV(RNAi) | 9.6 ± 4.3 (405) | 16.5 ± 5.5 (337) | 1.7 | < 0.001 | ↑ |
| 1 | C07G1.3 | 3.3 ± 2.5 (37) | 9.3 ± 3.9 (25) | 2.8 | < 0.001 | ↑ |
| 2 | T26A5.4 | 6.9 ± 2.9 (20) | 7.4 ± 2.9 (20) | 1.1 | 0.6725 | = |
| 3 | F53A2.5 | 7.0 ± 4.1 (29) | 8.7 ± 3.8 (33) | 1.2 | 0.05293 | = |
| 4 | T12A2.7 | 7.9 ± 2.9 (29) | 10.2 ± 4.2 (39) | 1.3 | 0.02536 | = |
| 5 | C44E4.3 | 8.2 ± 3.7 (30) | 14.1 ± 5.0 (30) | 1.7 | < 0.001 | ↑ |
| 6 | K03H1.7 | 8.7 ± 2.4 (30) | 14.0 ± 5.2 (30) | 1.6 | < 0.001 | ↑ |
| 7 | R10E4.5 | 9.1 ± 3.6 (27) | 13.5 ± 3.5 (27) | 1.5 | < 0.001 | ↑ |
| 8 | R07G3.7 | 9.2 ± 3.1 (25) | 13.6 ± 4.9 (25) | 1.5 | 0.002428 | = |
| 9 | C18A3.5 | 9.3 ± 3.6 (56) | 9.6 ± 3.8 (66) | 1.0 | 0.4456 | = |
| 10 | B0207.4 | 9.5 ± 2.6 (16) | 13.1 ± 5.3 (17) | 1.4 | 0.02488 | = |
| 11 | C37A5.7 | 9.5 ± 3.2 (21) | 16.2 ± 5.0 (26) | 1.7 | < 0.001 | ↑ |
| 12 | F46F11.4 | 9.9 ± 4.3 (10) | 17.2 ± 4.3 (10) | 1.7 | 0.001632 | = |
| 13 | F57B10.8 | 10.1 ± 4.0 (22) | 14.6 ± 6.0 (18) | 1.4 | 0.005764 | = |
| 14 | T28D9.2 | 10.2 ± 2.7 (30) | 16.0 ± 3.2 (30) | 1.6 | < 0.001 | ↑ |
| 15 | F14D2.4 | 10.3 ± 5.9 (41) | 16.2 ± 5.8 (28) | 1.6 | < 0.001 | ↑ |
| 16 | F55F8.9 | 10.3 ± 4.2 (25) | 18.4 ± 5.8 (25) | 1.8 | < 0.001 | ↑ |
| 17 | C18G1.5 | 10.4 ± 4.3 (22) | 16.0 ± 4.5 (25) | 1.5 | < 0.001 | ↑ |
| 18 | C50F4.4 | 11.0 ± 4.7 (22) | 17.0 ± 6.7 (29) | 1.6 | < 0.001 | ↑ |
| 19 | F42H10.2 | 11.0 ± 3.9 (30) | 17.9 ± 4.5 (30) | 1.6 | < 0.001 | ↑ |
| 20 | T08B2.4 | 11.3 ± 2.8 (27) | 16.1 ± 2.7 (20) | 1.4 | < 0.001 | ↑ |
| 21 | R07E5.8 | 11.6 ± 3.7 (24) | 16.6 ± 5.5 (25) | 1.4 | < 0.001 | ↑ |
| 22 | Y39E4B.5 | 11.7 ± 3.0 (25) | 17.8 ± 4.9 (25) | 1.5 | < 0.001 | ↑ |
| 23 | T07E3.5 | 11.8 ± 2.6 (30) | 15.0 ± 3.0 (30) | 1.3 | < 0.001 | ↑ |
| 24 | F59G1.7 | 11.9 ± 5.1 (30) | 14.7 ± 5.0 (30) | 1.2 | 0.03855 | = |
| 25 | C46A5.5 | 12.0 ± 3.4 (49) | 18.8 ± 5.8 (45) | 1.6 | < 0.001 | ↑ |
| 26 | D1046.2 | 12.1 ± 5.2 (28) | 13.7 ± 6.2 (30) | 1.1 | 0.2819 | = |
| 27 | C43E11.4 | 12.2 ± 4.3 (24) | 15.9 ± 5.2 (30) | 1.3 | 0.02435 | = |
| 28 | F33D11.9 | 12.5 ± 4.5 (25) | 17.6 ± 4.6 (25) | 1.4 | < 0.001 | ↑ |
| 29 | F55C5.7 | 12.7 ± 2.6 (30) | 21.6 ± 3.9 (30) | 1.7 | < 0.001 | ↑ |
| 30 | T07F8.4 | 12.7 ± 3.3 (39) | 14.3 ± 4.8 (20) | 1.1 | 0.243 | = |
| 31 | F43G9.2 | 12.7 ± 4.3 (17) | 16.3 ± 5.8 (24) | 1.3 | 0.04362 | = |
| 32 | C09H6.3 | 13.3 ± 5.0 (21) | 15.3 ± 3.7 (13) | 1.2 | 0.0911 | = |
| 33 | C06A5.8 | 13.3 ± 5.3 (30) | 19.6 ± 4.8 (29) | 1.5 | < 0.001 | ↑ |
| 34 | C05D11.3 | 13.3 ± 3.6 (25) | 12.1 ± 5.5 (22) | 0.9 | 0.3046 | = |
| 35 | T25G3.1 | 14.4 ± 4.1 (22) | 18.8 ± 6.1 (26) | 1.3 | 0.01647 | = |
| 36 | F45G2.7 | 14.4 ± 5.0 (30) | 15.8 ± 4.8 (30) | 1.1 | 0.1943 | = |
| 37 | C13G5.2 | 14.9 ± 4.9 (28) | 18.7 ± 4.6 (30) | 1.3 | 0.006913 | = |
| 38 | ZC328.4 | 15.1 ± 6.0 (20) | 21.0 ± 6.5 (30) | 1.4 | 0.001179 | = |
| 39 | C09G9.6 | 15.1 ± 4.7 (32) | 15.1 ± 5.2 (27) | 1.0 | 0.8247 | = |
| 40 | F10G7.4 | 16.8 ± 6.7 (40) | 14.4 ± 7.9 (24) | 0.9 | 0.0813 | = |
| 41 | F47D12.4 | 18.7 ± 6.1 (20) | 22.7 ± 11.2 (21) | 1.2 | 0.2666 | = |
| 42 | F25H5.5 | 28.1 ± 8.6 (30) | 28.1 ± 8.4 (20) | 1.0 | 0.9605 | = |
| 43 | C27A12.2 | 39.1 ± 12.1 (20) | 44.3 ± 13.2 (6) | 1.1 | 0.2860 | = |

Tabla 3| Promedio de cuerpos apoptóticos observados durante la exploración de 43 genes mediante RNAi en condiciones de control y ayuno. Como control en cada gen se utilizaron los datos obtenidos de animales alimentados. Cada promedio de cuerpos apoptóticos está acompañado de su desviación estándar y la cifra entre paréntesis indica el número de individuos analizados. El nivel de inducción es el resultado de la división de la cantidad de cuerpos apoptóticos observados en ayuno entre los cuerpos apoptóticos contados en gónadas de animales alimentados. El valor P se obtuvo del análisis con una prueba *t* Mann Whitney. ↑ indica que hubo un aumento de cuerpos apoptóticos durante el ayuno y = significa que no hubo diferencias. PV= plásmido vacío.

Tabla 4| Promedio de cuerpos apoptóticos observados durante la exploración de 21 genes mediante RNAi en condiciones de ayuno. Como control en cada gen se utilizaron los datos obtenidos de animales alimentados. Cada promedio de cuerpos apoptóticos está acompañado de su desviación estándar y la cifra entre paréntesis indica el número de individuos analizados. El nivel de inducción es el resultado de la división de la cantidad de cuerpos apoptóticos observados en ayuno entre los cuerpos apoptóticos contados en gónadas de animales alimentados. El valor P se obtuvo del análisis con una prueba *t* Mann Whitney. ↑ indica que hubo un aumento de cuerpos apoptóticos durante el ayuno y = significa que no hubo diferencias. PV= plásmido vacío.

| | Gen | Control | Ayuno | Nivel de Inducción | Valor P | |
|----|----------|------------------|------------------|--------------------|---------|---|
| | PV(RNAi) | 9.6 ± 4.3 (405) | 16.4 ± 5.5 (321) | 1.7 | < 0.001 | ↑ |
| 1 | T08D10.1 | 6.3 ± 2.9 (29) | 14.1 ± 4.9 (30) | 2.2 | < 0.001 | ↑ |
| 2 | R166.4 | 8.7 ± 2.7 (23) | 12.5 ± 4.1 (25) | 1.4 | < 0.001 | ↑ |
| 3 | C25A1.8 | 9.3 ± 3.4 (55) | 16.0 ± 4.5 (50) | 1.7 | < 0.001 | ↑ |
| 4 | C45G3.1 | 9.4 ± 4.2 (10) | 13.0 ± 5.7 (13) | 1.4 | 0.1275 | = |
| 5 | F45C12.7 | 9.5 ± 2.6 (20) | 14.7 ± 4.0 (20) | 1.5 | < 0.001 | ↑ |
| 6 | EEED8.3 | 9.6 ± 3.7 (55) | 18.1 ± 4.9 (55) | 1.9 | < 0.001 | ↑ |
| 7 | F20D1.4 | 10.9 ± 4.5 (25) | 17.4 ± 4.3 (25) | 1.6 | < 0.001 | ↑ |
| 8 | F29F11.3 | 11.2 ± 3.4 (25) | 16.4 ± 5.4 (25) | 1.5 | < 0.001 | ↑ |
| 9 | T05F1.2 | 12.8 ± 3.8 (25) | 18.8 ± 6.5 (25) | 1.5 | 0.0020 | = |
| 10 | F47G3.3 | 13.5 ± 3.6 (25) | 20.2 ± 4.4 (25) | 1.5 | < 0.001 | ↑ |
| 11 | F25H2.12 | 13.6 ± 4.2 (25) | 13.7 ± 3.6 (25) | 1.0 | 0.9301 | = |
| 12 | ZC404.8 | 14.2 ± 6.2 (29) | 16.3 ± 5.4 (29) | 1.2 | 0.1031 | = |
| 13 | T26C11.7 | 14.6 ± 4.2 (40) | 16.9 ± 4.2 (32) | 1.2 | 0.01496 | = |
| 14 | F57C2.1 | 14.7 ± 5.6 (38) | 15.0 ± 3.5 (26) | 1.0 | 0.7733 | = |
| 15 | ZC168.4 | 15.0 ± 5.3 (36) | 13.9 ± 4.8 (40) | 0.9 | 0.2459 | = |
| 16 | B0336.7 | 16.7 ± 6.2 (20) | 13.9 ± 3.6 (20) | 0.8 | 0.09454 | = |
| 17 | R74.8 | 18.9 ± 4.9 (25) | 26.0 ± 7.3 (25) | 1.4 | < 0.001 | ↑ |
| 18 | R05H5.3 | 22.7 ± 9.1 (30) | 21.9 ± 7.6 (20) | 1.0 | 0.921 | = |
| 19 | ZC395.10 | 23.4 ± 5.7 (25) | 27.4 ± 7.9 (25) | 1.2 | 0.06192 | = |
| 20 | R13F6.10 | 36.2 ± 12.9 (35) | 37.2 ± 10.4 (30) | 1.0 | 0.6928 | = |
| 21 | T08G5.5 | 52.5 ± 17.4 (37) | 55.3 ± 18.8 (25) | 1.1 | 0.4771 | = |

Número de cuerpos apoptóticos por brazo de la gónada



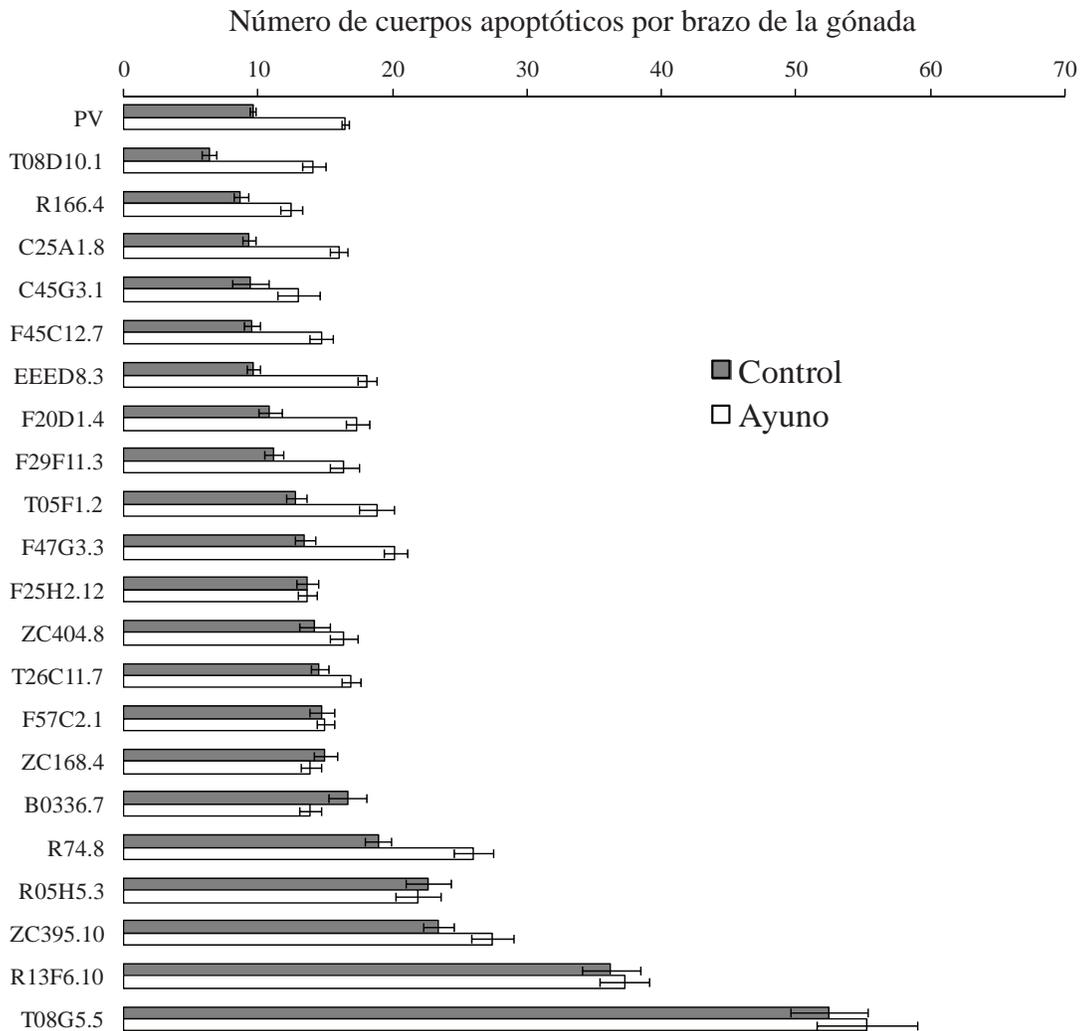


Figura 14| Promedio del número de cuerpos apoptóticos observados en el ayuno durante el análisis de RNAi en 21 genes que disminuyen sus niveles de expresión durante el ayuno. Se silenció por RNAi cada uno de los genes anotados en la gráfica en la cepa *ced-1::gfp* y los expusimos a condiciones con comida y sin comida. Como control del silenciamiento se usó el PV. Después, se anestesiaron y montaron los animales para contar los cuerpos apoptóticos por microscopía de fluorescencia. Las barras de error representan el error estándar. PV= plásmido vacío.

Figura 13| Promedio del número de cuerpos apoptóticos observados en el ayuno durante el análisis de RNAi en 43 genes que aumentan sus niveles de expresión durante el ayuno. Se silenció por RNAi cada uno de los genes anotados en la gráfica en la cepa *ced-1::gfp* y los expusimos a condiciones con comida y sin comida. Como control del silenciamiento se usó el PV. Después, se anestesiaron y montaron los animales para contar los cuerpos apoptóticos por microscopía de fluorescencia. Las barras de error representan el error estándar. PV= plásmido vacío.

5.1.3 DISCUSIÓN

En *C. elegans*, la apoptosis fisiológica es importante para mantener la calidad de los ovocitos y la homeostasis en la gónada [57, 59]. Cuando analizamos la participación de 64 genes en la apoptosis fisiológica, encontramos que el silenciamiento en 4 de ellos disminuyó los niveles de este tipo de apoptosis (Tablas 1 y 2; Figuras 11 y 12). El silenciamiento en 34 de los 64 genes analizados incrementó los niveles de apoptosis fisiológica en los animales (Tablas 1 y 2; Figuras 11 y 12). Como puede observarse, en nuestro escrutinio encontramos una mayor cantidad de genes cuyo silenciamiento aumentó los niveles de apoptosis fisiológica. Existen dos posibilidades para explicar este resultado. Primero, se ha visto que el RNA de doble cadena (dsRNA) en la línea germinal induce un incremento en la apoptosis de las células germinales debido a su acumulación [97], por lo que es posible que los altos niveles de apoptosis fisiológica observados durante el silenciamiento de los 34 genes se deba a este fenómeno. Segundo, otra posibilidad es que el incremento en la apoptosis fisiológica también se deba a que muchos de los genes analizados están involucrados en procesos celulares esenciales y si son eliminados, la célula no puede continuar con su ciclo y muere. Dentro de estos genes tenemos por ejemplo a F47D12.4 (componente de la cromatina [98]), F10G7.4 (división mitótica y meiótica [99]), C05D11.3 (reorganización de los microtúbulos [100]), ZC168.4 (ciclina B1 [101]), R13F6.10 (componente del complejo sinaptonémico [102]), entre otros. Sin embargo, existen otros genes que pudieran tener un papel en la apoptosis fisiológica.

El gen B0336.7 codifica una proteína con dominio tipo THAP [103]. Otras proteínas con este dominio incluyen LIN-15A, LIN-15B, LIN-36 Y HIM-17, las cuales interaccionan con LIN-35 [103]. LIN-35

se ha descrito como una proteína que regula la apoptosis fisiológica a través de la represión de la transcripción del gen *ced-9* [66]. Además, en el laboratorio se ha visto que LIN-35 induce apoptosis por ayuno mediante la regulación negativa de los niveles de la proteína de CED-9 [67]. Con base en los datos anteriores, es posible que la proteína B0336.7, al tener una interacción predicha con LIN-35, esté involucrada en la apoptosis de las células germinales. Mientras que la ausencia de LIN-35 disminuye la apoptosis fisiológica [66], el silenciamiento de B0336.7 la aumenta (Tabla 2; Figura 13). Por lo tanto, B0336.7 podría estar antagonizando la función de LIN-35.

El silenciamiento de los genes C07G1.3, T26A5.4, F53A2.5 y T08D10.1 ocasionó que la apoptosis fisiológica disminuyera significativamente en los animales (Tablas 1 y 2; Figuras 11 y 12). A la fecha no se ha encontrado un gen cuya ausencia elimine por completo la apoptosis fisiológica, por lo que resulta interesante estudiar aquellos genes que disminuyen (aunque sea parcialmente) esta apoptosis. C07G1.3 es una proteína involucrada en el marcaje de los componentes presinápticos al axón [104], por lo que resulta difícil relacionarla con la apoptosis fisiológica. La función del gen T26A5.4 se desconoce por completo. De los 64 genes analizados en el escrutinio, solo dos codifican para factores de transcripción: F53A2.5 y T08D10.1. Mientras que F53A2.5 codifica para un factor de transcripción de la familia DR1, T08D10.1 codifica para un factor de transcripción del tipo Y [103]. Curiosamente, el silenciamiento de estos dos genes disminuyó la apoptosis fisiológica al igual que ocurre cuando se elimina la expresión de *lin-35*, otro factor transcripcional [66].

Cuando los animales son expuestos a 6 h de ayuno, la apoptosis de las células germinales se incrementa [64]. Esta apoptosis es inducida por LIN-35 quien a su vez regula la disminución de los niveles de

CED-9 [67]. Durante el escrutinio para identificar genes involucrados en la apoptosis por ayuno, encontramos que el silenciamiento de 36 genes ocasionó que los animales no respondieran al ayuno (no hubo un incremento de apoptosis) (Tablas 3 y 4; Figuras 13 y 14). Para poder explicar el papel de estos genes en la apoptosis por ayuno se requiere de estudios específicos que permitan entender de qué manera están involucrados. Por ejemplo, podríamos analizar si estos genes tienen un efecto sobre los componentes de la maquinaria de apoptosis (i. e. *ced-9*, *ced-4* y *ced-3*).

Para la gran mayoría de los animales en donde se silenciaron genes que incrementaron significativamente la apoptosis fisiológica, tampoco respondieron al ayuno (Tablas 3 y 4; Figuras 13 y 14). Es posible que este aumento de la apoptosis fisiológica no permita detectar las diferencias en el número de cuerpos apoptóticos entre el control y el ayuno. Sin embargo, particularmente en el caso del gen R74.8, encontramos que a pesar de que su silenciamiento ocasionó un incremento considerable en la apoptosis fisiológica de los animales, éstos respondieron al ayuno (Tabla 4; Figura 14), lo que sugiere una participación más clara de este gen en la apoptosis fisiológica que en la apoptosis por ayuno.

Durante el escrutinio para identificar genes involucrados en la apoptosis por ayuno, encontramos al gen C18A3.5 (*tiar-1*) (Figura 13) [95]. TIAR-1 es uno de los ortólogos de TIA-1 y TIAR de mamíferos. Los otros dos ortólogos de TIA-1 y TIAR en *C. elegans* son TIAR-2 y TIAR-3. En mamíferos, TIA-1 y TIAR fueron originalmente descritas como proteínas de unión a RNA con funciones proapoptóticas [69, 105]. Las proteínas purificadas de TIA-1 y TIAR inducen la fragmentación de DNA en timocitos permeabilizados, sugiriendo que estas proteínas quizás sean responsables de la inducción de apoptosis en este tipo de células [69, 105]. Adicionalmente, TIA-1 promueve la inclusión del

exón 6 durante el splicing del receptor de Fas resultando en la formación de la isoforma proapoptótica [75]. Además de su rol en la apoptosis, las proteínas TIA-1 y TIAR han sido involucradas en varias funciones celulares, incluidas el splicing, la traducción, la degradación de mRNAs específicos y la formación de gránulos de estrés [29, 70-77, 79, 106-110]. Sin embargo, poco se sabe de la participación de TIA-1 y TIAR en la línea germinal [78, 79]. Debido a lo anterior y a que encontramos a *tiar-1* como un gen que se requiere para inducir apoptosis por ayuno (Figura 13), resultó interesante estudiar la función de TIAR-1 en la línea germinal de *C. elegans*. Además de que esta familia de proteínas no había sido descrita en el nematodo.

5.1.4 CONCLUSIONES

El silenciamiento en 34 de los 64 genes analizados incrementó significativamente la apoptosis fisiológica en los animales.

El silenciamiento en 4 de los 64 genes analizados disminuyó significativamente la apoptosis fisiológica en los animales.

El silenciamiento en 36 de los 64 genes analizados no incrementó el número de cuerpos apoptóticos en los animales ayunados.

CAPÍTULO 2: EL HOMÓLOGO DE TIA-1/TIAR EN *C. ELEGANS*, TIAR-1, SE REQUIERE PARA INDUCIR APOPTOSIS DE LAS CÉLULAS GERMINALES

En *C. elegans*, la apoptosis fisiológica en la gónada del hermafrodita elimina más de la mitad de las células para mantener la calidad de los ovocitos y la homeostasis en la línea germinal mediante un mecanismo desconocido. Factores externos también pueden afectar la apoptosis de las células germinales. La proteína EGL-1 induce apoptosis de las células germinales cuando los animales son expuestos a patógenos o a agentes que producen un daño al DNA. La apoptosis inducida por daño al DNA también requiere a la proteína CEP-1/p53. Previamente, en el laboratorio se encontró que el choque de calor, el estrés osmótico y el estrés oxidativo inducen apoptosis de las células germinales a través de un mecanismo independiente de EGL-1 y

CEP-1 y que requiere a la vía de las MAPKK. Sin embargo, se observó que el ayuno incrementa la apoptosis de las células germinales a través de un mecanismo desconocido. En busca de proteínas que participan en la apoptosis inducida por ayuno, encontramos a la proteína de unión a RNA TIAR-1 (un homólogo de la familia TIA-1/TIAR de mamíferos). En este artículo mostramos que en *C. elegans* TIAR-1 es requerido para inducir apoptosis en la línea germinal bajo diferentes condiciones. También mostramos que TIAR-1 actúa por debajo de CED-9/BCL2 para inducir apoptosis durante el estrés, y no parece regular directamente la acumulación de los mRNAs de *ced-4* y *ced-3*. TIAR-1 se expresa ubicuamente en el citoplasma de las células somáticas y germinales; en estas últimas se asocia de manera transitoria a gránulos P. También mostramos que los animales que pierden la expresión de TIAR-1 son estériles debido a defectos en la ovogénesis y espermatogénesis. Nuestro trabajo muestra que la proteína TIAR-1 es requerida para una correcta función de la línea germinal, y demostramos también que esta proteína es importante para inducir apoptosis de las células germinales durante diferentes condiciones de estrés.

october 2013

genesis

The Journal of Genetics and Development

editor sally a. moody

WILEY Blackwell

ISSN 1526-968X

Volume 51 no. 10

ARTICLE

The *C. elegans* TIA-1/TIAR Homolog TIAR-1 Is Required to Induce Germ Cell Apoptosis

Carlos Giovanni Silva-García and Rosa Estela Navarro*

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

Received 5 June 2013; Revised 20 July 2013; Accepted 22 July 2013

Summary: In *Caenorhabditis elegans*, physiological germ cell apoptosis eliminates more than half of the cells in the hermaphrodite gonad to support gamete quality and germline homeostasis by a still unidentified mechanism. External factors can also affect germ cell apoptosis. The BH3-only protein EGL-1 induces germ cell apoptosis when animals are exposed to pathogens or agents that produce DNA damage. DNA damage-induced apoptosis also requires the nematode p53 homolog CEP-1. Previously, we found that heat shock, oxidative, and osmotic stresses induce germ cell apoptosis through an EGL-1 and CEP-1 independent mechanism that requires the MAPKK pathway. However, we observed that starvation increases germ cell apoptosis by an unknown pathway. Searching for proteins that participate in stress-induced apoptosis, we found the RNA-binding protein TIAR-1 (a homolog of the mammalian TIA-1/TIAR family of proteins). Here, we show that TIAR-1 in *C. elegans* is required to induce apoptosis in the germline under several conditions. We also show that TIAR-1 acts downstream of CED-9 (a BCL2 homolog) to induce apoptosis under stress conditions, and apparently does not seem to regulate *ced-4* or *ced-3* mRNAs accumulation directly. TIAR-1 is expressed ubiquitously in the cytoplasm of the soma as well as the germline, where it sometimes associates with P granules. We show that animals lacking TIAR-1 expression are temperature sensitive sterile due to oogenesis and spermatogenesis defects. Our work shows that TIAR-1 is required for proper germline function and demonstrates that this protein is important to induce germ cell apoptosis under several conditions. *genesis* 00:1–18. © 2013 Wiley Periodicals, Inc.

Key words: apoptosis; germline; germ cells; TIA-1; TIAR; TIAR-1; stress; *C. elegans*

INTRODUCTION

Germ cells produce gametes, which are the basis of organisms' continuity. To ensure gamete quality, germ cell apoptosis occurs normally as a highly conserved mechanism (Andux and Ellis, 2008; Baum *et al.*, 2005). In *C. elegans*, it is estimated that fifty percent of germ cells are eliminated during oogenesis in a response known as physiological germ cell apoptosis (Gumienny *et al.*, 1999). This process requires the core components of the apoptosis pathway: CED-3, CED-4, and CED-9 but it is activated by an unknown mechanism. The BCL2 family member CED-9 prevents apoptosis by sequestering the APAF1 homolog CED-4. During physiological germ cell apoptosis an unidentified mechanism inactivates CED-9. This stimulus liberates CED-4, which in turn activates the caspase CED-3 (Lettre and Hengartner, 2006).

Several types of environmental stress increase germ cell apoptosis by different pathways (Derry *et al.*, 2001; Salinas *et al.*, 2006; Schumacher *et al.*, 2001). DNA damage triggers germ cell apoptosis through the proapoptotic proteins EGL-1 (a BH3-only protein) and CEP-1 (the p53 homolog; Derry *et al.*, 2001; Schumacher *et al.*, 2001). Pathogen infections induced apoptosis in an EGL-1 dependent manner (Aballay and Ausubel, 2001).

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

*Correspondence to: Rosa E. Navarro, Departamento de Biología Celular y Desarrollo, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México. Apartado Postal 70-600, México DF 04510, Mexico. E-mail: rnavarro@ifc.unam.mx

Contract grant sponsor: PAPIIT-UNAM, Contract grant numbers: IN225509 and IN207412; Contract grant sponsor: CONACYT-MEXICO, Contract grant numbers: 50896-Q and 103856-Q.

Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

DOI: 10.1002/dvg.22418

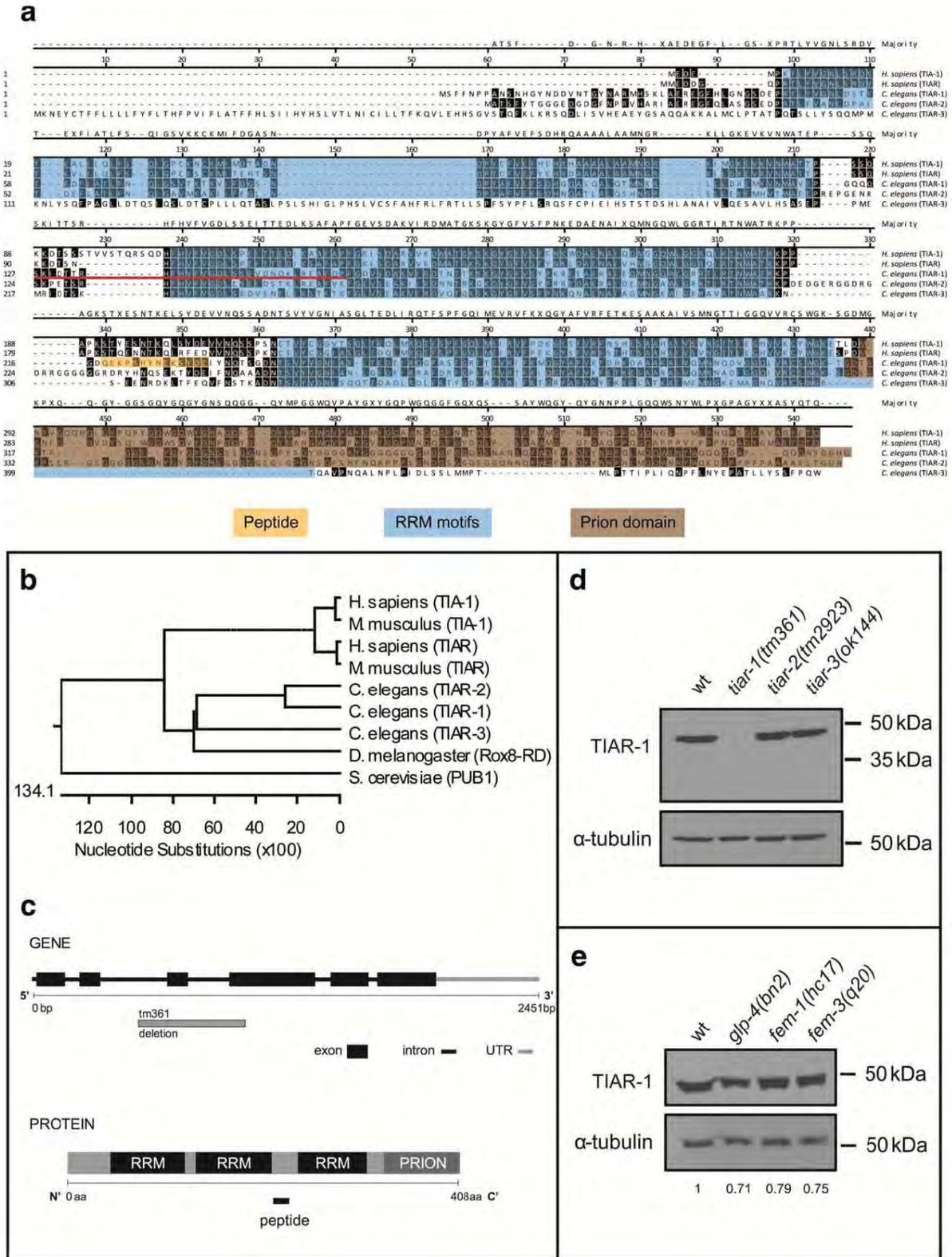


FIG. 1.

Previously, we found that oxidative and osmotic stress, as well as heat shock, activate germ cell apoptosis through the MAPKK pathway and independently of EGL-1 and CEP-1/p53 (Salinas *et al.*, 2006). Unexpectedly, we observed that starvation induces germ cell apoptosis by an unknown mechanism that is independent of the EGL-1, CEP-1/p53 and the MAPKK pathways (Salinas *et al.*, 2006). Characterization of the pathways that regulate stress-induced germ cell apoptosis will contribute to our understanding of how the germline stays healthy to pass genetic information for the next generation.

In this article, we show the role of TIAR-1, an RNA-binding protein from the TIA-1/TIAR family, in germ cell apoptosis. TIA-1/TIAR proteins were originally described as cytotoxic granule-associated RNA-binding proteins with proapoptotic functions. Purified recombinant TIA-1 and TIAR induced DNA fragmentation in digitonin-permeabilized thymocytes, suggesting that these proteins may be responsible for inducing apoptosis in cytolytic lymphocyte targets (Kawakami *et al.*, 1992; Tian *et al.*, 1991). Additionally, TIA-1 promotes Fas receptor exon 6 inclusion during splicing, resulting in the formation of a proapoptotic isoform involved in Fas-mediated apoptosis (Izquierdo *et al.*, 2005). Also, TIA-1 interacts with Fas-activated serine/threonine kinase (FAST), which is a regulator of Fas-induced apoptosis (Li *et al.*, 2004; Tian *et al.*, 1995). Besides apoptosis, TIA-1/TIAR proteins are involved in other cellular functions, including splicing, translation, repression, degradation of specific mRNAs and stress granule formation (Anderson and Kedersha, 2002b; Del Gatto-Konczak *et al.*, 2000; Förch and Valcárcel, 2001; Förch *et al.*, 2000, 2002; Gilks *et al.*, 2004; Izquierdo *et al.*, 2005; Kawai *et al.*, 2006; Kedersha *et al.*, 1999; Kuwano *et al.*, 2008; Le Guiner *et al.*, 2001; Lopez de Silanes *et al.*, 2005; Piecyk *et al.*, 2000; Yamasaki *et al.*, 2007; Zuccato *et al.*, 2004).

Here, we show that in *C. elegans* TIAR-1 is required to induce germ cell apoptosis under different conditions, including starvation, heat shock, osmotic, oxidative stress, and UV irradiation. This nematode lacks the Fas apoptosis-inducing pathway, and in this article, we show that to trigger apoptosis TIAR-1 acts downstream of the BCL2 homolog CED-9 but apparently does not directly regulate the accumulation of *ced-4* or *ced-3* mRNAs. Our findings introduce TIAR-1 as a new com-

ponent in the *C. elegans* germline whose function is important under normal growth and stress conditions.

RESULTS

TIAR-1 Is Ubiquitously Expressed

In an ongoing screen to identify genes that participate in starvation-induced germ cell apoptosis, we detected C18A3.5, a gene that encodes one of the three TIA-1/TIAR homologs in *C. elegans* (Fig. 1a,b). The other two homologs are *tiar-2* (*Y46G5A.13*) and *tiar-3* (*C07A4.1*; Fig. 1a,b). The predicted TIAR-1 protein is composed of 408 residues that contains three RNA recognition motifs and a prion-like domain (Fig. 1a,c). TIAR-1 displays 46.1 and 43.3% overall amino acid sequence identity with human TIA-1 and TIAR, respectively.

To investigate TIAR-1 protein expression, we produced a rabbit antibody against a 14 amino acid peptide covering positions 218–231 (Fig. 1a,c). Western blotting with affinity-purified antiserum revealed a single ~46 kDa band, whereas the predicted size was 45.2 kDa (Fig. 1d). This band was not observed in *tiar-1(tm361)* mutant animals (Fig. 1d). In contrast, the band was detected in *tiar-2(tm2923)* and *tiar-3(ok144)* mutant animals (Fig. 1d), which indicates that the antibody specifically recognizes TIAR-1 protein. The *tm361* allele carries a 579 bp deletion that eliminates exon 3 and 33% of exon 4 (Fig. 1c). RT-PCR experiments revealed that *tiar-1(tm361)* animals expressed a transcript of 1054 bp. This transcript was not in frame and had lost 232 bp of the original ORF between positions 242 and 475.

TIAR-1 protein levels were slightly lower in mutants with a feminized germline [*fem-1(bc17)* (79%; Kimble *et al.*, 1984)], a masculinized gonad [*fem-3(q20gf)* (75%; Barton *et al.*, 1987)] or a reduced germline [*glp-4(bn2)* (71%; Beanan and Strome, 1992; Fig. 1e]. These data demonstrate that TIAR-1 is not exclusively expressed in the germline, and that its expression is abundant in somatic tissues. However, it is intriguing that TIAR-1 expression is similarly affected in mutants that do not have germline, sperm, or oocytes. A possible explanation for this is that perhaps whenever some

FIG. 1. The *C. elegans* TIA-1/TIAR homolog TIAR-1 is expressed in both somatic and germline. (a) Protein alignment in the TIA-1/TIAR family. The alignment was performed using human TIA-1 and TIAR and *C. elegans* TIAR-1/2/3 sequences, and the Clustal W Method. Conserved residues are marked with black boxes. The peptide against which the antibody was generated is shown in yellow. The conserved RRM motifs are shown in blue, and the prion-like domain is shown in brown. (b) Phylogenetic analysis of the TIA-1/TIAR family. *Saccharomyces cerevisiae* PUB1 protein is used as an out-group. The length of each pair of branches represents the distance between sequences, and the units at the bottom of the tree indicate the number of substitution events. (c) Schematic representation of the *tiar-1* gene and its protein. Peptide: QEKPSHYNEKSYDE. RRM: RNA recognition motifs. (d,e) Western blot analyses of whole-animal protein from 100 one-day-old animals of the indicated background. The blots were probed with the affinity-purified rabbit TIAR-1 antibody. A commercial mouse α -tubulin antibody (Sigma) was used for the loading control. Molecular markers are shown on the right, and expression levels are indicated at the bottom.

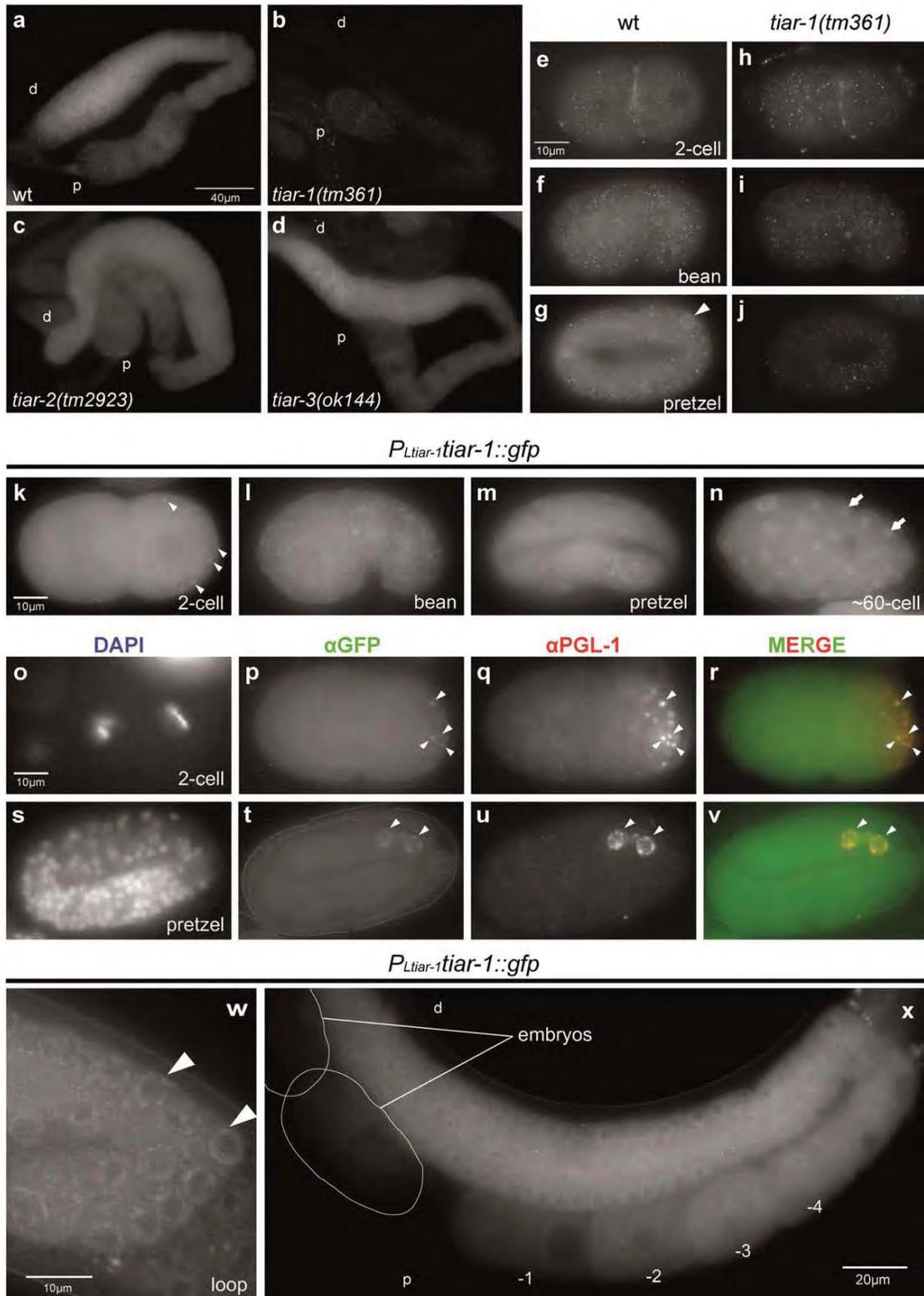


FIG. 2.

Table 1
tiar-1(tm361) Produce Fewer Offspring Than Wild Type Animals and Show Increased Embryonic Lethality

| Genotype | % Offspring (n) | | % Embryonic lethality (n) | | % Sperm (n) | |
|---|-----------------|-----------|---------------------------|-----------|-------------|-----------|
| | 20°C | 25°C | 20°C | 25°C | 20°C | 25°C |
| ♀ N2 | 100 (50) | 100 (51) | 0.4 (40) | 1.2 (41) | ND | 100 (30) |
| ♀ <i>tiar-1(tm361)</i> | 47.4 (39) | 0.7 (42) | 7.8 (39) | 0.0 (42) | ND | 94.2 (30) |
| ♀ N2 vs ♂ <i>him-8(e1489)</i> | 100 (4) | ND | 4.5 (4) | ND | ND | ND |
| ♀ <i>tiar-1(tm361)</i> vs ♂ <i>him-8(e1489)</i> | 43.6 (8) | ND | 7.2 (8) | ND | ND | ND |
| ♂ <i>him-8(e1489)</i> | ND | ND | ND | ND | 100 (15) | 100 (15) |
| ♂ <i>tiar-1(tm361); him-8(e1489)</i> | ND | ND | ND | ND | 48.7 (15) | 34.7 (15) |
| ♀ <i>fog-2(q71)</i> vs ♂ <i>him-8(e1489)</i> | 100 (17) | ND | 0.4 (17) | ND | ND | ND |
| ♀ <i>fog-2(q71)</i> vs ♂ <i>tiar-1(tm361); him-8(e1489)</i> | 22.7 (7) | ND | 4.4 (7) | ND | ND | ND |
| ♀ <i>tiar-1(tm361); P_{Stiar-1}gfp:tiar-1</i> | 82.3 (22) | 7.4 (23) | 31.6 (22) | 15.5 (23) | ND | ND |
| ♀ <i>tiar-1(tm361); P_{pie-1}gfp:tiar-1</i> | 26.1 (20) | 12.1 (20) | 1.4 (20) | 0.6 (20) | ND | ND |
| ♀ <i>tiar-1(tm361); P_{Ltiar-1}gfp:tiar-1</i> | 59.8 (25) | 35.6 (25) | 2.7 (25) | 0.6 (25) | ND | ND |

Hermaphrodites were individually selected as L4 larvae and then transferred to new plates every 24 h over the course of 3 or 4 days, depending on the temperature (25 or 20°C, respectively). Plates were scored for dead embryos and surviving offspring every 24 h. Embryos that did not hatch within 24 h after laying were considered dead. To study oocytes contributions to fertility, we crossed *tiar-1(tm361)* hermaphrodites with *him-8(e1489)* males. To study male fertility, *tiar-1(tm361); him-8(e1489)* males were crossed with *fog-2(q71)* females. To determine sperm number, we stained extruded gonads from one-day-old males with DAPI and counted sperm under a fluorescent microscope. The percentages of each category are shown, with the number of animals tested is given in parentheses. ND: not determined.

alterations in the germline occur, TIAR-1 somatic expression is affected as a result.

Whole-mount immunostaining revealed that TIAR-1 had a diffuse pattern of expression in the cytoplasm of several tissues (Supporting Information Fig. S1a-d,i), and this expression was reduced in *tiar-1(tm361)* animals (Supporting Information Fig. S1e-h,j). TIAR-1 expression was particularly observed in germ cells where sometimes it has a perinuclear association (see insets in Supporting Information Fig. S1a-d,i). In dissected wild-type hermaphrodite gonads, TIAR-1 was observed in the cytoplasm (Fig. 2a), and this expression was reduced in *tiar-1(tm361)* animals but not affected in *tiar-2(tm2923)* or *tiar-3(ok144)* animals (Fig. 2b-d). TIAR-1 expression appears lower in the most proximal oocytes (Fig. 2a,c,d). In male gonads, TIAR-1 was expressed in the cytoplasm of all germ cells except mature sperm (Supporting Information Fig. S1k,l). Unexpectedly in extruded gonads, we did not see TIAR-1 associated with perinuclear granules, as was observed in whole-mount immunostaining. A possible explanation is that TIAR-1 may not associate with perinuclear granules very tightly therefore its association is easily lost during certain fixation methods or manipulations. Another possible explanation is that TIAR-1 associates

to perinuclear granules transiently and only during certain conditions.

During embryogenesis, TIAR-1 was observed in all blastomeres and its levels seemed to increase at later stages relative to early stages (Fig. 2e-g). In late stages of embryogenesis, TIAR-1 was again observed in germ cell perinuclear granules (Fig. 2g; arrowhead). A granular pattern and cortex-like signal background artifacts were observed in *tiar-1(tm361)* embryos, but differences between specific TIAR-1 expression and background were clearer in older embryos (Fig. 2e-j), likely because TIAR-1 was expressed at low level at earlier stages.

To study TIAR-1 *in vivo*, we produced transgenic animals using microparticle bombardment (Praitis *et al.*, 2001). Our first attempt used a construct that carried 300 bp of the predicted *tiar-1* promoter, *gfp*, 1227 bp of the *tiar-1* ORE, and 485 bp of the downstream 3' UTR (*P_{Stiar-1}gfp:tiar-1*; the S denotes the shorter promoter). This construct was expressed in the soma in a pattern similar to that observed for the native protein by immunostaining (compare Fig. 2e-g and Supporting Information Fig. S1i with S1m,p,r-v), but it was not expressed in the germline, possibly because of natural transgene silencing in this tissue (Kelly *et al.*, 1997). It

FIG. 2. TIAR-1 is mainly expressed in the cytoplasm of *C. elegans* gonads and embryos. Gonads (a-d) and embryos (e-j) from the indicated background were dissected and stained with the affinity-purified TIAR-1 antibody. TIAR-1 expression in wild-type (a), *tiar-1(tm361)* (b), *tiar-2(tm2923)* (c), and *tiar-3(ok144)* (d) gonads. TIAR-1 expression in wild-type (e-g) and *tiar-1(tm361)* (h-j) embryos. (k-x) *P_{Ltiar-1}TIAR-1:GFP* is localized in cytoplasm and sometimes is associated with P granules. (k-n) *P_{Ltiar-1}tiar-1:gfp* transgenic animals were mounted and observed by fluorescence microscopy. Arrowheads point to P granules in k. *P_{Ltiar-1}TIAR-1:GFP* expression in the nuclei of ~60-cell embryo (n; arrows). (o-v) *P_{Ltiar-1}tiar-1:gfp* transgenic embryos were dissected and stained with GFP and PGL-1 antibodies. (w) The loop area of a gonad arm of *P_{Ltiar-1}tiar-1:gfp* transgenic animals showing P granule localization (arrowheads). (x) *P_{Ltiar-1}TIAR-1:GFP* is expressed diffusely in the cytoplasm in the gonad. *P_{Ltiar-1}TIAR-1:GFP* expression is slightly decreased in the most proximal oocytes, especially in the -1 oocyte. This low expression continues throughout early embryogenesis. d: distal; p: proximal. Pictures from k to n have different exposure to ensure the visualization of P granules and the nuclear localization.

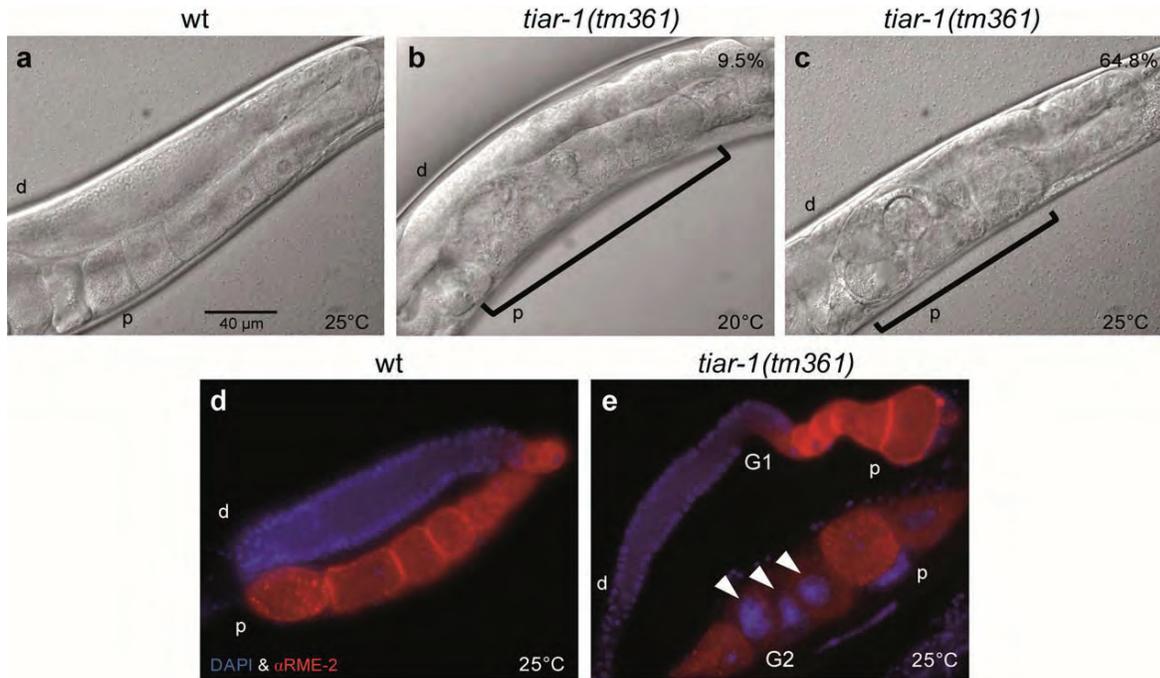


FIG. 3. Loss of *tiar-1* results in oogenesis defects. (a–c) Nomarski views of gonads from one-day-old wild-type (a) and *tiar-1(tm361)* (b,c) hermaphrodites grown at indicated temperatures. The percentage of animals with the depicted phenotype is shown in each picture. The clasps in b,c indicate abnormal oocytes. (d,e) Immunofluorescent images of extruded gonads from one-day-old wild-type and *tiar-1(tm361)* animals stained with an antibody against the yolk receptor protein RME-2 (red) and DAPI (blue). The arrowheads in e point to endomitotic oocytes. d: distal; p: proximal; G1: gonad 1; G2: gonad 2.

is also possible that the construct was lacking a DNA region required for germline expression.

Therefore, we generated a second construct carrying 1997 bp of the *tiar-1* promoter, 1966 bp of the *tiar-1* genomic sequence, *gfp* and 1500 bp of the *tiar-1* 3' UTR ($P_{Ltiar-1}tiar-1:gfp$); the L denotes the longer promoter). $P_{Ltiar-1}TIAR-1:GFP$ expression was similar to the expression of the native protein as measured by antibody staining in soma and germline, and also to the expression of the previous transgene (Supporting Information Fig. S1o,2k–n,x). Interestingly, we observed $P_{Ltiar-1}TIAR-1:GFP$ associated with perinuclear granules (Fig. 2k,w; arrowheads). This association was only observed occasionally when we used antibody staining of the native protein (Fig. 2g and Supporting Information S1a–d). To test if observed perinuclear granules are P granules, we used PGL-1 as a marker (Kawasaki *et al.*, 1998). We immunostained $P_{Ltiar-1}TIAR-1:GFP$ animals using GFP and PGL-1 antibodies and observed a colocalization between these two markers (Fig. 2o–v). These data suggest that TIAR-1 associates with P granules.

Occasionally, nuclear expression of $P_{Ltiar-1}TIAR-1:GFP$ was observed in some embryos (Fig. 2n; arrows). Similar to what we observed using TIAR-1 antibody in immunostainings, $P_{Ltiar-1}TIAR-1:GFP$ expression appears

reduced in the most proximal oocytes (–1 and –2 oocytes; Fig. 2x). This lower expression of TIAR-1 transgene continues through early embryogenesis (Fig. 2x).

To study solely TIAR-1 expression in the germline, we decided to use the *pie-1* promoter (Stitzel *et al.*, 2006). This construct carried 3845 bp of the *pie-1* promoter, *gfp*, 1966 bp of the *tiar-1* genomic sequence and 879 bp of 3'UTR ($P_{pie-1gfp:tiar-1}$), and it was expressed in the gonad in a manner similar to that of the native protein as measured by antibody staining (Supporting Information Fig. S1n,q,w–a'). The expression of this construct was observed occasionally associated with perinuclear granules in embryos (Supporting Information Fig. S1w,x). Similar to what we previously observed, the $P_{pie-1gfp:tiar-1}$ transgene associates with perinuclear granules in certain conditions supporting the idea that the association of TIAR-1 to these structures is transient or easily affected.

TIAR-1 Is Important for Fertility

tiar-1(tm361) animals are shorter and move more slowly suggesting that TIAR-1 might have a somatic function, but in this manuscript, we will focus on its germline role. *tiar-1(tm361)* hermaphrodites show

temperature-sensitive sterility because they had 47.4% offspring and 7.8% embryonic lethality at 20°C, whereas at 25°C, they had only 0.7% offspring and almost no embryos were found (Table 1). We thus evaluated whether the low fertility was influenced by oocyte defects. We crossed *tiar-1(tm361)* hermaphrodites with *bim-8(1489)* males. *bim-8(e1489)* hermaphrodites produce 30% more males than wild-type animals, and they are often used for fertility experiments (Riddle *et al.*, 1997). Crossed *tiar-1(tm361)* hermaphrodites produced 43.6% offspring and showed 7.2% embryonic lethality at 20°C (Table 1). This result suggests that oocyte defects are in part responsible for the low fertility observed in *tiar-1(tm361)* hermaphrodites.

Nomarski microscopy revealed that a low percentage of *tiar-1(tm361)* gonads presented atypical oocytes (9.5%) while the rest of gonads appeared wild-type. This phenotype increased at 25°C (64.8%; Fig. 3a-c). Using an antibody against the yolk receptor RME-2, which is an oocyte marker (Grant and Hirsh, 1999), and DAPI, we observed that some *tiar-1(tm361)* oocytes displayed enlarged nuclei with increased DNA content (Fig. 3d,e; arrowheads). This phenotype is known as Emo (endomitotic replication of the DNA within the oocyte) and is typically coupled with ovulation defects (Iwasaki *et al.*, 1996). Our results suggest that TIAR-1 might play a role in oogenesis and/or ovulation.

We next investigated whether TIAR-1 is required for spermatogenesis. We first stained dissected gonads with DAPI to detect nuclei. *tiar-1(tm361)* hermaphrodites produced almost a wild-type number of spermatids at 25°C (94.2%; Table 1). We next analyzed the requirement for TIAR-1 in the male gonad. To obtain more males, we generated a double mutant: *tiar-1(tm361); bim-8(e1489)*. These double mutant males produced fewer sperm than *bim-8(e1489)* males (48.7 and 34.7% at 20 and 25°C, respectively; Table 1). To assess the fertility of *tiar-1(tm361); bim-8(e1489)* males, we set up crosses with *fog-2(q71)* animals. *fog-2(q71)* animals exclusively produce oocytes, but they are fertile when crossed (Schedl and Kimble, 1988). *fog-2(q71)* females crossed with *tiar-1(tm361); bim-8(e1489)* males produced only 22.7% offspring and showed 4.4% embryonic lethality (Table 1).

Because *tiar-1(tm361)* animals exhibit a deficient locomotion, it is also possible that they cannot mate efficiently. To assess this possibility, we marked sperm mitochondria using Mitotracker (Life Technologies, Carlsbad, CA; Hill and L'Hernault, 2001). Only 11% of the *fog-2(q71)* females crossed with *tiar-1(tm361); bim-8(e1489)* males carrying labeled sperm, which indicates that these males could not cross efficiently. Despite this deficiency, whenever crosses were successful, animals had offspring although less than wild-type animals. Together these data suggest that TIAR-1 also plays a role during spermatogenesis.

We evaluated the fertility and embryonic lethality in the rescued animals. *tiar-1(tm361); P_{Stiar-1}gfp:tiar-1* animals (somatic tissues expression) showed an improvement in fertility (82.3%) at 20°C; however, their embryonic lethality was high (31.6%; Table 1). These data suggest that there are some functions of TIAR-1 in somatic tissues, which can be related to the somatic gonad that influence fertility. *tiar-1(tm361); P_{pie-1}gfp:tiar-1* animals (germline expression) had 26.1% offspring and 1.4% embryonic lethality at 20°C (Table 1). *tiar-1(tm361); P_{Ltiar-1}tiar-1:gfp* animals (soma/germline expression) showed 59.8% fertility and 2.7% embryonic lethality at 20°C. The three rescued animals showed a slight improvement in fertility and embryonic development at 25°C (Table 1). It seems that TIAR-1 expression in the germline is important for embryo development because when an improvement in fertility was observed in *tiar-1(tm361); P_{Stiar-1}gfp:tiar-1* animals (somatic tissues expression), embryonic lethality was higher.

There was an improvement in fertility when TIAR-1 was expressed in solely in the germline or in a soma/germline combination; however, it is unclear why the *P_{Ltiar-1}tiar-1:gfp* construct was unable to fully rescue these phenotypes. It is possible that some elements required for TIAR-1 function were still missing in *P_{Ltiar-1}tiar-1:gfp* construct or that the genomic region where transgene was inserted is affected. Another possible explanation is that the addition of the GFP to the TIAR-1 construct could have an effect on its function. Regardless, our data suggest that TIAR-1 expression in the soma and the germline is important for both embryogenesis and fertility.

TIAR-1 Is Required to Induce Germ Cell Apoptosis Under Several Types of Stresses

Six hours of food deprivation induces germ cell apoptosis in *C. elegans* although the gonad still remains healthy (Salinas *et al.*, 2006). We originally found *tiar-1* in an RNAi screen to identify genes that regulate starvation-induced germ cell apoptosis. To test whether *tiar-1*, *tiar-2*, and *tiar-3* are involved in apoptosis, we crossed each mutant with the MD701 strain (*P_{lim-7}ced-1:gfp*), which is used for detection of germ cell engulfment (Schumacher *et al.*, 2005). To induce starvation, we exposed the animals to 6 h of bacteria deprivation and then analyzed them under a fluorescent microscope. According to our previous findings, germ cell apoptosis increases by up to 2.0-fold in starved *ced-1:gfp* control animals (Fig. 4a and Table 2; Salinas *et al.*, 2006). In control conditions, *tiar-1(tm361); ced-1:gfp* animals showed a slightly decreased number of physiological germ cell corpses but did not exhibit increased apoptosis under starvation (Fig. 4a and Table 2). *tiar-2(tm2923); ced-1:gfp* and *tiar-3(ok144); ced-1:gfp* animals showed normal levels of physiological and

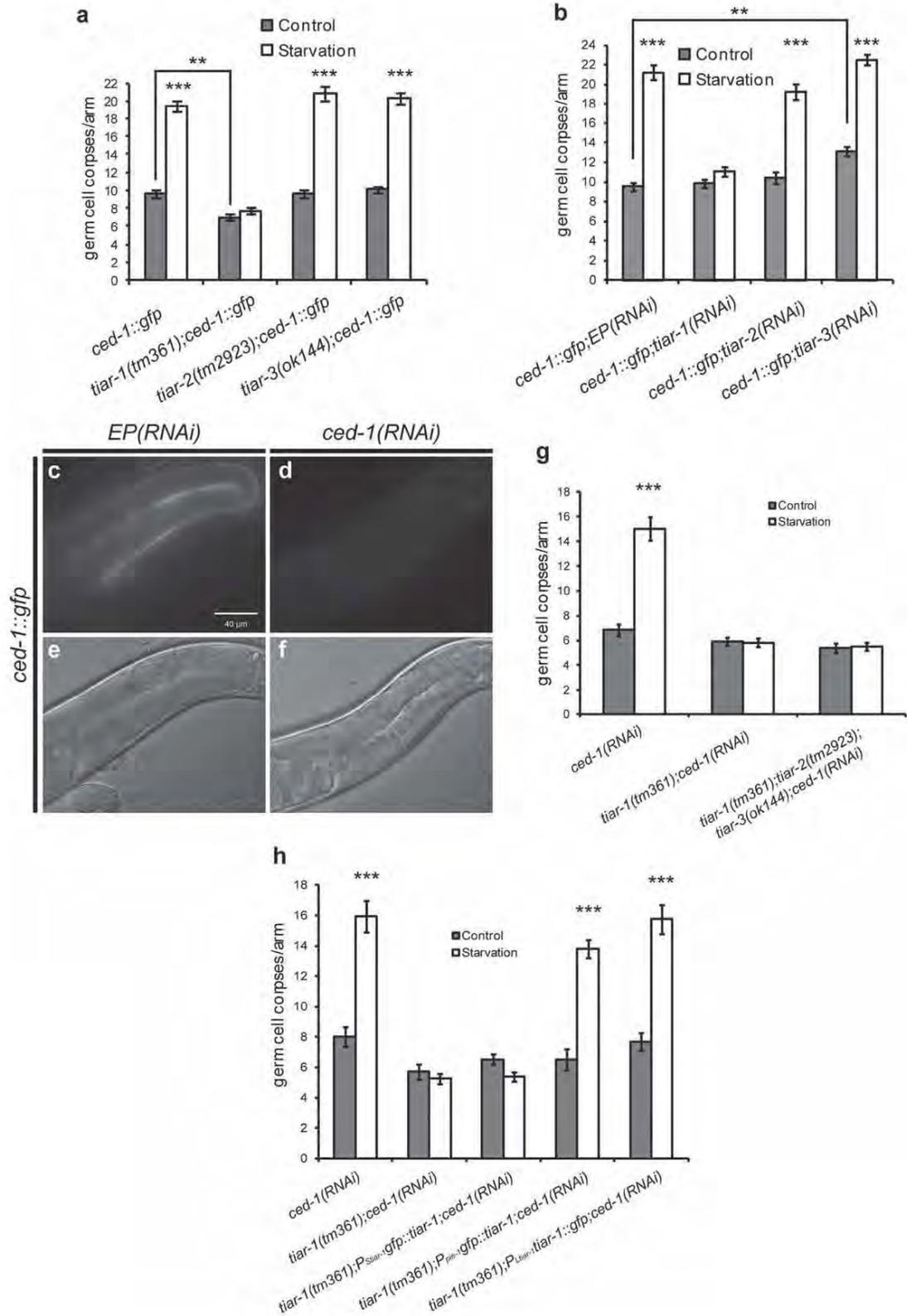


FIG. 4.

starvation-induced germ cell apoptosis (Fig. 4a and Table 2). To validate these data, we used RNAi to silence each gene in a *ced-1:gfp* background. We obtained similar results; except that we did not find a decrease number in physiological germ cell corpses in *ced-1:gfp;tiar-1(RNAi)* animals while *ced-1:gfp;tiar-3(RNAi)* animals showed a slightly increased number in this type of cell death (Fig. 4b and Table 2).

To test the redundancy of the *C. elegans* TIA-1/TIAR family of proteins in germ cell apoptosis, we silenced the *ced-1* gene in a triple mutant. Cell corpses can be detected under Nomarski microscopy directly and *ced-1* silencing or deletion aids their detection. CED-1 is a receptor involved in the engulfment process whose absence induces the accumulation of cell corpses (Zhou *et al.*, 2001). First, we confirmed silencing efficiency by feeding *ced-1* dsRNA to MD701 animals and we observed that the *ced-1:gfp* expression decreased considerably its expression (Fig. 4c-f). Triple *tiar-1(tm361);tiar-2(tm2923);tiar-3(ok144);ced-1(gfp)* mutant animals did not show starvation-induced apoptosis even after two days of adulthood (Fig. 4g and Table 2) confirming that only TIAR-1 is required for this process.

We studied the somatic and germline contributions of TIAR-1 to starvation-induced germ cell apoptosis in animals rescued with transgenic lines. We found that two-day old *tiar-1(tm361);P_{S_{tiar-1}}gfp;tiar-1;ced-1(RNAi)* animals (somatic tissues expression) did not show a significant increase in apoptosis in response to starvation (Fig. 4h and Table 2). In contrast, two-day old *tiar-1(tm361);P_{pie-1}gfp;tiar-1;ced-1(RNAi)* (germline expression) and *tiar-1(tm361);P_{L_{tiar-1}}gfp;tiar-1;ced-1(RNAi)* (somatic/germline expression) animals exhibited apoptosis during starvation (Fig. 4h and Table 2). Our results suggest that TIAR-1 germline expression is required for starvation-induced germ cell apoptosis.

We next evaluated whether TIAR-1 is necessary to induce apoptosis in other conditions like osmotic, oxidative, heat shock and UV stress (Derry *et al.*, 2001; Salinas *et al.*, 2006; Schumacher *et al.*, 2001; see Materials and Methods for details). We found that TIAR-1 is required to induce apoptosis under all tested stress conditions (Fig. 5a and Table 2) suggesting that TIAR-1 might play a more general role during germ cell apoptosis.

TIAR-1 Induces Germ Cell Apoptosis Downstream of *ced-9*

Since TIAR-1 is required to induce germ cell apoptosis via several pathways that converge on CED-9, we

decided to test if this protein is required for germ cell death when *ced-9* is silenced. CED-9 is the *C. elegans* homolog of BCL2, which protects cells from apoptosis by preventing the activation of CED-3/caspase by binding CED-4/APAF1 (Lettre and Hengartner, 2006). Thus, when CED-9 is absent, massive apoptosis is triggered, which in some cases can result in lethality (Hengartner *et al.*, 1992). First, we evaluated *ced-9* silencing efficiency by semiquantitative RT-PCR and found that its expression was diminished ~50% in wild-type or *tiar-1(tm361)* backgrounds (Fig. 5b). This silencing efficiency is similar to that obtained by Ito *et al.* (2010).

As expected, *ced-9* silencing in *ced-1:gfp* control animals caused a significant increase in germ cell apoptosis (2.7-fold; Fig. 5c and Table 2). However, a less substantial increase (1.3-fold) in germ cell apoptosis was observed in *tiar-1(tm361);ced-1:gfp;ced-9(RNAi)* animals (Fig. 5c and Table 2). To confirm these results, we used acridine orange staining as an alternative apoptosis detection technique (Navarro *et al.*, 2001). Wild-type control animals showed a mean count of 1.7 germ cell corpses per arm of the gonad, whereas *ced-9(RNAi)* animals contained 11.4 germ cell corpses/arm (a 6.7-fold increase; Fig. 5d and Table 2). In control *tiar-1(tm361)* animals, we detected a mean of 1.1 germ cell corpses/arm; however, when *ced-9* was silenced, we observed only 2.7 germ cell corpses/arm (a 2.5-fold increase) (Fig. 5d and Table 2). Our results demonstrate that TIAR-1 acts downstream of CED-9 to induce germ cell apoptosis.

TIAR-1 mammalian counterparts are well-characterized RNA binding proteins that act on mRNA to regulate splicing (Del Gatto-Konczak *et al.*, 2000; Förch and Valcárcel, 2001; Förch *et al.*, 2000, 2002; Izquierdo *et al.*, 2005; Le Guiner *et al.*, 2001; Zuccato *et al.*, 2004) or stability (Yamasaki *et al.*, 2007). Therefore, we tested whether the expression of genes that are downstream of *ced-9*, like *ced-4* and *ced-3*, was affected in the absence of *tiar-1*. We used *ced-3* and *ced-4* specific oligonucleotides to perform semiquantitative RT-PCR of cDNA obtained from wild-type and *tiar-1(tm361)* one-day-old animals that were well-fed or starved for 6 h. While *ced-3* does not seem to have alternative splicing forms, *ced-4* has two known as short (S) and long (L), which have opposite functions (Shaham and Horvitz, 1996). *ced-4S* (the predominant transcript) induce apoptosis, while *ced-4L* has antiapoptotic function (Shaham and Horvitz, 1996).

In wild-type animals and during starvation, *ced-4L* showed a minor increase in its accumulation (Fig. 5e)

FIG. 4. Starvation-induced germ cell apoptosis requires TIAR-1 germline expression. Animals of the indicated backgrounds were exposed to starvation conditions as described in the Materials and Methods. Cell corpses were counted under fluorescent (a,b) or DIC (g and i) microscopy. The numbers of germ cell corpses per gonad arm were counted in one-day-old (a,b) or two-day-old (g,h) living animals. We used RNAi to knock down *tiar-1*, *tiar-2*, and *tiar-3* (b) and *ced-1* (c-h), and empty plasmid (EP) was used as a control. (c-f) Fluorescence (c, d) or DIC (e, f) images of *ced-1:gfp;EP(RNAi)* and *ced-1:gfp;ced-1(RNAi)* animals. Error bars represent the SEM. *P*-values were determined by unpaired *t*-tests (Mann Whitney). See Table 2 for germ cell apoptosis number and statistics.

Table 2
Stress-Induced Germ Cell Apoptosis in Different Genetic Backgrounds

| Genotype | Control | Starvation | Salt | Paraquat | Heat Shock | UV |
|---|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| TIAR-1 is required to induce germ cell apoptosis under several stress conditions ^a | | | | | | |
| <i>ced-1:gfp</i> | 9.6 ± 0.25 (180) | 19.4 ± 0.56 (60) <i>P</i> < 0.0001 | 16.2 ± 0.56 (40) <i>P</i> < 0.0001 | 15.7 ± 0.70 (40) <i>P</i> < 0.0001 | 15.7 ± 0.57 (40) <i>P</i> < 0.0001 | 16.5 ± 0.73 (40) <i>P</i> < 0.0001 |
| <i>tiar-1(tm361);ced-1:gfp</i> | 7.8 ± 0.21 (235) <i>P</i> < 0.0001 | 7.7 ± 0.36 (60) <i>P</i> = 0.9911 | 8.8 ± 0.48 (60) <i>P</i> = 0.0451 | 8.0 ± 0.36 (60) <i>P</i> = 0.4587 | 7.6 ± 0.34 (60) <i>P</i> = 0.9898 | 7.0 ± 0.32 (60) <i>P</i> = 0.1149 |
| <i>tiar-2(tm2923);ced-1:gfp</i> | 9.7 ± 0.44 (60) | 20.9 ± 0.81 (60) <i>P</i> < 0.0001 | ND | ND | ND | ND |
| <i>tiar-3(ok144);ced-1:gfp</i> | 10.1 ± 0.44 (60) | 20.3 ± 0.59 (60) <i>P</i> < 0.0001 | ND | ND | ND | ND |
| <i>ced-1:gfp;EP(RNAi)</i> | 9.6 ± 0.46 (35) | 21.3 ± 0.75 (34) <i>P</i> < 0.0001 | ND | ND | ND | ND |
| <i>ced-1:gfp;tiar-1(RNAi)</i> | 9.9 ± 0.48 (53) | 11.1 ± 0.48 (60) <i>P</i> = 0.1265 | ND | ND | ND | ND |
| <i>ced-1:gfp;tiar-2(RNAi)</i> | 10.5 ± 0.60 (30) | 19.3 ± 0.77 (28) <i>P</i> < 0.0001 | ND | ND | ND | ND |
| <i>ced-1:gfp;tiar-3(RNAi)</i> | 13.2 ± 0.48 (60) <i>P</i> < 0.0001 | 22.6 ± 0.52 (60) <i>P</i> < 0.0001 | ND | ND | ND | ND |
| Only TIAR-1 is required for starvation-induced germ cell apoptosis ^b | | | | | | |
| <i>ced-1(RNAi)</i> | 6.8 ± 0.45 (30) | 15.0 ± 0.96 (30) <i>P</i> < 0.0001 | ND | ND | ND | ND |
| <i>tiar-1(tm361);ced-1(RNAi)</i> | 5.9 ± 0.32 (30) | 5.8 ± 0.36 (30) <i>P</i> = 0.7583 | ND | ND | ND | ND |
| <i>tiar-1(tm361);tiar-2(tm2923); tiar-3(ok144);ced-1(RNAi)</i> | 5.4 ± 0.38 (30) | 5.5 ± 0.34 (30) <i>P</i> = 0.7247 | ND | ND | ND | ND |
| Starvation-induced germ cell apoptosis requires TIAR-1 germline expression ^b | | | | | | |
| <i>ced-1(RNAi)</i> | 8.0 ± 0.63 (30) | 15.9 ± 1.0 (30) <i>P</i> < 0.0001 | ND | ND | ND | ND |
| <i>tiar-1(tm361);ced-1(RNAi)</i> | 5.7 ± 0.63 (30) | 15.9 ± 1.0 (30) <i>P</i> < 0.0001 | ND | ND | ND | ND |
| <i>tiar-1(tm361);P_{S_{TIAR-1}}:gfp;tiar-1;ced-1(RNAi)</i> | 6.5 ± 0.32 (30) | 5.4 ± 0.31 (30) <i>P</i> = 0.0142 | ND | ND | ND | ND |
| <i>tiar-1(tm361);P_{DIE-1}:gfp;tiar-1;ced-1(RNAi)</i> | 6.5 ± 0.69 (30) | 13.8 ± 0.60 (30) <i>P</i> < 0.0001 | ND | ND | ND | ND |
| <i>tiar-1(tm361);P_{L_{TIAR-1}}:gfp;ced-1(RNAi)</i> | 7.7 ± 0.60 (30) | 15.8 ± 0.95 (30) <i>P</i> < 0.0001 | ND | ND | ND | ND |
| TIAR-1 is required to induce germ cell apoptosis in the absence of CED-9 ^a | | | | | | |
| <i>ced-1:gfp;EP(RNAi)</i> | 5.5 ± 0.55 (50) | ND | ND | ND | ND | ND |
| <i>ced-1:gfp;ced-9(RNAi)</i> | 14.9 ± 0.59 (60) <i>P</i> < 0.0001 | ND | ND | ND | ND | ND |
| <i>tiar-1(tm361);ced-1:gfp;EP(RNAi)</i> | 5.4 ± 0.75 (60) | ND | ND | ND | ND | ND |
| <i>tiar-1(tm361);ced-1:gfp;ced-9(RNAi)</i> | 6.8 ± 0.49 (60) <i>P</i> = 0.0295 | ND | ND | ND | ND | ND |
| <i>N2;EP(RNAi)</i> | 1.7 ± 0.25 (50) | ND | ND | ND | ND | ND |
| <i>N2;ced-9(RNAi)</i> | 11.4 ± 0.56(60) <i>P</i> < 0.0001 | ND | ND | ND | ND | ND |
| <i>tiar-1(tm361);EP(RNAi)</i> | 1.1 ± 0.15 (60) | ND | ND | ND | ND | ND |
| <i>tiar-1(tm361);ced-9(RNAi)</i> | 2.7 ± 0.31 (60) <i>P</i> = 0.0002 | ND | ND | ND | ND | ND |

^aOne- or ^btwo-day-old animals of the indicated backgrounds were subjected to different stress conditions (see details in the Materials and Methods). When *ced-1:gfp* animals or acridine orange assay were used, cell corpses were detected by fluorescence microscopy. When the *ced-1(RNAi)* background was used, cell corpses were detected by DIC microscopy. The average number of cell corpses per gonad arm is shown with the SEM. The number of gonads evaluated (one per animal) is shown in parentheses. *P*-values were determined by unpaired *t*-tests (Mann Whitney). EP: empty plasmid; ND: not determined.

while *ced-4S* and *ced-3* did not show a significant difference on their expression. Unfortunately, we did not find significant differences in the accumulation levels of *ced-4S*, *ced-4L*, and *ced-3* mRNAs when *tiar-1* was absent neither in control or starvation conditions (Fig. 5e). Furthermore, we did not observe differences in the accumulation of the splicing forms of *ced-4L* vs *ced-4S* (Fig. 5e). These results suggest that TIAR-1 does not regulate the splicing or mRNA accumulation levels of *ced-4S*, *ced-4L*, and *ced-3* during normal or starvation conditions.

DISCUSSION

The TIA-1/TIAR protein family has been studied for several years in tissue culture (Anderson and Kedersha, 2002a,b; Buchan and Parker, 2009; Förch and Valcárcel, 2001; Kedersha and Anderson, 2007); however, relatively few studies have been performed in the context of a whole organism (Beck *et al.*, 1998; Kharraz *et al.*, 2010; Piecyk *et al.*, 2000). Here, we show that the TIA-1/TIAR family has three homologs in *C. elegans* and demonstrate that TIAR-1 is the only one that has a conserved role in apoptosis. We showed that TIAR-1 is expressed in the cytoplasm of soma and germ cells where it occasionally associates with P granules. Although TIAR-1 appears to play important roles during larval development, locomotion, and embryogenesis, in this work, we focused on its function in the germline. We found that TIAR-1 is important for fertility and promotes germ cell apoptosis downstream of the *C. elegans* BCL2 homolog CED-9 under different stress conditions.

TIAR-1 Belongs to the TIA-1/TIAR Family of Proteins

TIAR-1 displays slightly higher amino acid structural identity with the human TIA-1 and TIAR (46% and 43%, respectively) than TIAR-2 (40% and 40%) or TIAR-3 (31% and 33%). Similar to the human TIA-1/TIAR proteins, TIAR-1 and TIAR-2 contain a prion-like domain and three RRM motifs. In contrast, TIAR-3 does not contain a prion-like domain and possesses only two RRM motifs (Fig. 1a). Furthermore, here we show that TIAR-1 is the only member of the *C. elegans* TIA-1/TIAR family of proteins that is required to induce germ cell apoptosis under different stress conditions (Figs. 4 and 5). TIAR-1 is ubiquitously expressed at all *C. elegans* developmental stages. Diffuse cytoplasmic expression was observed in most cells (Fig. 2 and Supporting Information S1). We found TIAR-1 occasionally associated with P granules in the germline (Fig. 2 and Supporting Information S1). Because we do not see, TIAR-1 always associated with P granules using immunostainings and/or in transgenic animals, we suggest that its association with these structures might be transient or sensitive to certain conditions or manipulations.

Members of the TIA-1/TIAR family localized to nuclei and cytoplasm in mammalian cells (Kedersha *et al.*, 1999; Zhang, 2005). Although TIA-1 and TIAR proteins do not contain a NES (nuclear exportation sequence) domain, some of these proteins shuttle between the cytoplasm and the nucleus (Kedersha *et al.*, 1999; Zhang, 2005). In the nuclei, members of the TIA-1/TIAR family participate in splicing (Del Gatto-Konczak *et al.*, 2000; Förch and Valcárcel, 2001; Förch *et al.*, 2000, 2002; Izquierdo *et al.*, 2005; Le Guiner *et al.*, 2001; Zuccato *et al.*, 2004); while in the cytoplasm they regulated mRNA stability and translation (Kawai *et al.*, 2006; Kuwano *et al.*, 2008; Lopez de Silanes *et al.*, 2005; Piecyk *et al.*, 2000; Yamasaki *et al.*, 2007).

Although in *C. elegans* TIAR-1 is primarily expressed in the cytoplasm and does not contain a NES domain; this protein was occasionally observed in embryonic nuclei (Fig. 2n), which suggests that it might shuttle between the cytoplasm and the nucleus under certain conditions. Similarly, a previous report showed nuclear accumulation of TIAR-2 in oocytes (Jud *et al.*, 2008). The main localization of TIAR-1 into the cytoplasm suggests that in *C. elegans* this protein could play a more important role in functions related to mRNA stability or repression and not to splicing. Although it is possible that TIAR-1 needs a specific interaction or condition to be located in the nuclei.

TIAR-1 Is Important for Fertility

tiar-1 ablation results in short animals with slow locomotion, embryonic lethality and germline defects. Among germline phenotypes are temperature-sensitive fertility defects due to oogenesis and spermatogenesis problems (Fig. 3 and Table 1). At 25°C some *tiar-1(tm361)* animals showed oocytes that appeared abnormal and present an Emo phenotype (Fig. 3e), which typically occurs in cases of oocyte maturation/ovulation defects (Iwasaki *et al.*, 1996). *tiar-1*^{-/-} mice are also sterile, but this deficiency is attributed to a lack of spermatogonia/oogonia (Beck *et al.*, 1998). In *tiar-1*^{-/-} mice, primordial germ cells are reduced in number but still migrate to the genital ridge, although they are not eliminated by apoptosis (Beck *et al.*, 1998). Accordingly, with this, we did not observe an increase in physiological germ cell apoptosis in *tiar-1(tm361)* hermaphrodites (Fig. 4a). The variability in the somatic and germline phenotypes of *tiar-1(tm361)* animals and their mammalian counterparts may be due to the variability in the downstream targets of affected proteins (Kim *et al.*, 2007; Lopez de Silanes *et al.*, 2005).

TIAR-1 Induces Germ Cell Apoptosis Downstream of CED-9

TIA-1 and TIAR were originally described as cytotoxic granule-associated RNA-binding proteins with pro-

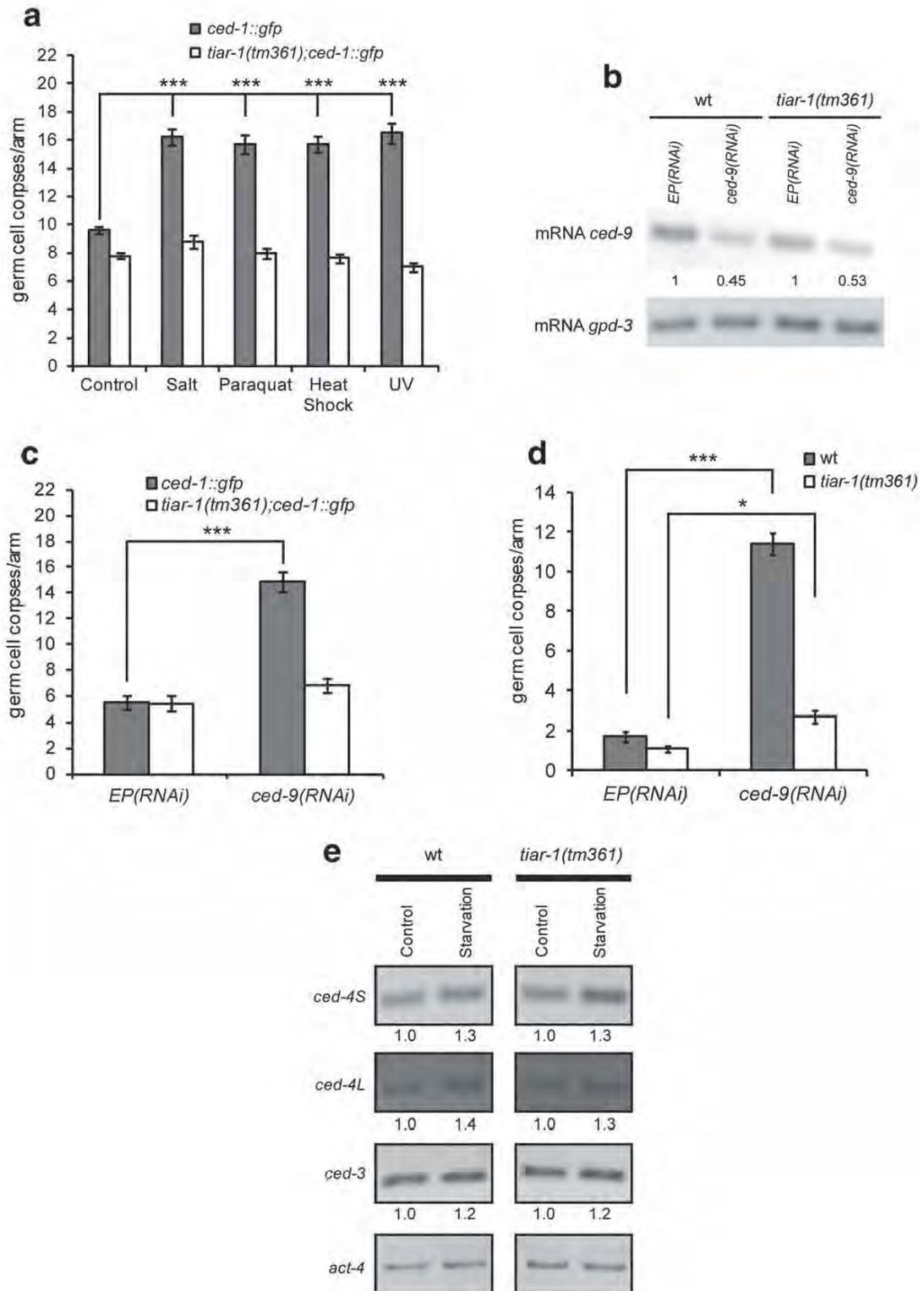


FIG. 5.

apoptotic functions (Kawakami *et al.*, 1992; Tian *et al.*, 1991). One of the mechanisms by which TIA-1 induces apoptosis in mammals is by promoting an alternatively spliced form of the pro-apoptotic Fas receptor (Förch *et al.*, 2000; Izquierdo *et al.*, 2005). To our knowledge, *C. elegans* has no Fas homolog; therefore, TIAR-1 must function through a different pathway and here we demonstrate that TIAR-1 acts downstream of CED-9/BCL2 to induce germ cell apoptosis (Fig. 5d). We also show that TIAR-1 is required to induce germ cell apoptosis under several stress conditions that are activated via different pathways (Figs. 4 and 5; Derry *et al.*, 2001; Salinas *et al.*, 2006; Schumacher *et al.*, 2001) suggesting that TIAR-1 might have a general role regulating germ cell death.

Although mammalian TIA-1 and TIAR had been implicated as splicing regulators (Del Gatto-Konczak *et al.*, 2000; Förch and Valcárcel, 2001; Förch *et al.*, 2000, 2002; Izquierdo *et al.*, 2005; Le Guiner *et al.*, 2001; Zuccato *et al.*, 2004), we found that TIAR-1 does not seem to regulate the alternative splicing forms of *ced-4* to induce germ cell apoptosis (Fig. 5e). This idea is supported by the fact that we barely found TIAR-1 in germ cells nuclei (Figs. 2 and Supporting Information S1). Members of the TIA-1/TIAR family of proteins can also regulate the stability of certain mRNAs (Yamasaki *et al.*, 2007); however, TIAR-1 does not seem to be regulating the accumulation of *ced-4L*, *ced-4S* or *ced-3* mRNAs under normal or stress conditions (Fig. 5e).

In mammals, during normal conditions the cytochrome *c* mRNA is being actively translated, but when cells are subject to stress TIA-1 represses its translation (Kawai *et al.*, 2006). Therefore, a possible scenario is that in *C. elegans* TIAR-1 could be regulating *ced-4L*, *ced-4S*, or *ced-3* mRNA translation. Finally, it is also possible that TIAR-1 is regulating the splicing, stability or translation of one of the *ced-4L*, *ced-4S*, or *ced-3* regulators to induce stress-induced germ cell apoptosis.

Despite the fact that the *tiar-1(tm361)* phenotype is pleiotropic, these animals did not have increased physiological germ cell apoptosis (Fig. 4). Indeed, we observed that *tiar-1(tm361);ced-1:gfp* animals showed slightly lower physiological germ cell apoptosis (Fig. 4a) suggesting that might play a minor role in physiological germ cell apoptosis. Although it has been shown that sometimes somatic tissues can influence germ cell apoptosis (Ito *et al.*, 2010), we found that TIAR-1

expression solely in the germline is sufficient to trigger germ cell apoptosis (Fig. 4h).

Our data suggest a scenario where TIAR-1 converges on the same regulatory point downstream of CED-9 to induce germ cell apoptosis under conditions like starvation, heat shock, DNA damage, osmotic and oxidative stress, which are controlled via different regulatory pathways (Fig. 6). Since TIAR-1 is a putative RNA-binding protein whose mammalian homologs regulate mRNA splicing, expression or degradation, it is possible that this protein regulates one of these aspects in a key component of the apoptosis machinery to induce apoptosis under stress.

MATERIALS AND METHODS

Nematode Culture and RNAi

The maintenance and genetic manipulation of *C. elegans* strains (Supporting Information Table S1) derived from the wild-type Bristol strain N2 were following standard conditions (Brenner, 1974) at indicated temperatures (20, 24, or 25°C).

RNAi was performed by feeding as previously described (Timmons *et al.*, 2001). RNAi constructs for the *tiar-1*, *tiar-2* and *ced-1* genes were obtained from the *C. elegans* RNAi v1.1 feeding library (Open Biosystems). The following genes were cloned using the indicated primers: *tiar-3* (5'-ATGTGCTTACCAACTGCGACTCC-3' and 5'-TCACCATTGTGGGAAGGAAGCAACTG-3') and *ced-9* (5'-GGAATCCCCGATATTCGAGAAGAAGCACG-3' and 5'-GGGGTACCCCTTACTTCAAGCTGAACATCATC-3'). The products were digested with EcoRI and KpnI and cloned into the feeding vector (PD129.36), and the resulting plasmid was transformed into *Escherichia coli* strain HT115.

Antibody Production and Western Blot Analysis

Rabbit polyclonal TIAR-1 antibodies were raised against the TIAR-1 peptide QEKPSHYNEKSYDE (residues 218 to 231). The peptide was synthesized (Sigma) and injected into two rabbits according to Sigma protocols. The TIAR-1 antibody was purified from the rabbit antisera by TIAR-1 peptide affinity column (Sulfolink, Pierce).

For Western blot analysis, 100 *C. elegans* hermaphrodites from the indicated backgrounds were grown at 20 or 25°C, collected and washed in PBS 1× with loading

FIG. 5. TIAR-1 is required to induce germ cell apoptosis under several stress conditions and in the absence of CED-9. Animals of the indicated backgrounds were exposed to stress conditions as described in the Materials and Methods. (a,c,d) Germ cell corpses were counted under fluorescent microscopy using a *ced-1:gfp* background (a,c) and acridine orange (d). The numbers of germ cell corpses per gonad arm were counted in one-day-old living animals. (b) Semi-quantitative RT-PCR to evaluate *ced-9* silencing efficiency. (b–d) We used RNAi to knock down *ced-9* expression and an empty plasmid (EP) was used as a control. Error bars represent the SEM. *P*-values were determined by unpaired *t*-tests (Mann Whitney); see Supporting Information Table S1. (e) Semi-quantitative RT-PCR to evaluate mRNA expression levels of *ced-4S*, *ced-4L*, and *ced-3* in wild-type and *tiar-1(tm361)* animals in control and starvation conditions.

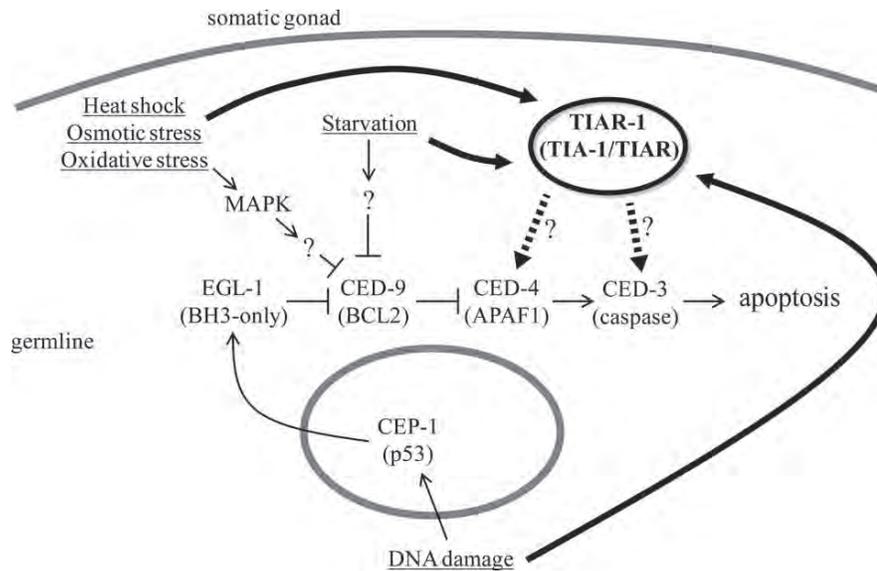


FIG. 6. Model depicting *tiar-1* germline requirement for stress-induced germ cell apoptosis. Because TIAR-1 acts downstream of CED-9 to induce apoptosis, we hypothesize that this protein induces germ cell apoptosis by regulating the mRNA splicing, stability, or translation of *ced-4*, *ced-3*, or some of their regulators (dotted lines).

buffer and DTT (174 mM). To extract protein, samples were boiled for 5 min and spun for 1 min at 13,000 rpm. The supernatant was loaded into 10% polyacrylamide gel, which was subsequently transferred onto an Immobilon-P PVDF membrane (Millipore) following standard procedures. Membranes were initially incubated with the TIAR-1 antibody (1:500) and then with a secondary HRP-conjugated goat anti-rabbit antibody (1:1000; Pierce). Bound antibody was detected using Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce). An α -tubulin monoclonal antibody (Sigma, T9026) was used as a loading control. The TIAR-1 antibody obtained from the first rabbit only recognized one specific band in Western blotting experiments (Fig. 1c), but the TIAR-1 antibody obtained from the second rabbit recognized two main bands of ~ 46 kDa and ~ 65 kDa (Supporting Information Fig. S2). The ~ 46 kDa band appeared to be the TIAR-1 protein, but the other band (~ 65 kDa) appeared to be non-specific because it was still present in protein extracts from a triple *tiar-2(tm2923);tiar-1(tm361);tiar-3(ok144)* mutant (Supporting Information Fig. S2). Because this antibody did not specifically recognize the TIAR-1 protein, it was not used in subsequent experiments.

Immunofluorescence Analysis

For TIAR-1, PGL-1 and RME-2 immunolocalization in gonads and embryos, samples were processed as previously described (Salinas *et al.*, 2007). Briefly, extruded gonads or embryos from one-day-old gravid adults grown at 20 or 25°C were frozen in liquid nitrogen,

freeze-cracked, fixed in methanol at -20°C for 1 min and treated with $1\times$ PBS, 3.7% paraformaldehyde, 80 mM HEPES, 1.6 mM MgSO_4 , and 0.8 mM EGTA for 30 min at room temperature. The affinity-purified rabbit anti-TIAR-1 antibody was applied at a 1:100 dilution, the PGL-1 and RME-2 antibodies were diluted as in previous studies (Grant and Hirsh, 1999; Kawasaki *et al.*, 1998). Cy3-conjugated goat anti-rat (Jackson ImmunoResearch Laboratories) and Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rabbit secondary antibodies (Molecular Probes) were used at a concentration of 1:100, and 4',6-diamidino-2-phenylindole DAPI was used at a concentration of $1\text{ ng }\mu\text{l}^{-1}$.

Whole-mount immunofluorescence was performed using the Finney-Ruvkun protocol (Finney and Ruvkun, 1990). Briefly, animals grown at 20°C were suspended in Ruvkun's fixing solution (80 mM KCl, 20 mM NaCl, 10 mM EGTA, 5 mM spermidine, 15 mM PIPES, 25% methanol, and 1% paraformaldehyde) and frozen in a dry ice-ethanol bath. Samples were then treated with 1% β -mercaptoethanol followed by 10 mM DTT and finally by 0.3% hydrogen peroxide. Samples were initially incubated with the rabbit anti-TIAR-1 antibody (1:100) and then with $1\text{ ng }\mu\text{l}^{-1}$ DAPI and an Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rabbit antibody (1:100). Samples were mounted in Vectashield fluorescence medium (Vector Laboratories).

Transgenic fluorescent animals were anesthetized with 40 mM NaN_3 , mounted on agar pads and observed under fluorescence microscopy. Images from immunostained samples and *P_{Stiar-1gfp}:tiar-1*, *P_{pie-1gfp}:tiar-1*, and *P_{Ltiar-1}:tiar-1:gfp* transgenic animals were obtained

by MRGrab 1.0.0.4 program on a Nikon Eclipse E600 microscope equipped with an AxioCam MRc digital camera (Zeiss). All images were processed to improve their contrast and brightness in the ImageJ 1.47g program.

Phenotype Studies

To study the germline defects of *tiar-1(tm361)* mutants, one-day-old adults grown at 20 or 25°C were anesthetized (40 mM NaN₃), mounted on agar pads and observed under Nomarski microscopy [Nikon Eclipse E600 microscope equipped with an AxioCam digital camera (Zeiss)] to determine their phenotype. Because the *tiar-1(tm361)* animals are sterile at 25°C, we incubated L1 larvae at 25°C and allowed them to progress to adult stages.

To study the fertility of *tiar-1(tm361)* mutants, hermaphrodites were individually selected as L4 specimens and then transferred to new plates every 24 h over the course of 3 (25°C) or 4 (20°C) days. Plates were scored for dead embryos and surviving offspring. Embryos not hatched within 24 h after being laid were considered dead. N2 was used as the control.

To obtain *tiar-1(tm361)* males, we employed the *bim-8(e1489)* strain, whose hermaphrodites produce ~30% male progeny. To test the fertility of *tiar-1(tm361);bim-8(e1489)* males, we crossed three animals with one *fog-2(q71)* hermaphrodite for 24 h at 20°C and scored fertility, embryonic lethality and successful mating. *bim-8(e1489)* animals were used as the control.

To count sperm, L4 males were incubated at 20 or 25°C for 24 h to allow them to reach adulthood. Male gonads were then dissected, and extruded gonads were fixed as described for immunofluorescence analysis. The samples were then incubated for 5 min in 1× PBT with 1 ng μl⁻¹ DAPI. Stained gonads were visualized using a Nikon Eclipse E600 microscope equipped with an AxioCam digital camera (Zeiss).

Mating efficiency was evaluated as previously described (Hill and L'Hernault, 2001). Briefly, young adult males were incubated in a dark chamber for 3 h at 20°C in the presence of M9 medium containing 75 μM mitotracker (Invitrogen). These males were then crossed and left overnight at 20°C. Sperm transference into uteri and/or spermathecae was scored under fluorescence microscopy. The reported mating efficiency reflects the proportion of successful mating events (i.e., when fluorescent sperm was detected in the uterus of a female) relative to the total number of crosses.

Transgenic Line Constructions

The *tiar-1* transgenes were constructed by Gateway cloning (Invitrogen) using the following regions and primers: *tiar-1* short promoter (5'-GGGGACAACCTTTG

TATAGAAAAGTTGCTGGCTGAAACTTAAAATTATTTG-3' and 5'-GGGGACTGCTTTTTTGTACAACTTGTTCATGGCTTAAATGATAGATCCCTG-3'; 300 bp), *tiar-1* ORF + *tiar-1* 3'UTR (485bp) (5'-GGGGACAGCTTCTTGTACAAAGTGGCCATGTCCTTCTTCAACCCACCAGC-3' and 5'-GGGGACAACCTTTGTATAATAAAGTTGACTTTACCCTCGCATTATTATTGTGC-3'; 1712 bp), *tiar-1* gene + *tiar-1* 3'UTR (879bp) (5'-GGGGACAGCTTCTTGTACAAAGTGGCCATGTCCTTCTTCAACCCACCAGC-3' and 5'-GGGGACAACCTTTGTATAATAAAGTTGAGAAAGCA TTCTGTGTCACATTAATCAG-3'; 2845 bp), *tiar-1* long promoter + *tiar-1* gene (5'-GGGGACAACCTTTGTATAGAAAAGTTGCTGGCTGAAACTTAAAATTATTTG-3' and 5'-GGGGACTGCTTTTTTGTACAACTTGTTCATGGCTTCTTCAACCCACCAGC-3'; 3963 bp), and *tiar-1* 3'UTR (1500bp) (5'-GGGGACAGCTTCTTGTACAAAGTGGCC TAAACTCCAGTATTTTTTAAAAAC-3' and 5'-GGGGACAACTTTGTATAATAAAGTTGACATATTAGTCACAACGGTTTCTCG-3'; 1500 bp). *tiar-1* constructs were introduced by microparticle bombardment (Praitis *et al.*, 2001).

Stress Conditions

Stress conditions were induced as reported previously (Salinas *et al.*, 2006). Briefly, to simulate starvation conditions, one-day-old animals were transferred to NGM plates with or without food and incubated for 6 h. One-day-old animals were incubated for 1 h in control M9 medium or M9 containing 10 mM paraquat (oxidative stress) or 70 mM sodium chloride (osmotic stress); following incubation, the animals were transferred to seeded NGM plates and allowed to recover for 1 h. To induce germ cell apoptosis by heat shock, the animals were incubated at 31°C in a water bath for 3 h and then allowed to recover for 4.5 h. To induce DNA damage, animals were exposed to 0.1 J of UV light (Stratalinker, model 1800) and then allowed to recover for 3.5 h. After every treatment, animals of the appropriate strain were anesthetized and mounted for visualization of cell corpses.

Apoptosis Assays

Cell corpses were counted using Nomarski optics (for *ced-1(RNAi)* experiments) or fluorescence microscopy (for *ced-1:gfp* strains and acridine orange assays). For acridine orange (AO) staining, animals were incubated in 200 ml of 100 μM AO in M9 for 2 h in the dark and then fed for 1 h to decrease background gut fluorescence. After treatment, the animals were anesthetized with 40 mM NaN₃, mounted on agar pads and observed to visualize cell corpses. All statistical analyses were performed using Prism (GraphPad Software). All error bars indicate SEM. All *t*-tests are two-tailed unpaired *t*-tests (Mann Whitney).

RT-PCR

Synchronized animals grown under the described conditions were collected in M9 medium and lysed in

TRIzol buffer (Invitrogen). RNA was extracted from each sample using standard phenol-chloroform-based procedures. cDNA synthesis was performed using the standard reverse transcription protocol from Promega. To analyze mRNA levels, RT-PCR was performed using specific primers for *ced-9*: 5'-AAACGGAATGGAATG GTTG-3' and 5'-AATTTTCCGCGTGCTTCTT-3'; *ced-4S* and *ced-4L*: 5'-TTCGAGAGTATCACGTGGATCGAG-3' and 5'-TACAACGACGTGACATGCTCCAC-3'; *ced-3*: 5'-GAGCAAGATCTCGT TCTCGATCG-3' and 5'-GTCTGA AAACACGGCTTATGGTTG-3'. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase and actin genes (*gpd-3* and *act-4*) were used as loading control with the following primers: *gpd-3*: 5'-CAGCACAAGATCAAGGTCTACAAC-3' and 5'-GAAGACTCCGGTGGACTCAAC-3'; and *act-4*: 5'-ATGT GTGACGACGAGGTTGCC-3' and 5'-CTGGAAGAGAGC CTCTGGGC-3'. The sizes of amplified fragments were 100 bp for *ced-9*, 295 bp for *ced-4S*, 361 bp for *ced-4L*, 247 bp for *ced-3*, 792 bp for *act-4* and 100 bp for *gpd-3*.

ACKNOWLEDGMENTS

The *tm361* and *tm2923* strains were obtained from Japan's National Bioresource Project for the Experimental Animal "Nematode *C. elegans*." All other strains used in this work were provided by the *Caenorhabditis* Genetics Center, which is supported by the NIH National Center for Genetics Resources. The authors thank L. Silvia Salinas for technical assistance. They are grateful to Jorge Ramírez, Lorena Chávez-González, Simón Guzmán-León, and José Luis Santillán-Torres for technical support. They would also like to thank Dr. Valerie Reinke, Dr. Susan Strome (PGL-1), and Dr. Barth Grant (RME-2 antibody) for kindly providing reagents. CGSG received a Ph.D. fellowship from CONACYT-México and a CONACYT/Grant fellowship (103856-Q) to complete his Ph.D. studies. This work represents partial fulfillment of the requirements for CGSG's Ph.D. degree in Biomedical Science from the Universidad Nacional Autónoma de México.

REFERENCES

Aballay A, Ausubel FM. 2001. Programmed cell death mediated by *ced-3* and *ced-4* protects *Caenorhabditis elegans* from *Salmonella typhimurium*-mediated killing. *Proc Natl Acad Sci* 98:2735-2739.

Anderson P, Kedersha N. 2002a. Stressful initiations. *J Cell Sci* 115:3227-3234.

Anderson P, Kedersha N. 2002b. Visibly stressed: The role of eIF2, TIA-1, and stress granules in protein translation. *Cell Stress Chaperones* 7:213-221.

Andux S, Ellis RE. 2008. Apoptosis Maintains Oocyte Quality in Aging *Caenorhabditis elegans* Females. *PLoS Genet* 4:1-13.

Barton MK, Schedl T, Kimble J. 1987. Gain-of-Function Mutations of *fem-3*, a Sex-Determination Gene in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 115:107-119.

Baum JS, St. George JP, McCall K. 2005. Programmed cell death in the germline. *Semin Cell Dev Biol* 16:245-259.

Beanan MJ, Strome S. 1992. Characterization of a germline proliferation mutation in *C. elegans*. *Development* 116:755-766.

Beck ARP, Miller IJ, Anderson P, Streuli M. 1998. RNA-binding protein TIAR is essential for primordial germ cell development. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:2331-2336.

Brenner S. 1974. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77:71-94.

Buchan JR, Parker R. 2009. Eukaryotic stress granules: The ins and outs of translation. *Mol Cell* 36:932-941.

Del Gatto-Konczak F, Bourgeois CF, Guiner CL, Kister L, Gesnel MC, Stévenin J, Breathnach R. 2000. The RNA-binding protein TIA-1 is a novel mammalian splicing regulator acting through intron sequences adjacent to a 5' splice site. *Mol Cell Biol* 20:6287-6299.

Derry WB, Putzke AP, Rothman JH. 2001. *Caenorhabditis elegans* p53: Role in apoptosis, meiosis, and stress resistance. *Science* 294:591-595.

Finney M, Ruvkun G. 1990. The *unc-86* gene product couples cell lineage and cell identity in *C. elegans*. *Cell* 63:895-905.

Förch P, Puig O, Kedersha N, Martínez C, Granneman S, Séraphin B, Anderson P, Valcárcel J. 2000. The apoptosis-promoting factor TIA-1 is a regulator of alternative pre-mrna splicing. *Mol Cell* 6:1089-1098.

Förch P, Puig O, Martínez C, Séraphin B, Valcárcel J. 2002. The splicing regulator TIA-1 interacts with U1-C to promote U1 snRNP recruitment to 5' splice sites. *EMBO J* 21:6882-6892.

Förch P, Valcárcel J. 2001. Molecular mechanisms of gene expression regulation by the apoptosis-promoting protein TIA-1. *Apoptosis* 6:463-468.

Gilks N, Kedersha N, Ayodele M, Shen L, Stoecklin G, Dember LM, Anderson P. 2004. Stress granule assembly is mediated by prion-like aggregation of TIA-1. *Mol Biol Cell* 15:5383-5398.

Grant B, Hirsh D. 1999. Receptor-mediated Endocytosis in the *Caenorhabditis elegans* Oocyte. *Mol Cell Biol* 10:4311-4326.

Gumienny TL, Lambie E, Hartwig E, Horvitz HR, Hengartner MO. 1999. Genetic control of programmed cell death in the *Caenorhabditis elegans* hermaphrodite germline. *Development* 126:1011-1022.

Hengartner MO, Ellis RE, Horvitz HR. 1992. *Caenorhabditis elegans* gene *ced-9* protects cells from programmed cell death. *Nature* 356:494-499.

Hill KL, L'Hernault SW. 2001. Analyses of reproductive interactions that occur after heterospecific matings

- within the genus *Caenorhabditis*. *Dev Biol* 232:105–114.
- Ito S, Greiss S, Gartner A, Derry WB. 2010. Cell-nonautonomous regulation of *C. elegans* germ cell death by *kri-1*. *Curr Biol* 20:333–338.
- Iwasaki K, Mccarter J, Francis R, Schedl T. 1996. *emo-1*, a *Caenorhabditis elegans* Sec61p/homologue, is required for oocyte development and ovulation. *J Cell Biol* 134:699–714.
- Izquierdo JM, Majós N, Bonnal S, Martínez C, Castelo R, Guigó R, Bilbao D, Valcárcel J. 2005. Regulation of Fas alternative splicing by antagonistic effects of TIA-1 and PTB on exon definition. *Mol Cell* 19:475–484.
- Jud MC, Czerwinski MJ, Wood MP, Young RA, Gallo CM, Bickel JS, Petty EL, Mason JM, Little BA, Padilla PA, Schisa JA. 2008. Large P body-like RNPs form in *C. elegans* oocytes in response to arrested ovulation, heat shock, osmotic stress, and anoxia and are regulated by the major sperm protein pathway. *Dev Biol* 318:38–51.
- Kawai T, Lal A, Yang X, Galban S, Mazan-Mamczarz K, Gorospe M. 2006. Translational control of cytochrome c by RNA-binding proteins TIA-1 and HuR. *Mol Cell Biol* 26:3295–3307.
- Kawakami A, Tian Q, Duan X, Streuli M, Schlossman SF, Anderson P. 1992. Identification and functional characterization of a TIA-1-related nucleolysin. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:8681–8685.
- 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.
- Kedersha N, Anderson P. 2007. Mammalian stress granules and processing bodies. *Methods Enzymol* 431: 61–81.
- Kedersha N, Gupta M, Li W, Miller I, Anderson P. 1999. RNA-binding proteins TIA-1 and TIAR link the phosphorylation of eIF-2 α to the assembly of mammalian stress granules. *J Cell Biol* 147:1431–1441.
- Kelly WG, Xu S, Montgomery MK, Fire A. 1997. Distinct requirements for somatic and germline expression of a generally expressed *Caenorhabditis elegans* gene. *Genetics* 146:227–238.
- Kharraz Y, Salmand P-A, Camus A, Auriol J, Gueydan C, Krays V, Morello D. 2010. Impaired embryonic development in mice overexpressing the RNA-binding protein TIAR. *PLoS One* 5:1–12.
- Kim HS, Kuwano Y, Zhan M, Pullmann R, Mazan-Mamczarz K, Li H, Kedersha N, Anderson P, Wilce MCJ, Gorospe M, Wilce JA. 2007. Elucidation of a C-Rich Signature Motif in Target mRNAs of RNA-Binding Protein TIAR. *Mol Cell Biol* 27:6806–6817.
- Kimble J, Edgar L, Hirsh D. 1984. Specification of male development in *Caenorhabditis elegans*: The fem genes. *Dev Biol* 105:234–239.
- Kuwano Y, Kim HH, Abdelmohsen K, Pullmann R Jr., Martindale JL, Yang X, Gorospe M. 2008. MKP-1 mRNA stabilization and translational control by RNA-binding proteins HuR and NF90. *Mol Cell Biol* 28:4562–4575.
- Le Guiner C, Galiana D, Kister L, Breathnach R, Stévenin J, Del Gatto-Konczak F. 2001. TIA-1 and TIAR activate splicing of alternative exons with weak 5' splice sites followed by a U-rich stretch on their own Pre-mRNAs. *J Biol Chem* 276:40638–40646.
- Lette G, Hengartner MO. 2006. Developmental apoptosis in *C. elegans*: A complex CEDnario. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:97–108.
- Li W, Simarro M, Kedersha N, Anderson P. 2004. FAST is a survival protein that senses mitochondrial stress and modulates TIA-1-regulated changes in protein expression. *Mol Cell Biol* 24:10718–10732.
- Lopez de Silanes I, Galban S, Martindale JL, Yang X, Mazan-Mamczarz K, Indig FE, Falco G, Zhan M, Gorospe M. 2005. Identification and functional outcome of mRNAs associated with RNA-binding protein TIA-1. *Mol Cell Biol* 25:9520–9531.
- Navarro RE, Shim EY, Kohara Y, Singson A, Blackwell TK. 2001. *rgb-1*, a conserved predicted RNA helicase required for gametogenesis and protection from physiological germline apoptosis in *C. elegans*. *Development* 128:3221–3232.
- Pieczyk M, Wax S, Beck ARP, Kedersha N, Gupta M, Maritim B, Chen S, Gueydan C, Krays V, Streuli M, Anderson P. 2000. TIA-1 is a translational silencer that selectively regulates the expression of TNF- α . *EMBO J* 19:4154–4163.
- Praitis V, Casey E, Collar D, Austin J. 2001. Creation of Low-Copy Integrated Transgenic Lines in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 157:1217–1226.
- Riddle DL, Blumenthal T, Meyer BJ, Priess JR, editors. 1997. *C. elegans* II, 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Salinas LS, Maldonado E, Macías-Silva M, Blackwell TK, Navarro RE. 2007. The DEAD box RNA helicase VBH-1 is required for germ cell function in *C. elegans*. *Genesis* 45:533–546.
- Salinas LS, Maldonado E, Navarro RE. 2006. Stress-induced germ cell apoptosis by a p53 independent pathway in *Caenorhabditis elegans*. *Cell Death Differ* 13:2129–2139.
- 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.
- Schumacher B, Hofmann K, Boulton S, Gartner A. 2001. The *C. elegans* homolog of the p53 tumor suppressor is required for DNA damage-induced apoptosis. *Curr Biol* 11:1722–1727.

- Schumacher B, Schertel C, Wittenburg N, Tuck S, Mitani S, Gartner A, Conradt B, Shaham S. 2005. *C. elegans ced-13* can promote apoptosis and is induced in response to DNA damage. *Cell Death Differ* 12:153-161.
- Shaham S, Horvitz HR. 1996. An alternatively spliced *C. elegans ced-4* RNA encodes a novel cell death inhibitor. *Cell* 86:201-208.
- 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.
- Tian Q, Streuli M, Saito H, Schlossman SF, Anderson P. 1991. A polyadenylate binding protein localized to the granules of cytolytic lymphocytes induces DNA fragmentation in target cells. *Cell* 67:629-639.
- Tian Q, Taupin J, Elledge S, Robertson M, Anderson P. 1995. Fas-activated Serine/Threonine Kinase (FAST) Phosphorylates TIA-1 during Fas-mediated Apoptosis. *J Exp Med* 182:864-874.
- 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.
- Yamasaki S, Stoecklin G, Kedersha N, Simarro M, Anderson P. 2007. T-cell intracellular antigen-1 (TIA-1)-induced translational silencing promotes the decay of selected mRNAs. *J Biol Chem* 282:30070-30077.
- Zhang T. 2005. Identification of the sequence determinants mediating the nucleo-cytoplasmic shuttling of TIAR and TIA-1 RNA-binding proteins. *J Cell Sci* 118:5453-5463.
- Zhou Z, Hartwig E, Horvitz HR. 2001. CED-1 is a transmembrane receptor that mediates cell corpse engulfment in *C. elegans*. *Cell* 104:43-56.
- Zuccato E, Buratti E, Stuani C, Baralle FE, Pagani F. 2004. An intronic polypyrimidine-rich element downstream of the donor site modulates cystic fibrosis transmembrane conductance regulator exon 9 alternative splicing. *J Biol Chem* 279:16980-16988.

SUPPLEMENTARY INFORMATION

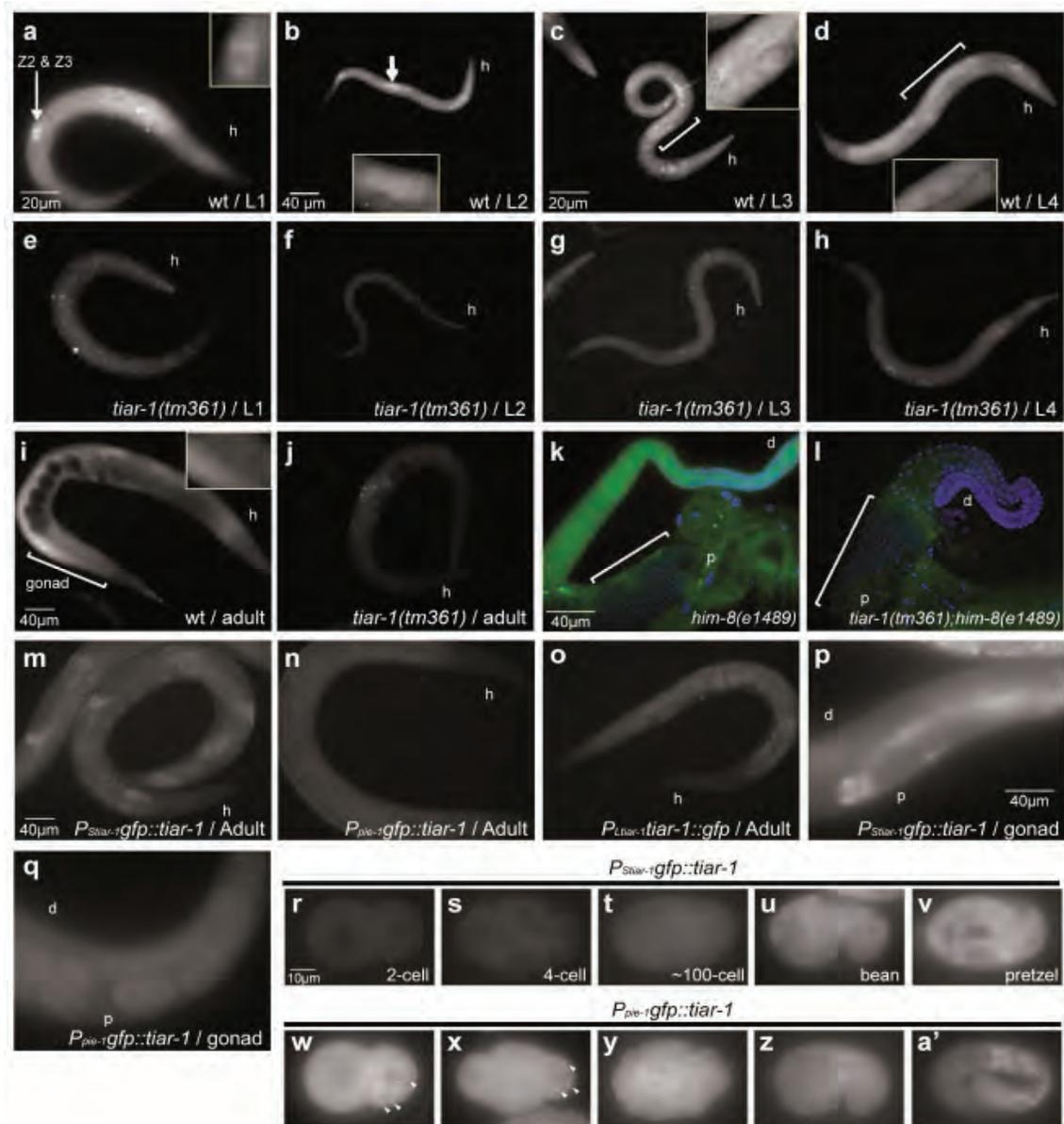


FIG. S1. TIAR-1 is ubiquitously expressed at all developmental stages in *C. elegans*. (a-j) Wt and *tiar-1(tm361)* animals were collected at different stages and immunostained with the affinity-purified TIAR-1 antibody. (k-l) Male gonads from the indicated background were dissected, immunostained with the affinity-purified TIAR-1 antibody and DAPI. (m-q) Animals or (r-a') embryos of indicated transgenic strain were mounted and observed by fluorescence microscopy. Arrows and clasps in a-d and i mark the gonad. The clasps in k-l mark mature sperm. Arrowheads in w-x point to P granules. h= head, d= distal and p= proximal.

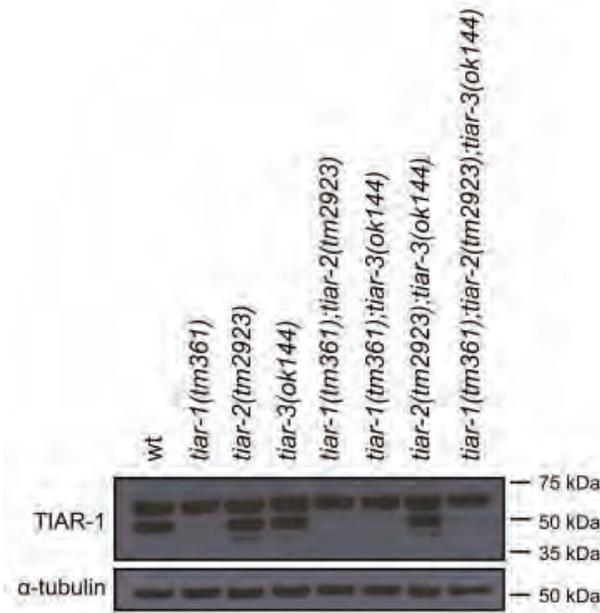


FIG. S2. The affinity-purified TIAR-1 antibody obtained from a second rabbit is nonspecific. Total protein extracts from 100 one-day-old animals from the indicated strains were separated by electrophoresis and transferred onto a membrane that was subsequently incubated with an affinity-purified antibody against TIAR-1. This antibody was obtained from a second rabbit exposed to the same peptide used earlier. A commercial α -tubulin antibody was used as a loading control.

Table S1. Strain used in this work

| Genotype | Transgene description | Strain | Reference |
|---|---|--------|-----------------------------------|
| Mutant strains | | | |
| <i>tiar-1(tm361) II</i> | --- | 361 | This study |
| <i>tiar-2(tm2923) II</i> | --- | 2923 | This study |
| <i>tiar-3(ok144) X</i> | --- | BS3348 | This study |
| <i>tiar-1(tm361) II; tiar-2(tm2923) II; tiar-3(ok144) X</i> | --- | --- | This study |
| <i>glp-4(bn2) I</i> | -- | SS104 | (Beanan and Strome, 1992) |
| <i>fem-1(hc17) IV</i> | --- | BA17 | (Kimble <i>et al.</i> , 1984) |
| <i>fem-3(q20) IV</i> | --- | JK816 | (Barton <i>et al.</i> , 1987) |
| <i>him-8(e1489) IV</i> | --- | CB1489 | (Riddle <i>et al.</i> , 1997) |
| <i>tiar-1(tm361) II; him-8(e1489) IV</i> | -- | --- | This study |
| <i>fog-2(q71) V</i> | --- | JK574 | (Schedl and Kimble, 1988) |
| Transgenes | | | |
| <i>bcls39[P(lim-7)ced-1::GFP + lin-15(+)]</i> | <i>lim-7 prom::ced-1::gfp</i> | MD701 | (Schumacher <i>et al.</i> , 2005) |
| <i>tiar-1(tm361) II; bcls39[P(lim-7)ced-1::GFP + lin-15(+)]</i> | <i>lim-7 prom::ced-1::gfp</i> | --- | This study |
| <i>tiar-2(tm2923) II; bcls39[P(lim-7)ced-1::GFP + lin-15(+)]</i> | <i>lim-7 prom::ced-1::gfp</i> | --- | This study |
| <i>tiar-3(ok144) X; bcls39[P(lim-7)ced-1::GFP + lin-15(+)]</i> | <i>lim-7 prom::ced-1::gfp</i> | --- | This study |
| <i>unc-119(ed3) III; xmls1[pCG.01; tiar-1p::GFP::tiar-1::tiar-1 3'UTR + unc-119(+)]</i> | <i>tiar-1 short prom::GFP::TIAR-1 ORF::tiar-1 3'UTR</i> | --- | This study |
| <i>unc-119(ed3) III; xmls2[pCG.02; pie-1p::GFP::tiar-1::tiar-1 3'UTR + unc-119(+)]</i> | <i>pie-1 prom::GFP::TIAR-1::tiar-1 3'UTR</i> | --- | This study |
| <i>unc-119(ed3) III; xmls3[pCG.03; tiar-1p::tiar-1::GFP::tiar-1 3'UTR + unc-119(+)]</i> | <i>tiar-1 long prom::TIAR-1::GFP::tiar-1 3'UTR</i> | --- | This study |
| <i>tiar-1(tm361) II; xmls1[pCG.01; tiar-1::GFP::tiar-1::tiar-1 3'UTR + unc-119(+)] (unc-119(ed3) III -???)</i> | <i>tiar-1 short prom::GFP::TIAR-1 ORF::tiar-1 3'UTR</i> | --- | This study |
| <i>tiar-1(tm361) II; xmls2[pCG.02; pie-1p::GFP::tiar-1::tiar-1 3'UTR + unc-119(+)] (unc-119(ed3) III -???)</i> | <i>pie-1 prom::GFP::TIAR-1::tiar-1 3'UTR</i> | --- | This study |
| <i>tiar-1(tm361) II; xmls3[pCG.03; tiar-1p::tiar-1::GFP::tiar-1 3'UTR + unc-119(+)] (unc-119(ed3) III -???)</i> | <i>tiar-1 long prom::TIAR-1::GFP::tiar-1 3'UTR</i> | --- | This study |

CAPÍTULO 3: MECANISMO DE INDUCCIÓN DE APOPTOSIS DE TIAR-1

5.3.1 *tiar-1* DISMINUYE SU EXPRESIÓN DURANTE EL AYUNO

Inicialmente, encontramos en un microarreglo a *tiar-1* como un gen que aumenta sus niveles de expresión durante el ayuno. Con el afán de corroborar este dato mediante otra técnica se realizaron ensayos tipo Northern blot y RT-PCR para analizar los niveles del mRNA de *tiar-1* durante el ayuno. Estos análisis se hicieron usando RNA extraído de animales silvestres crecidos en condiciones control y animales ayunados por 6 h. El valor de Z para el gen *tiar-1* en el microarreglo fue de 1.9, lo que indica que aumentó sus niveles de expresión. En el Northern blot la expresión de *tiar-1* disminuyó hasta un 25% (Figura 15 A), mientras que el RT-PCR arrojó que la expresión del mRNA de *tiar-1* disminuyó un 50% (Figura 15 B). Con base en los datos anteriores, podemos concluir que los niveles de mRNA de *tiar-1* disminuyen en condiciones de ayuno. También, analizamos los niveles de expresión

de la proteína TIAR-1 en condiciones de ayuno mediante Western blot, y encontramos que los niveles de TIAR-1 disminuyeron ligeramente (15%) (Figura 15 C).

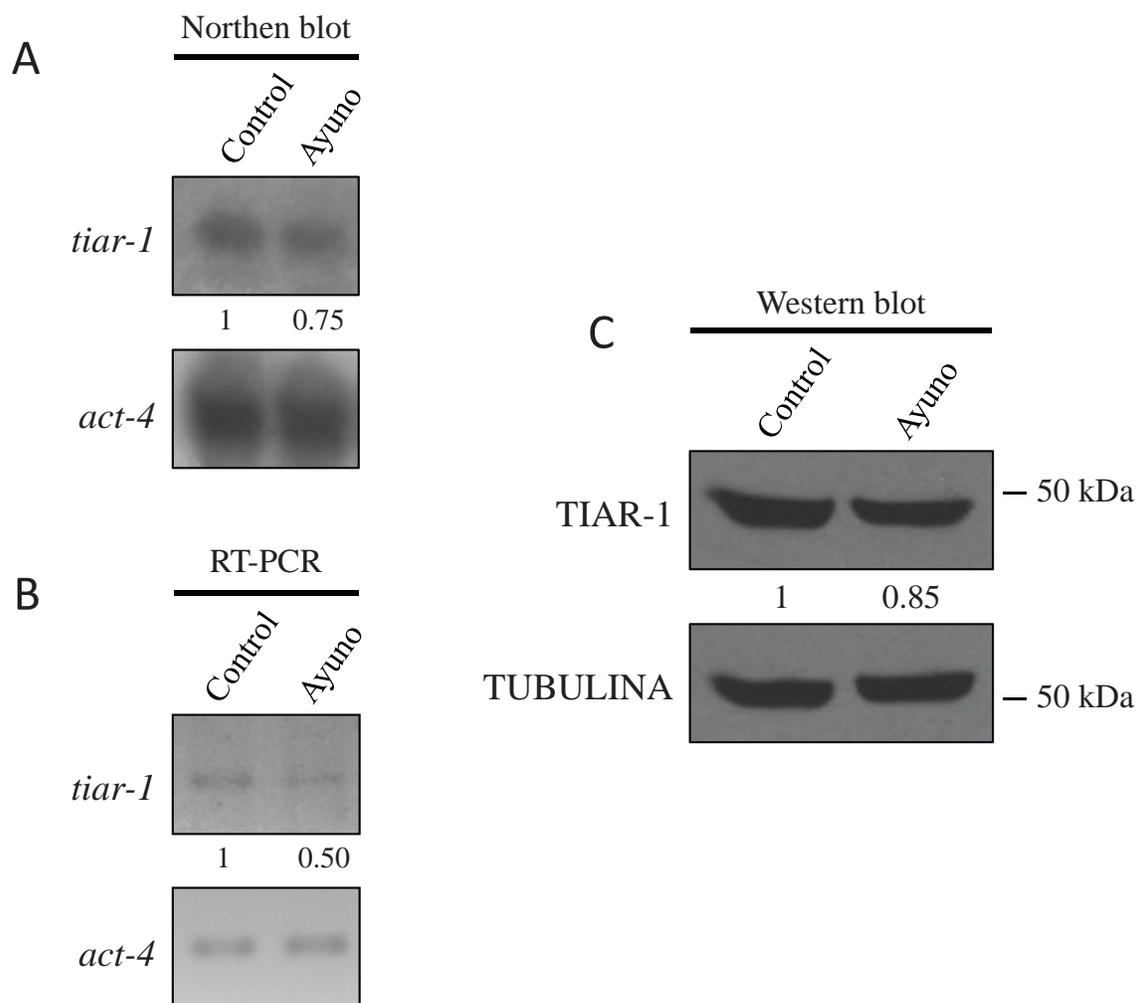


Figura 15| El mRNA y proteína de *tiar-1* disminuyen en condiciones de ayuno.

Animales sincronizados se expusieron a 6 h de ayuno. Posteriormente se colectaron y se extrajo RNA para Northern blot (A y B) y proteína para Western blot (C) como se indica en

Materiales y Métodos. Los números entre cada panel indican los niveles de expresión. El panel inferior corresponde al control de carga del gel en donde se utilizó el gen *act-4* para A y B, y el anticuerpo contra α -tubulina para C.

5.3.2 EL mRNA DE *tiar-1* ESTÁ ENRIQUECIDO EN LA LÍNEA GERMINAL

Para determinar el patrón de expresión del mRNA de *tiar-1* en los estadios larvarios del nematodo realizamos un Northern blot. Para esto, sincronizamos animales con el objetivo de homogenizar su edad y extrajimos el RNA en diferentes etapas del desarrollo (Figura 16). Encontramos que el mRNA para el gen *tiar-1* aumenta conforme crece el animal (Figura 16). Este aumento puede estar relacionado con el crecimiento de la gónada, ya que ésta se desarrolla conforme el animal alcanza el estado adulto (Figura 1).

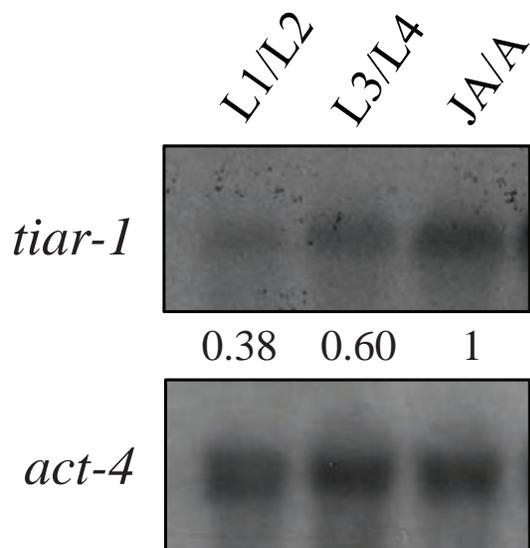


Figura 16| El mRNA de *tiar-1* se expresa durante todas las etapas larvarias de *C. elegans*. Para realizar el Northern blot, se sincronizaron animales en diferentes etapas del desarrollo, se colectaron y posteriormente se extrajo RNA como se indica en Materiales y Métodos. Los diferentes estadios larvarios están indicados con la letra L. Los números entre los paneles indican los niveles de expresión. El panel inferior corresponde al control de carga del gel en donde se utilizó la sonda para el gen *act-4*. JA= jóvenes adultos, A= adultos.

Dado que nuestro interés fue estudiar la función de TIAR-1 en la línea germinal de *C. elegans*, analizamos los niveles de expresión del mRNA de *tiar-1* en la gónada. Para esto, hicimos un Northern blot con el RNA extraído de 3 cepas termosensibles que tienen afectado el desarrollo de la gónada. En la cepa *fem-1(hc17)* los hermafroditas producen únicamente ovocitos en la gónada [111], los hermafroditas *fem-3(q20gf)* solo producen espermatozoides [112] y en la cepa *glp-4(bn2)* los animales prácticamente no tienen gónada [113]. En los animales *glp-4(bn2)* (animales sin gónada) la expresión del gen *tiar-1* disminuye un 82% (Figura 17). En la cepa *fem-1(hc17)* (animales feminizados) no encontramos cambios significativos con respecto a los animales silvestres con gónada completa, mientras que en la cepa *fem-3(q20gf)* (animales masculinizados) el mRNA de *tiar-1* reduce un 58% su expresión (Figura 17). Estos resultados sugieren que una buena cantidad del mRNA de *tiar-1* está enriquecido en la línea germinal. Este resultado coincide con los datos obtenidos por Reinke *et al.*, en donde mediante análisis globales de microarreglos encontraron también que este gen está enriquecido en la gónada de *C. elegans* [91].

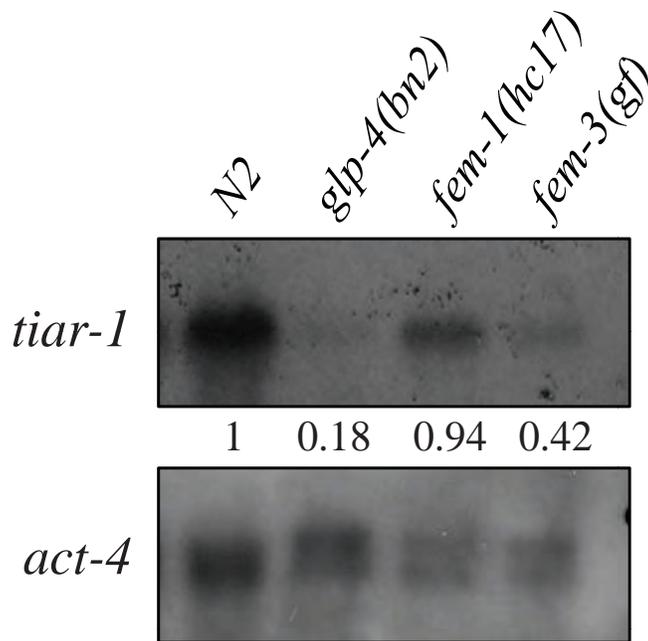


Figura 17| El mRNA de *tiar-1* está enriquecido en la línea germinal. Animales adultos sincronizados de las cepas indicadas colectaron y posteriormente se extrajo RNA para realizar el Northern blot como se indica en Materiales y Métodos. *glp-4(bn2)*: los hermafroditas tienen una gónada muy reducida; *fem-1(hc17)*: solo producen ovocitos; *fem-3(q20gf)*: solo producen espermatozoides. Los números entre los paneles indican los niveles de expresión. El panel inferior corresponde al control de carga del gel en donde se utilizó la sonda para el gen *act-4*.

5.3.3 TIAR-1 NO PARTICIPA EN LA FAGOCITOSIS Y DEGRADACIÓN DE LOS CUERPOS APOPTÓTICOS

Anteriormente, mostramos que TIAR-1 induce apoptosis por debajo de CED-9 [68]. C}Para discernir el mecanismo de inducción de apoptosis de TIAR-1 durante el estrés, exploramos entre diferentes opciones que estuvieran por debajo de la vía de CED-9 como la fagocitosis y degradación del cuerpo apoptótico.

En *C. elegans*, durante la fagocitosis participan dos vías funcionales [51]. La primera vía está compuesta por el heterodímero de CED-5–

CED-12 y sus reguladores CED-2, MIG-2 y UNC-73 [114]. El segundo grupo de moléculas involucradas en la fagocitosis está compuesto por el receptor de membrana CED-1 y su adaptador proteico CED-6, así como el transportador tipo ABC, CED-7 [96, 115, 116]. Ambos grupos de proteínas convergen en la activación de CED-10 que participa en la reorganización de los filamentos de actina, lo cual es necesario para fagocitar el cuerpo apoptótico [117]. En el caso de la degradación del cuerpo apoptótico, se han identificado ocho nucleasas (*crn-1* a *crn-5*, *cps-6*, *nuc-1* y *cyp-13*) implicadas en este proceso [118-120].

La eliminación de algún gen involucrado en la fagocitosis y/o degradación de los cuerpos apoptóticos tiene como consecuencia la acumulación de éstos debido a un ineficiente proceso [121]. Nakagawa *et al.* [122] encontraron que el homólogo de DICER en *C. elegans*, DCR-1, es requerido para generar extremos 3'OH en el DNA nuclear, lo cual es necesario para que se desencadene la degradación de los cuerpos apoptóticos. Así, mutantes en *dcr-1* suprimen la acumulación de cuerpos apoptóticos en mutantes de genes involucrados en la degradación (i. e. *cps-1*, *cps-6*, *nuc-1* y *crn-2*). Del mismo modo, se ha reportado que la inactivación de proteínas como la fosfatasa lipídica MTM-1 causa una reducción significativa en el número de cuerpos apoptóticos en mutantes de la fagocitosis (i. e. *ced-1*, *ced-6*, *ced-7* y *ced-2*) debido a una ineficiente defosforilación del lípido PtdIns(3)P en la membrana plasmática [123, 124].

Analizamos la posibilidad de que TIAR-1 pudiera actuar en algún paso inicial de la fagocitosis y/o degradación, y de esta manera suprimir la acumulación de cuerpos apoptóticos en mutantes de estos dos procesos. Para ello, realizamos un análisis epistático haciendo RNAi en genes involucrados en la fagocitosis y degradación en los animales *ced-1::gfp* como control y *tiar-1(tm361);ced-1::gfp*. Los genes analizados de la

fagocitosis fueron *ced-7* y *ced-12*, mientras que *nuc-1* fue analizado como componente de la degradación. Como esperábamos, el RNAi en estos tres genes ocasionó una acumulación de cuerpos apoptóticos en los animales control *ced-1::gfp* (Tabla 5 y Figura 18). Del mismo modo, observamos que en los animales *tiar-1(tm361);ced-1::gfp* se incrementó el número de cuerpos apoptóticos cuando hicimos RNAi en *ced-7*, *ced-12* y *nuc-1* (Tabla 5 y Figura 18). Los resultados anteriores indican que la ausencia de TIAR-1 no suprime la acumulación de cuerpos apoptóticos debido al silenciamiento de genes involucrados en la fagocitosis o degradación.

Tabla 5| Apoptosis obtenida al silenciar genes involucrados en la fagocitosis y degradación de cuerpos apoptóticos en los animales *ced-1::gfp* y *tiar-1(tm361);ced-1::gfp*. Cada promedio de cuerpos apoptóticos está acompañado de su desviación estándar y la cifra entre paréntesis indica el número de gónadas analizadas. El nivel de inducción es el resultado de la división de la cantidad de cuerpos apoptóticos observados en el RNAi de cada gen entre el control (*PV*). Los valores *P* fueron obtenidos de una prueba *t* Mann Whitney. ↑ indica un aumento en el número de cuerpos apoptóticos. *PV*= plásmido vacío.

| Gen | Promedio de cuerpos apoptóticos | Nivel de Inducción | Valor P | |
|---------------------------------|---------------------------------|--------------------|---------|---|
| <i>ced-1::gfp</i> | | | | |
| <i>PV(RNAi)</i> | 5.0 ± 0.4 (40) | --- | --- | |
| <i>ced-7(RNAi)</i> | 7.1 ± 0.4 (20) | 1.4 | < 0.001 | ↑ |
| <i>ced-12(RNAi)</i> | 21.2 ± 2.0 (20) | 4.2 | < 0.001 | ↑ |
| <i>nuc-1(RNAi)</i> | 17.7 ± 1.4 (20) | 3.5 | < 0.001 | ↑ |
| <i>tiar-1(tm361);ced-1::gfp</i> | | | | |
| <i>PV(RNAi)</i> | 5.3 ± 0.4 (50) | --- | --- | |
| <i>ced-7(RNAi)</i> | 9.6 ± 1.1 (20) | 1.8 | < 0.001 | ↑ |
| <i>ced-12(RNAi)</i> | 16.6 ± 2.3 (20) | 3.1 | < 0.001 | ↑ |
| <i>nuc-1(RNAi)</i> | 19.8 ± 2.3 (20) | 3.7 | < 0.001 | ↑ |

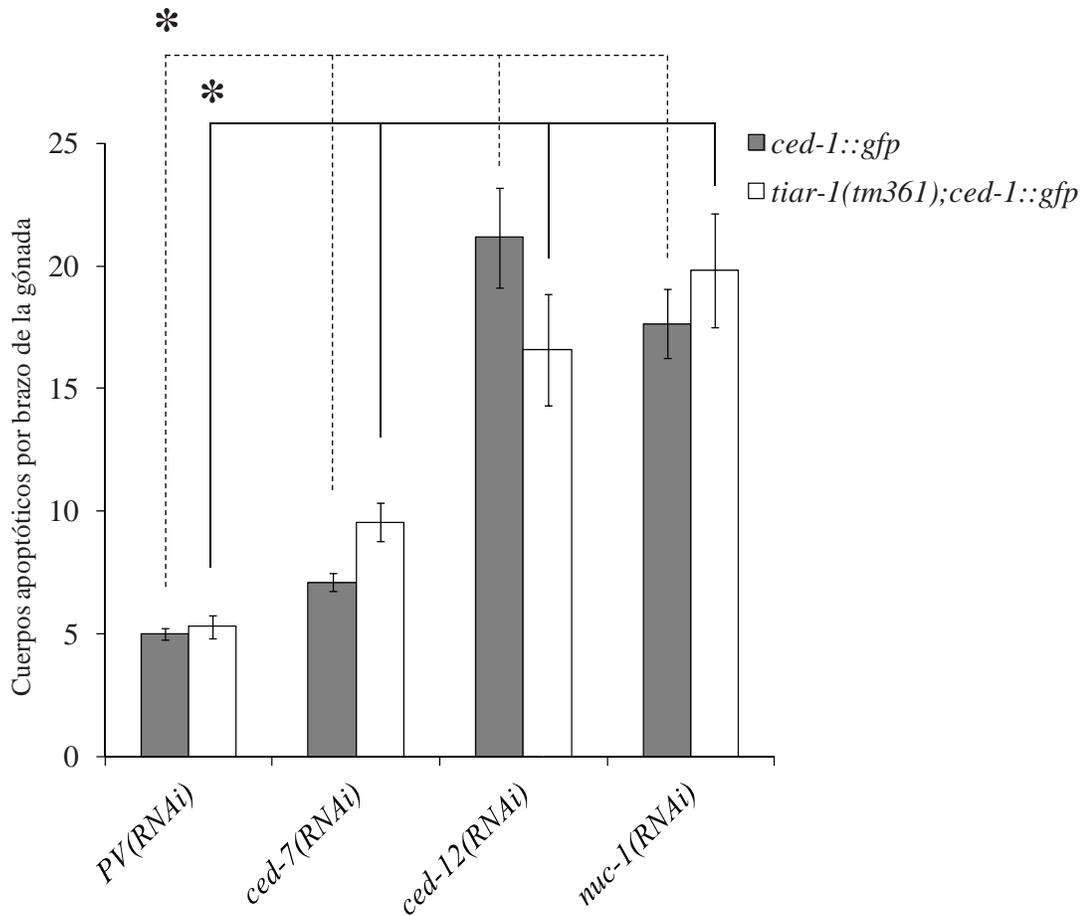


Figura 18| TIAR-1 no se requiere para la activación de la fagocitosis y degradación de los cuerpos apoptóticos. Hicimos RNAi (ver Materiales y Métodos) en los genes *ced-7* y *ced-12* involucrados en la fagocitosis, así como en la nucleasa NUC-1 en las cepas *ced-1::gfp* y *tiar-1(tm361);ced-1::gfp*. Después, montamos y anestesiamos a los animales para contar los cuerpos apoptóticos bajo microscopía de fluorescencia. Las barras de error representan el error estándar. Los valores de *P* fueron obtenidos con una prueba *t* Mann Whitney. **P*<0.001. PV= plásmido vacío.

5.3.4 LA AUSENCIA DE TIAR-1 NO AFECTA LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE CED-9 Y CED-4 DURANTE EL AYUNO Y EL CHOQUE DE CALOR

Hemos visto que diferentes tipos de estrés inducen un incremento en la apoptosis de las células germinales en *C. elegans* (Figura 7). La apoptosis por daño al DNA es regulada por EGL-1 y CEP-1 (Figura 7) [61, 62]. La apoptosis por choque de calor, estrés osmótico y oxidativo es regulada por las MAPKK MEK-1 y SEK-1 (Figura 7) [64]. Durante el ayuno, los niveles de CED-9 disminuyen drásticamente para inducir apoptosis, y LIN-35 contribuye a esta disminución [67].

Decidimos analizar si los niveles de CED-9 cambiaban en ausencia de TIAR-1 durante el ayuno, choque de calor y radiación UV. Para esto, expusimos a los animales silvestres y *tiar-1(tm361)* a las condiciones de estrés mencionadas (ver Materiales y Métodos). Después del estrés, colectamos los animales y realizamos un Western blot utilizando un anticuerpo contra CED-9. Encontramos que al igual que en los animales silvestres, en los animales *tiar-1(tm361)* los niveles de CED-9 disminuyen drásticamente durante el ayuno (Figura 19) [67]. En los animales silvestres durante el choque de calor y radiación UV, los niveles de CED-9 fueron muy similares a los del control. En los animales *tiar-1(tm361)*, los niveles de CED-9 durante el choque de calor fueron similares al control, pero en la radiación UV disminuyeron (Figura 19). Los resultados anteriores sugieren que TIAR-1 no se requiere para regular los niveles de expresión de CED-9 durante el ayuno y el choque de calor. Sin embargo, TIAR-1 parece estar involucrado en mantener los niveles de CED-9 durante la radiación UV.

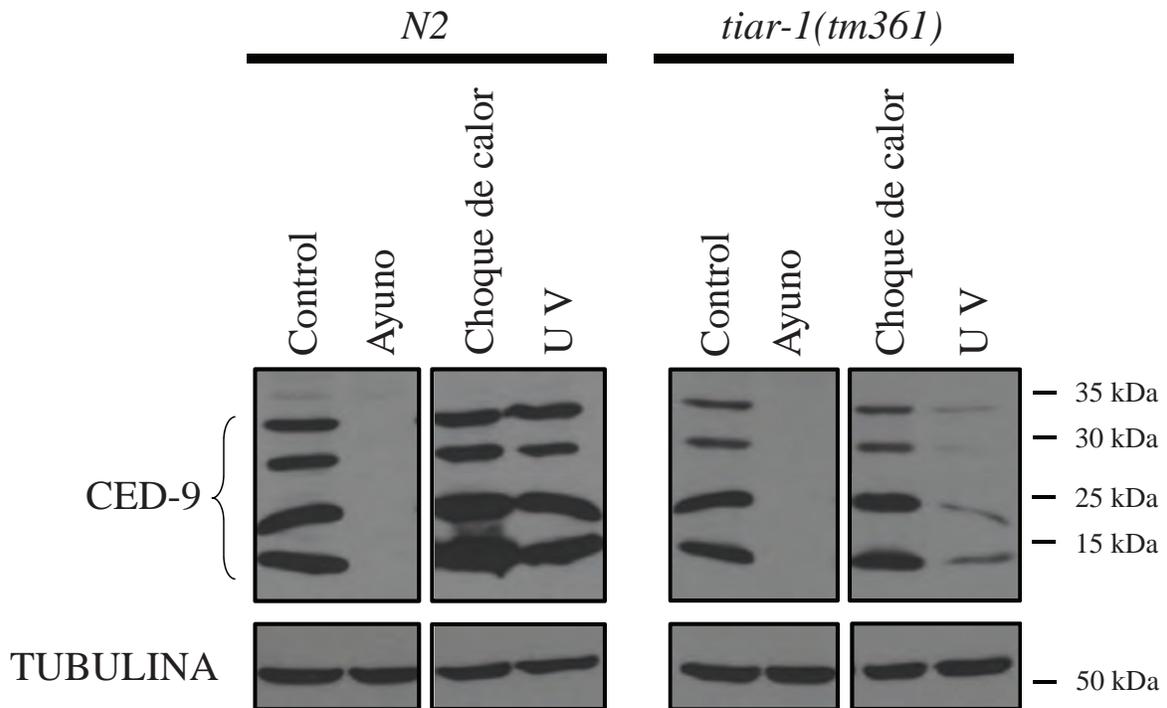


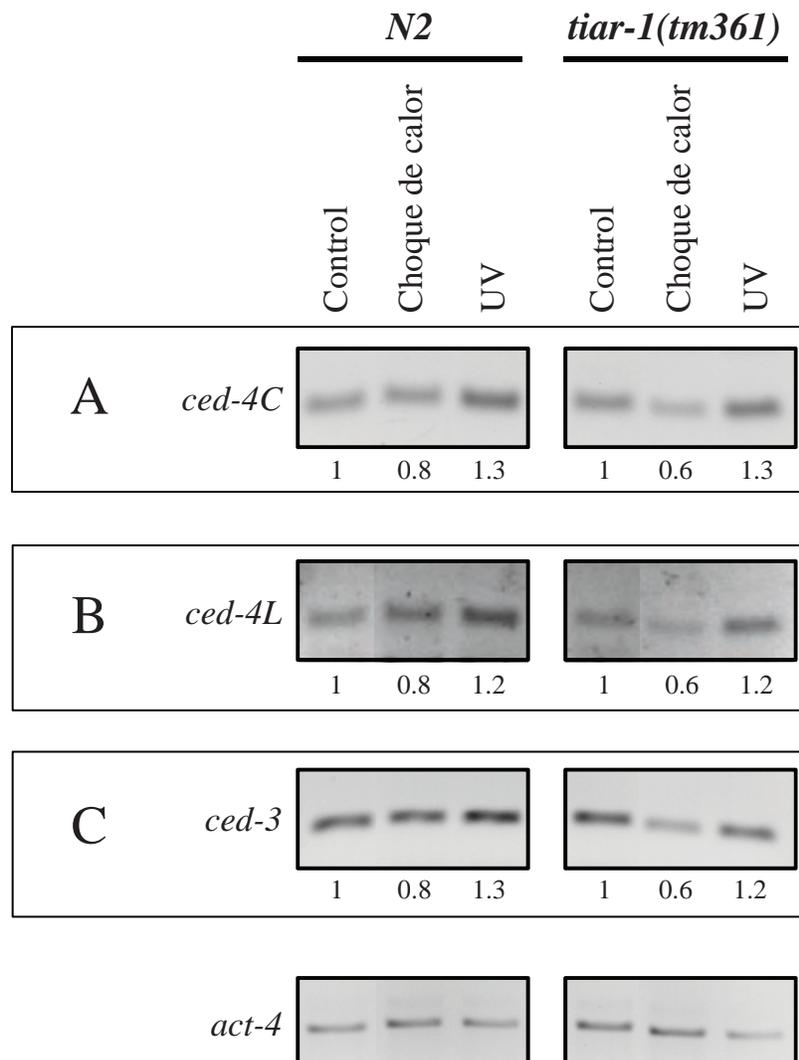
Figura 19| Niveles de la proteína CED-9 en las cepas *N2* y *tiar-1(tm361)* en condiciones de estrés. Animales sincronizados de las cepas *N2* y *tiar-1(tm361)* fueron expuestos a ayuno, choque de calor y radiación UV (ver Materiales y Métodos). Para realizar el Western blot, se extrajo la proteína total de 100 animales. Las membranas fueron incubadas con un anticuerpo contra CED-9. Como control de carga del gel utilizamos un anticuerpo contra tubulina.

En mamíferos, TIA-1 y TIAR han sido bien caracterizadas como proteínas de unión a RNA que actúan sobre los mRNAs regulando su splicing [70-75, 106] o su degradación [77]. Debido a esto y buscando el mecanismo por el cual TIAR-1 induce apoptosis por debajo de CED-9 [68], analizamos los niveles de expresión del mRNA de los genes de la maquinaria de apoptosis *ced-4* y *ced-3*. Mientras que *ced-3* no parece tener formas alternativas de splicing, *ced-4* posee dos isoformas conocidas como corta (C) y larga (L), las cuales poseen funciones opuestas [125, 126]. *ced-4S* (el transcrito predominante) induce apoptosis, mientras que *ced-4L* posee funciones antiapoptóticas [126].

Previamente, encontramos que TIAR-1 no regula los niveles de acumulación de los mRNAs de *ced-4C*, *ced-4L* y *ced-3* durante el ayuno [68]. Para analizar si TIAR-1 regula los niveles de expresión de los mRNAs de *ced-4C*, *ced-4L* y *ced-3* durante el choque de calor y radiación UV, hicimos RT-PCR de RNA extraído de animales silvestres y *tiar-1(tm361)* en condiciones control y de estrés (ver Materiales y Métodos). Encontramos en los animales silvestres que los tres transcritos tenían patrones similares de expresión en estas dos condiciones de estrés. Mientras que sus niveles tendieron a disminuir en el choque de calor, durante la radiación UV incrementaron discretamente (Figura 20). Desafortunadamente, no observamos diferencias en los niveles de acumulación de los mRNAs de *ced-4C*, *ced-4L* y *ced-3* entre los animales *tiar-1(tm361)* y los animales silvestres durante el choque de calor y radiación UV (Figura 20). Los resultados anteriores sugieren que TIAR-1 no está involucrado en regular los niveles de acumulación de los mRNAs de *ced-4C*, *ced-4L* y *ced-3* en condiciones choque de calor y radiación UV.

Figura 20| Expresión de los mRNAs de la maquinaria de apoptosis, *ced-4C*, *ced-4L* y *ced-3*, es similar en los animales silvestres y *tiar-1(tm361)* en condiciones de choque de calor y radiación UV. (A-C) Para realizar el RT-PCR semicuantitativo, animales sincronizados fueron expuestos a choque de calor y radiación UV (ver Materiales y Métodos). Después de cada condición de estrés se extrajo RNA, se sintetizó cDNA y se realizó el PCR. Los números de debajo de cada panel indican los niveles de expresión. El panel inferior corresponde al control de carga del gel en donde se utilizó el gen *act-4*. C= corto, L= largo.

En el laboratorio contamos con una cepa transgénica que expresa la proteína CED-4 fusionada con la GFP. Para analizar si TIAR-1 participa en la regulación de la expresión de CED-4, hicimos una cruce de los animales que acarrean la fusión CED-4::GFP con la cepa *tiar-1(tm361)*. Sometimos a estos animales a las condiciones de ayuno, choque de calor y radiación UV, y después analizamos la fluorescencia bajo el microscopio. En los animales *ced-4::gfp* control, la fusión



se localiza principalmente alrededor de los núcleos de las células germinales, aunque también tiene una expresión ligeramente difusa en toda la gónada (Figura 21 A) [127, 128]. En condiciones de ayuno y radiación UV, encontramos que esta expresión no cambia (Figura 21 B y D). Durante el choque de calor, observamos que la fusión CED-4::GFP presentó un ligero aumento de expresión en general, que fue más evidente en el centro de la gónada (Figura 21 C). La expresión de la fusión CED-4::GFP en los animales *tiar-1(tm361)* en condiciones normales y de estrés fue igual a lo que observamos en los animales control (Figura 21 E-H). Estos resultados sugieren que TIAR-1 no participa en la regulación de la expresión de CED-4 durante el ayuno, choque de calor y radiación UV.

5.3.5 EN LOS ANIMALES *tiar-1(tm361)* NO SE REPRIME LA TRADUCCIÓN DURANTE EL AYUNO

En cultivos celulares, ha sido ampliamente demostrado que diferentes tipos de estrés inducen la formación de gránulos de estrés, los cuales están compuestos, entre otros componentes, por el complejo de inicio de la traducción 48S (Figura 3) [20]. La composición de gránulos de estrés por este complejo, aunado al análisis de perfiles polisomales, ha demostrado que el estrés induce un arresto traduccional [20, 107, 129]. Como se mencionó anteriormente, en el laboratorio se encontró que el ayuno induce un arresto traduccional en *C. elegans* [67]. Uno de los indicios que sugirió que el ayuno induce un arresto en la traducción fue la formación de gránulos. Nos preguntamos si la ausencia de gránulos en el centro de la gónada de animales *tiar-1(tm361)* durante el ayuno [130]

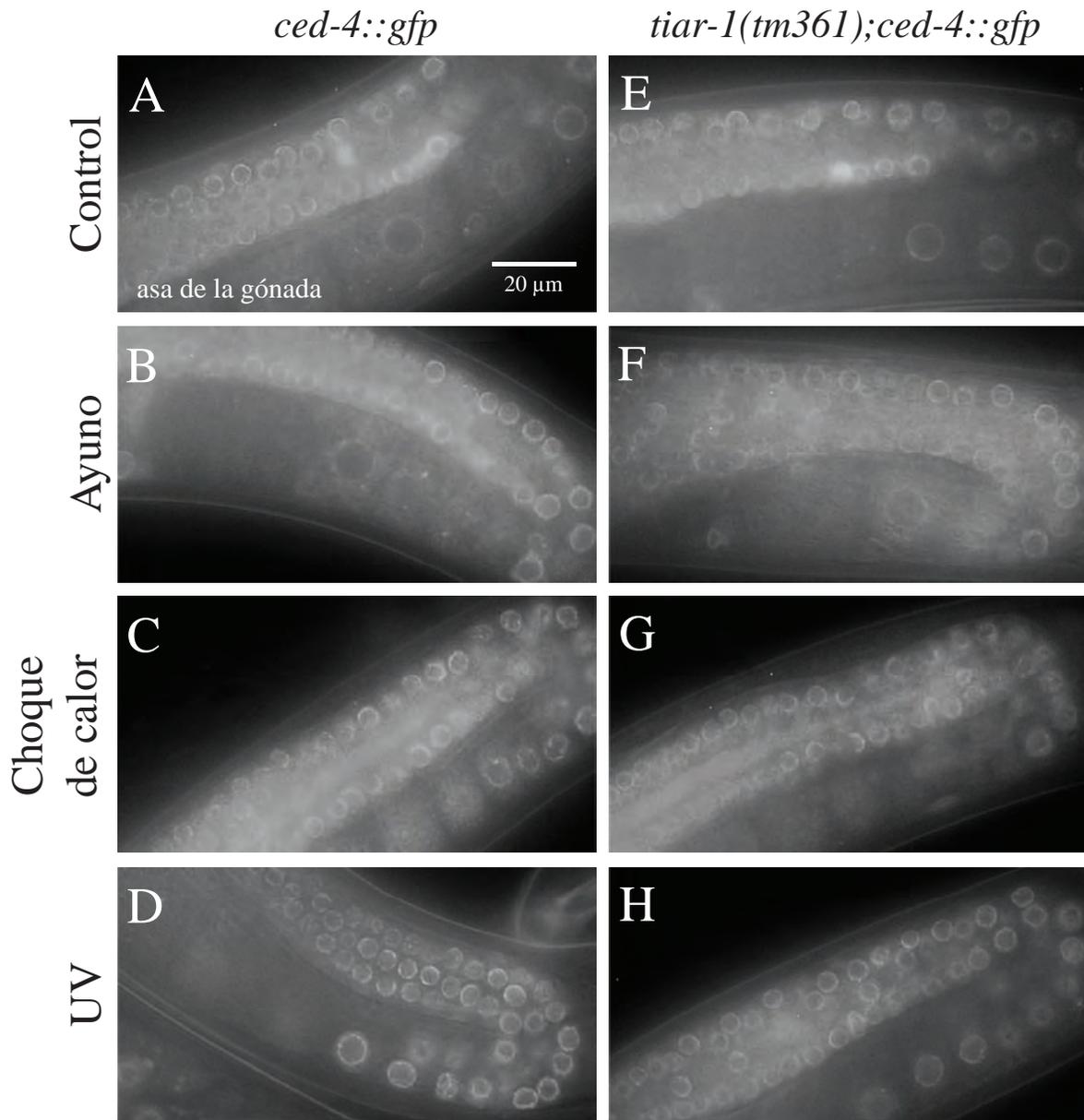


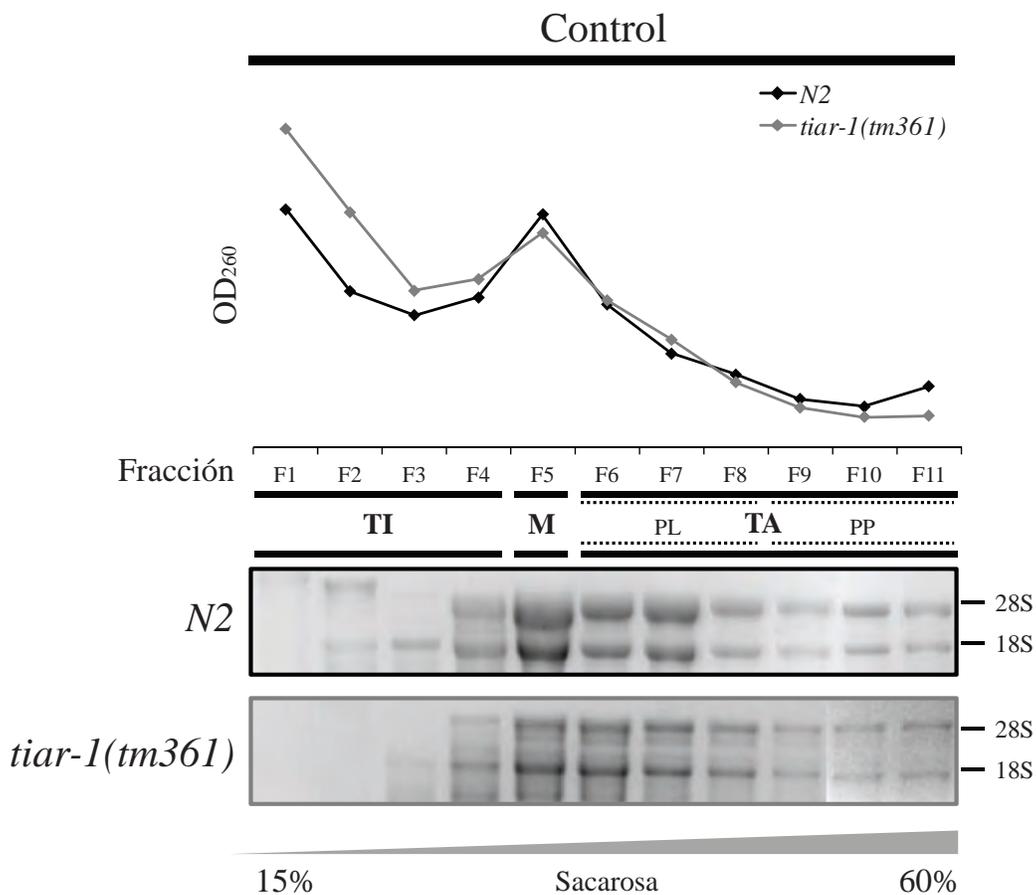
Figura 21| La expresión de CED-4::GFP no se altera en los animales *tiar-1(tm361)* en condiciones normales y de estrés comparada con la cepa control. (A-H) Para analizar la expresión de la fusión CED-4::GFP, animales sincronizados de las cepas *ced-4::gfp* y *tiar-1(tm361);ced-4::gfp* se expusieron a condiciones de ayuno, choque de calor y radiación UV (ver Materiales y Métodos). Después de la exposición al estrés, los animales fueron montados y anestesiados para analizarlos bajo microscopía de fluorescencia.

podría traer como consecuencia que no hubiera un arresto traduccional. Este análisis se hizo mediante el uso de perfiles polisomales.

La gráfica que se obtiene de un perfil polisomal está dada por la cantidad de RNA presente en la muestra y está compuesta principalmente por tres regiones divididas en base a las subunidades ribosomales (Figura 22). La primera región se denomina traduccionalmente inactiva (TI). La segunda zona se conoce como monosomas (M) y está definida, como su nombre lo indica, por la presencia de un solo ribosoma sobre el mRNA y marca el inicio de la traducción. La tercera zona se denomina traduccionalmente activa (TA); en estas fracciones se localiza una mayor cantidad de ribosomas sobre el mRNA. La zona TA se puede dividir a su vez en dos subregiones, una donde se encuentra una menor cantidad de ribosomas (polisomas ligeros -PL-) y otra donde hay una mayor cantidad (polisomas pesados -PP-). Así, las fracciones polisomales se sedimentan en base al número de polisomas que hay sobre los mRNAs: de las fracciones más ligeras a las fracciones más pesadas (de la F1 a la F11) (Figura 22).

Figura 22| La tasa de traducción en los animales *tiar-1(tm361)* es similar a la de la cepa silvestre en condiciones de crecimiento normales. Perfil polisomal de extractos de las cepas *N2* (A) y *tiar-1(tm361)* (B) en condiciones control. Para generar las fracciones, las muestras fueron centrifugadas en un gradiente de sacarosa del 15% al 60%. Cada fracción obtenida se leyó a una absorbancia de 260 nm (gráfica). Los perfiles están divididos en tres regiones principales: traduccionalmente inactiva (TI, fracciones F1-F4), monosomas (M, fracción F5) y traduccionalmente activa (TA, fracciones F6-F11). La región TA se divide a su vez en polisomas ligeros (PL) y polisomas pesados (PP). De cada fracción se extrajo RNA y se corrió en un gel de agarosa al 1% para analizar las subunidades de RNA ribosomal.

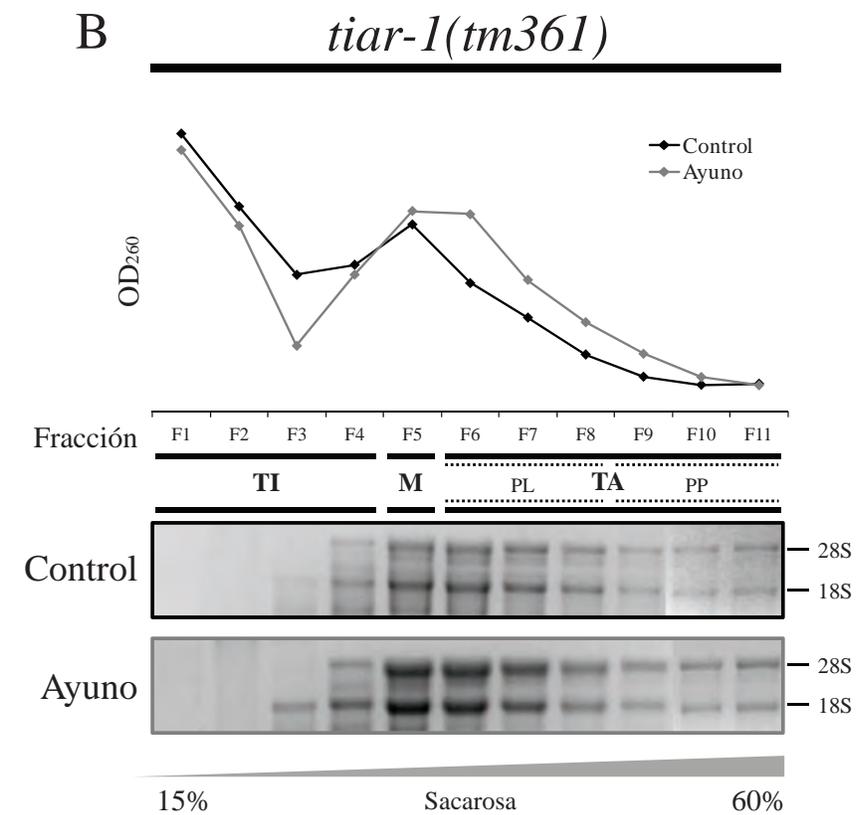
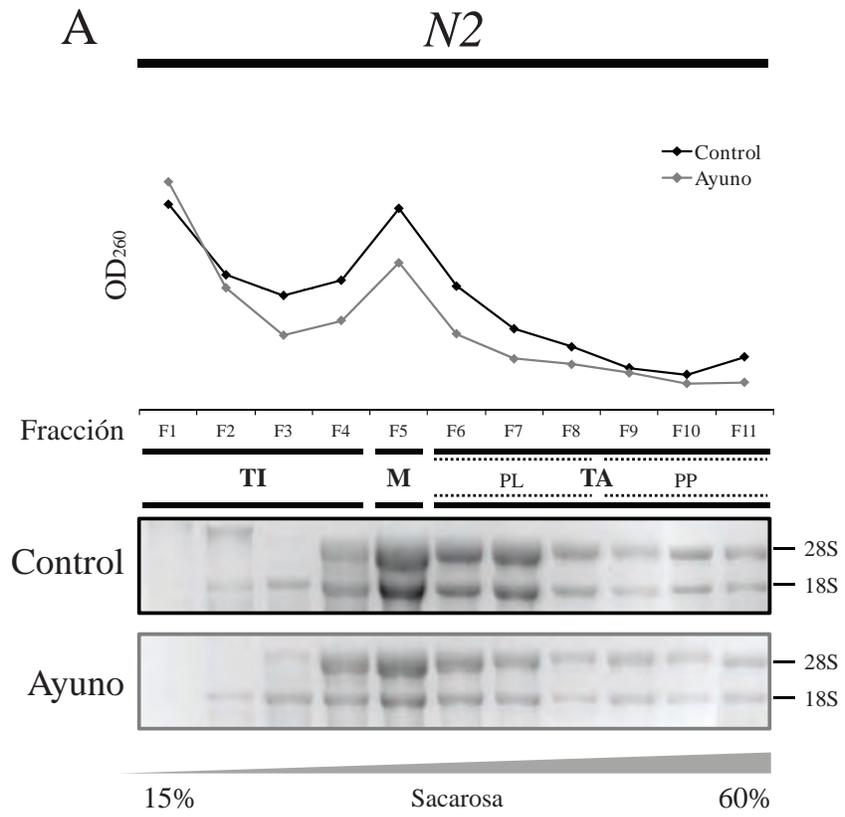
Animales adultos silvestres y *tiar-1(tm361)* fueron crecidos en condiciones control y de ayuno. Posteriormente, los animales se colectaron y se procesaron para realizar el perfil polisomal. Encontramos que la cantidad de RNA presente en las dos cepas de las fracciones 5 a la 11 (F5-F11) fue muy similar (Figura 23). También podemos observar en el perfil que la cantidad de RNA presente en las fracciones F1-F4 de los animales *tiar-1(tm361)* fue un poco mayor a la cantidad de RNA presente en las mismas fracciones en los animales silvestres (Figura



23). Sin embargo, esta región corresponde a la zona traduccionalmente inactiva (TI), la cual no es relevante para el análisis traduccional. Los resultados anteriores sugieren, de manera general, que la ausencia de TIAR-1 no afecta la tasa de traducción cuando los animales crecen en condiciones normales.

Después analizamos la tasa de traducción en los animales silvestres y *tiar-1(tm361)* en condiciones de ayuno. Como se había observado antes [67], el ayuno indujo una baja en la tasa de traducción en los animales silvestres (Figura 23 A). Esta represión se observó en las fracciones F6-F11 con la disminución de la cantidad de RNA total y con la disminución de las subunidades ribosomales (Figura 23 A). Cuando analizamos la tasa de traducción en los animales *tiar-1(tm361)* durante el ayuno, encontramos que hubo un ligero incremento en la cantidad de RNA total y de las subunidades ribosomales en las fracciones F6-F9 (Figura 23 B). El resultado anterior sugiere que la tasa de traducción en los animales *tiar-1(tm361)* no disminuyó durante el ayuno.

Figura 23| El ayuno induce una disminución general en la traducción en los animales silvestres mientras que en los animales *tiar-1(tm361)* no. Perfil polisomal de extractos de las cepas *N2* (A) y *tiar-1(tm361)* (B) en condiciones control y de ayuno. Para generar las fracciones, las muestras fueron centrifugadas en un gradiente de sacarosa del 15% al 60%. Cada fracción obtenida se leyó a una absorbancia de 260 nm (gráfica). Los perfiles están divididos en tres regiones principales: traduccionalmente inactiva (TI, fracciones F1-F4), monosomas (M, fracción F5) y traduccionalmente activa (TA, fracciones F6-F11). La región TA se divide a su vez en polisomas ligeros (PL) y polisomas pesados (PP). De cada fracción se extrajo RNA y se corrió en un gel de agarosa al 1% para analizar las subunidades de RNA ribosomal.



5.3.6 LA AUSENCIA DE TIAR-1 AFECTA LA TRADUCCIÓN DE mRNAs ESPECÍFICOS DURANTE EL AYUNO

Dado que nos interesaba conocer cómo es que TIAR-1 regula la apoptosis en la línea germinal durante el ayuno [68], analizamos la traducción de mRNAs específicos de la apoptosis (i. e. *ced-9*, *ced-4* y *ced-3*) y como mRNA control usamos el mRNA de *act-5*. Para ello, de cada fracción polisomal del control y ayuno extrajimos RNA total, sintetizamos cDNA y realizamos un RT-PCR. Como se había visto antes en el laboratorio [67], observamos en los animales silvestres que el mRNA control de *act-5* disminuye de manera general su porcentaje en la región traduccionalmente activa (F5-F11) durante el ayuno (Figura 24 A). Esto concuerda con que el ayuno induce una disminución general en la traducción en los animales silvestres (Figura 24 A) [67]. En los animales *tiar-1(tm361)*, encontramos que el mRNA de *act-5* se distribuyó de manera similar en las fracciones traduccionalmente activas (F5-F11) durante el control y el ayuno (Figura 24 B). Este resultado concuerda con lo que observamos anteriormente en los animales *tiar-1(tm361)*: que el ayuno no reprime la traducción general (Figura 24 B).

Para el caso de *ced-9* y como anteriormente se había visto en el laboratorio [67], observamos que en la cepa silvestre su mRNA se distribuye principalmente en la región traduccionalmente activa (F5-F11) en condiciones normales (Figura 24 C). Sin embargo, durante el ayuno la mayoría del mRNA de *ced-9* estuvo enriquecido dramáticamente en la fracción F6 y en la región traduccionalmente inactiva (F1-F4). Lo anterior sugiere un arresto en la traducción de este mRNA [67]. Cuando analizamos el mRNA de *ced-9* en los animales *tiar-1(tm361)*, encontramos que en condiciones normales su mRNA se distribuye en

las fracciones F6-F11 (Figura 24 D). Durante el ayuno, el mRNA de *ced-9* incrementó en las fracciones F4 (traduccionalmente inactiva), F5 (monosomas), y disminuyó ligeramente en las fracciones F6-F11 (traduccionalmente activas) (Figura 24 D). Estos resultados indican que el mRNA de *ced-9* no se arresta en los animales *tiar-1(tm361)* durante el ayuno como ocurre en los animales silvestres.

El mRNA de *ced-4* en condiciones normales se distribuyó principalmente en las fracciones F7-F11 en animales silvestres (Figura 24 E) [67]. Durante el ayuno, este mRNA se distribuyó especialmente en las fracciones F4 y F1, aunque también los observamos en menor medida en las fracciones F2-F5 y F7 (Figura 24 E) [67]. Los resultados anteriores indican que el mRNA de *ced-4* baja ligeramente su traducción en el ayuno (Figura 24 E) [67]. Al analizar el mRNA de *ced-4* en los animales *tiar-1(tm361)* en condiciones control, encontramos este mRNA se distribuye en las fracciones F2-F19 y F11 (Figura 24 F). Cuando estos animales fueron sometidos al ayuno, el mRNA de *ced-4* mantuvo una distribución similar a la observada en condiciones control (F2-F9 y F11) (Figura 24 F). Estos resultados sugieren que el mRNA de *ced-4* no disminuyó su traducción durante el ayuno en los animales *tiar-1(tm361)*.

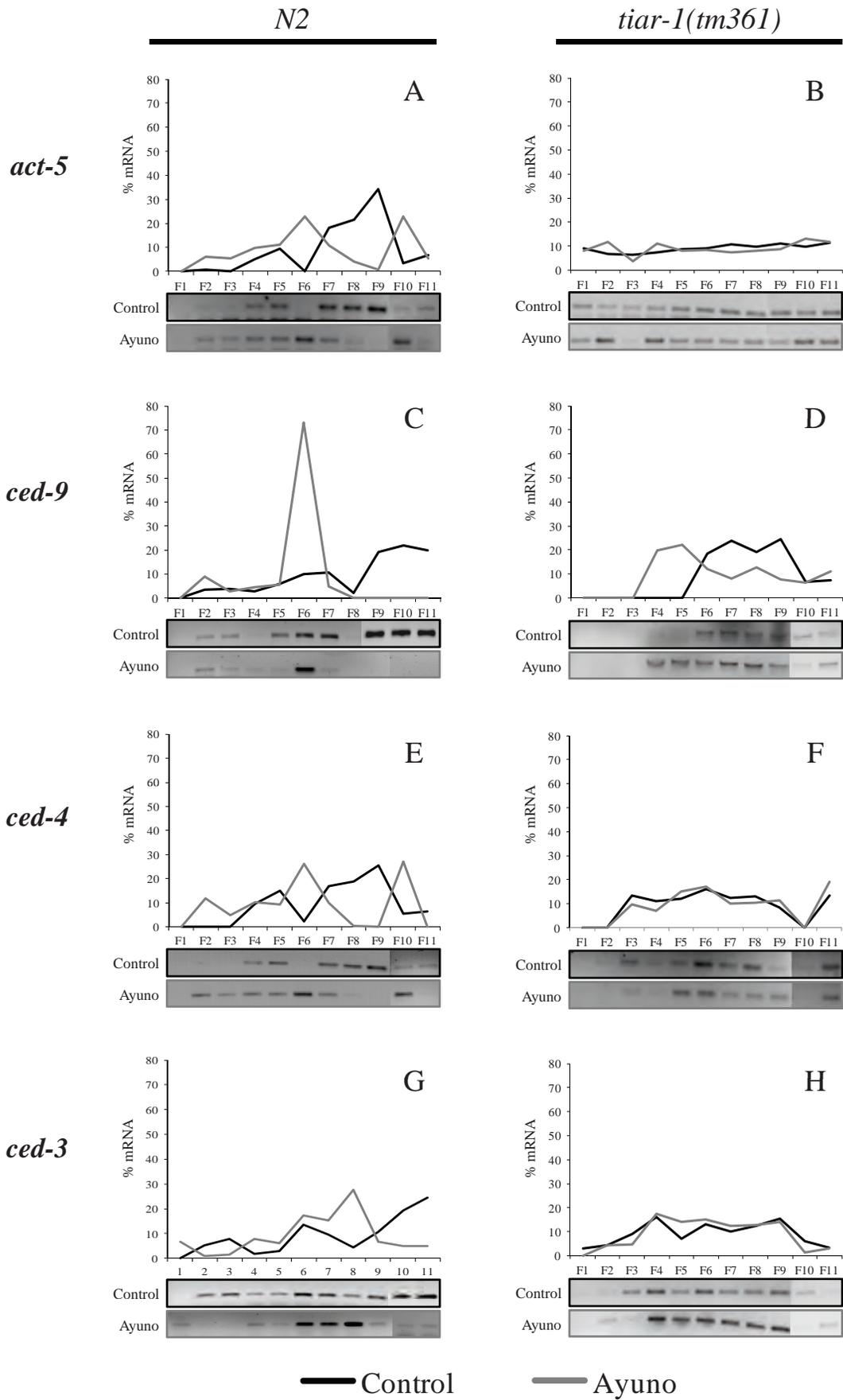
Como se había observado anteriormente en el laboratorio, encontramos que el mRNA de *ced-3* se distribuyó en las regiones traduccionalmente activas (F2-F4), monosomas (F5) y traduccionalmente activas (F6-F11) en los animales silvestres durante el control (Figura 24 G) [67]. En el ayuno, se observó una disminución del mRNA de *ced-3* en las fracciones F2-F5 y F9-F10, así como un enriquecimiento de este mRNA en las fracciones F6-F8 (Figura 24 G). Los datos anteriores indican que el mRNA de *ced-3* bajó muy poco su traducción durante el ayuno en los animales silvestres (Figura 24 G) [67]. Al analizar el

mRNA de *ced-3* en condiciones normales en los animales mutantes para *tiar-1*, encontramos que se distribuyó en todas las fracciones, teniendo un mayor enriquecimiento en las fracciones F4-F9 (Figura 24 H). Durante el ayuno, observamos una distribución de este mRNA de la fracción F2-F11, pero enriquecido en las fracciones F4-F9 (Figura 24 H). Esto sugiere que el mRNA de *ced-3* no baja su traducción durante el ayuno en los animales *tiar-1(tm361)*.

5.3.7 LA AUSENCIA DE TIAR-1 AFECTA LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE *csp-2B*

Hasta este momento, no hemos encontrado un resultado que permita explicar la ausencia de apoptosis en los animales *tiar-1(tm361)* cuando son sometidos al estrés [68]; por lo tanto, decidimos explorar otros componentes de la vía de apoptosis. Un componente importante en la inducción de apoptosis que se encuentra por debajo de CED-9, es CSP-2. El gen *csp-2* codifica para dos proteínas: CSP-2A y CSP-2B [131]. El transcrito de *csp-2B* es significativamente más abundante y es específico de la línea germinal [131]. CSP-2B es un homólogo de la caspasa CED-3, el cual perdió su actividad catalítica y funciona como un represor de CED-3 impidiendo su autoactivación [131]. Analizamos los niveles de expresión y de traducción del mRNA de *csp-2* en animales silvestres y *tiar-1(tm361)* en condiciones control y de estrés mediante RT-PCR y

Figura 24| Los mRNAs de los genes *ced-9*, *ced-4* y *ced-3* en los animales *tiar-1(tm361)* no bajan su traducción durante el ayuno. Después de extraer el RNA de cada fracción polisomal se sintetizó cDNA y se realizó un PCR para los mRNAs de los genes *act-5*, *ced-9*, *ced-4* y *ced-3*.

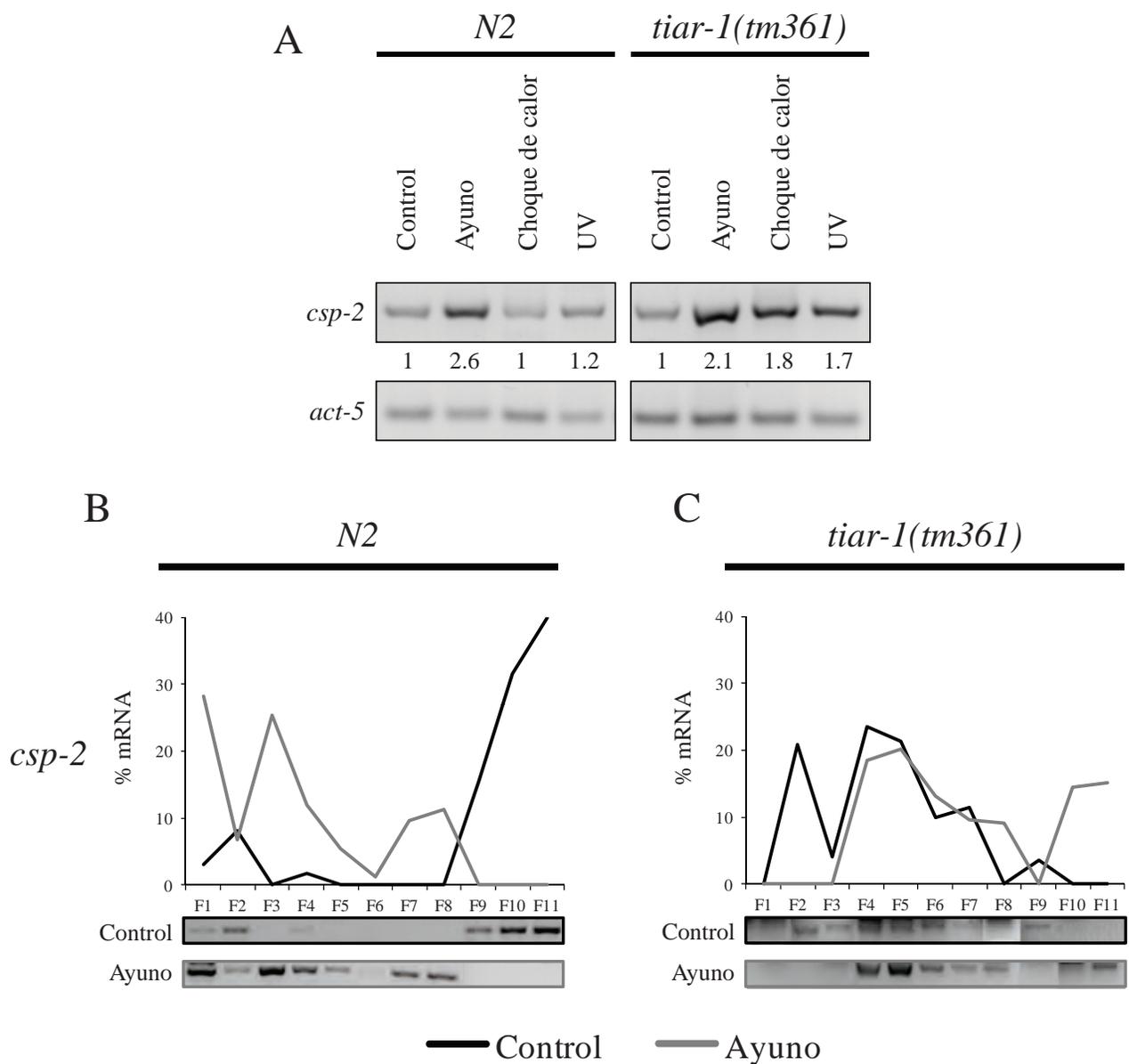


perfiles polisomales.

A través del RT-PCR estudiamos los niveles del mRNA de *csp-2* durante el ayuno, el choque de calor y la radiación UV en los animales silvestres y *tiar-1(tm361)*. Encontramos que los niveles de expresión del mRNA de *csp-2* aumentaron considerablemente durante el ayuno (2.6 veces) en los animales silvestres, mientras que en el choque de calor no incrementaron y en la radiación UV el aumento fue muy discreto (1.2 veces) (Figura 25 A). Cuando analizamos los niveles del mRNA de *csp-2* en los animales *tiar-1(tm361)*, encontramos que en las tres condiciones de estrés probadas hubo un incremento en los niveles de este mRNA con respecto a su control (Figura 25 A). Este resultado sugiere que la ausencia TIAR-1 podría estar afectando los niveles de expresión, degradación o acumulación del mRNA de *csp-2* durante el choque de calor y radiación UV.

Figura 25| En los animales *tiar-1(tm361)*, los niveles de expresión y traducción del mRNA de *csp-2* se afectan en condiciones de estrés. (A) Para realizar el RT-PCR semicuantitativo, animales sincronizados de las cepas *N2* y *tiar-1(tm361)* fueron expuestos al ayuno, choque de calor y radiación UV (ver Materiales y Métodos). Después de cada condición de estrés se extrajo RNA, se sintetizó cDNA y se realizó el PCR para el mRNA de *csp-2*. Los números entre cada panel indican los niveles de expresión. El panel inferior corresponde al control de carga del gel en donde se utilizó el gen *act-5*. (B) Distribución polisomal del mRNA de *csp-2* en condiciones control y de ayuno en la cepa *N2* y *tiar-1(tm361)*. Después de extraer el RNA de las cepas *N2* y *tiar-1(tm361)* de cada fracción polisomal en condiciones control y ayuno, se sintetizó cDNA y se realizó un PCR para el mRNA de *csp-2*.

El siguiente paso fue analizar los niveles de traducción del mRNA de *csp-2* en condiciones control y de ayuno. Para ello, de las fracciones polisomales obtenidas de los animales silvestres y *tiar-1(tm361)* realizamos un RT-PCR. Observamos que en el control de los animales silvestres el mRNA de *csp-2* se encontró distribuido principalmente



en las fracciones F9-F11 (polisomas pesados) y en menor medida en las fracciones F1, F2 y F4 (traduccionalmente inactivas) (Figura 25 B). En el ayuno, observamos un cambio de este mRNA de las fracciones de polisomas pesados (F9-F11) a polisomas ligeros (F6-F8) y monosomas (F5), así como un aumento en las fracciones F1, F3 y F4 (traduccionalmente inactivas). Este resultado indica que en los animales silvestres el mRNA de *csp-2* disminuye considerablemente su traducción durante el ayuno. En los animales mutantes para *tiar-1*, encontramos el mRNA de *csp-2* distribuido en las fracciones F2-F9 en el control (Figura 25 C). Durante el ayuno, observamos que este mRNA aparecía en las fracciones F10 y F11, y se mantenía en las fracciones F4-F8 (Figura 25 C). Estos datos sugieren que en los animales *tiar-1(tm361)* el mRNA de *csp-2* no disminuye su traducción durante el ayuno, de hecho incrementa su traducción al observarse una acumulación en polisomas pesados (F10 y F11) (Figura 25 C).

Analizamos si TIAR-1 se localiza en las fracciones polisomales como un indicio de que participa en la traducción. Para realizar esto, de cada fracción polisomal obtenida de los animales silvestres en control y ayuno extrajimos las proteínas y realizamos un Western blot usando un anticuerpo contra TIAR-1. Encontramos que en el control TIAR-1 se localiza en las fracciones F1-F11, pero principalmente en las fracciones F1-F3 (traduccionalmente inactivas) (Figura 26). Del mismo modo, en el ayuno TIAR-1 se localiza en las fracciones F1-F11 y en mayor medida en las fracciones F1-F3 (Figura 26). Los resultados anteriores sugieren que TIAR-1 se localiza con la maquinaria de traducción en condiciones normales y de ayuno. Además, este resultado es consistente con los datos obtenidos en mamíferos donde a TIA-1 lo han encontrado en fracciones polisomales [76].

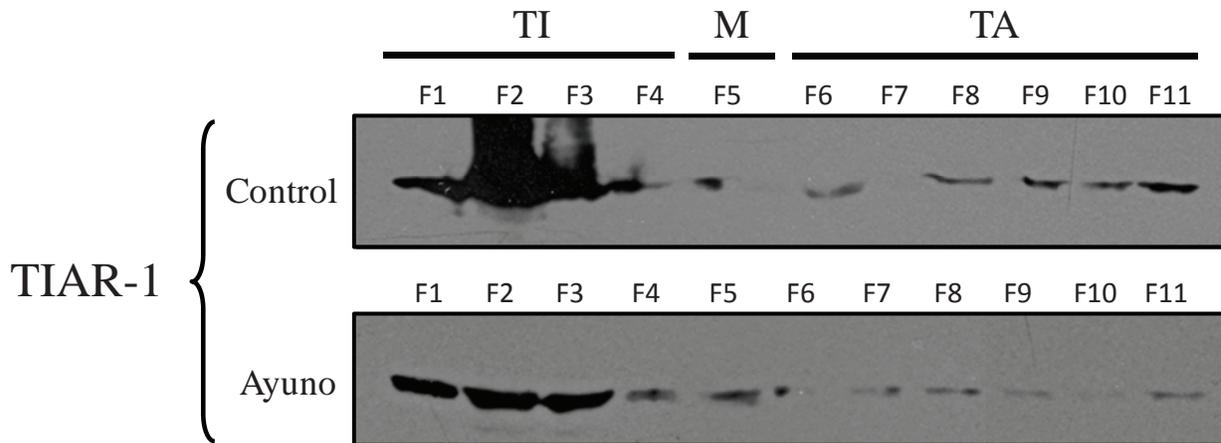
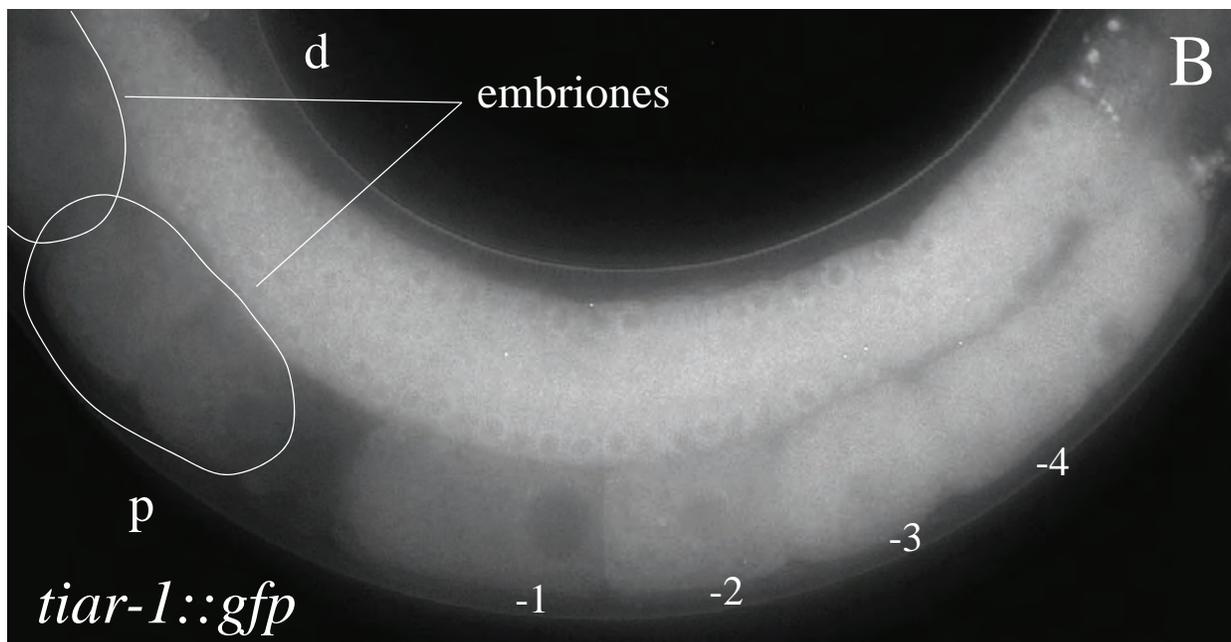
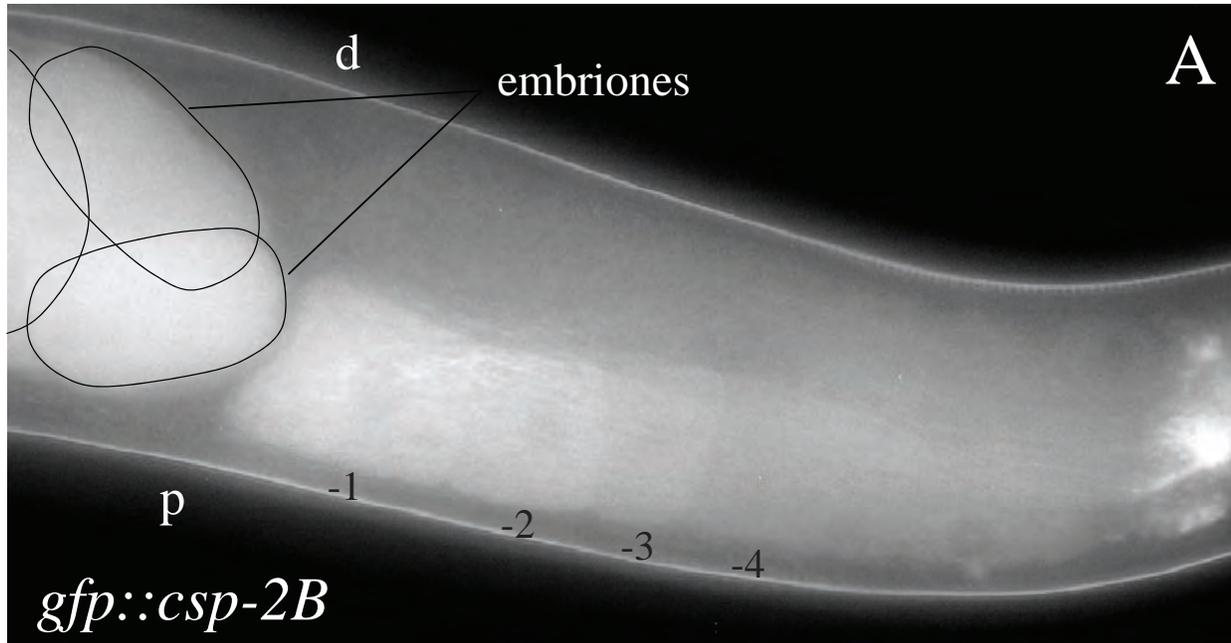


Figura 26| TIAR-1 se localiza en todas las fracciones de los perfiles polisomales en condiciones control y de ayuno. Después de obtener las muestras de cada fracción polisomal de la cepa *N2*, se extrajo la proteína total. Las membranas fueron hibridadas con un anticuerpo contra TIAR-1. TI= traduccionalmente inactiva, M= monosomas y TA= traduccionalmente activa.

Los resultados anteriores sugieren que TIAR-1 podría estar regulando la traducción del mRNA de *csp-2* afectando así la expresión de su proteína. Para estudiar si la ausencia de TIAR-1 afectaba la expresión de CSP-2, generamos un transgene. Para construir el transgene usamos la isoforma *csp-2B*, la cual está involucrada en la apoptosis y es específica de la línea germinal [131]. Para dirigir la expresión de CSP-2B en la línea germinal usamos un promotor específico, *pie-1* [132]. La construcción se hizo fusionando 3845 pb del promotor de *pie-1*, el gen *gfp*, 792 pb del ORF de *csp-2B* y 244 pb de su 3'UTR ($P_{pie-1}gfp::csp-2B$). Insertamos una sola copia de la construcción mediante microinyección basados en un protocolo que permite insertar transgenes en una región bien definida del cromosoma II [133]. Después de la inserción, analizamos la expresión de la construcción $P_{pie-1}gfp::csp-2B$. Encontramos que GFP::CSP-2B se expresó en la línea germinal, mostrando un enriquecimiento de su expresión en los ovocitos más proximales a la espermateca (Figura 27

A). Curiosamente, esta expresión es opuesta a la expresión observada previamente para TIAR-1::GFP (Figura 27 B) [68]. Así, donde TIAR-1 aumenta su expresión, la expresión de CSP-2B disminuye, y viceversa (comparar panel A con B de la Figura 27).



Posteriormente analizamos si la ausencia de TIAR-1 afectaba los niveles de expresión de GFP::CSP-2B en condiciones control y de ayuno. Para esto, silenciamos mediante RNAi el gen *tiar-1* en los animales $P_{pie-1}gfp::csp-2B$ en condiciones control y de ayuno, y como control del silenciamiento usamos el plásmido vacío (PV). Después, observamos los animales al microscopio e hicimos un análisis de fluorescencia de las fotografías obtenidas. En el control, los animales $P_{pie-1}gfp::csp-2B;PV(RNAi)$ mostraron una expresión de GFP::CSP-2B normal (100%): menos intensa en la región distal, la cual va aumentando hasta los ovocitos más proximales (Figura 28 A). Durante el ayuno, observamos que los niveles de fluorescencia de GFP::CSP-2B disminuyeron un 43.4% (Figura 28 A, B y E) en los animales $P_{pie-1}gfp::csp-2B;PV(RNAi)$. Cuando analizamos los niveles de expresión de GFP::CSP-2B en los animales $P_{pie-1}gfp::csp-2B;tiar-1(RNAi)$, encontramos que en condiciones control la expresión de GFP::CSP-2B aumentó un 38.1% comparada con los animales $P_{pie-1}gfp::csp-2B;PV(RNAi)$ control (Figura 28 A, C y E). Durante el ayuno y en ausencia de TIAR-1, los niveles de expresión de GFP::CSP-2 disminuyeron un 41.1% (Figura 28 C, D y E) comparada con los animales $P_{pie-1}gfp::csp-2B;tiar-1(RNAi)$ control. Los resultados anteriores sugieren que aunque la ausencia de TIAR-1 incrementa los niveles de expresión de CSP-2B independientemente de

Figura 27| TIAR-1 y CSP-2B tienen expresiones opuestas en la gónada *C. elegans*.

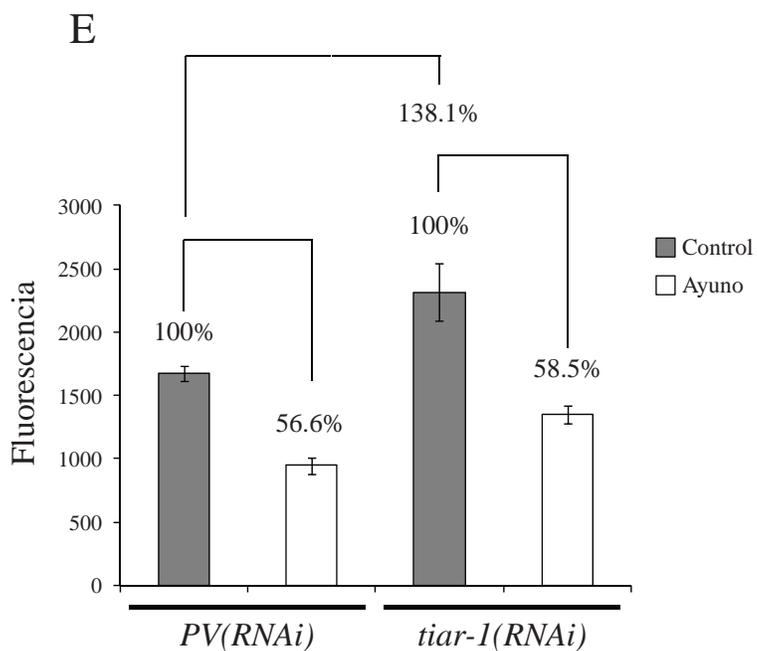
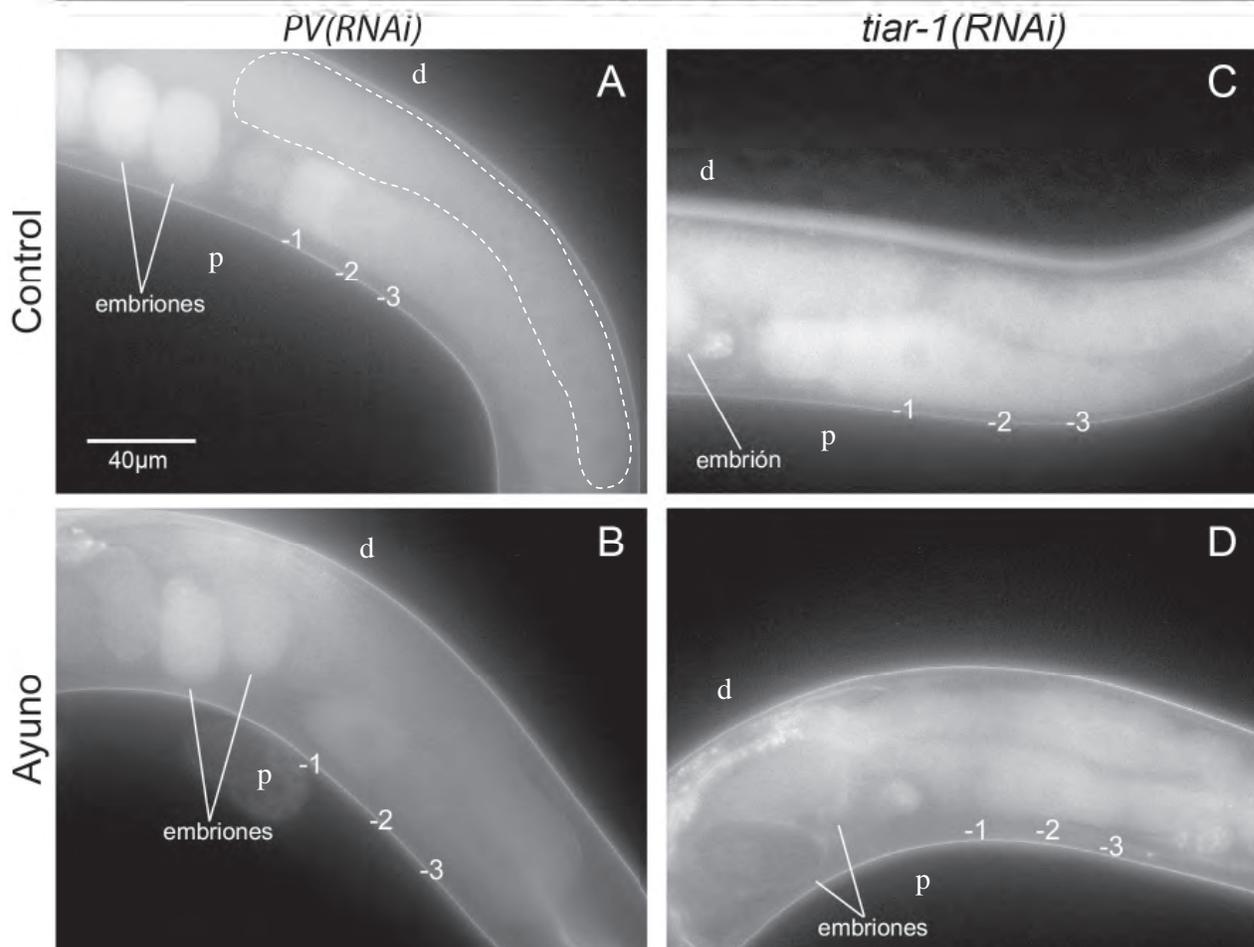
La construcción $P_{pie-1}gfp::csp-2B$ se insertó en el cromosoma II mediante recombinación homóloga, y la construcción $P_{tiar-1}tiar-1::gfp$ se insertó mediante biobalística (ver materiales y Métodos). (A) La expresión de $P_{pie-1}GFP::CSP-2B$ es menos intensa en la región distal y va aumentando hasta los ovocitos más proximales (ovocitos -1 y -2). Este aumento se mantiene en los primeros estadios embrionarios. (B) La expresión de $P_{tiar-1}TIAR-1::GFP$ es más intensa en la región distal y va disminuyendo hasta los ovocitos más proximales (ovocitos -1 y -2). Esta disminución se mantiene en los primeros estadios embrionarios. d= distal, p= proximal.

las condiciones de crecimiento, hay una disminución en la expresión de CSP-2B durante el ayuno que no depende de TIAR-1.

Geng *et al.* [131] demostraron que CSP-2B se asocia con el zimógeno de la caspasa CED-3 e inhibe su autoactivación. Así, animales mutantes en *csp-2B* mostraron un incremento en la apoptosis de las células germinales debido a la activación de CED-3 [131]. Como hemos visto, los animales *tiar-1(tm361)* no muestran un incremento en la apoptosis de las células germinales después del estrés ni tampoco en ausencia de CED-9 [68]. Existe la posibilidad de que estos animales no respondan al ayuno debido a los altos niveles de CSP-2B que tienen en su gónada y que impedirían la activación de CED-3. Para probar esta hipótesis, hicimos un silenciamiento de *csp-2* mediante RNAi en los animales *ced-1::gfp* y *tiar-1(tm361);ced-1::gfp*, los expusimos a condiciones control y de ayuno, y posteriormente contamos el número de cuerpos apoptóticos. Los animales *ced-1::gfp;PV(RNAi)* mostraron un promedio de cuerpos apoptóticos de 9.6 en condiciones control y de 16.9 en condiciones de ayuno (incremento de 1.7 veces) (Tabla 6 y Figura 29). Como esperábamos, encontramos un aumento de 1.7 veces en la apoptosis fisiológica en los animales *ced-1::gfp;csp-2(RNAi)* comparados con su control de silenciamiento (Tabla 6 y Figura 29) [131]. Sin embargo, estos animales fueron incapaces de responder al ayuno

Figura 28| La ausencia de TIAR-1 incrementa los niveles de expresión de CSP-2B en la gónada de *C. elegans*. Hicimos RNAi del gen *tiar-1* en la cepa $P_{pie-1}gfp::csp-2B$ en condiciones control o expuestos a 6 h de ayuno. Como control del RNAi se usó el PV. Después del ayuno, montamos y anestesiamos a los animales para analizar la fluorescencia. Todas las fotografías están tomadas a la misma exposición. (E) Análisis de la intensidad de la fluorescencia de A-D. Para realizar este análisis se seleccionó de la zona del centro de la gónada hacia el asa como se muestra en A y se eliminó la intensidad de fluorescencia del fondo. Esta zona se eligió porque es donde se observa normalmente la apoptosis de las células germinales. Para este análisis se usaron los resultados de dos experimentos. PV= plásmido vacío. d= distal, p= proximal.

P_{pie-1}gfp::csp-2B



(Tabla 6 y Figura 29). Los animales *tiar-1(tm361);ced-1::gfp;PV(RNAi)* mostraron un promedio de 8.3 cuerpos apoptóticos durante el control, y como ya habíamos observado previamente, estos animales no responden al ayuno (Tabla 6 y Figura 29) [68]. Al silenciar a *csp-2* en los animales *tiar-1(tm361);ced-1::gfp* encontramos un incremento en la apoptosis fisiológica (1.6 veces) (Tabla 6 y Figura 29). Cuando sometimos a estos animales al ayuno, observamos que tampoco respondieron a este tipo de estrés (Tabla 6 y Figura 29). De los resultados anteriores podemos obtener dos conclusiones. La primera es que el silenciamiento de *csp-2* induce un incremento en la apoptosis fisiológica de los animales *tiar-1(tm361)*, lo cual no habíamos observado antes en ninguna condición de estrés ni aún en ausencia de CED-9 [68]. La segunda conclusión es que CSP-2 se requiere para inducir apoptosis por ayuno.

Tabla 6| Promedio de cuerpos apoptóticos observados durante el silenciamiento de *csp-2* en condiciones control y de ayuno en los animales *ced-1::gfp* y *tiar-1(tm361);ced-1::gfp*.

Cada promedio de cuerpos apoptóticos está acompañado de su desviación estándar y la cifra entre paréntesis indica el número de gónadas analizadas. En la apoptosis fisiológica, el nivel de inducción es el resultado de la división de la cantidad de cuerpos apoptóticos observados en el RNAi de *csp-2* entre el control (*PV*). En la apoptosis por ayuno, el nivel de inducción es el resultado de la división de la cantidad de cuerpos apoptóticos observados en ayuno entre los cuerpos apoptóticos contados en animales alimentados. El valor P se obtuvo del análisis con una prueba *t* Mann Whitney. ↑ indica que hubo un aumento de cuerpos apoptóticos en la apoptosis fisiológica o durante la apoptosis por ayuno, y = significa que no hubo diferencias. *PV*= plásmido vacío.

| Gen | Control | Ayuno | Nivel de Inducción | Valor P | |
|---|-----------------|-----------------|--------------------|---------|---|
| Apoptosis fisiológica | | | | | |
| <i>ced-1::gfp;PV(RNAi)</i> | 9.6 ± 0.4 (40) | --- | --- | --- | |
| <i>ced-1::gfp;csp-2(RNAi)</i> | 16.6 ± 0.5 (60) | --- | 1.7 | <0.0001 | ↑ |
| <i>tiar-1(tm361);ced-1::gfp;PV(RNAi)</i> | 8.3 ± 0.5 (40) | --- | --- | --- | |
| <i>tiar-1(tm361);ced-1::gfp;csp-2(RNAi)</i> | 13.4 ± 0.8 (60) | --- | 1.4 | <0.0001 | ↑ |
| Apoptosis por ayuno | | | | | |
| <i>ced-1::gfp;PV(RNAi)</i> | 9.6 ± 0.4 (40) | 16.9 ± 0.5 (30) | 1.7 | <0.0001 | ↑ |
| <i>ced-1::gfp;csp-2(RNAi)</i> | 16.6 ± 0.5 (60) | 17.1 ± 0.6 (60) | 1.0 | 0.6678 | = |
| <i>tiar-1(tm361);ced-1::gfp;PV(RNAi)</i> | 8.3 ± 0.5 (40) | 8.5 ± 0.5 (40) | 1.0 | 0.8730 | = |
| <i>tiar-1(tm361);ced-1::gfp;csp-2(RNAi)</i> | 13.4 ± 0.8 (60) | 12.9 ± 0.6 (60) | 1.0 | 0.8745 | = |

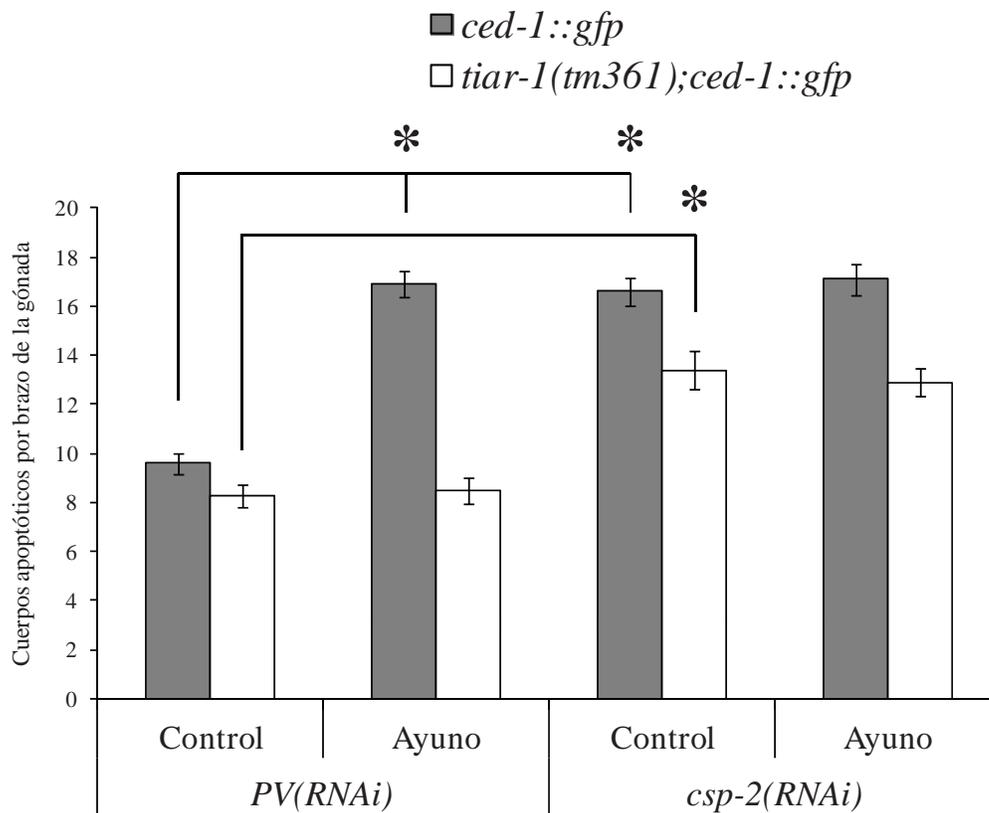


Figura 29 | El silenciamiento de *csp-2* induce un aumento en la apoptosis fisiológica de los animales silvestres y *tiar-1(tm361)*. Hicimos RNAi del gen *csp-2* en las cepas *ced-1::gfp* y *tiar-1(tm361);ced-1::gfp*. Como control del RNAi se usó el PV. Los animales de cada cepa fueron expuestos a 6 h de ayuno con su respectivo control. Después, montamos y anestesiarnos a los animales para contar los cuerpos apoptóticos bajo microscopía de fluorescencia. Las barras de error representan el error estándar. Los valores de *P* fueron obtenidos con una prueba *t* Mann Whitney. **P*<0.001.

5.3.8 DISCUSIÓN

La maquinaria central de apoptosis en *C. elegans* está compuesta por las proteínas CED-9, CED-4 y CED-3 (Figura 6) [51, 52, 55]. Mientras no exista apoptosis, un dímero de CED-4 se une a CED-9 [56]. Ante un estímulo de apoptosis, CED-9 libera a CED-4, el cual a su vez activará a la caspasa CED-3 desencadenando el proceso de apoptosis

[134]. Distintos tipos de estrés inducen un incremento en la apoptosis de las células germinales a través de diferentes vías que convergen en la activación de la maquinaria de apoptosis (Figura 7) [60, 61, 64, 135]. Mostramos que TIAR-1 se requiere para inducir apoptosis por ayuno, choque de calor, radiación UV, estrés osmótico, estrés oxidativo y en ausencia de CED-9 [68].

Buscando el mecanismo por el cual TIAR-1 induce apoptosis en condiciones de estrés, exploramos varias posibilidades. Encontramos que la ausencia de TIAR-1 no suprimió la acumulación de cuerpos apoptóticos debido al silenciamiento de genes involucrados en la fagocitosis y degradación (Figura 18). Lo anterior indica que TIAR-1 no participa en algún paso inicial de estos dos procesos.

Particularmente en el ayuno, la regulación traduccional es importante para inducir apoptosis de las células germinales por este tipo de estrés en *C. elegans* [67]. Encontramos que en ausencia de TIAR-1 no parece haber una disminución en la traducción como ocurre en los animales silvestres durante el ayuno (Figura 23). Aunado a esto, cuando analizamos de manera particular los mRNAs de *act-5*, *ced-9*, *ced-4* y *ced-3*, encontramos que la traducción de estos mRNAs se comportó de manera distinta a la observada en los animales silvestres durante el ayuno (Figura 24). Los mRNAs de *act-5*, *ced-4* y *ced-3* no bajaron su traducción en condiciones de ayuno en los animales *tiar-1(tm361)*, mientras que el mRNA de *ced-9* bajó discretamente (Figura 24). Estos resultados concuerdan con los datos obtenidos en mamíferos donde se ha observado que TIA-1 funciona como un represor de la traducción [76, 79, 106, 110]. Además, podríamos aventurarnos a sugerir que en *C. elegans* TIAR-1 quizás está involucrado en la degradación de mRNAs. Lo anterior se sustenta en que observamos un aumento en la cantidad de subunidades ribosomales durante el ayuno en ausencia de

TIAR-1 (Figura 23 B), lo que da un indicio de que hay más mRNAs traduciendo en los animales *tiar-1(tm361)* durante este tipo de estrés. Esta idea es apoyada por el hecho de que en mamíferos se ha demostrado que el silenciamiento traduccional promovido por TIA-1 induce simultáneamente la degradación de mRNAs específicos [77].

Es de llamar la atención que a pesar de que el mRNA de *ced-9* no se arresta en los animales *tiar-1(tm361)* durante el ayuno (Figura 24 C y D), al analizar los niveles de proteína de CED-9, éstos disminuyen drásticamente al igual que en los animales silvestres durante el ayuno (Figura 19). Con base en lo anterior, podemos especular que la disminución de los niveles de la proteína CED-9 durante el ayuno quizás no depende en primera instancia de su arresto traduccional. Por lo tanto, existe la posibilidad de que haya otro mecanismo involucrado en bajar los niveles de CED-9 durante el ayuno, podría ser por ejemplo la degradación de proteínas.

En resumen, para inducir apoptosis TIAR-1 no parece regular los niveles de expresión de los mRNAs de *ced-9*, *ced-4* y *ced-3* en condiciones de ayuno, así como tampoco los niveles de expresión de las proteínas CED-9 y CED-4 (Figuras 19, 20 y 21) [68]. Aunque la ausencia de TIAR-1 afecta los niveles de traducción de los mRNAs de *ced-9*, *ced-4* y *ced-3* durante el ayuno, estos cambios no permiten explicar porqué los animales *tiar-1(tm361)* no responden a este tipo de estrés (Figura 24). Analizando a que otro nivel TIAR-1 podría regular la inducción de apoptosis por ayuno, estudiamos a CSP-2.

En animales silvestres y en condiciones normales, CSP-2B impide la activación de CED-3 y por lo tanto no hay apoptosis [131]. Encontramos que TIAR-1 regula los niveles de traducción del mRNA de *csp-2*. Observamos en los animales *tiar-1(tm361)* que el mRNA de *csp-2* no disminuye su traducción durante el ayuno como ocurre

en animales silvestres, es más, su traducción aumenta (Figura 25). Al estudiar si este efecto sobre la traducción del mRNA de *csp-2* se veía reflejado en su proteína, encontramos que los niveles de CSP-2B aumentaron en ausencia de TIAR-1 tanto en condiciones normales como de ayuno (Figura 28). Este resultado explicaría que los animales *tiar-1(tm361)* no responden al ayuno debido a que hay más CSP-2B en ellos que bloquea la activación de CED-3. Esta idea se apoya por otras dos evidencias. La primera evidencia es que TIAR-1 se localiza en las fracciones polisomales (Figura 26), lo que da un indicio de su participación en la traducción. La segunda evidencia es que CSP-2B y TIAR-1 tienen expresiones opuestas en la gónada de *C. elegans* (Figura 27), sugiriendo que TIAR-1 podría estar regulando los niveles de expresión de CSP-2B.

Hasta este momento sabemos que en condiciones silvestres TIAR-1 mantiene bajos los niveles de expresión de CSP-2B en la gónada de *C. elegans* (Figura 28). Por lo tanto, creemos que en los animales *tiar-1(tm361)* CSP-2B aumenta, y este aumento podría ser el responsable de que no observemos un incremento de apoptosis en estos animales en condiciones de estrés ni en ausencia de CED-9 [68]. En mamíferos, las proteínas de unión a RNA TIA-1 y TIAR han sido involucrados en diferentes procesos del metabolismo del RNA como el splicing, degradación y traducción [70-77]. Por lo tanto, dada la naturaleza de TIAR-1 y los resultados obtenidos (Figuras 26, 27, 28 y 29), proponemos que la función de esta proteína está sobre la regulación del mRNA de *csp-2B*.

Con base en los resultados obtenidos en esta sección y los expuestos en los dos artículos [68, 130], sugerimos el siguiente modelo de inducción de apoptosis de TIAR-1 (Figura 30). Proponemos que en condiciones normales HSP-1 interactúa con TIAR-1 impidiendo que

parte de las moléculas de TIAR-1 estén libres [130]. De esta manera, las pocas moléculas libres de TIAR-1 podrían interaccionar con el mRNA de *csp-2B* y así regular los niveles de CSP-2B. Durante un estímulo como el ayuno, HSP-1 liberaría a TIAR-1 [130]. Esta liberación ocasiona que más moléculas de TIAR-1 estén libres y puedan reprimir el mRNA de *csp-2B*. Esta represión podría estar relacionada con la formación de gránulos en el centro de la gónada [130]. Así, en estos gránulos se encontraría el complejo TIAR-1/*mRNA csp-2B* que trae como consecuencia la disminución de los niveles de CSP-2B. La disminución de CSP-2B durante el ayuno en los animales silvestres ocasionaría que el zimógeno de CED-3 (la caspasa inactiva) se autoactive o se una a CED-4 para que éste la active. La activación de CED-3 desencadenaría entonces un incremento en la apoptosis.

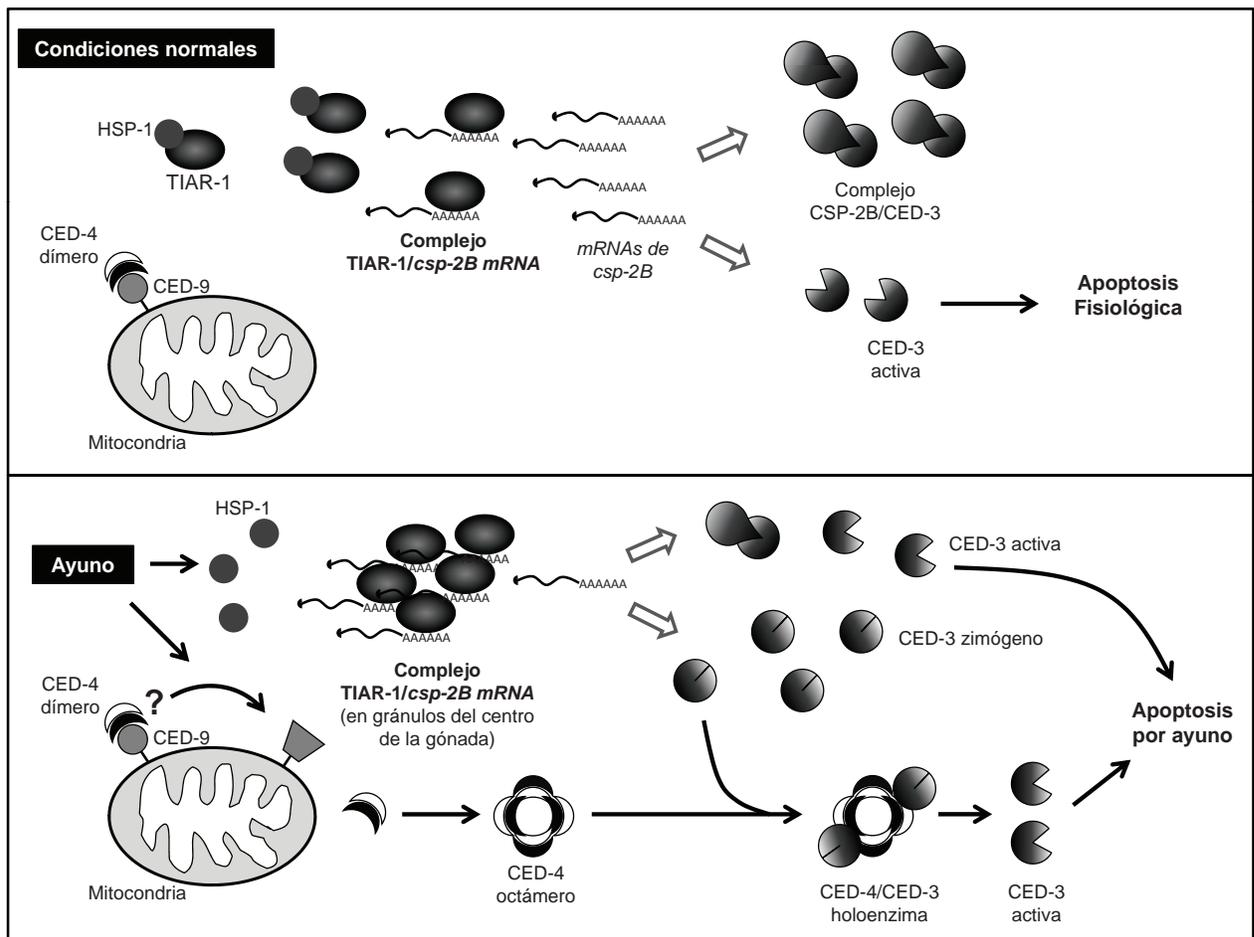


Figura 30| Mecanismo sugerido de inducción de apoptosis de TIAR-1 durante el ayuno.

Otro dato que podría apoyar la regulación del mRNA de *csp-2B* por TIAR-1 es la composición del 3' UTR de *csp-2B*. Se ha reportado en mamíferos que TIA-1 se une al 3' UTR de mRNAs enriquecidos en A y U, principalmente sobre elementos AU [109]; mientras que TIAR se une al 3' UTR de mRNAs enriquecidos en C [136]. Analizando la composición del 3' UTR del mRNA de *csp-2B*, encontramos que su 3' UTR esté enriquecido en U y tiene un elemento AU (Figura 31). Esto apoya la posibilidad de que TIAR-1 pudiera unirse al 3' UTR del mRNA de *csp-2B* y así regular su expresión.

5' uagaaaugacguguuuugaugucaauggccucggugaucaguaugcu
 cucaguacauguuucaacaguucuuucaauuguacacauuuuuucccgug
 cuacgaugaauuacaauaccuauucauuuccaauaucagauuuucuauc
 aauugugaugaugucaugcuagccuuauucauauuuuaaaauacccguuug
 ucaacucuuuuggauaguuuuacuagucaauaaaguguuuuauuug3'

Figura 31| El 3' UTR del mRNA de *csp-2B* posee un elemento AU. El 3' UTR predicho del mRNA de *csp-2B* mide 244 pb y está enriquecido en U.

5.3.9 CONCLUSIONES

Los niveles de expresión del mRNA de *tiar-1* disminuyen en condiciones de ayuno.

El mRNA de *tiar-1* está enriquecido en la línea germinal mientras que su proteína no.

TIAR-1 no se requiere en los pasos iniciales de la degradación y fagocitosis de los cuerpos apoptóticos.

En ausencia de TIAR-1 no existe una disminución general en la tasa de traducción en condiciones de ayuno.

En ausencia de TIAR-1, la traducción de los mRNAs de *ced-9*, *ced-4* y *ced-3* no se altera durante el ayuno.

TIAR-1 no regula los niveles de expresión de las proteínas CED-9 y CED-4 durante el ayuno.

La ausencia de TIAR-1 incrementa los niveles de traducción del mRNA de *csp-2* durante el ayuno.

Las proteínas TIAR-1 y CSP-2B tienen patrones de expresión opuestos en la gónada.

La ausencia de TIAR-1 incrementa los niveles de expresión de la proteína CSP-2B en la gónada tanto en condiciones control como de ayuno.

CAPÍTULO 4: PARTICIPACIÓN DE TIAR-1 EN LA DIAPAUSA REPRODUCTIVA DEL ADULTO

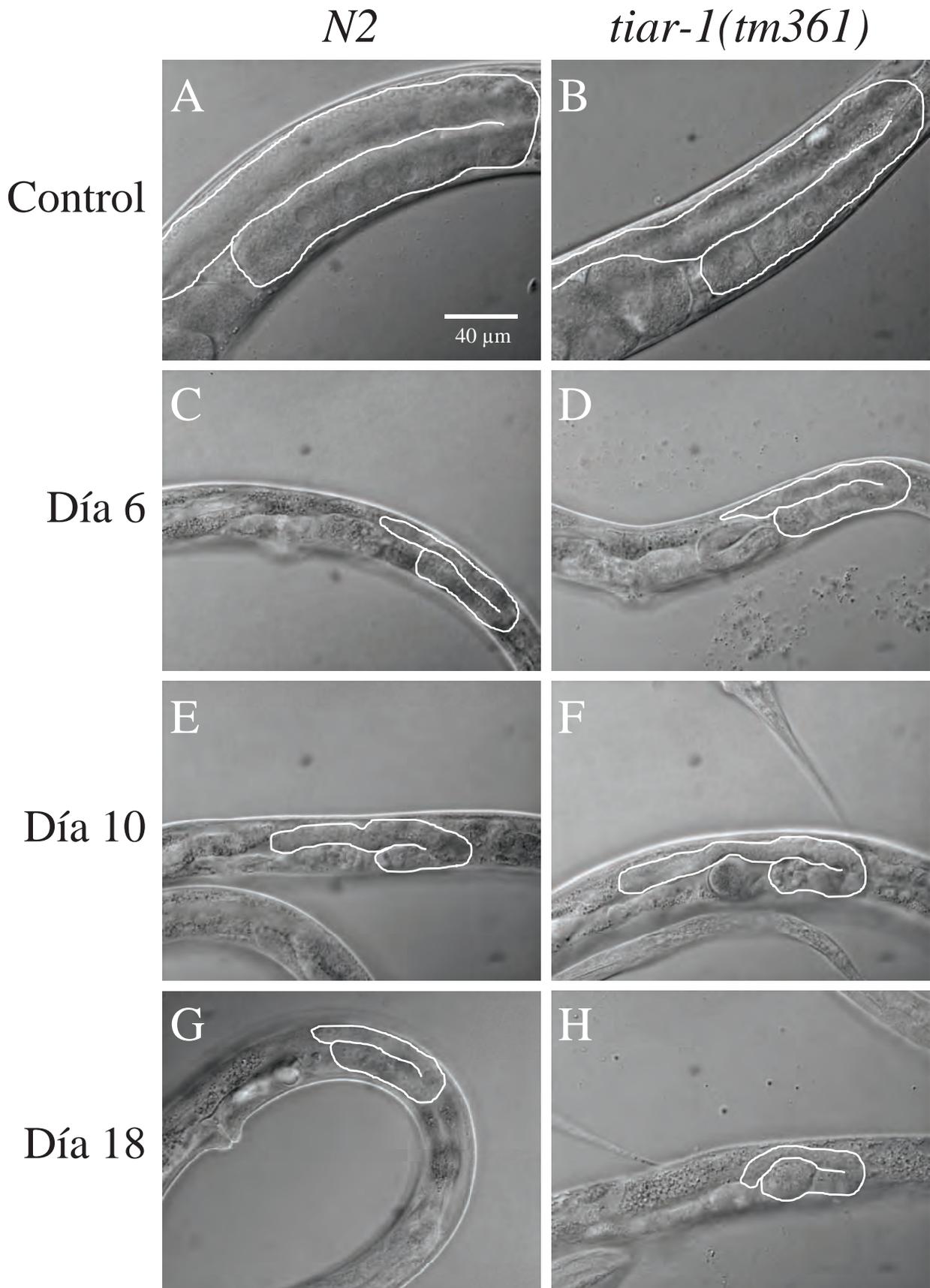
5.4.1 LA AUSENCIA DE TIAR-1 NO AFECTA LA ENTRADA A LA DIAPAUSA

Cuando *C. elegans* es ayunado, su crecimiento puede detenerse en algunos estadios larvarios sin que afecte su futuro crecimiento o reproducción. Los estadios larvarios de latencia más estudiados durante el ayuno son la larva L1 y “dauer” (Figura 1). Animales recién eclosionados pueden sobrevivir al menos dos semanas sin comida al entrar a la diapausa L1 (Figura 1) [4]. Animales arrestados en “dauer” pueden soportar varios meses sin alimento (Figura 1) [2]. En estos casos, los animales detienen su desarrollo y cuando la disposición del alimento se restablece continúan con su crecimiento. Recientemente se ha descrito un estadio de latencia nuevo denominado diapausa reproductiva del adulto (Figura 1) [5, 6].

Al igual que las diapasas mencionadas anteriormente, la diapausa reproductiva del adulto se caracteriza por permitir la sobrevivencia de los

animales adultos a largos periodos sin comida [5]. Además, durante este periodo se observa una reducción de la gónada en ovogénesis (Figura 1) [5]. Cuando las condiciones de comida se restablecen, la gónada se regenera y continúa el ciclo de vida del animal [5]. La apoptosis es importante para la diapausa reproductiva del adulto ya que la ausencia de CED-3 (no hay apoptosis) en los animales impide la reducción en el número de células germinales [5]. Dado que la apoptosis es importante para la reducción de la gónada en la diapausa reproductiva del adulto [5] y encontramos que TIAR-1 se requiere para inducir apoptosis por ayuno en el adulto, exploramos la posibilidad de que esta proteína fuera importante durante esta diapausa.

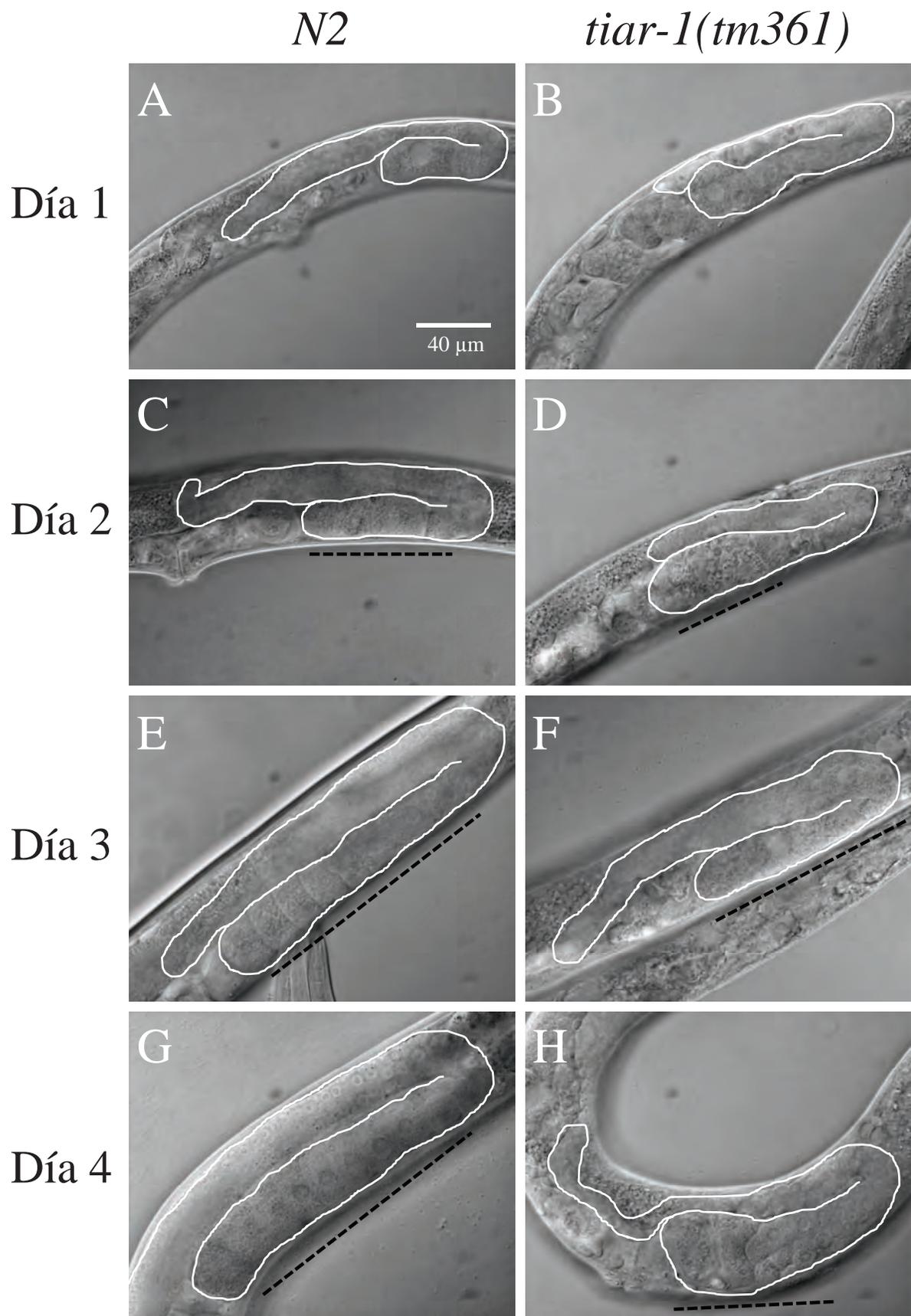
Para analizar la participación de TIAR-1 en la diapausa reproductiva del adulto, los animales silvestres y *tiar-1(tm361)* fueron sincronizados en el estadio larvario L4 y se pusieron en cajas sin comida por 20 días. Seguimos día a día el curso de estos animales observando su gónada bajo el microscopio y analizando la entrada a la diapausa durante el ayuno. Al igual que la investigaciones hechas previamente [5, 6], observamos una reducción en la gónada de los animales silvestres (Figura 32 A, C, E y G). Cuando analizamos la entrada a la diapausa reproductiva del adulto en los animales *tiar-1(tm361)*, encontramos que éstos reducen su gónada de manera similar a la de los animales silvestres (Figura 32 B, D, F y H). Lo anterior sugiere que TIAR-1 no se requiere para que los animales entren a la diapausa reproductiva del adulto.



5.4.2 LA AUSENCIA DE TIAR-1 AFECTA LA RECUPERACIÓN DE LA DIAPAUSA

El siguiente objetivo a estudiar fue la participación de TIAR-1 en la recuperación de los animales después de haber estado en la diapausa reproductiva del adulto. Para esto, los animales silvestres y *tiar-1(tm361)* que estuvieron sin comida por 20 días y habían entrado a la diapausa reproductiva del adulto, fueron alimentados para analizar su recuperación. Encontramos que los animales silvestres recuperaron por completo el tamaño y morfología de su gónada a los 4 días (Figura 33 A, C, E y G). En contraste, la gónada de los animales *tiar-1(tm361)* nunca se volvió a verse como era antes (Figura 33 B, D, F y H). Observamos que la región de los ovocitos maduros fue de menor tamaño que la de los animales silvestres y lucía dañada desde el día de recuperación 2 (Figura 33 C-H, línea punteada).

Figura 32| Los animales *tiar-1(tm361)* pueden entrar a la diapausa reproductiva del adulto. Animales sincronizados de las cepas *N2* y *tiar-1(tm361)* en el estadio larvario L4 fueron puestos a ayuno 20 días para inducir la diapausa reproductiva del adulto (ver Materiales y Métodos). En A y B se muestran las gónadas control de adultos bien alimentados. (C-H) Los animales en condiciones de ayuno fueron montados y anestesiados para observarlos bajo microscopía Nomarski. Se muestran imágenes representativas de los días 6, 10 y 18 de ayuno. La gónada se marca con una línea continua blanca.



5.4.3 TIAR-1 REGULA LA APOPTOSIS DE LAS CÉLULAS GERMINALES LOS PRIMEROS DIAS DE LA DIAPAUSA

Otro aspecto que analizamos de los animales que están entrando en la diapausa reproductiva del adulto fue la apoptosis de las células germinales. Para esto, animales sincronizados de las cepas *ced-1::gfp* y *tiar-1(tm361);ced-1::gfp* en el estadio larvario L4 se pusieron en ayuno. Durante los primeros 5 días de ayuno contamos la apoptosis en la gónada de estos animales. Encontramos que la apoptosis en los animales control *ced-1::gfp* va disminuyendo conforme van aumentando los días de ayuno (Figura 34). En el caso de los animales *tiar-1(tm361);ced-1::gfp*, observamos menos apoptosis los 2 primeros días de ayuno comparada con la apoptosis de la cepa *ced-1::gfp* (Figura 34).

Figura 33| Los animales *tiar-1(tm361)* no se recuperan de la diapausa reproductiva del adulto. (A-B) Animales de las cepas *N2* y *tiar-1(tm361)* en 20 días de diapausa (ver Materiales y Métodos) fueron recuperados en cajas con comida. Estos animales fueron montados y anestesiados para observar su recuperación bajo microscopía Nomarski. Se muestran imágenes representativas de los días 1, 2, 3 y 4 de recuperación. La gónada se marca con una línea continua blanca. La línea negra punteada señala la región de los ovocitos.

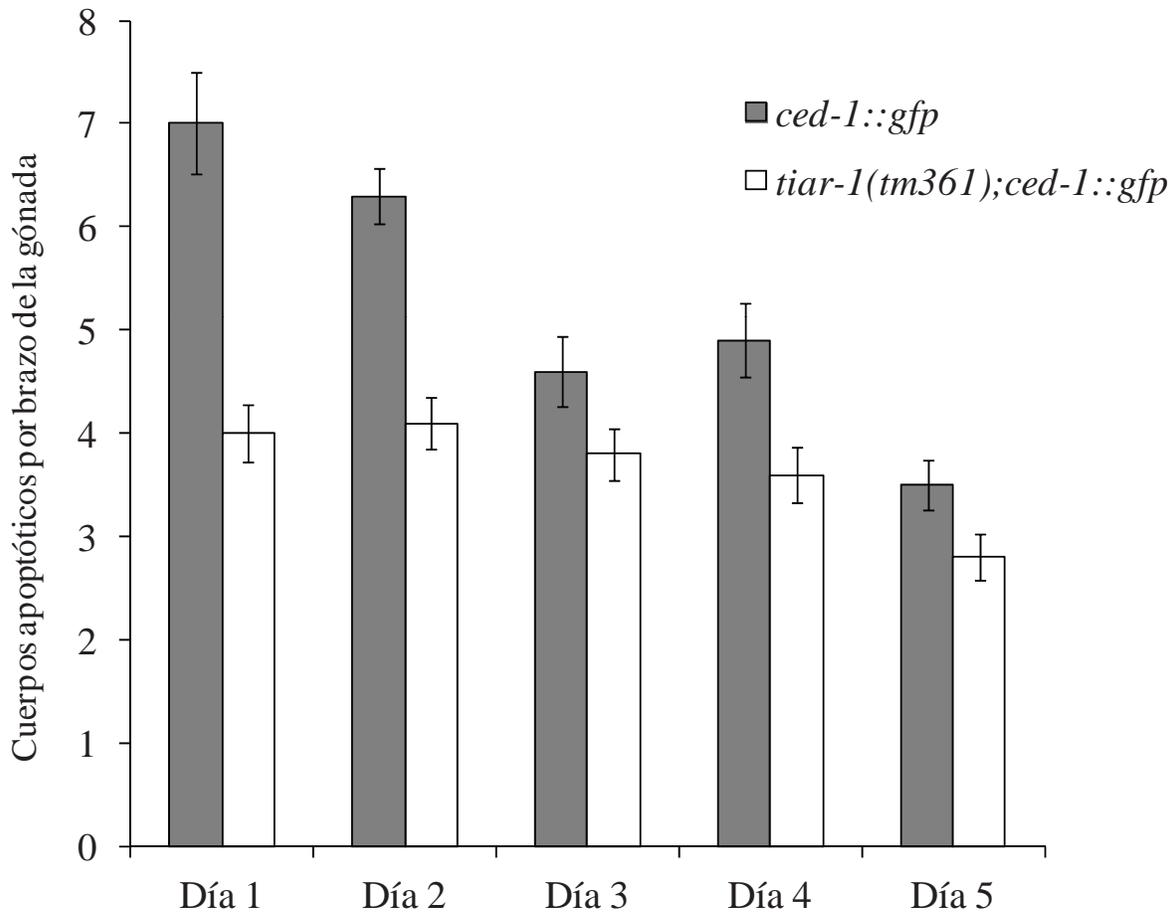


Figura 34| Los animales *tiar-1(tm361)* tienen menos apoptosis que los animales silvestres los primeros días de la diapausa reproductiva del adulto. Animales sincronizados *ced-1::gfp* y *tiar-1(tm361)::ced-1::gfp* en el estadio larvario L4 fueron puestos a ayuno por 5 días para inducir la diapausa reproductiva del adulto (ver Materiales y Métodos). Los animales en condiciones de ayuno fueron montados y anestesiados cada día para contar los cuerpos apoptóticos bajo microscopía de Fluorescencia. Las barras de error representan el error estándar.

5.4.4 DISCUSIÓN

Muchos animales alteran su estrategia reproductiva en respuesta al estrés ambiental [137-141]. Particularmente en *C. elegans*, las larvas hermafroditas L4 o adultos que están en condiciones de ayuno inician la ovogénesis pero reducen el tamaño de su gónada y su tasa de reproducción, entrando en un estado conocido como diapausa reproductiva del adulto [5, 6]. Cuando la alimentación se restablece, los animales en esta diapausa regeneran el tamaño de su gónada y continúan con su ciclo de vida [5]. En este capítulo estudiamos la participación de TIAR-1 en la diapausa reproductiva del adulto. Encontramos que los animales mutantes para *tiar-1* entraron en la diapausa reproductiva del adulto (Figura 32), lo que sugiere que TIAR-1 no se requiere para que los animales entren a esta diapausa.

Cuando recuperamos a los animales *tiar-1(tm361)* de la diapausa, encontramos que la gónada aumentaba de tamaño pero no se veía como antes (Figura 33). Lo anterior sugiere que TIAR-1 podría ser importante para la recuperación de la gónada de los animales que estuvieron en la diapausa reproductiva del adulto. Sin embargo, tenemos que tomar en cuenta que los animales mutantes para *tiar-1* presentan defectos en la ovogénesis [68]. Por lo tanto, es posible que los defectos en la gónada de éstos animales al recuperarse de la diapausa se deban a una mala ovogénesis [68] y no necesariamente a un requerimiento de TIAR-1 en el proceso de recuperación de esta diapausa.

Otro aspecto que analizamos de la diapausa reproductiva del adulto fue la apoptosis de las células germinales. Encontramos en los animales control que la apoptosis de las células germinales va disminuyendo conforme aumentan los días de ayuno (Figura 34). Seguramente esta disminución en la apoptosis se debe a que también va disminuyendo el

número de células germinales conforme los animales pasan más días en diapausa (Figura 32) [5]. Cuando analizamos la apoptosis de las células germinales en los animales *tiar-1(tm361)*, encontramos que desde el primer día de ayuno esta apoptosis fue menor comparada con la de los animales control (Figura 34). Podemos especular que esta disminución de la apoptosis el primer día en los animales mutantes para *tiar-1* podría deberse a que esta proteína es indispensable para inducir apoptosis por ayuno [68]. Sin embargo, conforme aumenta el número de días en ayuno, llega un momento (día 4-5) en el que la apoptosis de las células germinales es basal tanto para los animales mutantes como para los animales control (Figura 34). Esto sugiere que la apoptosis inducida por ayuno [64, 67, 68] no se requiere para reducir la gónada de tamaño; entonces, parece que los niveles de apoptosis fisiológica basal son los que regulan esta reducción.

5.4.5 CONCLUSIONES

TIAR-1 no se requiere para que los animales entren a la diapausa reproductiva del adulto.

No se pudo determinar si TIAR-1 participa en la recuperación de la diapausa reproductiva del adulto porque los animales *tiar-1(tm361)* presentan defectos en la ovogénesis.

La apoptosis de las células germinales disminuye conforme aumentan los días en ayuno.

Los animales *tiar-1(tm361)* tienen menos apoptosis durante los dos primeros días de ayuno comparada con la apoptosis de los animales silvestres debido a que no inducen apoptosis por ayuno.

APARTADO DOS

EL PAPEL DE TIAR-1 EN LA FORMACIÓN DE GRÁNULOS EN LA GÓNADA

CAPÍTULO 5: LA **PROTEÍNA** DE UNIÓN A RNA **TIAR-1** SE REQUIERE **PARA LA FORMACIÓN** DE **GRÁNULOS** EN CONDICIONES DE **ESTRÉS** EN EL CENTRO DE LA GÓNADA DE ***C. ELEGANS***

Durante la ovogénesis, grandes cantidades de mRNAs y proteínas son sintetizados y almacenados para un correcto desarrollo embrionario y para la preservación de la línea germinal. Debido a esto, las células germinales han desarrollado mecanismos para proteger estos componentes del estrés. Dentro de los mecanismos que las células han desarrollado para protegerse del estrés está la formación de gránulos de RNA. En *C. elegans*, complejos ribonucleoproteicos (RNP) han sido descritos tanto en ovocitos como en el centro de la gónada durante el estrés. Aunque componentes de

cuerpos de procesamiento, gránulos de estrés y gránulos germinales (gránulos P) se localizan en gránulos de RNA durante el estrés, no se ha esclarecido la naturaleza de estos gránulos. En este artículo, mostramos la formación de gránulos en el centro de la gónada en respuesta al ayuno, choque de calor y radiación UV. Así, mediante análisis genéticos y el uso de reactivos químicos, mostramos que los gránulos formados en el centro de la gónada durante el estrés son similares a los gránulos de estrés de mamíferos. Sin embargo, también observamos que la formación de gránulos en los ovocitos tiene una naturaleza distinta. Además, probamos si los gránulos formados en el centro de la gónada dependían de los tres homólogos en *C. elegans* de TIA-1/TIAR, TIAR-1, TIAR-2 y TIAR-3. Encontramos que la formación de estos gránulos depende principalmente de TIAR-1, pero la formación de gránulos en los ovocitos no. También encontramos que TIAR-1 interacciona genéticamente con la proteína de choque de calor, HSP-1, para regular la formación de gránulos en el centro de la gónada, donde HSP-1 tiene un papel antagonista. TIAR-1 se expresa en todo el animal, pero su expresión en la línea germinal es suficiente para rescatar la formación de gránulos en el centro de la gónada, sugiriendo que la formación de estos gránulos es intrínseca de la línea germinal. Estos descubrimientos contribuyen a entender mejor la naturaleza de los gránulos de RNA formados en la gónada de *C. elegans*, la cual no ha sido bien esclarecida aún.

The RNA binding protein TIAR-1 is required to form gonad core granules under stress conditions in *C. elegans*

Silva-García, C. G. and Navarro, R. E.

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

Abstract

During oogenesis, large amounts of mRNAs and proteins are synthesized and stored for early embryo development and germline preservation. Therefore, germ cells have evolved mechanisms to protect their components from stress. Among the mechanisms that cells have to protect themselves from stress is the formation of RNA granules. Recently in *Caenorhabditis elegans*, ribonucleoprotein (RNP) complexes have been described in both oocytes and the gonad core region during stress. Although components of processing bodies (P bodies), stress granules and germ granules (P granules) localized in RNA granules during stress, the nature of these granules is not clear for the moment. Here, we show that the *C. elegans* gonad form granules during stress conditions, and we propose that the nature of these granules depend of the region where are formed. Thus, using chemical reagents and genetics, we observed that gonad core granules are similar to mammalian stress granules. We demonstrate that the formation of gonad core granules depend on TIAR-1, one of three TIA-1/TIAR homologs in *C. elegans*. We also show that TIAR-1 genetically interacts with the heat shock protein HSP-1 to regulate the formation of gonad core granules, where HSP-1 plays an antagonistic role. Curiously, none of the three TIA-1/TIAR homologs, TIAR-1, TIAR-2 and TIAR-3, are required to form oocytes granules during stress conditions. TIAR-1 is expressed in the cytoplasm of whole animal cells, but its germline expression is sufficient to rescue the *tiar-1(tm361)* animals' core granule formation defects. These new insights contribute for better understanding the nature of RNA granules formed in the *C. elegans* gonad during stress conditions.

INTRODUCTION

The precise temporal and spatial regulation of mRNAs is vital to ensure an accurate gene expression. mRNA biogenesis, function and ultimate expression require the

concerted participation of RNA-binding proteins. Numerous mRNA-binding proteins have been described in multiple animal models that contribute to the control of mRNA through its capping, splicing, polyadenylation, nuclear export, translation and decay. Mammalian studies show that there are dynamic complexes which assemble in various cytoplasmic RNA granules that control mRNA triage and can be affected by adverse environmental conditions [1-3]. Among these RNA granules are processing bodies (P bodies) and stress granules.

P bodies are sites in which mRNAs are silenced or decay [2]. Therefore, these RNA granules concentrate proteins involved in mRNA decapping (Edc3, Lsm1-7, Dcp1 and Dcp2), miRNA repression (Ago2, ALG-1 and GW182), translational repression (Scd6, Rck and Pat1), and nonsense-mediated decay (SMG7 and Dpf1-3) [2,4]. In normal conditions, P bodies are present in cells, but under stressful conditions they can increase in size [2]. In contrast, stress granules are formed only when cells are exposed to harmful conditions such as heat shock, UV radiation and oxidative stress [3]. Stalled 48S pre-initiation complex (eIF3, eIF4A, eIF4G, PABP-1 and small ribosomal subunit) is the core constituent of mammalian stress granules [3]. During stress, translation of housekeeping mRNA transcripts is turned off, and these transcripts move from polysomes to stress granules, where mRNAs are temporally stored and protected from harmful conditions [3]. Stress granule formation depends, among other key factors, on TIA-1, an mRNA-binding protein that promotes the aggregation of modified 48S translation pre-initiation complexes [5] [6]. Mammalian TIA-1 and TIAR proteins are highly similar; they possess three RNA-recognition motifs (RRM) at their amino termini, and a glutamine-rich domain at their carboxyl termini (a prion-like domain); which is important for self-aggregation and interaction with another stress proteins like the heat shock protein HSP70 [6].

Germ cells are the basis of organismic continuity and environmental stresses could have drastic effects on their integrity. Growing oocytes accumulate an enormous quantity of mRNAs; some of them are translated, and others are silenced to prevent premature differentiation [7,8]. Although there are a few reports available about RNA granule formation in response to environmental stress in the germline of metazoans [9-13], much remains

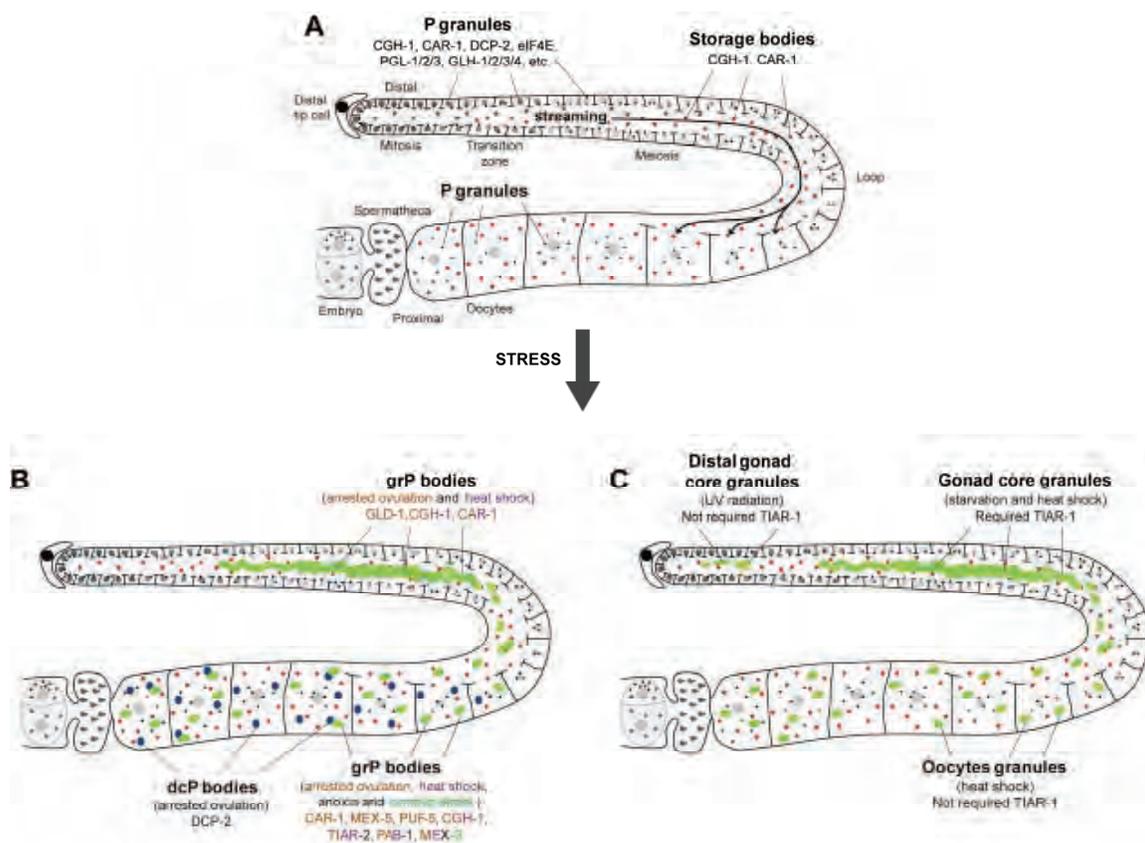


Figure 1. Schematic showing distribution of RNA granules under normal (A) and stress (B and C) conditions in the hermaphrodite *C. elegans* gonad.

unclear about the mechanisms that trigger this process and their relevance during the stress response.

In the *C. elegans* germline, some types of RNA granules have been described during normal development [9,14]. Germ cells in the hermaphrodite gonad contain perinuclear associated granules called P granules (Figure 1A). P granules regulate mRNA expression to promote germ cell development in the early embryo [15]. The composition of P granules is extremely varied, but they are characterized by containing a large number of RNA-binding proteins (Figure 1A) (e.g., CGH-1, CAR-1, DCP-2, eIF4E, PGL-1/3/3, GLH-1/2/3/4, DCR-1) [15,16]. Smaller RNA granules known as storage bodies are also present throughout the gonad and protect mRNAs from degradation (Figure 1A) [9]. These granules were identified using the DEAD box RNA helicase CGH-1, and the RNA-binding protein CAR-1 as markers [9,17,18]. The wide variety of proteins present in RNA granules in the *C. elegans* germline suggests that these structures work in coordination to regulate an appropriate gene expression. Moreover, these RNA granules are remodeled while others appear in the gonad when animals are exposed to stress conditions (Figure 1B) [9-11,14].

Bigger RNA granules are formed in the *C. elegans* gonad in response to stress or arrested ovulation (Figure 1B) [9-11]. During arrested ovulation, large RNA granules are observed in the gonad core composed by CGH-1, CAR-1 and GLD-1 (Figure 1B) [10,11]. These granules are called grP bodies (granules related to P bodies) [11], and they are also observed in arrested oocytes where they are composed by proteins such as CGH-1, CAR-1, MEX-5, PUF-5, MEX-3, PAB-1 and TIAR-2 (Figure 1B) [10,11]. Other RNA granules are observed during arrested ovulation and are composed principally by the decapping protein DCP-2 (Figure 1B) [11]. These types of RNA granules were named dcP bodies (DCP-2 – enriched granules related to P bodies) [11]. Thus, during arrested ovulation, dcP bodies were observed in oocytes but not in the gonad core (Figure 1B) [11].

Besides the arrested ovulation, it is seen that different types of stresses such as heat shock, osmotic stress and anoxia induce granule formation in the gonad [10]. Particularly, heat shock induces the formation of grP bodies in the gonad core (CGH-1 and CAR-1) and in oocytes (CGH-1, MEX-3, PAB-1 and TIAR-2) (Figure 1B) [10] [11]. grP bodies were also observed in oocytes

when animals are exposed to anoxia (MEX-3, PAB-1 and TIAR-2) and osmotic stress (MEX-3) (Figure 1B) [10,11].

We previously describe that the RNA binding protein TIAR-1, one of three RNA-binding proteins from the TIA-1/TIAR family, is a key regulator during stress response; particularly, we found that TIAR-1 is required to induce stress-induced germ cell apoptosis [19]. In this paper, we propose a model for granule formation in the *C. elegans* gonad under stress conditions. We tested the granule formation during starvation, heat shock and UV conditions, and we found that its formation depends of type of stress tested and the gonad region studied. Thus, there are three regions where we can observe the granule formation: distal gonad core, gonad core and oocytes (Figure 1C). Furthermore, using chemical reagents, we determinate that the granules observed particularly in the gonad core zone during starvation are more similar to mammalian stress granules than P bodies. We demonstrate that TIAR-1 is required for the formation of gonad core granules under starvation and heat shock conditions. Also, we show that TIAR-1 is not required to form granules in distal gonad core and oocytes under UV radiation and heat shock conditions, respectively, suggesting that these granules have different nature from stress granules. Finally, we observed that TIAR-1 genetically interacts with HSP-1 to form gonad core granules. Our data indicate that TIAR-1 is a key component in the *C. elegans* germline whose function is essential to assembly RNA granules under stress conditions.

Table 1

The granule formation in different genetic backgrounds

| Genotype | % (n) | | | |
|--|-----------|------------|------------|-----------|
| | Control | Starvation | Heat Shock | UV |
| wt | 0.0 (314) | 99.3 (135) | 97.8 (91) | 84 (94) |
| <i>tiar-1(tm361)</i> | 0.0 (167) | 25.4 (122) | 5.4 (37) | 68.1 (72) |
| <i>tiar-2(tm2923)</i> | 0.0 (37) | 100 (24) | 100 (20) | 91.7 (24) |
| <i>tiar-3(ok144)</i> | 7.1 (42) | 100 (27) | 90.1 (22) | 100 (23) |
| <i>tiar-2(tm2923);tiar-3(ok144)</i> | 0.8 (55) | 100 (21) | 95.0 (20) | 92.3 (26) |
| <i>tiar-1(tm361);tiar-2(tm2923)</i> | 0.0 (96) | 9.8 (41) | 0.0 (29) | 51.2 (41) |
| <i>tiar-1(tm361);tiar-3(ok144)</i> | 3.4 (148) | 37 (81) | 0.0 (41) | 58.9 (56) |
| <i>tiar-1(tm361);tiar-2(tm2923);tiar-3(ok144)</i> | 0.0 (137) | 82.9 (70) | 0.0 (28) | 52.2 (46) |
| <i>tiar-1(tm361);P_{star-1}::gfp::tiar-1</i> | 0.0 (30) | 0.0 (32) | ND | ND |
| <i>tiar-1(tm361);P_{pe-1}::gfp::tiar-1</i> | 7.1 (14) | 77.8 (27) | ND | ND |
| <i>tiar-1(tm361);P_{tiar-1}::gfp</i> | 0.0 (30) | 100 (40) | ND | ND |

Animals of the indicated strains were exposed to each stress condition as described in the Materials and Methods. After each treatment, hermaphrodite gonads were extruded, fixed, immunostained with an affinity-purified CGH-1 antibody and examined by fluorescence microscopy. The percentages of gonads that formed GCGs are shown, with the number of gonad arms tested in parentheses.

RESULTS

Starvation induces the formation of gonad core granules in *C. elegans*

The mammalian TIA-1 and TIAR proteins are important for stress granule formation [20], therefore we studied whether TIAR-1/2/3 participate in granules formation under stress conditions in the *C. elegans* gonad. We used CGH-1 as a marker for granule formation (Figure 1B). Under normal growth conditions, CGH-1 is expressed in the cytoplasm of early embryos and germ cells in a granular and diffuse pattern [17] (Figures 2A, 8A). First, we exposed one-day-old wild-type hermaphrodites to 6 h of bacteria deprivation to induce starvation. In these conditions, the gonad appears normal although germ cell apoptosis is triggered [21]. Under starvation, CGH-1 accumulated in the core of the hermaphrodite gonad in a laminar/granular pattern (Figure 2B; Table 1), which we will refer to as gonad core

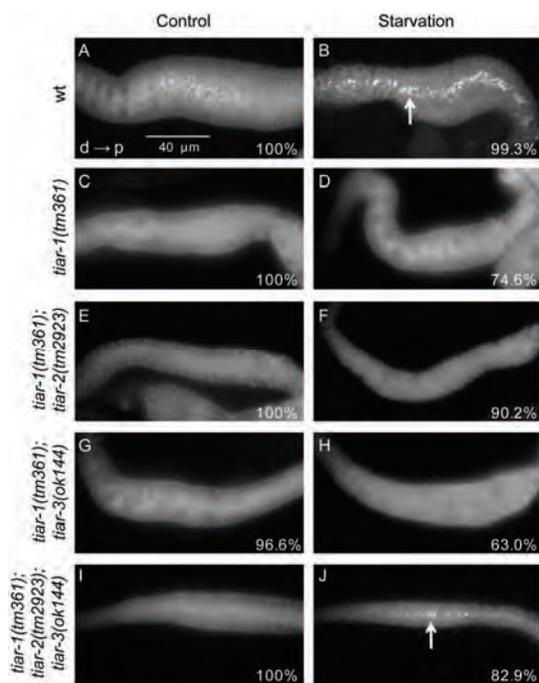


Figure 2. TIAR-1 is required to form gonad core granules under starvation conditions. (A-J) One-day-old animals of the indicated backgrounds were exposed to 6 h of food deprivation or kept in control conditions. After incubation, their gonads were extruded, fixed and immunostained with an affinity-purified CGH-1 antibody. The distal arm of the gonad is shown to the left in each frame. The percentage of animals with the depicted phenotype is shown in each picture. The arrows point to gonad core granules. d= distal and p= proximal.

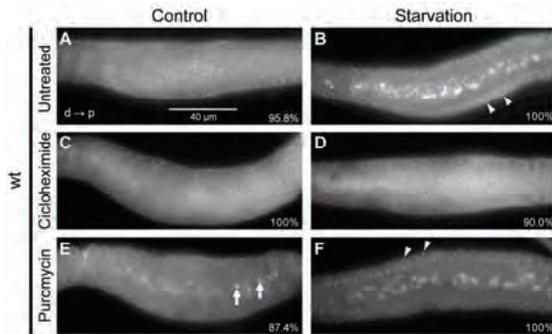


Fig. 3. Gonad core granule formation is abolished by cycloheximide and induced by puromycin. (A-F) One-day-old wild-type animals were exposed to control or starvation conditions (described in the Materials and Methods) in the presence of cycloheximide (10 mM) or puromycin (10 mM). After each treatment, the extruded gonads were fixed, immunostained with an affinity-purified CGH-1 antibody and observed under fluorescence microscopy. The distal gonad arm is on the left in each picture. The percentages of gonads showing similar phenotypes are shown in each panel. The arrows point to gonad core granules, and the arrowheads point to large P granules. d= distal and p= proximal.

granules (Figure 1C). To test whether males form gonad core granules, we used the *him-8(e1489)* strain, whose hermaphrodites produce 30% more males than wild-type animals [22]. We observed that in normal conditions CGH-1 is expressed through the gonad in a granular and diffuse pattern with a small accumulation of CGH-1 in the proximal part (Figure S1A, C). Under starvation, CGH-1 expression was not affected, and no accumulation of gonad core granules was observed (Figure S1B, D). These data show that only the hermaphrodite gonad is able to respond to starvation by aggregating gonad core granules.

In mammals, cycloheximide treatment disassembles both stress granules and P bodies [23]. To expose animals to the chemical reagent and starvation, we transferred one-day-old hermaphrodites to S-medium [24] with or without 10 mM cycloheximide. Accordingly with mammalian observations [23], CGH-1-positive gonad core granule formation was inhibited in the majority of gonads (90%) of starved animals in the presence of cycloheximide (Figure 3A-D). This observation suggests that gonad core granules are similar to mammalian stress granules and/or P bodies. It is worth noting that in these starvation conditions, large P granules were observed in untreated animals (Figure 3B; arrowheads), which were inhibited by cycloheximide (Figure 3D). Interesting, small CGH-1-positive cytoplasmic granules (storage bodies, Figure 1A) [9] were still present and not affected by cycloheximide both in normal as in starvation conditions (Figure 3C, D). Overall, these results suggest that cycloheximide affect

the formation of granules, but only when animals are exposed to starvation conditions (gonad core granules).

Puromycin, in contrast, promotes premature translational termination and polysome disassembly, which induce stress granule formation while does not affect P bodies [23]. To expose animals to puromycin and starvation, we transferred one-day-old hermaphrodites to S-medium [24] with or without food and incubated for 4 h with or without 10 mM of the chemical reagent. When puromycin was added in the absence of stress, many animals formed gonad core granules (87.4%), but not large P granules (Figure 3E). However, these two types of granules were more evident under starvation conditions (100%) (Figure 3F). Our data suggest that gonad core granules formed by puromycin in treated animals are similar to mammalian stress granules.

TIAR-1 is required to form gonad core granules under starvation conditions

To test the role of the *C. elegans* TIA-1/TIAR family in gonad core granule formation under starvation, we exposed single, double and triple mutants to starvation and used CGH-1 as a granule marker. When *tiar-1(tm361)* animals were starved, most gonads did not form gonad core granules (74.6%) (Figure 2C, D; Table 1), and the remaining animals formed small and scattered granules (Figure S2). These data suggest that TIAR-1 is required to induce gonad core granules under starvation. In *tiar-1(tm361)* animals, recently we reported rescue transgenic animals that carried the TIAR-1 protein fused with green fluorescent protein (GFP) [19]. The *P_{S_{tiar-1}}*

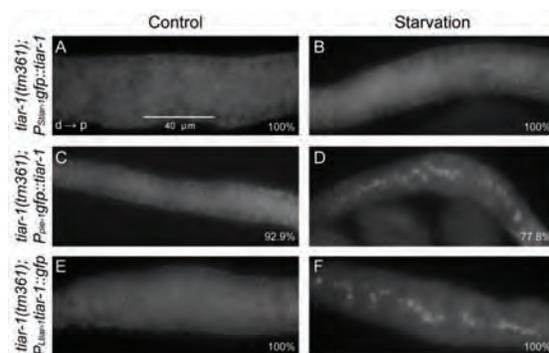


Fig. 4. Germline expression of TIAR-1 is sufficient to rescue gonad core granule formation in *tiar-1(tm361)* animals. (A-F) One-day-old animals of the indicated backgrounds were exposed to control and starvation conditions as described in the Materials and Methods. After each treatment, extruded gonads were fixed, immunostained with an affinity-purified CGH-1 antibody and observed under fluorescence microscopy. The distal gonad arm is on the left in each picture. d= distal, p= proximal.

igfp::tiar-1 construct is expressed in somatic cells; $P_{pie.igfp::tiar-1}$ construct is expressed exclusively in the gonad; and $P_{Ltiar-1}::igfp$ construct is expressed both soma and germline [19]. We next analyzed whether the expression of TIAR-1 in soma, germline or both is required to rescue gonad core granule formation. Somatic cells rescue of *tiar-1* expression (*tiar-1(tm361);P_{S_{tiar-1}}igfp::tiar-1*) was not sufficient to induce gonad core granule formation under starvation (Figure 4A, B; Table 1). Nearly of 78% of *tiar-1(tm361)* animals carrying the germline transgenic expression (*tiar-1(tm361);P_{pie.igfp::tiar-1}*) formed gonad core granules under starvation (Figure 4C, D; Table 1). A hundred percent of *tiar-1(tm361);P_{Ltiar-1}igfp* animals formed gonad core granules under starvation (Figure 4E, F; Table 1). These data suggest that the germline expression of TIAR-1 is required to induce gonad core granules under starvation.

The three *C. elegans* TIA-1/TIAR proteins have similar domain structures [19], suggesting that they may have overlapping functions. We therefore decided to assess the participation of the other homologs in gonad core granule formation. Single *tiar-2(tm2923)* or *tiar-3(ok144)* mutant animals were able to form gonad core granules after 6 h of starvation, indicating that these genes are not required for granule formation under starvation (Table 1). *tiar-2(tm2923);tiar-3(ok144)* double-mutant animals were still able to form gonad core granules under starvation, supporting the idea that these genes are not necessary for this response (Table 1). To test whether TIAR-2 or TIAR-3 collaborates with TIAR-1 in granule formation, we exposed double- and triple-mutant animals to starvation. Just about of ninety percent of *tiar-1(tm361);tiar-2(tm2923)* mutant animals were unable to form gonad core granules under starvation conditions (Figure 2E, F; Table 1). The slight increase in the proportion of *tiar-1(tm361);tiar-2(tm2923)* double-mutant animals that did not form gonad core granules (90.2%, Figure 2F; Table 1) relative to *tiar-1(tm361)* single-mutant animals (74.6%, Figure 2D; Table 1) suggests that TIAR-2 may play a minor role during the formation of gonad core granule. Only 63% of *tiar-1(tm361);tiar-3(ok144)* mutant animals were unable to form gonad core granules under starvation (Figure 2G, H; Table 1). This is a 11.6% of decrease in animals that did not form gonad core granules relative to *tiar-1(tm361)* single mutants suggests that TIAR-3 might play a role as an antagonist of gonad core granule formation. Indeed, it is worth noting that in the absence of TIAR-3, 7.1% of the animals formed gonad core granules in control conditions (Table 1). Unexpectedly, 82.9% of the starved *tiar-1(tm361);tiar-2(tm2923);tiar-3(ok144)* triple-mutant animals formed gonad core granules (Figure 2I, J; Table 1). This result suggests that in the absence of the *C. elegans* TIA-1/TIAR family of proteins, an unknown pathway induces gonad core granule formation under starvation conditions.

TIAR-1 is required to form puromycin-induced gonad core granules

As noted above, puromycin induces the formation of gonad core granules under normal growth conditions (Figure 3E, F). We tested whether TIAR-1 is required to form gonad core granules when animals are exposed to puromycin. To expose mutant animals to puromycin and starvation, we transferred one-day-old *tiar-1(tm361)* hermaphrodites to S-medium [24] with or without food and incubated for 4 h with or without 10 mM of the reagent. In these conditions, 48.5% of untreated *tiar-1(tm361)* animals showed a discrete formation of gonad core granules during starvation conditions (Figure 5A, B). Among the animals exposed to puromycin and bacteria, 82.4% of *tiar-1(tm361)* gonads developed discrete gonad core granules (Figure 5C). Puromycin-induced gonad core granule formation in *tiar-1(tm361)* animals was not as efficient as in wild-type animals, and the gonad core granule accumulation appeared fewer and smaller than those observed in wild-type animals under similar conditions (compare Figure 3E with 5C). Upon starvation, 76.7% of gonads from puromycin-treated *tiar-1(tm361)* animals showed a slightly greater accumulation of gonad core granules (Figure 5D), although this accumulation still looked less abundant than those formed in wild-type animals (compare Figure 3F with 5D). These data suggest that TIAR-1 is required to form puromycin-induced gonad core granules under both normal and starvation conditions.

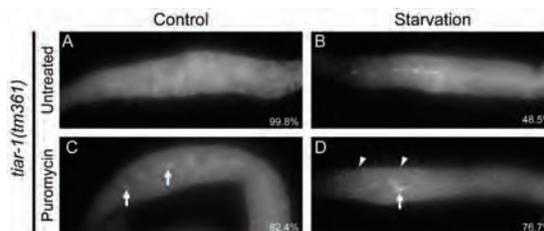


Figure 5. TIAR-1 is required for puromycin-induced gonad core granule formation. (A-D) One-day-old *tiar-1(tm361)* animals were exposed to control or starvation conditions (described in the Materials and Methods) in the presence puromycin (10 mM). After each treatment, the extruded gonads were fixed, immunostained with an affinity-purified CGH-1 antibody and observed under fluorescence microscopy. The distal gonad arm is on the left in each picture. The percentages of gonads showing similar phenotypes are shown in each panel. The arrows point to gonad core granules, and the arrowheads point to large P granules. d= distal and p= proximal.

HSP-1 antagonizes TIAR-1 during gonad core granule formation

Gilks *et al.* [6] partitioned the TIA-1 mammalian protein and observed that the prion-like domain of this protein can induce stress granule formation in cells, but this effect can be prevented by the overexpression of HSP70. To test the role of HSP70 in gonad core granule formation in *C. elegans*, we used RNAi to silence one of its *C. elegans* homologs (*hsp-1*). First, we evaluated *hsp-1* silencing efficiency by semi-quantitative RT-PCR and found that its expression was diminished 61% and 73% in wild-type and *tiar-1(tm361)* backgrounds, respectively (Figure S3). Silencing of *hsp-1* in a wild-type background resulted in the formation of discrete gonad core granules in 62.2% on control conditions (Figure 6A, C). All *hsp-1(RNAi)* animals were able to form gonad core granules under starvation, but these granules were bigger and more abundant than those formed in *EP(RNAi)* control animals (Figure 6B, D). In addition, we observed that P granules increased slightly in size and that other cytoplasmic

granules appeared in oocytes during starvation and silencing of *hsp-1* (Figure 6D, I). These data suggest that HSP-1 antagonizes the formation of gonad core granules in control and starved animals.

Next, we analyzed whether TIAR-1 is required to form gonad core granules when *hsp-1* is silenced (Figure 6E-H). A 22.6% reduction in gonad core granule formation was observed when *hsp-1* was silenced in the absence of *tiar-1* in control conditions, while in the gonads that formed granules these were reduced in size (Figure 6 compare C with G). TIAR-1 was also important for gonad core granule formation under starvation conditions when *hsp-1* was silenced (Figure 6 compare D with H). These data suggest that TIAR-1 is required to form gonad core granules due to silencing of *hsp-1*. However, TIAR-1 was not required during starvation to induce large P granules or oocytes granules in absence of HSP-1 (Figure 6H, J). Overall, the above results indicate that HSP-1 antagonizes TIAR-1 only during gonad core granule formation under starvation conditions.

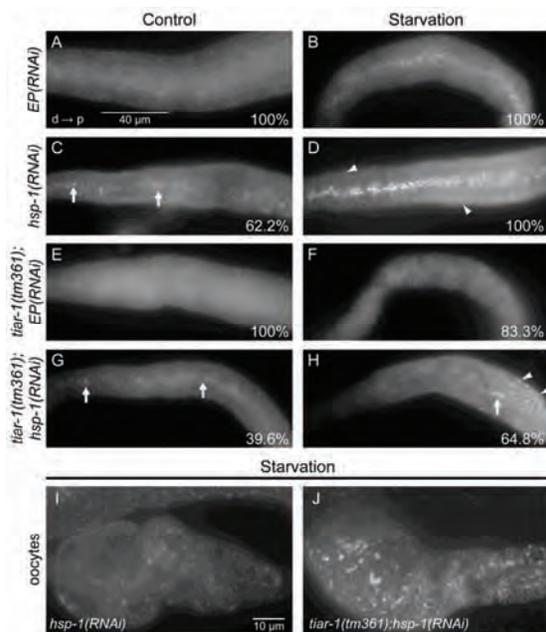


Figure 6. *hsp-1* silencing induces gonad core granule formation through TIAR-1. *hsp-1* was silenced by RNAi in wild-type and *tiar-1(tm361)* animals. One-day-old animals from each strain were exposed to control or starvation conditions as described in the Materials and Methods. Their gonads were then extruded, fixed and immunostained with an affinity-purified CGH-1 antibody. The distal gonad arm is shown in A-H, and oocytes are shown in I-J. The percentage of animals with each phenotype is noted in each panel. The arrows point to gonad core granules, and the arrowheads point to large P granules. EP= empty plasmid. d= distal, p= proximal.

TIAR-1 also plays an important role in gonad core granule formation under heat shock, but not in UV conditions

To evaluate the role of TIAR-1 under other types of stress, we exposed one-day-old wild-type and *tiar-1(tm361)* animals to 3 h of heat shock at 31°C or 0.1 Joules of UV light. Heat shock induced the formation of gonad core granules in wild-type animals (Figure 7A, B; Table 1). We found that *tiar-1(tm361)* animals did not form gonad core granules after heat shock (94.6%), suggesting that TIAR-1 is required for their formation (Figure 7D, E; Table 1). In addition, in wild-type animals the heat shock induced the formation of large P granules and oocytes granules (Figures 1C, 8A, B). Previous studies have also observed the formation of oocytes granules after heat shock [10]. We found that large P granules and oocytes granules were still observed in the absence of TIAR-1 (Figures 7E, 8C, D), indicating that, contrary to gonad core granules, these other foci do not require TIAR-1 for their formation.

Single and double TIAR-2 and TIAR-3 mutant animals formed gonad core, oocyte and large P granules under heat-shock conditions (Table 2). Contrary to gonad core granule formation under starvation, double- and triple-mutant animals containing the *tiar-1(tm361)* allele did not form gonad core granules under heat shock, although they were still able to form large P and oocytes granules (Table 1; Figures 7H, K, N, 8E, F). These data demonstrate that TIAR-1 is required to induce gonad core granules after heat shock, while a TIAR-1-independent pathway must be required to induce large P and oocytes granules under this type of stress.

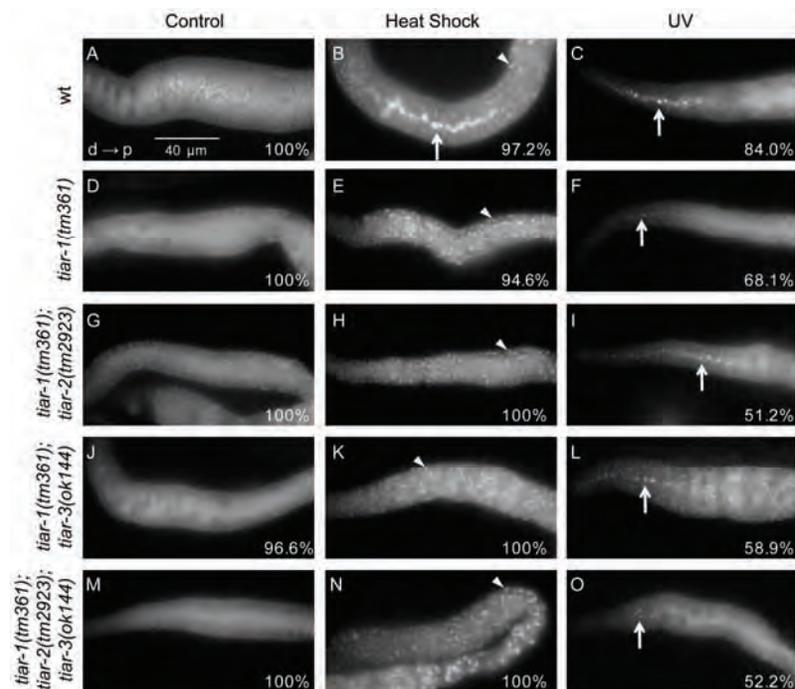


Figure 7. TIAR-1 is required to form gonad core granules under heat shock, but not in UV conditions. (A-O) One-day-old animals of the indicated backgrounds were exposed to control or different stress conditions (see Materials and Methods). After the animals were exposed to stress, their gonads were extruded, fixed and immunostained with an affinity-purified CGH-1 antibody. The distal arm of the gonad is shown to the left in each frame. The percentage of animals with the depicted phenotype is shown in each picture. The arrow in B point to gonad core granules, the arrows in C, F, I, L and O point to distal gonad core granules, and the arrowheads point to large P granules. d= distal and p= proximal.

To determine whether the large P and oocytes granules that appeared in gonads after heat shock were P granules, we performed a heat-shock time-course experiment using PGL-1 as a P granule marker [25]. We detected PGL-1 in P granules in the distal gonad during the first 30 min of heat shock; however, PGL-1 levels then gradually decreased and were significantly reduced after 3 h of treatment (Figure S4A-E, solid white lines). Similar to Jud *et al.* [10], we did not observe PGL-1 in oocytes granules during any time of heat shock (Figure S4F-J, dotted white lines). In contrast, over the course of the heat shock, CGH-1 gradually accumulated in P and oocytes granules in the distal and proximal gonad (Figure S4 K-T).

A few granules were observed in 84% of animals subjected to UV treatment, but these were scattered and were located at a more distal position in the gonad (Figure 7C; Table 1). The foci that we termed gonad core granules were absent in this condition. Distal gonad core granules were still observed in 68.1% of *tiar-1(tm361)* animals (Figure 7F; Table 1), suggesting that if TIAR-1 plays a role in their formation, it is minor. No significant differences were observed in *tiar-2(tm2923)* and *tiar-3(ok144)* single mutants (Table 1). A slight decrease in

UV-induced granule formation was observed in double and triple mutants of the TIA-1/TIAR family (Figure 7I, L, O; Table 1). The above results suggest two important points. First, the UV radiation induces granule formation in a different part of the gonad (distal) to that observed during starvation (central core) and heat shock (central core and oocytes). Second, the *C. elegans* TIA-1/TIAR family of proteins is less important for UV-induced distal gonad core granule formation and that an unknown pathway must be involved.

Mammalian TIA-1/TIAR proteins are frequently used as markers of stress granules [23]. We therefore evaluated whether TIAR-1 was localized in gonad core granules under different stress conditions. Unexpectedly, immunostaining with the TIAR-1 antibody revealed diffuse cytoplasmic localization under all tested conditions (Figure S5A-H) except for heat shock, where faint staining was detected in gonad core granules (Figure S5G). Similar to the antibody staining results, the P_{pie-1} GFP::TIAR-1 and $P_{Ltiar-1}$ TIAR-1::GFP constructs were not clearly associated with gonad core granules (Figure S5I-P) except under heat shock conditions, where both transgenes were associated with large P and oocytes granules (Figure S5K, O). Curiously, during heat shock

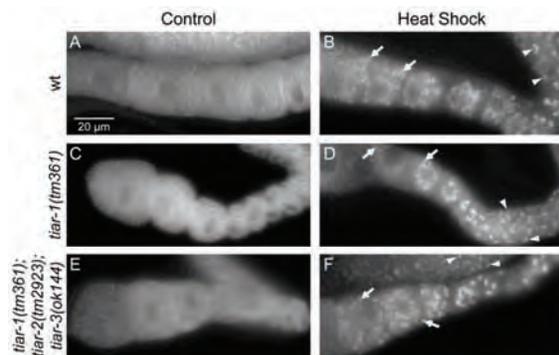


Figure 8. TIAR-1 is not required to induce large P or oocytes granules under heat shock. (A-F) One-day-old animals of the indicated backgrounds were exposed to control or heat shock conditions as described in the Materials and Methods. Their gonads were then extruded, fixed and immunostained using an affinity-purified CGH-1 antibody. Oocytes in the proximal gonad are shown in each picture. The arrows point to oocytes granules, and the arrowheads point to large P granules.

TIAR-1 associates with large P and oocytes granules, where this protein is not required for their formation.

DISCUSSION

TIAR-1 is the closest TIA-1/TIAR homolog in *C. elegans*

We recently reported that the TIAR-1 protein displays a structural identity (46.1% and 43.3%, respectively) with the human TIA-1 and TIAR homologs higher than TIAR-2 (40% and 40% respectively) and TIAR-3 (31% and 33% respectively) [19]. TIAR-1 and TIAR-2 contain a prion-like domain and three RNA recognition motifs (RRM) similar to mammalian TIA-1/TIAR (Figure 9A) [19]. In contrast, TIAR-3 does not contain a prion-like domain and possesses only two RRM domains (Figure 9A) [19]. TIA-1 knockdown mammalian cells are deficient in their ability to assemble stress granules, whereas TIAR knockdown cells form large stress granules, suggesting that TIAR might antagonize stress granule formation [6].

We found that like the mammalian counterpart, TIAR-1 is the main protein required for gonad core granule formation in *C. elegans*. In addition, appears that TIAR-2 contributes partially to this process because the percent of animals that did not form gonad core granules under starvation was the highest in *tiar-1(tm361);tiar-2(tm2923)* double-mutant animals (Figure 2F). Similar to mammalian TIAR, TIAR-3 might play an antagonistic role in this process because the percent of animals that did not form gonad core granules under starvation decreased

in *tiar-1(tm361);tiar-3(ok144)* double-mutant animals (Figure 2H). Indeed, a small percent of *tiar-3(ok144)* animals formed gonad core granules under control conditions (Table 1). Furthermore, mammalian TIA-1 and TIAR are involved in apoptosis response [26-30], and we found that TIAR-1 is required to induce stress-induced germ cell apoptosis, but TIAR-2 and TIAR-3 are not [19]. We therefore propose that the *C. elegans* TIAR-1 protein is functionally the closest TIA-1/TIAR homolog.

Starvation-induced gonad core granules are similar to mammalian stress granules

Previously, different groups have described that the stress can induce granule formation in the *C. elegans* gonad (Figure 1B) [9-11] and named them as grP bodies and dcP bodies based on the composition of their components [11]. However, because these granules share components with other structures, it is unclear their nature. For example, during stress and sperm deprivation, proteins such DCP-2, CAR-1, CGH-1, PAB-1 and TIAR-2 associate with P granules and also with grP bodies in oocytes, and some of them (CGH-1 and CAR-1) in the gonad core (Figure 1B) [10,11].

Here, we show that gonad core granules formed under starvation conditions are similar to stress granules because their formation is sensitive to cycloheximide treatment (Figure 3D), they can be induced by puromycin treatment (Figure 3E), and they require TIAR-1 for assembly (Figure 2D). In contrast, *tiar-1* ablation did not affect P granules or CGH-1-positive cytoplasmic granules previously described as storage bodies or P body-like (Figures 2C, 8C) [9-11,18]. Thus, we propose that although the granules formed in the *C. elegans* gonad share many components with others granules, their nature depends on the gonad region where are formed (see discussion below) and we renamed as gonad core granules, distal gonad core granules and oocytes granules (Figure 1C).

The silencing of *hsp-1* induces gonad core granule formation under normal conditions indicating that its protein partially antagonizes this process (Figure 6A-D). We also observed that the gonad core granules formed in the absence of HSP-1 depend on TIAR-1 (Figure 6E-H). Accordingly, the overexpression of exogenous HSP70 reversed the aggregation of the PRD (prion-related domain) of TIA-1 in mammalian cells [6]. Our results suggest a genetic interaction between HSP-1 and TIAR-1 supporting the idea that like in mammals, TIA-1-mediated stress granule formation is regulated by HSP70 [6].

Model for the participation of the three *C. elegans* TIA-1/TIAR homologs in the formation of gonad core granules under starvation

We determined that TIAR-1 is the most important protein for gonad core granule formation upon starvation (Figures 1C, 2; Table 1). TIAR-2 works together with TIAR-1 in this process, but TIAR-3 has an antagonistic role (Figure 2; Table 1). We propose a model where due to the TIAR-1/2/3 high homology (Figure 9A) [19], it is possible that these RNA binding proteins may be competing for the same substrates, i.e. mRNAs. Thus, under normal conditions, TIAR-1 and TIAR-2 may bind to the same targets, but the putative interaction of TIAR-1 with HSP-1 (Figure 6), among other factors, may prevent them from forming gonad core granules. In contrast, we suggest that TIAR-3 may bind to mRNAs under normal conditions. However, because this protein has no prion-like domain, it is unable to induce gonad core granule formation (Figure 9B), and this explains its antagonist role (Figure 2; Table 1). When animals are exposed to starvation conditions, HSP-1 may liberate TIAR-1 (Figure 6), and together with TIAR-2 (Figure 2), may displace TIAR-3 and/or bind to others mRNAs to induce gonad core granule formation (Figure 9B). Despite the essential role of TIAR-1 in gonad core granule formation, we show that in the absence of the TIA-1/TIAR family, an unknown pathway is able to induce gonad core granules formation under starvation, indicating that other pathways participate in this process.

The RNA granules formed in the *C. elegans* germline depend on stressful condition and appear to be different in each gonad region

Although several types of stress can induce the formation of different granules in the *C. elegans* gonad (Figures 1, 2, 7; Table 1) [9-11], we believe that the composition, location and ultimately the function of the granules depend on the type of stress involved. For instance, in wild-type animals, heat shock induces the formation of gonad core, large P and oocytes granules (Figures 1C, 7B, 8B). Remarkably, TIAR-1 is uniquely required for gonad core granule formation under this type of stress (Figures 1C, 7E, H, K, N; Table 1). Thus, we suggest that there are three different types of granules formed during heat shock: gonad core granules, large P granules and oocytes granules. The following evidence supports this idea: 1) only gonad core granule formation depends on TIAR-1 (Figures 1C, 7E, H, K, N; Table 1); 2) TIAR-1, TIAR-2 and TIAR-3 are not required for the formation of large P and oocytes granules (Figures 7E, H, K, N, 8C-F); and 3) large P granules differ from oocytes granules because PGL-1, a P granule component, is clearly present in large P granules during the initiation of

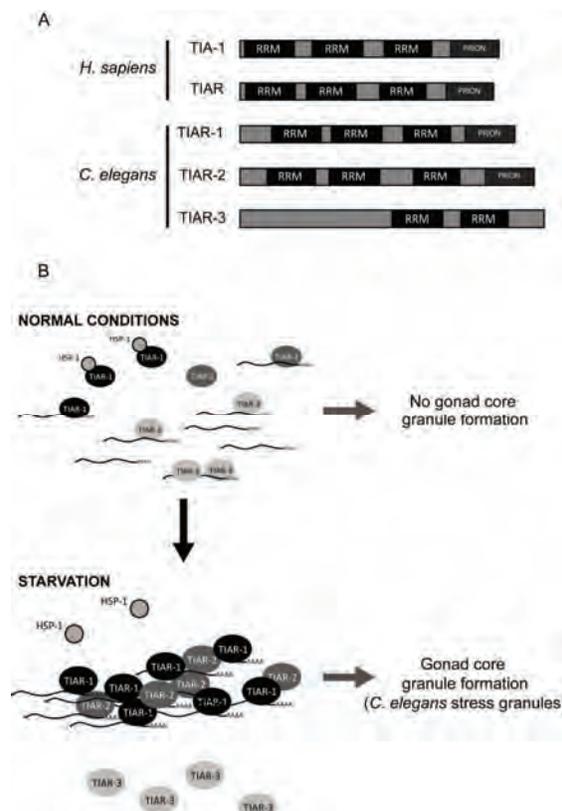


Figure 9. Model of the *C. elegans* TIA-1/TIAR proteins during starvation-induced core granule formation. (A) Schematic representation of the domains of *H. sapiens* and *C. elegans* TIA1/TIAR proteins. (B) Model of the participation of TIAR-1, TIAR-2 and TIAR-3 in the formation of gonad core granules under starvation conditions (see details in the text).

heat shock, but it has never been observed in oocytes granules, where CGH-1 is abundant (Figure S4A-T) [10].

A hypothesis to explain the formation of several types of granules under stress conditions is that the cytoplasmic state is distinct in each region of the *C. elegans* gonad. For example, high transcriptional levels are present from the distal to the diplotene region, whereas the proximal oocytes in diakinesis are transcriptionally inactive [31]. Thus, the components (i.e. mRNAs and proteins) present in the cytoplasm are different in each gonad region. Therefore, the composition and likely the purpose of granule formation under stressful conditions depend on the local mRNAs, proteins and cell state.

Germline *C. elegans* mRNAs are often exported from the nucleus to the cytoplasm through P granules [32-34]. This traffic through P granules likely involves the labeling of mRNAs by RNA P granule proteins to determine their final destination: translational timing or storage as maternal mRNA [34]. Thus, during heat shock, we

suggest that the increase of P granules (large P granules) is because more proteins are positioned on nascent mRNAs for their protection. Indeed, the P granule protein CGH-1 is important for maternal mRNA protection in normal growth conditions [9], and we observed a gradually accumulation of CGH-1 in large P granules according to the heat shock increased (Figure S4 K-O). In addition, mRNA accumulation around nuclear-associated P granules after heat shock has been demonstrated [10,34]. We suggest that gonad core granules, large P granules and oocytes granules formed under stress conditions might be targeting different mRNAs for protection depending on their localization and function (Figure 1C).

Despite the key role of TIAR-1 in granule formation under starvation, heat shock, puromycin treatment and *hsp-1* ablation in *C. elegans* (Figures 2, 5, 6, 7), TIAR-1 protein was not clearly detected in gonad core granules (Figure S5). Only during heat shock could we detect TIAR-1 in large P granules and oocytes granules, which ironically do not require this protein for their formation (Figure S4K, O). We do not know why TIAR-1 is not clearly associated with gonad core granules under stress conditions or if our antibody and constructs were not able to detect it there. One explanation is that TIAR-1 rapidly shuttles between gonad core granules and the cytoplasm or is specifically required for the initiation of granule formation before they can be observed. Nevertheless, this finding reflects a very important difference between TIAR-1 and its mammalian counterparts TIA-1/TIAR, which are used as markers of stress granules [23].

MATERIALS AND METHODS

Strains

The maintenance and genetic manipulation of *C. elegans* strains derived from the wild-type Bristol strain N2 were cultured as previously described [35] at 20°C. The following strains have been described previously: *him-8(e1489)* [22], *tiar-1(tm361)*, *tiar-2(tm2923)*, *tiar-3(ok144)*, *unc-119(ed3);xmis1[pCG.01;tiar-1p::GFP::tiar-1::tiar-1 3'UTR + unc-119(+)]*, *unc-119(ed3);xmis2[pCG.02;pie-1p::GFP::tiar-1::tiar-1 3'UTR + unc-119(+)]*, *unc-119(ed3);xmis3[pCG.03;tiar-1p::tiar-1::GFP::tiar-1 3'UTR + unc-119(+)]*, *tiar-1(tm361);xmis1[pCG.01;tiar-1::GFP::tiar-1::tiar-1 3'UTR + unc-119(+)](unc-119(ed3)-???)*, *tiar-1(tm361);xmis2[pCG.02;pie-1p::GFP::tiar-1::tiar-1 3'UTR + unc-119(+)](unc-119(ed3)-???)* and *tiar-1(tm361);xmis3[pCG.03;tiar-1p::tiar-1::GFP::tiar-1 3'UTR + unc-119(+)](unc-119(ed3)-???)* [19].

RNAi-mediated silencing

RNAi constructs for the *hsp-1* gene was obtained from the *C. elegans* RNAi v1.1 feeding library (Open Biosystems). The empty vector L4440 was used as control. RNAi was performed by feeding as previously described [36]. Briefly, a single colony carrying *hsp-1* was picked from the plate and grown in LB medium containing 50 µg/ml ampicillin and 12.5 µg/ml tetracycline at 37°C overnight. A 200 µl and 500 µl aliquots of each bacterial culture were pipette onto small and medium plates, respectively. These RNAi plates containing 50 µg/ml ampicillin, 12.5 µg/ml tetracycline and 1mM IPTG. The plates were allowed to dry and incubated at room temperature for 18 h. L1 animals were transferred to seeded RNAi plates to reach the L4 stage. L4 animals were moved to a new seeded RNAi plate to synchronize the population.

Immunostaining, live imaging, and microscopy

For TIAR-1, CGH-1 and PGL-1 immunolocalization in gonads, samples were processed as previously described [37]. Briefly, extruded gonads from one-day-old gravid adults grown at 20°C were frozen in liquid nitrogen, freeze-cracked, fixed in methanol at -20°C for 1 min following with 1X PBS, 3.7% paraformaldehyde, 80 mM HEPES, 1.6 mM MgSO₄ and 0.8 mM EGTA for 30 min at room temperature. The affinity-purified rabbit anti-TIAR-1 antibody was applied at a 1:100 dilution [19], whereas the CGH-1, PGL-1 and RME-2 antibodies were diluted as in previous studies [17,38]. Cy3-conjugated goat anti-rat (Jackson ImmunoResearch Laboratories) and Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rabbit secondary antibodies (Molecular Probes) were used at a concentration of 1:100, and 4',6-diamidino-2-phenylindole DAPI was used at a concentration of 1 ng µl⁻¹.

Transgenic fluorescent animals were anesthetized with 40 mM NaN₃, mounted on agar pads and observed under fluorescence microscopy. Images from immunostained samples and *P_{S_{tiar-1}}*gfp::tiar-1, *P_{pie-1}*gfp::tiar-1 and *P_{L_{tiar-1}}*gfp::tiar-1::gfp transgenic animals were obtained by MRGrab 1.0.0.4 program on a Nikon Eclipse E600 microscope equipped with an AxioCam MRc digital camera (Zeiss). All images were processed to improve their contrast and brightness in the ImageJ 1.47g program.

Stress conditions

For control and starvation conditions, one-day-old animals were transferred to NGM plates with or without bacterial, respectively and incubated for 6 h. For heat shock, the animals were placed on NGM plates and incubated at 31°C in a water bath for 3 h. To induce DNA damage, animals were exposed to 0.1 Joules of UV light (Stratalinker, model 1800) and then allowed to recover for

3.5 h. After every treatment, animals of the appropriate strain were dissected, fixed and stained to visualize granules under fluorescence microscopy.

To test granule formation by starvation in the presence of cycloheximide or puromycin, one-day-old animals were transferred to S-medium [24] with or without food and incubated for 4 h with or without 10 mM cycloheximide or 10 mM puromycin.

RT-PCR

Synchronized animals grown under the described conditions were collected in M9 medium and lysed in TRIzol buffer (Invitrogen). RNA was extracted from each sample using standard phenol-chloroform-based procedures. cDNA synthesis was performed using the standard reverse transcription protocol from Promega. To analyze mRNA levels, RT-PCR was performed using specific primers for *hsp-1*: 5'-CATGGTCAACGAAGCTGAGA-3' and 5'-TTCCAAATCCTTCTGTTGGTG-3'. Gamma-tubulin gene (*tbg-1*) was used as loading control with the following primers: 5'-CCTGTTGTCGATCCAAATGA-3' and 5'-AACCCGAGAAGCAGTTGAAA-3'. The sizes of amplified fragments were 280 bp for *hsp-1* and 100 bp for *tbg-1*.

ACKNOWLEDGMENTS

The *tm361* and *tm2923* strains were obtained from Japan's National Bioresource Project for the Experimental Animal "Nematode *C. elegans*." All other strains used in this work were provided by the *Caenorhabditis* Genetics Center, which is supported by the NIH National Center for Genetics Resources. We are grateful to Laura Ivon Láscares-Lagunas and Daniel Paz-Gómez for the support in the experiments. Also, we thank L. Silvia Salinas for technical assistance. We would also like to thank Dr. Susan Strome (PGL-1 antibody) for kindly providing reagents. CGSG received a Ph.D. fellowship from CONACYT-México. This work represents partial fulfillment of the requirements for CGSG's Ph.D. degree in Biomedical Science from the Universidad Nacional Autónoma de México. This work was supported by grants from PAPIIT-UNAM (IN225509 and IN207412) and CONACYT-MEXICO (50896-Q and 103856-Q).

REFERENCES

- Anderson P, Kedersha N (2006) RNA granules. *The Journal of Cell Biology* 172: 803-808.
- Chan EKL, Fritzler MJ, editors (2013) Ten Years of Progress in GW/P Body Research. New York: Springer. 276 p.
- Kedersha N, Ivanov P, Anderson P (2013) Stress granules and cell signaling: more than just a passing phase? *Trends Biochem Sci*: 1-13.
- Parker R, Sheth U (2007) P Bodies and the Control of mRNA Translation and Degradation. *Molecular Cell* 25: 635-646.
- Kedersha N, Gupta M, Li W, Miller I, Anderson P (1999) RNA-binding Proteins TIA-1 and TIAR Link the Phosphorylation of eIF-2 α to the Assembly of Mammalian Stress Granules. *The Journal of Cell Biology* 147: 1431-1441.
- Gilks N, Kedersha N, Ayodele M, Shen L, Stoecklin G, et al. (2004) Stress Granule Assembly Is Mediated by Prion-like Aggregation of TIA-1. *Molecular Biology of the Cell* 15: 5383-5398.
- Von Stetina JR, Orr-Weaver TL (2011) Developmental Control of Oocyte Maturation and Egg Activation in Metazoan Models. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3: a005553-a005553.
- Schedl T, editor (2013) *Germ Cell Development in C. elegans*. New York: Springer. 433 p.
- Boag PR, Atalay A, Robida S, Reinke V, Blackwell TK (2008) Protection of specific maternal messenger RNAs by the P body protein CGH-1 (Dhh1/RCK) during *Caenorhabditis elegans* oogenesis. *The Journal of Cell Biology* 182: 543-557.
- Jud MC, Czerwinski MJ, Wood MP, Young RA, Gallo CM, et al. (2008) Large P body-like RNPs form in *C. elegans* oocytes in response to arrested ovulation, heat shock, osmotic stress, and anoxia and are regulated by the major sperm protein pathway. *Developmental Biology* 318: 38-51.
- Noble SL, Allen BL, Goh LK, Nordick K, Evans TC (2008) Maternal mRNAs are regulated by diverse P body-related mRNP granules during early *Caenorhabditis elegans* development. *The Journal of Cell Biology* 182: 559-572.
- Buckingham M, Liu J-L (2011) U bodies respond to nutrient stress in *Drosophila*. *Experimental Cell Research* 317: 2835-2844.
- Shimada Y, Burn KM, Niwa R, Cooley L (2011) Reversible response of protein localization and microtubule organization to nutrient stress during *Drosophila* early oogenesis. *Developmental Biology* 355: 250-262.
- Schisa J (2012) New Insights into the Regulation of RNP Granule Assembly in Oocytes. 295: 233-289.
- Updike D, Strome S (2010) P granule assembly and function in *Caenorhabditis elegans* germ cells. *J Androl* 31: 53-60.
- Voronina E, Seydoux G, Sassone-Corsi P, Nagamori I (2011) RNA Granules in Germ Cells. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3: a002774-a002774.
- 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.
18. Rajyaguru P, Parker R (2008) CGH-1 and the control of maternal mRNAs. *Trends in Cell Biology* 19: 24-28.
 19. Silva-García CG, Navarro RE (2013) The *C. elegans* TIA-1/TIAR homolog TIAR-1 is required to induce germ cell apoptosis. *genesis*.
 20. Anderson P, Kedersha N (2007) Stress granules: the Tao of RNA triage. *Trends in Biochemical Sciences* 33: 141-150.
 21. Salinas LS, Maldonado E, Navarro RE (2006) Stress-induced germ cell apoptosis by a p53 independent pathway in *Caenorhabditis elegans*. *Cell Death and Differentiation* 13: 2129-2139.
 22. Riddle DL, Blumenthal T, Meyer BJ, Priess JR, editors (1997) *C. elegans* II. 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
 23. Kedersha N, Anderson P (2007) Mammalian Stress Granules and Processing Bodies. *Methods in Enzymology*. pp. 61-81.
 24. Hope IA, editor (1999) *C. elegans*. New York: Oxford University Press. 281 p.
 25. Kawasaki I, Shim Y-H, Kirchner J, Kaminker J, Wood B, William, et al. (1998) PGL-1, a Predicted RNA-Binding Component of Germ Granules, Is Essential for Fertility in *C. elegans*. *Cell* 94: 635-645.
 26. Tian Q, Streuli M, Saito H, Schlossman SF, Anderson P (1991) A Polyadenylate Binding Protein Localized to the Granules of Cytolytic Lymphocytes Induces DNA Fragmentation in Target Cells. *Cell* 67: 629-639.
 27. Kawakami A, Tian Q, Duan X, Streuli M, Schlossman SF, et al. (1992) Identification and functional characterization of a TIA-1-related nucleolysin. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 8681-8685.
 28. Tian Q, Taupin JL, S. E, Kobertson M, Anderson P (1995) Fas-activated Serine/Threonine Kinase (FAST) Phosphorylates TIA-1 during Fas-mediated Apoptosis. *J Exp Med* 182: 864-874.
 29. Li W, Simarro M, Kedersha N, Anderson P (2004) FAST Is a Survival Protein That Senses Mitochondrial Stress and Modulates TIA-1-Regulated Changes in Protein Expression. *Molecular and Cellular Biology* 24: 10718-10732.
 30. Izquierdo JM, Majós N, Bonnal S, Martínez C, Castelo R, et al. (2005) Regulation of Fas Alternative Splicing by Antagonistic Effects of TIA-1 and PTB on Exon Definition. *Molecular Cell* 19: 475-484.
 31. Walker AK, Boag PR, Blackwell TK (2007) Transcription reactivation steps stimulated by oocyte maturation in *C. elegans*. *Developmental Biology* 304: 382-393.
 32. Schisa JA, Pitt JN, Priess JR (2001) Analysis of RNA associated with P granules in germ cells of *C. elegans* adults. *Development* 128: 1287-1298.
 33. Voronina E, Seydoux G (2010) The *C. elegans* homolog of nucleoporin Nup98 is required for the integrity and function of germline P granules. *Development* 137: 1441-1450.
 34. Sheth U, Pitt J, Dennis S, Priess JR (2010) Perinuclear P granules are the principal sites of mRNA export in adult *C. elegans* germ cells. *Development* 137: 1305-1314.
 35. Brenner S (1974) The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77: 71-94.
 36. 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.
 37. Salinas LS, Maldonado E, Macías-Silva M, Blackwell TK, Navarro RE (2007) The DEAD box RNA helicase VBH-1 is required for germ cell function in *C. elegans*. *genesis* 45: 533-546.
 38. Grant B, Hirsh D (1999) Receptor-mediated Endocytosis in the *Caenorhabditis elegans* Oocyte. *Molecular and Cellular Biology* 10: 4311-4326.

SUPPLEMENTARY INFORMATION

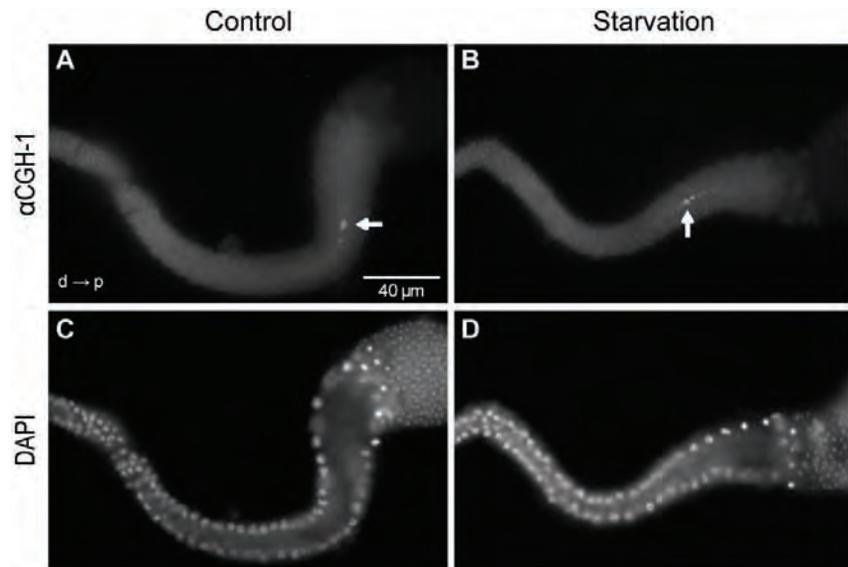


Fig. S1. Male animals did not form gonad core granules under starvation conditions. One-day-old *him-8(e1489)* male animals were exposed to starvation conditions as described in the Materials and Methods. After each treatment, extruded gonads were fixed, immunostained with an affinity-purified CGH-1 antibody and observed under fluorescence microscopy. d= distal and p= proximal.

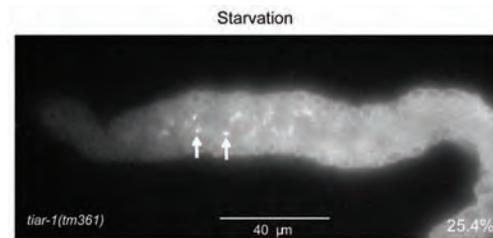


Fig. S2. The gonad core granules formed in *tiar-1(tm361)* starved animals are small and scattered. One-day-old *tiar-1(tm361)* animals were exposed to starvation conditions as described in the Materials and Methods. After each treatment, extruded gonads were fixed, immunostained with an affinity-purified CGH-1 antibody and observed under fluorescence microscopy. The distal gonad arm is on the left.

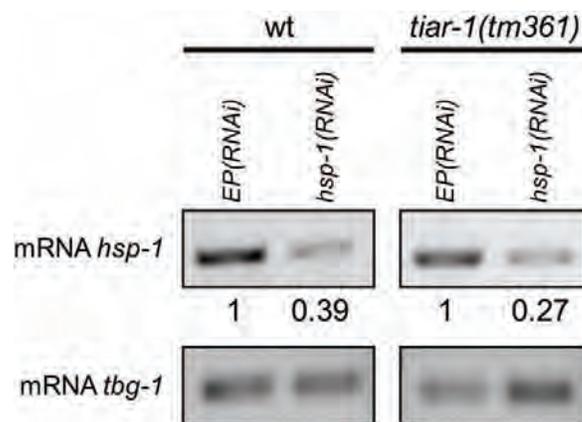


Figure S3. Semi-quantitative RT-PCR to evaluate *hsp-1* silencing efficiency. Wild-type and *tiar-1(tm361)* animals growing in *EP(RNAi)* and *hsp-1(RNAi)* conditions were collected. The empty plasmid (*EP*) was used as a control. cDNA synthesis was performed using the standard reverse transcription protocol. The numbers between the panels indicate the expression levels.

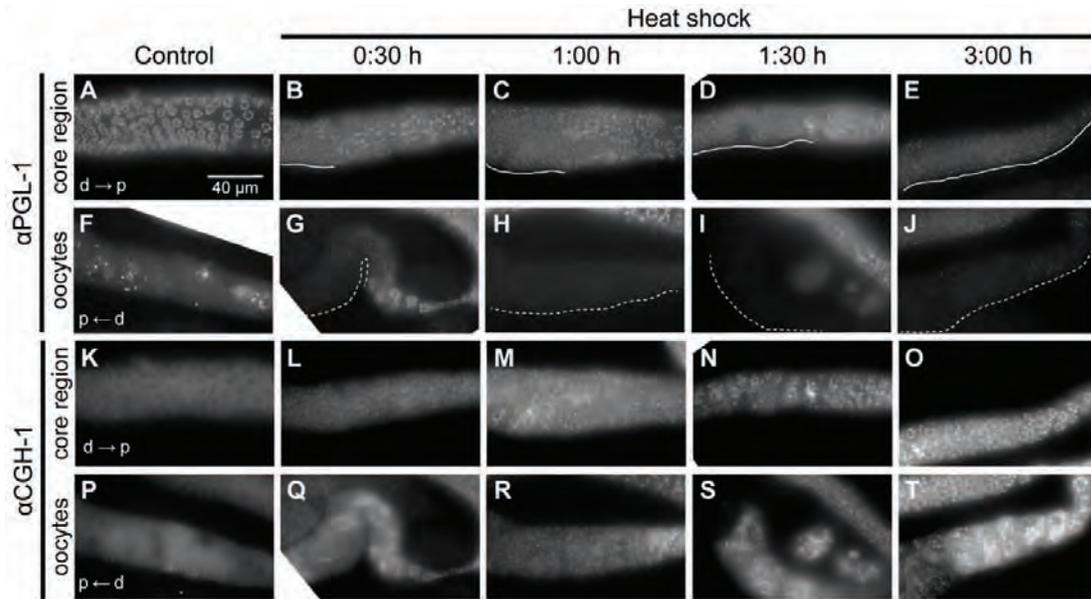


Fig. S4. PGL-1 is not present in large P and oocytes granules during heat shock. (A-T) One-day-old wt animals were exposed to 31°C for 30 min, 1 h, 1.5 h and 3 h. Their gonads were then extruded, fixed and immunostained with PGL-1 (A-J) and CGH-1 (K-T) antibodies. (A-E and K-O) Gonad core region. (F-J and P-T) Oocytes region. d= distal and p= proximal.

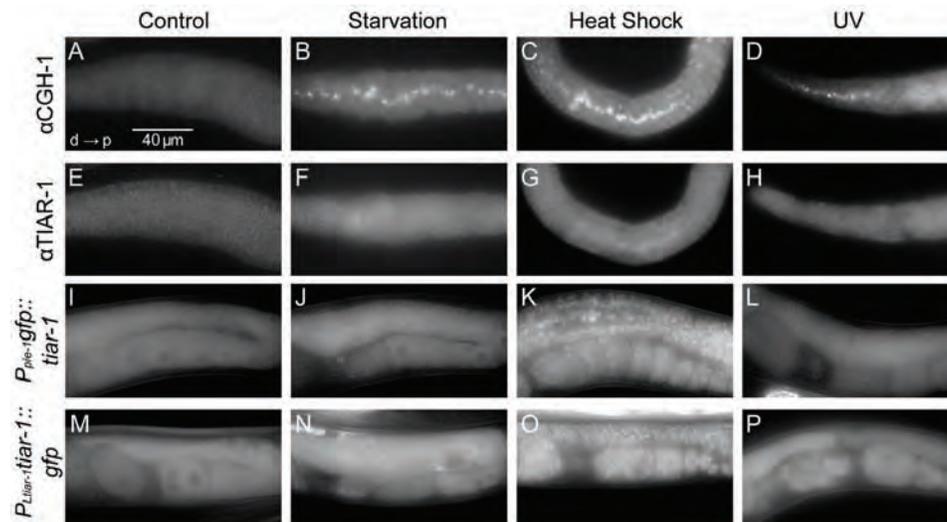


Fig. S5. TIAR-1 weakly associates with granules during stress. One-day-old animals of the indicated backgrounds were exposed to stress conditions as described in the Materials and Methods. The gonads were then extruded, fixed and immunostained with the affinity-purified CGH-1 antibody (A-D) and the affinity-purified TIAR-1 antibody (E-H). (I-T) After stress exposure, transgenic animals were mounted for fluorescence microscopy. d= distal and p= proximal.

CAPÍTULO 6: ALGUNOS **ASPECTOS** DE LA PARTICIPACIÓN DE **TIAR-1** DURANTE EL **ESTRÉS**

5.6.1 LA EXPOSICIÓN A CICLOHEXIMIDA O PUROMICINA AFECTA LOS NIVELES DE APOPTOSIS FISIOLÓGICA Y POR AYUNO

Los gránulos de estrés en mamíferos se forman mediante el reclutamiento del complejo de inicio de la traducción 48S como consecuencia de un arresto al inicio de la traducción (Figura 3) [142]. La cicloheximida es un compuesto que bloquea la elongación traduccional haciendo estables a los polisomas, lo cual inhibe la formación de gránulos de estrés y eventualmente reduce el número de cuerpos de procesamiento (Figura 3) [143]. La puromicina, en contraste, ocasiona una terminación prematura de la cadena de

aminoácidos y el consecuente desensamble de los polisomas, lo cual induce la formación de gránulos de estrés (Figura 3) [143]. Reportamos que la cicloheximida inhibe la formación de gránulos en el centro de la gónada debido al ayuno [68]. También encontramos que la presencia de puromicina induce la formación de estos gránulos en el centro de la gónada en condiciones normales [68].

Decidimos estudiar si la cicloheximida y la puromicina tienen un efecto sobre la apoptosis fisiológica y sobre la apoptosis inducida por ayuno. Para esto, los animales *ced-1::gfp* fueron expuestos a condiciones control o de ayuno en presencia de cicloheximida (10 mM) o puromicina (10 mM). Después de cada tratamiento, los animales se montaron y observaron bajo microscopía de fluorescencia para contar el número de cuerpos apoptóticos. Los animales *ced-1::gfp* control y que no fueron expuestos a ningún reactivo mostraron un promedio de 13.4 cuerpos apoptóticos (Tabla 7 y Figura 35). Cuando expusimos a los animales a la cicloheximida, encontramos un incremento estadísticamente significativo en la apoptosis fisiológica en condiciones control (17.7 cuerpos apoptóticos) (Tabla 7 y Figura 35). La puromicina también indujo un incremento significativo en la apoptosis fisiológica (18.6 cuerpos apoptóticos) en los animales *ced-1::gfp* en condiciones control (Tabla 7 y Figura 35). Como esperábamos, durante el ayuno los animales *ced-1::gfp* sin reactivo respondieron a este estrés incrementando el número de cuerpos apoptóticos (21.8) (Tabla 7 y Figura 35). Sin embargo, tanto los animales expuestos a la cicloheximida como a la puromicina no respondieron al ayuno (Tabla 7 y Figura 35).

Tabla 7| Promedio de cuerpos apoptóticos observados durante la exposición a cicloheximida y puromicina en condiciones control y de ayuno en los animales *ced-1::gfp*. Cada promedio de cuerpos apoptóticos está acompañado de su desviación estándar y la cifra entre paréntesis indica el número de gónadas analizadas. En la apoptosis fisiológica, el nivel de inducción es el resultado de la división de la cantidad de cuerpos apoptóticos observados en los animales expuestos a la cicloheximida y puromicina entre el control (sin reactivo). En la apoptosis por ayuno, el nivel de inducción es el resultado de la división de la cantidad de cuerpos apoptóticos observados en ayuno entre los cuerpos apoptóticos contados en animales alimentados. El valor P se obtuvo del análisis con una prueba *t* Mann Whitney. ↑ indica que hubo un aumento de cuerpos apoptóticos en la apoptosis fisiológica o durante la apoptosis por ayuno, y = significa que no hubo diferencias. PV= plásmido vacío.

| Gen | Control | Ayuno | Nivel de Inducción | Valor P | |
|-----------------------|-----------------|-----------------|--------------------|---------|---|
| Apoptosis fisiológica | | | | | |
| Sin reactivo | 13.4 ± 0.6 (35) | --- | --- | --- | |
| Cicloheximida | 17.7 ± 0.8 (50) | --- | 1.4 | <0.0001 | ↑ |
| Puromicina | 18.6 ± 0.9 (50) | --- | 1.4 | <0.0001 | ↑ |
| Apoptosis por ayuno | | | | | |
| Sin reactivo | 13.4 ± 0.6 (35) | 21.8 ± 0.9 (35) | 1.6 | <0.0001 | ↑ |
| Cicloheximida | 17.7 ± 0.8 (50) | 14.6 ± 0.6 (50) | 0.8 | 0.0022 | = |
| Puromicina | 18.6 ± 0.9 (50) | 18.4 ± 0.8 (50) | 1.0 | 0.7325 | = |

5.6.2 GLA-3 PARTICIPA EN LA FORMACIÓN DE GRÁNULOS DURANTE EL AYUNO

TIAR-1 se requiere para la formación de gránulos en el centro de la gónada durante el ayuno, mientras que TIAR-2 participa en menor medida en este proceso, y TIAR-3 tiene un papel antagónico [68]. De manera inesperada, hallamos que en una triple mutante *tiar-1(tm361);tiar-2(tm2923);tiar-3(ok144)* los gránulos en el centro de la gónada siguen formándose en condiciones de ayuno [68]. Lo anterior sugiere que en ausencia de TIAR-1, TIAR-2 y TIAR-3, una vía desconocida induce la formación de gránulos en el centro de la gónada durante el ayuno.

En el laboratorio se encontró a GLA-3 como otra proteína que se

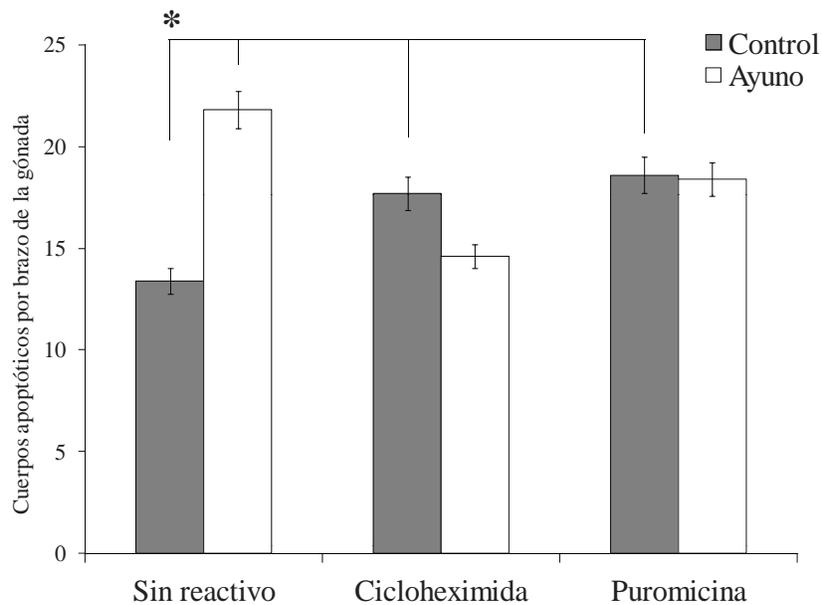


Figura 35| La exposición a cicloheximida y puromicina induce un incremento en la apoptosis fisiológica e impide un incremento de la apoptosis inducida por ayuno.

Animales *ced-1::gfp* fueron expuestos a 4 h en condiciones control o de ayuno en medio líquido (ver condiciones en Materiales y Métodos), y en presencia de cicloheximida (10 mM) o puromicina (10 mM). Después, montamos y anestesiamos a los animales para contar los cuerpos apoptóticos bajo microscopía de fluorescencia. Las barras de error representan el error estándar. Los valores de *P* fueron obtenidos con una prueba *t* Mann Whitney. **P*<0.001.

requiere durante el ayuno para la formación de gránulos en el centro de la gónada [144]. Con el objetivo de determinar si GLA-3 era el responsable de la formación de gránulos en el centro de la gónada durante el ayuno en la triple mutante *tiar-1(tm361);tiar-2(tm2923);tiar-3(ok144)*, silenciamos a *gla-3* en estos animales. Por otro lado, no todos los animales *tiar-1(tm361)* no forman gránulos en el centro de la gónada durante el ayuno [130], por lo que también analizamos si GLA-3 contribuye a la formación de gránulos en estas condiciones. Para realizar estos experimentos, silenciamos a *gla-3* mediante RNAi en los animales silvestres, *tiar-1(tm361)* y *tiar-1(tm361);tiar-2(tm2923);tiar-3(ok144)* en condiciones control y de ayuno. Como control del silenciamiento usamos el plásmido vacío (*PV*). Después del ayuno, las gónadas de los animales de cada cepa fueron diseccionadas, fijadas e inmunoteñidas

con un anticuerpo contra CGH-1.

Como esperábamos, el 100% de los animales *PV(RNAi)* formaron gránulos en el centro de la gónada durante el ayuno (Figura 36 A y B) [130], mientras que un 87.5% de los animales *gla-3(RNAi)* formaron pequeños gránulos en el centro de la gónada durante el ayuno (Figura 36 C y D) [144]. Inesperadamente, encontramos que el silenciamiento de *gla-3* en 27.0% de los animales *tiar-1(tm361)* indujo la formación de pequeños gránulos en condiciones control (Figura 36 E). Durante el ayuno, el 25.0% de los animales *tiar-1(tm361);gla-3(RNAi)* formaron pequeños gránulos en el centro de la gónada (Figura 36 F). Encontramos que el 6.1% de los animales *tiar-1(tm361);tiar-2(tm2923);tiar-3(ok144);gla-3(RNAi)* formaron pequeños gránulos en el centro de la gónada en condiciones control (Figura 36 G), mientras que durante el ayuno 67.3% de estos animales formaron pequeños gránulos en el centro de la gónada (Figura 36 H).

5.6.3 EL ESTRÉS AMBIENTAL REDUCE LA FERTILIDAD DE LOS ANIMALES

Hasta este momento sabemos que el estrés ambiental como el ayuno, choque de calor, estrés osmótico, estrés oxidativo y radiación UV tienen un efecto sobre la apoptosis y la inducción de la formación de gránulos en la gónada de *C. elegans*, y que TIAR-1 es responsable de estos efectos [64, 68, 130]. Una de las interrogantes que surgió fue conocer si el estrés ambiental tiene un efecto sobre la fertilidad de los animales silvestres, así como analizar la posible participación de TIAR-1 en este proceso. Para esto, expusimos a los animales silvestres

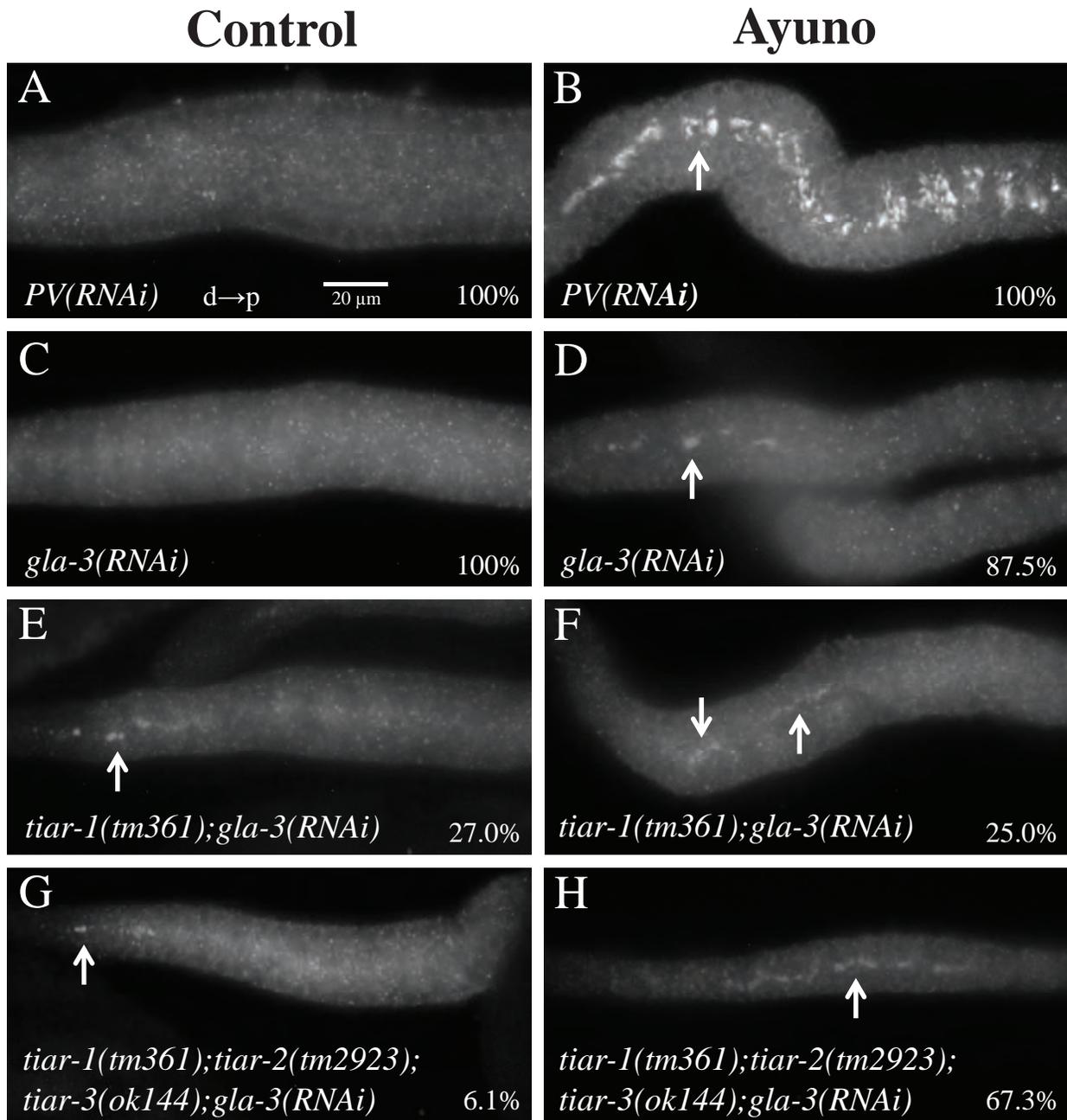


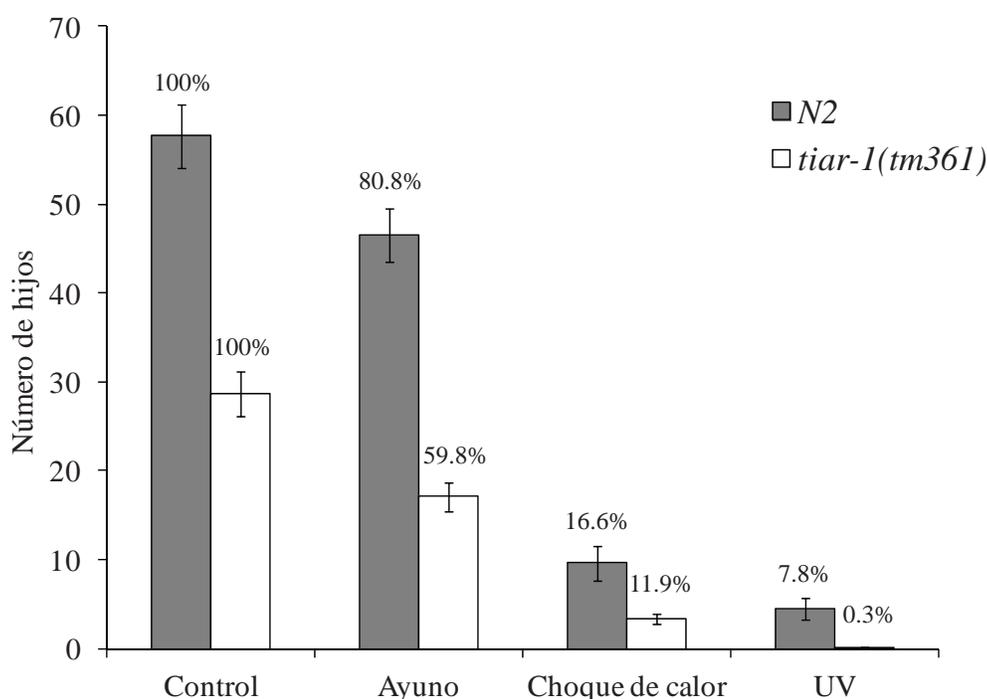
Figura 36| GLA-3 inhibe discretamente la formación de gránulos en el centro de la gónada en la triple mutante en los genes de la familia TIAR durante el ayuno. (A-H) Animales sincronizados de las cepas indicadas fueron expuestos a condiciones control o a 6 h de ayuno.

Como control de silenciamiento se usó el plásmido vacío. Después del ayuno, las gónadas fueron diseccionadas, fijadas e inmunoteñidas con un anticuerpo contra CGH-1. Después fueron analizados bajo microscopía de fluorescencia. El porcentaje de los animales con el fenotipo representado se muestra en cada figura. Las flechas señalan los gránulos del centro de la gónada.

PV= plásmido vacío, d= distal, p= proximal.

y *tiar-1(tm361)* a tres condiciones de estrés: ayuno, choque de calor y radiación UV. Después, recuperamos a los animales y los pusimos en cajas individuales para contar el número de hijos que tenían después de la exposición (ver Materiales y Métodos). Como control utilizamos el número de hijos que tiene cada cepa en condiciones normales. Cabe mencionar que los animales *tiar-1(tm361)* tienen 52.6% menos hijos que los animales silvestres [68].

Encontramos que los animales silvestres tienen 19.2% menos hijos después de ser expuestos al ayuno (Figura 37). Después de la exposición al choque de calor, los animales silvestres tienen 83.4% menos hijos y después de la radiación UV 92.2% (Figura 37). Cuando expusimos a los animales *tiar-1(tm361)* a las mismas condiciones de estrés, encontramos que el ayuno induce un 40.2% de infertilidad, mientras que el choque de calor y radiación UV un 88.1% y 99.7%, respectivamente (Figura 37). Los resultados anteriores indican que las tres condiciones de estrés probadas ocasionan una baja en la fertilidad de los animales silvestres y *tiar-1(tm361)*.



5.6.4 DISCUSIÓN

En este capítulo encontramos que la exposición tanto a la cicloheximida (inhibe la formación de gránulos [130]) como a la puromicina (promueve la formación de gránulos [130]) induce un incremento en la apoptosis fisiológica (Tabla 7 y Figura 35). En mamíferos se ha probado que ambos reactivos afectan la traducción: mientras que la cicloheximida bloquea la elongación traduccional, la puromicina promueve el desensamble de los polisomas [143]. Con base en esto, es posible que el incremento en la apoptosis fisiológica en los animales silvestres expuestos a estos dos reactivos se deba a defectos en la traducción. Cuando analizamos si los animales expuestos a la cicloheximida o a la puromicina respondían al ayuno, no observamos un aumento en la apoptosis de las células germinales (Tabla 7 y Figura 35). Una de las posibles explicaciones es que la traducción juega un papel importante en este tipo de apoptosis. Por lo tanto, al estar bloqueado el proceso general de traducción, los animales son incapaces de responder al ayuno porque no están los elementos necesarios (i. e. ribosomas y mRNAs) para que se pueda incrementar la apoptosis. Esta idea es apoyada por los resultados que se han obtenido en el laboratorio donde se observó que la inducción de la apoptosis por ayuno requiere de una regulación traduccional específica [67].

Figura 37| La exposición al estrés causa una disminución en el número de hijos de los animales silvestres y *tiar-1(tm361)*. Los animales de las cepas *N2* y *tiar-1(tm361)* fueron expuestos a ayuno, choque de calor y radiación UV como se indica en Materiales y Métodos. Después, cada animal fue recuperado en una caja individual para contar el número de hijos que tuvo. El porcentaje del número de hijos se representa arriba de cada columna. Las barras de error representan el error estándar

Tanto TIAR-1 como GLA-3 son proteínas que se requieren para inducir la formación de gránulos en el centro de la gónada durante el ayuno [130] [144]. Al estudiar si estas dos proteínas podrían trabajar de manera conjunta para inducir la formación de gránulos, encontramos que el 25.0% de los animales *tiar-1(tm361);gla-3(RNAi)* formaron gránulos durante el ayuno (Figura 36). Este 25.0% es similar al porcentaje de animales *tiar-1(tm361)* que formó gránulos en el ayuno (25.4%) [130]. Lo anterior sugiere la posibilidad de que TIAR-1 y GLA-3 estén actuando en la misma vía para inducir la formación de gránulos en el centro de la gónada en condiciones de ayuno.

Al analizar la participación de TIAR-1, TIAR-2 y TIAR-3 en la formación de gránulos durante el ayuno, encontramos que los animales mutantes en estos tres genes formaron gránulos durante el ayuno (82.9%) [130]. Lo anterior sugiere que existe otra vía involucrada en la formación de gránulos cuando TIAR-1, TIAR-2 y TIAR-3 están ausentes [130]. Cuando estudiamos si GLA-3 era la responsable de la formación de estos gránulos, encontramos que en los animales *tiar-1(tm361);tiar-2(tm2923);tiar-3(ok144);gla-3(RNAi)* el 67.3% formó gránulos (Figura 36). Este porcentaje es menor al de los animales *tiar-1(tm361);tiar-2(tm2923);tiar-3(ok144)* que formaron gránulos en ayuno (82.9%) [130]. Si bien el silenciamiento de *gla-3* disminuye el porcentaje de animales *tiar-1(tm361);tiar-2(tm2923);tiar-3(ok144)* que forman gránulos durante el ayuno, sigue habiendo una formación de estos. Lo anterior se puede explicar mediante dos opciones: que aún hay otro(s) componente(s) involucrado(s) en este proceso, o que al hacer una cuádruple mutante no observemos gránulos ya que el silenciamiento de *gla-3* puede no ser tan eficiente.

Otra de las cosas que analizamos en este capítulo fue el efecto del estrés ambiental sobre la fertilidad de los animales, así como

la participación de TIAR-1 en este proceso. Encontramos que la exposición al ayuno, choque de calor y radiación UV ocasionaron una disminución en el número de hijos tanto de los animales silvestres como de los animales mutantes para *tiar-1* (Figura 37). No obstante, la tendencia es que los animales *tiar-1(tm361)* tienen menos hijos que los animales silvestres después del estrés. Esto puede deberse a que de por sí los animales *tiar-1(tm361)* tienen menos hijos que los animales silvestres en condiciones normales (Figura 37) [68]. Sin embargo, particularmente en el ayuno la diferencia en el número de hijos entre la cepa silvestre y *tiar-1(tm361)* se acentúa más (21%), lo que sugiere una mayor importancia de TIAR-1 en este tipo de estrés. Esta idea es apoyada por el hecho de que TIAR-1 se requiere para otros procesos involucrados durante el ayuno como la traducción, la apoptosis, la diapausa reproductiva del adulto y la formación de gránulos (Capítulo 3, 4 y 6) [68, 130].

5.6.5 CONCLUSIONES

La exposición a cicloheximida y puromicina induce discretamente un incremento en la apoptosis fisiológica.

Los animales expuestos a la cicloheximida y a la puromicina no incrementan la apoptosis de las células germinales durante el ayuno.

GLA-3 actúa junto con TIAR-1 para inducir la formación de gránulos en el centro de la gónada durante el ayuno.

La exposición al ayuno, choque de calor y radiación UV disminuye el número de hijos en los animales silvestres y *tiar-1(tm361)*.

VI REFERENCIAS

1. Ruppert EE, Barnes RD (1996) Zoología de los invertebrados. México: McGraw Hill.
2. Riddle DL, Blumenthal T, Meyer BJ, Priess JR, editors (1997) *C. elegans* II. 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
3. Altun ZF, Hall DH (2005) Handbook of *C. elegans* hermaphrodite anatomy. Worm Atlas.
4. Johnson TE, Mitchell DH, Kline S, Kemal R, Foy J (1984) Arresting development arrests aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Mechanisms of Ageing and Development* 28: 23-40.
5. Angelo G, Van Gilst MR (2009) Starvation Protects Germline Stem Cells and Extends Reproductive Longevity in *C. elegans*. *Science* 326: 954-958.
6. Seidel HS, Kimble J (2011) The Oogenic Germline Starvation Response in *C. elegans*. *PLoS One* 6: e28074.
7. Padilla PA, Ladage ML (2012) Suspended animation, diapause and quiescence: Arresting the cell cycle in *C. elegans*. *Cell Cycle* 11: 1672-1679.
8. Baugh LR, Sternberg PW (2006) DAF-16/FOXO regulates transcription of *cki-1/Cip/Kip* and repression of *lin-4* during *C. elegans* L1 arrest. *Current Biology* 16: 780-785.
9. Kovacs AL, Zhang H (2010) Role of autophagy in *Caenorhabditis elegans*. *FEBS Letters* 584: 1335-1341.
10. Singson A (2001) Every sperm is sacred: fertilization in *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology* 230: 101-109.
11. Hubbard EJA, Greenstein D (2000) The *Caenorhabditis elegans* gonad: a test tube for cell and developmental biology. *Develop-*

- mental Dynamics 218: 2-22.
12. Schedl T, editor (2013) Germ Cell Development in *C. elegans*. New York: Springer. 433 p.
 13. Bolognani F, Perrone-Bizzozero NI (2008) RNA-protein interactions and control of mRNA stability in neurons. *J Neurosci Res* 15: 481-489.
 14. Hillebrand J, Barbee SA, Ramaswami M (2007) P-body components, microRNA regulation, and synaptic plasticity. *ScientificWorldJournal* 2: 178-190.
 15. Kiebler MA, Bassell GJ (2006) Neuronal RNA granules: movers and makers. *Neuron* 51: 685-690.
 16. Arkov AL, Ramos A (2010) Building RNA-protein granules: insight from the germline. *Trends Cell Biol* 20: 482-490.
 17. Voronina E, Seydoux G, Sassone-Corsi P, Nagamori I (2011) RNA Granules in Germ Cells. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3: a002774-a002774.
 18. Sengupta MS, Boag PR (2012) Germ granules and the control of mRNA translation. *IUBMB Life* 64: 586-594.
 19. Chan EKL, Fritzler MJ, editors (2013) Ten Years of Progress in GW/P Body Research. New York: Springer. 276 p.
 20. Kedersha N, Ivanov P, Anderson P (2013) Stress granules and cell signaling: more than just a passing phase? *Trends Biochem Sci*: 1-13.
 21. Barbee SA, Estes PS, Cziko AM, Hillebrand J, Luedeman RA, et al. (2006) Staufen- and FMRP-containing neuronal RNPs are structurally and functionally related to somatic P bodies. *Neuron* 52: 997-1009.
 22. Moser JJ, Fritzler MJ (2013) Relationship of Other Cytoplasmic Ribonucleoprotein Bodies (cRNPB) to GW/P Bodies. In: Chan EKL, Fritzler MJ, editors. Ten Years of Progress in GW/P Body Research. New York: Advances in Experimental Medicine and Biology. pp. 213-242.
 23. Cinalli RM, Rangan P, Lehmann R (2008) Germ cells are forever. *Cell* 132: 559-562.
 24. Lehmann R (2012) Germline stem cells: origin and destiny. *Cell Stem Cell* 10: 729-739.

25. Jain S, Parker R (2013) The discovery and analysis of P Bodies. In: Chan EKL, Fritzler MJ, editors. Ten Years of Progress in GW/P Body Research. New York: Advances in Experimental Medicine and Biology. pp. 23-43.
26. Olszewska M, Bujarski JJ, Kurpisz M (2012) P-bodies and their functions during mRNA cell cycle: mini-review. *Cell Biochem Funct* 30: 177-182.
27. Brengues M, Teixeira D, Parker R (2005) Movement of eukaryotic mRNAs between polysomes and cytoplasmic processing bodies. *Science* 310: 486-489.
28. Bhattacharyya SN, Habermacher R, Martine U, Closs EI, Filipowicz W (2006) Relief of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress. *Cell* 125: 1111-1124.
29. Kedersha N, Gupta M, Li W, Miller I, Anderson P (1999) RNA-binding Proteins TIA-1 and TIAR Link the Phosphorylation of eIF-2 α to the Assembly of Mammalian Stress Granules. *The Journal of Cell Biology* 147: 1431-1441.
30. Stoecklin G, Kedersha N (2013) Relationship of GW/P-bodies with stress granules. In: Chan EKL, Fritzler MJ, editors. Ten Years of Progress in GW/P Body Research. New York: Advances in Experimental Medicine and Biology. pp. 197-211.
31. Ohn T, Kedersha N, Hickman T, Tisdale S, Anderson P (2008) A functional RNAi screen links O-GlcNAc modification of ribosomal proteins to stress granule and processing body assembly. *Nat Cell Biol* 10: 1224-1231.
32. Kedersha N, Stoecklin G, Ayodele M, Yacono P, Lykke-Andersen J, et al. (2005) Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. *Journal of Cell Biology* 169: 871-884.
33. Barckmann B, Simonelig M (2013) Control of maternal mRNA stability in germ cells and early embryos. *Biochim Biophys Acta* 1829: 714-724.
34. Rajyaguru P, Parker R (2008) CGH-1 and the control of maternal mRNAs. *Trends in Cell Biology* 19: 24-28.
35. Strome S, Wood WB (1982) Immunofluorescence visualization of germ-line-specific cytoplasmic granules in embryos, larvae,

- and adults of *Caenorhabditis elegans*. PNAS 79: 1558-1562.
36. Voronina E, Seydoux G (2010) The *C. elegans* homolog of nucleoporin Nup98 is required for the integrity and function of germline P granules. Development 137: 1441-1450.
 37. Updike D, Strome S (2010) P granule assembly and function in *Caenorhabditis elegans* germ cells. J Androl 31: 53-60.
 38. Updike DL, Strome S (2009) A Genomewide RNAi Screen for Genes That Affect the Stability, Distribution and Function of P Granules in *Caenorhabditis elegans*. Genetics 183: 1397-1419.
 39. Schisa J (2012) New Insights into the Regulation of RNP Granule Assembly in Oocytes. 295: 233-289.
 40. Spike CA, Bader J, Reinke V, Strome S (2008) DEPS-1 promotes P-granule assembly and RNA interference in *C. elegans* germ cells. Development 135: 983-993.
 41. Kawasaki I, Shim Y-H, Kirchner J, Kaminker J, Wood B, William, et al. (1998) PGL-1, a Predicted RNA-Binding Component of Germ Granules, Is Essential for Fertility in *C. elegans*. Cell 94: 635-645.
 42. Amiri A, Keiper BD, Kawasaki I, Fan Y, Kohara Y, et al. (2001) An isoform of eIF4E is a component of germ granules and is required for spermatogenesis in *C. elegans*. Development 128: 3899-3912.
 43. Schaner CE, Kelly WG (2006) Germline chromatin. In: Community TCeR, editor. WormBook. pp. 1-14.
 44. Boag PR, Atalay A, Robida S, Reinke V, Blackwell TK (2008) Protection of specific maternal messenger RNAs by the P body protein CGH-1 (Dhh1/RCK) during *Caenorhabditis elegans* oogenesis. The Journal of Cell Biology 182: 543-557.
 45. McCarter J, Bartlett B, Dang T, Schedl T (1999) On the control of oocyte meiotic maturation and ovulation in *Caenorhabditis elegans*. Developmental Biology 205: 111-128.
 46. Noble SL, Allen BL, Goh LK, Nordick K, Evans TC (2008) Maternal mRNAs are regulated by diverse P body-related mRNP granules during early *Caenorhabditis elegans* development. The Journal of Cell Biology 182: 559-572.
 47. Jud MC, Czerwinski MJ, Wood MP, Young RA, Gallo CM, et

- al. (2008) Large P body-like RNPs form in *C. elegans* oocytes in response to arrested ovulation, heat shock, osmotic stress, and anoxia and are regulated by the major sperm protein pathway. *Developmental Biology* 318: 38-51.
48. Pereira WO, Amarante-Mendes GP (2011) Apoptosis: a programme of cell death or cell disposal? *Scand J Immunol* 73: 401-407.
 49. Lord CE, Gunawardena AH (2012) Programmed cell death in *C. elegans*, mammals and plants. *Eur J Cell Biol* 91: 603-613.
 50. Conradt B (2009) Genetic control of programmed cell death during animal development. *Annu Rev Genet* 43: 493-523.
 51. Darland-Ransom M, Wu Y-C, Xue D (2009) Programmed cell death in *C. elegans*. In: Yin X-M, Dong Z, editors. *Essentials of Apoptosis*. Second Edition ed. New York, NY: Humana Press. pp. 355-373.
 52. Hengartner MO, Ellis RE, Horvitz HR (1992) *Caenorhabditis elegans* gene *ced-9* protects cells from programmed cell death. *Nature* 356: 494-499.
 53. Conradt B, Horvitz HR (1998) The *C. elegans* protein EGL-1 is required for programmed cell death and interacts with the Bcl-2-like protein CED-9. *Cell* 93: 519-529.
 54. del Peso L, Gonzalez VM, Inohara N, Ellis RE, Nunez G (2000) Disruption of the CED-9/CED-4 complex by EGL-1 is a critical step for programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem* 275: 27205-27211.
 55. Yuan JY, Horvitz HR (1990) The *Caenorhabditis elegans* genes *ced-3* and *ced-4* act cell autonomously to cause programmed cell death. *Developmental Biology* 138: 33-41.
 56. Yan N, Chai J, Lee ES, Gu L, Liu Q, et al. (2005) Structure of the CED-4-CED-9 complex provides insights into programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 437: 831-837.
 57. Gumienny TL, Lambie E, Hartweg E, Horvitz HR, Hengartner MO (1999) Genetic control of programmed cell death in the *Caenorhabditis elegans* hermaphrodite germline. *Development* 126: 1011-1022.
 58. Wolke U, Jezuit EA, Priess JR (2007) Actin-dependent cytoplasmic streaming in *C. elegans* oogenesis. *Development* 134: 2227-

2236.

59. Andux S, Ellis RE (2008) Apoptosis Maintains Oocyte Quality in Aging *Caenorhabditis elegans* Females. PLoS GENETICS 4: 1-13.
60. Aballay A, Ausubel FM (2001) Programmed cell death mediated by *ced-3* and *ced-4* protects *Caenorhabditis elegans* from *Salmonella typhimurium*-mediated killing. Proceedings of the National Academy of Sciences 98: 2735-2739.
61. Schumacher B, Hofmann K, Boulton S, Gartner A (2001) The *C. elegans* homolog of the p53 tumor suppressor is required for DNA damage-induced apoptosis. Current Biology 11: 1722-1727.
62. Derry WB, Putzke AP, Rothman JH (2001) *Caenorhabditis elegans* p53: Role in Apoptosis, Meiosis, and Stress Resistance. Science 294: 591-595.
63. Aballay A, Drenkard E, Hilbun LR, Ausubel FM (2003) *Caenorhabditis elegans* innate immune response triggered by *Salmonella enterica* requires intact LPS and is mediated by a MAPK signaling pathway. Curr Biol 13: 47-52.
64. Salinas LS, Maldonado E, Navarro RE (2006) Stress-induced germ cell apoptosis by a p53 independent pathway in *Caenorhabditis elegans*. Cell Death and Differentiation 13: 2129-2139.
65. Schumacher B, Schertel C, Wittenburg N, Tuck S, Mitani S, et al. (2005) *C. elegans ced-13* can promote apoptosis and is induced in response to DNA damage. Cell Death and Differentiation 12: 153-161.
66. Schertel C, Conradt B (2007) *C. elegans* orthologs of components of the RB tumor suppressor complex have distinct pro-apoptotic functions. Development 134: 3691-3701.
67. Láscarez-Lagunas LI, Silva-García CG, Dinkova TD, Navarro RE (2013) LIN-35/Rb causes starvation-induced germ cell apoptosis via CED-9/Bcl2 down-regulation in *C. elegans*. En preparación.
68. Silva-García CG, Navarro RE (2013) The *C. elegans* TIA-1/TIAR homolog TIAR-1 is required to induce germ cell apoptosis. genesis.
69. Tian Q, Streuli M, Saito H, Schlossman SF, Anderson P (1991) A Polyadenylate Binding Protein Localized to the Granules of

- Cytolytic Lymphocytes Induces DNA Fragmentation in Target Cells. *Cell* 67: 629-639.
70. Del Gatto-Konczak F, Bourgeois CF, Guiner CL, Kister L, Gesnel MC, et al. (2000) The RNA-Binding Protein TIA-1 Is a Novel Mammalian Splicing Regulator Acting through Intron Sequences Adjacent to a 5' Splice Site. *Molecular and Cellular Biology* 20: 6287-6299.
 71. Förch P, Puig O, Kedersha N, Martínez C, Granneman S, et al. (2000) The Apoptosis-Promoting Factor TIA-1 Is a Regulator of Alternative Pre-mRNA Splicing. *Molecular Cell* 6: 1089–1098.
 72. Le Guiner C, Galiana D, Kister L, Breathnach R, Stévenin J, et al. (2001) TIA-1 and TIAR Activate Splicing of Alternative Exons with Weak 5' Splice Sites followed by a U-rich Stretch on Their Own Pre-mRNAs. *Journal of Biological Chemistry* 276: 40638-40646.
 73. Förch P, Puig O, Martínez C, Séraphin B, Valcárcel J (2002) The splicing regulator TIA-1 interacts with U1-C to promote U1 snRNP recruitment to 5' splice sites. *The EMBO Journal* 21.
 74. Zuccato E, Buratti E, Stuani C, Baralle FE, Pagani F (2004) An Intronic Polypyrimidine-rich Element Downstream of the Donor Site Modulates Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Exon 9 Alternative Splicing. *Journal of Biological Chemistry* 279: 16980-16988.
 75. Izquierdo JM, Majós N, Bonnal S, Martínez C, Castelo R, et al. (2005) Regulation of Fas Alternative Splicing by Antagonistic Effects of TIA-1 and PTB on Exon Definition. *Molecular Cell* 19: 475-484.
 76. Kawai T, Lal A, Yang X, Galban S, Mazan-Mamczarz K, et al. (2006) Translational Control of Cytochrome c by RNA-Binding Proteins TIA-1 and HuR. *Molecular and Cellular Biology* 26: 3295-3307.
 77. Yamasaki S, Stoecklin G, Kedersha N, Simarro M, Anderson P (2007) T-cell Intracellular Antigen-1 (TIA-1)-induced Translational Silencing Promotes the Decay of Selected mRNAs. *Journal of Biological Chemistry* 282: 30070-30077.
 78. Beck ARP, Miller IJ, Anderson P, Streuli M (1998) RNA-binding

- protein TIAR is essential for primordial germ cell development. Proc Natl Acad Sci USA 95: 2331-2336.
79. Piecyk M, Wax S, Beck ARP, Kedersha N, Gupta M, et al. (2000) TIA-1 is a translational silencer that selectively regulates the expression of TNF- α . The EMBO Journal 19: 4154-4163.
 80. Hope IA, editor (1999) *C. elegans*. New York: Oxford University Press. 281 p.
 81. Fire A, Xu S, Montgomery K, Kostas SA, Driver SE, et al. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. Nature 391: 806-811.
 82. Zhuang JJ, Hunter CP (2012) RNA interference in *Caenorhabditis elegans*: uptake, mechanism, and regulation. Parasitology 139: 560-573.
 83. Fire A, Timmons L (1998) Specific interference by ingested dsRNA. Nature 395: 854.
 84. Feinberg EH, Hunter CP (2003) Transport of dsRNA into cells by the transmembrane protein SID-1. Science 301: 1545-1547.
 85. Fraser AG, Kamath RS, Zipperlen P, Martinez-Campos M, Sohrmann M, et al. (2000) Functional genomic analysis of *C. elegans* chromosome I by systematic RNA interference. Nature 408: 325-330.
 86. Ito S, Greiss S, Gartner A, Derry WB (2010) Cell-nonautonomous regulation of *C. elegans* germ cell death by *kri-1*. Curr Biol 20: 333-338.
 87. Lant B, Derry WB (2013) Methods for detection and analysis of apoptosis signalling in the *C. elegans* germline. Methods.
 88. 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.
 89. Craig AL, Moser SC, Bailly AP, Gartner A (2012) Methods for studying the DNA damage response in the *Caenorhabditis elegans* germ line. Methods Cell Biol 107: 321-352.
 90. Flores HO, Riveros RH, Sosa PA, Vázquez CE, editors (2003) Mensaje Bioquímico. México: Depto. Bioquímica, Fac. Medicina, UNAM. 259 p.

91. Reinke V, Smith HE, Nance J, Wang J, Van Doren C, et al. (2000) A Global Profile of Germline Gene Expression in *C. elegans*. *Molecular and Cell* 6: 605–616.
92. 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.
93. Finney M, Ruvkun G (1990) The *unc-86* Gene Product Couples Cell Lineage and Cell Identity in *C. elegans*. *Cell* 63: 895-905.
94. Evans TC (2005) WormBook. In: Community TCeR, editor. Transformation and microinjection.
95. Silva-García CG (2007) Apoptosis en la línea germinal del nematodo *Caenorhabditis elegans*. Puebla, Pue. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. 94 p.
96. Zhou Z, Hartwig E, Horvitz HR (2001) CED-1 Is a Transmembrane Receptor that Mediates Cell Corpse Engulfment in *C. elegans*. *Cell* 104: 43-56.
97. Adamo A, Woglar A, Silva N, Penkner A, Jantsch V, et al. (2012) Transgene-mediated cosuppression and RNA interference enhance germ-line apoptosis in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci USA* 109: 3440–3445.
98. Jiang LI, Sternberg PW (1999) An HMG1-like protein facilitates Wnt signaling in *Caenorhabditis elegans*. *Genes & Development* 13: 877-889.
99. Chan RC, Chan A, Jeon M, Wu TF, Pasqualone D, et al. (2003) Chromosome cohesion is regulated by clock gene paralogue TIM-1. *Nature* 423: 1002-1009.
100. Ogawa S, Y. M, Nishida E (2004) An evolutionary conserved gene required for proper microtubule architecture I *Caenorhabditis elegans*. *Genes to Cell* 9: 83-93.
101. Liu J, Vasudevan S, Kipreos ET (2004) CUL-2 and ZYG-11 promote meiotic anaphase II and the proper placement of the anterior-posterior axis in *C. elegans*. *Development* 131: 3513-3525.
102. Smolikov S, Schild-Prufert K, zolaiacovo MP (2008) CRA-1 uncovers a double-strand break-dependent pathway promoting the assembly of central region proteins on chromosome axes during *C. elegans* meiosis. *PLoS GENETICS* 4.

103. (2013) WormBase. Comunidad de *C. elegans*.
104. Ou CY, Poon VY, Maeder CI, Watanabe S, Lehrman EK, et al. (2010) Two cyclin-dependent kinase pathways are essential for polarized trafficking of presynaptic components. *Cell* 141: 846-858.
105. Kawakami A, Tian Q, Duan X, Streuli M, Schlossman SF, et al. (1992) Identification and functional characterization of a TIA-1-related nucleolysin. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 8681-8685.
106. Förch P, Valcárcel J (2001) Molecular mechanisms of gene expression regulation by the apoptosis-promoting protein TIA-1. *Apoptosis* 6: 463-468.
107. Anderson P, Kedersha N (2002) Visibly stressed: the role of eIF2, TIA-1, and stress granules in protein translation. *Cell Stress & Chaperones* 7: 213-221.
108. Gilks N, Kedersha N, Ayodele M, Shen L, Stoecklin G, et al. (2004) Stress Granule Assembly Is Mediated by Prion-like Aggregation of TIA-1. *Molecular Biology of the Cell* 15: 5383-5398.
109. Lopez de Silanes I, Galban S, Martindale JL, Yang X, Mazan-Mamczarz K, et al. (2005) Identification and Functional Outcome of mRNAs Associated with RNA-Binding Protein TIA-1. *Molecular and Cellular Biology* 25: 9520-9531.
110. Kuwano Y, Kim HH, Abdelmohsen K, Pullmann R, Jr., Martindale JL, et al. (2008) MKP-1 mRNA stabilization and translational control by RNA-binding proteins HuR and NF90. *Mol Cell Biol* 28: 4562-4575.
111. Kimble J, Edgar L, Hirsh D (1984) Specification of Male Development in *Caenorhabditis elegans*: The fem Genes. *Developmental Biology* 105: 234-239.
112. Barton MK, Schedl T, Kimble J (1987) Gain-of-Function Mutations of *fem-3*, a Sex-Determination Gene in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 115: 107-119.
113. Beanan MJ, Strome S (1992) Characterization of a germ-line proliferation mutation in *C. elegans*. *Development* 116: 755-766.
114. Wang X, Wu YC, Fadok VA, Lee MC, Gengyo-Ando K, et al. (2003) Cell corpse engulfment mediated by *C. elegans* phospho-

- tidylserine receptor through CED-5 and CED-12. *Science* 302: 1563-1566.
115. Wu YC, Horvitz HR (1998) The *C. elegans* cell corpse engulfment gene *ced-7* encodes a protein similar to ABC transporters. *Cell* 93: 951-960.
 116. Liu QA, Hengartner MO (1998) Candidate adaptor protein CED-6 promotes the engulfment of apoptotic cells in *C. elegans*. *Cell* 93: 961-972.
 117. Kinchen JM, Cabello J, Klingele D, Wong K, Feichtinger R, et al. (2005) Two pathways converge at CED-10 to mediate actin rearrangement and corpse removal in *C. elegans*. *Nature* 434: 93-99.
 118. Wu YC, Stanfield GM, Horvitz HR (2000) NUC-1, a *Caenorhabditis elegans* DNase II homolog, functions in an intermediate step of DNA degradation during apoptosis. *Genes & Development* 14: 536-548.
 119. Parrish J, Li L, Klotz K, Ledwich D, Wang X, et al. (2001) Mitochondrial endonuclease G is important for apoptosis in *C. elegans*. *Nature* 412: 90-94.
 120. Parrish JZ, Xue D (2003) Functional Genomic Analysis of Apoptotic DNA Degradation in *C. elegans*. *Molecular Cell* 11: 987-996.
 121. Li Z, Lu N, He X, Zhou Z (2013) Monitoring the clearance of apoptotic and necrotic cells in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Methods in Molecular Biology* 1004: 183-202.
 122. Nakagawa A, Shi Y, Kage-Nakadai E, Mitani S, Xue D (2010) Caspase-Dependent Conversion of Dicer Ribonuclease into a Death-Promoting Deoxyribonuclease. *Science* 328: 327-334.
 123. Zou W, Lu Q, Zhao D, Li W, Mapes J, et al. (2009) *Caenorhabditis elegans* myotubularin MTM-1 negatively regulates the engulfment of apoptotic cells. *PLoS Genet* 5: e1000679.
 124. Neukomm LJ, Nicot AS, Kinchen JM, Almendinger J, Pinto SM, et al. (2011) The phosphoinositide phosphatase MTM-1 regulates apoptotic cell corpse clearance through CED-5–CED-12 in *C. elegans*. *Development* 138: 2003-2014.
 125. Yuan J, Shaham S, Ledoux S, Ellis HM, Horvitz HR (1993) The

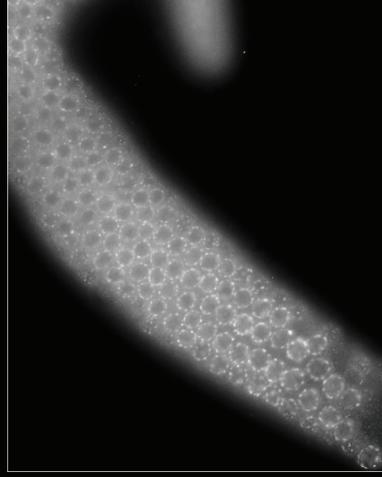
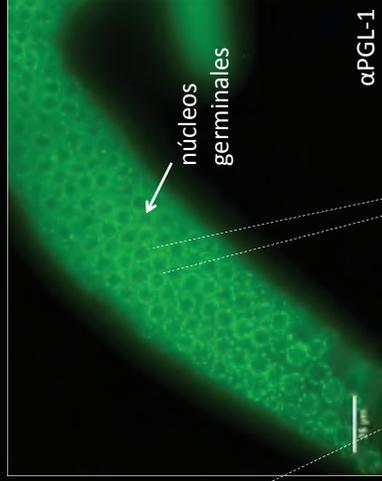
- C. elegans* Cell Death Gene *ced-3* Encodes a Protein Similar to Mammalian Interleukin-1 β -Converting Enzyme. *Cell* 75: 641-652.
126. Shaham S, Horvitz HR (1996) An Alternatively Spliced *C. elegans* *ced-4* RNA Encodes a Novel Cell Death Inhibitor. *Cell* 86: 201-208.
 127. Chen F, Hersh BM, Conradt B, Zhou Z, Riemer D, et al. (2000) Translocation of *C. elegans* CED-4 to nuclear membranes during programmed cell death. *Science* 287: 1485-1489.
 128. Pourkarimi E, Greiss S, Gartner A (2012) Evidence that CED-9/Bcl2 and CED-4/Apaf-1 localization is not consistent with the current model for *C. elegans* apoptosis induction. *Cell Death Differ* 19: 406-415.
 129. Anderson P, Kedersha N (2002) Stressful initiations. *Journal of Cell Science* 115: 3227-3234.
 130. Silva-García CG, Navarro RE (2013) The RNA binding protein TIAR-1 is required to form gonad core granules under stress conditions in *C. elegans*. En prepración.
 131. Geng X, Zhou QH, Kage-Nakadai E, Shi Y, Yan N, et al. (2009) *Caenorhabditis elegans* caspase homolog CSP-2 inhibits CED-3 autoactivation and apoptosis in germ cells. *Cell Death and Differentiation* 16: 1385-1394.
 132. Stitzel ML, Pellettieri J, Seydoux G (2006) The *C. elegans* DYRK Kinase MBK-2 Marks Oocyte Proteins for Degradation in Response to Meiotic Maturation. *Current Biology* 16: 56-62.
 133. Frøkjær-Jensen C, Wayne Davis M, Hopkins CE, Newman BJ, Thummel JM, et al. (2008) Single-copy insertion of transgenes in *Caenorhabditis elegans*. *Nature Genetics* 40: 1375-1383.
 134. Yang X, Chang HY, Baltimore D (1998) Essential role of CED-4 oligomerization in CED-3 activation and apoptosis. *Science* 281: 1355-1357.
 135. Gartner A, Milstein S, Ahmed S, Hodgkin J, Hengartner MO (2000) A Conserved Checkpoint Pathway Mediates DNA Damage-Induced Apoptosis and Cell Cycle Arrest in *C. elegans*. *Molecular Cell* 5: 435-443.
 136. Kim HS, Kuwano Y, Zhan M, Pullmann R, Mazan-Mamczarz K,

- et al. (2007) Elucidation of a C-Rich Signature Motif in Target mRNAs of RNA-Binding Protein TIAR. *Molecular and Cellular Biology* 27: 6806-6817.
137. Fox CW, Czesak ME, Mousseau TA, Roff DA (1999) The evolutionary genetics of an adaptive maternal effect: Egg size plasticity in a seed beetle. *Evolution* 53: 552-560.
 138. Renfree MB, Shaw G (2000) Diapause. *Annual Review of Physiology* 62: 353-375.
 139. Tatar M, Yin C (2001) Slow aging during insect reproductive diapause: why butterflies, grasshoppers and flies are like worms. *Experimental Gerontology* 36: 723-738.
 140. Denlinger DL (2002) Regulation of diapause. *Annual Review of Entomology* 47: 93-122.
 141. Fischer K, Brakefield PM, Zwaan BJ (2003) Plasticity in butterfly egg size: Why larger offspring at lower temperatures? *Ecology* 84: 3138-3147.
 142. Anderson P, Kedersha N (2007) Stress granules: the Tao of RNA triage. *Trends in Biochemical Sciences* 33: 141-150.
 143. Kedersha N, Anderson P (2007) Mammalian Stress Granules and Processing Bodies. *Methods in Enzymology*. pp. 61-81.
 144. Láscares-Lagunas LI (2013) Regulación de la apoptosis en la línea germinal del nematodo *C. elegans*. México, D. F. Universidad Nacional Autónoma de México.

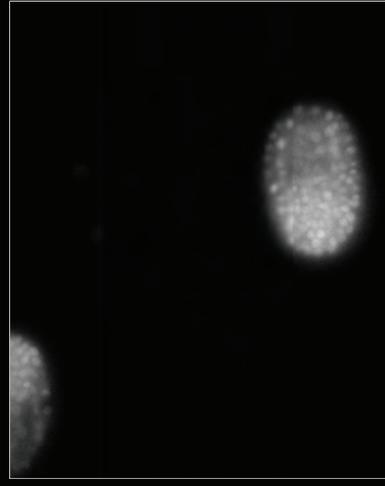
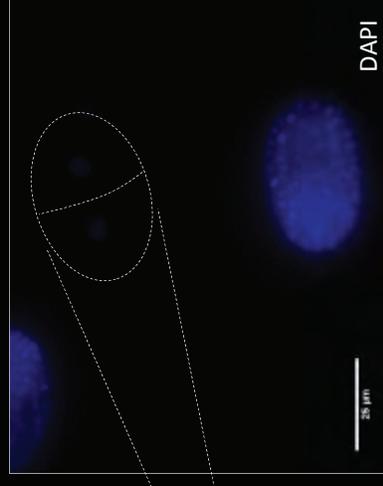
Larva L3



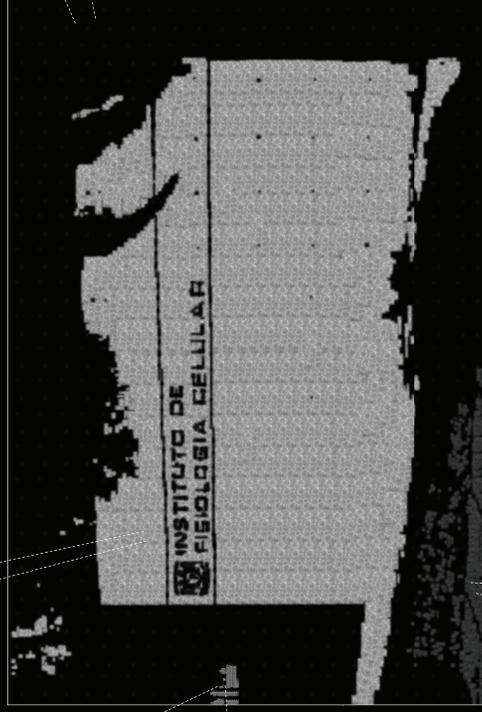
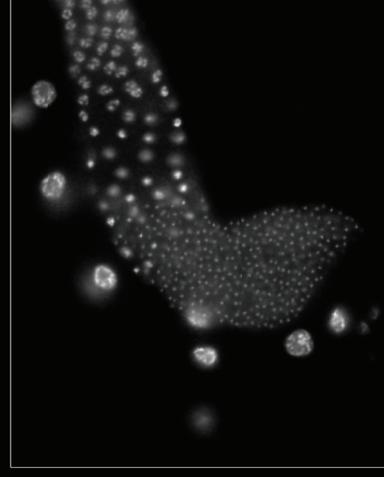
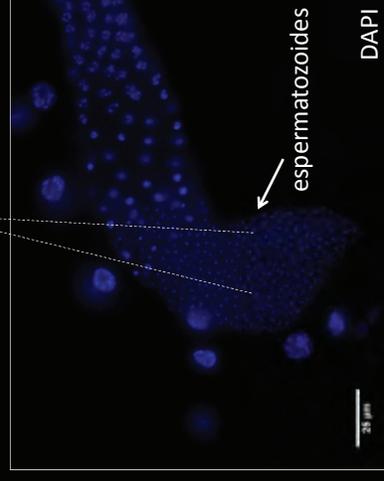
Gónada hermafrodita adulto



Embrión de 2 células



Gónada macho adulto



 INSTITUTO DE
FISIOLOGIA CELULAR

