



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

**“LA PROTEÍNA DE UNIÓN A DNA DPFF-1 ES IMPORTANTE PARA
LA MEIOSIS Y LA SUPERVIVENCIA AL ESTRÉS DEL NEMÁTODO
Caenorhabditis elegans”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

P R E S E N T A :

ANGEL EMMANUEL VILLANUEVA CHIMAL

TUTORA

DRA. ROSA ESTELA NAVARRO GONZÁLEZ
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ

DR. ERNESTO MALDONADO OLVERA
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA, UNAM

DR. LUIS PADILLA NORIEGA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

CIUDAD DE UNIVERSITARIA, CD. MX. SEPTIEMBRE DE 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

AGRADECIMIENTOS FORMALES

- Este trabajo se realizó bajo la dirección de la Dra. Rosa Estela Navarro González en el Departamento de Biología Celular y Desarrollo del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).
- Este trabajo se realizó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT-SEP 103856-Q y 220987) y el Programa de Apoyo a la Innovación e Investigación Tecnológica (PAPIIT-UNAM IN207412 e IN2017415).
- Angel Emmanuel Villanueva Chimal recibió una beca durante la realización de sus estudios de Doctorado por parte del Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACyT, México) con número CVU 335767, una beca Mixta para realizar una estancia en el extranjero y becas para la conclusión de sus estudios del Programa de Apoyo a la Innovación e Investigación Tecnológica (PAPIIT-UNAM IN20712 e IN2017415).
- Se agradece a la M. en C. Laura Silvia Salinas Velázquez por su valiosa asistencia técnica e intelectual. Sin su colaboración no se hubiera podido concluir la publicación de este trabajo.
- Se agradece su colaboración a las Doctoras Gabriela Huelgas Morales y Laura Paulette Fernández Cárdenas.
- Agradezco a los miembros de mi comité tutorial y miembros del jurado por su revisión crítica hacia este trabajo.
 - Dr. Ernesto Maldonado Olvera
 - Dr. Luis Padilla Noriega
 - Dra. Mahara Angélica Valverde Ramírez

- Dra. Berenice García Ponce de León
- Dr. Victor Julián Valdés Rodríguez
- Dr. Juan Miranda Ríos
- Tambié se agradece al personal de las siguientes unidades del IFC por su valiosa asistencia técnica:
 - A la Dra. Ongay Larios y al personal de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular: Guadalupe Códiz Huerta y Minerva Mora Cabrera.
 - 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.
 - Al personal de la Unidad de Cómputo del Instituto de Fisiología Celular: Ana María Escalante, Ivette Rosas, Gerardo Coello, Juan Manuel Barbosa y Francisco Pérez.
 - Al personal del taller Ing. Aurey Galván Lobato e Ing. Manuel Ortínez Benavides.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

- ☺ A la Dra. Rosa Navarro por haberme aceptado como miembro de su laboratorio, brindarme su confianza y dejarme una marca muy grande en mi formación profesional.
- ☺ Al Dr. Alejandro Sánchez Alvarado, Dr. Antonio Peña, Gunther Holloper y Christian Frøkjær-Jensen por las mejores discusiones sobre ciencia y la vida en general.
- ☺ Al Dr. Antonio Peña, Dr. Roberto Coria y Dr. Fernando López por su generosidad al facilitarme materiales y reactivos.
- ☺ A mis padres Martha Chimal y Miguel Villanueva por darme la vida, educarme, consentirme, cuidarme, apoyarme, tolerarme, quererme y estar siempre en todo momento para mí.
- ☺ A mi familia: Martha, Miguel, Herlinda, Tatiana, Sofía, Sharon, Herlinda, Job, Eluzaid Cristina, Josué, Víctor, Elena, Daniel, Uriel, Tirso, Rocío, Cintia, Diana, Ángeles, Cesar, Beatriz, Geraldine, Vicente, Tomás, Chayo, Tomy, Mimi, Gisela, Francisco, Clara, Alfredo y Alfredo Jr. por su apoyo, cariño y atenciones que me han brindado durante todo este tiempo. Los quiero mucho.
- ☺ A todo el IFC: 206-SUR Rocío, Emilio, Dieguii, Alan, Angelito, Daniel, Fermín, Ricardo, Giovanni y Laura. 306-OTE: Norma, Martha, Daniela, Christian, Carlos y René. 302-OTE: Dr. Roberto, Laurita, Miriam, Nancy y Maricela.
- ☺ To the Sanchez lab: Carolyn, Sarah, Kim, Long-Hua, Hanh Vu, Anh Tran, Li-Chun, thank you for the good times in the USA.

- ☯ A mis amigos de toda la vida: Ruth, Jonatan, Layla, Chayo, Gaby, Cristhian, José fer, Armando, Julio, Diego (Felipe de Jesús), Andrés, Felipe, Stefany. Gracias por ayudarme a seguir adelante.
- ☯ Aura Nirva Campero por el día de las luciérnagas.
- ☯ A la Universidad Nacional Autónoma de México.
- ☯ Андреа и Wiffy; Я очень сильно по тебе скучаю. Спасибо за ваш обмен жить со мной.

“Would you tell me, please, which way I ought to go from here?”

"That depends a good deal on where you want to get to."

"I don't much care where -"

"Then it doesn't matter which way you go."

-Lewis Carroll

Dedico este trabajo con mucho cariño para:

ॐ Martha Chimal

ॐ Miguel Ángel Villanueva

ॐ Herlinda Sánchez

ॐ Tatiana Villanueva

ॐ Sofía Villanueva

ABREVIATURAS

∞	ADN	Ácido desoxirribonucleico
∞	ANOVA	Análisis de la varianza
∞	ATP	Adenosín-5'-trifosfato
∞	ARN	Ácido ribonucleico
∞	BAF	Factores asociados a Brg/Brm (Brg/Brm-associated factors)
∞	cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
∞	CRISPR	Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats)
∞	DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
∞	DBD	Dominio de unión a ADN (DNA binding domain)
∞	DEPC	Dietilpirocarbonato
∞	DPF	Factores de transcripción de la familia <i>d4</i> (D 4 zinc and double P HD fingers transcription f actor f amily).
∞	GFP	Proteína verde fluorescente (Green fluorescent protein)
∞	HAT	Acetiltransferasa de histonas (Histone acetyltransferase enzymes)
∞	HDAC	Desacetilasa de histona (Histone deacetylase)
∞	HMT	Metiltransferasa de histona (Histone methyltransferase)
∞	IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
∞	MosSCI	Insecciones monocopia mediadas por la movilización del elemento Mos1 (Mos1-mediated Single Copy Insertion)
∞	NGM	Nematode growth medium

⌘ PBAF	Polybromo-BAF
⌘ PCR	Reacción de la cadena de la polimeraza (Polimerase chain reaction)
⌘ PHD	Plant homeodomain
⌘ PV	Plásmido vacío
⌘ qRT-PCR	PCR en tiempo real (Real-time reverse transcription-PCR)
⌘ RNA	Ácido ribonucleico
⌘ RNAi	RNA de interferencia
⌘ SLN	Señal de localización nuclear
⌘ SNF	Sucrose non fermenting
⌘ SSD	Dominio sensor de señal (Signal sensing domain)
⌘ SWI	Switching deficient
⌘ TAD	Dominio de <i>trans</i> -activación (Trans-activating domain)
⌘ ZT	Zona de transición
⌘ DTC	Célula de la punta distal (Distal cell)
⌘ MSP	Major Sperm Protein

RESUMEN

Existen tres miembros de la familia de factores de transcripción *d4* en mamíferos. El primero, DPF1/*neuro-d4* es un gen importante para el desarrollo del cerebro que cuenta con un patrón de expresión restringido a neuronas y el sistema nervioso. El segundo, DPF2/*requiem/ubi-d4* es un gen que funciona como factor apoptótico ante la privación de factores tróficos, el cual cuenta con un patrón de expresión ubicuo durante la embriogénesis y el desarrollo de animales adultos. Y el último, DPF3/*cer-d4* es un gen importante para el desarrollo de corazón, músculo esquelético y neuronal con un patrón de expresión que se restringe únicamente a estos tejidos. En *Drosophila melanogaster* solo se ha descrito a *dd4* como el único miembro de la familia *d4*. La función de *dd4* aún no ha sido descrita pero su expresión se ha observado en varios tejidos, en particular es muy abundante en el cerebro de embriones en desarrollo y en células somáticas y germinales de animales adultos.

En este trabajo presentamos a DPFF-1 (**D**4 zinc and double **P**HD fingers transcription **f**actor **f**amily) como el único miembro de la familia *d4* reportado en el genoma de *C. elegans*. Para explorar la función de *dpff-1*, se generó el alelo *xm17* por el sistema de edición del genoma CRISPR-Cas-9 y se utilizó el alelo *tm4287* que se obtuvo del 'National BioResource Project' de Japón. Adicionalmente, para determinar el patrón de expresión de *dpff-1*, se generaron animales transgénicos que expresan marcadores fluorescentes por el método de MosSCI. En este trabajo, observamos que DPFF-1 se requiere para inducir la apoptosis de células germinales durante el estrés y que el transgen GFP::DPFF-1 se expresa de manera ubicua durante todo el desarrollo de *C. elegans*, siendo estos atributos similares a su homólogo en mamífero DPF2/*requiem/ubi-d4*. En contraste con otros miembros de la familia *d4*, los animales *dpff-1* mutantes no presentan fenotipos somáticos evidentes a lo

largo del desarrollo. Sin embargo, observamos que animales *dpff-1* mutantes tienen baja fertilidad debido a defectos en la meiosis durante la ovogénesis. Además, observamos la sobreexpresión de la MAP cinasa fosforilada (P-MPK-1) en la gónada de animales *dpff-1* mutantes y un incremento en la apoptosis de células germinales dependiente del homólogo de p53 en *C. elegans*, la proteína CEP-1. Por último, observamos que animales *dpff-1* mutantes son más sensibles al choque térmico ya que no pueden activar los reporteros de respuesta ante este tipo de estrés. Este es el primer informe que muestra el papel de un miembro de la familia de factores de transcripción *d4* en la meiosis y el estrés.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. <i>Caenorhabditis elegans</i>	1
1.2. Ciclo de vida	3
1.3. Sistema reproductor	5
1.3.1. Espermatogénesis y ovogénesis en el hermafrodita	8
1.3.2. Maduración del ovocito	9
1.4. Apoptosis durante el desarrollo del <i>C. elegans</i>	13
1.5. Factores de transcripción	16
1.5.1. Factores de transcripción miembros de la familia <i>d4</i>	17
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	21
3. HIPÓTESIS	21
4. OBJETIVO GENERAL	22
4.1. Objetivos particulares	22
5. MATERIALES Y MÉTODOS	23
5.1. Cepas y condiciones de crecimiento	23
5.2. Sincronización de animales	24
5.3. ARN de interferencia (RNAi)	25
5.3.1. Inducción de ARN de doble cadena en bacterias crecidas en cultivo sólido	25
5.3.2. Inducción de ARN de doble cadena en bacterias crecidas en cultivo líquido	26
5.4. Tinción DAPI	27
5.5. Análisis de inmunofluorescencia	27
5.6. Western blot	29
5.7. Extracción de ARN	30
5.8. Análisis de la expresión de ARN mensajero mediante PCR tiempo real	31
5.9. Procesamiento de imágenes	32
5.10. Ensayos de apoptosis	33

5.11.	Condiciones de estrés	34
5.11.1.	Apoptosis inducida por estrés	34
5.11.2.	Ensayos con reporteros de choque de térmico	34
5.12.	Letalidad embrionaria después de un choque térmico	35
5.13.	Ensayos de fertilidad	36
5.14.	Construcción de transgenes	36
5.15.	Construcción de sgRNA	39
5.16.	Generación de animales transgénicos y cepas mutantes	39
5.17.	Curvas de sobrevivencia	41
6.	RESULTADOS	43
6.1.	DPFF-1 es el único miembro de la familia de factores de transcripción D4 en <i>C. elegans</i>	43
6.2.	DPFF-1 se expresa en los núcleos de todas las células de <i>C. elegans</i> durante el desarrollo	45
6.3.	La expresión de <i>dpff-1</i> es menor durante el ayuno	52
6.4.	Obtención y análisis de los alelos mutantes en <i>dpff-1</i>	53
6.5.	Los animales <i>dpff-1</i> tienen problemas de fertilidad.....	55
6.6.	Los animales <i>dpff-1</i> mutantes tienen problemas durante la meiosis.....	56
6.7.	Los animales <i>dpff-1</i> mutantes muestran una sobre expresión de la MAP cinasa ERK fosforilada	63
6.8.	Los defectos en meiosis en la gónada de animales <i>dpff-1</i> mutantes provocan que se active la apoptosis de las células germinales via p53	64
6.9.	DPFF-1 se requiere para inducir apoptosis de las células germinales en diferentes condiciones de estrés	69
6.10.	<i>dpff-1</i> se requiere para que animales adultos sobrevivan al estrés	71
7.	DISCUSIÓN	78
7.1.	DPFF-1 se expresa ubicuamente	78
7.2.	DPFF-1 protege a los animales adultos del estrés	79
7.3.	Animales <i>dpff-1</i> mutantes tienen defectos en la fertilidad y en la morfología de la gónada	81
8.	CONCLUSIONES	84

9. PERSPECTIVAS	85
10. ARTÍCULO PUBLICADO	87
11. COLABORACIONES	103
12. ANEXO	111
12.1. Soluciones y medios utilizados	111
12.1.1. Nematode Growth Medium (NGM)	111
12.1.2. Amortiguador M9 1X	111
12.1.3. PBS 1X	111
12.1.4. Solución de fijado para gónadas disecadas	112
13. BIBLIOGRAFÍA	113

1. INTRODUCCIÓN

1.1. *Caenorhabditis elegans*

El *Caenorhabditis elegans* es un nemátodo vermiforme, no segmentado con simetría bilateral y que tiene 1 mm de longitud. Este organismo vive en lugares templados y se alimenta principalmente de bacterias. La especie se compone básicamente de organismos hermafroditas pero ocasionalmente se presentan machos (0.1%) (Corsi et al. 2015). El hermafrodita adulto tiene en total 959 células somáticas, mientras que el macho adulto tiene en total 1031 células somáticas. Los animales adultos presentan una anatomía básica conformada por una boca, la faringe, el intestino, la gónada, el sistema nervioso, varios músculos y una cutícula de colágeno (**Figura 1**).

El *C. elegans* hermafrodita se puede auto-fertilizar, generando organismos homócigos genéticamente iguales o aparearse con machos. Un hermafrodita adulto produce alrededor de 300 embriones por autofertilización pero llega a producir más embriones si se aparea con un macho (1200 a 1400 embriones) (Corsi et al. 2015). El *C. elegans* tiene cinco pares de cromosomas autosomales (I-V) y un cromosoma sexual (X). El sexo del animal es determinado por la dosis del cromosoma sexual "X". Los animales hermafroditas (XX) tienen 2 copias del cromosoma sexual, mientras que los machos (X0) solo tienen una copia (Zarkower 2006).

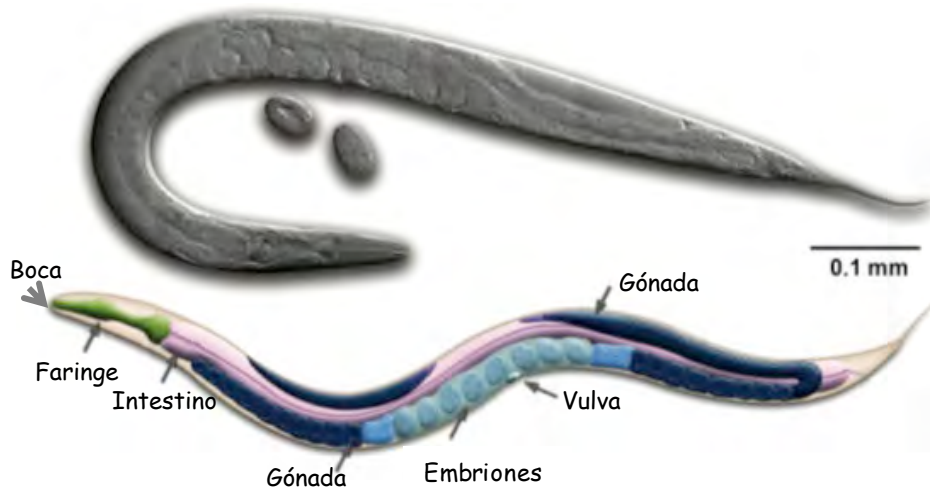


Figura 1. *C. elegans* hermafrodita adulto. Representación esquemática e imagen en Nomarski del *C. elegans* hermafrodita adulto (Imagen tomada y modificada de <http://www.wormbook.org/>).

Observaciones al microscopio realizadas por el grupo de Sulston and Horvitz (1977) permitieron trazar el linaje celular de *C. elegans* durante el desarrollo embrionario. La descripción anatómica del animal ha sido completada a nivel de microscopía electrónica (<http://www.wormatlas.org/>).

El *C. elegans* es ideal para estudiar procesos biológicos debido a características notables como un ciclo de vida corto, es transparente, es de fácil manipulación, se puede silenciar la expresión de genes utilizando RNA de interferencia (RNAi), se puede estudiar la expresión de genes *in vivo* mediante marcadores fluorescentes (**Figura 2**) y su genoma está completamente secuenciado (Chalfie et al. 1994; Boulin et al. 2006; Feinberg et al. 2008).

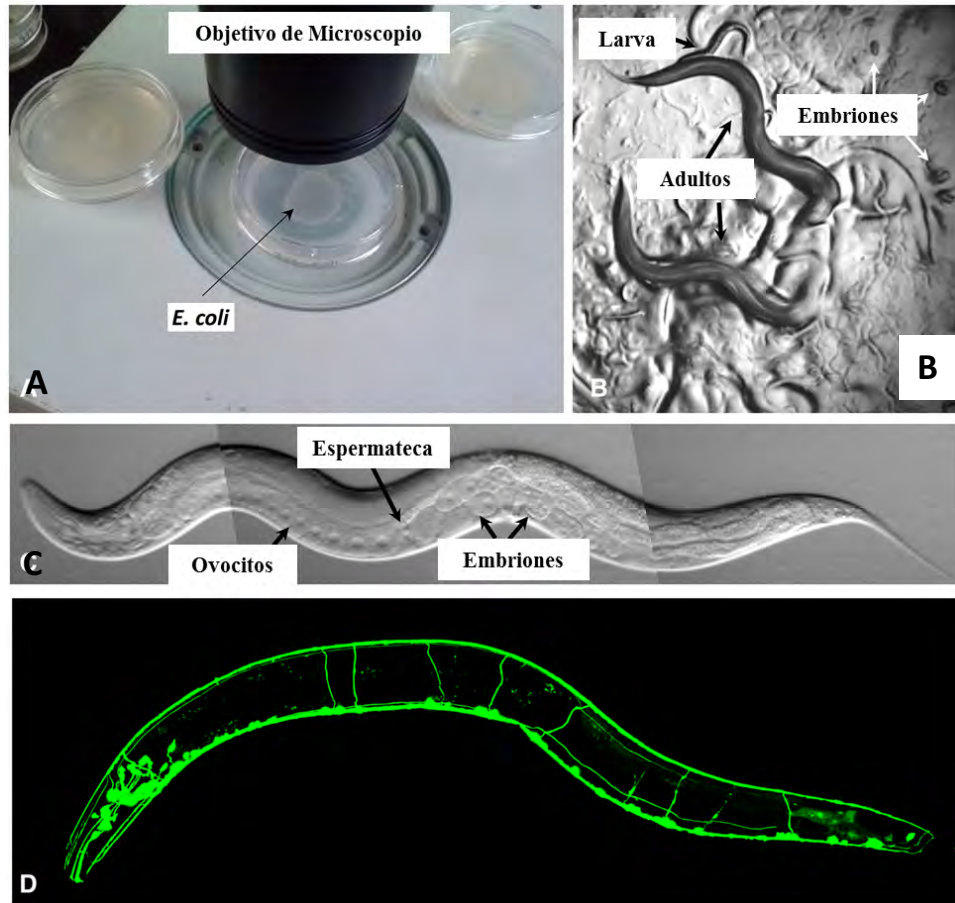


Figura 2. Observando al *C. elegans* (A) El *C. elegans* se crece en cajas Petri con bacterias como fuente de alimento. (B) *C. elegans* observado desde un microscopio estereoscópico. (C) *C. elegans* observado desde un microscopio compuesto bajo microscopía Nomarski. (D) Imagen fluorescente del sistema nervioso de *C. elegans* (*sto-6::gfp*) observado desde un microscopio de epifluorescencia (**Imagen tomada y modificada de Corsi et al. (2015)**).

1.2. Ciclo de vida

El ciclo de vida del *C. elegans* es sensible a temperatura ya que los animales hermafroditas pasan por un ciclo de vida reproductivo en 5.5 días a 15°C, 3.5 días a 20°C, y 2.5 días a 25°C. En promedio el *C. elegans* vive hasta un total de dos semanas (Corsi et al. 2015). El ciclo de vida del *C. elegans* comienza cuando un óvulo maduro es fertilizado en

la espermateca del hermafrodita adulto (**Figura 3**). El cigoto se forma en el útero en donde es retenido y posteriormente depositado en el medio (Sulston et al. 1983).

La embriogénesis del *C. elegans* comprende la fase de proliferación y la fase de morfogénesis (Sulston et al. 1983). Durante la fase de proliferación el cigoto se divide de forma asimétrica y asincrónica dando origen a células denominadas blastómeros. Al final de la etapa de proliferación los movimientos celulares durante la gastrulación producen las tres capas germinales embrionarias (endodermo, mesodermo y ectodermo) que dan origen al plano básico del cuerpo del animal. Más tarde en la embriogénesis, las divisiones celulares cesan y los diversos tejidos se organizan y diferencian (Sulston et al. 1983).

El desarrollo postembrionario comienza cuando el animal eclosiona del huevo y empieza a alimentarse. El *C. elegans* pasa por cuatro diferentes estadios larvarios (L1-L4) para llegar a la fase adulta. Los animales sintetizan y mudan una cutícula de colágeno al pasar por cada estadio larvario. En la etapa larval L1, la mayoría de las células no se siguen dividiendo, solo aumentan su tamaño a medida que el animal crece hasta la edad adulta. Sin embargo, un pequeño número de células se dividen aún más durante estadios larvarios específicos para producir neuronas adicionales, músculos y las estructuras involucradas en el apareamiento y la reproducción (Sulston and Horvitz 1977).

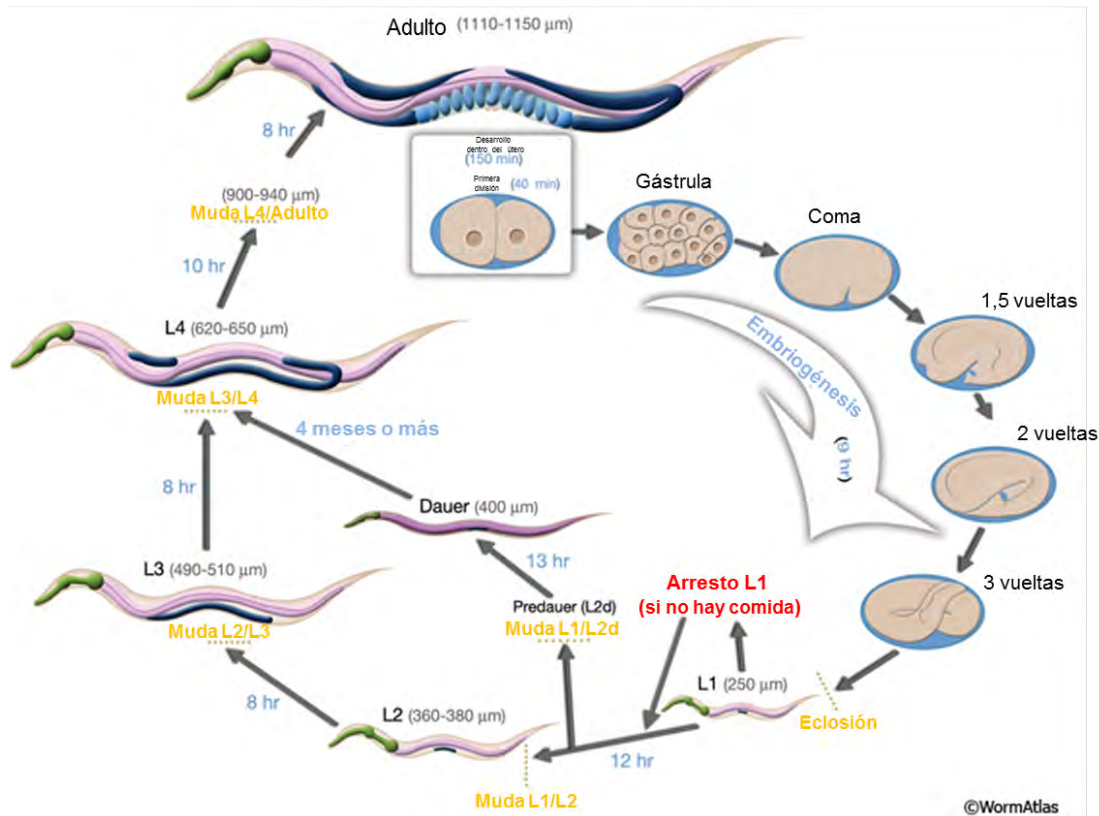


Figura 3. Ciclo de vida del *C. elegans* a 22 °C. En el esquema se muestran el desarrollo embrionario, las cuatro etapas larvales L1, L2, L3 y L4 y el estadio adulto. Si los animales son privados de comida detienen su crecimiento en dos diferentes etapas: al inicio del estadio larvario L1 y a finales del estadio L1 (“dauer”). Cuando las condiciones de alimentación se restablecen, los animales continúan su desarrollo (**Imagen tomada y modificada de <http://wormatlas.org/>**).

1.3. Sistema reproductor

El sistema reproductor del *C. elegans* hermafrodita se encarga de producir gametos masculinos y femeninos maduros. Además, provee la estructura y el ambiente necesarios para la autofertilización. Este sistema se divide en la gónada somática, la línea germinal y la vulva. En los animales hermafroditas la gónada somática y la línea germinal forman dos tubos simétricos en forma de “U” unidos a un útero común mediante la espermateca (**Figura 4**). Los machos solamente tienen un brazo de la gónada y en toda su etapa

reproductiva únicamente producen espermatozoides (**Figura 4**) (Hubbard and Greenstein 2000; Hubbard and Greenstein 2005).

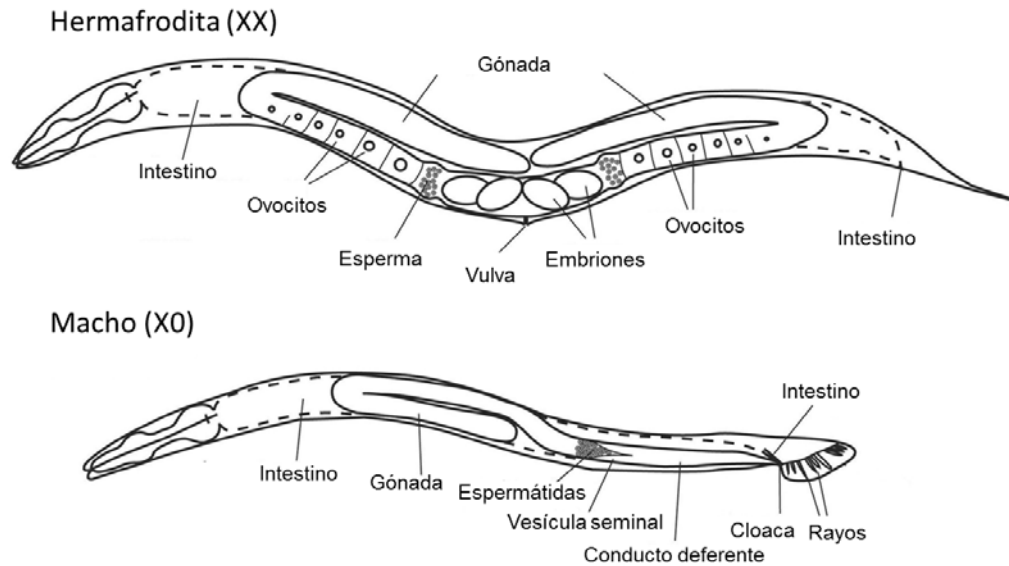


Figura 4. Estructura de la gónada del *C. elegans* en el adulto. Los hermafroditas y machos difieren notablemente en el tamaño del cuerpo y estructuras tales como la gónada somática y la cola. Muchos otros tejidos y órganos presentan dimorfismo sexual, en particular el sistema nervioso y la musculatura (**Imagen tomada y modificada de Zarkower (2006)**).

La gónada somática del hermafrodita está conformada por las células distales, las células de la vaina, la espermateca, la vulva y el útero (**Figura 5**). Por otro lado, la línea germinal es un sincicio de núcleos con membranas parciales organizados en zonas próximo-distales. Las células germinales en la región distal se mantienen en mitosis debido a una señalización tipo Notch que proviene de la célula distal. La célula distal expresa el ligando LAG-2, mientras que las células germinales expresan el receptor GLP-1. La interacción entre el LAG-2 y GLP-1 activa una vía de señalización tipo Notch (Cinquin et

al. 2010). Conforme las células germinales avanzan hacia la parte proximal entran en meiosis ya que pierden la señal del ligando LAG-2. El receptor GLP-1 se proteoliza, entra al núcleo y activa la transcripción de genes blanco. Cuando las células germinales llegan al asa de los brazos gonadales entran en paquíteno y adquieren membrana plasmática. En la región proximal los ovocitos adoptan una forma ovalada y se organizan en una sola fila (**Figura 5**) (Greenstein 2005; Hubbard and Greenstein 2005).

Cuando se celularizan, los ovocitos maduros pasan uno por uno a través de la espermateca y son fertilizados. Posteriormente, los embriones pasan al útero y finalmente son depositados en el medio. Los animales hermafroditas producen aproximadamente 300 embriones por autofertilización y más embriones si se aparea con un macho (1200 a 1400 embriones) (Corsi et al. 2015).

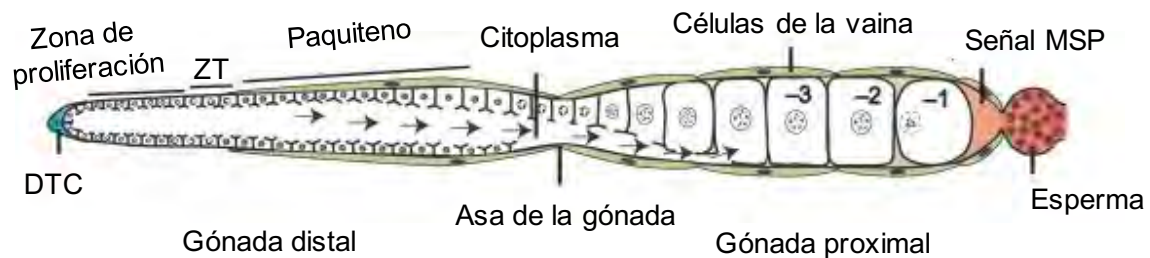


Figura 5. Representación esquemática de uno de los brazos de la gónada del *C. elegans* hermafrodita. Las células germinales están envueltas por membranas parciales formando un sincicio. El desarrollo de los ovocitos ocurre de la zona distal a la proximal. La zona de transición corresponde al lugar de la gónada donde las células germinales en mitosis entran en meiosis. El esperma que se produce en el estadio larvario L4 es almacenado en la espermateca. En la región más proximal de la gónada los ovocitos se muestran completamente formados. Célula distal (DTC). Zona de transición (ZT). Señal de la Major Sperm Protein (MSP) (**Imagen tomada y modificada de Kim et al. (2013)**).

1.3.1. Espermatogénesis y ovogénesis en el hermafrodita

Durante la segunda mitad del estadio larval L1 los precursores de la gónada somática Z1 y Z4 producen 12 células en el hermafrodita (**Figura 6**). Adicionalmente, los precursores de la línea germinal Z2 y Z3 comienzan a dividirse de forma continua desde el estadio larval L1 hasta la edad adulta (Kimble and Hirsh 1979).

En el estadio larval L2 las divisiones celulares del primordio de la gónada somática cesan, mientras que las células germinales continúan dividiéndose. Las células somáticas y germinales se encuentran mezcladas hasta la muda L2/L3. Una vez finalizada la muda L2/L3 se reorganizan las células y establecen lo que será la futura gónada. Las células distales (DTC) empiezan a migrar y la gónada empieza a alargarse (Kimble and Hirsh 1979).

En la etapa larvaria L4 las primeras 40 células germinales de cada brazo de la gónada que entran en meiosis se convierten en aproximadamente 160 espermatozoides (**Figura 6**). Una vez formados los espermatozoides son almacenados en la espermateca y utilizados en la fase adulta. Durante el resto del periodo reproductivo los animales hermafroditas adultos solamente producen ovocitos (Hubbard and Greenstein 2005).

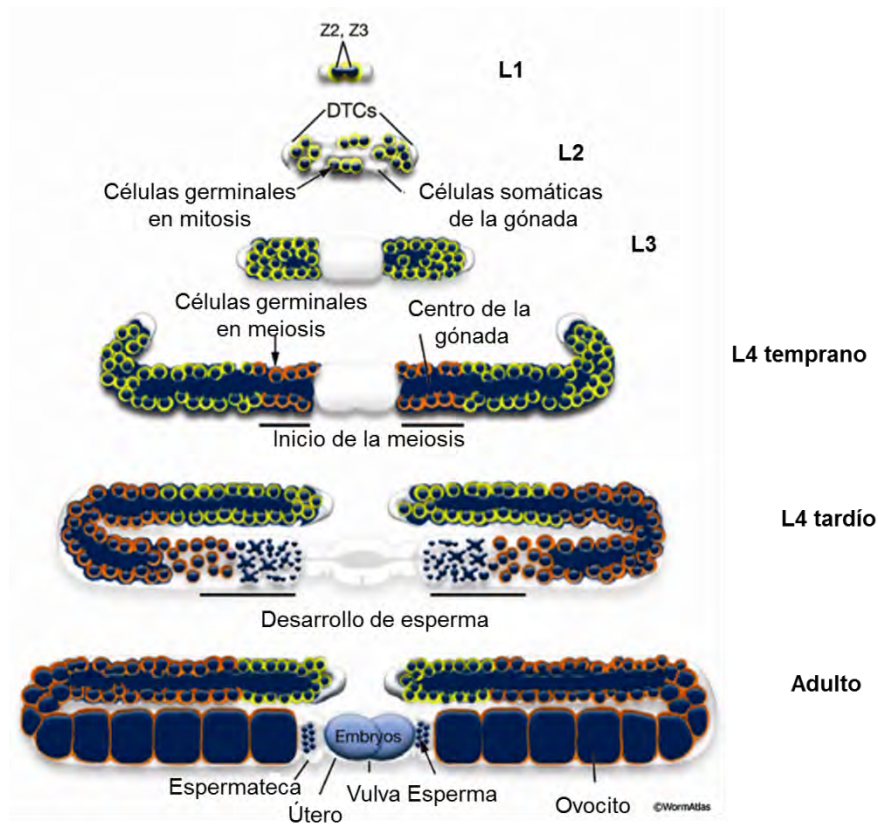


Figura 6. Desarrollo post-embrionario de la gónada del hermafrodita. Representación esquemática del desarrollo de la línea germinal durante las etapas larvales (L1-L4) y estadio adulto del *C. elegans*. Células distales (DTCs). Precursores de la línea germinal (Z2 y Z3) (Imagen tomada y modificada de <http://wormatlas.org/>).

1.3.2. Maduración del ovocito

En la gónada de *C. elegans*, la progresión meiótica ocurre en regiones espacialmente restringidas. Inmediatamente al salir de la región mitótica en la parte distal, las células germinales entran en meiosis y permanecen por un tiempo prolongado en la fase de paquíteno. Las células germinales salen de paquíteno en el asa de la gónada, en un proceso que depende de la activación de la vía RAS-MPK-1 (Church et al. 1995) (**Figura 7**).

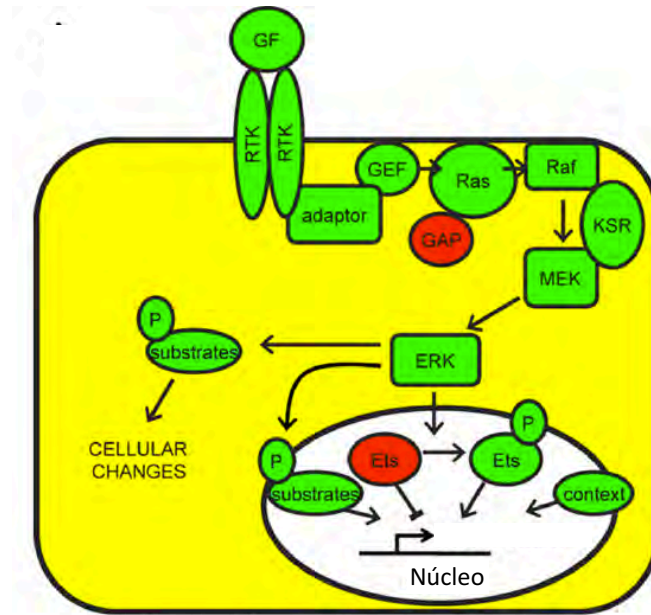


Figura 7. Representación esquemática de la activación canónica de RAS-MPK-1. La unión del ligando al receptor con dominios tirosín cinasa da como lugar la autofosforilación del receptor. El receptor fosforilado es reconocido por proteínas adaptadoras, como GRB2 y SOS. Posteriormente, se produce la activación de Ras. Ras pertenece a la superfamilia de proteínas con actividad de guanósín trifosfatasa (GTPasa). El Ras inactivo se encuentra unido al difosfato de guanósina (GDP), mientras que su forma activa se da cuando está unido al trifosfato de guanósina (GTP). La activación de Ras pone en marcha una cascada de reacciones en las cinasas distales que acaba provocando cambios en la expresión génica. La activación del Ras es contrarrestada por otra proteína activadora de la GTPasa llamada GAP. El Ras activado se une a Raf, que se une y fosforila a MEK. La última cinasa de la vía (ERK) penetra en el núcleo y allí fosforila ciertos factores de transcripción, como c-jun y c-fos, que, a su vez, activan la expresión genes específicos (**Imagen tomada y modificada de Sundaram (2013)**).

En presencia de nutrientes, DAF-2 activa la vía de RAS-MPK-1 un poco antes del asa de la gónada. La activación de MPK-1 en la primer zona (zona 1) permite la progresión meiótica y la producción de ovocitos (Lopez et al. 2013). MPK-1 es rápidamente desfosforilado cuando los ovocitos entran en diplóteno y diacinesis (Hajnal and Berset

2002). Conforme los ovocitos se mueven hacia la espermateca, la señal de MSP (Major Sperm Protein) reactiva la fosforilación de MPK-1 en el ovocito más proximal para permitir su maduración y ovulación (**Figura 8 A y B**) (Miller et al. 2001). Por otro lado, la activación de la MPK-1 se ve afectada en la zona 1 cuando hay una baja en los nutrientes disponibles y/o una falla en la señalización mediada por DAF-2. Esto genera una baja en la progresión meiótica y producción de ovocitos (**Figura 8 C**). Cuando los espermatozoides se acaban, la activación de la MPK-1 en la zona 2 no se lleva a cabo por lo que la progresión meiótica y producción de ovocitos también bajan (Lopez et al. 2013).

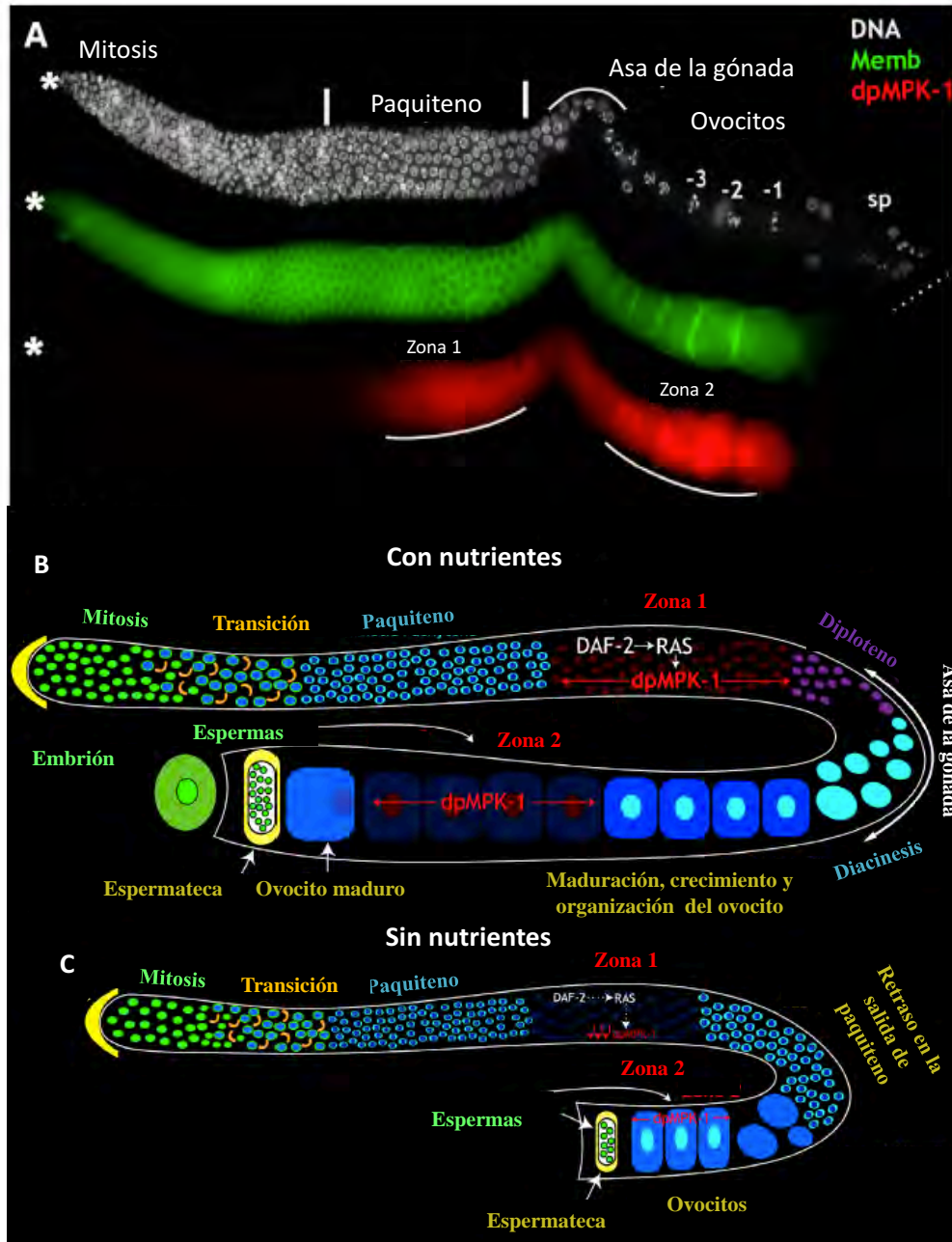


Figura 8. Activación de la MPK-1 en la gónada de *C. elegans*. (A) Gónadas disecadas de animales adultos orientadas de izquierda (Célula distal, indicada con el asterisco) a derecha (células germinales) fueron inmunoteñidas con un marcador de membrana (verde), la activación de dpMPK-1 (rojo) y DAPI (gris). Representación esquemática de la activación de la MPK-1 en la gónada de animales alimentados (B) y animales sometidos a un ayuno prolongado (C) (Imagen tomada y modificada de Lopez et al. (2013)).

1.4. Apoptosis durante el desarrollo del *C. elegans*

Estudios en el nemátodo *Caenorhabditis elegans* han establecido que la muerte celular programada o apoptosis es controlada por un conjunto de genes específicos evolutivamente conservados. Los genes se han ordenado y clasificado en una vía genética que consta de cuatro fases distintas (**Figura 9**). En la fase de activación, una célula recibe señales para activar su muerte programada. En fase de ejecución, la maquinaria central de apoptosis se activa. En la fase de fagocitosis se ejecuta el proceso de apoptosis, la fragmentación del DNA cromosomal y la fagocitosis de la célula en apoptosis por una célula vecina. Por último, en la fase de degradación, la célula fagocitada es degradada. Cabe mencionar que la vía de muerte celular programada en *C. elegans* podría no ocurrir de manera secuencial como se muestra en la **Figura 9**, si no que algunos de los pasos podrían ocurrir de forma paralela.

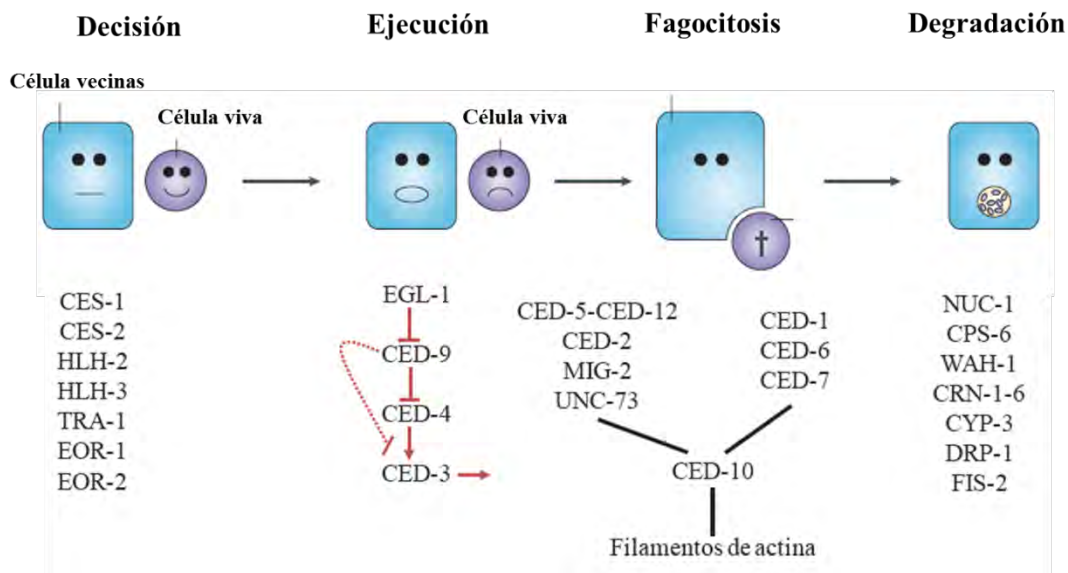


Figura 9. Vía genética de activación de la apoptosis en *C. elegans*. El proceso de apoptosis en *C. elegans* se compone de 4 pasos: activación, ejecución, fagocitosis y degradación. Debajo de cada etapa se indican las proteínas que participan en cada proceso (Imagen tomada y modificada de Lettre and Hengartner (2006)).

Durante el ciclo de vida del *C. elegans* la apoptosis ocurre en tres etapas del desarrollo y distintos tipos celulares; en células somáticas durante el desarrollo embrionario y post-embrionario (apoptosis somática) y en las células germinales de la gónada del hermafrodita adulto (apoptosis de la línea germinal) (Adams and Cory 2001; Gartner et al. 2008).

La apoptosis somática y de la línea germinal comparten componentes centrales de la maquinaria de apoptosis, sin embargo difieren en su activación (**Figura 10**) (Horvitz 1999; Gartner et al. 2008). Mientras que la apoptosis durante el desarrollo somático es programada por el linaje celular, la apoptosis de la línea germinal se produce, en condiciones normales, como parte del proceso de ovogénesis (Gumienny et al. 1999).

Una categoría de la apoptosis de la línea germinal, denominada apoptosis fisiológica, se encarga de reducir el número de células que completan la ovogénesis. Se calcula que cerca del cincuenta por ciento de las células germinales son eliminadas a través del proceso de muerte celular programada (Gumienny et al. 1999). Se ha propuesto que el exceso de células germinales puede servir como una población de células nodrizas, las cuales proveen los componentes citoplasmáticos necesarios para la formación de gametos femeninos maduros (Derry et al. 2001). Hasta el momento no se ha podido diferenciar a las células nodriza de las que se convertirán en ovocitos, debido a que la gónada del *C. elegans* es un sincicio de núcleos con membranas parciales. La vía de activación de la apoptosis fisiológica es aún desconocida. Sin embargo, se ha demostrado que las proteínas EGL-38 y PAX-2 activan la transcripción de *ced-9* (homólogo de Bcl-2) mientras que LIN-35 (homólogo de Rb) la reprime (Park et al. 2006; Schertel and Conradt 2007). Por otro lado, las proteínas DPL-1, EFL-1 y EFL-2 regulan la transcripción de *ced-3* (única caspasa funcional) y *ced-4* (homólogo de Apaf-1) (Schertel and Conradt 2007). Mientras que la

actividad antiapoptótica de CSP-2 consiste en inhibir la autoactivación del zimógeno pro-CED-3 en condiciones de sobrevivencia (**Figura 10A**) (Geng et al. 2009).

Una segunda categoría de este tipo de muerte es denominada apoptosis de las células germinales inducida por estrés. Este fenómeno es activado por: (1) infección por patógenos, (2) daño a DNA y (3) estrés ambiental. Las infecciones por patógenos como *S. typhimurium* y *S. enterica* inducen apoptosis de las células germinales a través de la activación de *egl-1/BH3* (Aballay and Ausubel 2001). Las infecciones por virus (RNAi y cosupresión) requieren del gen *cep-1/p53* para inducir apoptosis (**Figura 10B**). En el caso de la apoptosis inducida por daño a DNA se requiere de las proteínas EGL-1, *cep-1/p53* y la maquinaria de reparación de daño a DNA para su activación (Gartner et al. 2000; Derry et al. 2001). *lin-35*, *dpl-1* y *efl-2* actúan río abajo o en paralelo a *cep-1/p53* y *ced-13* controlando la expresión de genes blanco no identificados. *pmrt-5* actúa como inhibidor de la apoptosis inducida por radiación (**Figura 10C**) (Yang et al. 2009).

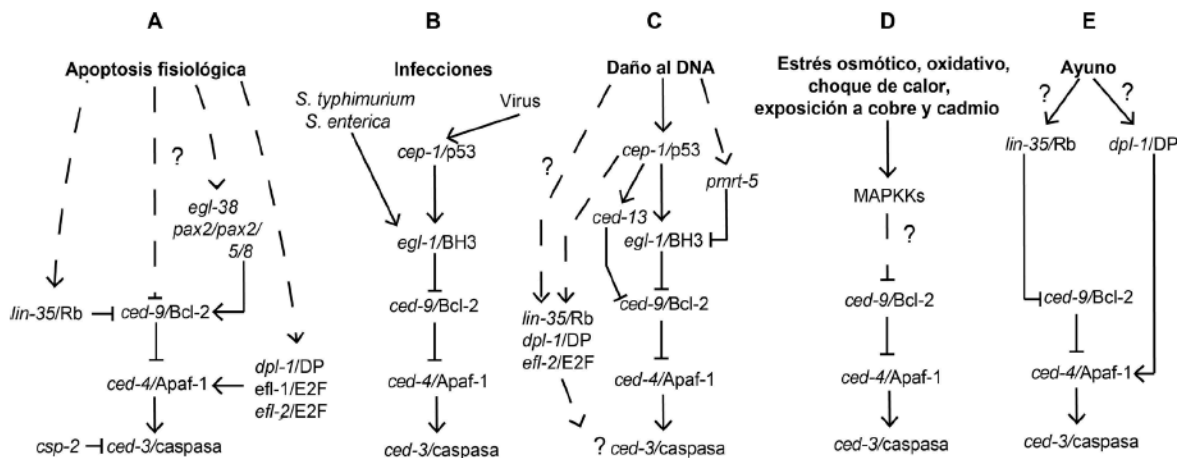


Figura 10. Tipos de inducción de la apoptosis en la línea germinal de *C. elegans*. (A-E) Diferentes vías de inducción de apoptosis convergen en la maquinaria central de apoptosis (*CED-9*, *CED-4* y *CED-3*). En el esquema se indican los genes que participan en cada vía. Los signos de interrogación indican que la vía todavía no ha sido esclarecida. (**Imagen tomada y modificada de Lascarez-Lagunas et al. (2014)**).

Estudios realizados en animales silvestres muestran que el estrés oxidativo, osmótico, choque de calor y ayuno aumentan la apoptosis fisiológica de las células germinales. Se ha descrito que la apoptosis inducida por estrés osmótico, oxidativo y choque de calor es regulada por las MAP-quinasas de la vía de JNK y p38 (Salinas et al. 2006). Además, se demostró que estos procesos de inducción de muerte celular son independientes de las proteínas EGL-1 y *cep-1/p53* (**Figura 10D**) (Salinas et al. 2006). La inducción de apoptosis por ayuno requiere de los genes *lin-35/Rb* y *dpl-1/DP*, los cuales disminuyen la expresión del gen *ced-9* y aumentan la expresión de *ced-4* respectivamente (**Figura 10E**) (Lascarez-Lagunas et al. 2014).

1.5. Factores de transcripción

Los factores de transcripción son proteínas que controlan la expresión de ADN a ARN mensajero. Estas proteínas controlan la tasa de transcripción por si solas o asociados a complejos proteicos mediante el reclutamiento de la ARN polimerasa a genes específicos. Los activadores transcripcionales promueven la tasa de transcripción, mientras que los represores transcripcionales bloquean la tasa de transcripción (Karin 1990; Latchman 1997).

Los factores de transcripción presentan en su estructura un dominio de unión a ADN (DBD), un dominio de *trans*-activación (TAD) y algunas veces un dominio sensor de señal (SSD) (**Figura 11**) (Latchman 1997; Warnmark et al. 2003). El dominio DBD reconoce y se une a secuencias específicas de ADN río arriba de un gen regulado. A estas secuencias se les denomina elemento de respuesta o secuencias promotoras. Por otro lado, el dominio TAD contiene sitios de unión a otras proteínas como reguladores transcripcionales. El dominio SSD sensa señales externas y transmite estas señales al resto del complejo de

transcripción, lo que resulta en una activación o represión de la expresión génica. Los dominios DBD y SSD pueden residir en proteínas separadas que se asocian en el complejo de transcripción para regular la expresión génica. Los remodeladores de la cromatina, coactivadores, cinasas, metilasas, acetilasas y desacetilasas de histonas a pesar de que juegan un papel crucial en la regulación de genes no se clasifican como factores de transcripción, ya que carecen de dominios de unión al ADN (Brivanlou and Darnell 2002).



Figura 11. Representación esquemática de un factor de transcripción. El orden y el número de dominios pueden diferir en diversos tipos de factores de transcripción. Dominio de unión a ADN (DBD). Dominio de *trans*-activación (TAD). Dominio sensor de señal (SSD).

1.5.1. Factores de transcripción miembros de la familia *d4*

Los factores de transcripción miembros de la familia *d4* son proteínas con dedos de zinc estructuralmente conservadas (**Figura 12 y 13**). Se ha reportado que miembros de la familia *d4* están involucrados en procesos como desarrollo neuronal, desarrollo de corazón y músculo esquelético, muerte celular programada y diferenciación celular (Buchman et al. 1992; Gabig et al. 1994; Chestkov et al. 1996; Wu et al. 2007; Lange et al. 2008; Lim et al. 2010a; Lim et al. 2010b; Tando et al. 2010). Las proteínas de la familia *d4* tienen en su estructura tres dominios: un dominio denominado 2/3 en la región N-terminal, un dedo de zinc tipo Krüppel (C2H2) en la parte central y dos motivos PHD/d4 (plant homeodomain)

dispuestos en tándem en la región C-terminal (**Figura 12**) (Gabig et al. 1998; Mertsalov et al. 2000; Nabirochkina et al. 2002). La mayoría de factores de transcripción con dedos de zinc tipo Krüppel pueden unir ADN o ARN (Miller et al. 1985; Theunissen 1992). La estructura de los dedos de zinc tipo PHD (Cx2CxnCx2Cx4Hx2CxnCx2C) es muy similar a la estructura del dominio LIM y a la estructura de dedos de zinc tipo RING. Además, se ha visto que los dedos de zinc tipo PHD son encontrados en muchos represores y co-activadores transcripcionales (Aasland et al. 1995; Saha et al. 1995).

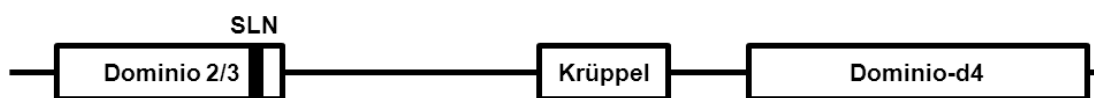


Figura 12. Representación esquemática de los factores de transcripción miembros de la familia *d4*. Dominio 2/3: Región N-terminal codificada por exones 2 y 3. SLN: Secuencia de localización Nuclear. Dedos de zinc tipo Krüppel y dominio *d4*:

Las proteínas que comprenden a la familia *d4* en mamíferos están conformadas por DPF1/*neuro-d4*, DPF2/*requiem/ubi-d4* y DPF3/*cer-d4* (**Figura 13**). DPF2/*requiem/ubi-d4* fue originalmente descrito como una proteína con dedos de zinc que se requiere para inducir la respuesta apoptótica de células mieloides ante la privación de IL-3 (Gabig et al. 1994). Al analizar el patrón de expresión de DPF2/*requiem/ubi-d4* se determinó que su expresión es ubicua a lo largo del desarrollo de ratón (Gabig et al. 1998). En este mismo trabajo se determinó que DPF2/REQ se encuentra en fracciones nucleares y citoplasmáticas de células de leucemia humanas K562 (Gabig et al. 1998). En otros ensayos se observó que la sobre expresión de DPF2/REQ en células CHO tiene un efecto negativo sobre el crecimiento celular e induce un aumento en la actividad de la caspasa-9 bajo condiciones normales de crecimiento o bajo el tratamiento de estaurosporina (Lim et al. 2010b). Por

otro lado, DPF1/*neuro-d4* y DPF3/*cer-d4* fueron descritos originalmente como reguladores transcripcionales de un grupo de genes específicos de neuronas (Buchman et al. 1992). Adicionalmente, se determinó que la expresión de DPF1/*neuro-d4* y DPF3/*cer-d4* a lo largo del desarrollo de ratón es única del sistema nervioso central y sistema nervioso periférico (Ninkina et al. 2001; Mertsalov et al. 2008; Kulikova et al. 2013).

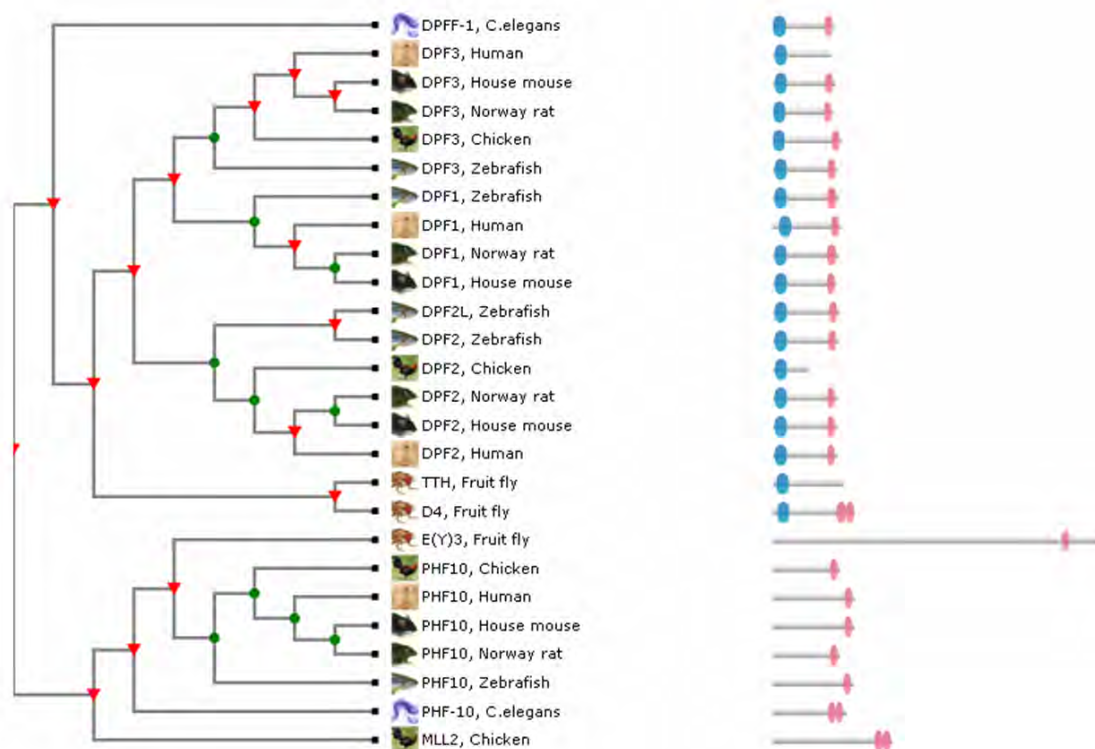


Figura 13. Árbol filogenético de los factores de transcripción miembros de la familia *d4*. Dominio 2/3: Región N-terminal codificada por exones 2 y 3 (azul). Dominio d4 (motivos PHD, naranja) (Imagen tomada de <http://www.treefam.org/family/TF318971#tabview=tab1>).

Mediante ensayos de inmunoprecipitación *in vitro* se demostró que las proteínas DPF1/NEURO-D4, DPF2/REQ, DPF3/CER-D4 y PHF10 se asocian con subunidades del complejo SWI/SNF (Lessard et al. 2007). PHF10 es un parálogo de la familia *d4* que

únicamente contiene motivos PHD/d4 (plant homeodomain) en la región C-terminal (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/55274>) (**Figura 13**). En estudios posteriores se encontró que DPF3/CER-D4 interacciona con histonas cuyos residuos de lisina han sido acetilados o metilados (Lange et al. 2008), mientras que DPF2/REQ interacciona a través de su localización nuclear con varias subunidades del complejo Brm-type SWI/SNF y la proteína p52 NF- κ B (Tando et al. 2010). En ensayos más recientes se ha demostrado que DPF1, 2 y 3 interaccionan de manera específica con las subunidades de clase BAF (Brg/Brm-associated factors) del complejo SWI/SNF (Middeljans et al. 2012).

Ensayos *in vivo* en ratones “*knockout*” para los genes DPF1/*neuro-d4* y DPF3/*cer-d4* mostraron que los ratones mutantes no tienen defectos somáticos o reproductivos (Mertsalov et al. 2008). Por otro lado, el silenciamiento genético mediado por morfolinós de *dpf3* en pez cebra conduce a la torsión incompleta del tubo cardíaco y una severa reducción en la contractilidad ventricular (Lange et al. 2008).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los factores de transcripción de la familia *d4* de vertebrados se describieron originalmente como genes implicados en la determinación del destino celular y la muerte celular programada. Recientemente, se ha demostrado que los miembros de la familia *d4* de vertebrados juegan un papel en el desarrollo neuronal, el desarrollo de corazón y el desarrollo de músculo esquelético cuando interactúan con las proteínas de clase BAF del complejo SWI/SNF. *dpff-1* es el único miembro de la familia *d4* reportado en el genoma de *C. elegans*. Sin embargo, no se conoce la función biológica de DPFF-1 durante el desarrollo de *C. elegans*.

3. HIPÓTESIS

La inactivación del gen *dpff-1* en *C. elegans* afectará la apoptosis de la línea germinal inducida por ayuno y choque de calor.

4. OBJETIVO GENERAL

Conocer la función del gen *dpff-1* en el desarrollo de *C. elegans* en condiciones normales de crecimiento y bajo diferentes tipos de estrés.

4.1.OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar la localización de la proteína DPFF-1 en el desarrollo de *C. elegans*.
 - a. Generar animales transgénicos mediante el sistema MosSCI que expresan el reportero GFP fusionado al gen *dpff-1*.
2. Generar un alelo mutante para el gen *dpff-1* mediante el sistema CRISPR-Cas-9.
3. Evaluar los fenotipos de los animales mutantes en *dpff-1* en el desarrollo de *C. elegans* en condiciones normales de crecimiento y de estrés como ayuno y choque de calor.
 - a. Analizar si los animales mutantes en *dpff-1* muestran un fenotipo evidente, p. Ej. Cambios en el número de prole, letalidad embrionaria, tiempo de vida, defectos en movilidad, etc.
 - b. Analizar si los animales mutantes en *dpff-1* presentan defectos en la apoptosis fisiológica y la apoptosis de la línea germinal inducida por ayuno y choque de calor.
 - c. Determinar si la sobrevivencia de los animales mutantes en *dpff-1* se afecta ante un estrés por choque de calor.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Cepas y condiciones de crecimiento

Las cepas de *C. elegans* se mantuvieron de acuerdo a procedimientos estándar de crecimiento (Brenner 1974). Los animales se crecieron a 20°C, 24°C o bajo cambios de temperatura durante su desarrollo; los animales se crecieron inicialmente a 20°C, se seleccionaron en el estadio larval L4 y posteriormente se incubaron a 24°C. Las cepas se muestran en la **Tabla 1** se utilizaron en este trabajo.

Tabla 1. Cepas utilizadas para esta tesis

Cepa	Genotipo	Referencia
Bristol N2	Silvestre	(Brenner 1974)
TM4287	<i>dpff-1(tm4287)</i>	(Villanueva-Chimal et al. 2017)
MD701	<i>bcIs39 [P_{lim-7}::ced-1::gfp; lin-15(+)]</i>	(Schumacher et al. 2005)
EG6699	<i>ttTi5605 II; unc-119(ed3) III; oxEx1578</i>	(Frokjaer-Jensen et al. 2008; Frokjaer-Jensen et al. 2012)
RN019	<i>xmSi09 [P_{dpff-1}::gfp::dpff-1::dpff-1 3'utr; Cbr-unc-119(+)]</i> II	(Villanueva-Chimal et al. 2017)
RN031	<i>xmSi25 [P_{dpff-1}::dpff-1::gfp::dpff-1 3'utr; Cbr-unc-119(+)]</i> II	(Villanueva-Chimal et al.)

		2017)
RN045	<i>dpff-1(xm17)</i>	(Villanueva-Chimal et al. 2017)
RN046	<i>ced-1::gfp; dpff-1(tm4287)</i>	(Villanueva-Chimal et al. 2017)
RN048	<i>ced-1::gfp; dpff-1(xm17)</i>	(Villanueva-Chimal et al. 2017)
SJ4058	<i>zcIs9 [hsp-60::GFP + lin-15(+)] V</i>	(Yoneda et al. 2004)
TJ375	<i>gpIs1[Phsp-16-2::GFP]?</i>	(Rea et al. 2005)

5.2. Sincronización de animales

Se colectaron animales adultos grávidos de los genotipos requeridos con amortiguador M9 1X (Na₂HPO₄ 42 mM, KH₂PO₄ 22 mM, NaCl 86 mM y MgSO₄ 1 mM). Se lavaron los animales con 10 ml de amortiguador M9 1X para quitar la mayor cantidad de bacteria, dejando un volumen de 800 µl. Posteriormente se agregaron 800 µl de cloro comercial y 200 µl de hidróxido de sodio (NaOH) 5 N. La mezcla se agitó en un vortex durante 5 min o hasta que los cuerpos de los gusanos dejaron de ser visibles a contra luz. Las muestras se centrifugaron a 8000 rpm durante 30 segundos y posteriormente se retiró el sobrenadante. El pellet de embriones se lavó tres veces con 10 ml de amortiguador M9 1X. Después del último lavado, se retiró la mayor cantidad de amortiguador M9 1X. Los

embriones fueron transferidos a un tubo Falcon® en un volumen final de 8 ml de M9 1X e incubados en agitación constante durante toda la noche a 20°C o 24°C para permitir la eclosión de las larvas L1.

5.3. ARN de interferencia (RNAi)

El plásmido para silenciar el gen *dpff-1* se obtuvo de una librería comercial de RNAi (OpenBiosystems) (Rual et al. 2004) y se verificó por secuenciación. El ARN de interferencia (RNAi) se realizó por alimentación a 24°C de acuerdo a las especificaciones de Timmons et al. (2001) y Conte and Mello (2003). Brevemente, el plásmido vacío (PV) pPD129.36 y los plásmidos para silenciar los genes *dpff-1* y *ced-1* se crecieron en la cepa *E. coli* HT115 (DE3). Para inducir la síntesis de ARN de doble cadena se siguieron dos protocolos:

5.3.1. Inducción de ARN de doble cadena en bacterias crecidas en cultivo sólido

Las bacterias HT115 transformadas se incubaron por una noche en medio LB adicionado con 50 µg/ml de ampicilina y 12.5 µg/ml de tetraciclina. Se colocaron 300 µl del cultivo en tubos de 1.5 ml y se centrifugó a 10000 rpm por un minuto. Se retiró la fracción líquida dejando aproximadamente 60 µl de volumen en el tubo. El pellet de bacterias se resuspendió y se colocó en placas con medio NGM (Agar 30 g/l, NaCl 3 g/l, peptona 2.5 g/l, amortiguadores de fosfatos 25 mM y colesterol 5 mg/l) suplementado con 50 µg/ml de ampicilina, 12.5 µg/ml de tetraciclina y 1 mM de IPTG. Las cajas se incubaron a temperatura ambiente durante 16 horas en ausencia de luz. Posteriormente, animales en el estadio L4 se colocaron en las cajas para que se alimentaran de las bacterias que tenían

ARN de doble cadena y de este modo poder silenciar el gen de interés. Los animales de los genotipos indicados se crecieron por una generación a 24°C en presencia de las bacterias con el plásmido vacío o de las bacterias con el plásmido para silenciar al gen de interés. Finalmente, animales F1 en el estadio L4 se seleccionaron y crecieron hasta que alcanzaron su etapa adulta a 24°C.

5.3.2. Inducción de ARN de doble cadena en bacterias crecidas en cultivo en líquido

Las bacterias que contienen el plásmido que expresa el gen a silenciar o plásmido vacío se crecieron en agitación constante a 37°C hasta una densidad óptica de 0.6 en un cultivo de un litro. Una vez alcanzada la densidad óptica en el cultivo, se agregó IPTG (0.4 mM concentración final) y se incubó por 2 horas adicionales a 37°C. El cultivo de bacterias se centrifugó a 12000 rpm durante 15 min a 4°C y el pellet de bacterias se resuspendió en 1/10 del volume original medio LB con 50 µg/ml de ampicilina y 12.5 µg/ml de tetraciclina, 0.4 mM IPTG y 25% v/v de glicerol. Por último, 1 ml de bacterias fueron dispensadas en tubos de 1.5 ml, congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a -70°C. Para iniciar los experimentos de ARN de interferencia (RNAi), se descongelaron las baterías inducidas y se centrifugó a 8200 rpm por 1 minuto. El pellet de bacterias fue resuspendido en 100 µl de medio LB con antibióticos e IPTG y 15µl de bacteria resuspendida fue colocada en placas de 60 mm con medio NGM suplementado con 50 µg/ml de ampicilina, 12.5 µg/ml de tetraciclina. Las cajas de NGM con la bacteria inducida se pueden almacenar a 4°C por un periodo máximo de una semana.

5.4. Tinción DAPI

La tinción DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) en gónadas disecadas se realizó de acuerdo a las especificaciones de Lee et al. (2007). Brevemente, las gónadas de animales adultos de los genotipos indicados se disecaron en 30 μ l de M9 1X sobre un cubreobjetos utilizando jeringas de insulina. Posteriormente se colocaron los cubreobjetos con los animales hacia abajo sobre un portaobjetos con poli-L-lisina y se sumergieron en nitrógeno líquido. Una vez congelados, se retiró el cubreobjetos y las muestras se fijaron en metanol a -20°C por un minuto. Adicionalmente, las muestras se fijaron en una solución que contenía formaldehído al 3% y 100 mM de K_2HPO_4 (pH 7.2) por 20 min a temperatura ambiente. Las gónadas fijadas se incubaron con DAPI (1 ng/ μ l) disuelto en PBT 1X (PBS y Tween 20 al 0.5%) a temperatura ambiente por 10 min. Posteriormente las muestras se lavaron con PBT 1X por 5 min. Enseguida se agregó Vectashield Mounting Medium (Vector Labs) para prevenir fotoblanqueo. Por último, las muestras se sellaron con un cubreobjetos utilizando un esmalte de acrílico.

5.5. Análisis de inmunofluorescencia

La inmunolocalización de RME-2 en gónadas disecadas se realizó de acuerdo a las especificaciones de Salinas et al. (2007). Brevemente, los animales adultos de los genotipos indicados se disecaron en 30 μ l de M9 1X sobre un cubreobjetos utilizando jeringas de insulina para liberar las gónadas. Posteriormente se colocaron los cubreobjetos con los animales hacia abajo sobre un portaobjetos con poli-L-lisina y se sumergieron en nitrógeno líquido. Una vez congelados, se retiró el cubreobjetos y las muestras se fijaron en metanol a -20°C por un minuto. Adicionalmente, las muestras se trataron con una solución que contiene PBS 1X, paraformaldehído al 3.7%, 80 mM de HEPES, 1.6 mM de MgSO_4 y 0.8

mM de EGTA a temperatura ambiente por 20 min. Una vez fijadas se bloquearon con 30 μ l de una solución que contiene 2 ml de PBT 1X, 0.9 ml de suero de cabra (NGS) y 0.12 ml de azida de sodio al 0.5% por 2 h. Al finalizar el bloqueo, se lavaron con PBT 1X por 10 min. Posteriormente, las muestras se incubaron toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario α -RME-2 (1:100) de acuerdo a las especificaciones de Grant and Hirsh (1999). Al día siguiente, las muestras se lavaron nuevamente con PBT 1X y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-conejo Alexa Fluor 488 (1:100; MolecularProbes) y DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol, 1 ng/ μ l) a temperatura ambiente por 2 h. Posteriormente se lavaron nuevamente con PBT 1X por 5 min. Enseguida se colocaron 20 μ l de Vectashield Mounting Medium (Vector Labs) para prevenir fotoblanqueo. Las muestras se sellaron colocando un esmalte de acrílico alrededor del cubreobjetos.

La inmunolocalización de la histona H3 fosforilada (H3P) en gónadas disecadas se realizó de acuerdo a las especificaciones de (Kadyk and Kimble 1998). Brevemente, los animales adultos de los genotipos indicados se disecaron en 30 μ l de M9 1X sobre un cubreobjetos utilizando jeringas de insulina para liberar las gónadas. Posteriormente se colocaron los cubreobjetos con los animales hacia abajo sobre un portaobjetos con poli-L-lisina y se sumergieron en nitrógeno líquido. Una vez congelados, se retiró el cubreobjetos y las muestras se fijaron en metanol a -20°C por un minuto. Adicionalmente, las muestras se trataron con una solución que contiene PBS 1X, paraformaldehído al 3.7%, 80 mM de HEPES, 1.6 mM de MgSO₄ y 0.8 mM de EGTA a temperatura ambiente por 20 min. Una vez fijadas se bloquearon con 30 μ l de una solución que contiene 2 ml de PBT 1X, 0.9 ml de Suero de cabra (NGS) y 0.12 ml de azida de sodio al 0.5% por 2 h. Al finalizar el bloqueo, se lavaron con PBT 1X por 10 min. Posteriormente, las muestras se incubaron toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario α -H3P (1:10; Fisher Scientific, catálogo: 06-

570). Al día siguiente, las muestras se lavaron nuevamente con PBT 1X y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-conejo Alexa Fluor 488 (1:100; MolecularProbes) y DAPI (1 ng/ μ l) a temperatura ambiente por 2 h. Posteriormente se lavaron nuevamente con PBT 1X por 5 min. Enseguida se colocaron 20 μ l de Vectashield Mounting Medium (Vector Labs) para prevenir fotoblanqueo. Las muestras se sellaron colocando un esmalte de acrílico alrededor del cubreobjetos.

5.6. Western blot

100 gusanos hermafroditas adultos de los genotipos indicados se crecieron 24°C, se colectaron en 9 μ l de una solución de PBS 1X y se agregaron 2.4 μ l de buffer de carga para proteína 6X y 2.6 μ l de DTT 1M. Para la extracción de proteína total, las muestras se hirvieron por 5 min a 95°C y se centrifugaron por 1 min a 13,000 rpm. El sobrenadante de cada muestra se cargó en un gel de poli-acrilamida al 10 u 8%. Las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa por electroforesis. La membrana se bloqueó con 5% de leche en una solución de TBS-Tween 0.1% (50 mM Tris-Hcl pH 7.6, 150 mM NaCl) con. Posteriormente, la membrana se incubó toda la noche a 4°C con un anticuerpo anti-pMPK-1 (Cell Signaling Technology, Catálogo: 9101) diluido 1:1000 en una solución de TBS con 5% de leche y con 0.5% de Tween 20. Al día siguiente la membrana se lavó con una solución de TBS-Tween y se incubó una hora a 4°C con un anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a peroxidasa (H+L) (Thermo Fisher Scientific, Catálogo: 32460) diluido 1:1000 en una solución de TBS con 5% de leche y con 0.5% de Tween 20, como control de carga se utilizó el anticuerpo monoclonal α -tubulina (Sigma-Aldrich, Catálogo: T9026) diluido 1:500. La membrana se lavó nuevamente y se reveló en un cuarto oscuro

utilizando las especificaciones del fabricante Super Signal West Femto Trial Kit (Thermo Fisher Scientific, Catálogo: 34096).

5.7. Extracción de ARN

La extracción de ARN se realizó de acuerdo a las especificaciones de Lascarez-Lagunas et al. (2014). Brevemente, se disecaron aproximadamente 100 gónadas de animales silvestres adultos crecidos con bacteria o sometidos a 6 h de ayuno a 24°C. La extracción de ARN total se realizó con el reactivo TRIzol (Invitrogen) y perlas de vidrio. Se agregó 100 µl de cloroformo a cada muestra, se agitó por 15 s en el vortex y se incubó a temperatura ambiente por 3 min. Las muestras se centrifugaron a 13400 rpm por 15 min. Al término de la centrifugación se tomó la fase superior y se colocó en un tubo nuevo. A cada tubo se le agregaron 250 µl de isopropanol, se agitó por 15 s en el vortex y se incubó a temperatura ambiente por 10 min. Posteriormente se centrifugaron las muestras a 13400 rpm por 3 min. Se decantó el sobrenadante y la pastilla de ARN se lavó con 500 µl de etanol al 75%. En seguida se centrifugaron las muestras a 7500 rpm por 5 min. El sobrenadante de etanol se decantó y los tubos se dejaron secar a temperatura ambiente durante 10 min. A cada tubo se le adicionaron 10 µl de agua tratada con DEPC. Se mezcló la pastilla de ARN con el vortex y se incubó a 60°C por 10 min. Finalmente se cuantificó la concentración de ARN en cada muestra con un NanoDrop (BioRad).

5.8. Análisis de la expresión de ARN mensajero mediante PCR de tiempo real

El análisis de la expresión de ARN mensajero mediante PCR tiempo real se realizó de acuerdo a las especificaciones de Lascarez-Lagunas et al. (2014). Brevemente, se utilizó 100 ng de ARN total en cada condición para sintetizar cDNA usando la transcriptasa reversa Im-Prom II (Promega) y oligos dT. El análisis de la expresión de ARN mensajero mediante PCR tiempo real (qRT-PCR) se realizó utilizando oligonucleótidos específicos diseñados con ayuda del software Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) (Untergasser et al. 2012). La amplificación se realizó con Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied biosystems). Cada reacción de 20 µl contiene 3 µl de Oligo FOW (250 nM), 3 µl de Oligo REV (250 nM), 1 µl de cDNA, 3 µl de H₂O milliQ estéril y 10 µl de SYBR Green PCR Master Mix. Para la detección se utilizó el sistema ABI Prism 7000 (Applied Biosystems). γ -Tubulina (*tbg-1*) se usó como control de amplificación. Los valores de *CT* (test gene threshold cycle) de cada gen se normalizaron con los valores de *CT* obtenidos para *tbg-1* en cada condición. Se utilizó el método comparativo *CT* descritos por (Livak and Schmittgen 2001) para obtener los niveles de expresión relativa. Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación se muestran en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Lista de oligonucleótidos utilizados en los experimentos de PCR de tiempo real

NOMBRE	Gen	Secuencia (5´-3´)	Tm	Fragmento que amplifica (pb)
<i>tbg-1_FOW</i>	<i>tbg-1</i>	CCTGTTGTCGATCCAAATGA	60	108
<i>tbg-1_REV</i>		AACCCGAGAAGCAGTTGAAA		
<i>ced-9_FOW</i>	<i>ced-9</i>	AAACGGAATGGAATGGTTTG	60	110
<i>ced-9_REV</i>		AATTTTCCGCGTGCTTCTT		
<i>dpff-1_FOW</i>	<i>dpff-1</i>	CGGCACTGCTTTTATGAACA	60	120
<i>dpff-1_REV</i>		CACTCAAGACACTGCCATCC		

5.9. Procesamiento de imágenes

Las micrografías se obtuvieron en un microscopio Nikon Eclipse E600 equipados con la cámara AxioCam MRc (Zeiss). Las imágenes se capturaron utilizando el programa AxioVision (Zeiss). Las imágenes se procesaron usando el programa ImageJ. Algunas imágenes se capturaron como un montaje con espacios sobrepuestos y se procesaron con el programa MosaicJ (Thévenaz and Unser 2007).

Para la cuantificación de la proteína verde fluorescente en las imágenes de los experimentos de choque térmico se utilizó el programa Image J (1.5ob, Wayne Rasband, National Institutes of Health). Para calcular y graficar las unidades relativas de fluorescencia se seleccionó en cada micrografía el área total de cada animal. La fluorescencia total corregida se calculó con la fórmula: fluorescencia total corregida

(CTF) = densidad integrada - (área seleccionada x media de fluorescencia de dos lecturas independientes) (<https://sciencetechblog.com/2011/05/24/measuring-cell-fluorescence-using-imagej/>) (Huelgas-Morales et al. 2016).

5.10. Ensayos de apoptosis

Para investigar el efecto de la falta de *dpff-1* en la apoptosis de la línea germinal se cruzaron los animales *dpff-1(tm4287)* y *dpff-1(xm17)* con la cepa transgénica MD701 *bcIs39 [P_{lim-7}::ced-1::gfp; lin-15(+)]* (Schumacher et al. 2005). El receptor de membrana CED-1 se expresa en las células de la vaina durante el proceso de fagocitosis de cuerpos apoptóticos. El transgen CED-1::GFP se usa comúnmente para la cuantificación de cuerpos apoptóticos bajo el microscopio de epifluorescencia. Los animales *ced-1::gfp; dpff-1(tm4287)*, *ced-1::gfp; dpff-1(xm17)* y *ced-1::gfp* se crecieron a 24°C. Posteriormente se montaron en un portaobjetos con agarosa al 2% y se anestesiaron con 20 µl de tetramisol 10 mM. Por último, los animales se observaron bajo el microscopio de epifluorescencia para cuantificar el número de cuerpos apoptóticos por brazo de gónada a las 24, 48 y 72 h post estadio larval L4. Por otro lado, para facilitar el conteo de cuerpos apoptóticos bajo microscopía Nomarski el gen *ced-1* se silenció por RNAi. Los animales con los genotipos indicados se crecieron a 24°C, se montaron en un portaobjetos con una cama de agarosa al 2%, se anestesiaron con tetramisol 10 mM y se observaron bajo microscopía Nomarski. Todos los análisis estadísticos se realizaron mediante una prueba t tipo Mann-Whitney (***) P<0.001) en el programa SIGMA-PLOT.

5.11. Condiciones de estrés

5.11.1. Apoptosis inducida por estrés

Las condiciones de estrés utilizadas en este trabajo se realizaron de acuerdo a las especificaciones de Derry et al. (2001), Salinas et al. (2006), Stergiou et al. (2007) y Silva-Garcia and Estela Navarro (2013). Brevemente, los animales *ced-1::gfp; dpff-1(tm4287)*, *ced-1::gfp; dpff-1(xm17)* y *ced-1::gfp* se crecieron a 24°C. Para inducir la apoptosis de la línea germinal por ayuno, animales adultos de los genotipos indicados se transfirieron a cajas NGM sin bacteria y mantenidos por 6 h a 24°C. Para inducir la apoptosis de la línea germinal por choque térmico, animales adultos de los genotipos indicados se transfirieron a cajas de 35 mm con NGM y bacteria. Los animales se incubaron en un baño de agua a 31°C por 3 h. Al finalizar el choque de calor los animales se recuperaron por 4.5 h a 24°C.

Al finalizar cada tratamiento de estrés, los animales adultos de los genotipos indicados se montaron en un portaobjetos con agarosa al 2% y se anestesiaron con 20 µl de tetramisol 10 mM. Por último, los animales se observaron bajo el microscopio de epifluorescencia para cuantificar el número de cuerpos apoptóticos por brazo de gónada. Todos los análisis estadísticos se realizaron mediante una prueba t tipo Mann-Whitney (***) $P < 0.001$) utilizando el programa SIGMA-PLOT.

5.11.2. Ensayos con reporteros de choque de térmico

Animales sincronizados *hsp-16.2::GFP* con los genotipos indicados se crecieron a 20°C. Entre 30-40 animales en el estadio L4 se colectaron en placas de 35 mm con medio NGM y bacteria OP50-1. Al día siguiente, los animales adultos se incubaron en un baño de agua a 35°C por 2 h y luego se dejaron recuperar por 4 h adicionales a 20°C (Dues et al. 2016). En el caso de animales que expresan el transgen *Psod-3::GFP* los experimentos se

realizaron bajo condiciones de ARN de interferencia a 20°C utilizando como control el plásmido vacío o silenciando el gen *dpff-1*(RNAi). Entre 30-40 animales en el estadio L4 se colectaron en placas de 35 mm con medio NGM y bacteria OP50-1. Al día siguiente, los animales adultos se incubaron en un baño de agua a 31°C por 8 h. Los animales que no fueron sometidos a ningún tipo de estrés se mantuvieron a 20°C todo el tiempo. Al finalizar los tratamientos, los animales fueron montados en un portaobjetos con una cama de agarosa al 2%, se anestesiaron con 20 µl de tetramisol 10 mM y se observaron bajo microscopía de epifluorescencia. La cuantificación de la fluorescencia se realizó con el software Image J, siguiendo las indicaciones de Huelgas-Morales et al. (2016).

5.12. Letalidad embrionaria después de un choque térmico

La cuantificación de la letalidad embrionaria después de un choque térmico se realizó de acuerdo a las especificaciones de Huelgas-Morales et al. (2016). Brevemente, animales adultos en los genotipos indicados se crecieron a 24°C y se dividieron dentro de dos grupos: animales control (24°C) y animales sometidos a un choque de calor de 31°C por 3h. Inmediatamente después del choque de calor, los animales de los genotipos indicados se montaron en un portaobjetos que contenía una cama de agarosa al 2% y se observaron bajo el microscopio Nomarski. El número de embriones y ovocitos maduros dentro de cada animal hermafrodita se determinó y se obtuvo el promedio. Los animales se recuperaron en cajas NGM con bacteria a 24°C y se permitió que depositaran embriones por 10 h (Grupo A). Posteriormente, los animales se transfirieron a nuevas cajas de NGM con bacteria a 24°C y se permitió que depositaran embriones por 12 h (Grupo B). Una vez más, los animales se transfirieron a cajas de NGM con bacteria a 24°C y se permitió que depositaran embriones por 24 h (Grupo C) (**Figura 29a**). La calidad de células germinales se evaluó

indirectamente a través de la cuantificación de la letalidad embrionaria. Los embriones que no eclosionaron 24 h después de ser depositados al medio fueron considerados muertos. La letalidad embrionaria de animales que no fueron sometidos al choque de calor se asignó como grupo control.

5.13. Ensayos de fertilidad

Animales hermafroditas en los genotipos indicados se crecieron a 20°C, 24°C o bajo cambios de temperatura durante su desarrollo. Animales en el estadio larval L4 se seleccionaron individualmente y se movieron a cajas de NGM con bacteria cada 24 h por 3 o 4 días. En cada caja se cuantificó el número de embriones muertos y descendencia viva cada 24 h. Los embriones que no eclosionaron 24 h después de ser depositados al medio fueron considerados muertos. Los porcentajes de cada categoría se muestran con SEM (Standard error of the mean). El número de animales analizados se muestra entre paréntesis. Todos los análisis estadísticos se realizaron mediante una prueba χ^2 tipo Mann-Whitney (***) ($P < 0.001$).

5.14. Construcción de transgenes

La clonación de genes para generar animales transgénicos por el método λ Mos1-mediated single copy insertion (MosSCI) (Frokjaer-Jensen et al. 2008; Frokjaer-Jensen et al. 2012) se realizó mediante el sistema λ Multisite Gateway Three Fragment Vector Construction Kit (Invitrogen). Para generar estos transgénicos se usó DNA genómico como templado y los oligonucleótidos anotados en la **Tabla 3**.

Los productos de PCR fueron purificados a partir de un gel de agarosa con el kit QIAquick Gel Extraction (QIAGEN). Los fragmentos purificados se clonaron por recombinación en los vectores donadores pDONRP4-P1R, pDONR221 y pDONRP2R-P3. Los insertos clonados en estos vectores se confirmaron por patrón de restricción y secuenciación.

Los plásmidos pDONRP4-P1R-*dpff-1* y pDONRP2R-P3-*dpff-1* se linealizaron por PCR con los oligonucleótidos enlistados en la la Tabla 3. La secuencia codificante de la *gfp* se amplificó del vector pCM1.53 (Addgene plasmid 17250) (Merritt et al. 2008) con los oligonucleótidos de la Tabla 3. Los productos de PCR se digirieron con la enzima de restricción DpnI (New England Biolabs) por 2 h y se purificaron a partir de un gel de agarosa al 2% con el kit QIAquick Gel Extraction (QIAGEN). La secuencia codificante de la *gfp* se fusionó después del ATG o antes del codón de paro del gen *dpff-1* mediante una reacción Gibson (Gibson et al. 2009). Para ello se mezclaron los productos de PCR linealizados de los plásmidos pDONRP4-P1R-*dpff-1* y pDONRP2R-P3-*dpff-1* con el producto de PCR de la *gfp*. Por último, los insertos clonados en los vectores pDONR se recombinaron en tandem en el plásmido destino pCFJ150 (Addgene plasmid 19329) (Frokjaer-Jensen et al. 2008).

Tabla 3. Lista de oligonucleótidos utilizados para la construcción de transgenes en *C. elegans*

NOMBRE	SECUENCIA 5' a 3'
attB4_ <i>dpff-1</i> _FOW	GGGGACAACCTTTGTATAGAAAAGTTGATGATGACCCTAAA AATTATCATAC
attB1r_ <i>dpff-1</i> _REV	GGGACTGCTTTTTTGTACAACTTGCTTAGATTATTCAGA TTTCAAATGGATC
attB1_ <i>dpff-1</i> _FOW	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAATGATAAAT CTTTAGAGCATTTAGG
attB2r_ <i>dpff-1</i> _REV	GGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTAAAGATCCACA ATTATGTGAAGAAG
attB2_ <i>dpff-1</i> _FOW	GGGGACAGCTTCTTGTACAAAGTGGTCAAATGTATTAGCT TCCTTCCTCTC
attB3_ <i>dpff-1</i> _REV	GGGGACAACCTTTGTATAATAAAGTTGTGATTCTTTGAACT TCCAATATTG
P4-P1R- <i>dpff-1</i> _FOW	GCTTCCGCCGGTACCTCCACTGCCACCGCTAGTACTCATTG TCTGTAAGATTAGCTGTCTTGGATTATTTTTAAAC
P4-P1R- <i>dpff-1</i> _REV	GGTGGCACAGGAGGAACGGGCGGTAGTGGAGGCACTGGTA TCTCGGAAAACGGATATATGGACCTGATGC
2R-P3- <i>dpff-1</i> _FOW	GCTTCCGCCGGTACCTCCACTGCCACCGCTAGTACTCTTCTT GGCCGGTGAC
2R-P3- <i>dpff-1</i> _REV	GGTGGCACAGGAGGAACGGGCGGTAGTGGAGGCACTGGTT AATGGTTCTCAAATATTATATTTATTCCAATATTT
GFP_FOW	AGTACTAGCGGTGGCAGTGGAGGTACCGGCGGAAGCAGTA AAGGAGAAGAACTTTTCAC

GFP_REV	ACCAGTGCCTCCACTACCGCCCGTTCCTCCTGTGCCACCTTT GTATAGTTCATCCATGCC
---------	--

5.15. Construcción de sgRNA

Usamos el plásmido pU6::*unc-119* sgRNA (Addgene plasmid 46169) (Friedland et al. 2013) como templado para generar el plásmido que expresa el sgRNA dirigido contra la secuencia de *dpff-1* en el genoma de *C. elegans*. El plásmido pU6::*unc-119* sgRNA se linealizó con los oligonucleótidos de la **Tabla 4**. Posteriormente, el producto de PCR se digirió con la enzima de restricción DpnI (New England Biolabs) por 2 h, se purificó de un gel de agarosa al 2% con el kit QIAquick Gel Extraction (QIAGEN) y se transformó en células competentes *E. coli* DH5 alpha. El plásmido pU6::*dpff-1* sgRNA se verificó por patrón de restricción y secuenciación.

Tabla 4. Lista de oligonucleótidos utilizados para la construcción del plásmido con un sgRNA dirigido a *dpff-1*

NOMBRE	SECUENCIA 5' a 3'
sgRNA_ <i>dp</i>	ACTGCATTAAATGGAATTCGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTT
<i>ff-1</i> _FOW	AAAATAAG
sgRNA_ <i>dp</i>	CGGAATTCCATTTAATGCAGTAAACATTTAGATTTGCAATTCAATT
<i>ff-1</i> _FOW	ATATAGG

5.16. Generación de animales transgénicos y cepas mutantes

Los animales transgénicos se generaron por el método de “Mos1-mediated single copy insertion” (Frokjaer-Jensen et al. 2008; Frokjaer-Jensen et al. 2012). Brevemente,

animales adultos de la cepa EG6699 [*ttTi5605* II; *unc-119(ed3)* III; *oxEx1578*] se microinyectaron en la gónada utilizando una mezcla que contiene los siguientes plásmidos: pCFJ601 (*Peft-3::Mos1* transposase, 50 ng/μl), el marcador de selección negativa pMA122 (*Phsp-16.1::peel-1*, 10 ng/μl), los plásmidos de coinyección pCFJ104 (*Pmyo-3::mCherry*, 5 ng/μl), pGH8 (*Prab-3::mCherry*, 10 ng/μl), pCFJ90 (*Pmyo-2::mCherry*, 2.5 ng/μl) y el plásmido templado pCFJ150 con el transgen *Pdpff-1::GFP::dpff-1::dpff-1 3'utr* (20 ng/μl) o el plásmido pCFJ150 con el transgen *Pdpff-1::dpff-1::GFP::dpff-1 3'utr* (20 ng/μl). Los animales inyectados se crecieron a 24°C por varios días y los animales con fenotipo *unc-119 (+)* se sometieron a un choque de calor a 34°C por 2 h. Los animales que sobrevivieron al choque de calor se movieron a cajas de NGM con bacteria y su progenie se analizó bajo el microscopio de epifluorescencia. Los animales que expresaban la señal fluorescente de la GFP pero no expresaban la señal fluorescente de la mCherry fueron seleccionados.

La línea mutante RN042 *dpff-1(xm17)* se generó por el sistema CRISPR-Cas-9 (Friedland et al. 2013). Brevemente, animales adultos silvestres se microinyectaron en la gónada utilizando una mezcla que contiene los siguientes plásmidos: *Peft-3::cas9-SV40* (Addgene plasmid 46168, 50 ng/μl) (Friedland et al. 2013), pU6::*dpff-1* sgRNA (45 ng/μl) y pCFJ104 (*Pmyo-3::mCherry*, 5 ng/μl). Los animales F1 que expresaban la señal fluorescente de la mCherry se seleccionaron en un estereomicroscopio de fluorescencia (66 animales). Los animales F1 seleccionados en el paso anterior se genotipificaron por PCR usando los oligonucleótidos *dpff-1_EcoRI_FOW*: GCGTAGCTACATATTAATCAATTATCGC y *dpff-1_EcoRI_REV*: AGCCGTTTGATGTTTCATAGTATG. Los productos de PCR se digirieron con la enzima de restricción EcoRI por 3 h y se visualizaron en un gel de agarosa al 2% (**Figura 14**). Mediante este método identificamos dos alelos independientes para el

gen *dpff-1* (Frecuencia de mutación =2/66=3.03%). Los productos de PCR de los alelos *xm17* y *xm20* se secuenciaron y se analizaron. El alelo *xm17* generó una mutación sin sentido (**Figura 23c**), mientras que el alelo *xm20* generó una mutación silenciosa.

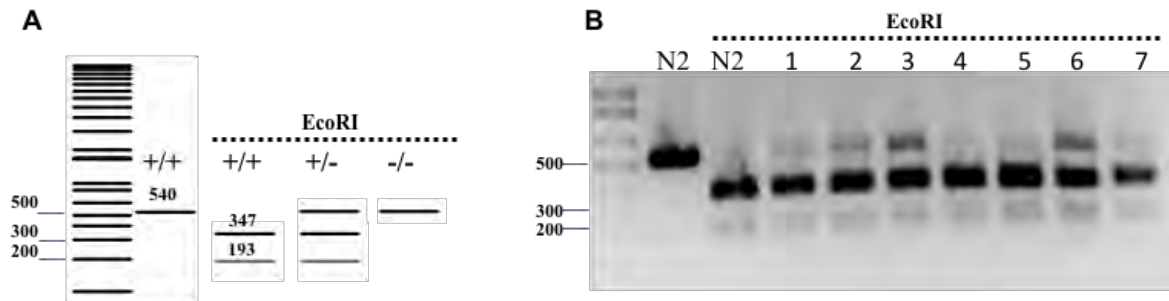


Figura 14. Identificación del alelo mutante para el gen *dpff-1*. (A) Representación esquemática del patrón de migración de productos de PCR de animales silvestres y animales mutantes. (B) Gel de agarosa con los productos de PCR de animales silvestres y animales mutantes. El producto de PCR de animales silvestres (+/+) genera una banda única de 540 pb. El patrón de restricción con la enzima EcoRI del producto de PCR de animales silvestres genera dos bandas, la más grande migra en 347 pb y la más pequeña migra en 193 pb. El patrón de restricción con la enzima EcoRI del producto de PCR de animales que acarrean una mutación en el sitio de corte de la enzima EcoRI genera una banda única de 540 pb. El patrón de restricción con la enzima EcoRI del producto de PCR de animales heterocigos (+/-) genera tres bandas, una de 540 pb, una de 347 pb y una de 193 pb. El patrón de restricción con la enzima EcoRI del producto de PCR de animales homocigos mutantes (-/-) genera una banda única de 540 pb.

5.17. Curvas de sobrevivencia

El choque de calor para las curvas de sobrevivencia se realizó de acuerdo a las especificaciones de Paz-Gomez et al. (2014). Brevemente, se colocaron larvas L1 sincronizadas en cajas con medio NGM y bacteria *Escherichia coli* OP50-1. Las larvas L1

en los genotipos indicados se crecieron a 24°C por 40 h o bajo cambios de temperatura durante su desarrollo por 45 h. Los animales adultos se colocaron en varias cajas de 35 mm con NGM y bacteria (30 animales por caja). Posteriormente se incubaron a 36°C por 12 h. Para contabilizar los animales vivos y muertos se tomó una caja diferente cada hora. Se consideraron animales muertos aquellos que no respondían al toque del asa y que además no presentaban bombeo en la faringe. El porcentaje de sobrevivencia representa la suma de tres experimentos diferentes. Todos los análisis estadísticos se realizaron mediante una Two-way ANOVA con una prueba de Bonferroni (** P<0.01, *** P<0.001) en el programa SIGMA-PLOT.

6. RESULTADOS

6.1. DPFF-1 es el único miembro de la familia de factores de transcripción D4 en

C. elegans

dpff-1(C28H8.9) es el único miembro de la familia *d4* reportado en el genoma de *C. elegans* (<http://www.wormbase.org>; release WS252, Dec 04 2015). Existen tres isoformas de ARNm del gen *dpff-1* anotadas en el genoma de *C. elegans*. Sin embargo, la isoforma más larga codifica para la proteína que posee los dominios Krüppel y PHD/d4 (<http://www.wormbase.org>; release WS252, Dec 04 2015, **Figura 15**).

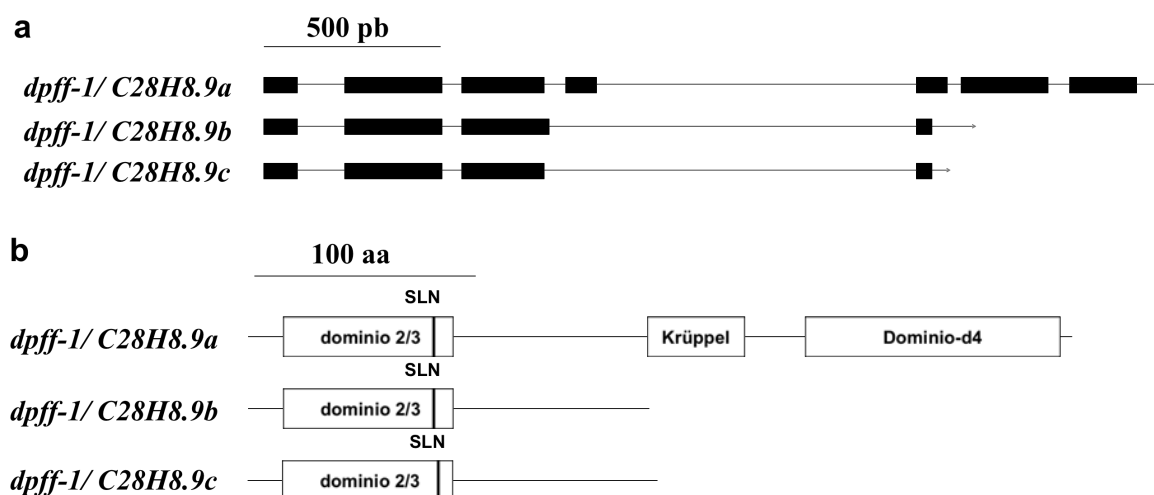


Figura 15. *dpff-1* es el único miembro de la familia *d4* reportado en el genoma de *C. elegans*. (a) Representación esquemática de las isoformas de ARNm del gen *dpff-1*. (b) Representación esquemática de las proteínas DPFF-1.

Un alineamiento a nivel de proteína entre miembros de la familia *d4* mostró que la proteína DPFF-1 de *C. elegans* es ~84% idéntica a sus homólogos en *Caenorhabditis remanei* y *Caenorhabditis briggsae*. La proteína DPFF-1 de *C. elegans* tiene un 60%

identidad con la proteína dd4-PA de *D. melanogaster* y un ~38% de identidad con miembros de la familia *d4* de vertebrados. Observamos que todos los miembros de la familia *d4*, incluyendo la proteína DPFF-1 de *C. elegans*, contienen una señal de localización nuclear predicha (SLN), un dedo de zinc tipo Krüppel y dos dominios PHD/d4 en el C-terminal (**Figura 16**).

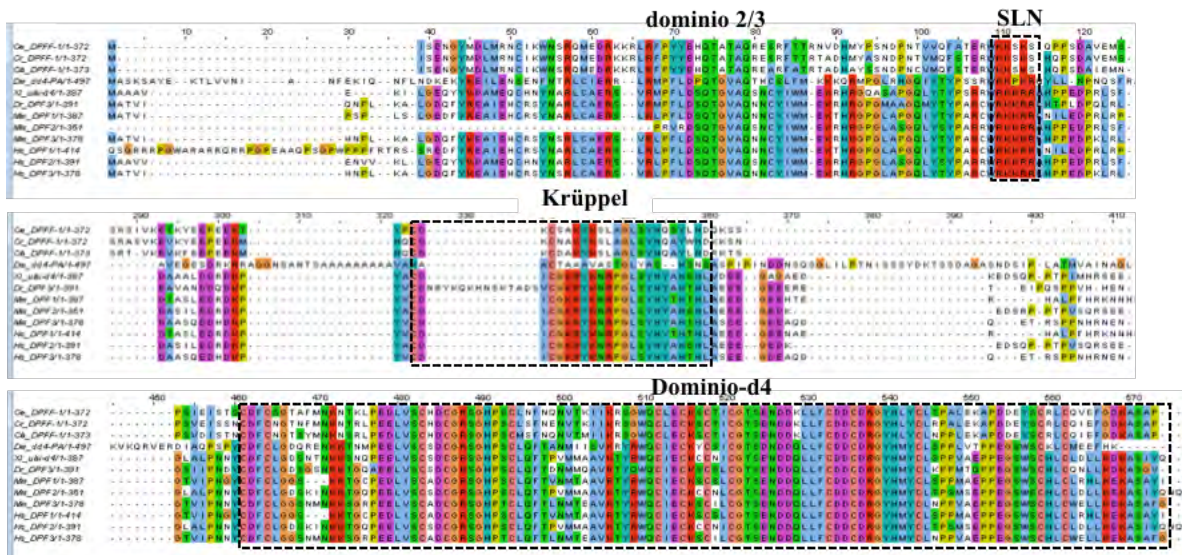


Figura 16. DPFF-1 pertenece a la familia de factores de transcripción D4. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos entre miembros de la familia de factores de transcripción D4. El alineamiento fue realizado por el método Muscle con la secuencia primaria de Ce-DPFF-1 (*C. elegans*), Cr-DPFF-1 (*C. remanei*), Cb-DPFF-1 (*C. briggsae*), Dm-dd4-PA (*D. melanogaster*), Xl-ubi-d4 (*X. leavi*), Dr-DPF3 (*D. rerio*), Mm-DPF1, Mm-DPF2, Mm-DPF3 (*M. musculus*), Hs-DPF-1, Hs-DPF2 and Hs-DPF3 (*H. sapiens*). Los aminoácidos conservados están marcados con azul. Los motivos conservados están encerrados en recuadros con líneas punteadas. Dominio 2/3: Región N-terminal codificada por exones 2 y 3. SLN: Secuencia de localización Nuclear. Dedos de zinc tipo Krüppel y dominio d4.

6.2. DPFF-1 se expresa en los núcleos de todas las células del *C. elegans* durante el desarrollo

Para determinar el patrón de expresión del gen *dpff-1* durante el desarrollo de *C. elegans*, fusionamos el promotor y el gen codificante de *dpff-1* con la proteína verde fluorescente (GFP) tanto en su extremo amino como en su extremo carboxilo. Para generar estas construcciones, clonamos en tandem la región promotora predicha de 965 pb río arriba del ATG (Dupuy et al. 2004) y la región codificante desde el ATG hasta el final de su 3'UTR reportado (2632 pb) (<http://www.wormbase.org>, release WS252, Dec 04 2015). Posteriormente, mediante una reacción tipo Gibson (Gibson et al. 2009) se unió la secuencia codificante de la *gfp* después del ATG o antes del codón de paro del gen *dpff-1*. Los animales transgénicos fueron generados por el método "Mos1-mediated single copy insertion (MosSCI)" (Frokjaer-Jensen et al. 2008; Frokjaer-Jensen et al. 2012). La primera línea transgénica, *xmSi09*, expresa el reportero GFP fusionado a la proteína DPFF-1 en su región N-terminal (**Figura 17**) y la segunda línea transgénica, *xmSi25*, expresa el reportero GFP fusionado a la proteína DPFF-1 en su región C-terminal (**Figura 17**).

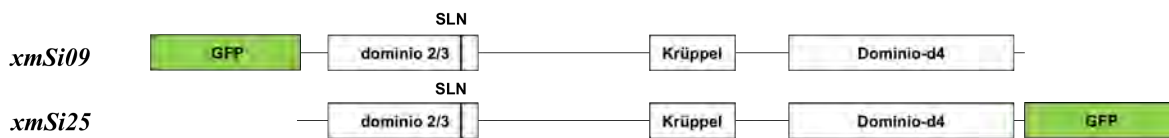


Figura 17. Representación esquemática de DPFF-1 fusionada a la proteína verde fluorescente (GFP) en su extremo amino terminal (*xmSi09*) o su extremo carboxilo terminal (*xmSi25*).

Para mayor facilidad en este trabajo nos referiremos a la línea transgénica *xmSi09* como GFP::DPFF-1 y a la línea transgénica *xmSi25* como DPFF-1::GFP. Embriones, larvas

y animales hermafroditas GFP::DPFF-1 fueron montados en un portaobjetos y observados bajo el microscopio de epifluorescencia para determinar el patrón de expresión. Se observó la expresión de la GFP::DPFF-1 en todas las etapas embrionarias y post-embrionarias principalmente en un patrón nuclear y ligeramente difuso por todo el citoplasma (**Figura 18**). Como se esperaba, animales DPFF-1::GFP presentaron un patrón de expresión similar al de animales GFP::DPFF-1, en todas las etapas embrionarias y post-embrionarias principalmente en un patrón nuclear y ligeramente difuso por todo el citoplasma (**Figura 19**).

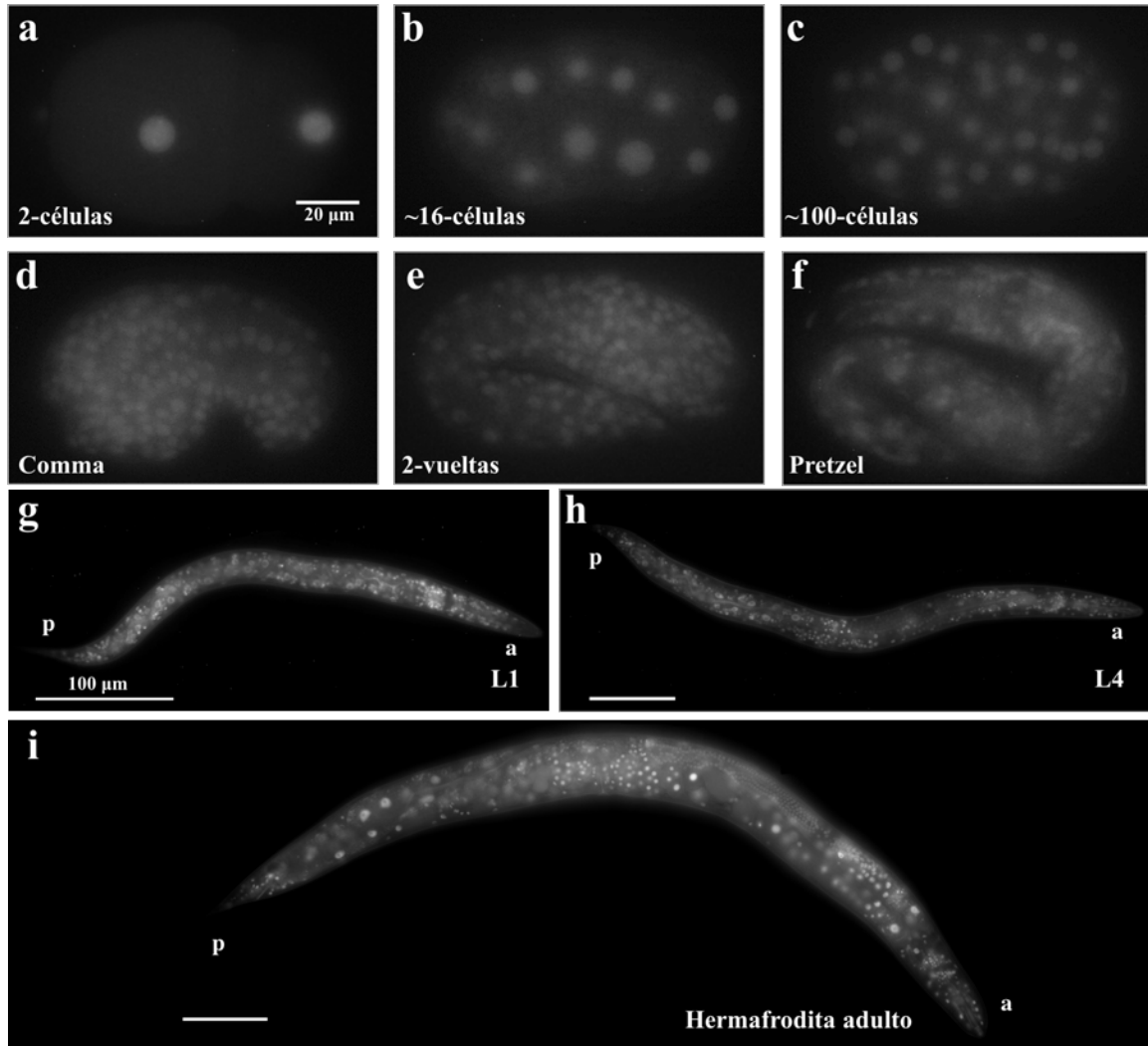


Figura 18. GFP::DPFF-1 se expresa de forma ubicua durante el desarrollo de *C. elegans*. Animales transgénicos *xmSi09* crecidos a 24°C fueron montados y observados bajo el microscopio de epifluorescencia. El patrón de expresión del transgen fue analizado en los estadios de desarrollo indicados en cada figura. (a-f) Embriones, (g) estadio larval L1, (h) estadio larval L4 y (i) hermafrodita adulto. Las imágenes (g-i) fueron capturadas como un montaje con límites sobrepuestos y procesadas usando MosaicJ. a: anterior. p: posterior.

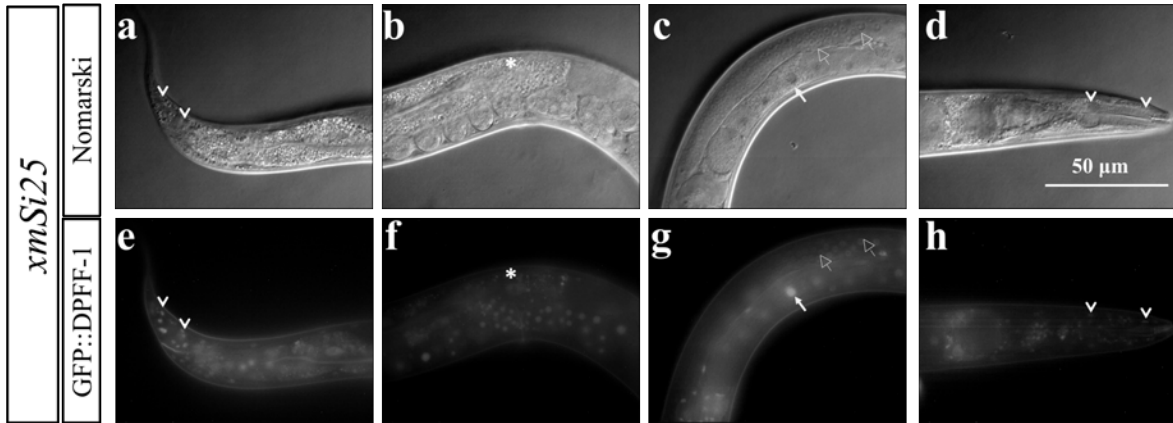


Figura 19. El transgen DPFF-1::GFP se expresa en células somáticas y germinales durante la fase adulta de *C. elegans*. Animales transgénicos *xmSi25* crecidos a 24°C fueron montados y observados bajo el microscopio de epifluorescencia. El patrón de expresión del transgen DPFF-1::GFP fue analizado en animales adultos. (e) Expresión del transgen DPFF-1::GFP en células no identificadas en la región de la cola (cabezas de flecha). (f) Expresión del transgen DPFF-1::GFP en embriones y células del intestino (asterisco). (g) Expresión del transgen DPFF-1::GFP en células germinales y ovocitos (flecha). (h) Expresión del transgen DPFF-1::GFP en células no identificadas en la región de la cabeza (cabezas de flecha).

Para corroborar la localización nuclear y expresión en la gónada del transgen GFP::DPFF-1, disecamos y teñimos con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) la gónada de animales *xmSi09* hermafroditas y animales *xmSi09* machos. Como se esperaba, la señal fluorescente GFP::DPFF-1 y DAPI se sobrelapó en las células somáticas y germinales de la gónada de animales hermafroditas (**Figura 20 a-c**) y animales machos (**Figura 20 d-f**). En estos experimentos también observamos que la señal fluorescente GFP::DPFF-1 presenta un patrón nuclear y ligeramente difuso por todo el citoplasma en las células germinales y en las células somáticas que conforman la gónada de animales hermafroditas (**Figura 20 a-c**) y animales machos (**Figura 20 d-f**). Estas observaciones demuestran que GFP::DPFF-1 se

expresa de manera ubicua durante todo el desarrollo embrionario y post-embrionario principalmente en un patrón nuclear y ligeramente difuso por todo el citoplasma de células somáticas y germinales.

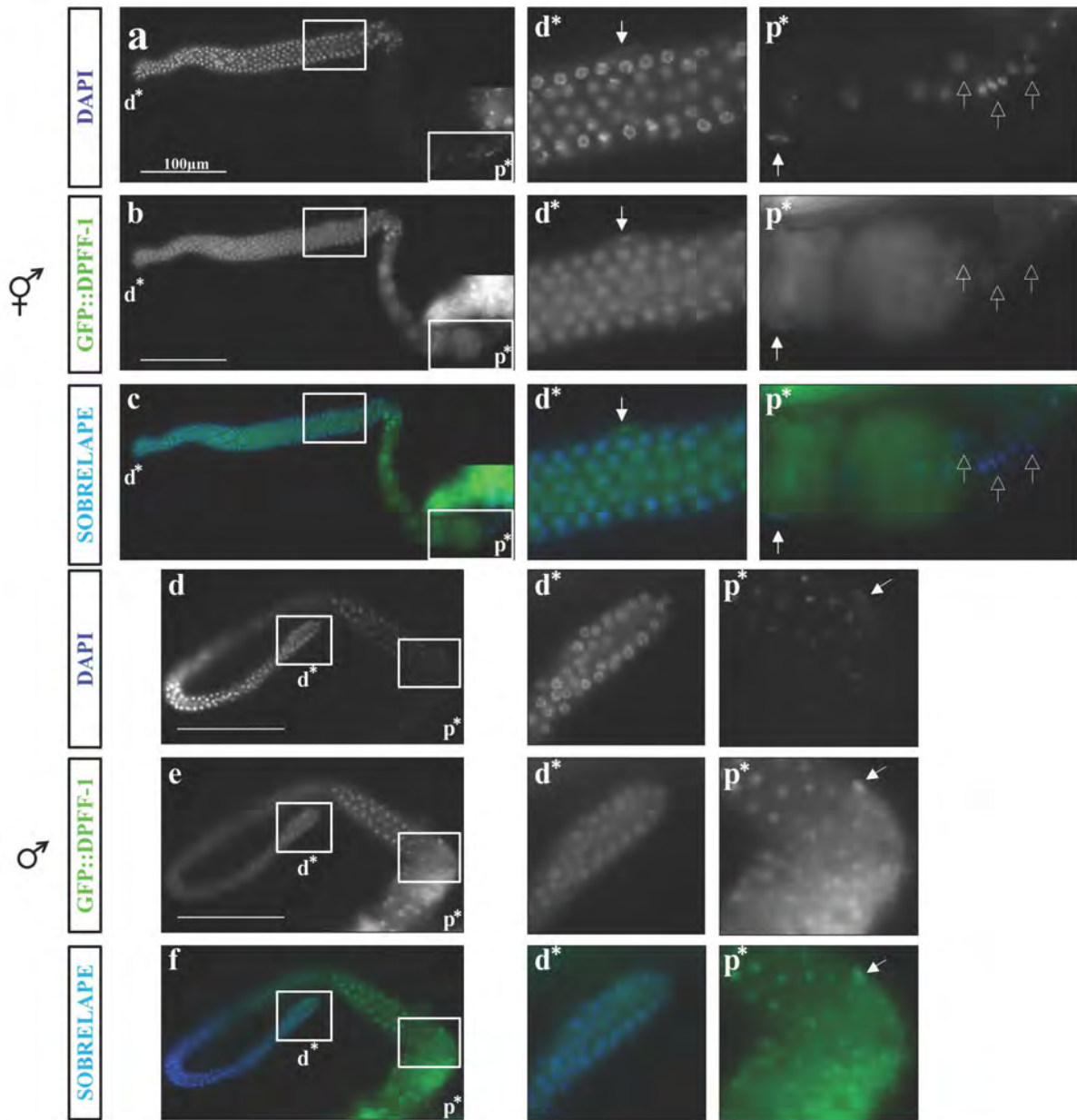


Figura 20. GFP::DPFF-1 se localiza principalmente en los núcleos de células somáticas y germinales en la gónada de *C. elegans*. (a-c) Las gónadas disecadas de animales *xmSi09* hermafroditas y (d-f) animales *xmSi09* machos fueron fijadas bajo condiciones especiales para preservar la señal de la GFP y teñidas con DAPI para visualizar

ADN. Las imágenes fueron capturadas como un montaje con límites sobrepuestos y procesadas usando MosaicJ. Las flechas apuntan hacia el núcleo de las células de la vaina. Las flechas vacías apuntan hacia las células que conforman la espermateca. Se muestran los acercamientos de las regiones distales (d*) y proximales (p*) de cada gónada.

Para validar la señal fluorescente de animales trasgénicos GFP::DPFF-1, silenciamos el gen *dpff-1* en animales *xmSi09* usando el método de RNAi por alimentación. En los ensayos de RNAi se usó el plásmido vacío (PV) pPD129.36 como control negativo, según lo recomendado anteriormente por Conte and Mello (2003). Animales *xmSi09* fueron crecidos por una generación bajo condiciones control (PV, plásmido vacío) o bajo condiciones *dpff-1*(RNAi) a 24°C. Animales adultos *xmSi09*; (PV) y animales *xmSi09*; *dpff-1*(RNAi) fueron montados en un portaobjetos y observados bajo el microscopio de epifluorescencia. La señal fluorescente GFP::DPFF-1 disminuyó en animales *xmSi09*; *dpff-1*(RNAi) (**Figura 21 m-p**) en comparación con la señal fluorescente de animales *xmSi09*; (PV) control (**Figura 21 e-h**). Sin embargo, todos los animales *xmSi09*; *dpff-1*(RNAi) preservaron algo de señal fluorescente en algunas células no identificados de la cabeza, la cola y a lo largo del cuerpo (**Figura 21 m y p**). Creemos que algunas de las células no identificadas con señal fluorescente después del tratamiento por RNAi podrían ser neuronas, ya que la mayoría de las neuronas son resistentes al RNAi por alimentación en *C. elegans* (Kamath et al. 2001; Asikainen et al. 2005). Estas observaciones demuestran que la señal fluorescente GFP::DPFF observada en animales *xmSi09* es específica.

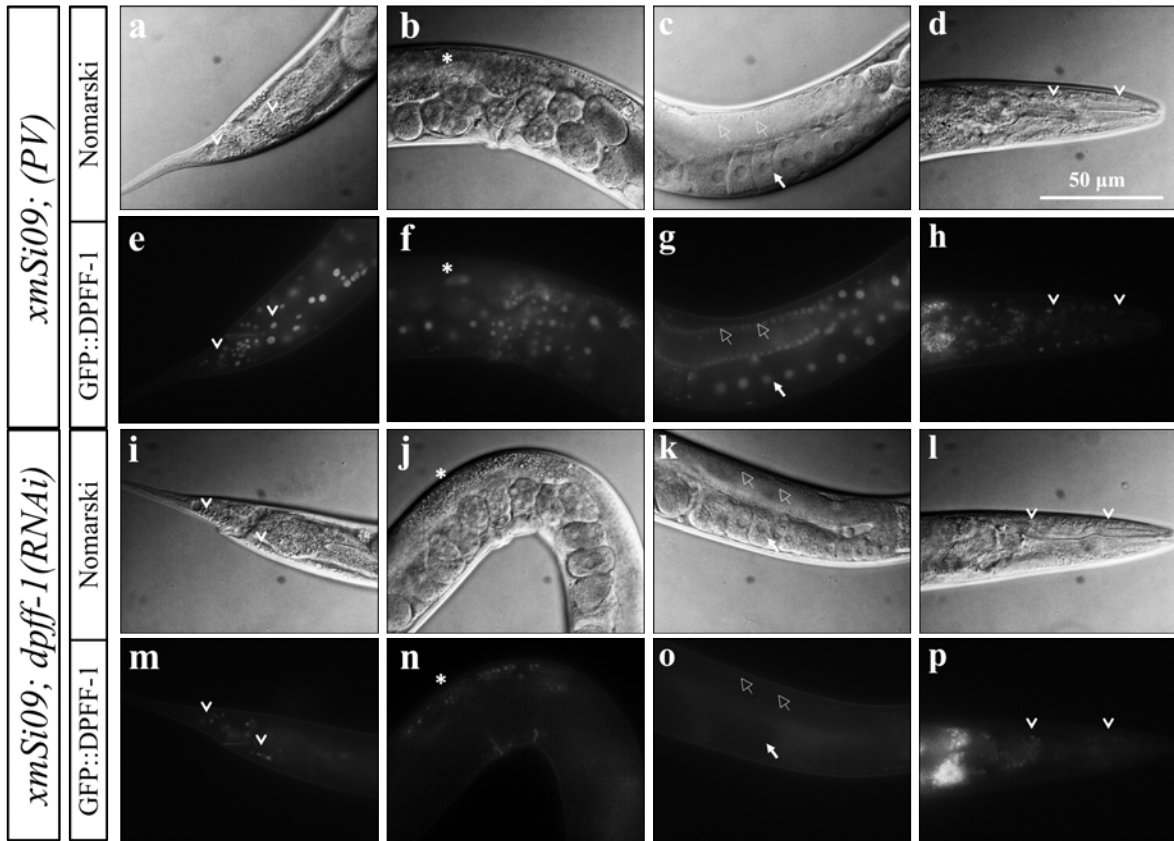


Figura 21. La señal GFP::DPFF-1 disminuye en animales *dpff-1*(RNAi). Animales transgénicos *xmSi09* fueron crecidos a 24°C en condiciones control (PV, plásmido vacío) o bajo condiciones *dpff-1*(RNAi). **(a-h)** Animales adultos *xmSi09; PV* (control) y **(i-p)** animales adultos *xmSi09; dpff-1*(RNAi) fueron montados y observados bajo el microscopio de epifluorescencia. Las imágenes en Nomarski se muestran en los paneles **a-d** y **i-l**. Las imágenes en fluorescencia se muestran en los paneles **e-h** y **m-p**. **(e y m)** Expresión del transgen GFP::DPFF-1 en células no identificadas en la región de la cola (cabezas de flecha). **(f y n)** Expresión del transgen GFP::DPFF-1 en embriones y células del intestino (asterisco). **(g y o)** Expresión del transgen GFP::DPFF-1 en células germinales (flechas abiertas) y ovocitos (flechas). **(h y p)** Expresión del transgen GFP::DPFF-1 en células no identificadas en la cabeza (cabezas de flechas).

6.3. La expresión de *dpff-1* es menor durante el ayuno

Originalmente, mediante un microarreglo se encontró que la expresión de *dpff-1* disminuye en animales adultos después de someterlos a un ayuno de 6 h (Silva-García 2013). Para corroborar que la expresión de *dpff-1* es menor en animales adultos después de someterlos a un ayuno de 6 h realizamos un análisis por qRT-PCR (real-time reverse transcription-PCR). En este experimento se utilizó el ARN total de gónadas disecadas de animales adultos silvestres alimentados o animales silvestres sometidos a 6 h de ayuno. Observamos que los niveles de ARNm de *dpff-1* disminuye 10.48 veces durante el ayuno (**Figura 22**). Anteriormente, se observó que el ayuno afecta la expresión del ARN mensajero de *ced-9* (Lascarez-Lagunas et al. 2014) por lo que se utilizó como control positivo. Efectivamente, observamos que los niveles de ARN mensajero de *ced-9* disminuyen durante el ayuno. Nuestros datos muestran que la expresión de *dpff-1* baja en la gónada de *C. elegans* después de un ayuno de 6 h.

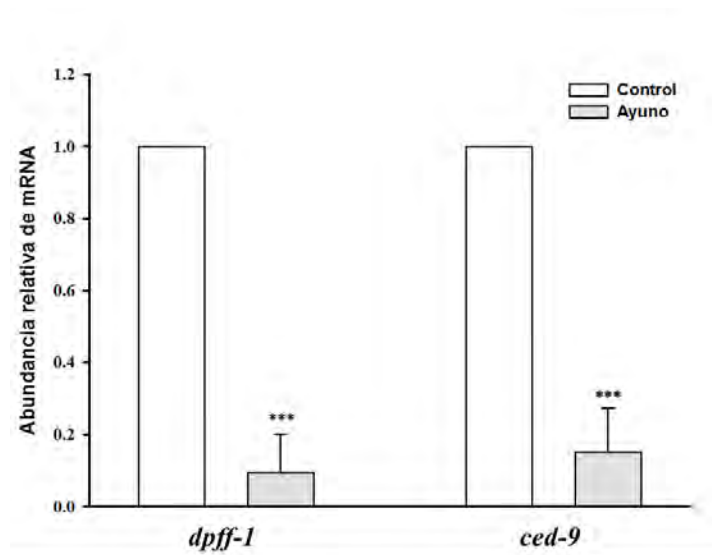


Figura 22. Los niveles de expresión del gen *dpff-1* disminuyen en condiciones de ayuno. Análisis de los genes indicados mediante qRT-PCR. El ARN mensajero total se obtuvo de gónadas disecadas de animales silvestres crecidos a 24°C en condiciones control

o sometidos a 6 h de ayuno. La gráfica muestra el promedio de la abundancia relativa de ARN mensajero provenientes de tres experimentos independientes. Las barras de error muestran SEM (Standard error of the mean). Todos los análisis estadísticos fueron realizados mediante una prueba t tipo Mann-Whitney (***) $P < 0.001$. Los oligonucleótidos que se utilizaron para amplificar a *dpff-1* y *ced-9* están enlistados en la tabla 2.

6.4. Obtención y análisis de los alelos mutantes en *dpff-1*

Para estudiar el fenotipo de animales *dpff-1* mutantes, usamos los alelos *xm17* y *tm4287* (**Figura 23**). El alelo *dpff-1(xm17)* (RN042) fue generado en el laboratorio mediante el sistema CRISPR-Cas-9 (Friedland et al. 2013). El alelo *xm17* tiene eliminadas e insertadas 5 y 4 pares de bases, respectivamente, entre los nucleótidos 46 a 56 después del codón de inicio del gen *dpff-1* (**Figura 23c**). Estas modificaciones generan una mutación sin sentido y dan origen a la síntesis de una proteína truncada de 23 aminoácidos (**Figura 23b**). El alelo *tm4287* se obtuvo del proyecto “National BioResource Project, Tokyo, Japan”. Este alelo tiene eliminadas en total 318 pares de bases, las cuales se describen a continuación; 16 de 83 pares de bases del exón uno, todo el primer intron y 176 de 254 pares de bases del exón dos, sin embargo, conserva el marco abierto de lectura (**Figura 23d**). La escisión de bases en el alelo *tm4287* dan origen a la síntesis de una proteína más corta que carece de los aminoácidos 22 a 85 (**Figura 23b**) pero conserva el resto de la proteína intacta. No observamos problemas en tamaño, crecimiento y motilidad en los animales *dpff-1(xm17)* y *dpff-1(tm4287)*.

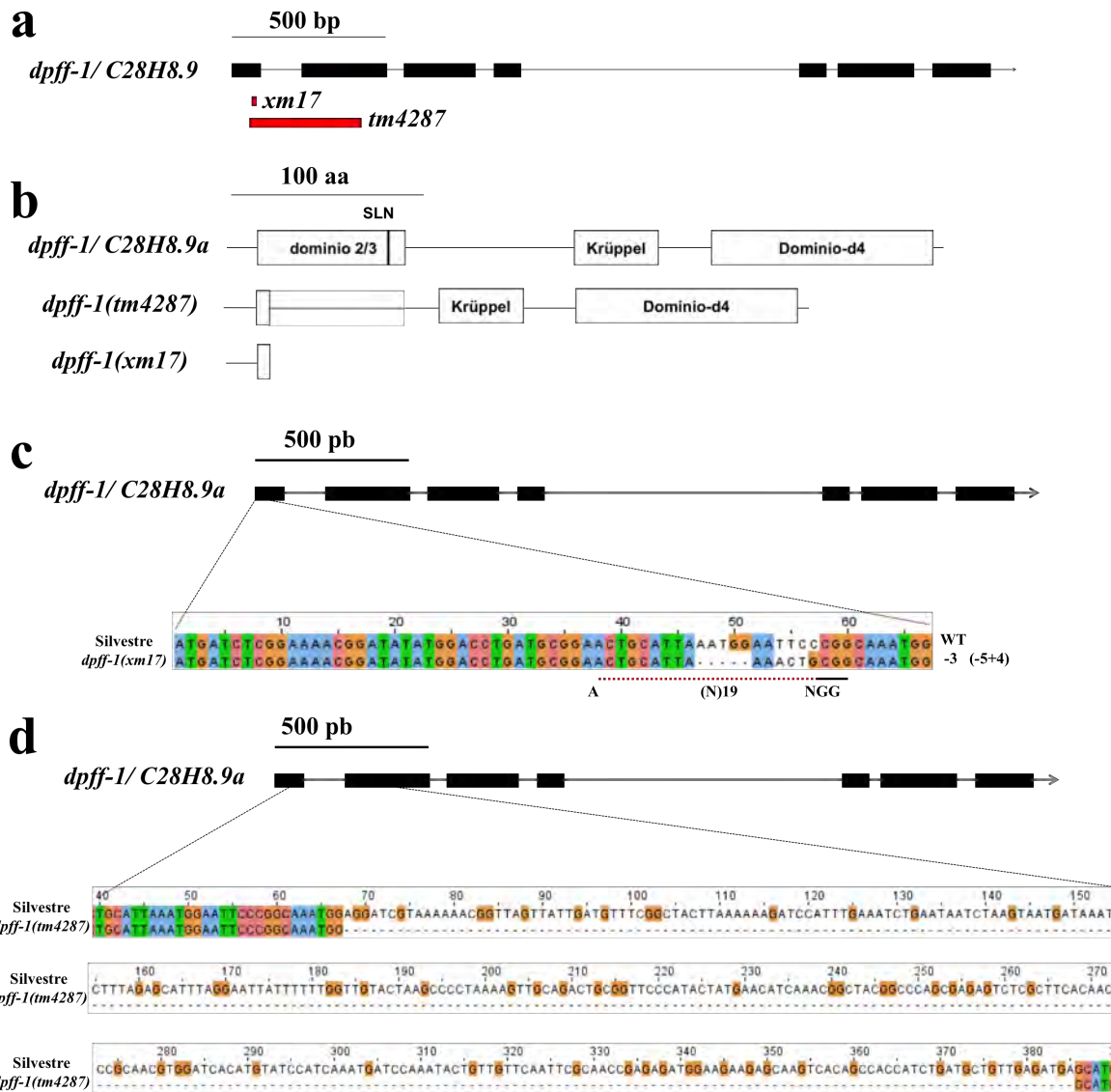


Figura 23. Esquema de los alelos *xm17* y *tm4287*. (a) Representación esquemática del gen *dpff-1* y sus alelos mutantes. (b) Representación esquemática de las proteínas DPFF-1 silvestres y mutantes. SLN: Secuencia de localización Nuclear. (c) Mutación del gen *dpff-1* mediante el sistema CRISPR-Cas-9. Representación esquemática de la inserción y pérdida de nucleótidos en el alelo *xm17*. El número de bases insertadas (+) o perdidas (-) están indicadas entre paréntesis. Las bases eliminadas son representadas como guiones negros. Los números a la izquierda de la secuencia indican el total de bases ganadas o perdidas en el alelo *xm17*. Análisis de la secuencia del alelo *tm4287*. (d) Representación esquemática

de las bases eliminadas en el alelo *tm4287*. Las bases eliminadas son representadas como guiones negros.

6.5. Los animales *dpff-1* tienen problemas de fertilidad

Para estudiar el efecto de *dpff-1* sobre la fertilidad y letalidad embrionaria de *C. elegans*, realizamos un conteo de progenie. Ya que varios procesos en la línea germinal de *C. elegans* han sido descritos como dependientes de la temperatura (Schierenberg et al. 1980; Denich et al. 1984), los experimentos de conteo de progenie fueron estudiados a 20°C, 24°C, o con cambios de temperatura durante su desarrollo. Independientemente de las condiciones de crecimiento, los animales *dpff-1* mutantes tuvieron en promedio menos hijos que los animales silvestres (**Tabla 5**). A su vez, observamos que los valores de letalidad embrionaria de animales *dpff-1* mutantes son ligeramente altos en todas las condiciones de crecimiento, sin embargo, al compararlas con los valores de letalidad embrionaria de animales silvestres estas diferencias no son estadísticamente significativas (**Tabla 5**). Estos datos sugieren que *dpff-1* se requiere para una óptima fertilidad en *C. elegans* pero no se requieren para sobrevivir la embriogénesis.

Tabla 5

Los animales mutantes *dpff-1* tienen menos hijos que los animales silvestres

Genotipo	% Total de hijos (n)			% Letalidad embrionaria (n)		
	20 °C	24 °C	20 to 24 °C	20 °C	24 °C	20 a 24 °C
N2	100 ± 2.99 (22)	100 ± 3.93 (22)	100 ± 1.75 (15)	0.19 ± 0.05 (22)	0.68 ± 0.12 (22)	0.72 ± 0.13 (15)
<i>dpff-1(tm4287)</i>	77.5 ± 4.20 (21)	81.53 ± 6.21 (19)	78.24 ± 2.29 (15)	1.89 ± 1.14 (21)	1.21 ± 0.25 (19)	1.51 ± 0.34 (15)
	P<0.001	P=0.017	P<0.001	P=0.168	P=0.214	P=0.149
<i>dpff-1(xm17)</i>	81.12 ± 2.58 (22)	71.51 ± 4.71 (22)	83.02 ± 1.53 (14)	0.46 ± 0.10 (22)	1.17 ± 0.3 (22)	1.2 ± 0.34 (14)
	P<0.001	P<0.001	P<0.001	P=0.084	P=0.539	P=0.406

Los animales hermafroditas en los genotipos indicados fueron individualmente seleccionados en el estadio larval L4 y transferidos a cajas Petri con comida cada 24 h por 3 o 4 días. En el caso de los experimentos realizados con cambios de temperatura durante el desarrollo, los animales fueron crecidos inicialmente a 20°C, seleccionados en el estadio larval L4 y transferidos a 24°C. Para determinar el número de progenie, en cada caja Petri se cuantificó el número de embriones muertos y descendencia viva cada 24 h. Los embriones que no eclosionaron 24 h después de ser depositados al medio fueron considerados muertos. Los porcentajes de cada categoría se muestran con SEM (Standard error of the mean). El número de animales analizados se muestra entre paréntesis. Todos los análisis estadísticos fueron realizados mediante una prueba "t" tipo Mann-Whitney (***) P<0.001).

Debido a que no hubo diferencias estadísticas entre el número de hijos de animales *dpff-1* mutantes crecidos a diferentes temperaturas, decidimos utilizar únicamente temperaturas de crecimiento de 24°C o con cambios de temperatura durante su desarrollo para los próximos experimentos.

6.6. Los animales *dpff-1* mutantes tienen problemas durante la meiosis

Para estudiar los efectos de la mutación en *dpff-1* sobre la proliferación de células germinales y la progresión de la meiosis, se realizó una tinción con DAPI en gónadas

disecadas. Los animales silvestres y animales *dpff-1* mutantes se crecieron a 24°C o con cambios de temperatura durante su desarrollo. Observamos que los animales *dpff-1* mutantes presentaban brazos de gónada distal extendida debido a que tienen un mayor número de células germinales en paquíteno (**Tabla 6**). El fenotipo de gónada distal extendida se observó en una baja frecuencia cuando los animales se crecen con cambios de temperatura durante su desarrollo ($\leq 5\%$). Sin embargo, el fenotipo de gónada distal extendida resultó más evidente en animales crecidos a 24°C, debido a que su penetrancia aumentó a un 19% en animales *dpff-1 (tm4287)* (N = 37) y un 11% en animales *dpff-1(xm17)* (**Tabla 6**).

Tabla 6

Animales mutantes *dpff-1* presentan brazos de gónada extendidos y defectos en la proliferación proximal

24°C									
Genotipo	Fenotipo en la gónada	Penetrancia %	Región mitótica	Zona de transición	Estructuras parecidas a Ovocitos	Número de células germinales en la zona de paquiteno	Ovocitos	Total	n
N2	Silvestre	100	25.16 ± 0.28	15.05 ± 0.23	NO	44.02 ± 0.68	5.72 ± 0.11	89.97 ± 0.89	36
<i>dpff-1(tm4287)</i>	Silvestre	73	24.81 ± 0.31 P = 0.365	15.18 ± 0.22 P = 0.742	NO	45.55 ± 0.77 P = 0.146	6.88 ± 0.48 P = 0.167	92.44 ± 0.97 P = 0.068	27 / 37
	Brazos de gónada extendidos	19	25.42 ± 0.57 P = 0.775	15.42 ± 1.08 P = 0.366	NO	69 ± 1.91 p<0.001	6.57 ± 0.20 P = 0.040	116.42 ± 2.27 p<0.001	7 / 37
	Otros de defectos meióticos	8	26.33 ± 0.33 P = 0.237	15 ± 0.57 P = 0.948	3.3 ± 0.33	44 ± 2.08 P = 0.991	5.66 ± 0.33 P = 0.904	91 ± 1.52 P = 0.746	3 / 37
<i>dpff-1(xm17)</i>	Silvestre	84	24.89 ± 0.30 P = 0.411	15.29 ± 0.22 P = 0.480	NO	43.94 ± 0.86 P = 0.752	7.08 ± 0.34 P = 0.060	91.21 ± 1.03 P = 0.366	37 / 44
	Brazos de gónada extendidos	11	28.40 ± 3.66 P = 0.968	13.80 ± 1.11 P = 0.309	NO	67.8 ± 1.31 P = <0.001	5.80 ± 0.20 P = 0.782	115.8 ± 3.69 P = <0.001	5 / 44
	Otros de defectos meióticos	5	25.50 ± 0.50 P = 0.894	14.50 ± 0.50 P = 0.593	2.5 ± 0.5	43.5 ± 1.50 P = 0.859	5.50 ± 0.50 P = 0.629	89 ± 2.00 P = 0.802	2 / 44
20 a 24 °C									
Genotipo	Fenotipo en la gónada	Penetrancia %	Región mitótica	Zona de transición	Estructuras parecidas a Ovocitos	Número de células germinales en la zona de paquiteno	Ovocitos	Total	n
N2	Silvestre	100	24.83 ± 0.27	16 ± 0.23	NO	54.03 ± 0.68	6.19 ± 0.13	101.06 ± 0.75	31
<i>dpff-1(tm4287)</i>	Silvestre	95	25.16 ± 0.24 P = 0.433	15.35 ± 0.17 P = 0.032	NO	53.18 ± 0.55 P = 0.338	6.43 ± 0.16 P = 0.482	100.13 ± 0.70 P = 0.372	37 / 39
	Brazos de gónada extendidos	5	25 P = 0.882	16.5 ± 0.5 P = 0.668	NO	89 ± 5 P = 0.021	6 P = 0.653	136.5 ± 5.5 P = <0.001	2 / 39
<i>dpff-1(xm17)</i>	Silvestre	97	25.32 ± 0.27 P = 0.216	15.52 ± 0.22 P = 0.178	NO	53.58 ± 0.65 P = 0.640	6.52 ± 0.15 P = 0.153	100.97 ± 0.70 P = 0.928	34 / 35
	Brazos de gónada extendidos	3	25	17	NO	96	6	144	1 / 35

Gónadas disecadas de animales hermafroditas en los genotipos indicados fueron fijadas y teñidas con DAPI. Cada zona de la gónada de *C. elegans* fue cuantificada y delimitada con base en la morfología nuclear. Los animales en los genotipos indicados fueron crecidos a 24°C o bajo cambios de temperatura durante su desarrollo. El promedio de núcleos por zona se muestra con SEM (Standard error of the mean). Todos los análisis estadísticos fueron realizados mediante una prueba t tipo Mann-Whitney (***) P<0.001). NO= no observado. Datos obtenidos en colaboración con la M. en C. Laura Silvia Salinas Velázquez.

También, observamos ovocitos ectópicos en proceso de maduración en el brazo de la gónada distal de animales *dpff-1(tm4287)* y *(xm17)* crecidos a 24°C [8% (N = 37) y 5% (N = 44), respectivamente] (**Tabla 6**). Sin embargo, el fenotipo de ovocitos ectópicos no se observó en animales *dpff-1* mutantes cuando se crecen bajo cambios de temperatura durante su desarrollo (**Tabla 6**). Estos datos muestran que los alelos *tm4287* y *xm17* se comportan de manera similar a diferentes temperaturas y que las frecuencias de fenotipos observados en ambos fondos mutantes son dependientes de la temperatura. Debido a que cuando se crecen los animales *dpff-1* mutantes a 24°C se observan más fenotipos y su penetrancia es más alta continuamos el estudio a esta temperatura.

A pesar de que no observamos defectos durante la mitosis en la gónada de animales *dpff-1* mutantes teñidos con DAPI, decidimos confirmar estas observaciones con una inmunolocalización de la histona H3 fosforilada (H3P) (Kadyk and Kimble 1998). Los animales *dpff-1(xm17)* adultos de dos días crecidos a 24°C tienen en promedio 4.2 núcleos con señal positiva para H3P (N=34), mientras que los animales silvestres tienen en promedio 4.6 núcleos con señal positiva para H3P (N=34) (**Tabla 7**). Dado que no observamos diferencias significativas en el número de núcleos que se encuentran activos en la zona de proliferación de animales *dpff-1* mutantes y animales silvestres, concluimos que no hay defectos en mitosis y que el fenotipo de gónada distal extendida observada en algunos animales *dpff-1* mutantes no es el resultado de defectos en proliferación.

Tabla 7
Los animales mutantes *dpff-1* no presentan defectos en proliferación

Genotipo	No. células positivas para la H3P promedio \pm SD (N)		
	24 h	48 h	72 h
N2	2.5 \pm 1.1 (20)	4.6 \pm 1.8 (34)	2.8 \pm 1.4 (22)
<i>dpff-1(xm17)</i>	2.7 \pm 1.4 (20)	4.2 \pm 1.2 (34)	3.1 \pm 1.5 (19)

Gónadas disecadas de animales hermafroditas en los genotipos indicados fueron fijadas y teñidas con DAPI y el anticuerpo en contra de la histona H3 fosforilada (H3P). El promedio de núcleos positivos para la histona H3 fosforilada se cuantificó a las 24, 48 y 72 h post estadio L4. Los animales fueron crecidos a 24°C. Todos los análisis estadísticos fueron realizados mediante una prueba t tipo Mann-Whitney (***) P<0.001). SD= desviación standard. N= número de gónadas. Datos obtenidos en colaboración con la M. en C. Laura Silvia Salinas Velázquez.

Cuando observamos la morfología nuclear de animales *dpff-1(xm17)* de dos días de adulto con una tinción DAPI y observamos que los animales mutantes presentaban en promedio más núcleos condensados en la gónada distal (4.4, N=79) en comparación a los núcleos observados en animales silvestres (2.1, N=81) (**Figura 24 a y b**). También observamos en un 66% de gónadas de animales *dpff-1(xm17)* (N=64) núcleos en transición ectópicos a lo largo de la zona de paquíteno (**Figura 24 c, inset**), mientras que los núcleos en transición de animales silvestres se encuentran únicamente adyacentes a las células mitóticas (**Figura 24a**). Como se había mencionado anteriormente, la penetrancia de los fenotipos de gónada distal extendida y la presencia de ovocitos en la parte distal fue mayor en animales *dpff-1* mutantes de dos días. Por lo que algunos experimentos mostrados a continuación se realizaron en animales *dpff-1(xm17)* adultos de dos días crecidos a 24°C.

Para confirmar si algunas células germinales se diferencian a ovocitos en la gónada distal de animales *dpff-1* mutantes, se realizó una inmunotinción en la gónada de animales adultos de dos días crecidos a 24°C en contra del receptor de vitelo RME-2, el cual sirve como marcador de ovocitos (Grant and Hirsh 1999) y DAPI. Observamos que todas las gónadas de animales silvestres dan una señal fluorescente al receptor RME-2 únicamente en la parte proximal de la gónada, en dónde los ovocitos salen de paquíteno de la profase I meiótica y progresan a diplóteno y diacinesis (**Figura 24d**). El 67.6% de las gónadas de animales *dpff-1(xm17)* mostraron una señal positiva al receptor RME-2 únicamente en la parte proximal de la gónada (**Figura 24e**), mientras que el resto (32.4%) mostró una señal positiva al receptor RME-2 en la parte proximal y distal de gónada (**Figura 24f**).

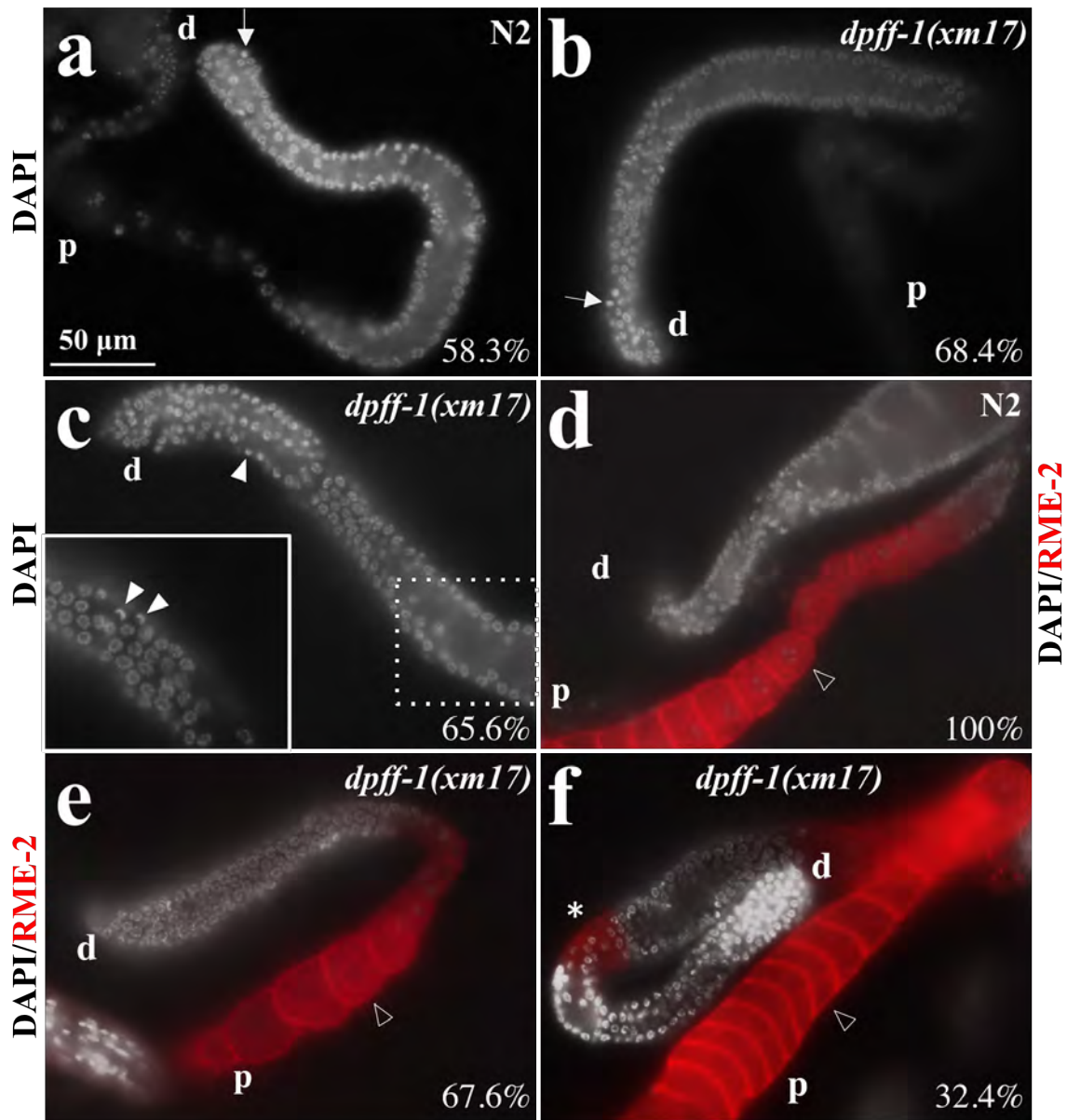


Figura 24. Animales *dpff-1* mutantes presentan defectos meióticos. Las gónadas disecadas de animales hermafroditas crecidos a 24°C de dos días y de los genotipos indicados fueron fijadas y teñidas con DAPI (gris; a-f) y el anticuerpo que reconoce al receptor de vitelo RME-2 (rojo; d, e y f). El porcentaje de animales que presentan el fenotipo mostrado está indicado dentro de cada panel. En el panel c se muestra un acercamiento y foco a la región distal de animales *dpff-1 (xm17)* en la que se observan núcleos en media luna ectópicos. Los animales se crecieron a 24°C. Las flechas completas

apuntan hacia núcleos condensados. Las cabezas de flecha apuntan a núcleos con forma de media luna. Las puntas de flecha vacías apuntan hacia las células germinales con señal RME-2 positivas. El asterisco indica células germinales con señal RME-2 positivas ectópicas. d: distal. p: proximal. Datos obtenidos en colaboración con la M. en C. Laura Silvia Salinas Velázquez.

6.7. Los animales *dpff-1* mutantes muestran una sobreexpresión de la MAP cinasa ERK fosforilada

Debido a que los animales *dpff-1* mutantes tienen defectos en la meiosis, realizamos una inmunotinción en contra de la proteína MPK-1 fosforilada (P-MPK-1) en gónadas disectadas de animales adultos de dos días *dpff-1(xm17)* crecidos a 24°C. Observamos que la activación de la señal de P-MPK-1 en zona 1 y zona 2 se dio en todos los animales silvestres (**Figura 25b**) y únicamente en un 34.9% de animales *dpff-1(xm17)*. Por otro lado, observamos que en un 65.1% de animales *dpff-1(xm17)* la señal de P-MPK-1 aparenta ser más fuerte o la señal nunca se apaga, ya que la señal se mantiene activa desde la zona de paquíteno hasta la zona de ovocitos (**Figura 25d**). Para confirmar que la señal de MPK-1 era más fuerte en animales *dpff-1(xm17)*, realizamos un Western blot con un anticuerpo que reconoce la forma activa de la proteína (P-MPK-1). En este experimento observamos que la expresión de MPK-1 en su forma activa (P-MPK-1) es más abundante en animales *dpff-1(xm17)* que en animales silvestres (**Figura 25e**). Estos resultados muestran que los animales mutantes en *dpff-1* tienen una sobreexpresión en la forma fosforilada de MPK-1 y esto podría ser la causa o consecuencia de los defectos en la meiosis.

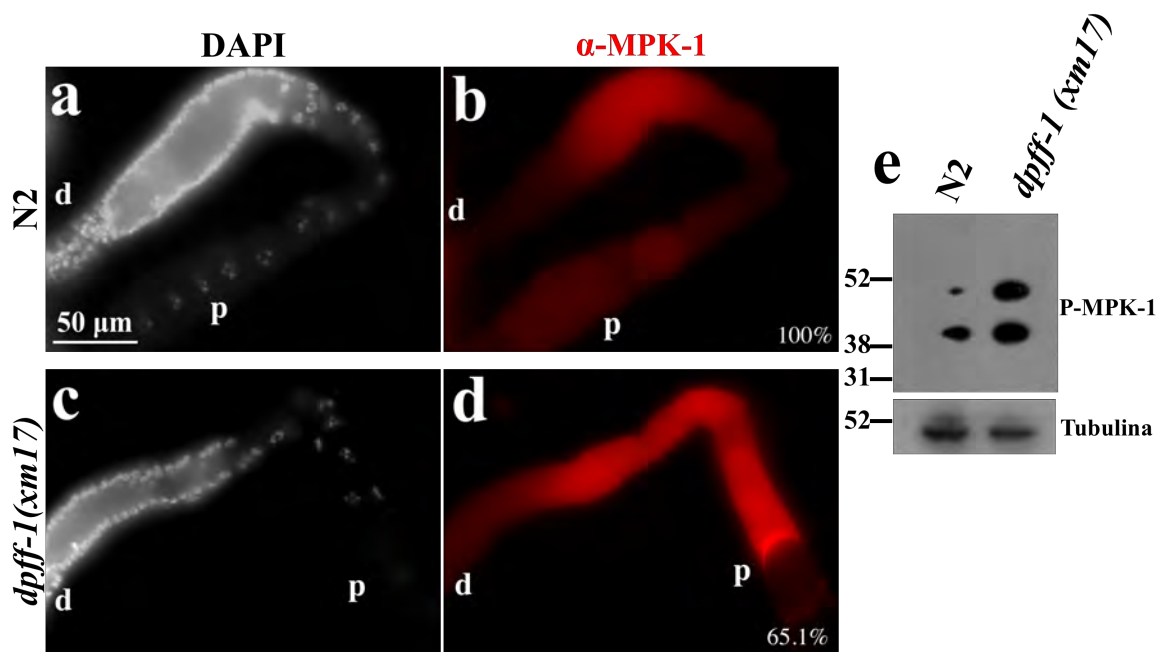


Figura 25. La señal de P-MPK-1 se expresa con mayor intensidad en animales *dpff-1* mutantes. Las gónadas disecadas de animales hermafroditas de dos días en los genotipos indicados fueron fijadas y teñidas con DAPI (gris; **a** y **c**) y el anticuerpo que reconoce a la MPK-1 fosforilada (P-MPK-1) (rojo; **b** y **d**). El porcentaje de animales que presentan el fenotipo mostrado está indicado dentro de cada panel. d=distal and p=proximal. (e) Western blot contra la proteína p-MPK-1 de extractos de animales silvestres y animales *dpff-1(xm-17)*. Como control de carga se utilizó el anticuerpo monoclonal α -tubulina. Datos obtenidos en colaboración con la M. en C. Laura Silvia Salinas Velázquez.

6.8. Los defectos en meiosis en la gónada de animales *dpff-1* mutantes provocan que se active la apoptosis de las células germinales via p53

Como se mencionó anteriormente, cuando realizamos tinciones con DAPI en la gónada de animales *dpff-1* mutantes, observamos núcleos condensados en la gónada distal que no fueron positivos a la señal de la histona H3 fosforilada (**Figura 24b**). Dado que los núcleos condensados son una característica común de células que entran en apoptosis, decidimos probar si la mutación en *dpff-1* podría desencadenar este tipo de muerte celular.

Para probar nuestra hipótesis, cruzamos animales *dpff-1(xm17)* con animales transgénicos MD701 *bcIs39 [P_{lim-7}::ced-1::gfp; lin-15(+)]*. La cepa MD701 es comúnmente empleada como marcador de apoptosis (Schumacher et al. 2005). Los animales *ced-1::gfp;dpff-1(xm17)* y *ced-1::gfp* (control) fueron crecidos a 24°C, montados en un portaobjetos y observados bajo el microscopio de epifluorescencia para cuantificar el número de cuerpos apoptóticos por brazo de gónada a las 24, 48 y 72 h post-estadío larval L4. Observamos que los cuerpos apoptóticos de la cepa control se aprecian únicamente en el asa de la gónada a lo largo de todo su desarrollo (**Figura 26a**). Por otro lado, en algunos animales *dpff-1(xm17)* 48 h post L4, los cuerpos apoptóticos son observados en la región distal y en el dobles de la gónada (**Figura 26b**). Adicionalmente, observamos que los animales *ced-1::gfp;dpff-1(xm17)* y *ced-1::gfp* (control) tienen valores similares de cuerpos apoptóticos a las 24 h post-estadío L4. Sin embargo, a las 48 y 72 h post-estadío L4 los animales *ced-1::gfp;dpff-1(xm17)* tienen más cuerpos apoptóticos que animales *ced-1::gfp* (**Figura 27a**). Para corroborar estas observaciones, silenciamos el gen *ced-1* por RNAi para cuantificar apoptosis por un método alternativo. La proteína CED-1 se requiere para el proceso de reconocimiento y degradación de cuerpos apoptóticos (Zhou et al. 2001). En un fondo *ced-1(RNAi)*, los cuerpos apoptóticos son detectados fácilmente por microscopía Nomarski. Por esta metodología, confirmamos que el número de cuerpos apoptóticos de animales *dpff-1(xm17)* es mayor al número de cuerpos apoptóticos de animales silvestres.

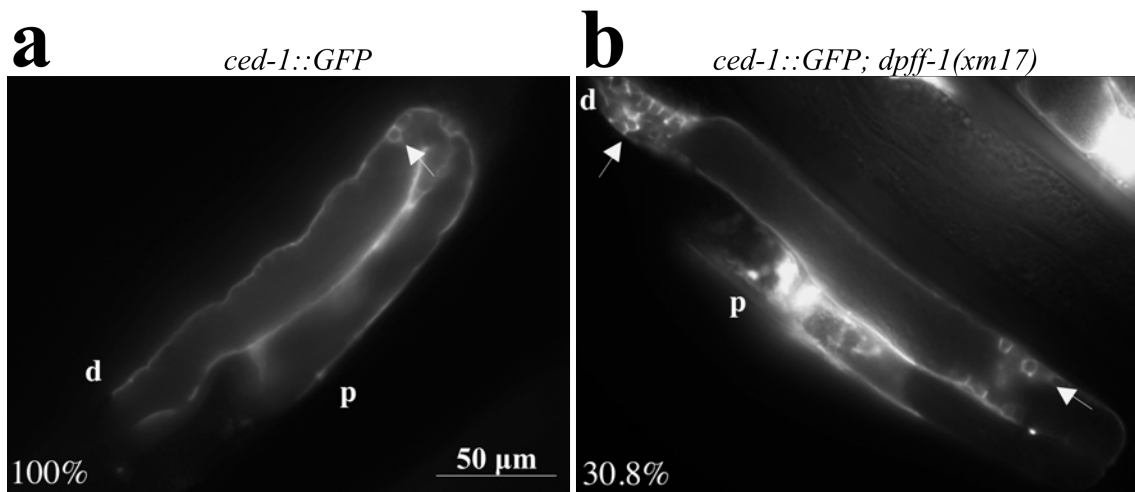


Figura 26. Los animales *dpff-1* mutantes presentan cuerpos apoptóticos ectópicos. (a y b) Animales hermafroditas de dos días de los genotipos indicados crecidos a 24°C, se montaron y observaron bajo el microscopio de epifluorescencia para cuantificar cuerpos apoptóticos. Las flechas completas apuntan hacia los cuerpos apoptóticos. El porcentaje de animales que presentan el fenotipo mostrado está indicado dentro de cada panel. d=distal and p=proximal. Datos obtenidos en colaboración con la M. en C. Laura Silvia Salinas Velázquez.

Se ha reportado que defectos en la meiosis pueden activar la apoptosis de la línea germinal (Gartner et al. 2000; Alpi et al. 2003; Martin et al. 2005). En *C. elegans*, la apoptosis de la línea germinal inducida por defectos en puntos de control meiótico depende de la activación de la proteína p53 (CEP-1) (Bailly and Gartner 2013). Para probar si el aumento de la apoptosis de células germinales en animales *dpff-1* mutantes es dependiente de p53, silenciamos a *dpff-1* por medio de RNAi en un fondo *cep-1(gk138);ced-1::gfp*. El silenciamiento de *dpff-1* en el fondo *ced-1::gfp* dio como resultado una mayor apoptosis de células germinales, similar a la observada en la pérdida de función de *dpff-1* (**Figura 27 a-c**). Los valores de cuerpos apoptóticos por brazo de gónada de animales *cep-1(gk138);ced-1::gfp* y animales *ced-1:gfp* (PV) fueron similares (**Figura 27d**). Además, observamos que

la cinética de apoptosis al silenciar *dpff-1* en un fondo *cep-1(gk138);ced-1::gfp* fue similar a la cinética de apoptosis de animales control (*cep-1 (gk138), ced-1: gfp*, (EP)) (**Figura 27d**), demostrando que el aumento en la apoptosis de las células germinales de animales *dpff-1* mutantes depende de p53 (CEP-1). Nuestros resultados sugieren que el aumento de la apoptosis de células germinales en animales *dpff-1* mutantes podría ser el resultado de la activación de puntos de chequeo de apoptosis debido a defectos en la meiosis.

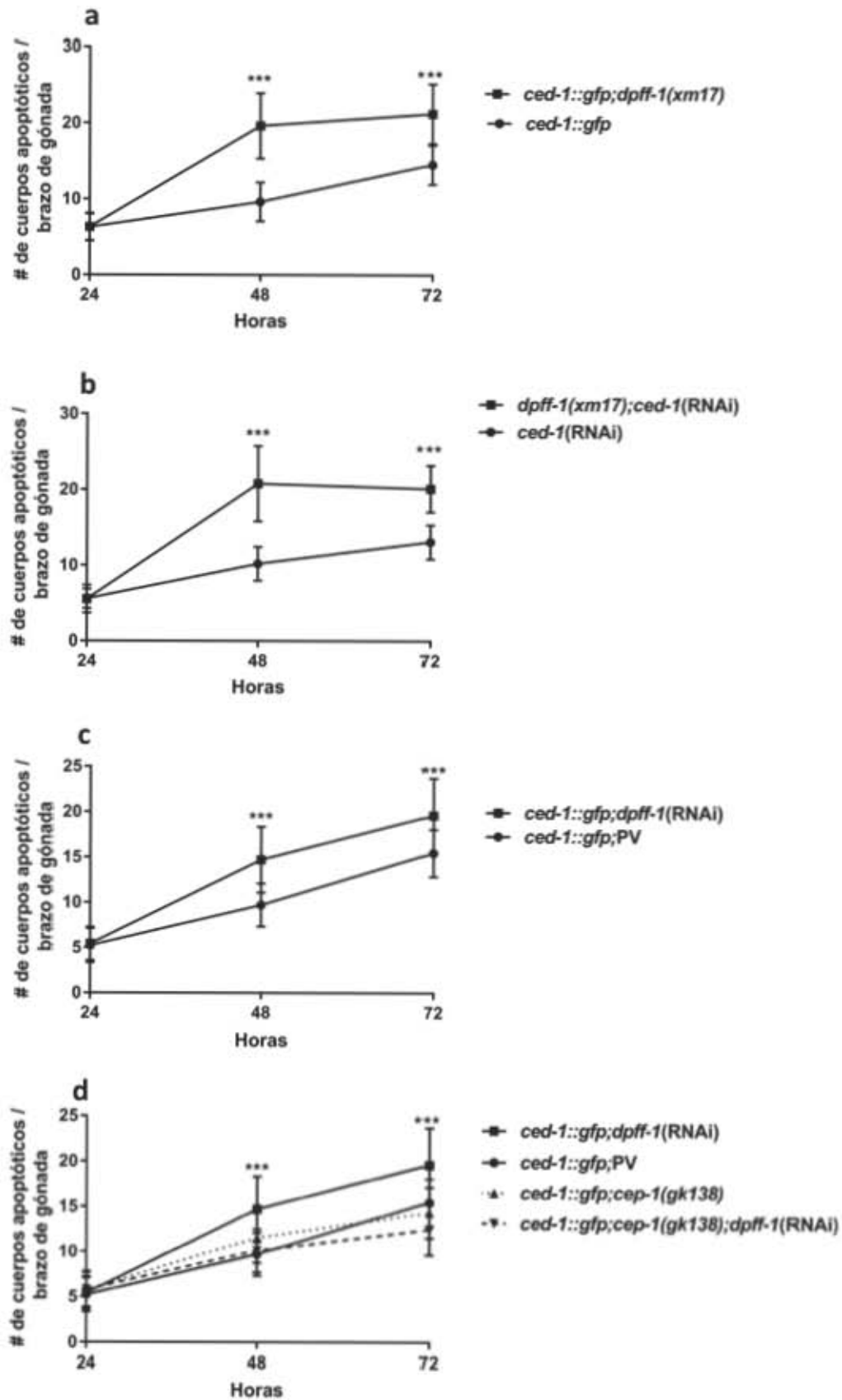


Figura 27. El incremento en la apoptosis de la línea germinal de animales *dpff-1* mutantes depende de la proteína p53. Los animales de los genotipos indicados fueron crecidos a 24°C, montados y observados bajo el microscopio de epifluorescencia para determinar el número de cuerpos apoptóticos. El promedio de cuerpos apoptóticos por brazo de gónada se cuantificó a las 24, 48 y 72 h post estadio L4. En los datos se muestra el error como SEM (Standard error of the mean). Todos los análisis estadísticos fueron realizados mediante una prueba t tipo Mann-Whitney (*** P<0.001). Datos obtenidos en colaboración con la M. en C. Laura Silvia Salinas Velázquez.

6.9. DPFF-1 se requiere para inducir apoptosis de las células germinales en diferentes condiciones de estrés

dpf2/requiem/ubi-d4 fue originalmente descrito como un gen que codifica para una proteína con dedos de zinc requerida para inducir la respuesta apoptótica de células mieloides ante la privación de IL-3 (Gabig et al. 1994). Diferentes tipos de estrés inducen la tasa de mortalidad de células germinales en *C. elegans* (Derry et al. 2001; Salinas et al. 2006; Stergiou et al. 2007), por lo que decidimos estudiar el rol de *dpff-1* en la inducción de la apoptosis de las células germinales bajo diferentes tipos de estrés. Para el estrés por ayuno, animales *ced-1::gfp;dpff-1(tm4287)*, *ced-1::gfp;dpff-1(xm17)* y *ced-1::gfp* control fueron crecidos a 24°C. Animales adultos de los genotipos indicados fueron alimentados con bacterias o se les ayunó por 6 h en cajas sin bacteria. Los animales se observaron con el microscopio de epifluorescencia para cuantificar los cuerpos apoptóticos por brazo de gónada en cada condición. Adicionalmente, se comparó el número de cuerpos apoptóticos de animales con el mismo genotipo en condiciones control vs condiciones ayuno. De acuerdo con resultados anteriores (Salinas et al. 2006), observamos que el número de cuerpos apoptóticos de animales control *ced-1::gfp* en condiciones de ayuno incrementó 1.8 veces (**Figura 28**). Por otro lado, observamos que el número de cuerpos apoptóticos de

animales *dpff-1* mutantes ayunados incrementó solo 1.4 veces (**Figura 28**). Debido a que existe una diferencia significativa entre los valores de apoptosis del grupo de animales control ayunados y el grupo de animales *dpff-1* ayunados, consideramos que la respuesta de inducción al ayuno en un fondo *dpff-1* mutante es parcial.

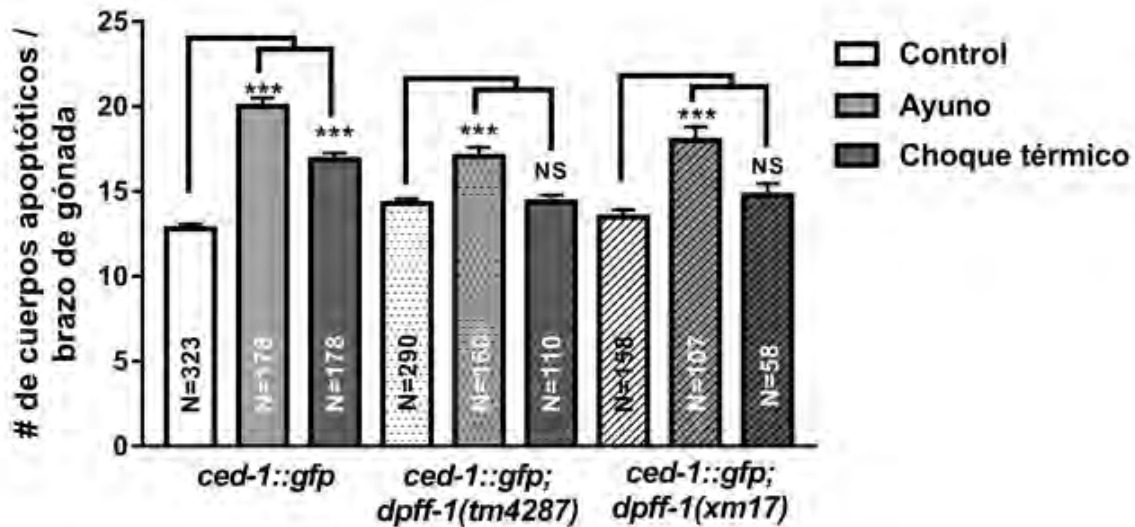


Figura 28. DPFF-1 se requiere para inducir apoptosis de las células germinales en diferentes condiciones de estrés a 24°C. Los animales en los genotipos indicados fueron crecidos a 24°C. Animales adultos de un día de los genotipos indicados fueron expuestos a 6 h de ayuno o 3h a 31°C para choque de calor, montados y observados bajo el microscopio de epifluorescencia para determinar el número de cuerpos apoptóticos. En la gráfica se muestra el promedio de cuerpos apoptóticos por brazo de gónada cuantificados en condiciones control o bajo diferentes tipos de estrés. En las barras se muestran el error como SEM (Standard error of the mean) y el número total de gónadas cuantificadas. Todos los análisis estadísticos fueron realizados mediante una prueba t tipo Mann-Whitney (***) P<0.001).

A continuación, evaluamos si *dpff-1* participa en inducir la apoptosis de las células germinales con un choque de calor. Animales *ced-1::gfp;dpff-1(tm4287)*, *ced-1::gfp;dpff-1(xm17)* y *ced-1::gfp* control fueron crecidos a 24°C. Animales adultos de un día de los

genotipos indicados se mantuvieron a 24°C o fueron expuestos a un choque de calor durante 3 h a 31°C y recuperados por 4.5 h a 24°C. Los animales se observaron con el microscopio de epifluorescencia para cuantificar los cuerpos apoptóticos por brazo de gónada en cada condición. Adicionalmente, se comparó el número de cuerpos apoptóticos de animales con el mismo genotipo en condiciones control *vs* condiciones de choque de calor. Observamos que el número de cuerpos apoptóticos de animales control *ced-1::gfp* en condiciones de choque de calor incrementó 1.4 veces (**Figura 28**). Sin embargo, el número de cuerpos apoptóticos de animales *dpff-1* mutantes en condiciones de choque de calor no aumentó. Estos datos sugieren que *dpff-1* es importante para inducir la apoptosis durante el choque de calor.

6.10. *dpff-1* se requiere para que animales adultos sobrevivan al estrés

Para determinar si *dpff-1* se requiere para la protección de embriones y células germinales ante un choque de calor, realizamos un ensayo en el que se evalúa la letalidad embrionaria como medida indirecta de la calidad de las células germinales (Huelgas-Morales et al. 2016). En estos ensayos, animales adultos de un día en los genotipos indicados fueron crecidos a 24°C y se dividieron en dos grupos: animales control (24°C) y animales sometidos a un choque de calor de 31°C por 3h. La calidad de células germinales fue indirectamente evaluada a través de la cuantificación de la letalidad embrionaria. Para analizar el efecto del choque de calor sobre las células germinales, la progenie fue dividida dentro de tres grupos: Grupo I): embriones que fueron fertilizados antes o durante el choque de calor, (Tiempo 0 al 10 h post choque de calor), grupo II): embriones que fueron fertilizados 10 a 22 h post choque de calor, y grupo III): embriones que fueron fertilizados 22 a 46 h post choque de calor (**Figura 29a**). La letalidad embrionaria tanto de animales

silvestres como de animales *dpff-1* mutantes del grupo control fue baja en todos los casos (**Figura 29b**). En cambio, la letalidad embrionaria en condiciones de choque de calor de animales silvestres y animales *dpff-1* mutantes del grupo I incrementó (**Figura 29b**). Sin embargo, la letalidad embrionaria en condiciones de choque de calor de animales silvestres y animales *dpff-1* mutantes del grupo II y grupo III disminuyó (**Figura 29b**). No hubo diferencias estadísticas entre la letalidad embrionaria de animales *dpff-1* mutantes comparada con la letalidad embrionaria de animales silvestres en cada condición. Estos datos sugieren que *dpff-1* no se requiere para la protección de células germinales y embriones ante un choque de calor.

Para determinar si *dpff-1* se requiere en animales adultos para sobrevivir al estrés por choque de calor, se realizó un ensayo descrito previamente por Paz-Gomez et al. (2014). Animales adultos silvestres y animales adultos *dpff-1* mutantes crecidos a 24°C fueron sometidos a un choque de calor de 36°C por varias horas. Los animales en los genotipos indicados fueron analizados cada hora para comprobar su sobrevivencia. Independientemente de las condiciones de crecimiento, durante las primeras seis horas de incubación no hubo diferencias entre en el porcentaje de sobrevivencia de animales *dpff-1* mutantes y animales silvestres (**Figura 29c**). A las 9 h del choque de calor, solo el 78% de animales silvestres sobrevivió; mientras que, en el mismo punto sólo el 36% de animales *dpff-1* mutantes sobrevivió (**Figura 29c**). A las 11 h del choque de calor, el 49% de animales silvestres sobrevivió; mientras que, en el mismo punto sólo 3% de animales *dpff-1* mutantes sobrevivió (**Figura 29c**). Estos datos sugieren que DPFF-1 es importante para sobrevivir al choque de calor durante la edad adulta de *C. elegans*.

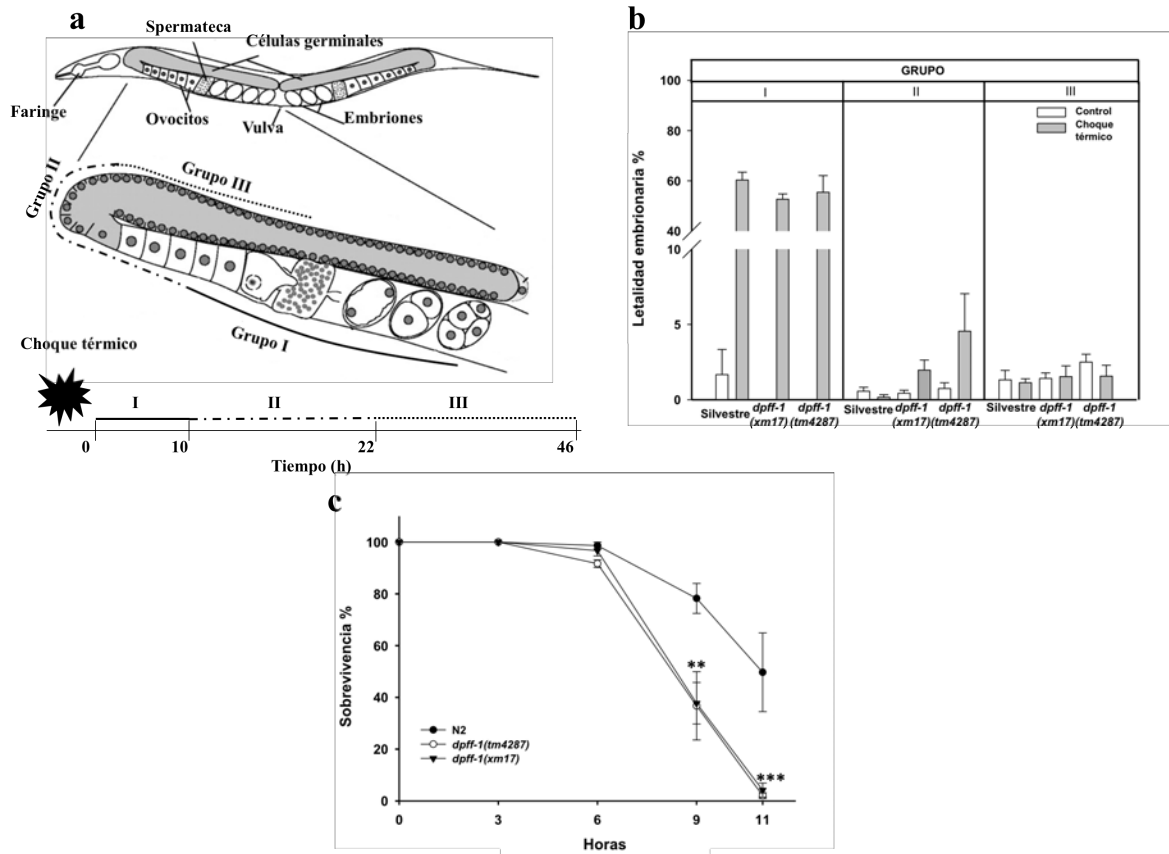


Figura 29. *dpff-1* se requiere en animales adultos para sobrevivir al estrés. (a) Representación esquemática de la clasificación de embriones para el ensayo de sobrevivencia al choque de calor. (b) Los animales en los genotipos indicados fueron crecidos a 24°C, seleccionados en el estadio adulto de un día y sometidos a un choque de calor a 31°C por 3 h. Los animales control en los genotipos indicados fueron crecidos a 24°C. Los embriones fueron clasificados dentro tres grupos: embriones que fueron fertilizados I) antes o durante el choque de calor, II) poco después del choque de calor y III) tiempo después del choque de calor. La letalidad embrionaria es representada como el porcentaje de embriones que no eclosionaron después de 24 h de ser depositados en el medio. Se muestran los datos con dos réplicas independientes en cada condición con una $n \geq 989$. Las barras de error muestran SEM (Standard error of the mean). Todos los análisis estadísticos fueron realizados mediante una n1w-ANOVA (** $p < 0.01$). Animales adultos sincronizados del genotipo indicado fueron crecidos a 24°C y sometidos un choque de calor de 36°C por varias horas. Se muestra el promedio del porcentaje de sobrevivencia de animales adultos de tres experimentos independientes. Las barras de error muestran SEM

(Standard error of the mean). Todos los análisis estadísticos fueron realizados mediante una Two-way ANOVA con una prueba de Bonferroni (** P<0.01, *** P<0.001). **(b)** Datos obtenidos en colaboración con la Dra. Gabriela Huelgas Morales. **(c)** Datos obtenidos en colaboración con la Dra. Paulette Fernández Cárdenas.

Para evaluar si los animales *dpff-1* mutantes eran capaces de activar una respuesta ante un choque de calor, se usó el transgénico TJ375 (*hsp-16.2::gfp(gpIs1)*). La cepa TJ375 expresa la GFP bajo el promotor inducible por choque de calor *hsp-16.2* (Dues et al. 2016). Animales *hsp-16.2::gfp(gpIs1)* y animales *dpff-1(xm17);hsp-16.2::gfp* se mantuvieron a 20°C o se sometieron a un choque de calor durante 2 h a 35°C. Al finalizar los tratamientos, los animales de cada grupo en los genotipos indicados fueron montados y observados bajo un microscopio de epifluorescencia. Observamos que los valores de fluorescencia relativa en los animales que no fueron sometidos a ningún tipo de estrés son similares (**Figura 30 a, c y j**). Por otro lado, los valores de fluorescencia relativa incrementaron tanto en animales *hsp-16.2::gfp(gpIs1)* como en animales *dpff-1* mutantes al finalizar los tratamientos por choque de calor (**Figura 30 b, d y j**). Sin embargo, observamos que bajo condiciones de estrés, los valores de fluorescencia relativa de animales *dpff-1(xm17);hsp-16.2::gfp* era significativamente menores a los valores de fluorescencia relativa de animales *hsp-16.2::gfp* (**Figura 30j**).

Adicionalmente, evaluamos la respuesta de animales *dpff-1* mutantes usando el transgénico CF1553 (*psod-3::gfp*). La cepa CF1553 expresa la GFP bajo el promotor inducible por choque de calor *sod-3* [134]. Se silenció a *dpff-1* por RNAi en un fondo *psod-3::gfp* y como control se utilizó el plásmido vacío (PV). Los animales *psod-3::gfp(PV)* y *psod-3::gfp;dpff-1(RNAi)* se mantuvieron a 20°C o se sometieron a un choque de calor durante 8 h a 31°C. Al finalizar los tratamientos, los animales de cada grupo en los

genotipos indicados fueron montados y observados bajo un microscopio de epifluorescencia. Observamos que en condiciones control los valores de fluorescencia relativa de animales *psod-3::gfp;dpff-1(RNAi)* eran significativa menores a los valores de fluorescencia relativa de animales *psod-3::gfp(EP)* (**Figura 30 f, h y k**). Al finalizar el choque de calor, observamos que los valores de fluorescencia relativa no incrementaron en animales *psod-3::gfp;dpff-1(RNAi)* (**Figura 30 i y k**); mientras en animales *psod-3::gfp(EP)* los valores de fluorescencia relativa incrementaron significativamente (**Figura 30 g y k**). Adicionalmente, observamos que bajo condiciones de estrés, los valores de fluorescencia relativa de animales *psod-3::gfp;dpff-1(RNAi)* eran significativamente menores a los valores de fluorescencia relativa de animales *psod-3::gfp(EP)* (**Figura 30k**). Estos resultados en conjunto muestran que DPFF-1 tiene un papel importante para la activación de la respuesta al estrés inducida por choque calor en animales adultos.

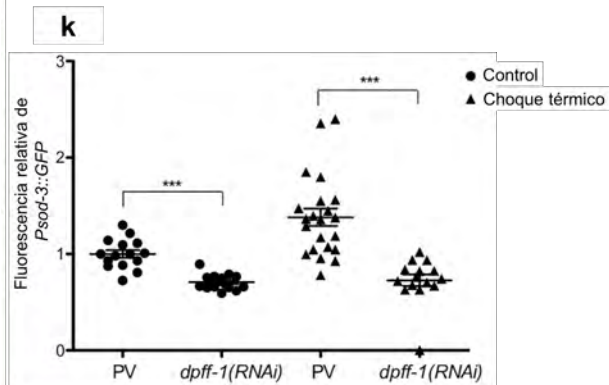
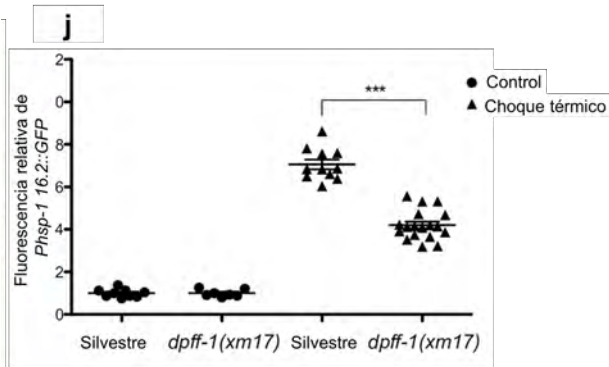
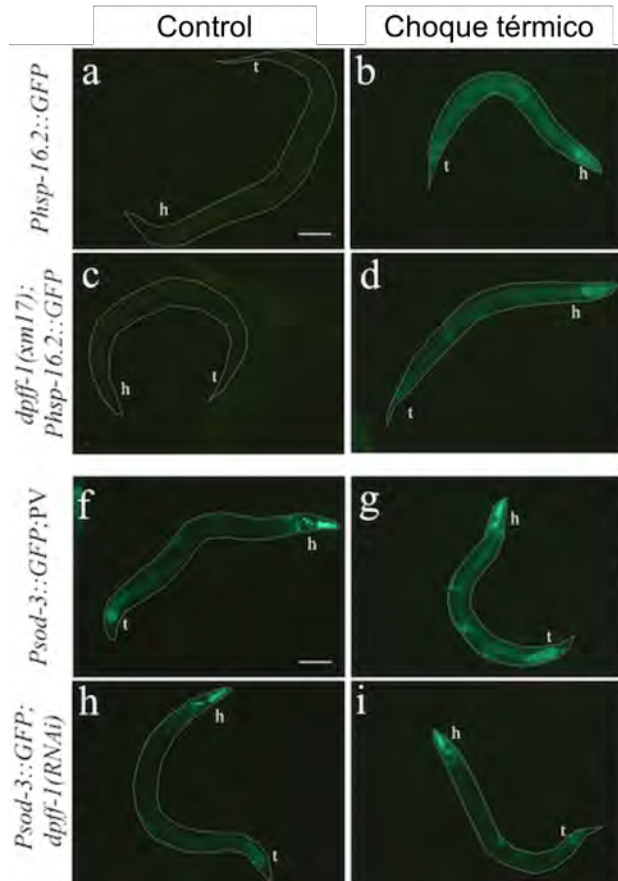


Figura 30. Los Animales *dpff-1(xm17)* no responden al choque térmico. Expresión del reportero de choque de calor *hsp16.2::gfp* en animales con los genotipos indicados bajo condiciones control (sin estrés, **a y c**) o después de un choque calor de 35°C por 2 h (**b y d**). Expresión del reportero de choque de calor *dpff-1; hsp16.2::gfp* *gfp* en animales con los genotipos indicados bajo condiciones control (sin estrés, **f y h**) o después de un choque de calor de 31°C por 8 h (**g e i**). (**j y k**) Análisis cuantitativo para comparar lo niveles de expresión de la GFP en los genotipos indicados. Se muestran los datos de una o dos réplicas independientes con resultados similares. Todos los análisis estadísticos fueron realizados mediante una One-way ANOVA *** $p < 0.001$. *hsp-16::gfp*: (control) n=17, (choque de calor) n=17; *hsp-16::gfp; dpff-1(xm17)*: (control) n=29, (choque de calor) n=33. *sod-3:gfp*; PV: (control) n=27, (choque de calor) n=29; *sod-3:gfp; dpff-1(RNAi)*: (control) n=43, (choque de calor) n=31. h=cabeza and t=cola. Datos obtenidos en colaboración con la M. en C. Laura Silvia Salinas Velázquez y la Dra. Paulette Fernández Cárdenas.

7. DISCUSIÓN

7.1. DPFF-1 se expresa ubicuamente

En este trabajo mostramos que el transgen GFP::DPFF-1 se expresa de manera ubicua durante todo el desarrollo embrionario y post-embrionario de *C. elegans*, principalmente en un patrón nuclear y ligeramente difuso en el citoplasma de células somáticas y germinales (**Figura 18, 19 y 20**). En contraste, durante el desarrollo embrionario y post-embrionario de ratón, DPF1/*neuro-d4* y DPF3/*cer-d4* se expresan únicamente en el sistema nervioso central y el sistema nervioso periférico, mientras que DPF2/*requiem/ubi-d4* se expresa por igual en todos los tejidos y órganos (Buchman et al. 1992; Gabig et al. 1994; Gabig et al. 1998; Mertsalov et al. 2000; Kulikova et al. 2013). Además, Lange et al. (2008) mostró que *dpf3* se expresa en el corazón y los somitos de ratón, pollo y pez cebra. Durante el desarrollo embrionario y post-embrionario de *D. melanogaster*, *dd4* se expresa en el sistema nervioso y sistema reproductivo (Nabirochkina et al. 2002). En *Xenopus levis*, xReq se detectó en extractos de ovario (Konishi et al. 1999). Los dominios conservados en la secuencia de aminoácidos y el patrón de expresión conservado en diferentes organismos sugieren que los factores de transcripción de la familia *d4* podrían tener funciones evolutivamente conservadas.

Gabig et al. (1998) mostró que DPF2/REQ se encuentra en las fracciones nucleares y citoplasmáticas de células de leucemia humanas K562 y sugiere que DPF2/REQ podría ser secuestrado en el citoplasma en un estado inactivo o que su localización sub-celular dual podría tener una función biológica distinta en cada compartimiento celular. En concordancia con estos datos, mostramos que DPFF-1 se observa en los núcleos y

ligeramente difusa en el citoplasma de células somáticas y germinales durante todo el desarrollo de *C. elegans* (**Figura 20**).

7.2. DPFF-1 protege a los animales adultos del estrés

Hasta el momento, no había evidencia que mostrara la participación de los miembros de la familia *d4* en la protección contra el estrés. Encontramos que DPFF-1 es importante para sobrevivir al choque de calor durante la edad adulta de *C. elegans* (**Figura 29c**) ya que se requiere para activar algunos genes de respuesta a choque de calor (**Figura 30**). A pesar de que DPFF-1 tiene un papel importante en el desarrollo de ovocitos (**Figura 24, Tabla 6**), este no se requiere para la protección de embriones y células germinales ante el choque de calor a 31°C (**Figura 29b**). En *C. elegans*, el complejo remodelador de la cromatina SWI/SNF se requiere para promover longevidad y resistencia al estrés (Riedel et al. 2013). El complejo SWI/SNF está compuesto por subunidades accesorias comunes y subunidades específicas (**Figura 31**) (Large and Mathies 2014; Mathies et al. 2015). Dos grandes subfamilias del complejo SWI/SNF, denominadas BAF (Brg/Brm-associated factors) y PBAF (Polybromo-BAF), se distinguen entre sí por la composición única de subunidades accesorias. Las subunidades accesorias BAF/BAP y PBAF/PBAP tienen funciones distintas y compartidas en la regulación transcripcional de genes durante el desarrollo de mamíferos y el desarrollo de *D. melanogaster* (Lemon et al. 2001; Wang et al. 2004; Yan et al. 2005; Moshkin et al. 2007; Gao et al. 2008; Huang et al. 2008; Yan et al. 2008). Mediante experimentos *in vitro* de inmunoprecipitación se demostró una interacción entre la localización nuclear de la proteína DPF2/REQ con varias subunidades del complejo Brm-type SWI/SNF y la proteína p52 NF-κB (Tando et al. 2010). Además, experimentos de inmunoprecipitación montados en células Hek293 (Human Embryonic

Kidney) demostraron que las proteínas DPF1, 2 y 3 interactúan de manera específica con las subunidades de clase BAF (Brg/Brm-associated factors) del complejo SWI/SNF en (Middeljans et al. 2012). También se encontró que DPF3/CER-D4 interactúa con histonas cuyos residuos de lisina han sido acetilados o metilados (Lange et al. 2008). Adicionalmente, Lessard et al. (2007) mostró que el intercambio entre la subunidad PHF10 a la subunidad DPF1/DPF3 en los complejos SWI/SNF juegan un papel fundamental en el desarrollo neuronal. Aún no está claro el mecanismo por el cual DPFF-1 protege a los animales de un choque de calor. Es posible que la proteína DPFF-1 de *C. elegans* tenga un rol en la regulación transcripcional de genes mediante su unión directa al DNA y/o mediante su unión a proteínas del complejo remodelador de la cromatina SWI/SNF. Sería interesante probar si DPFF-1 interactúa con remodeladores de la cromatina bajo condiciones de estrés.

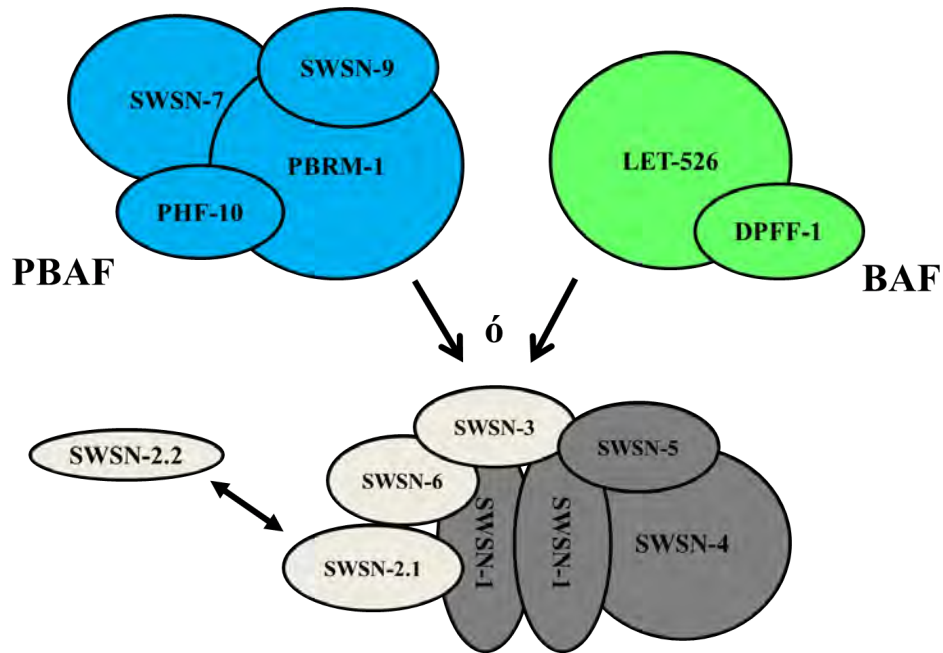


Figura 31. Representación esquemática del complejo remodelador de la cromatina SWI/SNF de *C. elegans* (modificado de (Mathies et al. 2015)). Por analogía con los complejos de mamíferos, estas subunidades se pueden combinar para formar complejos distintos (indicadas por flechas). Las subunidades compartidas por todos los complejos SWI/SNF incluyen el núcleo catalítico (gris oscuro) y las subunidades accesorias comunes (gris claro). Los complejos específicos BAF (Brg/Brm-associated factors; verde) y PBAF (Polybromo-BAF; azul) se asocian al núcleo catalítico y las subunidades accesorias.

7.3. Animales *dpff-1* mutantes tienen defectos en la fertilidad y en la morfología de la gónada

Mertsalov et al. (2008) mostró que ratones mutantes homocigotos para los genes *DPF1/neuro-d4* y *DPF3/cer-d4* no tienen defectos somáticos o reproductivos y propuso que otros genes o mecanismos podrían compensar la inactivación genética de *DPF1/neuro-d4* y *DPF3/cer-d4*. Por otro lado, el silenciamiento genético mediado por morfolinós de *dpf3* en pez cebra conduce a la incompleta torsión del tubo cardíaco y una severa reducción en la contractilidad ventricular (Lange et al. 2008). En concordancia con los datos previamente

reportados, observamos que animales *dpff-1* mutantes no presentan defectos somáticos evidentes a lo largo de su desarrollo. Sin embargo, mostramos que la fertilidad de animales *dpff-1* mutantes se reduce de manera significativa independientemente de las condiciones de crecimiento (**Tabla 5**). Los problemas de fertilidad en animales *dpff-1* mutantes podrían ser atribuidos a los defectos meióticos observados en las tinciones con DAPI. Entre los defectos meióticos observados están: 1) núcleos en transición ectópicos, 2) zona de paquíteno extendida, 3) ovocitos que parece estar madurando en la gónada distal y 4) un mayor número de núcleos condensados en la zona de mitosis (**Tabla 6 y Figura 24 b, c, e y f**). Aunado a ello, observamos que la penetrancia de los defectos meióticos en animales *dpff-1* mutantes es dependiente a temperatura (**Tabla 6**) y a su vez estos defectos aumentan conforme los animales envejecen.

En este trabajo mostramos que la señal de P-MPK-1 en animales *dpff-1* mutantes se mantiene activa desde la zona de paquíteno hasta la zona de ovocitos (**Figura 25d**). Además, confirmamos que la expresión de la MPK-1 fosforilada es mayor en animales *dpff-1* mutantes (**Figura 25e**). La señal de MPK-1 es necesaria para que las células germinales progresen a través de la profase I meiótica de paquíteno a diploteno y diacinesis (Church et al. 1995). Sugerimos que la desregulación de la P-MPK-1 en animales *dpff-1* mutantes podría estar causando los defectos meióticos. Actualmente, no sabemos por qué la expresión y fosforilación de MPK-1 son más altos en animales *dpff-1* mutantes. Se requieren estudios adicionales para probar si DPFF-1 regula la expresión de MPK-1 directa o indirectamente.

En animales silvestres solo las células que están en paquíteno tardío pueden entrar en apoptosis debido a la fosforilación de MPK-1 (Gumienny et al. 1999). Sin embargo,

observamos que animales *dpff-1* mutantes presentan un incremento en los valores de apoptosis de la línea germinal (**Figura 27 a-c**), así como cuerpos apoptóticos ectópicos en la gónada distal (**Figura 26b**). Creemos que las células germinales con defectos meióticos generadas en un fondo *dpff-1* mutante son detectadas en la gónada de estos animales. En *C. elegans* distintas vías activan la apoptosis de la línea germinal en respuesta a defectos en puntos de control de la meiosis (Gartner et al. 2000; Alpi et al. 2003; Martin et al. 2005). Adicionalmente, observamos que el incremento en los valores de apoptosis de la línea germinal en animales *dpff-1* mutantes se redujo significativamente en un fondo CEP-1 mutante (**Figura 27d**). La MPK-1 fosforilada activa la expresión de CEP-1 en células que se encuentran en paquíteno tardío (Rutkowski et al. 2011).

Gabig et al. (1998) mostró que la expresión de DPF2/*requiem/ubi-d4* es necesaria para iniciar la respuesta apoptótica de células mieloides ante la privación de IL-3. Además, Lim et al. (2010b) mostró que la sobre expresión de DPF2/REQ tiene un efecto negativo sobre el crecimiento celular e induce un aumento en la actividad de la caspasa-9 en células CHO, sin embargo estos cambios no era suficientes para activar la apoptosis. Por otro lado, Lim et al. (2010b) también encontró que la sobre expresión de DPF2/REQ sensibiliza a las células CHO ante la apoptosis inducida por estaurosporina al incrementar la actividad de la caspasa-9 y sugiere que la proteína DPF2/REQ podría tener un papel en la apoptosis mediada por mitocondria bajo el tratamiento de estaurosporina. En este trabajo sugerimos que *dpff-1* podría tener una función conservada en la apoptosis de células germinales bajo condiciones de estrés ya que DPFF-1 se requiere para inducir la apoptosis de las células germinales en respuesta al ayuno y choque de calor (**Figura 30**).

8. CONCLUSIONES

El objetivo de este trabajo fue explorar la función de *dpff-1*(C28H8.9) durante el desarrollo de *C. elegans*, en la resistencia al estrés y en la apoptosis de la línea germinal. Encontramos que (1) DPFF-1 es importante para sobrevivir al choque de calor durante la edad adulta de *C. elegans* ya que se requiere para activar algunos genes de respuesta a este tipo de estrés. Sin embargo, (2) DPFF-1 no se requiere para la protección de embriones y células germinales ante un choque de calor. (3) Encontramos que la inactivación de *dpff-1* genera defectos meióticos que afectan la fertilidad y aumentan la apoptosis de las células germinales. (4) Demostramos que el aumento en la apoptosis de las células germinales de animales *dpff-1* mutantes depende de p53 (CEP-1). (5) Mostramos que la señal de P-MPK-1 en animales *dpff-1* mutantes se mantiene activa desde la zona de paquíteno hasta la zona de ovocitos. También, (6) encontramos que DPFF-1 se requiere para inducir la apoptosis de las células germinales en respuesta al ayuno y choque de calor a altas temperaturas. Por último, (7) confirmamos que la expresión de *dpff-1* en la gónada de *C. elegans* disminuye en condiciones de ayuno y que (8) el transgen GFP::*DPFF-1* se expresa de manera ubicua durante todo el desarrollo embrionario y post-embrionario de *C. elegans*, principalmente en un patrón nuclear y ligeramente difuso por todo el citoplasma de células somáticas y germinales.

9. PERSPECTIVAS

- Determinar el mecanismo por el cuál se presentan defectos meióticos en animales *dpff-1* mutantes bajo condiciones normales de crecimiento.
 - a. Mediante ensayos de RT-PCR tiempo real y western-blot determinar que componentes de la via RAS-MPK-1 se encuentran alterados.
- Determinar el mecanismo por el cuál DPFF-1 protege a los animales de un choque de calor.
 - a. Mediante ensayos de co-inmunoprecipitación de proteínas, western-blot y espectrometría de masas determinar a que complejos proteicos se asocia DPFF-1 bajo condiciones normales de crecimiento o durante el estrés por choque de calor.
 - b. Mediante ensayos de inmunoprecipitación de cromatina y secuenciación (ChIP-seq) determinar que genes regula transcripcionalmente DPFF-1 bajo condiciones normales de crecimiento o durante el estrés por choque de calor.
- Determinar el mecanismo por el cuál se requiere *dpff-1* para inducir la apoptosis de la línea germinal en respuesta al ayuno y choque de calor.
 - a. Mediante ensayos de RT-PCR tiempo real y western-blot determinar que componentes de la maquinaria central de apoptosis o genes involucrados en la activación de la apoptosis de la línea germinal se encuentran alterados.
 - b. Mediante ensayos de inmunoprecipitación de cromatina y secuenciación (ChIP-seq) determinar que genes regula transcripcionalmente DPFF-1

bajo condiciones normales de crecimiento o durante el estrés por ayuno y choque de calor.

- Explorar cambios en la expresión de GFP::DPFF-1 en condiciones de estrés.

10.ARTÍCULO PUBLICADO


Received: 30 September 2016 | Revised: 15 September 2017 | Accepted: 20 September 2017

DOI: 10.1002/dvg.23072

RESEARCH ARTICLE

WILEY **genesis**
The Journal of Embryos and Development

DPFF-1 transcription factor deficiency causes the aberrant activation of MPK-1 and meiotic defects in the *Caenorhabditis elegans* germline

Emmanuel Villanueva-Chimal¹ | Laura S. Salinas¹ | Laura P. Fernández-Cardenas¹ |
Gabriela Huelgas-Morales¹ | Alejandro Cabrera-Wrooman² | Rosa E. Navarro¹ 

¹Departamento de Biología Celular y Desarrollo, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., México

²Laboratorio de Tejido Conjuntivo, Centro Nacional de Investigación y Atención de Quemados, Instituto Nacional de Rehabilitación "Luis Guillermo Ibarra Ibarra," México, D.F., México

Correspondence

Rosa E. Navarro, Departamento de Biología Celular y Desarrollo, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México. Apartado Postal 70-600. México D.F., 04510 México.
Email: navarro@ifc.unam.mx

Funding information

NIH Office of Research Infrastructure Programs, Grant Number: P40 OD010440; National BioResource Project for the Experimental Animal "Nematode *C. elegans*," Tokyo, Japan; Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT-México); Grant Number: 103856-Q, 220987; Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT-UNAM), Grant Number: IN207412, IN207415

Summary

The d4 family of transcription factors consists of three members in mammals. DPFF1/neuro-d4 is expressed mainly in neurons and the peripheral nervous system, and is important for brain development. DPFF2/requiem/ubi-d4 is expressed ubiquitously and presumably functions as an apoptotic factor, especially during the deprivation of trophic factors. DPFF3/cer-d4 is expressed in neurons and in the heart, and is important for heart development and function in zebrafish. In *Drosophila*, there is only one member, dd4, whose function is still unknown, but it is expressed in many tissues and is particularly abundant in the brain of developing embryos and in adults. Here, we present DPFF-1, the only member of this family of proteins in the nematode *C. elegans*. DPFF-1 is similar to its mammalian homolog DPFF2/requiem/ubi-d4 because it is ubiquitously expressed during embryogenesis and in adult tissues, and because it is important for the induction of germ cell apoptosis during stress. Here, we show that *dpff-1* null mutant animals produce less progeny than wild-type nematodes, presumably due to meiotic defects. Gonads of *dpff-1* deficient animals showed more germ cells in pachytene and overexpressed the P-MPK-1 signal. Additionally, these animals presented higher levels of p53-induced germ cell apoptosis than wild-type animals. Furthermore, we observed that *dpff-1* deficient animals are more sensitive to heat shock. This is the first report showing that the d4 family of transcription factors could be involved in meiosis and stress protection.

KEYWORDS

apoptosis, DPFF1/neuro-d4, DPFF2/requiem/ubi-d4, DPFF3/cer-d4, *dpff-1*, *C. elegans*, meiosis, MPK-1, stress

1 | INTRODUCTION

Members of the evolutionarily conserved d4 family of transcription factors DPFF1/*neuro-d4*, DPFF2/*requiem/ubi-d4* and DPFF3/*cer-d4* play important roles in programmed cell death and development (Buchman et al., 1992; Gabig, Mantel, Rosli, & Crean, 1994; Lange et al., 2008; Lim, Seah, Mantalaris, Yap, & Wong, 2010; Tando et al., 2010; Wu et al., 2007). DPFF1/*neuro-d4* and DPFF3/*cer-d4* were originally described as transcription factors that are expressed only in the central and peripheral nervous systems of mice (Buchman et al., 1992; Kulikova, Mertsalov, & Simonova, 2013; Lessard et al., 2007; Mertsalov

et al., 2000). In contrast, DPFF2/*requiem/ubi-d4* is expressed in all tissues and organs of mice and is required for the apoptotic response upon IL-3 withdrawal in myeloid cells (Gabig et al., 1994, 1998). DPFF2/REQ overexpression in Chinese hamster ovary (CHO) cells has a negative effect on cell growth and sensitizes cells to increased caspase-9 activities under control and staurosporine-induced apoptotic conditions (Lim et al., 2010).

Few groups have studied the requirements of this family of proteins in whole animals. Whereas mice with mutated DPFF1/*neuro-d4* or DPFF3/*cer-d4* do not show any reproductive or tissue defects (Mertsalov et al., 2008), morpholino knockdown of *dpf3* in zebrafish leads to

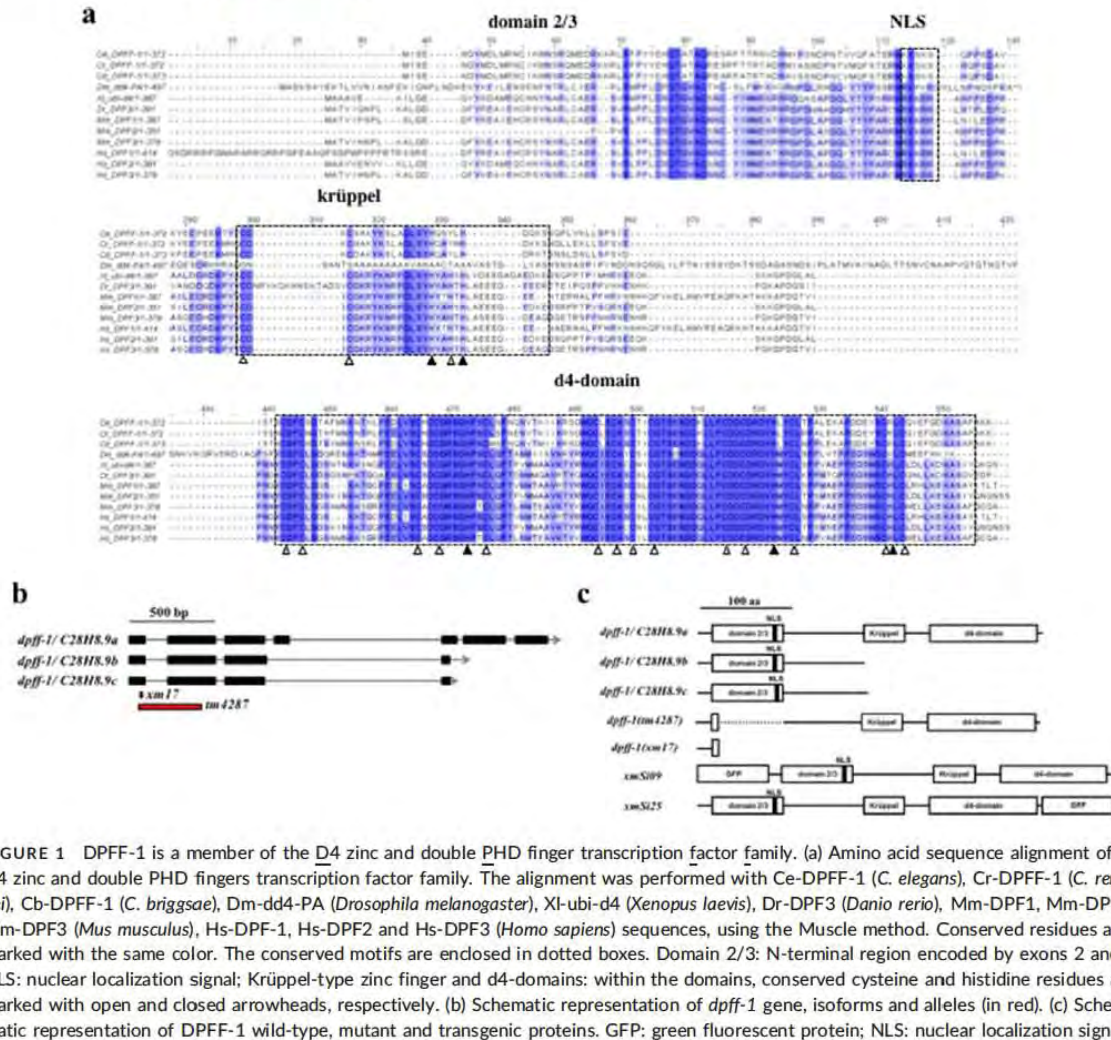


FIGURE 1 DPFF-1 is a member of the D4 zinc and double PHD finger transcription factor family. (a) Amino acid sequence alignment of D4 zinc and double PHD fingers transcription factor family. The alignment was performed with Ce-DPFF-1 (*C. elegans*), Cr-DPFF-1 (*C. remanei*), Cb-DPFF-1 (*C. briggsae*), Dm-dd4-PA (*Drosophila melanogaster*), XI-ubi-d4 (*Xenopus laevis*), Dr-DPF3 (*Danio rerio*), Mm-DPF1, Mm-DPF2, Mm-DPF3 (*Mus musculus*), Hs-DPF-1, Hs-DPF2 and Hs-DPF3 (*Homo sapiens*) sequences, using the Muscle method. Conserved residues are marked with the same color. The conserved motifs are enclosed in dotted boxes. Domain 2/3: N-terminal region encoded by exons 2 and 3; NLS: nuclear localization signal; Krüppel-type zinc finger and d4-domains: within the domains, conserved cysteine and histidine residues are marked with open and closed arrowheads, respectively. (b) Schematic representation of *dpff-1* gene, isoforms and alleles (in red). (c) Schematic representation of DPFF-1 wild-type, mutant and transgenic proteins. GFP: green fluorescent protein; NLS: nuclear localization signal

incomplete cardiac looping and severely reduced ventricular contractility with disassembled muscular fibers (Lange et al., 2008).

The nematode *Caenorhabditis elegans* has only one member of this family of proteins, *dpff-1*. In this article, we show that DPFF-1 is important for fertility and the correct progression of germ cells through meiosis. *dpff-1* mutant animals had ectopic and higher expression of the active phosphorylated form of MPK-1 (P-MPK-1) than wild-type animals, and this expression was never down-regulated in the proximal gonad. We show that *dpff-1* mutant animals showed increased germ cell apoptosis, which we attributed to the activation of a meiotic checkpoint because was dependent on the p53 homolog of *C. elegans* CEP-1. Here, we also show that DPFF-1 is important for the heat shock response because animals lacking this protein were unable to induce germ cell apoptosis under these conditions, were more sensitive to heat shock and were unable to turn on heat shock stress reporters.

2 | RESULTS

2.1 | *C. elegans* has only one member of the D4 family of transcription factors

Searching for members of the d4 family of transcription factors in the *C. elegans* genome, we found the open reading frame C28H8.9, which is also called *dpff-1* (<http://www.wormbase.org>, release WS252, Dec 04, 2015). Protein alignment showed that *C. elegans* DPFF-1 is almost identical to its putative orthologs in *Caenorhabditis remanei* (86% identity) and *Caenorhabditis briggsae* (82% identity) (Figure 1a). *C. elegans* DPFF-1 is also closely related to *Drosophila melanogaster* dd4-PA (60% identity) and, to a lesser extent, is similar to its orthologs from vertebrates [~38% identity with the d4 family of transcription factors from *Xenopus laevis*, *Danio rerio*, *Mus musculus* and *Homo sapiens*; (Figure 1a)]. Similar to other members of the d4 family of transcription factors, *C. elegans* DPFF-1 contains a putative nuclear localization signal (NLS),

a Krüppel-type zinc finger domain and two C-terminal tandem plant homeodomains (PHD/d4-domain; Figure 1a,c). There are three predicted *dpff-1* spliced isoforms in the *C. elegans* genome, but only the longest isoform encodes a protein that possesses the Krüppel and d4 domains, which are characteristic of this family of proteins (Figure 1b,c).

2.2 | DPFF-1 is expressed in nuclei during development

To determine the expression pattern of *dpff-1* during *C. elegans* development, we made amino- and carboxy-terminus green fluorescent protein (GFP) reporter transgenes driven by *dpff-1*'s own regulatory regions. To generate these transgenes, we cloned in tandem: *dpff-1*'s putative promoter region (965 bp), defined as the intergenic sequence upstream of *dpff-1* (Dupuy et al., 2004), and the genomic coding region from ATG to the end of the longest 3'UTR reported (2632 bp) (<http://www.wormbase.org>, release WS252, Dec 04, 2015). Then, we fused the *gfp* coding gene without a stop codon after *dpff-1* ATG or before the *dpff-1* stop codon using a Gibson reaction (Gibson et al., 2009). Transgenic animals were generated by Mos1-mediated single copy insertion (MosSCI) (Frokjaer-Jensen, Davis, Ailion, & Jorgensen, 2012; Frokjaer-Jensen et al., 2008). The transgenic line *xmSi09* expresses the GFP reporter fused to DPFF-1 in the amine-terminus (Figure 1c), and the line *xmSi25* expresses the GFP reporter fused to DPFF-1 in the carboxy-terminus (Figure 1c). For simplicity, in this work, we will refer to the transgenic line *xmSi09* as GFP::DPFF-1 and the transgenic line *xmSi25* as DPFF-1::GFP.

A mixture of live GFP::DPFF-1 embryos, larvae and adult hermaphrodite animals were placed on a slide and observed under an epifluorescence microscope to determine the fusion protein expression pattern. GFP::DPFF-1 positive cells could be observed throughout all embryonic and post-embryonic stages, at high levels in nuclei, and at lower levels diffused throughout the cytoplasm (Figure 2). Both transgenic lines had the same expression pattern (Supporting Information Figure S1).

To confirm GFP::DPFF-1 nuclear localization, we stained extruded gonads of 1-day-old *xmSi09* hermaphrodite and male animals with 4',6'-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI). As expected, the fluorescent signal of GFP::DPFF-1 overlapped with the DAPI fluorescent signal in hermaphrodite (Supporting Information Figure S2a–c) and male (Supporting Information Figure S2d–f) germ and somatic gonad cells. GFP::DPFF-1 was also observed at lower levels diffused throughout the cytoplasm of hermaphrodite (Supporting Information Figure S2a–c) and male (Supporting Information Figure S2d–f) germ cells. These observations demonstrate that GFP::DPFF-1 is expressed ubiquitously throughout all embryonic and postembryonic stages and is, mainly localized in the nuclei and at lower levels is diffused throughout the cytoplasm.

To validate the fluorescent signal of the GFP::DPFF-1 transgene, we silenced the *dpff-1* gene in *xmSi09* animals using RNAi by feeding. As a negative control for the RNAi studies, we used an empty pPD129.36 plasmid (EP) as previously recommended by Conte and

Mello (2003). *xmSi09* animals were grown under control (EP) or *dpff-1* (RNAi) conditions at 24°C. One-day-old *xmSi09*(EP) and *xmSi09*;*dpff-1* (RNAi) animals were observed under an epifluorescence microscope. The GFP::DPFF-1 fluorescent signal was clearly reduced in *dpff-1*(RNAi) animals (Supporting Information Figure S3i–p) compared to that of control RNAi animals (Supporting Information Figure S3a–h). However, all *xmSi09*;*dpff-1*(RNAi) animals retained some fluorescent background in some unidentified cells in the head, tail and along the body (Supporting Information Figure S3m,p, arrowheads). We hypothesized that some of these unidentified cells could be neurons because they are resistant to RNAi by feeding in *C. elegans* (Asikainen, Vartiainen, Lakso, Nass, & Wong, 2005; Kamath, Martinez-Campos, Zipperlen, Fraser, & Ahringer, 2001). Our observations demonstrate that the fluorescent signal observed in the GFP::DPFF-1 animals corresponds to the expression of the fusion protein and that the dsRNA used to silence *dpff-1* works efficiently.

2.3 | *dpff-1* mutant animals have fertility defects

To better understand the role of *dpff-1* in *C. elegans*, we studied *dpff-1* mutants carrying *xm17* or *tm4287* alleles (Figure 1c). The *xm17* allele was generated in our laboratory by the CRISPR-Cas-9 genome editing system (Friedland et al., 2013) and it consists of a five-base pair deletion and a four-base pair insertion between nucleotides 46 to 56 after the *dpff-1* ATG codon (Supporting Information Figure S4a). *xm17* results in a *dpff-1* nonsense mutation that leads to the production of a truncated hypothetical protein that contains only the first 23 amino acids (Figure 1c). The *tm4287* allele was obtained from the National BioResource Project in Tokyo, Japan, and is a 318 bp deletion that eliminates 16 bp (out of 83 bp) from exon 1, all of intron 1 and 176 bp (out of 254 bp) of exon 2 but conserves the open reading frame (Supporting Information Figure S4b). Translation of the *tm4287* allele results in the production of a hypothetical shortened version of the DPFF-1 protein that lacks amino acids 22 to 85 (Figure 1c) but conserves the rest of the protein. *dpff-1*(*xm17*) and *dpff-1*(*tm4287*) animals grew, moved and looked like the wild-type animals and we did not detect any evident somatic defects.

To study the effects of *dpff-1* mutations on *C. elegans* fertility and embryonic lethality, we performed a self-progeny count experiment. We assessed fertility at different temperatures because some germline phenotypes are more evident in higher temperatures (Kawasaki et al., 1998). In some experiments, we performed a temperature shift to ensure that the embryonic and larval development occurred at lower temperatures such that when these animals were about to reach adulthood (L4 larvae), they were switched to higher temperatures thus allowing us to observe the effects of *dpff-1* loss in the adult animals mainly in the germline. Offspring of wild-type and *dpff-1* mutant animals were studied at 20 and 24°C and upon shifting the temperature from 20 to 24°C (see the Materials and Methods). *dpff-1*(*tm4287*) and *dpff-1*(*xm17*) animals had less offspring than wild-type animals, independent of the temperature (Table 1). Although *dpff-1*(*tm4287*) and *dpff-1*(*xm17*) animals had slightly higher embryonic lethality than wild-type animals, none of these differences were statistically significant

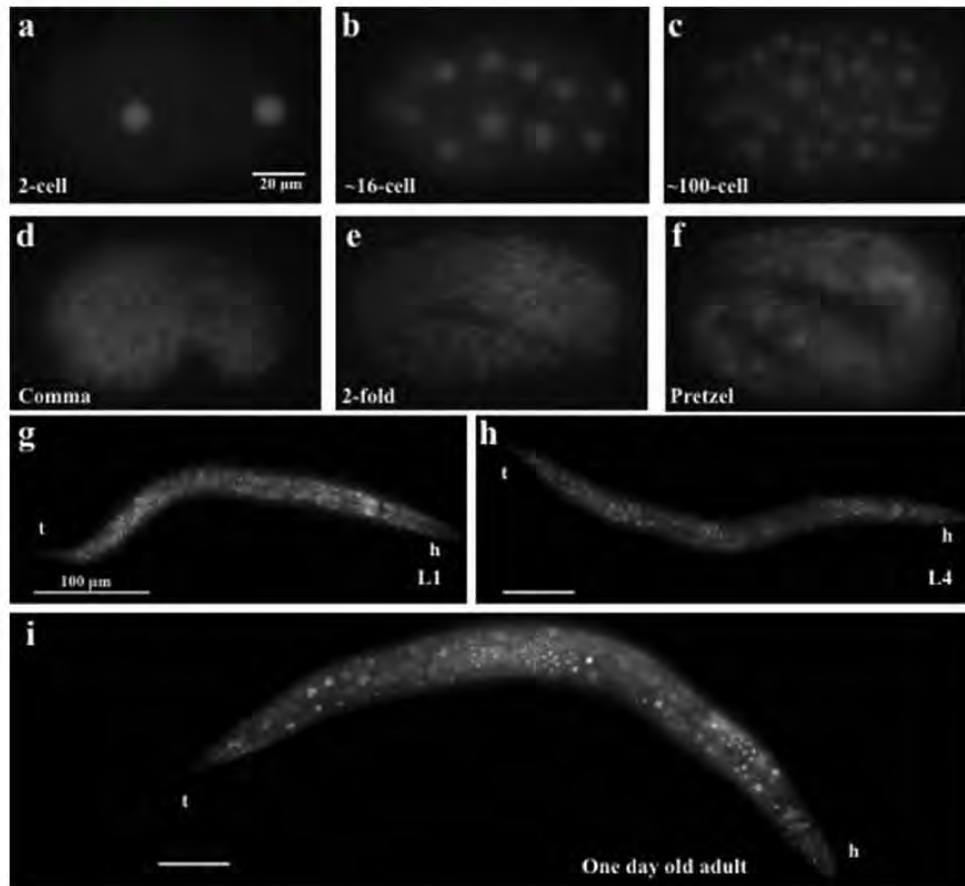


FIGURE 2 GFP::DPFF-1 is expressed ubiquitously throughout all of *C. elegans* development. Live *xmSi09* transgenic animals were mounted and observed under an epifluorescence microscope to analyze their expression pattern at the indicated developmental stages. (a–f) Embryos, (g) L1, (h) L4 larval stages and (i) 1-day-old hermaphrodites are shown. (g–i) Images were captured as a montage, with overlapping cell boundaries and processed using MosaicJ. h: head; t: tail

(Table 1). Our data show that *dpff-1* is important for *C. elegans* optimal fertility, and does not seem to play an evident role in embryogenesis although we cannot discard this possibility.

2.4 | *dpff-1* mutant animals overexpress the P-MPK-1 signal and have meiotic defects

To study the effects of *dpff-1* mutations on germ cell proliferation and meiosis at the nuclear morphological level, we stained extruded gonads of 1-day-old wild-type and *dpff-1* mutant animals grown at 24°C or under temperature shift experiments with DAPI. A small proportion of 1-day-old *dpff-1(tm4287)* and *(xm17)* animals grown with the temperature shift had longer distal gonad arms than wild-type animals [5% ($N = 39$) and 3% ($N = 35$), respectively]. This phenotype was more evident in 1-day-old animals grown at 24°C, in which 19% of *dpff-1(tm4287)* ($N = 37$) and 11% of *dpff-1(xm17)* ($N = 44$) had longer distal gonad arms. We quantified the number of germ cells in mitosis and

meiosis with DAPI staining and found that some *dpff-1* mutant animals with longer distal gonad arms had more germ cells in pachytene (~60% more when compared to the wild-type) but a normal proliferation zone. Indeed, the penetrance of germline phenotypes was higher in *dpff-1* mutants grown at 24°C. For example, we observed germ cells that looked like oocytes in the distal gonad arm of *dpff-1(tm4287)* and *(xm17)* [8% ($N = 37$) and 5% ($N = 44$), respectively] whereas wild-type animals had only pachytene-stage germ cells. Because animals grown at 24°C had a more penetrant phenotype and both alleles behaved similarly, we continued evaluating the meiotic defects in *dpff-1(xm17)* animals grown at 24°C. As we will show later, some phenotypes were clearer in older animals; therefore, experiments were performed in 1- or 2-day-old adults.

We further examined the proliferation zone in *dpff-1* mutant animals by using an antibody against the phosphorylated form of Histone H3, a commonly used marker for mitosis (Kadyk and Kimble, 1998). Two-day-old *dpff-1(xm17)* animals had an average of 4.6 nuclei positive for phospho-Histone H3 ($N = 34$) while the wild-type animals had 4.2

TABLE 1 *dpff-1* mutant animals produce fewer offspring than wild-type animals

Genotype	% Offspring (N)		% Embryonic lethality (N)	
	20°C	24°C	20 to 24°C	20 to 24°C
N2	100 ± 2.99 (22)	100 ± 3.93 (22)	100 ± 1.75 (15)	0.19 ± 0.05 (22)
<i>dpff-1(tm4287)</i>	77.5 ± 4.20 (21) <i>p</i> < 0.001	81.53 ± 6.21 (19) <i>p</i> = 0.017	78.24 ± 2.29 (15) <i>p</i> < 0.001	1.89 ± 1.14 (21) <i>p</i> = 0.168
<i>dpff-1(xm17)</i>	81.12 ± 2.58 (22) <i>p</i> < 0.001	71.51 ± 4.71 (22) <i>p</i> < 0.001	83.02 ± 1.53 (14) <i>p</i> < 0.001	0.46 ± 0.10 (22) <i>p</i> = 0.084
				0.68 ± 0.12 (22)
				1.21 ± 0.25 (19) <i>p</i> = 0.214
				1.17 ± 0.3 (22) <i>p</i> = 0.539
				0.72 ± 0.13 (15)
				1.51 ± 0.34 (15) <i>p</i> = 0.149
				1.2 ± 0.34 (14) <i>p</i> = 0.406

Hermaphrodite animals of the indicated genotype 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. 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. The percentages of each category are shown with the SEM. The number of animals tested is given in parentheses. All *t* tests are two-tailed unpaired *t* tests (Mann-Whitney).

(*N* = 34). Because we did not observe any significant differences in the proliferation zone of *dpff-1* mutant and wild-type animals, we concluded that the longer distal arms observed in some *dpff-1* mutant animals were not the result of proliferation defects.

When we examined the germ cells nuclear morphology of 2-day-old *dpff-1(xm17)* animals with DAPI staining, we observed more evident defects than those of 1-day-old animals. For example, *dpff-1(xm17)* animals had more condensed nuclei that were not positive for phospho-Histone H3 staining in the distal gonad (4.4, *N* = 79) than wild-type animals (2.1, *N* = 81) (Figure 3a,b). We also observed transition nuclei (crescent shape) in the loop area in 66% of *dpff-1(xm17)* animals (*N* = 64), whereas these type of nuclei are exclusively located adjacent to the mitotic cells in wild-type animals (Figure 3c, inset). Indeed, the penetrance of phenotypes such as long distal arm gonads and the presence of cells that looked like oocyte-like in the distal part was higher in 2-day-old animals. Therefore, we further studied *dpff-1(xm17)* mutant animal phenotypes at this age and at 24°C.

To confirm that some germ cells looked like "oocyte" at the distal gonad, we immuno-stained extruded gonads of 2-day-old wild-type and *dpff-1* mutant animals for the oocyte marker RME-2, which is the yolk receptor (Grant and Hirsh, 1999), and DAPI. As previously described (Grant and Hirsh, 1999), all wild-type animal gonads were RME-2 positive only in the proximal part of the gonad where oocytes had exited the pachytene stage of meiotic pro-phase I and had progressed to diplotene and diakinesis (Figure 3d). In total, 67.6% of gonads of *dpff-1* mutant animals had RME-2-positive cells in the proximal area (Figure 3e), whereas the rest (32.4%) had them in both the distal and proximal gonad (Figure 3f) (*N* = 37).

In the *C. elegans* gonad, meiotic cell cycle progression occurs in spatially restricted regions. Immediately, after leaving the distal mitotic region, germ cells enter meiosis and thereafter remain in the pachytene stage of the first meiotic prophase for an extended period. Germ cells exit pachytene at the loop area, in a process that depends on the phosphorylation of the MAP kinase MPK-1 (ERK homolog) (Church, Guan, & Lambie, 1995). MPK-1 is rapidly dephosphorylated when the oocytes enter diplotene and diakinesis (Hajnal and Berset, 2002). As oocytes move proximally, a signal from the sperm (MSP, major sperm protein), reactivates the phosphorylation of MPK-1 on the most proximal oocyte to allow their maturation (Miller et al., 2001). Because one of the phenotypes observed in *dpff-1* mutant animals was a longer pachytene zone, we stained the gonads of 2-day-old *dpff-1(xm17)* animals grown at 24°C with an antibody that binds specifically to the phosphorylated form of MPK-1 (P-MPK-1). In 65% of *dpff-1(xm17)* animals, P-MPK-1 was observed in the pachytene zone (Figure 4c,d) similar to the wild-type (Figure 4a,b). However this signal persisted all the way to the proximal oocytes and its intensity appeared to be higher than in the wild-type animals (Figure 4c,d). To confirm that the intensity of the P-MPK-1 signal was higher in *dpff-1(xm17)* animals, we performed Western blotting. By this means, we confirmed that the expression of the P-MPK-1 signal was higher in *dpff-1(xm17)* than in wild-type animals (Figure 4e). These results demonstrate that *dpff-1* deficient animals showed up-regulation as well as ectopic expression of the P-MPK-1 signal, and this correlates with the observed meiotic defects.

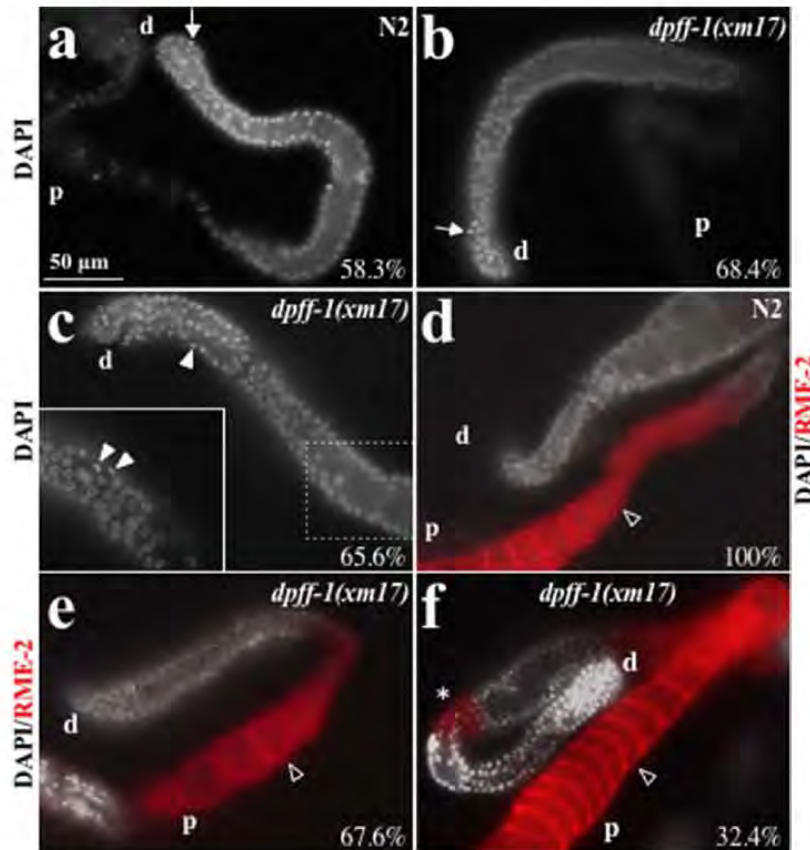


FIGURE 3 Loss of *dpff-1* results in meiotic defects. DAPI and Immunofluorescent images of extruded gonads from 2-day-old adult hermaphrodites of the indicated genotypes. (a) DAPI-stained gonads of the wild-type animal. (b and c) DAPI-stained gonads of *dpff-1(xm17)* animals. (d–f) DAPI-stained and anti-RME-2-immunostained gonads of wild-type (d) and *dpff-1(xm17)* animals (e and f). The percentage of animals presenting each phenotype is indicated inside each panel. In c, a detail of the gonad is shown in a different focal plane where crescent nuclei are observed (arrowhead). Full arrows point towards condensed nuclei, empty arrowheads point towards RME-2-positive germ cells and asterisks indicate ectopic RME-2-positive germ cells. d:distal and p:proximal

2.5 | *dpff-1* mutant animals activate germ cell apoptosis via p53

As we mentioned earlier, when we stained gonads of *dpff-1* mutant animals with DAPI, we observed condensed nuclei in the distal gonad (Figure 3b) that were not positive for phospho-histone-H3 antibody. Because condensed nuclei are a common feature of cells undergoing apoptosis, we hypothesized that *dpff-1* mutations could trigger this type of cell death. To test our hypothesis, we crossed *dpff-1(xm17)* animals with the strain MD701 that carries an apoptotic marker (*bcls39* [*Plim-7::ced-1::gfp; lin-15(+)*]), which we will refer to hereafter as *ced-1::gfp* (Schumacher et al., 2005). *ced-1::gfp* (control) and *ced-1::gfp; dpff-1(xm17)* animals were grown at 24°C for up to 3 days after the L4 stage, mounted and observed under an epifluorescence microscope to quantify germ cell corpses. One-day-old *dpff-1(xm17)* and control animals had a similar number of germ cell corpses (Table 2). However, 2-day-old and 3-day-old *dpff-1(xm17)* animals had more germ cell corpses

than the wild-type animals (Table 2). In the control strain, germ cell corpses localized to the loop area (Figure 5a). Unexpectedly, some *dpff-1(xm17)* 2-day-old animals had ectopic germ cell corpses in the distal gonad (Figure 5b). To corroborate our data, we used a different method to quantify apoptosis. We performed RNAi in *ced-1*, which is required for germ cell corpse degradation (Zhou, Hartwig, & Horvitz, 2001). In a *ced-1* mutant background, corpses are easily detected by Nomarski microscopy. By means of this methodology, we confirmed that *dpff-1(xm17)* mutant animals had an increased number of germ cell corpses and that this phenotype was more severe as the animals aged (Table 2).

Double-strand breaks occur normally during meiotic prophase as the initiating events in meiotic recombination (Bailey and Gartner, 2013). Among other events, the success in repairing double strand breaks is monitored during meiotic checkpoints (Alpi, Pasierbek, Gartner, & Loidl, 2003; Gartner, Milstein, Ahmed, Hodgkin, & Hengartner, 2000; Martin, Winkelmann, Petalcorin, Mcllwraith, & Boulton, 2005). During the meiotic checkpoints, a failure to repair the double strand breaks activates

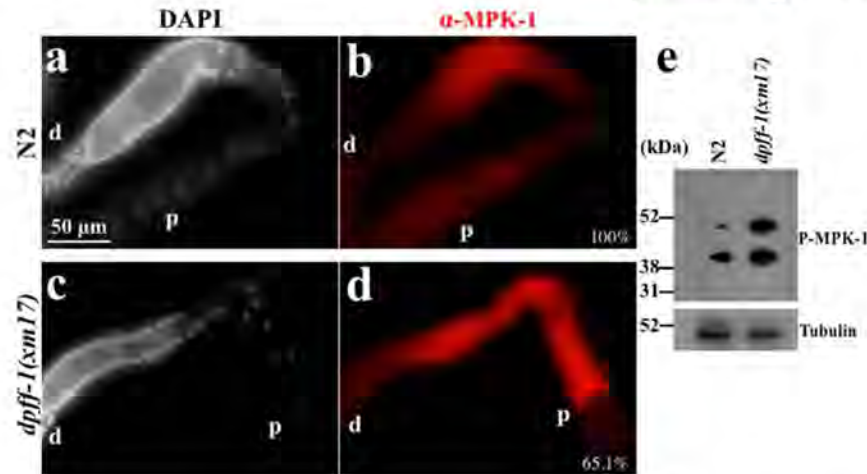


FIGURE 4 *dpff-1* mutant animals have an expanded zone of expression of the P-MPK-1 signal. (a–d) Dissected gonads of 2-day-old wild-type and *dpff-1(xm17)* animals were extruded, fixed and stained with DAPI (gray) and an anti-phosphorylated-MPK-1 antibody (red). The percentage of animals having the observed phenotype are indicated in each panel. d:distal and p:proximal. (e) Western blot of whole extracts of wild-type and *dpff-1(xm17)* where an antibody against an anti-phosphorylated-MPK-1 antibody (top panel) or tubulin (lower panel) was used

DNA damage-induced apoptosis via the p53 worm homolog *cep-1* (Alpi et al., 2003). We hypothesized that germ cell apoptosis in *dpff-1* mutant animals could be triggered by the activation of a meiotic checkpoint. To test our hypothesis, we silenced *dpff-1* by RNAi in a *cep-1(gk138);ced-1::gfp* background. Silencing *dpff-1* in the *ced-1::gfp* background resulted in higher germ cell apoptosis, similar to *dpff-1* loss of function (Table 2). *cep-1(gk138);ced-1::gfp* animals had similar numbers of germ cell corpses as the *ced-1::gfp* (EP) animals (Table 2). Silencing *dpff-1* in *cep-1(gk138);ced-1::gfp* animals resulted in similar germ cell corpse numbers as in control animals (*cep-1(gk138);ced-1::gfp*, EP) (Table 2). Our results demonstrate that the increase in germ cell apoptosis of *dpff-1*-deficient animals is dependent on *cep-1/p53*, suggesting that the high levels of germ cell apoptosis in *dpff-1* mutant animals might be a consequence of the activation of the DNA damage apoptosis program that is triggered when meiosis defects are found in the system.

2.6 | *dpff-1* is important in the induction of germ cell apoptosis under heat shock

In tissue culture, it has been observed that *dpf2/requiem/ubi-d4* is required for the apoptotic response upon IL-3 withdrawal in myeloid cells (Gabig et al., 1994). In *C. elegans* several stress conditions lead to an increase of germ cell apoptosis (Derry, Putzke, & Rothman, 2001; Salinas, Maldonado, & Navarro, 2006; Stergiou, Doukoumetzidis, Sandoel, & Hengartner, 2007); therefore, we tested the role of *dpff-1* in the induction of apoptosis under different stress conditions. For starvation, 1-day-old *ced-1::gfp* and *ced-1::gfp; dpff-1* mutant animals were grown at 24°C and divided into two groups: one that was fed with bacteria and another one that lacked bacteria for 6 h. After treatment, animals were mounted and observed under an epifluorescence microscope to quantify germ cell corpses. Starved *ced-1::gfp* control

TABLE 2 Germ cell apoptosis in different genetic backgrounds.

	24 h	48 h	72 h
<i>dpff-1</i> mutant animals have higher germ cell apoptosis			
<i>ced-1::gfp</i>	6.3 ± 0.3 (47)	9.6 ± 0.3 (69) 1.5	14.5 ± 0.5 (32) 2.3
<i>ced-1::gfp; dpff-1(xm17)</i>	6.3 ± 0.2 (54) <i>p</i> = 0.915	19.6 ± 0.6 (60) 3.1 <i>p</i> < 0.001	21.2 ± 0.6 (41) 3.4 <i>p</i> < 0.001
<i>ced-1</i> (RNAi)	5.6 ± 0.2 (48)	10.2 ± 0.2 (115) 1.8	13.1 ± 0.3 (46) 2.3
<i>dpff-1(xm17);ced-1</i> (RNAi)	5.5 ± 0.3 (45) <i>p</i> = 0.877	20.8 ± 0.4 (140) 3.8 <i>p</i> < 0.001	20.1 ± 0.5 (38) 3.7 <i>p</i> < 0.001
<i>dpff-1</i> increased germ cell apoptosis is CEP-1-dependent			
<i>ced-1::gfp</i> , EP	5.2 ± 0.3 (57)	9.7 ± 0.3 (93) 1.9	15.5 ± 0.3 (62) 3.0
<i>ced-1::gfp; dpff-1</i> (RNAi)	5.4 ± 0.2 (78) <i>p</i> = 0.557	14.7 ± 0.3 (106) 2.7 <i>p</i> < 0.001	19.6 ± 0.5 (83) 3.6 <i>p</i> < 0.001
<i>ced-1::gfp; cep-1(gk138)</i> ; EP	5.8 ± 0.3 (37)	11.5 ± 0.3 (97) 2	14.3 ± 0.3 (85) 2.4
<i>ced-1::GFP;cep-1(gk138); dpff-1</i> (RNAi)	5.9 ± 0.3 (34) <i>p</i> = 0.928	10.1 ± 0.2 (105) 1.7 <i>p</i> < 0.001	12.4 ± 0.3 (108) 2.1 <i>p</i> < 0.001

Animals of the indicated genotype were grown at 24°C, mounted and observed under an epifluorescence microscope or Nomarski microscopy to quantify germ cell corpses. The mean number of apoptotic cells per gonad arm with the SEM was scored with CED-1::GFP at 24, 48, and 72 h post L4 stage. The number of animals tested is given in parentheses. All *t* tests are two-tailed unpaired *t* tests (Mann-Whitney; *** < 0.001).

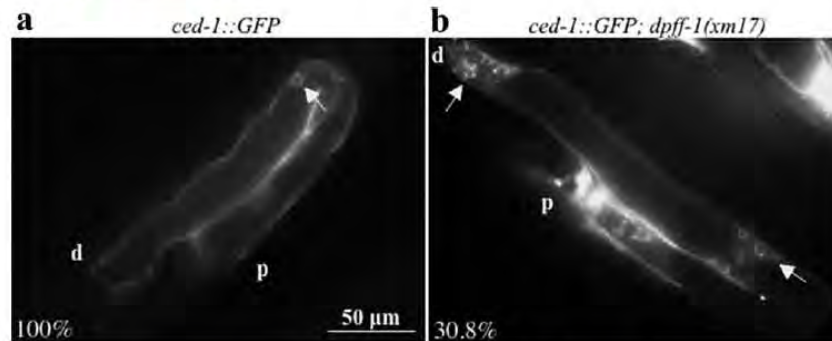


FIGURE 5 *dpff-1* mutant animals have ectopic cell corpses. (a and b) Two-day-old adult animals of the indicated genotype were grown at 24°C, mounted and observed under an epifluorescence microscope to quantify germ cell corpses. Full arrows point towards germ cell corpses. The percentage of animals showing the observed phenotype is indicated in each panel. d:distal and p:proximal

animals had increased germ cell apoptosis by up to 1.8-fold at 24°C (Figure 6). Starved *ced-1::gfp; dpff-1* mutant animals had only partially increased germ cell apoptosis (1.4-fold) (Figure 6). Our data suggest that DPFF-1 might play a partial role in inducing germ cell apoptosis under starvation.

For heat shock experiments, 1-day-old *dpff-1* mutant animals grown at 24°C were exposed to 31°C for 3 h as we have previously reported (Salinas et al., 2006). Heat-shocked *ced-1::gfp* control animals had increased germ cell apoptosis by up to 1.4-fold (Figure 6). Heat-shocked *ced-1::gfp; dpff-1* mutant animals did not increase germ cell apoptosis (Figure 6). Our data suggest that DPFF-1 might play a role in inducing germ cell apoptosis under heat shock conditions.

To determine if *dpff-1* is important for germ cells and/or embryo protection from heat shock, we performed an assay published earlier by our group (Huelgas-Morales, Silva-García, Salinas, Greenstein, D., & Navarro, 2016) in which embryogenesis success is used as a measure of germ cell quality. In this assay, 1-day-old adult animals were exposed to heat shock, and their progeny were sorted into three groups thereafter: Group I was composed of embryos already formed before the heat shock (inside the uterus) and embryos formed during or shortly after heat shock, which likely came from diakinesis-stage oocytes (Figure 7a). Group II was composed of embryos laid between 12 and 24 h after stress (late pachytene-stage germ cells at the moment of stress). Finally, group III was composed of those embryos laid between 24 and 48 h after stress (early pachytene-stage germ cells at the moment of stress) (Figure 7a) (Huelgas-Morales et al., 2016).

For performing this assay, 1-day-old wild-type and *dpff-1* mutant hermaphrodites were grown at 24°C and divided into two groups: one that was kept as a control (24°C) and another that was heat shocked for 3 h at 31°C. After that, the progeny of these animals was divided into three groups, and embryonic lethality was quantified. Non-heat-shocked wild-type and *dpff-1* mutant animals showed low to no embryonic lethality (Figure 7b). Heat-shocked wild-type and *dpff-1* mutant animals from group I showed an increase in embryonic lethality (Figure 7b). However, heat-shocked *dpff-1* mutant and wild-type animals from group II and III showed low percentages of embryonic lethality that were not significantly different between the groups (Figure 7b). Our

data suggest that germ cells from *dpff-1* mutant animals are not sensitive to heat shock and that DPFF-1 is not important for the protection of germ cells and embryos from heat shock, despite its importance in the induction of germ cell apoptosis under this condition.

2.7 | *dpff-1* is important for adult stress survival

We have previously observed that proteins required for stress-induced germ cell apoptosis are also important to protect the whole animal from stressful conditions (Huelgas-Morales et al., 2016; Rousakis et al., 2014; Silva-García and Estela Navarro, 2013). Because we found that DPFF-1 is important in the induction of germ cell apoptosis under heat shock conditions, we decided to test whether this protein could protect the whole organism from stress. We tested heat shock stress resistance in wild-type and *dpff-1* mutant animals following standard protocols (Arsenovic, Maldonado, Colleluori, & Bloss, 2012; Paz-Gomez, Villanueva-Chimal, & Navarro, 2014; Rodriguez, Snoek, De Bono, &

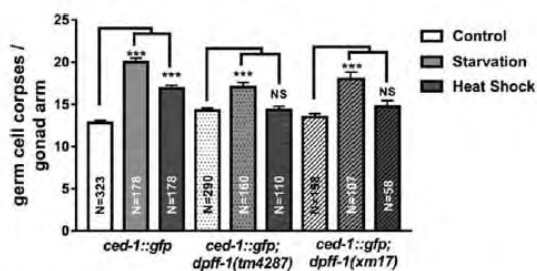


FIGURE 6 DPFF-1 is important for stress-induced germ cell apoptosis. One-day-old adult animals of the indicated genotype were grown at 24°C and exposed to 6 h of starvation or at 31°C for 3 h to induce heat shock. Afterwards, treat animals were mounted and observed under an epifluorescence microscope to quantify germ cell corpses. The mean number of apoptotic germ cells per gonad arm of at least two independent experiments was scored with CED-1::GFP and is shown in the graph. Error bars indicate SEM and asterisks show that each treatment is different from untreated control. All *t* tests are two-tailed unpaired *t* tests (Mann-Whitney; *** $p < 0.001$)

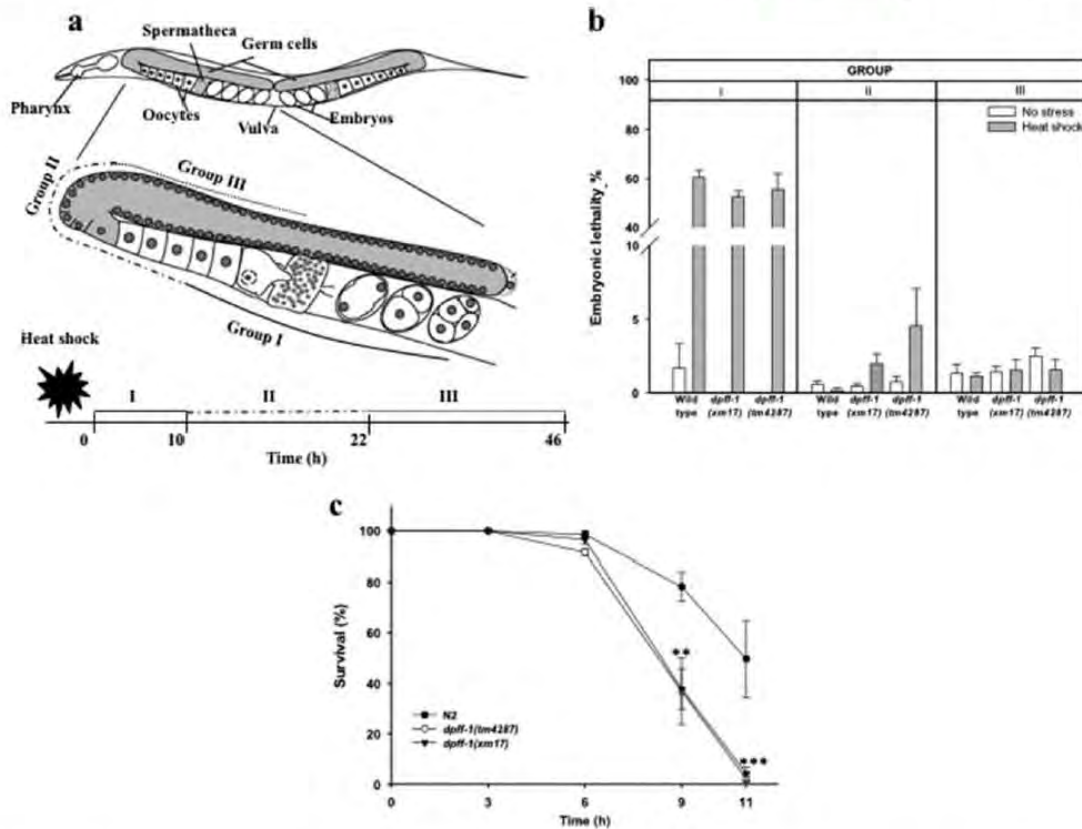


FIGURE 7 *dpff-1* participates in adult stress survival. (a) Scheme representing how the groups of embryos were assigned for the heat shock assay. (b) Animals of the indicated genotype were grown at 24°C and were divided into two groups: one kept at the same temperature another that was heat-shocked at 31°C for 3 h. The embryos produced were sorted into three groups: embryos that had been fertilized (I) before or during the heat-shock, (II) shortly after heat-shock and (III) long after heat-shock. Embryonic lethality is represented by the percentage of embryos that did not hatch after 24 h of being laid. The data from one of two replicates, with each condition having a ≥ 989 , are depicted. Error bars indicate SEM. One-way-ANOVA (** $p < 0.01$). (c) Synchronized 1-day-old adult hermaphrodites of the indicated genotype were grown at 24°C and exposed to a heat shock stress at 36°C for the indicated time. The data from three different experiments were obtained, and the percentage of surviving animals was graphed. Error bars indicate SEM. Two-way ANOVA analysis with Bonferroni's test was used to compare each condition to the control. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

Kammenga, 2013). One-day-old wild-type and *dpff-1* mutant animals grown at 24°C were exposed to heat shock at 36°C and analyzed every hour to monitor their survival over the course of 11 h. During the first 6 h of incubation, there was no difference in survival between *dpff-1* mutant and wild-type animals (Figure 7c). After 9 h of heat shock, 78% of wild-type animals were still alive (Figure 7c). However, at the same time, only 36% of *dpff-1* mutant animals survived (Figure 7c). After 11 h of heat shock, 49% of wild-type animals survived (Figure 7c); in contrast, only 3% of *dpff-1* mutant animals did (Figure 7c). These data demonstrate that *dpff-1* mutant animals have a compromised heat shock response.

To continue studying the role of DPFF-1 in the heat shock response, we tested whether *dpff-1* mutant animals were able to turn on two heat shock reporters: *hsp-16.2::gfp(gpls1)* (Rea, Wu, Cypser, Vaupel, & Johnson, 2005) and *psod-3::gfp* (Libina, Berman, & Kenyon,

2003). We exposed *hsp-16.2::gfp(gpls1)* and *dpff-1(xm17); hsp-16.2::gfp* animals to 35°C for 2 h and recovered them for 4 h at 20°C as recommended by (Rea et al., 2005). After incubation, the animals were mounted and observed under a fluorescence microscope. As expected, *hsp-16.2::gfp* animals expressed the reporter after heat shock (Figure 8a,b,e) nevertheless *dpff-1(xm17); hsp-16.2::gfp* animals showed significantly lower expression (Figure 8a–e).

We performed RNAi by feeding in a *psod-3::gfp* background using bacteria that expressed *dpff-1* dsRNA or an empty plasmid as a control. We exposed *psod-3::gfp(EP)* and *psod-3::gfp; dpff-1(RNAi)* animals to 35°C for 2 h as recommended by Dues et al. (2016), but we were not able to detect an induction of *psod-3::gfp* expression. Therefore, we optimized the temperature to detect *psod-3::gfp* expression and found that 8 h at 31°C were optimal for the observation of *gfp* expression. *psod-3::GFP(EP)* animals had higher GFP expression during heat shock

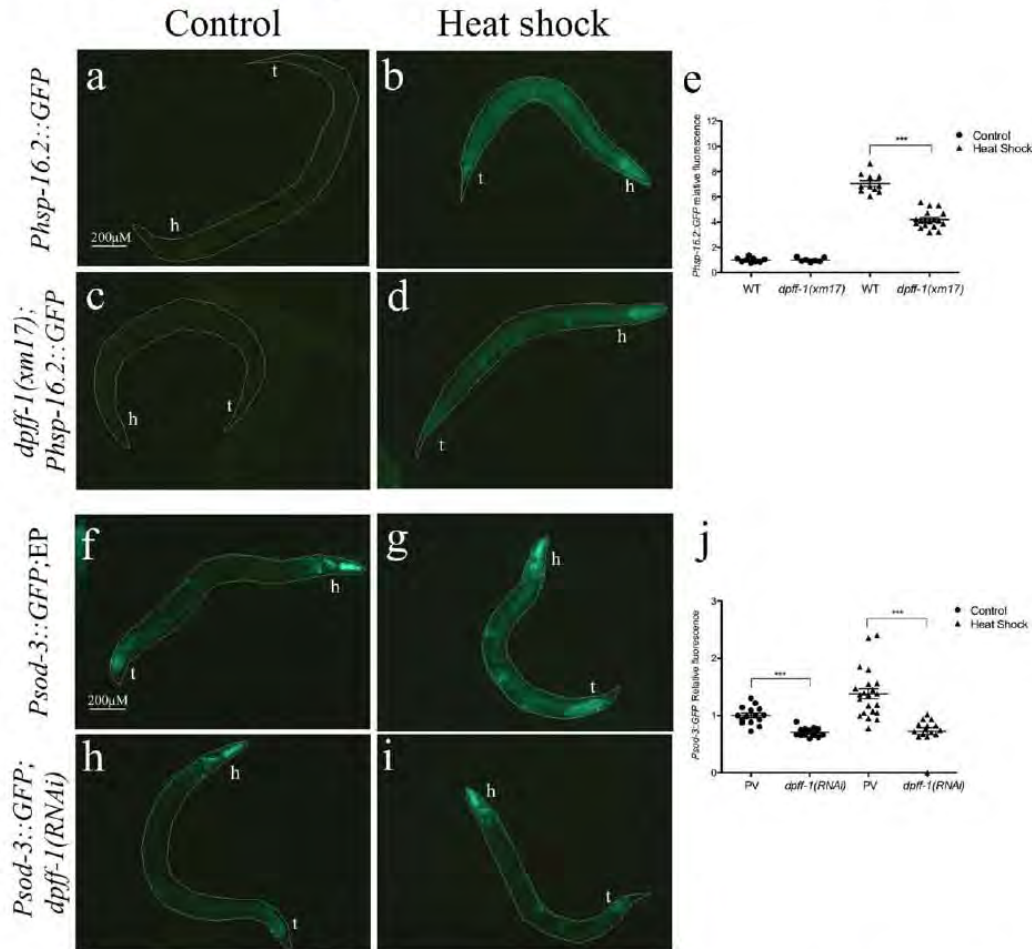


FIGURE 8 *dpff-1(xm17)* animals are unable to respond to heat shock. (a–e) One-day-old adult hermaphrodites of (a and b) *hsp16.2::gfp* and (c and d) *dpff-1;hsp16.2::gfp* strains grown at 20°C were subjected to heat shock at 35°C for 2 h or were kept at 20°C (control, no stress). After heat shock animals were recovered for 4 h at 20°C, they were mounted and observed under an epifluorescence microscope to obtain photomicrographs of representative animals for each strain and condition. (f–j) Animals expressing a heat shock reporter (*sod-3::gfp*) were fed with an empty plasmid (EP, f and g) or *dpff-1* dsRNA to induce RNAi (h and i). EP or *dpff-1(RNAi)* 1-day-old adult animals of the indicated background were exposed to 8 h at 31°C to induce heat shock (g and i) or kept at 20°C (no stress condition; f and h). Right after heat shock animals were mounted and observed under a fluorescence microscope and representative pictures are shown. (e and j) Quantitative analysis to compare the expression levels of GFP in indicated backgrounds. The data of one of two independent replicates with similar results are shown. One-way ANOVA *** $p < 0.001$. *hsp-16::gfp*: (control) $n = 17$, (heat shock) $n = 17$; *hsp-16::gfp; dpff-1(xm17)*: (control) $n = 29$, (heat shock) $n = 33$. *sod-3::gfp; EP*: (control) $n = 27$, (heat shock) $n = 29$; *sod-3::gfp; dpff-1(RNAi)*: (control) $n = 43$, (heat shock) $n = 31$. h: head and t: tail

than in normal conditions (Figure 8f,g,j). In contrast, *sod-3::gfp; dpff-1(RNAi)* animals had less expression of the *sod-3::gfp* reporter in control conditions and after heat shock in comparison to control animals (Figure 8h–j). Our results show that DPFF-1 plays an important role in the activation of heat shock response in *C. elegans*.

3 | DISCUSSION

In this work, we explored the expression and function of the putative transcriptional factor *dpff-1* in *C. elegans* fertility and during the stress

response. We found that the fusion protein GFP::DPFF-1 is ubiquitously expressed throughout all embryonic and post-embryonic stages, mainly in the nuclei, and at lower levels diffused in the cytoplasm of somatic and germ cells. Here, we show for the first time that a member of the d4 family of transcription factors participates in meiosis. Some *dpff-1* mutant animals had an extended pachytene zone and ectopic oocyte-like cells in the distal gonad. We also found that the P-MPK-1 signal is higher and persists from pachytene to diakinesis. *dpff-1* mutant animals had higher, and in some cases, ectopic germ cell apoptosis that was activated through the p53 (CEP-1) pathway. In addition to DPFF-1

function in fertility and meiosis, we also showed that DPFF-1 is important to protect the animal from heat shock and to turn on heat shock reporters. This is the first report showing that a member of this family of proteins plays a role in meiosis and heat shock protection. Because DPFF-1 is a putative transcription factor it is possible that its function is to regulate the expression of some genes important for meiosis, apoptosis and/or stress.

3.1 | *dpff-1* mutant animals have fertility and meiosis defects

dpff-1 mutant animals, grew, appeared and moved like the wild-type animals, and we did not observe any evident somatic phenotype. Because in other organisms DPFF1 and DPFF3 play a role in the nervous system (Lange et al., 2008; Mertsalov et al., 2008), we do not discard the possibility that DPFF-1 could have a role in the soma.

Here, we showed that *dpff-1* mutant animals have less offspring independent of the temperature tested (Table 1). However, meiotic defects were more evident in older animals that grew at 24°C. This finding is not surprising since some germline phenotypes are more penetrant at higher temperatures (Kawasaki et al., 1998). Nevertheless, it is possible that somatic defects accumulated when animals grew from early larval stages at 24°C potentially compromising the germline's performance. Another possibility is that older animals had higher penetrance of the studied phenotypes because their gonads accumulated defects as oogenesis progressed.

We attributed low fertility problems in *dpff-1* mutant animals to meiotic defects since several defects were observed during this process by several techniques. Among the defects observed are: an extended transition zone that in some instances could be observed in the loop area, an expanded pachytene zone, in some cases, ectopic oocyte-like germ cells in the distal gonad and condensed nuclei in the distal gonad (Figure 3).

Here, we show that the expression of the phosphorylated MPK-1 is ectopic and higher in *dpff-1* mutant animals (Figure 4). MPK-1 signal is necessary for germ cells to progress through the meiotic prophase I from pachytene to diplotene and diakinesis (Church et al., 1995). We speculate that upregulation of the P-MPK-1 could be contributing to meiotic defects observed in *dpff-1* deficient animals although it is possible that it is a consequence of other meiotic defects. Currently, we do not know why MPK-1 expression is ectopic or higher in *dpff-1* animals. Further studies are required to test if DPFF-1 regulates the expression of MPK-1 directly or indirectly. Because DPFF-1 is a putative transcription factor, it is possible that it could be directly regulating *mpk-1* expression or other genes important for meiosis, but it is also possible that DPFF-1 plays an indirect role.

dpff-1 mutant animals had increased germ cell apoptosis (Table 2 and Figure 5). We observed that high levels of germ cell apoptosis in *dpff-1* mutant animals were dependent on CEP-1 (Table 2), and for this reason, we suggest that germ cell apoptosis is triggered in these animals due to the activation of a meiotic checkpoint. Double-strand breaks occur not only following DNA damage but also normally during meiotic prophase as the initiating events of meiotic recombination.

During meiotic prophase, the integrity of both meiotic recombination and meiotic chromosome synapsis is monitored by checkpoints, and such checkpoint activation leads to a cell cycle arrest phenotype in yeast and apoptosis in animals. In mutations that lead to the accumulation of recombination intermediates such as *rad-51* (Gartner et al., 2000) or *brcA* (Martin et al., 2005), germ cell apoptosis is activated via the DNA damage pathway, which is induced by CEP-1/p53 (Alpi et al., 2003; Bailly and Gartner, 2013; Gartner et al., 2000). It is important to note that not all meiotic defects lead to activation of the DNA damage checkpoint. For example, in synapsis-defective animals (such as *him-3* mutants) and those with translocated chromosomes (such as *rec-8* mutants), germ cell apoptosis is not triggered (Alpi et al., 2003).

In some *dpff-1* mutant animals, germ cell corpses were found ectopically in the distal gonad. In the wild-type, germ cell apoptosis occurs only in the loop area, where germ cells are in late pachytene and become competent for apoptosis due to the phosphorylation of MPK-1 (Gumienny, Lambie, Hartwig, Horvitz, H. R., & Hengartner, 1999). We believe that the ectopic germ cell apoptosis observed in the distal gonad of *dpff-1* animals is due to the activation of a meiosis checkpoint because it is completely blocked by the absence of *cep-1/p53*. We do not believe that DPFF-1 or any of its putative targets regulates germ cell apoptosis during meiosis directly.

Germ cell apoptosis can be triggered by different and independent pathways (Bailly and Gartner, 2013). As we mentioned above, DNA damage is regulated by checkpoint genes and can be induced by meiosis defects (Bailly and Gartner, 2013; Gartner et al., 2000). We previously found that heat shock can trigger germ cell apoptosis in a CEP-1/p53 independent pathway via the MAPKKs MEK-1 and SEK-1 (Salinas et al., 2006). Starvation can trigger germ cell apoptosis via LIN-35/Rb and in a CEP-1/p53 and MEK-1/SEK-1 independent pathways (Lascarez-Lagunas, Silva-García, Dinkova, & Navarro, 2014; Salinas et al., 2006). Here, we found that DPFF-1 is important in the induction of apoptosis during starvation (although partially) and heat shock in *C. elegans*. It is possible that DPFF-1 could play a direct role in the induction of apoptosis by stress because DPFF2/*requiem/ubi-d4* was originally found in a screening to identify factors that provide apoptosis resistance in murine myeloid cells (Gabig et al., 1994). Until now, it is not known what role the DPFF family members could be playing in this type of cell death and whether their function is direct or indirect. However, it is possible that this family of proteins has a conserved role in the induction of apoptosis during stress conditions and further studies are needed to investigate this possibility.

3.2 | *dpff-1* protects animals from stress

Until this report, there was no evidence that members of the d4 family of transcription factors could play a role in stress protection. Here, we show that DPFF-1 is important for adult hermaphrodites to survive heat shock conditions (Figure 7c) and to activate the heat shock stress response (Figure 8). Despite DPFF-1 having an important role in oocyte development, it does not seem to play an important role into protecting the germ cells from heat shock because *dpff-1* mutant

animals exposed to heat shock produce embryos that are able to successfully complete embryogenesis (Figure 7b). The role of DPFF-1 in protecting animals from heat shock still remains to be elucidated but it is intriguing that DPFF-1 is not needed for stress protection until animals have been exposed for several hours to extreme heat shock. It will be interesting to test if DPFF-1 plays a role in chromatin remodeling and stress in *C. elegans* because some members of the d4 family of transcription factors of vertebrates interact with BAF-class SWI/SNF complexes (Middeljans et al., 2012; Tando et al., 2010) and in *C. elegans*, it has been shown that DAF-16/FOXO, a transcriptional activator essential for the stress response, acts with a BAF-like subclass of SWI/SNF components to provide stress resistance (Riedel et al., 2013).

The DPFF-1:GFP transgene is expressed mainly in the nuclei of all the *C. elegans* cells. This pattern of expression is congruent with DPFF-1's putative DNA binding domains and nuclear localization signal. Until now, not much is known about the putative targets of this family of transcription factors. It is possible that DPFF-1 might directly regulate the expression of genes implicated in meiosis, apoptosis, stress-induced apoptosis and/or genes that are important for the activation of the heat shock response, and further studies are needed to better understand the role of this protein in these processes. It also would be interesting to test the roles of members of the d4 family of transcription factors in meiosis and stress resistance in higher organisms.

4 | MATERIALS AND METHODS

4.1 | *C. elegans* strains and growth conditions

C. elegans strains were maintained according to standard procedures (Brenner, 1974) on NGM-lite and grown at 20, 24°C for all of their life cycle or at 20°C from embryos to L4 larvae and then shifted to 24°C. The following *C. elegans* strains were used: the wild-type variety Bristol strain N2 (var Bristol), *dpff-1(tm4287)*, MD701 *bcls39 [Plim-7::ced-1::gfp; lin-15(+)]* (Schumacher et al., 2005), EG6699 [*ttT5605 II; unc-119(ed3) III; oxEx1578*] (Frokjaer-Jensen et al., 2008, 2012), TJ375 *hsp-16.2:gfp(gpls1)* (Rea et al., 2005), RNO19 *xmSi09 [Pdpff-1::gfp::dpff-1::dpff-1 3'UTR; Cbr-unc-119(+)] II* (this study), RNO31 *xmSi09 [Pdpff-1::dpff-1::gfp::dpff-1 3'UTR; Cbr-unc-119(+)] II* (this study), RNO45 [*dpff-1(xm17)*] (this study), RNO46 [*ced-1::gfp; dpff-1(tm4287)*] (this study), RNO48 [*ced-1::gfp; dpff-1(xm17)*] (this study), TJ1 *cep-1(gk138)*, and CF1553 *mls84 ([pAD76] p_{sod-3::gfp} + rol-6(su1006))*.

4.2 | RNA interference

RNAi silencing was performed by feeding at 24°C using standard methods (Conte and Mello, 2003; Timmons, Court, & Fire, 2001). Briefly, empty pPD129.36 plasmid (EP) and RNAi vectors were grown into the *E. coli* strain HT115(DE3). To induce RNAi in *dpff-1*, the done was obtained from the RNAi library (OpenBiosystems) (Rual et al., 2004) and confirmed by sequencing. To induce RNAi in *ced-1* a plasmid previously cloned in our lab was used (Salinas et al., 2006). The transformed

bacteria were cultured overnight in LB broth containing 50 mg/ml of ampicillin and 12.5 mg/ml of tetracycline. For RNAi experiments to quantify apoptosis, double stranded RNA for *ced-1* and *dpff-1* was induced in liquid as previously described by (Salinas et al., 2006). To test *dpff-1* RNAi efficiency double stranded RNA synthesis was induced overnight on NGM plates supplemented with ampicillin (50 mg mL⁻¹), tetracycline (12.5 mg mL⁻¹) and IPTG (1 mM). L4 larvae were placed onto NGM-lite plates containing induced bacteria and incubated at 24°C for one generation, and then, L4 animals were cloned for experiments.

4.3 | Transgene and sgRNA targeting construction

The cloning of *dpff-1* for single-copy insertion was performed using the Multisite Gateway Three Fragment Vector Construction Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA). For the promoter, we amplified a 965-bp fragment of the intergenic region upstream of *dpff-1*. For the coding region containing the 3'UTR, we amplified the region from the ATG to the end of the longest 3'UTR reported (<http://www.wormbase.org>, release WS252, Dec 04, 2015).

The following primers were used: attB4_ *dpff-1*_ FOW GGGGA-CAACTTTGTATAGAAAAGTTGATGATGACCCTAAAAATATCATAC; attB1r_ *dpff-1*_ REV, GGGGACTGCTTTTTGTACAAACTTGCTTAGAT TATTCAGATTCAAATGGATC; attB1_ *dpff-1*_ FOW, GGGGACAAG TTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAATGATAAATCTTTAGAGCAATTAGG; attB2r_ *dpff-1*_ REV, GGGGACCACTTTGTACAAAGAAAGCTGGGTAA GATCCACAATTATGTGAAGAAG; attB2_ *dpff-1*_ FOW, GGGGACAGCT TTCTGTACAAAGTGGTCAAATGTATTAGCTTCCTCCTCCTC and attB3_ *dpff-1*_ REV, GGGGACAACCTTTGTATAATAAAGTTGTGATTCTT TGAAACTTCCAATATTG. PCR products were gel-purified by standard procedures and cloned through recombination in to the donor vectors pDONRP4-P1R, pDONR221 and pDONR2R-P3 to generate entry clones. In all cases, genomic N2 DNA was used as a template. The inserts were confirmed by sequencing.

pDONRP4-P1R-*dpff-1* and pDONR2R-P3-*dpff-1* were linearized by PCR with primers P4-P1R-*dpff-1*_ FOW, GCTTCCGCCGGTACCTC CACTGCCACCCTAGTACTCATTGTCTGTGAAGATTAGCTGTCTTGGA TTATTTTTAAAC; P4-P1R-*dpff-1*_ REV, GGTGGCACAGGAGGAACGG GCGGTAGTGGAGGCACTGGTATCTCGGAAAACGGATATATGGACCT GATGC; 2R-P3-*dpff-1*_ FOW, GCTTCCGCCGGTACCTCCTCCTCCTC GCTAGTACTCTTCTGGCCGGTGCAC and 2R-P3-*dpff-1*_ REV, GGTG GCACAGGAGGAACGGCGGTAGTGGAGGCACTGGTAAATGTTCTC AAATATTATATTATTCCAATATTT, respectively. The GFP sequence was amplified from the entry clone pCM1.53 (Addgene plasmid 17250) (Merritt, Rasoloson, Ko, & Seydoux, 2008) with primers GFP_FOW, AGTACTAGCGGTGGCAGTGAGGTACCGCGGAAGCAGTAAAGGAG AAGAACTTTTAC and GFP_REV, ACCAGTGCCTCCACTACCGCCGT TCCTCCTGTGCCACCTTTGTATAGTTCATCCATGCC. PCR products were digested with DpnI and gel-purified following standard procedures. Then, we fused the GFP coding gene after the *dpff-1* ATG or before the *dpff-1* stop codon using a Gibson reaction (Gibson et al., 2009) by mixing pDONRP4-P1R-*dpff-1* or pDONR2R-P3-*dpff-1* PCR products with GFP PCR products. Finally, the desired PCR products on each entry clone

vector were cloned in tandem through recombination into the destination vector pCFJ150 (Addgene plasmid 19329) (Frokjaer-Jensen et al., 2008).

To generate the *dpff-1* sgRNA expression vector, we used the pU6::*unc-119* sgRNA vector (Addgene plasmid 46169) (Friedland et al., 2013) as a template. pU6::*unc-119* sgRNA was linearized by PCR with the primers *sgRNA_dpff-1_FOW*, ACTGCATTAAATGGAATTCGGTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTAAATAAG and *sgRNA_dpff-1_FOW*, CGGAATCCATTTAATGACAGTAAACATTTAGATTTGCAATTCATTATATAGG. The PCR product was digested with DpnI, gel-purified and transformed into competent cells. pU6::*dpff-1* sgRNA was confirmed through sequencing.

4.4 | Generation of transgenic and mutant strains

Transgenic animals were generated through Mos1-mediated single copy insertion (Frokjaer-Jensen et al., 2008, 2012). Briefly, 1-day-old EG6699 [*ttT15605* II; *unc-119(ed3)* III; *oxEx1578*] animals were microinjected into the gonad with a mixture containing the following plasmids: pCFJ601 (*Peft-3::Mos1* transposase, 50 ng μL^{-1}), the negative selection marker pMA122 (*Phsp-16.1::peel-1*, 10 ng μL^{-1}), the coinjection markers pCFJ104 (*Pmyo-3::mCherry*, 5 ng μL^{-1}), pGH8 (*Prab-3::mCherry*, 10 ng μL^{-1}), pCFJ90 (*Pmyo-2::mCherry*, 2.5 ng μL^{-1}) and the template plasmid pCFJ150 with the transgene *Pdpff-1::gfp::dpff-1::dpff-1* 3'UTR (20 ng μL^{-1}) or pCFJ150 with the transgene *Pdpff-1::dpff-1::gfp::dpff-1* 3'UTR (20 ng μL^{-1}). The injected worms were grown at 24°C for several days. *unc-119* (+) animals were heat shocked at 34°C for 2 h. The living animals were isolated, and their progeny were analyzed using a fluorescence microscope. GFP-expressing animals with no mCherry expression were selected.

The mutant RN042 *dpff-1(xm17)* line was generated by CRISPR-Cas-9 genome editing (Friedland et al., 2013). Briefly, 1-day-old wild-type N2 animals were microinjected using a mixture containing the following plasmids: *Peft-3::cas9-SV40* (Addgene plasmid 46168, 50 ng μL^{-1}) (Friedland et al., 2013), pU6::*dpff-1* sgRNA (45 ng/ μL) and pCFJ104 (*Pmyo-3::mCherry*, 5 ng μL^{-1}). F1 animals with mCherry expression were selected using a fluorescence stereomicroscope. We genotyped 66 F1 worms by PCR using the primers *dpff-1_EcoRI_FOW*, GCGTAGCTACATATTAATCAATTATCGC and *dpff-1_EcoRI_REV*, AGCCGTTTGATGTTTCATAGTATG. PCR products were digested with EcoRI and visualized in a 2% agarose gel. Using this approach, we identified two independent restriction fragment length polymorphisms in PCR amplicons generated from mutant genomic DNA. *xm17* and *xm20* alleles were sequenced and analyzed. The *xm17* allele resulted in a nonsense mutation (Supporting Information Figure S2). The *xm20* allele resulted in a silent mutation and was not used in this study (data not shown).

4.5 | Fertility assay

To study the effect of *dpff-1* mutations on *C. elegans* fertility, wild-type N2, *dpff-1(tm4287)* and *dpff-1(xm17)* hermaphrodite animals were grown at 20°C, 24°C and with the temperature shift (as previously

described). These hermaphrodite animals were individually selected as L4 larvae and then transferred to new plates every 24 h over the course of 3–4 days, depending on the temperature. Embryos that did not hatch within 24 h after being laid were considered dead.

4.6 | Immunostaining

RME-2 and P-MPK-1 immunolocalization in dissected gonads were performed as previously described (Salinas, Maldonado, Macias-Silva, Blackwell, & Navarro, 2007) with the following modifications. Briefly, dissected gonads were frozen in liquid nitrogen, freeze-cracked, fixed in methanol at -20°C for 1 min and treated with a mix of 1X PBS, 3.7% paraformaldehyde, 80 mM HEPES, 1.6 mM MgSO_4 , and 0.8 mM EGTA for 20 min at room temperature for RME-2 and 12 min for P-MPK-1. Fixed gonads were incubated with RME-2 antibody (1:100) as previously described (Grant and Hirsh, 1999), a commercial antibody against phospho-histone-H3 (Upstate Biotechnology, Catalogue number: 06-570) (1:10) or a commercial phospho-MPK-1 antibody (1:400) (Sigma-Aldrich, Catalogue number: M8159), washed in PBT and finally incubated with a mix of Alexa Fluor 594-conjugated goat anti-rabbit secondary antibody (1:100; Molecular Probes) for MPK-1, Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-mouse Ig(G) secondary antibody (1:100 Molecular Probes) for phospho-histone-H3 or Cy3 anti-mouse secondary antibody (1:100; Jackson Immunology) and DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride, 1 ng μL^{-1}).

To observe nuclear morphology, DAPI staining was performed as previously described (Lee et al., 2007). Briefly, dissected gonads were fixed in 3% formaldehyde and 100% methanol in a 100 mM K_2HPO_4 (pH 7.2) buffer for 20 min at -20°C . Fixed gonads were incubated with DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride, 1 ng μL^{-1}) in PBT (PBS and 0.5% Tween 20) for 10 min at room temperature and washed in PBT. Stained gonads were mounted with Vectashield Mounting Medium (Vector Labs, Burlingame, CA) to prevent photobleaching.

4.7 | Western blot analysis

For the Western blot analysis, 100 two-day-old adult animals from the indicated backgrounds were grown at 24°C, collected and washed in phosphate-buffered saline (PBS 1X). To lyse animals, the samples were boiled for 5 min in 171.5 mM DTT and loading buffer and centrifuged at 13,000 rpm for 1 min. The resulting supernatant was loaded onto 10% polyacrylamide gels. The gels were transferred onto an Immobilon-P polyvinylidene di-fluoride (PVDF) membrane (Millipore) according to standard procedures. Blots were incubated using a commercial antibody for Phospho-ERK (Cell Signaling Technology, Catalogue number: 9101) 1:1000. Primary antibody was diluted in 0.5% nonfat commercial milk, 0.1% TBT and incubated overnight at 4°C. To detect the Phospho-ERK protein, we used the secondary antibody peroxidase-conjugated Goat Anti-Rabbit (H + L) (Thermo Scientific, Catalogue number: 32460) diluted to a final concentration of 1:1000 (same dilution buffer) and incubated for 1 h at room temperature. An α -tubulin monoclonal antibody (Sigma-Aldrich, Catalogue number:

T9026) was used as a loading control at a dilution of 1:500. Bound antibody was detected using a Super Signal West Femto Trial Kit (Thermo Scientific, Catalogue number: 34096).

4.8 | Apoptosis assays

To investigate the role of *dpff-1* in germ cell apoptosis, we crossed *dpff-1(tm4287)* and *dpff-1(xm17)* animals with the strain MD701 (Schumacher et al., 2005). Control *ced-1::gfp*, *ced-1::gfp; dpff-1(tm4287)*, and *ced-1::gfp; dpff-1(xm17)* animals were grown at 24°C, mounted in 2% agarose pads, anesthetized with 10 mM tetramisole and observed under an epifluorescence microscope to quantify germ cell corpses at the indicated developmental stages or stress conditions. For *ced-1(RNAi)*, animals of the indicated genotypes were grown at 24°C, mounted on 2% agarose pads, anesthetized with 10 mM tetramisole and observed by Nomarski microscopy to observe cell corpses. All statistical analyses were performed using SIGMA-PLOT. Error bars indicate SEM. All t-tests are two-tailed unpaired t tests (Mann-Whitney).

4.9 | Stress conditions

For stress-induced germ cell apoptosis, we followed (Salinas et al., 2006) and (Silva-Garcia and Estela Navarro, 2013). Briefly, control *ced-1::gfp*, *ced-1::gfp; dpff-1(tm4287)*, and *ced-1::gfp; dpff-1(xm17)* animals were grown at 24°C. For starvation conditions, 1-day-old animals of the indicated genotype were transferred to NGM plates without bacteria and incubated for 6 h at 24°C. For inducing germ cell apoptosis by heat shock, 1-day-old animals of the indicated background were transferred to NGM plates with bacteria, incubated for 3 h at 31°C in a water bath, and then allowed to recover for 4.5 h at 24°C. After every treatment, animals of the indicated genotypes were anesthetized with 10 mM tetramisole, mounted on 2% agarose pads and observed under an epifluorescence microscope to quantify germ cell corpses. All statistical analyses were performed using SIGMA-PLOT. Error bars indicate SEM. All t tests are two-tailed unpaired t tests (Mann-Whitney).

Synchronized *hsp-16.2::GFP* and *dpff-1(xm17); hsp-16.2::GFP* were grown at 20°C, and when animals reached the L4 stage, 30–40 animals were passed to 35 mm plates of NGM-lite seeded with OP50-1 bacteria. The next day, 1-day-old adults were heat shocked at 35°C for 2 h and then recovered for 4 h (Dues et al., 2016). Animals were mounted and observed under a fluorescence microscope. EP and *dpff-1(RNAi)* animals in the L4 stage expressing the transgene *Psod-3::GFP* were selected and transferred to 35 mm plates of NGM-lite seeded with OP50-1 bacteria. The next day, the animals were heat shocked at 31°C for 8 h. Control animals in both experiments were grown at 20°C (without stress). Fluorescence quantification was performed using ImageJ software as previously described (Huelgas-Morales et al., 2016).

4.10 | Quantification of embryonic lethality after heat shock

Quantitation of embryonic lethality after heat shock was performed as previously described (Huelgas-Morales et al., 2016). Briefly, 1-day-old hermaphrodites were grown at 24°C and heat shocked at 31°C for 3 h

in a controlled temperature water bath. Control groups were kept at 24°C. Immediately after the heat shock, animals were mounted in 2% agarose pads and observed under a microscope. The number of embryos in the uterus and the number of fully grown oocytes inside each gonad arm of every hermaphrodite were counted. Then, animals were recovered and allowed to lay as many embryos as previously averaged for 10 h, constituting group I. Afterwards, the hermaphrodites were transferred to new plates and were allowed to lay embryos for 12 h, constituting group II. Once again, the hermaphrodites were transferred and allowed to lay embryos for another 24 h, constituting group III. Embryonic lethality was determined as the percentage of embryos that did not hatch after 24 h of being laid. In parallel, the embryonic lethality of control hermaphrodites that were not heat shocked was scored.

4.11 | Survival assays

Heat shock was performed as previously described (Paz-Gomez et al., 2014). Synchronized L1 worms were grown at 24°C for 40 h and subsequently transferred to several 35-mm NGM plates for heat shock (30 worms per plate). Plates with 1-day-old hermaphrodites were incubated at 36°C for 12 h, and every hour a plate was taken from the incubator to observe animals under a stereoscopic microscope. Animals without pharyngeal pumping that did not respond to touch were scored as dead and burst animals were discarded. Data from three different experiments were obtained, and the percentage of survival was graphed.

4.12 | Image acquisition and processing

The images were obtained on a Nikon Eclipse E600 microscope equipped with an AxioCam MRc camera (Zeiss). Pictures were captured using AxioVision software (Zeiss). Images were processed using ImageJ (1.50b, Wayne Rasband National Institutes of Health). Some images were captured as a montage with overlapping cell boundaries and processed using MosaicJ (Thévenaz and Unser, 2007).

Quantification of GFP fluorescence used ImageJ (1.50b, Wayne Rasband, National Institutes of Health). The whole area of each animal was selected, and its relative levels of fluorescence (intensity) were measured and graphed. The corrected total fluorescence was calculated as follows: corrected total fluorescence (CTF) = integrated density – (area of the selected animal x mean fluorescence of the background readings). In which the background reading was determined independently by selecting a region next to the animal that had no fluorescence.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Drs. Erik M. Jorgensen, C. Frøkjær-Jensen, and G. Holloper for kindly providing technical advice and reagents. They also thank Dr. Barth Grant for kindly providing the RME-2 antibody. Some strains were provided by the CGC, which is funded by the NIH Office of Research Infrastructure Programs (P40 OD010440) and by the National BioResource Project for the Experimental Animal “Nematode *C. elegans*,” Tokyo, Japan. They also thank the WormBase release WS252 (Dec 04, 2015) for gathering information

and making it available. A.E.V.C. is a doctoral student from the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, UNAM, and received fellowship 335767 from CONACyT. A.E.V.C. received additional financial support from the Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) program and PAPIIT-UNAM (IN207412 and IN207415). This work was supported by grants from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT-México) (103856-Q and 220987) and from Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT-UNAM) (IN207412 and IN207415).

ORCID

Rosa E. Navarro  <http://orcid.org/0000-0003-4992-4450>

REFERENCES

- Alpi, A., Pasierbek, P., Gartner, A., & Loidl, J. (2003). Genetic and cytological characterization of the recombination protein RAD-51 in *Caenorhabditis elegans*. *Chromosoma*, *112*, 6–16.
- Arsenovic, P. T., Maldonado, A. T., Colleluori, V. D., & Bloss, T. A. (2012). Depletion of the *C. elegans* NAC engages the unfolded protein response, resulting in increased chaperone expression and apoptosis. *PLoS One*, *7*, e44038.
- Asikainen, S., Vartiainen, S., Lakso, M., Nass, R., & Wong, G. (2005). Selective sensitivity of *Caenorhabditis elegans* neurons to RNA interference. *Neuroreport*, *16*, 1995–1999.
- Bailly, A., & Gartner, A. (2013). Germ cell apoptosis and DNA damage responses. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *757*, 249–276.
- Brenner, S. (1974). The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, *77*, 71–94.
- Buchman, V. L., Ninkina, N. N., Bogdanov, Y. D., Bortvin, A. L., Akopian, H. N., Kiselev, S. L., ... Georgiev, G. P. (1992). Differential splicing creates a diversity of transcripts from a neurospecific developmentally regulated gene encoding a protein with new zinc-finger motifs. *Nucleic Acids Research*, *20*, 5579–5585.
- Church, D. L., Guan, K. L., & Lambie, E. J. (1995). Three genes of the MAP kinase cascade, *mek-2*, *mpk-1/sur-1* and *let-60 ras*, are required for meiotic cell cycle progression in *Caenorhabditis elegans*. *Development*, *121*, 2525–2535.
- Conte, D., Jr., & Mello, C. C. (2003). RNA interference in *Caenorhabditis elegans*. *Current Protocols in Molecular Biology* *26.3.1–26.3.20*.
- Derry, W. B., Putzke, A. P., & Rothman, J. H. (2001). *Caenorhabditis elegans* p53: role in apoptosis, meiosis, and stress resistance. *Science*, *294*, 591–595.
- Dues, D. J., Andrews, E. K., Schaar, C. E., Bergsma, A. L., Senchuk, M. M., & Van Raamsdonk, J. M. (2016). Aging causes decreased resistance to multiple stresses and a failure to activate specific stress response pathways. *Aging (Albany NY)*, *8*, 777–795.
- Dupuy, D., Li, Q. R., Deplancke, B., Boxem, M., Hao, T., Lamesch, P., ... Vidal, M. (2004). A first version of the *Caenorhabditis elegans* promoterome. *Genome Research*, *14*, 2169–2175.
- Friedland, A. E., Tzur, Y. B., Esvelt, K. M., Colaiacovo, M. P., Church, G. M., & Calarco, J. A. (2013). Heritable genome editing in *C. elegans* via a CRISPR-Cas9 system. *Nature Methods*, *10*, 741–743.
- Frokjaer-Jensen, C., Davis, M. W., Ailion, M., & Jorgensen, E. M. (2012). Improved Mos1-mediated transgenesis in *C. elegans*. *Nature Methods*, *9*, 117–118.
- Frokjaer-Jensen, C., Davis, M. W., Hopkins, C. E., Newman, B. J., Thummel, J. M., Olesen, S. P., ... Jorgensen, E. M. (2008). Single-copy insertion of transgenes in *Caenorhabditis elegans*. *Nature Genetics*, *40*, 1375–1383.
- Gabig, T. G., Crean, C. D., Klenk, A., Long, H., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., ... Weber, G. (1998). Expression and chromosomal localization of the *Requiem* gene. *Mammalian Genome*, *9*, 660–665.
- Gabig, T. G., Mantel, P. L., Rosli, R., & Crean, C. D. (1994). *Requiem*: a novel zinc finger gene essential for apoptosis in myeloid cells. *Journal of Biological Chemistry*, *269*, 29515–29519.
- Gartner, A., Milstein, S., Ahmed, S., Hodgkin, J., & Hengartner, M. O. (2000). A conserved checkpoint pathway mediates DNA damage-induced apoptosis and cell cycle arrest in *C. elegans*. *Molecular Cell*, *5*, 435–443.
- Gibson, D. G., Young, L., Chuang, R. Y., Venter, J. C., Hutchison, C. A., III, & Smith, H. O. (2009). Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature Methods*, *6*, 343–345.
- Grant, B., & Hirsh, D. (1999). Receptor-mediated endocytosis in the *Caenorhabditis elegans* oocyte. *Molecular Biology of the Cell*, *10*, 4311–4326.
- Gumienny, T. L., Lambie, E., Hartweg, E., Horvitz, H. R., & Hengartner, M. O. (1999). Genetic control of programmed cell death in the *Caenorhabditis elegans* hermaphrodite germline. *Development*, *126*, 1011–1022.
- Hajnal, A., & Berset, T. (2002). The *C. elegans* MAPK phosphatase LIP-1 is required for the G(2)/M meiotic arrest of developing oocytes. *EMBO Journal*, *21*, 4317–4326.

- Huelgas-Morales, G., Silva-Garcia, C. G., Salinas, L. S., Greenstein, D., & Navarro, R. E. (2016). The stress granule RNA-binding protein TIAR-1 protects female germ cells from heat shock in *Caenorhabditis elegans*. G3 (Bethesda).
- Kadyk, L. C., & Kimble, J. (1998). Genetic regulation of entry into meiosis in *Caenorhabditis elegans*. *Development*, *125*, 1803–1813.
- Kamath, R. S., Martinez-Campos, M., Zipperlen, P., Fraser, A. G., & Ahringer, J. (2001). Effectiveness of specific RNA-mediated interference through ingested double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Genome Biology*, *2*, RESEARCH0002.
- Kawasaki, I., Shim, Y. H., Kirchner, J., Kaminker, J., Wood, W. B., & Strome, S. (1998). PGL-1, a predicted RNA-binding component of germ granules, is essential for fertility in *C. elegans*. *Cell*, *94*, 635–645.
- Kulikova, D. A., Mertsalov, I. B., & Simonova, O. B. (2013). D4 family genes in vertebrates: Genomic organization and expression. *Ontogeny*, *44*, 3–9.
- Lange, M., Kaynak, B., Forster, U. B., Tonjes, M., Fischer, J. J., Grimm, C., ... Sperling, S. (2008). Regulation of muscle development by DPF3, a novel histone acetylation and methylation reader of the BAF chromatin remodeling complex. *Genes & Development*, *22*, 2370–2384.
- Lascarez-Lagunas, L. I., Silva-Garcia, C. G., Dinikova, T. D., & Navarro, R. E. (2014). LIN-35/Rb causes starvation-induced germ cell apoptosis via CED-9/Bcl2 downregulation in *Caenorhabditis elegans*. *Molecular & Cellular Biology*, *34*, 2499–2516.
- Lee, M. H., Ohmachi, M., Arur, S., Nayak, S., Francis, R., Church, D., ... Schedl, T. (2007). Multiple functions and dynamic activation of MPK-1 extracellular signal-regulated kinase signaling in *Caenorhabditis elegans* germline development. *Genetics*, *177*, 2039–2062.
- Lessard, J., Wu, J. I., Ranish, J. A., Wan, M., Winslow, M. M., Stahl, B. T., ... Crabtree, G. R. (2007). An essential switch in subunit composition of a chromatin remodeling complex during neural development. *Neuron*, *55*, 201–215.
- Libina, N., Berman, J. R., & Kenyon, C. (2003). Tissue-specific activities of *C. elegans* DAF-16 in the regulation of lifespan. *Cell*, *115*, 489–502.
- Lim, Y., Seah, V. X., Mantalaris, A., Yap, M. G., & Wong, D. C. (2010). Elucidating the role of requiem in the growth and death of Chinese hamster ovary cells. *Apoptosis*, *15*, 450–462.
- Martin, J. S., Winkelmann, N., Petalcorin, M. I., McIlwraith, M. J., & Boulton, S. J. (2005). RAD-51-dependent and -independent roles of a *Caenorhabditis elegans* BRCA2-related protein during DNA double-strand break repair. *Molecular & Cellular Biology*, *25*, 3127–3139.
- Merritt, C., Rasoloson, D., Ko, D., & Seydoux, G. (2008). 3' UTRs are the primary regulators of gene expression in the *C. elegans* germline. *Current Biology*, *18*, 1476–1482.
- Mertsalov, I. B., Kulikova, D. A., Alimova-Kost, M. V., Ninkina, N. N., Korochkin, L. I., & Buchman, V. L. (2000). Structure and expression of two members of the d4 gene family in mouse. *Mammalian Genome*, *11*, 72–74.
- Mertsalov, I. B., Ninkina, N. N., Wanless, J. S., Buchman, V. L., Korochkin, L. I., & Kulikova, D. A. (2008). Generation of mutant mice with targeted disruption of two members of the d4 gene family: neuro-d4 and cer-d4. *Doklady Biochemistry & Biophysics*, *419*, 65–68.
- Middeljans, E., Wan, X., Jansen, P. W., Sharma, V., Stunnenberg, H. G., & Logie, C. (2012). SS18 together with animal-specific factors defines human BAF-type SWI/SNF complexes. *PLoS One*, *7*, e33834.
- Miller, M. A., Nguyen, V. Q., Lee, M. H., Kosinski, M., Schedl, T., Caprioli, R. M., & Greenstein, D. (2001). A sperm cytoskeletal protein that signals oocyte meiotic maturation and ovulation. *Science*, *291*, 2144–2147.
- Paz-Gomez, D., Villanueva-Chimal, E., & Navarro, R. E. (2014). The DEAD Box RNA helicase VBH-1 is a new player in the stress response in *C. elegans*. *PLoS One*, *9*, e97924.
- Rea, S. L., Wu, D., Cypser, J. R., Vaupel, J. W., & Johnson, T. E. (2005). A stress-sensitive reporter predicts longevity in isogenic populations of *Caenorhabditis elegans*. *Nature Genetics*, *37*, 894–898.
- Riedel, C. G., Downen, R. H., Lourenco, G. F., Kirienko, N. V., Heimbucher, T., West, J. A., ... Ruvkun, G. (2013). DAF-16 employs the chromatin remodeller SWI/SNF to promote stress resistance and longevity. *Nature Cell Biology*, *15*, 491–501.
- Rodriguez, M., Snoek, L. B., De Bono, M., & Kammenga, J. E. (2013). Worms under stress: *C. elegans* stress response and its relevance to complex human disease and aging. *Trends in Genetics*, *29*, 367–374.
- Rousakis, A., Vlanti, A., Borbolis, F., Roumelioti, F., Kapetanou, M., & Syntichaki, P. (2014). Diverse functions of mRNA metabolism factors in stress defense and aging of *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One*, *9*, e103365.
- Rual, J. F., Ceron, J., Koreth, J., Hao, T., Nicot, A. S., Hirozane-Kishikawa, T., ... Vidal, M. (2004). Toward improving *Caenorhabditis elegans* phenome mapping with an

11. COLABORACIONES

© 2012 Wiley Periodicals, Inc.

genesis 50:801–818 (2012)

ARTICLE

Germ Cell Survival in *C. elegans* and *C. remanei* is Affected When the DEAD Box RNA Helicases VBH-1 or Cre-VBH-1 are Silenced

Laura S. Salinas, Ari Franco-Cea, Laura I. Láscarez-Lagunas, Emmanuel Villanueva-Chimal, Ernesto Maldonado, and Rosa E. Navarro*

Departamento de Biología Celular y Desarrollo, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior s/n Ciudad Universitaria, México DF, 04510, México

Received 30 April 2012; Revised 27 May 2012; Accepted 1 June 2012

Summary: The Vasa family of proteins comprises several conserved DEAD box RNA helicases important for mRNA regulation whose exact function in the germline is still unknown. In *Caenorhabditis elegans*, there are six known members of the Vasa family, and all of them are associated with P granules. One of these proteins, VBH-1, is important for oogenesis, spermatogenesis, embryo development, and the oocyte/sperm switch in this nematode. We decided to extend our previous work in *C. elegans* to sibling species *Caenorhabditis remanei* to understand what is the function of the VBH-1 homolog in this gonochoristic species. We found that Cre-VBH-1 is present in the cytoplasm of germ cells and it remains associated with P granules throughout the life cycle of *C. remanei*. Several aspects between VBH-1 and Cre-VBH-1 function are conserved like their role during oogenesis, spermatogenesis, and embryonic development. However, Cre-*vbh-1* silencing in *C. remanei* had a stronger effect on spermatogenesis and spermatid activation than in *C. elegans*. An unexpected finding was that silencing of *vbh-1* in the *C. elegans* caused a decrease in germ cell apoptosis in the hermaphrodite gonad, while silencing of Cre-*vbh-1* in *C. remanei* elicited germ cell apoptosis in the male gonad. These data suggest that VBH-1 might play a role in germ cell survival in both species albeit it appears to have an opposite role in each one. *genesis* 50:801–818, 2012. © 2012 Wiley Periodicals, Inc.

Key words: VBH-1; Cre-VBH-1; VASA; RNA helicases; *C. remanei*; P granules; germline; *C. elegans*; apoptosis

INTRODUCTION

Germ granules are ribonucleoprotein complexes important for germline specification and function; however

their detailed function remains elusive [reviewed in (Gallo *et al.*, 2010; Seydoux and Braun, 2006; Strome, 2005; Updike and Strome, 2010)]. In *C. elegans* germ granules are known as P granules and among their components are several DEAD box RNA helicases such as GLH-1/-2/-3/-4, CGH-1, LAF-1, and VBH-1 (Gruidl *et al.*, 1996; Hubert and Anderson, 2009; Kuznicki *et al.*, 2000; Navarro *et al.*, 2001; Roussel and Bennett, 1993; Salinas *et al.*, 2007). With the exception of CGH-1, all these proteins belong to the Vasa family and are mainly expressed in the germline where they contribute significantly to its function. Vasa was originally found in *Drosophila melanogaster*, which is required for the recruitment of several pole plasma components and for the regulation of *gurken* translation through its interaction with the eIF5B translation initiation factor (Johnstone and Lasko, 2004). Ultimately, these processes lead to oogenesis progression, proper development of germ cells, and the correct posterior patterning of the embryo.

In *C. elegans*, we have shown that VBH-1 is important for oogenesis, embryo development, and its silencing

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

Laura S. Salinas and Ari Franco-Cea contributed equally to this work.

*Correspondence to: Rosa Estela Navarro, Departamento de Biología Celular y Desarrollo, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-600, México DF, 04510, México.

E-mail: rnavarro@ifc.unam.mx

Contract grant sponsor: CONACyT-Mexico; contract grant numbers: 103856 J50896Q; Contract grant sponsor: UNAM-PAPIIT; contract grant numbers: IN225509, IN207412, IN208512.

Published online 6 June 2012 in

Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

DOI: 10.1002/dvg.22043

Para la colaboración de este trabajo se acopló un microscopio invertido a un sistema de microinyección. Posteriormente se sintetizó e inyectó ARN de doble cadena (0.5-1 ng/ μ l) en el intestino de animales *C. remanei* hembra para silenciar el gen *vbh-1*.



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

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

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

Abstract

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

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

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

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

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

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

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

* E-mail: rnavarro@icunam.mx

Introduction

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

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

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

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

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

Para la colaboración de este trabajo se montó el sistema ‘‘Mos1-mediated single copy insertion (MosSCI)’’ y se generaron los animales transgénicos RN007 (*xmSi05* [*Pvbh-1::gfp::vbh-1::vbh-13’utr*; *Cbr-unc-119(+)*] II), RN008 (*xmSi05* [*Pvbh-1::gfp::vbh-1::vbh-13’utr*; *Cbr-unc-119(+)*] II) y RN013 (*xmSi24* [*Ppie-1::gfp::pie-1 3’utr*; *Cbr-unc-119(+)*] II).

Para generar el transgen *Pvbh-1::gfp::vbh-1::vbh-13’utr* se usó DNA genómico como templado y los oligonucleótidos enlistados en la **Tabla 8**. Los productos de PCR fueron purificados a partir de un gel de agarosa con el kit QIAquick Gel Extraction (QIAGEN). Los fragmentos purificados se clonaron por recombinación en los vectores donadores pDONRP4-P1R y pDONRP2R-P3. Por último, los insertos clonados en los vectores pDONR se mezclaron con el plásmido pCM1.53 (GFP) (Addgene plasmid 17250) y se recombinaron en tandem en el plásmido destino pCFJ150 (Addgene plasmid 19329).

Tabla 8. Lista de oligonucleótidos utilizados para la construcción de transgenes en *C. elegans*

NOMBRE	SECUENCIA 5’ a 3’
attB4_ <i>vbh-1</i> _FOW	GGGGACAAC TTTGTATAGAAAAGTTGCAGCTTTTGTG GTGCGTGACC
attB1r_ <i>vbh-1</i> _REV	GGGGACTGCTTTTTTTGTACAACTTGTCAATTGTAAGAC TATATCAAACGG
attB2_ <i>vbh-1</i> _FOW	GGGGACAGCTTTCTTGTACAAAGTGGCAATGAACACA CAATATTATGCGAATCACAACGG
attB3_ <i>vbh-1</i> _REV	GGGGACAAC TTTGTATAATAAAGTTGGACTATTTGTC AGGCCACAAGGGC

Para generar el transgen *Ppie-1::gfp::pie-1 3'utr* se mezclaron los plásmidos pCM1.127 (promotor *pie-1*) (Addgene plasmid 21384), pCM1.53 (GFP) y pCM5.47 (*pie-1 3'utr*) (Addgene plasmid 17254). Los tres fragmentos se recombinaron en tandem en el plásmido destino pCFJ150. Todos los plásmidos se confirmaron por patrón de restricción y secuenciación.

Los animales transgénicos *Pvvh-1::gfp::vvh-1::vvh-13'utr* se generaron al microinyectar en la gónada de animales adultos de la cepa EG6699 [*ttTi5605* II; *unc-119(ed3)* III; *oxEx1578*] una mezcla que contiene los siguientes plásmidos: pCFJ601 (*Peft-3::Mos1* transposase, 10 ng/μl), el marcador de selección negativa pMA122 (*Phsp-16.1::peel-1*, 10 ng/μl), los plásmidos de coinyección pCFJ104 (*Pmyo-3::mCherry*, 10 ng/μl), pGH8 (*Prab-3::mCherry*, 10 ng/μl), pCFJ90 (*Pmyo-2::mCherry*, 2 ng/μl) y el plásmidos templado pCFJ150 con el transgen *Pvvh-1::gfp::vvh-1::vvh-13'utr* (10 ng/μl).

Los animales transgénicos *Ppie-1::gfp::pie-1* se generaron al microinyectar en la gónada de animales adultos de la cepa EG6699 [*ttTi5605* II; *unc-119(ed3)* III; *oxEx1578*] con una mezcla que contiene los siguientes plásmidos: pCFJ601 (50 ng/μl), el marcador de selección negativa pMA122 (10 ng/μl), los plásmidos de coinyección pCFJ104 (5 ng/μl), pGH8 (10 ng/μl), pCFJ90 (2.5 ng/μl) y el plásmidos templado pCFJ150 con el transgen *Ppie-1::gfp::pie-1* (20 ng/μl).

Los animales inyectados se crecieron a 24°C por varios días y los animales con fenotipo *unc-119* (+) se sometieron a un choque de calor a 34°C por 2 h. Los animales que sobrevivieron al choque de calor se movieron a cajas de NGM con bacteria y su progenie se analizó bajo el microscopio de epifluorescencia. Los animales que expresaban la señal fluorescente de la GFP pero no expresaban la señal fluorescente de la mCherry fueron seleccionados.

RESEARCH ARTICLE

Caenorhabditis elegans ATPase inhibitor factor 1 (IF₁) MAI-2 preserves the mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) and is important to induce germ cell apoptosis

L. P. Fernández-Cárdenas¹, E. Villanueva-Chimal¹, L. S. Salinas¹, C. José-Nuñez², M. Tuena de Gómez Puyou^{2*}, R. E. Navarro^{1*}

1 Departamento de Biología Celular y Desarrollo, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México, **2** Departamento de Bioquímica y Biología Estructural, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México

* rnavarro@ifc.unam.mx (REN); mtuena@ifc.unam.mx (MTdeGP)



OPEN ACCESS

Citation: Fernández-Cárdenas LP, Villanueva-Chimal E, Salinas LS, José-Nuñez C, Tuena de Gómez Puyou M, Navarro RE (2017) *Caenorhabditis elegans* ATPase inhibitor factor 1 (IF₁) MAI-2 preserves the mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) and is important to induce germ cell apoptosis. PLOS ONE 12(8): e0181984. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181984>

Editor: Janine Santos, National Institute of Environmental Health Sciences, UNITED STATES

Received: May 11, 2017

Accepted: July 10, 2017

Published: August 22, 2017

Copyright: © 2017 Fernández-Cárdenas et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was supported by grants from Dirección General de Asuntos del Personal Académico PAPIIT-UNAM (IN207412 and IN207415) and Consejo Nacional de Ciencia y

Abstract

When the electrochemical proton gradient is disrupted in the mitochondria, IF₁ (Inhibitor Factor-1) inhibits the reverse hydrolytic activity of the F₁F₀-ATP synthase, thereby allowing cells to conserve ATP at the expense of losing the mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$). The function of IF₁ has been studied mainly in different cell lines, but these studies have generated contrasting results, which have not been helpful to understand the real role of this protein in a whole organism. In this work, we studied IF₁ function in *Caenorhabditis elegans* to understand IF₁'s role *in vivo*. *C. elegans* has two inhibitor proteins of the F₁F₀-ATPase, MAI-1 and MAI-2. To determine their protein localization in *C. elegans*, we generated translational reporters and found that MAI-2 is expressed ubiquitously in the mitochondria; conversely, MAI-1 was found in the cytoplasm and nuclei of certain tissues. By CRISPR/Cas9 genome editing, we generated *mai-2* mutant alleles. Here, we showed that *mai-2* mutant animals have normal progeny, embryonic development and lifespan. Contrasting with the results previously obtained in cell lines, we found no evident defects in the mitochondrial network, dimer/monomer ATP synthase ratio, ATP concentration or respiration. Our results suggest that some of the roles previously attributed to IF₁ in cell lines could not reflect the function of this protein in a whole organism and could be attributed to specific cell lines or methods used to silence, knockout or overexpress this protein. However, we did observe that animals lacking IF₁ had an enhanced $\Delta\psi_m$ and lower physiological germ cell apoptosis. Importantly, we found that *mai-2* mutant animals must be under stress to observe the role of IF₁. Accordingly, we observed that *mai-2* mutant animals were more sensitive to heat shock, oxidative stress and electron transport chain blockade. Furthermore, we observed that IF₁ is important to induce germ cell apoptosis under certain types of stress. Here, we propose that MAI-2 might play a role in apoptosis by regulating $\Delta\psi_m$. Additionally, we suggest that IF₁ function is mainly observed under stress and that, under physiological conditions, this protein does not play an essential role.

Para la colaboración de este trabajo se generó la cepa transgénica RN015 (*xmSi01* [*Pmex-5::tomm-20::mcherry::tbb-2 3utr; Cb-unc-119 (+)*] II). Para generar este transgénico se usó DNA genómico como templado y los oligonucleótidos en la **Tabla 9**. Las primeras 225 pb del gen *tomm-20* fueron amplificadas con los oligonucleótidos attB1_ *tomm-20*_FOW y *tomm20_mcherryLINK_rev*. La secuencia de la mCherry fue amplificada del plásmido pGH8 (Addgene plasmid 19359) con los ‘primers’ *tomm-20_mcherryLINK_fow* y attB2r_mcherry_REV. Los productos de PCR fueron purificados a partir de un gel de agarosa y fusionados en una reacción de PCR stitching con los oligonucleótidos attB1_ *tomm-20*_FOW y attB2r_mcherry_REV. El fragmento de PCR fusionado fue purificado a partir de un gel de agarosa y clonado por recombinación en el vector donador pDONR221.

Tabla 9. Lista de oligonucleótidos utilizados para la construcción de transgenes en *C. elegans*

NOMBRE	SECUENCIA 5´ a 3´
attB1_ <i>tomm-20</i> _FOW	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAAAAATG TCGGACACAATTCTTG
<i>tomm20_mcherryLINK_rev</i>	TTCTTCACCCTTTGAGACCATTCCAGCCTGGGCACG
<i>tomm-20_mcherryLINK_fow</i>	AGAGACGTGCCCAGGCTGGAATGGTCTCAAAGGGTGA AGAAG
attB2r_mcherry_REV	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTACTTATAC AATTCATCCATGCCACC

Para generar el transgen *Pmex-5::tomm-20::mcherry::tbb-2* se mezclaron los plásmidos pCFJ183 (promotor *mex-5*), pDONR221 (*tomm-20::mcherry*) y pCm1.36 (*tbb-2 3'UTR*, Addgene plasmid 19359) (Merritt et al. 2008) . Los tres fragmentos se

recombinaron en tandem en el plásmido destino pCFJ150. Todos los plásmidos se confirmaron por patrón de restricción y secuenciación.

Los animales transgénicos *Pmex-5::tomm-20::mcherry::tbb-2* se generaron al microinyectar en la gónada de animales adultos de la cepa EG6699 [*ttTi5605* II; *unc-119(ed3)* III; *oxEx1578*] una mezcla que contiene los siguientes plásmidos: pCFJ601 (*Peft-3::Mos1* transposase, 10 ng/μl), el marcador de selección negativa pMA122 (*Phsp-16.1::peel-1*, 10 ng/μl), los plásmidos de coinyección pCFJ104 (*Pmyo-3::mCherry*, 2 ng/μl), pGH8 (*Prab-3::mCherry*, 10 ng/μl), pCFJ90 (*Pmyo-2::mCherry*, 2 ng/μl) y el plásmido templado pCFJ150 con el transgen *Pmex-5::tomm-20::mcherry::tbb-2 3'utr* (10 ng/μl).

Los animales inyectados se crecieron a 24°C por varios días y los animales con fenotipo *unc-119* (+) se sometieron a un choque de calor a 34°C por 2 h. Los animales que sobrevivieron al choque de calor se movieron a cajas de NGM con bacteria y su progenie se analizó bajo el microscopio de epifluorescencia. Los animales que expresaban la señal fluorescente de la GFP pero no expresaban la señal fluorescente de la mCherry fueron seleccionados.

12.ANEXO

12.1. Soluciones y medios utilizados

12.1.1. Nematode Growth Medium (NGM)

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

12.1.2. Amortiguador M9 1X

Reactivo	Concentración final
Na ₂ HPO ₄	42 mM
KH ₂ PO ₄	22 mM
NaCl	86 mM
MgSO ₄	1 mM

12.1.3. PBS 1X

Reactivo	Concentración final
Na ₂ HPO ₄	10.1 mM
K ₂ HPO ₄	1.8 mM
NaCl	137 mM
KCl	2.7 mM

12.1.4. Solución de fijado para gónadas disecadas

Reactivo	Concentración final
PBS	1X
Formaldehido	3.7% (w/v)
HEPES	80 Mm
MgSO ₄	1.6 mM

13.BIBLIOGRAFÍA

- Aasland R, Gibson TJ, Stewart AF. 1995. The PHD finger: implications for chromatin-mediated transcriptional regulation. *Trends in biochemical sciences* **20**: 56-59.
- 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 of the United States of America* **98**: 2735-2739.
- Adams JM, Cory S. 2001. Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends in biochemical sciences* **26**: 61-66.
- Alpi A, Pasierbek P, Gartner A, Loidl J. 2003. Genetic and cytological characterization of the recombination protein RAD-51 in *Caenorhabditis elegans*. *Chromosoma* **112**: 6-16.
- Asikainen S, Vartiainen S, Lakso M, Nass R, Wong G. 2005. Selective sensitivity of *Caenorhabditis elegans* neurons to RNA interference. *Neuroreport* **16**: 1995-1999.
- Bailly A, Gartner A. 2013. Germ cell apoptosis and DNA damage responses. *Adv Exp Med Biol* **757**: 249-276.
- Boulin T, Etchberger JF, Hobert O. 2006. Reporter gene fusions. *WormBook : the online review of C elegans biology*: 1-23.
- Brenner S. 1974. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **77**: 71-94.
- Brivanlou AH, Darnell JE, Jr. 2002. Signal transduction and the control of gene expression. *Science* **295**: 813-818.
- Buchman VL, Ninkina NN, Bogdanov YD, Bortvin AL, Akopian HN, Kiselev SL, Krylova O, Anokhin KV, Georgiev GP. 1992. Differential splicing creates a diversity of transcripts from a neurospecific developmentally regulated gene encoding a protein with new zinc-finger motifs. *Nucleic acids research* **20**: 5579-5585.
- Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward W, Prasher D. 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **263**: 802-805.
- Chestkov AV, Baka ID, Kost MV, Georgiev GP, Buchman VL. 1996. The d4 gene family in the human genome. *Genomics* **36**: 174-177.
- Church DL, Guan KL, Lambie EJ. 1995. Three genes of the MAP kinase cascade, mek-2, mpk-1/sur-1 and let-60 ras, are required for meiotic cell cycle progression in *Caenorhabditis elegans*. *Development* **121**: 2525-2535.
- Cinquin O, Crittenden SL, Morgan DE, Kimble J. 2010. Progression from a stem cell-like state to early differentiation in the *C. elegans* germ line. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 2048-2053.
- Conte D, Jr., Mello CC. 2003. RNA interference in *Caenorhabditis elegans*. *Current protocols in molecular biology / edited by Frederick M Ausubel [et al]* **Chapter 26**: Unit 26 23.
- Corsi AK, Wightman B, Chalfie M. 2015. A Transparent Window into Biology: A Primer on *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **200**: 387-407.
- Denich KR, Schierenberg E, Isnenghi E, Cassada R. 1984. Cell-lineage and developmental defects of temperature-sensitive embryonic arrest mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Wilhelm Roux's archives of developmental biology* **193**: 164-179.

- Derry WB, Putzke AP, Rothman JH. 2001. Caenorhabditis elegans p53: role in apoptosis, meiosis, and stress resistance. *Science* **294**: 591-595.
- Dues DJ, Andrews EK, Schaar CE, Bergsma AL, Senchuk MM, Van Raamsdonk JM. 2016. Aging causes decreased resistance to multiple stresses and a failure to activate specific stress response pathways. *Aging (Albany NY)* **8**: 777-795.
- Dupuy D, Li QR, Deplancke B, Boxem M, Hao T, Lamesch P, Sequerra R, Bosak S, Doucette-Stamm L, Hope IA et al. 2004. A first version of the Caenorhabditis elegans Promoterome. *Genome research* **14**: 2169-2175.
- Feinberg EH, Vanhoven MK, Bendesky A, Wang G, Fetter RD, Shen K, Bargmann CI. 2008. GFP Reconstitution Across Synaptic Partners (GRASP) defines cell contacts and synapses in living nervous systems. *Neuron* **57**: 353-363.
- Friedland AE, Tzur YB, Esvelt KM, Colaiacovo MP, Church GM, Calarco JA. 2013. Heritable genome editing in C. elegans via a CRISPR-Cas9 system. *Nature methods* **10**: 741-743.
- Frokjaer-Jensen C, Davis MW, Ailion M, Jorgensen EM. 2012. Improved Mos1-mediated transgenesis in C. elegans. *Nature methods* **9**: 117-118.
- Frokjaer-Jensen C, Davis MW, Hopkins CE, Newman BJ, Thummel JM, Olesen SP, Grunnet M, Jorgensen EM. 2008. Single-copy insertion of transgenes in Caenorhabditis elegans. *Nature genetics* **40**: 1375-1383.
- Gabig TG, Crean CD, Klenk A, Long H, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Quincey D, Parente F, Lespinasse F et al. 1998. Expression and chromosomal localization of the Requiem gene. *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society* **9**: 660-665.
- Gabig TG, Mantel PL, Rosli R, Crean CD. 1994. Requiem: a novel zinc finger gene essential for apoptosis in myeloid cells. *The Journal of biological chemistry* **269**: 29515-29519.
- Gao X, Tate P, Hu P, Tjian R, Skarnes WC, Wang Z. 2008. ES cell pluripotency and germ-layer formation require the SWI/SNF chromatin remodeling component BAF250a. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 6656-6661.
- Gartner A, Boag PR, Blackwell TK. 2008. Germline survival and apoptosis. *WormBook : the online review of C elegans biology*: 1-20.
- 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.
- Geng X, Zhou QH, Kage-Nakadai E, Shi Y, Yan N, Mitani S, Xue D. 2009. Caenorhabditis elegans caspase homolog CSP-2 inhibits CED-3 autoactivation and apoptosis in germ cells. *Cell Death Differ* **16**: 1385-1394.
- Gibson DG, Young L, Chuang RY, Venter JC, Hutchison CA, 3rd, Smith HO. 2009. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature methods* **6**: 343-345.
- Grant B, Hirsh D. 1999. Receptor-mediated endocytosis in the Caenorhabditis elegans oocyte. *Molecular biology of the cell* **10**: 4311-4326.
- Greenstein D. 2005. Control of oocyte meiotic maturation and fertilization. *WormBook : the online review of C elegans biology*: 1-12.

- 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.
- Hajnal A, Berset T. 2002. The *C.elegans* MAPK phosphatase LIP-1 is required for the G(2)/M meiotic arrest of developing oocytes. *EMBO J* **21**: 4317-4326.
- Horvitz HR. 1999. Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cancer research* **59**: 1701s-1706s.
- Huang X, Gao X, Diaz-Trelles R, Ruiz-Lozano P, Wang Z. 2008. Coronary development is regulated by ATP-dependent SWI/SNF chromatin remodeling component BAF180. *Developmental biology* **319**: 258-266.
- Hubbard EJ, Greenstein D. 2000. The *Caenorhabditis elegans* gonad: a test tube for cell and developmental biology. *Dev Dyn* **218**: 2-22.
- Hubbard EJ and Greenstein D. 2005. Introduction to the germ line. *WormBook : the online review of C elegans biology*: 1-4.
- Huelgas-Morales G, Silva-Garcia CG, Salinas LS, Greenstein D, Navarro RE. 2016. The Stress Granule RNA-Binding Protein TIAR-1 Protects Female Germ Cells from Heat Shock in *Caenorhabditis elegans*. *G3 (Bethesda)*.
- Kadyk LC, Kimble J. 1998. Genetic regulation of entry into meiosis in *Caenorhabditis elegans*. *Development* **125**: 1803-1813.
- Kamath RS, Martinez-Campos M, Zipperlen P, Fraser AG, Ahringer J. 2001. Effectiveness of specific RNA-mediated interference through ingested double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Genome biology* **2**: RESEARCH0002.
- Karin M. 1990. Too many transcription factors: positive and negative interactions. *New Biol* **2**: 126-131.
- Kim S, Spike C, Greenstein D. 2013. Control of oocyte growth and meiotic maturation in *Caenorhabditis elegans*. *Adv Exp Med Biol* **757**: 277-320.
- Kimble J, Hirsh D. 1979. The postembryonic cell lineages of the hermaphrodite and male gonads in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* **70**: 396-417.
- Konishi M, Hiraoka Y, Ogawa M, Sakai Y, Ishii H, Aiso S. 1999. Molecular cloning and expression of *Xenopus laevis* requiem cDNA1. *Biochimica et biophysica acta* **1445**: 172-176.
- Kulikova DA, Mertsalov IB, Simonova OB. 2013. [D4 family genes in vertebrates: genomic organization and expression]. *Ontogenez* **44**: 3-9.
- Lange M, Kaynak B, Forster UB, Tonjes M, Fischer JJ, Grimm C, Schlesinger J, Just S, Dunkel I, Krueger T et al. 2008. Regulation of muscle development by DPF3, a novel histone acetylation and methylation reader of the BAF chromatin remodeling complex. *Genes & development* **22**: 2370-2384.
- Large EE, Mathies LD. 2014. *Caenorhabditis elegans* SWI/SNF subunits control sequential developmental stages in the somatic gonad. *G3* **4**: 471-483.
- Lascarez-Lagunas LI, Silva-Garcia CG, Dinkova TD, Navarro RE. 2014. LIN-35/Rb Causes Starvation-Induced Germ Cell Apoptosis via CED-9/Bcl2 Downregulation in *Caenorhabditis elegans*. *Molecular and cellular biology* **34**: 2499-2516.
- Latchman DS. 1997. Transcription factors: an overview. *Int J Biochem Cell Biol* **29**: 1305-1312.
- Lee MH, Ohmachi M, Arur S, Nayak S, Francis R, Church D, Lambie E, Schedl T. 2007. Multiple functions and dynamic activation of MPK-1 extracellular signal-regulated

- kinase signaling in *Caenorhabditis elegans* germline development. *Genetics* **177**: 2039-2062.
- Lemon B, Inouye C, King DS, Tjian R. 2001. Selectivity of chromatin-remodelling cofactors for ligand-activated transcription. *Nature* **414**: 924-928.
- Lessard J, Wu JI, Ranish JA, Wan M, Winslow MM, Staahl BT, Wu H, Aebersold R, Graef IA, Crabtree GR. 2007. An essential switch in subunit composition of a chromatin remodeling complex during neural development. *Neuron* **55**: 201-215.
- Lettre G, Hengartner MO. 2006. Developmental apoptosis in *C. elegans*: a complex CEDnario. *Nature reviews Molecular cell biology* **7**: 97-108.
- Lim Y, Mantalaris A, Yap MG, Wong DC. 2010a. Simultaneous targeting of Requiem & Alg-2 in Chinese hamster ovary cells for improved recombinant protein production. *Molecular biotechnology* **46**: 301-307.
- Lim Y, Seah VX, Mantalaris A, Yap MG, Wong DC. 2010b. Elucidating the role of requiem in the growth and death of Chinese hamster ovary cells. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* **15**: 450-462.
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods* **25**: 402-408.
- Lopez AL, 3rd, Chen J, Joo HJ, Drake M, Shidate M, Kseib C, Arur S. 2013. DAF-2 and ERK couple nutrient availability to meiotic progression during *Caenorhabditis elegans* oogenesis. *Dev Cell* **27**: 227-240.
- Martin JS, Winkelmann N, Petalcorin MI, McIlwraith MJ, Boulton SJ. 2005. RAD-51-dependent and -independent roles of a *Caenorhabditis elegans* BRCA2-related protein during DNA double-strand break repair. *Molecular and cellular biology* **25**: 3127-3139.
- Mathies LD, Blackwell GG, Austin MK, Edwards AC, Riley BP, Davies AG, Bettinger JC. 2015. SWI/SNF chromatin remodeling regulates alcohol response behaviors in *Caenorhabditis elegans* and is associated with alcohol dependence in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **112**: 3032-3037.
- Merritt C, Rasoloson D, Ko D, Seydoux G. 2008. 3' UTRs are the primary regulators of gene expression in the *C. elegans* germline. *Current biology : CB* **18**: 1476-1482.
- Mertsalov IB, Kulikova DA, Alimova-Kost MV, Ninkina NN, Korochkin LI, Buchman VL. 2000. Structure and expression of two members of the d4 gene family in mouse. *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society* **11**: 72-74.
- Mertsalov IB, Ninkina NN, Wanless JS, Buchman VL, Korochkin LI, Kulikova DA. 2008. Generation of mutant mice with targeted disruption of two members of the d4 gene family: neuro-d4 and cer-d4. *Doklady Biochemistry and biophysics* **419**: 65-68.
- Middeljans E, Wan X, Jansen PW, Sharma V, Stunnenberg HG, Logie C. 2012. SS18 together with animal-specific factors defines human BAF-type SWI/SNF complexes. *PLoS one* **7**: e33834.
- Miller J, McLachlan A, Klug A. 1985. Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* oocytes. *Embo J* **4**: 1609 - 1614.
- Miller MA, Nguyen VQ, Lee MH, Kosinski M, Schedl T, Caprioli RM, Greenstein D. 2001. A sperm cytoskeletal protein that signals oocyte meiotic maturation and ovulation. *Science* **291**: 2144-2147.

- Moshkin YM, Mohrmann L, van Ijcken WF, Verrijzer CP. 2007. Functional differentiation of SWI/SNF remodelers in transcription and cell cycle control. *Molecular and cellular biology* **27**: 651-661.
- Nabirochkina E, Simonova OB, Mertsalov IB, Kulikova DA, Ladigina NG, Korochkin LI, Buchman VL. 2002. Expression pattern of dd4, a sole member of the d4 family of transcription factors in *Drosophila melanogaster*. *Mechanisms of development* **114**: 119-123.
- Ninkina NN, Mertsalov IB, Kulikova DA, Alimova-Kost MV, Simonova OB, Korochkin LI, Kiselev SL, Buchman VL. 2001. Cerd4, third member of the d4 gene family: expression and organization of genomic locus. *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society* **12**: 862-866.
- Park D, Jia H, Rajakumar V, Chamberlin HM. 2006. Pax2/5/8 proteins promote cell survival in *C. elegans*. *Development* **133**: 4193-4202.
- Paz-Gomez D, Villanueva-Chimal E, Navarro RE. 2014. The DEAD Box RNA helicase VBH-1 is a new player in the stress response in *C. elegans*. *PLoS one* **9**: e97924.
- Rea SL, Wu D, Cypser JR, Vaupel JW, Johnson TE. 2005. A stress-sensitive reporter predicts longevity in isogenic populations of *Caenorhabditis elegans*. *Nat Genet* **37**: 894-898.
- Riedel CG, Downen RH, Lourenco GF, Kirienko NV, Heimbucher T, West JA, Bowman SK, Kingston RE, Dillin A, Asara JM et al. 2013. DAF-16 employs the chromatin remodeller SWI/SNF to promote stress resistance and longevity. *Nature cell biology* **15**: 491-501.
- Rual JF, Ceron J, Koreth J, Hao T, Nicot AS, Hirozane-Kishikawa T, Vandenhaute J, Orkin SH, Hill DE, van den Heuvel S et al. 2004. Toward improving *Caenorhabditis elegans* phenome mapping with an ORFeome-based RNAi library. *Genome research* **14**: 2162-2168.
- Rutkowski R, Dickinson R, Stewart G, Craig A, Schimpl M, Keyse SM, Gartner A. 2011. Regulation of *Caenorhabditis elegans* p53/CEP-1-dependent germ cell apoptosis by Ras/MAPK signaling. *PLoS Genet* **7**: e1002238.
- Saha V, Chaplin T, Gregorini A, Ayton P, Young BD. 1995. The leukemia-associated-protein (LAP) domain, a cysteine-rich motif, is present in a wide range of proteins, including MLL, AF10, and MLLT6 proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**: 9737-9741.
- Salinas LS, Maldonado E, Macias-Silva M, Blackwell TK, Navarro RE. 2007. The DEAD box RNA helicase VBH-1 is required for germ cell function in *C. elegans*. *Genesis* **45**: 533-546.
- Salinas LS, Maldonado E, Navarro RE. 2006. Stress-induced germ cell apoptosis by a p53 independent pathway in *Caenorhabditis elegans*. *Cell death and differentiation* **13**: 2129-2139.
- 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.
- Schierenberg E, Miwa J, von Ehrenstein G. 1980. Cell lineages and developmental defects of temperature-sensitive embryonic arrest mutants in *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology* **76**: 141-159.

- 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 and differentiation* **12**: 153-161.
- Silva-García CG. 2013. La proteína de unión a RNA TIAR-1 regula la respuesta al estrés de las células germinales del nematodo *Caenorhabditis elegans*
- Silva-García CG, Estela Navarro R. 2013. The *C. elegans* TIA-1/TIAR homolog TIAR-1 is required to induce germ cell apoptosis. *Genesis* **51**: 690-707.
- Stergiou L, Doukoumetzidis K, Sandoel A, Hengartner MO. 2007. The nucleotide excision repair pathway is required for UV-C-induced apoptosis in *Caenorhabditis elegans*. *Cell death and differentiation* **14**: 1129-1138.
- Sulston JE, Horvitz HR. 1977. Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Developmental biology* **56**: 110-156.
- Sulston JE, Schierenberg E, White JG, Thomson JN. 1983. The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Developmental biology* **100**: 64-119.
- Sundaram MV. 2013. Canonical RTK-Ras-ERK signaling and related alternative pathways. *WormBook*: 1-38.
- Tando T, Ishizaka A, Watanabe H, Ito T, Iida S, Haraguchi T, Mizutani T, Izumi T, Isobe T, Akiyama T et al. 2010. Requiem protein links RelB/p52 and the Brm-type SWI/SNF complex in a noncanonical NF-kappaB pathway. *The Journal of biological chemistry* **285**: 21951-21960.
- Theunissen O. 1992. RNA and DNA binding zinc fingers in *Xenopus* TFIIIA. *Cell* **71**: 679 - 690.
- Thévenaz P, Unser M. 2007. User-friendly semiautomated assembly of accurate image mosaics in microscopy. *Microscopy Research and Technique* **70**: 135-146.
- 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.
- Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG. 2012. Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res* **40**: e115.
- Villanueva-Chimal E, Salinas LS, Fernández-Cárdenas LP, Huelgas-Morales G, Cabrera-Wrooman A, Navarro RE. 2017. DPFF-1 transcription factor deficiency causes the aberrant activation of MPK-1 and meiotic defects in the *Caenorhabditis elegans* germline. *Genesis*.
- Wang Z, Zhai W, Richardson JA, Olson EN, Meneses JJ, Firpo MT, Kang C, Skarnes WC, Tjian R. 2004. Polybromo protein BAF180 functions in mammalian cardiac chamber maturation. *Genes & development* **18**: 3106-3116.
- Warnmark A, Treuter E, Wright AP, Gustafsson JA. 2003. Activation functions 1 and 2 of nuclear receptors: molecular strategies for transcriptional activation. *Mol Endocrinol* **17**: 1901-1909.
- Wu JI, Lessard J, Olave IA, Qiu Z, Ghosh A, Graef IA, Crabtree GR. 2007. Regulation of dendritic development by neuron-specific chromatin remodeling complexes. *Neuron* **56**: 94-108.
- Yan Z, Cui K, Murray DM, Ling C, Xue Y, Gerstein A, Parsons R, Zhao K, Wang W. 2005. PBAF chromatin-remodeling complex requires a novel specificity subunit, BAF200, to regulate expression of selective interferon-responsive genes. *Genes & development* **19**: 1662-1667.

- Yan Z, Wang Z, Sharova L, Sharov AA, Ling C, Piao Y, Aiba K, Matoba R, Wang W, Ko MS. 2008. BAF250B-associated SWI/SNF chromatin-remodeling complex is required to maintain undifferentiated mouse embryonic stem cells. *Stem cells* **26**: 1155-1165.
- Yang M, Sun J, Sun X, Shen Q, Gao Z, Yang C. 2009. Caenorhabditis elegans protein arginine methyltransferase PRMT-5 negatively regulates DNA damage-induced apoptosis. *PLoS Genet* **5**: e1000514.
- Yoneda T, Benedetti C, Urano F, Clark SG, Harding HP, Ron D. 2004. Compartment-specific perturbation of protein handling activates genes encoding mitochondrial chaperones. *J Cell Sci* **117**: 4055-4066.
- Zarkower D. 2006. Somatic sex determination. *WormBook : the online review of C elegans biology*: 1-12.
- Zhou Z, Hartweg E, Horvitz HR. 2001. CED-1 is a transmembrane receptor that mediates cell corpse engulfment in *C. elegans*. *Cell* **104**: 43-56.