

UNIVERSIDAD NACIONAL UN/M AUTÓNOMA DE MÉXICO POSGR/DO

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

DOS ASPECTOS DEL DESARROLLO DEL PEZ CEBRA (*DANIO RERIO*): EXPRESIÓN DEL GEN *CGH-1* Y CRIO-CAPTURA DE CÉLULAS EPIDERMALES.

TESISQUE PARA OBTENER EL GRADO DE :MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)PRESENTA :CASANDRA EDELWEISS
VILLAVA ROBLES



Director de Tesis: Dr. Ernesto Maldonado Olvera

MÉXICO, D. F.

Octubre 2007



Universidad Nacional Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Abreviaturas

- BCIP: Bromo-4-cloro-3-indolil fosfato
- C. e.: Caenorhabditis elegans
- Cgh: Conserved Germline Helicase (helicasa conservada de línea germinal)
- CGP: células germinales primordiales
- D. m.: Drosophila melanogaster
- D. r.: Danio rerio
- Dpf: días post-fertilización
- EST: Expressed Sequence Tag (etiqueta de secuencia expresada)
- Hpf: horas post-fertilización
- kb: kilobase
- kDa: kilo daltones
- mRNA: RNA mensajero
- µg: microgramos
- µL: microlitros
- NBT: nitro blue tetrazolium
- pb: Pares de bases
- PBS: Phosphate Buffer Saline (Amortiguador salino de fosfatos)
- PCR: Polimerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)
- RNA: ácido ribonucléico
- RNAi: RNA de interferencia
- RNP: Ribonucleoprotéico
- SDS-PAGE: SDS Poli Acrilamide Gel Electrophoresis (Electroforesis en gel de
 - poliacrilamida y SDS)
- X. I.: Xenopus laevis

RECONOCIMIENTOS

El presente trabajo se llevó a cabo bajo la dirección del Dr. Ernesto Maldonado en el Departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM y con recursos provenientes de los donativos 220406 de la UNAM (PAPIIT) y 50894 de CONACYT.

El Comité Tutoral que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por: Dra. Diana Escalante Dr. Mario Zurita Instituto de Fisiología Celular, UNAM

La Dra. Rosa E. Navarro del Departamento de Biología Celular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM nos asesoró en el trabajo de mantenimiento de la cepa N2 de *Caenorhabditis elegans* y de su transformación por "Biobalística". También contamos con la asistencia técnica de la M. en C. Marta Elena Castro Manreza. El M. en C. Andrés Ausencio Arellano Torres y la laboratorista Roció Camarillo Villegas se encargaron del mantenimiento de nuestra colonia de peces para investigación. La Bióloga Silvia Salinas Velázquez participó en la adquisición del equipo y material utilizado.

La secuenciación de DNA y preparación de algunos oligonucleótidos empleados en este proyecto se llevó a cabo gracias al trabajo de la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. En particular se agradece el trabajo de la Dra. Laura Ongay Larios, de la Bióloga Guadalupe Codiz Huerta y de la M. en C. Minerva Mora Cabrera.

Para las observaciones de muestras de piel de peces cebra en desarrollo fue indispensable la participación de la Unidad de Microscopía del Instituto de Fisiología Celular, UNAM. Se reconoce en especial el trabajo de la Dra. Araceli Patrón Soberano y del Med. Cir. Rodolfo Paredes Díaz.

El empleo del equipo de computo y acceso a las bases de datos de Internet fue esencial para llevar cabo este proyecto, por eso le agradecemos a la Unidad de Cómputo del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM y en especial a Gerardo Coello, Juan Manuel Barbosa y a Ivette Rosas.

Reconozco en particular el apoyo recibido por CONACYT en la forma de la Beca de Maestría 160573.

El Jurado de Examen estuvo constituido por:

Presidente	Dr. Mario Enrique Zurita Ortega,	Instituto de Biotecnología, UNAM
Vocal	Dra. Marina Macías Silva,	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Secretaria	Dra Tzvetanva Dimitrova Dinkova	a, Facultad de Química, UNAM
Suplente	Dra. Diana Escalante Alcalde,	Instituto de Fisiología Celular UNAM
Suplente	Dr. Jaime Iván Velasco Velázque	z, Instituto de Fisiología Celular, UNAM

AGRADECIMIENTOS

Existen muchas personas involucradas en la realización de este trabajo, en mi desarrollo académico y personal, tantas que me es imposible agradecerles a todos... sin embargo...

Agradezco el apoyo, cariño y confianza incondicional que mi familia me ha otorgado siempre además de todo lo que me han enseñado y me hacen ser la persona que soy: mi mamá Rosa María, mi papá Luis Ernesto y mi hermano Tsintsuni, a mis abuelitos, tíos, tías, primos y primas.

A mi madrina Vicki y a La Novena por su cariño y apoyo.

De igual forma agradezco a mis compañeros y amigos de laboratorio, M. C. Carlos Lozano, Elena Barrera, Dr. Rodrigo Cuervo, M. C. Andrés Arellano que es el técnico del acuario y a la M. C. Marta Castro por su ayuda en la biobalística de *C. elegans*. Del laboratorio de la Dra. Rosa Navarro agradezco su amistad a Aydé Mendoza, Valeria Hansberg, Daniel Paz, Giovanni Silva y a Silvia Salinas además por su apoyo técnico. A la Sra Rocío Camarillo, por su amistad y su ayuda en el laboratorio. A Julián, Agustín, Alfonso y demás estudiantes del Dr. Vaca por su amistad.

Al Instituto de Fisiología Celular por permitirme realizar mis estudios en sus instalaciones, a la Unidad de Cómputo, en especial a Juan Manuel Barbosa e lvette Rosas por su asistencia técnica. A la Dra. Laura Ongay y a Guadalupe Codiz de la Unidad de Biología Molecular por la secuenciación de las construcciones generadas.

A mi comité Tutoral, conformado por la Dra. Diana Escalante y el Dr. Mario Zurita por sus aportaciones a la tesis y su apoyo durante todo el proceso. A mi Jurado por su aportación a la presente Tesis, Dra. Marina Macías, Dra. Tzvetanka Dinkova y Dr. Iván Velasco. Al Dr. Vaca por su apoyo incondicional.

Al Dr. Ernesto Maldonado por permitirme realizar mi trabajo de tesis en su laboratorio y a la Dra. Rosa Navarro por sus valiosas aportaciones a mi proyecto.

A Millipore por su patrocinio para mi asistencia al 5° Congreso Internacional de Pez Cebra, celebrado en Ámsterdam en Julio del presente año.

A todas las personas que consciente o inconscientemente han contribuido a mi desarrollo personal y académico.

CONTENIDO

Abreviatura	IS	I
Agradecimi	entos	II
Reconocim	ientos	III
Resumen		1
Introducció	n	3
El pe	ez cebra como modelo de estudio	3
Desa	arrollo embrionario del pez cebra	4
Primera pa	rte: Identificación del gen cgh-1 de pez cebra	
Ante	cedentes	7
	Las células germinales	8
	Componentes del plasma germinal	9
	Helicasas de RNA tipo DEAD Box	10
	Cgh-1	11
	Cgh-1 y procesamiento de RNA	12
	Proteínas que interactúan con Cgh-1	15
Justi	ficación	16
Hipó	tesis	16
Obje	tivo general	17
Obje	tivos particulares	17
Méto	odos	18
N	lantenimiento de una colonia de pez cebra	18
Т	écnicas básicas de biología molecular	18
	Análisis de las bases de datos	16
	Geles de agarosa	16
	Clonaciones	17
	Preparación de células competentes	19
	Transformación	19

	PCR para clonar a <i>cgh-1</i> y para verificar el	
	inserto de los plásmidos	20
	Construcción de la proteína de fusión de Cgh-1	
	de C. elegans con la proteína verde fluorescente	21
	Extracción de RNA para la detección del mRNA de	
	<i>cgh-1</i> a través de RT-PCR	23
	RT-PCR para detectar al mRNA de cgh-1 en diferentes	
	estadios de desarrollo de pez cebra	24
	Transcripción in vitro para generar la sonda para detectar	
	a cgh-1 a través de hibridación in situ	25
	Dot Blot para determinar la cantidad de sonda a usar	
	para las hibridaciones <i>in situ</i>	26
	Hibridación <i>in situ</i>	27
	Extracción de proteínas de embriones completos de peces	29
	SDS-PAGE y Western Blot	30
Re	esultados	27
	Identificación del gen cgh-1 en las bases de datos	32
	Clonación del gen <i>cgh-1</i> de pez cebra	37
	Sonda control (<i>Dead end</i>)	38
	Expresión del mRNA de <i>cgh-1</i> durante el desarrollo de	
	pez cebra	39
	Aproximaciones en la determinación de la región en que se	
	expresa el mRNA de <i>cgh-1</i> en embriones de pez cebra	40
	Evaluación del anticuerpo	43
	Generación de una proteína de fusión de GFP con el	
	homólogo de Cgh-1 de <i>C. elegans</i>	45
Di	scusión y conclusiones	47

Segunda parte: implementación de una técnica de criocaptura y tinciónde células epidermales.52Antecedentes52

Planteamiento del problema	55
Hipótesis	56
Objetivo general	56
Objetivos particulares	56
Resultados y discusión	57
Referencias	58
Artículo "Freeze-crack technique to study epidermal development	
in zebrafish using differential interference contrast microscopy	
and fluorescent markers"	63

Resumen

El estudio de la biología del desarrollo ha encontrado una herramienta muy útil en el pez cebra, que es un organismo modelo vertebrado para el que se han elaborado herramientas moleculares que permiten estudiar el papel de muchos genes involucrados en el desarrollo de este organismo.

Un evento esencial en el desarrollo de los organismos es la formación de la línea germinal en etapas tempranas de desarrollo; la línea germinal más adelante, en el organismo adulto, originará a los gametos (ovocitos y espermatozoides) para la reproducción de la especie. En el pez cebra, el origen de la línea germinal es dictado por la presencia de determinantes en el citoplasma de las células, albergados en gránulos ribonucleoprotéicos o gránulos germinales. No se conocen todos los componentes de estos gránulos, pero aquellos que se han identificado son generalmente proteínas de unión a RNA, RNA helicasas o proteínas involucradas en el metabolismo de RNA, además de diversos RNA mensajeros aún no identificados. Es importante destacar que algunos de estos componentes también se encuentran en células somáticas, formando parte de cuerpos de procesamiento de RNA y en gránulos de estrés, en donde se sabe que se encuentra la maquinaria de interferencia de RNA, que es un procesamiento posterior a la transcripción que consiste en degradar RNA mensajeros en fragmentos de 19 a 21 nucleótidos a través del reconocimiento de secuencias específicas complementarias a RNAs pequeños. Cgh-1 es una RNA helicasa que forma parte de todos estos gránulos y se ha encontrado como una proteína exclusiva de línea germinal en Caenorhabditis elegans, Drosophila melanogaster, Xenopus laevis, sin embargo, en mamíferos como Mus musculus y Homo sapiens, también se encuentra en células somáticas. Esta proteína está involucrada en el control de la traducción de RNA mensajeros pero no se conoce el mecanismo de reconocimiento con el que selecciona a los RNA que silencia. En este trabajo, encontramos 2 homólogos de cgh-1 de C. elegans en el genoma de pez cebra y describimos el patrón de expresión de su RNA mensajero y generamos herramientas que permitirán estudiar la función de éstos en el desarrollo del pez cebra, como la evaluación de un anticuerpo anti-cgh de pez cebra y la fusión de la proteína homóloga de Cgh en C. elegans a la proteína verde fluorescente.

Por otro lado, desarrollamos una técnica que permite la obtención de las dos capas epidermales de larvas de pez cebra que permiten un estudio más detallado de ésta estructura.

INTRODUCCIÓN

EL PEZ CEBRA COMO MODELO DE ESTUDIO

El estudio del desarrollo embrionario requiere el uso de muy diversas técnicas moleculares, bioquímicas, genéticas, fisiológicas, etc., y de la elección correcta del modelo en el que se estudiarán los fenómenos de interés.

En los últimos 20 años, el pez cebra ha adquirido importancia como modelo vertebrado de desarrollo embrionario y para entender algunas enfermedades hemáticas, desórdenes renales y neuronales en personas (Fraenkel y Zon, 2005). Las características ventajosas que posee son: fácil mantenimiento y reproducción en cautiverio, accesibilidad a gran cantidad de embriones de cualquier etapa del desarrollo, transparencia óptica de los embriones en desarrollo y un genoma diploide que facilita los estudios genéticos (Houart, 2001). Esto ha permitido la realización de varios estudios de mutagénesis a gran escala que han producido muchas líneas de peces con mutaciones puntuales en genes esenciales en el desarrollo embrionario, que permiten estudiar su función, como el realizado por el grupo de Christiane Nüsslein-Volhard en 1996 (Geisler *et al.,* 2007; Patton y Zon, 2001).

El progreso en la secuenciación del genoma del pez cebra ha mostrado que conserva una alta sintenia con el genoma humano, (es decir, los genes conservan la misma posición en los cromosomas humanos y cromosomas de pez) y que posee muchos genes homólogos a los humanos. Por ello, varias cepas de mutantes de pez cebra se utilizan para estudiar enfermedades humanas como las cardiovasculares, neurológicas, hematopoyéticas y renales, por mencionar algunas (Fraenkel y Zon, 2005). Además, se han elaborado herramientas que permiten elucidar el papel de algunos genes durante el desarrollo del pez cebra. Su genoma está a punto de ser secuenciado por completo, existen ya bases de datos de secuencias de expresión de RNA o EST (Expressed Sequence Tag) y existen genotecas de cromosomas artificiales de pez cebra.

La transparencia del embrión permite el rastreo de células individuales o subpoblaciones de ellas con colorantes vitales, su transplante y eliminación para determinar su origen y así construir mapas de predeterminación del embrión (Amacher, 2001). Aprovechando esta misma característica, es posible realizar hibridaciones *in situ* e inmunodetecciones en el embrión completo y así rastrear la localización de RNA mensajeros y proteínas.

En las células relativamente grandes de los primeros estadios de desarrollo, se pueden microinyectar RNA y morfolinos (RNA con enlaces modificados, que se hibridan a los mRNA e impiden su traducción) que nos permiten sobreexpresar genes o bloquear la traducción de mRNA para investigar la función de genes específicos. Sin embargo, al ser un modelo relativamente reciente, todavía faltan desarrollar herramientas que nos permitan explorar más detalladamente aspectos del desarrollo embrionario, por ejemplo, no se ha desarrollado la técnica de "*knock out*" para eliminar genes particulares.

Por todas estas razones, el pez cebra se eligió para estudiar aspectos de la determinación y mantenimiento de las células germinales en este trabajo. Por otro lado, se desarrolló una técnica novedosa que permite la obtención de células de epidermis de embriones de 5 días y teñirlas con marcadores comerciales y anticuerpos para realizar búsquedas de fenotipos particulares en un estudio a gran escala. Estos dos estudios se realizaron aprovechando las ventajas que tiene el pez cebra como modelo de estudio de aspectos de desarrollo embrionario.

DESARROLLO EMBRIONARIO DEL PEZ CEBRA

La fertilización o fusión del espermatozoide y el ovocito lleva a la combinación del material genético de ambas células, sin embargo, el desarrollo posterior del embrión depende absolutamente de la capacidad de proliferación inmediata del cigoto. Esta capacidad está dada por la acumulación de mRNAs durante la ovogénesis, que permanecen latentes (sin ser traducido). De esta manera en el pez cebra, la transcripción se inicia a las 2:45 horas post-fertilización (a 28.5 °C) cuando ya se han formado más de 500 células (figura 1J) y después de 10 divisiones celulares sincrónicas, no se ha transcrito ningún RNA mensajero. Cada ciclo celular dura aproximadamente 15 min y a partir de este momento se vuelven más lentos y asincrónicos; el ciclo celular 10 dura 17 min, el 12 dura 33.5 min y el 16 dura 4 horas. Después, las células avanzan y cubren al vitelo

por epibolia, un proceso controlado por genes cigóticos (*no tail, goosecoid, snail1*) (Kimmel *et al.,* 1995). La gastrulación comienza en la región del escudo, (figura 1Q) que determina la región dorsal, en la que al final de la epibolia se pueden distinguir los ejes embrionarios y por donde se comienza a engrosar la región dorsal. Se forman el epiblasto y el hipoblasto, se desarrolla la placa neural de anterior a posterior, después se comienzan a formar las somitas a la par del alargamiento de la cola (figuras 1W-1D'). Se desarrollan los rudimentos de los órganos primarios y se comienzan a desarrollar el cerebro, el corazón, los ojos, la línea lateral y el pronefros (Figura 1E'-1J').

Después del desarrollo de las somitas, se cubren de epitelio. Se desarrolla la notocorda desde la región anterior hacia la posterior. El siguiente periodo es el de faríngula, en el que se termina de formar la notocorda, el cerebro ya tiene 5 lóbulos, aparecen los primordios de los arcos branquiales, el pez se estira y la cola crece. Comienzan a aparecer melanocitos, se forma el sistema circulatorio y el corazón comienza a latir con movimientos coordinados (Figura 1F'). La eclosión ocurre entre 48 y 72 horas, los rudimentos de los órganos están completos, aparece la boca y se comienzan a desarrollar las aletas (Figura 1I', 1J').





PRIMERA PARTE: IDENTIFICACIÓN DEL GEN cgh-1 DE PEZ CEBRA

ANTECEDENTES

Las células germinales son células especializadas, encargadas de llevar la información genética a la siguiente generación. Dan origen a los gametos, esenciales para la reproducción, por lo que su especificación, producción y mantenimiento es un proceso altamente regulado en la mayoría de los organismos. Por ser tan importante en la sobrevivencia de las especies, este proceso está muy conservado entre los organismos.

Las células germinales tienen características muy particulares, una de las más sobresalientes es su totipotencialidad que les permite dar origen a todas las células que componen a un organismo completo y funcional. Otra característica muy importante es su motilidad, que les permite situarse en el sitio en donde se formará la gónada y en donde se desarrollan los gametos a través de la meiosis. La meiosis recombina el material genético y reduce el juego de cromosomas a la mitad para formar a los gametos. Este proceso es fundamental para la reproducción y consecuente sobrevivencia de las especies. Es importante hacer notar que estas células tienen un programa de expresión genético muy particular, que está muy finamente regulado, lo que les permite mantener su totipotencialidad y responder a ciertas señales y no a otras.

Como se mencionó antes, las células germinales tienen un citoplasma germinal que contiene elementos de origen materno que les confiere su identidad. Las células germinales además contienen determinantes que dirigen el desarrollo de las primeras etapas embrionarias.

Tratando de entender cómo se determinan y cómo funcionan las células germinales, se han identificado diversos componentes del citoplasma germinal, pero aún faltan muchos por estudiar. Se ha encontrado que muchos de ellos son RNAs mensajeros, proteínas de unión a RNA y helicasas, también se sabe que dichos RNA mensajeros están silenciados y no se conoce qué proteínas codifican. Muchos de los componentes encontrados están altamente conservados en los distintos organismos, desde invertebrados (*Caenorhabditis*)

elegans, Drosophila melanogaster) hasta vertebrados (Danio rerio, Mus musculus, Homo sapiens).

También se ha encontrado que existen componentes del citoplasma germinal en gránulos de células somáticas de humanos, por ejemplo, en los cuerpos de procesamiento de RNA, en donde se ha descubierto que se encuentra la maquinaria de interferencia de RNA que regula la expresión de genes a nivel postranscripcional. Se ha propuesto que estos determinantes hacen que las células germinales no se diferencien en ningún tipo celular, pero todavía falta mucho por conocer de los mecanismos, proteínas y RNAs implicados en la determinación de las células germinales.

Las células germinales

En el embrión de 2 y 4 células, el citoplasma germinal se encuentra anclado en forma de gránulos, en los planos marginales de segmentación; estos 4 gránulos persisten en el los surcos marginales mientras que el embrión se encuentra como sincicio, hasta que el embrión tiene 32 células, que es el momento en que cada célula se independiza de las demás y cada gránulo permanece dentro de una célula, dando origen a 4 células germinales. Las células germinales primordiales tienen división asimétrica, manteniendo su número constante hasta el estadio de 1000 células y a partir de este momento se multiplican para tener 20 células en el estadio de domo con aprox. 4000 células somáticas. (4.5 horas post fecundación). A las 6 horas hay 25 células germinales en 4 grupos que no tienen una posición específica con respecto a los ejes corporales (Yoon et al., 1997). Al final de la epibolia, las células germinales guedan en una posición más o menos ecuatorial y comienzan a migrar hacia el sitio en donde se va a formar la gónada, se sabe que el receptor Cxcr4b y la quimiocina Sdf-1 dirigen esta migración (Doitsidou et al., 2002). La proliferación y migración de células germinales primordiales (CGP) en pez cebra se inicia en el estadio de esfera (4 hpf). Cuando las CGP llegan al lugar pre-determinado, inducen la formación del tejido gonadal y la formación de la gónada.

Las células germinales son células que con un control único de sus funciones celulares evitan diferenciarse en células somáticas, son separadas y diferenciadas de las células somáticas temprano en el desarrollo. Este plasma germinal es segregado asimétricamente durante las primeras divisiones celulares del cigoto. Sin embargo, en mamíferos y anfibios urodelos, la determinación de la línea germinal es inducida durante la gastrulación y depende del tejido en el que estén (Raz, 2003).

Componentes del citoplasma germinal

El citoplasma germinal es conocido en *Drosophila melanogaster* como gránulos polares, en *Xenopus laevis* y pez cebra como gránulos germinales y en *C. elegans* como gránulos P (Schisa *et al.*, 2001). La función de estos gránulos se desconoce pero se ha especulado que almacenan y procesan RNA mensajeros y proteínas que son importantes para la función de la línea germinal y la embriogénesis. Se ha observado en algunos organismos que existe una represión transcripcional en las células germinales primordiales (Leatherman y Jongens, 2003). El represor de *C. elegans* es *pie-1*, que actúa directamente sobre la RNA polimerasa II. Algunos componentes del plasma germinal participan en el control de la transcripción, en la unión de RNAs, control de la traducción, etc. (revisado por Wylie, 1999).

En Drosophila se han encontrado gran cantidad de componentes de plasma germinal, entre ellos RNAs no codificantes (RNA mitocondrial ribosomal, pgc), proteínas involucradas en el ensamblaje del plasma germinal (Tropomiosina III, Mago nashi, Valois), proteínas de unión a RNA, involucradas en la migración y sobrevivencia de las células germinales (Oskar, Orb, Capuccino, Spire, Nanos, Vasa, Tudor, Pumilio, Gustavus, Aubergine, Torso, (Wylie, 1999; Santos y Lehmann, 2004; Amikura et al., 2001). Los mRNAs que son componentes de gránulos germinales deben tener secuencias en su 3'UTR para ser localizados correctamente y deben ser transportados a través de microfilamentos o microtúbulos, deben ser protegidos de degradación, anclados en el gránulo o plasma germinal adherido a la corteza y tener reprimida su traducción (Zhou y Louking, 2004). El gen vasa codifica para una helicasa de la familia DEAD Box que se expresa en la línea germinal durante el ciclo de vida del organismo y se usa como marcador de células germinales (Knaut et al,. 2005; Krovel y Olsen, 2004) cuya proteína no tiene la misma localización de su mRNA (Yoon, 1997).

En pez cebra se han descrito muy pocos de estos componentes (Raz, 2003), como vasa (Braat *et al.,* 2000), RNA de vasa , nanos, dead end (Weidinger *et al,.* 2003), daz1, cxcr4b, orb/CPEB (Bally-Cuiff, 1998), pero no se conoce a detalle sus funciones e interacciones.

Helicasas de RNA tipo DEAD Box

La familia DEAD Box es una subfamilia de helicasas de RNA a la que pertenece *cgh-1*. Las RNA helicasas son proteínas que unen ATP y tienen la habilidad de desenrollar dos cadenas de RNA complementarias. En particular, la subfamilia de RNA helicasas con cajas DEAD (D-E-A-D = Asp-Glu-Ala-Asp) participan en varios procesos celulares como la exportación de mRNA, el *"splicing"* de pre-mRNA, la degradación de mRNA, la biogénesis de ribosomas y la traducción (Matsumoto et al. 2005). También se les involucra en la transcripción y expresión de genomas de organelos (Tomer y Linder, 2001; Rocak y Linder, 2004).

Estas proteínas tienen varios dominios característicos nombrados por los aminoácidos conservados (x es cualquier aminoácido):

I: AxxGxGKT (alanina, x, x, glicina, x, glicina, lisina, treonina) une ATP;

Ia: PTRELA (prolina, treonina, arginina, ácido glutámico, leucina, alanina), une al RNA sustrato;

Ib: TPGR (treonina, prolina, glicina, arginina) también une a RNA sustrato;

II: DEAD (ácido aspártico, ácido glutámico, alanina, ácido glutámico) une ATP;

III: SAT (serina, alanina, treonina) coordina la actividad de la hidrólisis de ATP con la de helicasa;

V: ARGID (alanina, arginina, glicina, isoleucina, ácido aspártico) une al sustrato;

VI: HRxGRxGR (histidina, arginina, x, glicina, arginina, x, glicina, arginina) une ATP.

Además, en vertebrados, la proteína contiene una señal de localización nuclear ("NLS" o "nuclear localization sequence") y otra de exportación del núcleo ("NES" o "nuclear export sequence"). Tiene un sitio de fosforilación y otro de unión a proteína cinasa (Figura 2).



Figura 2: Dominios conservados en las helicasas DEAD Box (Weston y Sommerville, 2006).

La helicasa DEAD box más común es el factor de inicio de la traducción eIF4A, que contiene los elementos mínimos para ejercer su función. Las demás proteínas tienen los dominios conservados y lo que las diferencia son las secuencias amino y carboxilo terminales.

Cgh-1

Cgh (**c**onserved **g**ermline RNA **h**elicase) es una helicasa muy conservada en distintos organismos y en algunos es exclusivo de la línea germinal. En *Saccharomyces cerevisiae* el gen homólogo a *cgh-1* (*dhh1*) (Bergkessel y Reese, 2004) es esencial para el re-inicio de la fase S del ciclo celular, en un evento posterior al arresto del ciclo inducido por la vía de señalización conocida

como "verificación del daño a DNA" (DNA damage checkpoint en inglés). Una interrupción de la fase G1 del ciclo celular ocurre como respuesta a condiciones de estrés ambiental (como estrés oxidativo o limitación de nutrientes). Se ha sugerido que *cgh-1* participa en el re-inicio del ciclo celular influyendo en la estabilidad y traducción de los mRNA (Bergkessel y Reese, 2004). De manera concordante, el homólogo de *cgh-1* en humanos (rck) se expresa en tejidos de alto recambio y su sobreexpresión en tejidos de bajo recambio se ha relacionado con algunos tipos de cáncer (Akao *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 2005). Por el momento no se sabe a qué mensajeros se une Cgh-1.

En *C. elegans* se describió que la eliminación en la expresión de *cgh-1* por interferencia de RNA (RNAi) provoca la apoptosis de la mayoría de los ovocitos contenidos en la gónada sin afectar otros tejidos y se encontró que el esperma no es funcional, por lo que se sugirió que este gen tiene un papel protector contra la apoptosis en células germinales (Navarro *et al.*, 2001). En organismos como *Xenopus*, *Drosophila* y *C. elegans* se ha encontrado que el gen *cgh-1* forma parte integral del citoplasma germinal (Nakamura *et al.*, 2001; Ladomery *et al.*, 1997) al igual que en almeja *Spisula solidissima* (Minshall, Thom y Standard, 2001). En mamíferos como el ratón, *cgh-1* (*p54*) también se ha encontrado altamente expresado en el citoplasma de células germinales como ovocitos maduros y espermatocitos primarios, además de ciertos tejidos somáticos. Sin embargo una vez fertilizado el óvulo, su expresión disminuye gradualmente a lo largo del desarrollo y si se sobreexpresa en las primeras divisiones, el desarrollo se ve severamente afectado (Matsumoto *et al.*, 2005; Akao *et al.*, 1995).

Cgh-1 y procesamiento de mRNAs

La proteína Cgh-1 (Dhh1p) tiene también un papel relevante en la degradación de RNAs mensajeros en *S. cerevisiae* (Tseng-Rogenski *et al.,* 2003) y se ha estudiado su función como activador de las proteínas que eliminan el *cap5'* y que a su vez induce la degradación de los mRNAs (Teixeira, 2005). Esto ocurre localizadamente en los cuerpos de procesamiento. Otro componente de los cuerpos de procesamiento que interactúa con Cgh-1 es la enzima que remueve el cap (Coller *et al.,* 2001), que tiene 2 subunidades *Dcp*1 y 2, existen varias

proteínas que activan la eliminación del cap, como *Lsm1-7* y *Pat1*. (Figura 3). Se ha sugerido que la proteína de unión al elemento CPE (*CPEB*) que también es parte de estos cuerpos de procesamiento, así como una subunidad de la enzima deadenilasa *Ccr4* (Bally-Cuif *et al.*, 1998; Sheth y Parker, 2003). Hasta el momento no se conocen las interacciones que existen entre ellos ni la coordinación de sus funciones.

A la proteína Cgh-1 se le ha asignado una función de represor de la traducción en células germinales, lo que explicaría su asociación con los cuerpos de procesamiento de RNA (Minshall y Standart, 2004). El modelo de inhibición de la traducción por *cgh-1* consiste en la formación de un dímero de Cgh-1 que junto con la proteína CPEB se une al extremo 3' no-poliadenilado de los mRNA maternos (Figura 3). Las proteínas elF4E y su transportador en conjunto con Cgh-1 han sido implicados en llevar a los mRNAs maternos a los cuerpos de procesamiento de RNA (Andrei *et al.,* 2005). Este subcomplejo secuestra al factor de inicio de la traducción elF4E y evita que lleve a cabo su función. La proteína elF4E se requiere para unirse al cap 5' y activar la unión de otros factores traduccionales al mRNA (Minshall y Standart, 2004; de Moor, 2005; Coolegrove-Otero, 2005). Este modelo sugiere la circularización del mRNA donde los extremos 3' y 5' están al mismo tiempo unidos a este subcomplejo regulatorio (Figura 3).

Otros estudios demuestran que el ortólogo en levadura, Dhh1 es capaz de reprimir la traducción de mensajeros actuando directamente sobre la subunidad 40 S e independiente de factores de inicio de la traducción (Coller y Parker, 2005).



Figura 3: Modelo propuesto de las interacciones de Cgh 1 (Xp54) (Weston *et al.,* 2006) muestra tres estados: de degradación en donde interactúa con pat, a través de RNA con Car; en este mismo complejo existe un dímero de FRGY2 y un CPEB en un mRNA sin cap 5' ni poliA.

De almacén en donde se encuentra Cgh y Car interactuando a través de RNA, FRGY2 se encuentra fosforilado y el CPEB interatuando con el factor 4E-T y elF4E. En el estado de traducción Cgh se encuentra aparentemente inactivado por fosforilación, la PABP se une a elF4G y permite la entrada del ribosoma para traducir al mRNA.

Recientemente se han estudiado los componentes de la maquinaria de interferencia de RNA en los cuerpos de procesamiento. Se ha encontrado que en células humanas, el ortólogo de Cgh-1, RCK, colocaliza con Argonauta 1 y 2 (Chu y Rana, 2006) y además es esencial para el silenciamiento de mRNAs a través de miRNAs.

En humanos, Cgh-1 se expresa en varios tejidos somáticos, especialmente tejidos de alto recambio celular, pero en algunos organismos como *Xenopus laevis* y *C. elegans* es exclusivo de línea germinal, forma parte del citoplasma germinal y su ausencia provoca la traducción de mRNAs que normalmente están silenciados (Nakamura *et al.,* 2001).

Por otro lado, los gránulos germinales no son los únicos gránulos presentes en las células germinales, también se encuentran cuerpos de procesamiento y otros gránulos de procesamiento de RNA y en todos ellos se

encuentra Cgh-1, aunque no se sabe cuál es la relación entre ellos (Anderson y Kedersha, 2006).

Por otro lado, algunos trabajos en *Xenopus laevis* han reportado la presencia del ortólogo de Cgh1 (Xp54) en el núcleo, formando un complejo ribonucleoprotéico, por lo que se ha propuesto que dicho componente une a los mRNAs desde el núcleo, después de ser transcritos, probablemente ejerciendo un control a nivel post-transcripcional. La proteína contiene señales NLS y NES que le permite entrar y salir del núcleo aparentemente sólo en vertebrados (Weston y Sommerville, 2006).

Proteínas que interactúan con Cgh-1

Se han encontrado pocas proteínas que colocalizan con Cgh-1 en dichos gránulos, entre los cuales se encuentra Car-1, una proteína de unión a RNA, cuya interacción con Cgh-1 es a través de mRNA, como ocurre con CPEB (Boag *et al.*, 2005). También interactúan indirectamente con factores de traducción, como eIF4E (Andrei *et al.*, 2005), además de la enzima que elimina el cap (Dcp 1 y 2; Coller *et al.*, 2001). Se ignora todavía la relación que existe entre estos componentes y su papel en el mantenimiento de la línea germinal, aunque se ha propuesto que el citoplasma germinal estabiliza a los mRNAs con el complejo que forma Cgh-1 (Weston y Sommerville, 2006).

JUSTIFICACIÓN

Las células germinales son totipotenciales y pueden dar origen a cualquier tipo celular de un organismo. Conocer los mecanismos de acción de los gránulos que las caracterizan nos permitiría entender más claramente cómo se lleva a cabo el desarrollo de los organismos, el control de la diferenciación celular, además del control de la expresión de ciertas proteínas y el control de la correcta transmisión de la herencia genética en condiciones normales. Se ha identificado al citoplasma germinal como el complejo que alberga a dichos elementos o determinantes y se han encontrado partículas similares en células somáticas que controlan la traducción de RNAs mensajeros, pero se desconocen los componentes y los mRNAs que silencian.

Para poder responder qué papel juega Cgh-1 en el mantenimiento de la línea germinal del pez cebra, primero es esencial demostrar que ésta proteína es, efectivamente, exclusiva de línea germinal y necesaria para su sobrevivencia y función en pez cebra.

HIPÓTESIS

Si la helicasa Cgh-1 es parte del citoplasma germinal en pez cebra, podremos detectarla solamente en sus células germinales mediante hibridaciones *in situ*.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

 Generar las herramientas necesarias para la caracterización de Cgh-1 de pez cebra y estudiar el patrón de expresión del mRNA de *cgh-1* en embriones de pez cebra.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1. Identificar y clonar al gen *cgh-1* de pez cebra y hacer un análisis filogenético con los homólogos en otros organismos.
- 2. Determinar en qué etapa del desarrollo se encuentra el mRNA de *cgh-1* a través de la técnica de RT-PCR.
- 3. Determinar si en embriones completos de pez cebra el mRNA de *cgh-1* se expresa en células germinales por medio de hibridaciones *in situ*.
- 4. Titular un anticuerpo dirigido contra Cgh-1 a través de Western Blot.
- 5. Generar una proteína de fusión con GFP ("Green Fluorescent Protein") y la proteína homóloga de Cgh-1 en *C. elegans*.

MÉTODOS

Mantenimiento de una colonia de pez cebra

Los peces se mantuvieron en tanques con un sistema semi-automatizado de circulación, calentamiento y purificación de agua con pH de 6.8-7.2, conductividad de 450-500 ohms y temperatura de 28° C. El cuarto donde está el acuario se mantuvo a una temperatura de 24 °C. Fotoperiodo: 14 horas luz y 10 de oscuridad. Las larvas de peces se alimentaron con paramecio 3 veces al día y los adultos con artemias y hojuelas maceradas de alimento comercial (Tetramin Pro) para peces 2 veces al día.

Se usó la cepa TAB-14 (cruza de "Tübingen (T) y cepa de Oregon (AB)) y NOP (no portador de mutaciones, fondo genético TAB-14) y para obtener embriones se puso un macho y una hembra en una caja de cruza con agua de acuario, se colocaron en la tarde y al día siguiente en la mañana se revisaron si hay huevos fecundados. Los embriones se recolectaron con un colador, se lavaron con agua de acuario con azul de metileno (0.01 %) para evitar la proliferación de hongos y se colocaron un máximo de 60 embriones en cada caja de petri. Se mantuvieron en una incubadora a 28°C. Se revisaron en los días 1, 3 y 5 para retirar los embriones muertos.

Técnicas básicas de biología molecular

Análisis de las bases de datos: Se buscaron las secuencias de proteínas ya reportadas como homólogos de *cgh-1* de *C. elegans* en las bases de datos de otros organismos (*C. elegans* y *Homo sapiens*) (Ensembl), estas secuencias se usaron para buscar en la base de datos del pez cebra las secuencias más parecidas. Las secuencias reportadas como homólogos de *cgh-1* en otros organismos se compararon con las secuencias candidatas de pez cebra a través de un alineamiento múltiple, que después se usó para el análisis filogenético y comprobar que la secuencia encontrada corresponde al homólogo en pez cebra.

Geles de agarosa: Se usó agarosa al 1% en TBE (Tris 0.089 M, EDTA-Na₂ 0.002 M, ácido Bórico 0.089 M) y se corrió 30 minutos a 100 Volts para analizar productos de PCR y plásmidos digeridos con enzimas de restricción.

Clonaciones:

-Se diseñaron oligonucleótidos para clonar a *cgh-1*, se realizó un PCR cuyo producto se insertó en un plásmido TOPO para clonar productos de PCR que tiene extremos T que se aparean con los extremos A que genera la enzima Taq polimerasa.

- Para hibridaciones *in situ*: Se buscaron en las bases de datos de pez cebra los genes más parecidos a *cgh-1* localizando regiones suficientemente diferentes entre el gen *cgh-1* y otras helicasas tipo DEAD de pez cebra para diseñar una sonda específica para *cgh-1*. Este fragmento se subclonó usando enzimas de restricción en el vector pBluescript II. Se utilizó como control positivo el gen Dead End (dnd) que se ha reportado como gen que se expresa exclusivamente en células germinales de pez cebra.

Preparación de células competentes: Se inocularon 10-12 colonias de bacterias DH5α a 250 mL de medio SOB (extracto de levadura 0.5%, triptona 2%, NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgS0₄ 7H₂O 10 mM) en un matraz de 2 L, se incubaron a 18° C a 200-250 rpm hasta que el cultivo alcanzó una OD₅₉₅ de 0.6. Se enfrió el matraz en hielo por 10 min. Se centrifugó a 3000 x g por 10 min a 4°C, se retiró el sobrenadante y se agregaron 80 mL de TB (PIPES 10 mM, CaCl₂ 2H₂O 15 mM, KCl 250 mM, MnCl₂ 4H₂O 55 mM) frío y se incubó en hielo por 10 min. Se centrifugó a 3000 rpm por 10 min a 4°C, se retiró el sobrenadante y cagregaron 1.4 mL de DMSO, se mezcló e incubó en hielo por 10 min. Se hicieron alícuotas de 500 μL y se congelaron en nitrógeno líquido, se guardaron a -70°C.

Transformación: Se descongelaron en hielo las bacterias competentes, se agregó el plásmido (1:200 μ L), se mezcló suavemente e incubó en hielo 15 min. Se dió choque térmico por 60 seg a 42° C. Se transfirió rápidamente a hielo. Se adicionaron 250 μ L de medio SOC (medio SOB + glucosa 20 mM). Se incubó en agitación a 37°C por una hora. Se centrifugó a velocidad máxima 30 seg, se decantó, resuspendió y plaqueó en cajas con LB (Triptona 1%, extracto de levadura 0.5% y NaCl 1%) y el antibiótico de selección.

PCR para clonar a cgh y para verificar el inserto de los plásmidos:

Se usó Buffer de PCR 10X, MgCl_2 2 mM, dNTPs 0.2 mM, primers 0.5 μM , y Taq polimerasa a 2.6 U/ 50 $\mu L.$ Se usaron 2 programas en el termociclador PTC-200:

1)	94°	2 min		2)	94°	2 min	
	94°	30 seg	ו		94°	15 seg -	ו
	60°	30 seg	> 30 veces		60°	30 seg	30 veces
	68°	2 min	J		68°	1.5 min -	J
	72°	10 min			72°	10 min	

 Tabla 1:Oligonucleótidos diseñados para clonar a cgh-1 de pez cebra:

Nombre	Blanco	Posición	Secuencia	Objetivo
cv1	cgh-1 D r	Base 102	GCTCTAGACTCCACTGTTGTTTGTCGCTC	Clonar y secuenciar cgh
cv2	cgh-1 D r	Base 41	GCTGTGGGAAGGACGACTTGC	Clonar y secuenciar cgh
cv3	cgh-1 D r	Base 41	GCTCTAGAGCTGTGGGAAGGACGACT	Clonar y secuenciar cgh
cv4	cgh-1 D r	Base 1638	GGGGTACCTGGGATAGGGGACAAAGGA	Clonar y secuenciar cgh
cv5	cgh-1 D r	Base 1753	GGGGTACCAAGAGGGAGGTGGGAGTAGA	Clonar y secuenciar cgh
cv6	cgh-1 D r	Base 1753	AAGAGGGAGGTGGGAGTAGAGGAA	Clonar y secuenciar cgh
cv9	cgh-1 D r	Base 196	CCGAGTCCTATTCAAGAAGCATC	Secuenciar cgh
cv10	cgh-1 D r	Base 495	CATCGCCACCCCAGGAAG	Secuenciar cgh
cv11	cgh-1 D r	Base 796	GCTTCTCTTGAACAAAGGC	Secuenciar cgh
cv12	cgh-1 D r	Base 784	CAAAGGCATAGTATTGGGTG	Secuenciar cgh
cv13	cgh-1 D r	Base 204	TCTTCTTCCAGTCATCTCCAGGC	Secuenciar cgh
cv14	cgh-1 D r	Base 466	TTTCTTCAGGTCTATGCGTTCAAG	Secuenciar cgh
cv15	cgh-1 D r	Base 1081	TCCTGTTTCTACATTCATGCCAAG	Secuenciar cgh

Tabla 2: Plásmidos obtenidos en este trabajo. Todas las construcciones fueron secuenciadasen la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

			kb		
Nombre	Plásmido origen	Inserto	inserto	Objetivo	Promotor
pCV1	TOPO	cgh1 D. rerio	1.753	Clonar y secuenciar a cgh	T7
pCV2	pDONR	cgh <i>C. elegan</i> s	1.6	Fusión GFP vector entrada	-
				Fusión GFP	
pCV3	pID3.01B	cgh C. elegans	1.6	vector de expresión	Pie-1
pCV4	pBLUESCRIPT II KS	cgh D. rerio	0.909	sonda ISH	T7
pCV7	pBLUESCRIPT II KS	myoD D. rerio	0.7	sonda ISH Control	T3
pCV10	pBLUESCRIPT II KS	Dnd D. rerio	0.450	sonda ISH	T7

Construcción de la proteína de fusión de Cgh-1 de *C. elegans* con la proteína verde fluorescente

-Para generar la proteína de fusión Cgh-1::GFP de *C. elegans*: se usó el sistema Gateway de Invitrogen con el que se subclonó el gen *cgh-1* de *C. elegans* en un vector (pID3.01B), que tiene el promotor del gen *pie-1* de expresión gonadal y fusiona a la proteína verde fluorescente al extremo amino del gen de interés.

Se usaron oligonucleótidos y ADN de *C. elegans* proporcionados por la Dra. Rosa Navarro para clonar el gen de *C. elegans* en vectores del sistema GATEWAY de Invitrogen, que funciona con sitios de recombinación.

Se realizó el PCR con el siguiente programa:

1er paso: Desnaturalización a 94° C por 4 min.

2º paso: 5 ciclos de desnaturalización a 94° C por 30 seg, alineamiento a 55° C por 45 seg y extensión a 72° C por 2 min.

3er paso: 20 ciclos de desnaturalización a 94º por 30 seg, alineamiento a 45º por 45 seg, extensión a 72º por 2 min.

4º paso: extensión final a 72º por 4 min.

El producto de PCR se clonó por recombinación tipo BP (el producto de PCR tiene sitios de recombinación B y el vector pDONR tiene sitios de recombinación P) en el vector pDONR, produciendo la construcción pCV2. Para la reacción de recombinación BP se combinaron en un tubo 4.5 μ L de Buffer TE, 0.5 μ L del producto de PCR, 1 μ L del plásmido pDONR 201 (150 ng/ μ L), 2 μ L del buffer de la clonasa y 2 μ L de la enzima clonasa. Se incubó a 25° C toda la noche, se agregó 1 μ L de proteinasa K, se incubó por 10 min a 37° C y se transformaron células competentes DH5 α utilizando kanamicina como marcador de selección.

El plásmido resultante (pCV2) se recombinó con un vector de expresión pID3.01B que tiene el promotor *pie-1* produciendo el plásmido pCV3 que ya presenta la proteína verde fluorescente con Cgh. Reacción de recombinación tipo LR (el plásmido pCV2 tiene sitios de recombinación L y el plásmido destino pID3.01B tiene sitios de recombinación R): se combinaron en un tubo eppendorff 3 µL de buffer TE, 1.5 de pCV2, 1.5 µL de pID3.01B, 2 µL del buffer de la clonasa LR y 2 µL de la enzima Clonasa LR. Se incubó a 25° C toda la noche, se agregó 1 µL de proteinasa K, se incubó por 10 min a 37° C y se

transformaron células competentes. Se usó ampicilina como marcador de selección.

Biobalística: La construcción de la proteína de fusión se introdujo en la gónada del *C. elegans* (también referidos aquí como "los gusanos") con la técnica de "*biobalística*", que consiste en bombardear a los gusanos con perlas microscópicas bañadas en el plásmido de interés.

Preparación de balas de oro: Se lavaron las perlas de oro (Biorad) con etanol al 70% y luego 3 veces con agua estéril. Se resuspendieron en glicerol estéril al 50%. Se tomó una alícuota de 100 µL y se precipitó el plásmido a usar agregando 10 μ g de DNA, 100 μ L de CaCl₂ 2.5 M, 40 μ L de espermidina fría. Se lavó 3 veces con etanol al 70%, finalmente se agregaron 96 µL de etanol al 100% para resuspender la pastilla. Se agregaron 500 µL de PVP (polivinilpirrolidona), se mezcló y se pasaron a un tubo de 15 mL y se llevaron a un volumen de 3 mL. Estos 3 mL se usaron para llenar 75 cm de tubo seco de 3 mm de diámetro usando una jeringa. El tubo cargado se montó en la estación de preparación del tubo. Se dejó que las perlas se asienten por 5 min. Se retiró el etanol a una velocidad de 0.5-1 pulgadas por seg. Se rotó 180° unos seg y después se hizo rotar el tubo por 30 seg. Se hizo fluir nitrógeno a una presión de 0.35-0.4 LPM por 5 min. Se sacó el tubo de la estación y se cortó en fragmentos de 1 cm. Se guardaron en viales de vidrio y se almacenaron a 4° C. Preparación de los gusanos: Para el bombardeo se usaron 60 cajas grandes con gusanos adultos jóvenes (4 días), crecidos en medio EP (200 mM NaCl, 20% bactotriptona, 25% agar, 5 mg colesterol, 1 mM sulfato de magnesio y 25 mM de fosfato de potasio), sembrado con bacterias NA22. Se colectaron los gusanos con medio M9 (22 mM de KH₂PO₄, 42 mM Na₂HPO₄, 86 mM de NaCl, 1 mM MgSO₄) y se lavaron 2 veces con M9. Se resuspendieron en 7 mL los gusanos de 30 cajas. Se colocaron 6 o 7 gotas de 140 µL c/u en cada caja nueva con alimento y se dejó secar.

Transformación: Los tubos se insertaron en cartuchos del sistema "Helios Gene Gun" de Biorad. Los disparos se hicieron a presiones de 500 psi (primera válvula) y 300 psi (segunda válvula). Se cargó la pistola con el cartucho que contiene el DNA. Se hizo un disparo en cada gota, a 2 cm de distancia. Los gusanos se dejaron crecer a 24°C y las cajas se revisaron una semana después. Después de varios días de recuperación, se buscaron gusanos capaces de moverse y con fluorescencia. Para ello, se utilizó un microscopio Zeiss StemiSV11 con epifluorescencia para determinar si alguno de los gusanos descendientes de los tratados heredó la construcción integrada en su genoma.

Extracción de RNA para la detección del mRNA de *cgh-1* a través de RT-PCR:

Se colocaron de 20-100 embriones de pez cebra en un tubo eppendorf y se agregaron 800 µL de Trizol a temperatura ambiente. Se homogeneizó extensivamente con un pistilo estéril desechable. Se agregaron 200 µL de cloroformo y vortexearon por 20 seg. Se dejó a temperatura ambiente por 3 min. Se centrifugó a 4° C por 15 min a 12000 x g. Se transfirieron la fase acuosa a un tubo nuevo. Para precipitar se agregaron 500 µL de isopropanol, se mezcló y se dejó a temperatura ambiente por 10 min. Se centrifugó a 4° C por 10 min a 12000 x g. Se retiró el sobrenadante. Se lavó con 1 mL de etanol al 75% con agua tratada con DEPC. Se centrifugó a 4°C por 5 min a 7500 x g. Se retiró el sobrenadante y se dejó secar. Para eliminar el DNA genómico se resuspendió la pastilla en 34 µL de agua tratada con DEPC, 6 µL de Buffer de transcripción 10X (Roche) precalentado a 37° C y 20 µL de DNAsa (Roche), se colocó a 37° C por una hora. Se agregaron 140 µL de agua DEPC y 200 µL de Fenol-Cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), se vortexeó 20 segundos y se dejó a temperatura ambiente por 3 min. Se centrifugó a 4° C por 15 minutos a 12000 x g. Se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo. Se precipitó con 500 µL de isopropanol, se mezcló y dejó a temperatura ambiente por 10 min. Se centrifugó a 4° C por 10 min a 12000 x g, se retiró el sobrenadante. Se lavó 2 veces con 1 mL de etanol al 75% con agua DEPC, se centrifugó a 4° C por 5 min a 7500 x g. Se dejó secar la pastilla al aire. Se resuspendió en 1 µL de agua tratada con DEPC por 14 embriones para RT-PCR.

Cuantificación: se calentó la muestra a 65° C por 10 min y se transfrió a hielo por 2 min. Se diluyeron 5 μ L en 1 mL de agua DEPC y se midió la absorbancia en una celda de cuarzo a 260 y 280 nm. La concentración se calculó con la siguiente fórmula: [RNA μ g/ μ L]=abs 260 X 40X dilución / 1000

RT-PCR para detectar al mRNA de *cgh-1* en diferentes estados de desarrollo de pez cebra:

A partir de RNA extraído con el protocolo anterior se sintetizó cDNA y después se hizo una amplificación por PCR.

Para sintetizar cDNA, se mezcló en un tubo:

Hasta 5 µg de RNA	
Oligo dT 10 mM	1 μL
Mezcla de dNTPs 10 mM	1µL
Agua DEPC	para completar 10 µL

Se incubó a 65° C por 5 min y se transfirió a hielo por 1 min. Y después se agregó la siguiente mezcla de síntesis de cDNA:

Buffer RT 10X	2μL	
MgCl ₂ 25 mM		4 µL
DTT 0.1 M	2 µL	
RNaseOUT (40 U/µL)	1μL	

Transcriptasa reversa SuperScript III (200 U/µL)1 µL

Se incubó a 50° C por 50 min. Se terminó la reacción a 85° C por 5 min, después se enfrió en hielo y se centrifugó brevemente, posteriormente se añadió 1 µL de RNasa H e incubó por 20 min a 37° C. Después se hizo el PCR con oligonucleótidos específicos para el gen de interés.

Transcripción *in vitro* para generar la sonda para detectar a *cgh-1* a través de hibridación *in situ*:

Para realizar la transcripción *in vitro* se realiza un PCR con oligonucleótidos diseñados sobre el vector pBluescript, en donde se clonaron las secuencias de interés.

 Tabla 2: Oligonucleótidos diseñados sobre el plásmido pBuescript II para realizar las transcripciones *in vitro*.

oligo	Secuencia
emo1	ACAGCTATGACCATGATTACG
emo2	ACGTTGTAAAACGACGGCCAG
emo4	TATAGGGCGAATTGGAGCTC
emo5	AGGGAACAAAAGCTGGAGCT
emo6	TATAGGGCGAATTGGGTACC

- Mezcla de reacción (Roche)			
Buffer de transcripción 10X	2	μL	
Producto de PCR	750	ng	
NTPs-Digoxigenina 10 mM		2	μL
Inhibidor de RNAsas (40 U/ μL)	1	μL	
Polimerasa T3 o T7 (20 U/µL total)	1	μL	
Agua MiliQ DEPC	para	20 µL 1	final

Se incubó a 37° C por 3 horas, después se agregaron 15 μ L de DNAsa (Ambion 2 U/ μ L libre de RNAsas). Se incubó por 30 min a 37° C, se agregaron 2 μ L de EDTA 200 mM en agua tratada con DEPC pH 8 para detener la reacción. Se incubó 5 min a temperatura ambiente, después 10 min a 65° C y se transfirió a hielo por 10 min. Se agregaron 38 μ L de agua MiliQ estéril para dar un total de 75 μ L.

Se purificó con columnas pequeñas para microcentrífuga: se quitó la tapa de arriba y luego la de abajo, se dejó salir el buffer por gravedad, se centrifugó dentro de tubos eppendorf de 2 mL a 1100 x g un min. Se colocaron los 75 μ L de la reacción y se eluyeron a 1100 x g por 4 min. Se midió el volumen eluido y se apartaron 10 μ L para analizar el producto mediante gel de agarosa. Se precipitó agregando 0.1 volúmenes de acetato de amonio 3M pH 5.2 y 2.5 volúmenes de etanol 100%. Se incubó a -70° C por 30 min. Se centrifugó a velocidad máxima a 4° C por 30 min. Se decantó el sobrenadante y se lavó con 1 mL de etanol al 70% DEPC. Se centrifugó a 4° C por 5 min a 7500 x g. Se removió el sobrenadante y se dejó secar por 5 min, se resuspendió en 80 μ L de solución de hibridación HYB+ (formamida al 50%, SSC 5X, Tween-20 al 0.1%, RNA de levadura 500 μ g/mL, heparina 50 μ g/ mL) y se guardó a -70° C.

Las sondas obtenidas se	muestran a	continuación:
-------------------------	------------	---------------

Gen	oligonucleótidos	Polimerasa	Concentración	Kb
			Aprox sonda	
cgh	emo 1 y emo6	Т3	35 ng/µL	1
dnd	emo1 y emo4	Т3	17.5 ng/µL	0.6
MyoD	emo2 y emo5	Τ7	10 ng/µL	1.7

Dot Blot para determinar la cantidad de sonda a usar para las hibridaciones *in situ:*

Este ensayo se realizó sin hibridar la sonda con el mRNA, se realizó para estandarizar la cantidad de sonda que se requiere para obtener color al revelar con los reactivos NBT y BCPI.

Se prepara la mezcla de reacción en dos diluciones:

1:5	sonda	2 µL	1:50	mezcla 1:5	1 µL
	5X SSC	8 µL		agua MiliQ DEPC	9 µL

Se cortaron 2 fragmentos de membrana de nitrocelulosa "Hybond" de 1 X 3 cm. Se colocaron 3 gotas de cada dilución a cada membrana: una de 1 μ L, otra de 3 μ L y la tercera de 5 μ L. Se incubaron a 70° C por 45 min. Se lavaron con 2X SSC (de SSC 20X: NaCl 3M, citrato de sodio 0.3M pH 7) por 5 min en agitación. Se lavaron 2 veces con PBST (PBS con Tween al 0.1%) por 5 min en agitación. Se bloquearon con solución bloqueadora (Blocking reagent Roche al 2% en 100 mM de ácido maléico, 150 mM NaCl, 0.1% Tween pH 7.5) en agitación por 30 min a temperatura ambiente. Se agregó el anticuerpo anti digoxigenina 1:2000 en solución bloqueadora y se incubó por 30 min a temperatura ambiente. Se lavaron 3 veces con PBST por 10 min cada lavado en agitación. Se lavaron con solución de coloración (100 mM Tris pH 9.5, 50 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 0.1% Tween-20, 1 mM levamisol) por 5 min. Se agregó 1 μ L de NBT (75 mg/mL en 70% dimetilformamida) y 2 de BCIP (50 mg/mL en dimetilformamida) por cada mL de solución de coloración y se incubó en agitación hasta que de la reacción dió color. Se lavó con PBST 2 veces.

Hibridación in situ

Se colectaron embriones de pez cebra y se fijaron por 4 horas a temperatura ambiente y agitación suave en paraformaldehído al 4% en PBS pH 7.4 recién preparado. Se pueden guardar deshidratados en metanol a -20° C, haciendo 2 cambios de metanol al 50% por 10 min y 2 de metanol 100% en agitación. Antes de usarlos, se rehidrataron con 2 cambios de metanol 50% en agitación y 2 cambios en metanol al 30% en PBS. Se eliminó la capa protectora o corion y lavaron 3 veces con PBST, se volvieron a fijar con paraformaldehído al 4% por

20 min, se lavaron 2 veces con PBST. Se permeabilizaron con proteinasa K (10 μ g/mL) en agitación el tiempo indicado en minutos:

Embriones de menos de 5 somitas	1 min
Embriones de 6-10 somitas	3 min
Embriones de 11-22 somitas	5 min
Embriones de 24-32 hpf	10 min
Embriones de 33 a 48 hpf	20 min

Se lavaron con mucho cuidado con PBST 3 veces. Se volvieron a fijar con paraformaldehído al 4% en PBST por 30 min en agitación y temperatura ambiente. Se lavaron con PBST 5 veces. Se cambió por HYB- (formamida 50%, SSC 5X, Tween-20 0.1%) 3 veces. Se colocaron a 65° C por 5 min. Se cambió por HYB+ (formamida al 50%, SSC 5X, Tween-20 al 0.1%, RNA de levadura 500 μ g/mL, heparina 50 μ g/ mL) calentado a 65° C 2 veces. Colocar a 65° C por 2 horas. Se agregó de 1:200 a 1:66 de la sonda a hibridar (de 0.2-1 μ g/mL de RNA), e incubó 12 horas a 65° C en tubos de 500 μ L bajo las siguientes condiciones:

Gen Concentración de la sonda		Tiempo de
revelado		
1. <i>cgh-1</i>	1.7 μL de sonda, 0.0595 ng/μL	1:30 hrs
2. dnd	5 μL de sonda, 0.35 ng/μL	-
3. <i>MyoD</i>	1.5 μL de sonda, 0.03 ng/μL	30 minutos
4. Control -	0	-

Se retiró la sonda y se lavaron en agitación como sigue:

1.5 mL HYB- y 500 µL de 2X SSCT	15 min, 65° C
1 mL HYB- y 1 mL de 2X SSCT	15 min, 65° C
500 µL HYB- y 1.5 de 2X SSCT	15 min, 65° C
2 mL de 2X SSCT	15 min, 70° C
2 mL de 0.2X SSCT	30 min, 70° C
2 mL de 0.2X SSCT	30 min, 70° C

Se dejó a temperatura ambiente por 15 min. Se lavó con 1.33 mL de 0.2X SSCT y 670 μ L de 1X PBST 15 min a temperatura ambiente. Después se lavó con 670 μ L de 0.2X SSCT y 1.33 mL de 1X PBST 15 min a temperatura

ambiente. Se cambió la solución anterior por 2 mL de PBST 3 veces y se lavó por 15 min.

Para bloquear, se cambió la solución con solución bloqueadora 2 veces y se dejó incubar por 4 horas en agitación a temperatura ambiente. Se intercambió con solución con anticuerpo antidigoxigenina (1:4000), se incubó toda la noche a 4° C. Se lavaron con PBST 3 veces a temperatura ambiente. Se hicieron 3 lavados de 15 min.

Para el revelado, se intercambió por solución precolorante con tetramizol y se lavaron 3 veces durante 5 min. Se cambió la solución de precoloración y se agregó tetramizol 1 mM, NBT (75 mg/mL en 70% dimetilformamida) y BCIP (50 mg/mL en dimetilformamida). Se transfirieron los embriones a placas excavadas sobre un agitador orbital cubierto con papel aluminio. Se monitorearon cada 5 min. Se detuvo la reacción con PBST. Se aclararon los embriones con glicerol 50% - 80% y se fotografiaron.

Extracción de proteínas de embriones completos de peces:

Probamos 3 protocolos de extracción de proteínas:

- a) Se enjuagaron los embriones con solución Hank al 10%, se retiró la sol de Hank y se añadió 1 µL de buffer SDS (63 mM Tris-HCl pH 6.8, 10% glicerol, 5% ß-mercaptoethanol, 3.5% SDS) por pez. Se trituraron los embriones con un pistilo estéril de plástico hasta homogenizarlos. Después se sumergieron el tubo en agua hirviendo por 1 min, se centrifugaron por 5 min en una microfuga a velocidad máxima. Se recuperó el sobrenadante.
- b) Se enjuagaron los embriones con solución de Ringer con EDTA y PMSF, se removieron los vitelos. Se transfirieron los peces en solución de Ringer fresco y se enjuagaron 2 veces, se retiró la solución de Ringer y se añadieron 2 µL de buffer SDS por pez. Se homogenizaron con pistilo estéril. Se sumergió el tubo en agua hirviendo por 5 min y se centrifugaron 2 min a velocidad máxima para luego recuperar el sobrenadante
- c) Se homogenizaron lo embriones con un pistilo en solución de lisis que contiene: 250 mM sacarosa, 100 mM NaCl, 2.5 mM MgCl₂, 10 mM EGTA, 20 mM HEPES, 1% Triton X-100, 10 mM NaF,1 mM Na₃VO₄, 10

mg/ml leupeptina, 1 mg/ml aprotinina, 1 mg/ml pepstatina A,1 mg/ml antipaina, 20 mg/ml fluoruro de fenilmetilsulfonil. Se centrifugó 5 min y se recuperó el sobrenadante.

Para el "*Western Blot*" se usaron 50 µg de proteína en 10 µL de volumen, se agregaron 2 µL de buffer de carga 6X y 1/5 de volumen de DTT. Se calentaron las muestras a 95° C por 5 min y se enfriaron en hielo.

SDS-PAGE y "Western Blot"

Para hacer el gel de poliacrilamida se mezclan por separado:

	Gel separador	Gel Concentrador
- Buffer separador (Tris 3M, 1%	0	
SDS, HCI 0.5M pH 8.9)	625 µL	
- Buffer concentrador (Tris 0.5M	Л)	250 μL
- 30% Archilamida-Bis (29:1)	1650 μL	200 µL
- SDS 10%	50 µL	20 µL
- Agua desionizada	2620 µL	1508 μL
- PersµLfato de amonio 10%	50 µL	20 µL
- TEMED	5 µL	2 µL
Volumen final	5 mL	2 mL

El gel se corrió en un buffer de electroforesis (Glicina 200 mM, Tris 25 mM, SDS al 0.1%) a 0.02 amperes por 40 min.

Después se transfirieron las proteínas a una membrana de nitrocelulosa previamente sumergida en metanol. Se montó la transferencia en el siguiente orden:

Polo -Esponja Filtro Gel Membrana Filtro Esponja Polo + Se usó el Buffer de transferencia (25 mM Tris, 192 mM glicina, metanol 20 % pH 8.3) y se realizó la transferencia a 0.5 amperes en cuarto frío por 2 horas.

Posteriormente se hizo la inmunodetección, para lo cual, se bloqueó la membrana en TBS 1X (Tween 0.1%) con 5% leche por 1 hora. Se agregó el anticuerpo primario y se incubó a 4° C toda la noche en agitación. Se lavó 5 veces (5 min c/u) con TBS 1X Tween 0.1% a 4° C. Se agregó el anticuerpo secundario 1:1000, se incubó 1 hora a 4° C. Se lavó 3 veces (5 min c/u) con TBS tween. Ultimo lavado con TBS por 10 min. Para revelar en cuarto oscuro: Se usó el kit "SuperSignal West Dura" de Pierce. Se incubó la membrana en solución de luminol (Buffer y sol peroxidasa 1:1) por 5 min a temperatura ambiente. Se enjuagó en TBS y se montó la membrana en plástico adherente. Se colocó dentro del cassette y se expuso a una película fotográfica. Se reveló la película con solución reveladora y luego en solución fijadora. Se enjuagó con agua y se dejó secar.

RESULTADOS:

Identificación del gen cgh-1 en las bases de datos:

La clonación del gen cgh-1 en pez cebra se hizo utilizando la secuencia del gen cgh-1 de C. elegans (NP_498646). Se realizaron búsquedas con el algoritmo BLAST que identificaron las secuencias en pez cebra con número de acceso XM_679831 y XP_707715.1 de 1754 bp y 1625 bp respectivamente, en el cromosoma 16 con una alta homología con cgh-1 de otros organismos (Figura 6b). Estas secuencias aparecieron por primera vez depositada en el "Genbank" a finales de Junio del 2005. Por medio de una alineación de secuencias se identificaron los 9 dominios conservados de cgh-1. Se identificaron las cajas características de las helicasas DEAD, que son: Motivo Q, I: AxxGxGKT que une ATP; Ia: PTRELA que une al RNA sustrato; Ib: TPGR también une a RNA sustrato; II: DEAD une ATP; III: SAT coordina la actividad de la hidrólisis de ATP con la de helicasa; IV: LiF que se une al sustrato, V: ARGID une al sustrato; y VI: HRxGRxGR une ATP. Además se identificó una secuencia de localización nuclear cerca del amino terminal, seguido de una señal de exportación del núcleo y una secuencia de fosforilación cerca del carboxilo terminal. (Figuras 4 y 5).

Por medio de búsquedas por homología (BLAST) en las diferentes bases de datos y alineamientos múltiples (CLUSTALW) nos aseguramos que XM_679831 es la secuencia más similar a *cgh-1* en el genoma de pez cebra.

Buscando la secuencia genómica y el locus, observamos que estas secuencias están en la misma posición, es decir que se trata del mismo gen, probablemente la segunda secuencia es producto de un "*splicing*" alternativo de RNA. Posteriormente, se realizó una segunda búsqueda de homólogos de *cgh-1* y se encontró una secuencia que posiblemente corresponde a otro gen *cgh* en pez cebra en el cromosoma 18 al que nombramos *cgh-2*, con número de acceso XP_001340860. Se hizo un análisis filogenético usando las 2 secuencias reportadas como posibles homólogos de *cgh-1* en pez cebra y los de *C. elegans, C. intestinales, T. rubipens, D. melanogaster, X. laevis, y* humano; usando como grupo externo al factor de inicio de la traducción elF4A y se encontró que las proteínas reflejan las relaciones filogenéticos que existen entre los organismos sometidos al análisis, ya que las secuencias de pez cebra

caen en el grupo de los peces; lo que significa que las secuencias de pez cebra son homólogos de *cgh-1* (Figuras 4 y 6). Para el trabajo subsiguiente nos basamos en la secuencia de *cgh-1* de pez cebra. En la figura 6b se puede ver que la similitud de *cgh-1* de pez cebra y otros organismos es muy alta, en todos los casos, superior al 60%, reafirmando que sea el homólogo.

Posteriormente, tomamos la secuencia de *cgh-1* de pez cebra y la comparamos con otras helicasas del mismo pez para buscar secuencias distintivas que nos permitan distinguir a *cgh-1* de otras helicasas DEAD Box (figura 5). Encontramos a los factores de inicio de la traducción eIF4A y eIF4B, que son proteínas DEAD box. Encontramos otras dos proteínas muy parecidas, que no se han descrito todavía, nombradas "polipéptido DEAD 48" y "transcrito 1 asociado a HLA-B". Estas cuatro secuencias fueron comparadas con *cgh-1* de pez cebra y se encontró que la región 5' es la más variable.

D.r. EIF4A C.e. cgh1 D.m. me31B D.r. cgh2 X.I. Xp54 D.r. cgh1 Human-RCK	MSSEHEDRPRD <mark>NG</mark> P MSGAEQQQIVPA <mark>NNG</mark> D MATARTELIPASVMPVT <mark>KQNGQ</mark> AKPMSLQTGSFSSTPSGKTPVMPQKGSSIPQSGG MSTARTENPVLMGMSS-QNGQLRGPLKRSAGPCGGGG-TQTQQIN-QLKNASTINSGSQQQ MSTARTENPVLLGLSN-QNGQLRGPVKPAGGPCGGGGCSQTTQPAQVKASSTVNNGYSQP MSTARTENPV
D.r. EIF4A C.e. cgh1 D.m. me31B D.r. cgh2 X.I. Xp54 D.r. cgh1 Human-RCK	FDDM NUR EALURGTYAYQFEK FDDM NUR EALURGTYAYQFEK
D.r. EIF4A	PSAIDQRATLPCIKGYDVIAQAQSGTGKTATFATSILQQIDVELKATQAMVLAPTRELAD
C.e. cgh1	PSPIQEASIGVALTGQDILARAKNGTGKTGAYCIPVIEKIQPALKATQAMVIVPTRELAL
D.m. me31B	PSPIQEASIPTALSGCDVLARAKNGTGKTGAYCIPVIEQIDPTKDYLQALVMVVPTRELAL
D.r. cgh2	PSPIQEESIPIALSGRDILARAKNGTGKSGAYLIPLLERIDLKKDYLQALVMVVPTRELAL
X.I. Xp54	PSPIQEESIPIALSGRDILARAKNGTGKSGAYLIPLLERIDLKKDYLQALVMVVPTRELAL
D.r. cgh1	PSPIQEESIPIALSGRDILARAKNGTGKSGAYLIPLLERIDLKKDSIQAVVVPTRELAL
Human-RCK	PSPIQEESIPIALSGRDILARAKNGTGKSGAYLIPLLERIDLKKDSIQAVVVPTRELAL
D.r. EIF4A	NES
C.e. cgh1	QIQKVVLALGDYMGATCHACIGGTNVRNDVQKLQADVPHIVVGTPGRVFDMLNRRYLS
D.m. me31B	QTSQIQVELSKHIQLKVMVTTGGTDLRDDINRLNGTVHUVTATPGRILDLMEKGVAK
D.r. cgh2	QTSQIQTELAKHLDIRVMVTTGGTLKDDIRLNDTVHUVTATPGRILDLMDKKVAD
X.I. Xp54	QVSQISINMSKHL-GGIKVMATTGGTNLRDDINRLDEIV-HVIATPGRILDLIKKGVAK
D.r. cgh1	QVSQICIQVSKHM-GGVKVMATTGGTNLRDDINRLDDTV-HVVIATPGRILDLIKKGVAK
Human-RCK	QVSQICIQVSKHM-GGAKVMATTGGTNLRDDINRLDDTV-HVVIATPGRILDLIKKGVAK
D.r. EIF4A	PKYIKMEA <mark>LDEADE</mark> MLSRGEKDQIYETEQKILATDTQVILL <mark>SATY</mark> PQEVILEVTTKEMRDPV
C.e. cgh1	MEHCKTIVLDEADKLLSQDEQGILDRITNFLPKERQVMLYSATEPNTVTSEMQKHMHKPY
D.m. me31B	MSHCRILVLDEADKLLSQDEQGILDRITNFLPKERQVMLYSATEPTVKNEMEKHTREPY
D.r. cgh2	VDKVQMAVMDEADKLLSQDEVVLTEDTISELPKKRQILLYSATEPTSVQKEMTKHLQKPY
X.I. Xp54	VDHTQMIVLDEADKLLSQDEVVLTEDTISELPKKRQILLYSATEPTSVQKEMTKHLQKPY
D.r. cgh1	VGQVQMIVLDEADKLLSQDEVQTMEDTITTLPKNRQILLYSATEPLSVQKEMTSHLQKPY
Human-RCK	VDHYQMIVLDEADKLLSQDEVQTMEDTTLTLPKNRQILLYSATEPLSVQKEMTSHLQKPY
D.r. EIF4A	RIIL VIKKEELTLIEGIRQEMIN WEKEEWIKLDTUCDUYETUTITOAVITEIMTRRKMDWUTEKM
C.e. cgh1	EINL-WEELTLLGVTQYYAFWQ-EKQKVHCLNTLFRKLQINQSTIFENSTQRVELLAKKI
D.m. me31B	EINL-MEELTLKGVTQYYAFWQ-ERQKVHCLNTLFSKLQINQSIIFENSTQRVELLAKKI
D.r. cgh2	EINL-MDELTLKGUTQYYAYVT-ERQKVHCLNTLFSRLQINQSIIFENSSQRVELLAKKI
X.I. Xp54	EINL-MEELTLKGVTQYYAYVT-ERQKVHCLNTLFSRLQINQSIIFENSSQRVELLAKKI
D.r. cgh1	EINL-MEELTLKGVTQYYAYVT-ERQKVHCLNTLFSRLQINQSIIFENSSQRVELLAKKI
Human-RCK	EINL-MEELTLKGVTQYYAYVT-ERQKVHCLNTLFSRLQINQSIIFENSSQRVELLAKKI
D.r. EIF4A	HARDFTVSALHGDMEQKERDVIMKEFRSGSSRVLITTDLLARGIDVQQVSLVINYDLPTN
C.e. cgh1	TEIGYSCYYTHSKMAQNHRNRVFHDFRQGNCRNLVCSDLLTRGIDEQAVNVVINFDFPRN
D.m. me31B	TELGYCYYTHAKMAQAHRNRVFHDFRQGLCRNLVCSDLFTRGIDEQAVNVVINFDFPRM
D.r. cgh2	TQLGYSCFYIHAKMAQEYRNRVFHDFRNGLCRNLVCTDLFTRGIDEQAVNVVINFDFPKN
X.I. Xp54	SQLGYSCFYIHAKMAQEHRNRVFHDFRNGLCRNLVCTDLFTRGIDEQAVNVVINFDFPKL
D.r. cgh1	SQLGYSCFYIHAKMAQEHRNRVFHDFRNGLCRNLVCTDLFTRGIDEQAVNVVINFDFPKL
Human-RCK	SQLGYSCFYIHAKMAQEHRNRVFHDFRNGLCRNLVCTDLFTRGIDEQAVNVVINFDFPKL
D.r. EIF4A C.e. cgh1 D.m. me31B D.r. cgh2 X.I. Xp54 D.r. cgh1 Human-RCK	RENYIHRIGRGGRFGRKGVAINMITEDDKRTURDIETFYNTTVEEMPMNVADLI AETYLHRIGRSGRFGHLGVAINLITYEDRHTURRIEQEURTRIEPIPKTVDPKUYVA AETYLHRIGRSGRFGHLGIAINLITYEDRHTURRIEKELGTEIKPIPKVTDPALYVANVG AETYLHRIGRSGRYGHLGLAINLITYEDRFNLKGIEDQLWTDIKPIPSSIDKSLYVA GETYLHRIGRSGRFGHLGLAINLITYDDRFNLKSIEEQLGTEIKPIPSSIDKSLYVA GETYLHRIGRSGRFGHLGLAINLITYDDRFNLKSIEEQLGTEIKPIPSSIDKSLYVA AETYLHRIGRSGRFGHLGLAINLITYDDRFNLKSIEEQLGTEIKPIPSSIDKSLYVA FOSFORIACIÓN

Figura 4: Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de los ortólogos de Cgh-1 de C. elegans (Cgh-1), D.melanogaster Х. (Me31B) laevis (Xp54), Н. sapiens (RCK), У las dos secuencias de pez cebra (D. r. cgh1 y D. r. cgh2), además del factor de inicio de la traducción eIF4A de Se Danio rerio. observa la alta similitud todas entre ellas, sobretodo el las regiones centrales. Los recuadros delimitan

los dominios característicos de las helicasas DEAD box: en naranja el dominio Q, en morado el motivo I, en verde el motivo la, en rosa el motivo lb, en rojo el motivo II, en amarillo el motivo III, en azul cielo el motivo IV, en lila el motivo V y en azul rey el motivo VI. Figura hecha por el Dr. Ernesto Maldonado con el programa McVector.

HLA b Dead48 zcgh1 eIF4A 1B elF4A 1A HLAD GHSDGIISIRKEG DEAD48 MTKIEFETSEEV 20001 TQPA QVKSSTVNNGNSQPVPTANTIIKPGDDWKKNLKI e4F4A18 MEPDGVIESNWK e4F4A14 MEPDGVIESNWK NPDGVIS NGNSQPVPTANTIIKPGDDWKKNLKI M PDGVIS NGNSQPVPTANTIIKPGDDWKKNLKI M PDGVIS NGNSQPVPTANTIIKPGDDWKKNLKI N G N S Q P V P T A N T I I K P G D D W K K N L K L DEAD48 PPP zcah1 eF4A 1B K elF4A 1A

 SEVQHECTIPQALICG
 MDVLCQAKSGMGK
 TAVFVLATLQQL

 SAIQQRAIKQ
 RAIG
 RDVIAQSQSGTGK
 TATFCVLATLQQL

 SAIQQRAIKQ
 RAIQQRAIL
 FVLAL
 C
 RDVIAQSQSGTGK
 TATFCVLATLQQL

 SAIQQRAIL
 FVLAL
 FVLAL
 C
 RDVIAQSQSGTGK
 TATFAISILQQL

 SAIQQRAIL
 FVLAL
 FVLQQL
 C
 R
 R
 FVLQCL

 SAIQQRAIL
 FVLQQRAI
 FVLAL
 FVLQQL
 C
 R
 FVLQQL

 SAIQQRAIL
 FVLQQRAIL
 FVLQQL
 FVLQQL
 FVLQQL
 FVLQQL
 FVLQQL

 HLA b DEAD48 zonh1 D elF4A 1B eF4A 1A D

 PVTGQVXVLVMCHTRELAF

 QVRETQALILAPTRELAF

 QVRETQALILAPTRELAF

 QVRETQALILAPTRELAF

 QVSQICIQVSKHMGGV

 KKDSIQAVVIVPTRELAF

 QVSQICIQVSKHMGGV

 VELKATQAMVLAPTRELA

 QVRETQALVLAPTRELAF

 QVSQICIQVSKHMGV

 VELKATQAMVLAPTRELAF

 QIQKVVLALGDYMG

 QIQKVVLALGDYMG

 VELKATQAMVLAPTRELA

 QIQKVVLALGDYMG

 VELKATQAMVLAPTRELA

 QIQKVVLALGDYMG

 VCHA

 HLAD DEAD48 zcgh1 eIF4A 1B VIELKATQAMVLAPTRELAGQIQKVVLALGDYMG TQALVLAPTRELAGQIQKVVLALGDYMG eF4A 1A HLAD FGGLSIKKDEEVLKKESPHVVVGTPGRTLALSRNKSLM DEAD48 IGGTNVGEDIRKLDYG-QHVVVGTPGRVFDMIRRRSLR 25gh1 TGGTNLRDDINMRLDET-VHVVIATPGRILDLIKKGVAK eF4A18 IGGTNVRNEVQKLQAEAPHIVVGTPGRVYDMLNRKFLS eF4A14 IGGTNVRNDVQKLQADVPHIVVGTPGRVFDMLNRRYLS S D. 1 GGTNYR KL PHVVVGTPGR D

 H
 H
 F
 I
 L
 D
 E
 C
 D
 M
 R
 D
 Q
 V
 Q
 F
 R
 M
 T
 P
 H
 E
 Q
 V
 Q
 F
 R
 M
 T
 P
 H
 E
 Q
 V
 Q
 F
 R
 M
 T
 P
 H
 K
 Q
 V
 Q
 F
 R
 M
 T
 P
 H
 K
 Q
 V
 Q
 F
 Q
 Q
 R
 Y
 L
 P
 A
 T
 Q
 V
 C
 L
 Q
 V
 Q
 I
 L
 L
 S
 L
 S
 L
 S
 L
 L
 L
 L
 L
 L
 L
 L
 L
 L
 L
 L
 L
 L
 L
 L
 L
 L
 L
 L
 L
 L
 L
 L
 L
 L
 L
 L
 L
 L
 L
 L
 L
 L
 L
 L
 L
 L
 L
 L
 HLA b Dead48 zcoh1 elF4A 1B eF4A 1A

 A
 T
 L
 S
 K
 E
 I
 R
 P
 C
 R
 K
 F
 M
 O
 D
 P
 E
 I
 F
 V
 L
 T
 L
 F
 H
 L
 E
 L
 T
 N
 K
 F
 M
 D
 P
 I
 I
 L
 V
 K
 T
 R
 I
 L
 V
 K
 T
 R
 I
 L
 V
 K
 T
 R
 I
 L
 V
 K
 F
 D
 L
 T
 L
 T
 K
 F
 M
 I
 L
 V
 K
 F
 M
 I
 L
 V
 K
 F
 M
 R
 D
 P
 M
 I
 L
 V
 K
 I
 L
 V
 K
 I
 L
 K
 K
 I
 L
 K
 K
 I
 R
 R
 I
 L
 V
 K
 K
 I
 L
 K
 I
 L
 K
 I
 L
 K
 L
 L
 HLAD DEAD48 zcgh1 eIF4A 1B elF4A 1A
 LK
 - DN
 EK
 N
 R
 K
 F
 D
 L
 D
 V
 E
 F
 V
 V
 V
 F
 V
 K
 V
 Q
 R
 C
 I
 A
 Q

 V
 E
 R
 E
 L
 D
 L
 D
 T
 I
 T
 Q
 N
 I
 F
 C
 I
 A
 Q
 V
 I
 F
 V
 Q
 R
 C
 I
 A
 Q
 V
 I
 F
 V
 Q
 D
 I
 I
 I
 D
 I
 I
 D
 I
 I
 D
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I</t HLA b Dead48 zcgh1 eIF4A 1B eF4A 1A VE KEEWKL VDWL 0 KEEWK, DTLCDL . T LTIT ĸ D HAAD VE Q N F PAIAIH RAM P Q DE R LARYQQF K D F Q R R I L VAT N L DEAD48 REAN F T V S S M H G D M P Q KE R E S I M K E F R S G A S R V L I S T D V zrght S Q L G Y S C F Y I H A K M R Q E H R N R V F H D F R N G L C R N L V C T D L eF4A1B H A R D F T V S A L H G D M D Q K D R D L I M R E F R S G S S R V L I T T D L eF4A1A H A R D F T V S A L H G D M D Q K E R D V I M KE F R S G S S R V L I T T D L FTVSA. HGDM QKER..IM.EFRSG SRVLL, TDL GRGMDIERVNIAFNYDMPEDSDT HLA b Dead48 RAGRE GTKG A R G L D V S Q V S L V I N Y D L P N R E L TR G I D I Q A V N V I N F D F P K L G E T A R G I D V Q Q V S L V I N Y D L P T N R E N A R G I D V Q Q V S L V I N Y D L P T N R E N Y I H R I G R S G R F G R K G V Y L H R I G R S G R F G H L G L Y I H R I G R G G R F G R K G V AAA zcgh1 eIF4A 1B YIHRIGRGGRFGRKG eF4A 1A A VSLVINYDLP HRIGR GRFGRKG GIDY Q Q NRE HLAD Dead48 zcgh1 eIF4A 1B eF4A 1A HLAD DEAD48

alineamiento de Cgh-1 de pez cebra con las helicasas DEAD box más cercanas. Se observa una alta similitud también, pero las regiones amino y carboxilo terminal son suficientemente distintas como para diferenciarlas. Los recuadros delimitan dominios los característicos de las helicasas DEAD box: en naranja el dominio Q. en morado el motivo I, en verde el motivo la, en rosa el motivo lb, en rojo el motivo 11. en amarillo el motivo III, en azul cielo el motivo IV, en lila el motivo V y en azul

rey el motivo VI.

Figura

5:



a)

Organismo aa		no aa	Organismo aa	a simili	similitud %	
	D. rerio D. rerio D. rerio D. rerio D. rerio D. rerio D. rerio	484 484 484 484 484 484 484	C.elegans D melanogaster H. sapiens M. musculus X. laevis S. solidissima	430 459 472 483 481 449	67 64 89 89 88 69	

Figura 6: Análisis filogenético de los homólogos de Cgh y de elF4A como grupo externo.

a) para el árbol filogenético se usó un alineamiento múltiple generado por el programa ClustalW y el método "Neighbor Joining". El árbol se probó con "Bootstraping" con 1000 iteraciones. Los números en los nodos representan el porcentaje de confianza. Realizado por el Dr. Ernesto Maldonado.

b) Tabla que muestra los porcentajes de similitud de la secuencia de aminoácidos entre la secuencia de cgh-1 de pez cebra comparado con cada uno de los homólogos en otros organismos.

Clonación del gen cgh-1 de pez cebra:

Se realizó el PCR con el programa 1 y los oligonucleótidos cv2 cv6 usando cDNA de embriones de 3 días y se obtuvo la banda esperada de 1.7 kb que corresponde a la secuencia codificadora y parte de las secuencias no codificantes a ambos lados (figura 7, gel izquierdo). Esta secuencia se clonó en el vector TOPO de Invitrogen, se nombró a esta construcción pCV1. Se verificó el inserto por PCR (Figura 7, gel derecho) y se verificó por secuencia en la unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.



Figura 7: pCV1: Clonación del gen *cgh-1* de pez cebra en el plásmido pCV1. En el gel de la izquierda, el carril 1 corresponde al PCR de *cgh-1* que muestra una banda de 1713 bp. El carril 2 corresponde a Actina de 400 bp. En el gel de la derecha, los carriles 1 al 6 son PCR de diferentes clonas en donde vemos el inserto de 1713 bp, excepto en el carril 2, esta clona no se utilizó.

Se hizo una búsqueda de secuencias de nucleótidos similares al homólogo de *cgh-1* en el genoma de pez cebra y se hizo un alineamiento para buscar regiones variables entre *cgh-6* y otras helicasas tipo DEAD que nos permitan diseñar una sonda específica para *cgh-1* y se determinó que la región del extremo 5' es adecuada (Figura 5).

A partir de la construcción pCV1 del gen completo, se subclonó el fragmento de 909 bases de la región 5', que es la más variable entre las helicasas de RNA de pez cebra. Para ello se usaron las enzimas de restricción

Not 1 del plásmido TOPO (pCV1) y *Sac1* del gen *cgh-1* que corta en la base 944 y se liberó el fragmento de 909 bases, se insertó en pBluescript digerido con las mismas enzimas generando el plásmido pCV4 (Figura 8). Esta construcción se mandó secuenciar y por medio de un BLAST en la base de datos del NCBI se confirmó su identidad.



Figura 8: pCV4 Clonación del fragmento 5' de 909 bp de cgh de pez cebra en pBluescript para hibridación *in situ*. MW: marcador de peso molecular, 1 y 2 clonas de pCV4 en donde se observa la banda de 909 pb producto de digestión con las enzimas de restricción *Not1 y Sac1*.

Sonda control (Dead end)

Se ha reportado que la expresión del gen Dead end es exclusivo de línea germinal en pez cebra, por lo que se usará como control para marcar células germinales. La digestión con *HinclI* del plásmido IRBO ID 7412116 comprado a Open Biosystems, libera 3 fragmentos de este gen y de ellos se subclonó el fragmento central de 447 bases en pBluescript y se mandó secuenciar, con lo que verificamos que corresponde a *dnd* (Figura 9).



Figura 9: **pCV10**: clonación de un fragmento de 450 bp de Dead end (flecha) como control para hibridaciones in situ. MW: Marcador de peso molecular. Carriles 1-5 son clonas de pCV10.

Expresión del mRNA de cgh-1 durante el desarrollo de pez cebra

de agarosa al 1% (figura 10). cv15 que dan un producto de 524 pb. Ambos productos se corrieron en un gel gen de expresión constitutiva (actina). Para cgh-1 se usaron los oligos cv6 y con los oligos Actin F1 y Actin R1 que amplifican un fragmento de 400 pb de un corresponda al RNA y no a la secuncia genómica. realizó un control sin transcriptasa para corroborar que el producto amplificado fertilización), 2, 3 y 5 dpf (días post-fertilización) y de adulto completo. embriones de 32 células, escudo, 3 somitas, 14 somitas, 24 hpf (horas posttécnica de RT-PCR, para lo cual se extrajo RNA de ovocitos sin fertilizar y de Se determinó la expresión temporal del RNA mensajero de cgh-1 mediante la Se realizó el PCR control Se

gel puede corresponder a cgh-1, cgh-2 o ambos (Figura 10). distinguir la expresión de uno u otro gen, por lo que la banda observada en el organismos adultos. etapas del desarrollo, incluso en baja cantidad en ovocitos sin fertilizar y en Este experimento nos muestra que el gen se expresa durante todas . Sin embargo, los oligonucleótidos usados no nos permiten las



400 pb para cada etapa del desarrollo probada etapa de desarrollo probada y en el gel de la derecha se observa la banda control de actina de control de carga. En el gel de Figura 10: RT-PCR de peces en diferentes estadios de desarrollo para cgh 1/2 y actina como la izquierda se muestra la banda de 524 pb de cgh para cada

Aproximaciones en la determinación de la región en que se expresa el mRNA de *cgh-1* en embriones de pez cebra

Transcripciones in vitro:

Se hicieron los PCRs usando los plásmidos pCV4, pCV10 y MyoD, este último proporcionado por el Dr. Isaac Skromme de "*University of Chicago*" de los EU; se purificaron de gel con el kit PCR purification de QIAGEN y se limpiaron con fenol/cloroformo (como sugerencia de la Dra. Diana Escalante) seguido de precipitación con etanol, después se realizaron las transcripciones *in vitro* (Figura 11).



Figura 11: Transcripción in vitro A) Productos de PCR que se usaron como templado para hacer las transcripciones *in vitro* de cada sonda, se observa una banda de 1 kb para *cgh-1,* una banda de 1.7 para *myoD* y una de 600 bp para *dnd*. B) Se analizaron 10 µL de sonda después de la limpieza con la columna de sefarosa, en gel de agarosa 1% no desnaturalizante, por lo que se observa la banda principal con barrido y no corresponde a su peso exacto. MW: marcador de peso molecular. Carril 1: cgh, 2: dnd y ultimo carril: myoD.

Se realizaron los ensayos de "Dot Blot" para determinar la cantidad de sonda a usar en las hibridaciones in situ (Figura 12). En las membranas observamos que la señal de color que resulta del revelado de la sonda no cambia mucho en ambas diluciones, probablemente a que la reacción se encuentra saturada en ambas condiciones.



Figura 12: Dot Blot de las 3 sondas usadas en la hibridación *in situ*. Se probaron 1, 3 y 5 μ L para cada sonda (*cgh, dnd y myoD*) en cada dilución (1:5 y 1:50) para determinar la dilución aproximada de sonda para usar en la Hibridación *in situ*.

La hibridación *in situ* con la sonda de *cgh-1* muestra señal en todo el cuerpo del embrión, lo que indica que este gen es probablemente de expresión somática, contrario a lo que suponíamos, aunque la sonda detecta la expresión de *cgh-1* y 2.



Figura 13: Hibridación in situ: En embriones de 14 somitas A) Sonda *cgh-1* cuya señal se observa tenuemente en todo el cuerpo del embrión, A') Acercamiento del recuadro en donde se observa una tenue coloración violeta que indica la presencia del mRNA de *cgh-1*; B) Sonda *dnd* sin señal, B') Acercamiento del recuadro; C) Sonda *MyoD* con clara señal en cada par de somitas a lo largo del embrión, C') Acercamiento del recuadro en donde se observa la región de la cabeza con el patrón característico del mRNA de *myoD*; D) Embriones incubados sin sonda como control negativo, D') Acercamiento del recuadro en donde se observa que la coloración control es de amarillenta a transparente. La flecha señala la región de la cabeza. Barra: 100 µm.

Evaluación del anticuerpo

Se mandó producir un anticuerpo anti Cgh-1 de pez cebra a la compañía SIGMA-GENOSYS, usaron un péptido de 14 aa (YDDRFNLKGIEEQL) que corresponde a una secuencia cercana al extremo carboxilo que fueron inyectados a 2 conejos, de los que se obtuvieron 3 sangrados de cada uno. Se probaron 3 protocolos para extraer proteína de peces de 5 días y se cuantificaron por Bradford obteniendo las siguientes concentraciones:

- Protocolo A: 4.93 µg/µL
- Protocolo B: 9.66 μg/μL
- Protocolo C: 13 µg/µL

Se corrió una electroforesis con 50 µg de proteína total y se observó que el protocolo B da una mejor calidad e integridad de las bandas, aunque el protocolo C presenta mayor concentración. Decidimos darle mayor importancia a la integridad de las bandas en el gel para elegir el protocolo de extracción a usar subsecuentemente.

Usando la proteína extraída con el protocolo B se realizó un "Western Blot" para determinar la eficiencia y la dilución de anticuerpo más adecuada. Probamos los sueros de los 2 conejos, a las siguientes diluciones de anticuerpo: 1:100, 1:5000, 1:10000 y 1:50000.

En el suero del primer conejo se observan 2 bandas a 1:10000 y una sola muy tenue a 1:50000 que corresponde a aproximadamente un peso de 54 kDa, que es lo reportado para el homólogo en diferentes organismos.

En el suero del segundo conejo se observa a una dilución de 1:10000 de la misma banda del peso esperado y otras 2. A 1:50000 solo se observa una banda del mismo peso (aprox 54 kDa).

Factor de dilución









Para verificar el peso de dicha banda, se hizo una gráfica semilogarítmica de peso (kDa) versus Rf, (frente de corrimiento, en cm) obteniendo un peso de entre 55 y 60 kDa.



Figura 16: gráfica semilogarítmica para extrapolar el peso de la banda obtenida en el "Western Blot".

Con este ensayo, concluimos que el anticuerpo si funciona y que es específico para el homólogo de la proteína Cgh-1 en pez cebra.

Generación de una proteína de fusión de GFP con el homólogo de Cgh-1 de *C. elegans*

Este experimento tiene la finalidad de generar una herramienta que nos permita estudiar a mayor detalle la función de este gen, permitiéndonos observar su expresión en gusanos vivos mediante microscopía de fluorescencia.

Se realizó el PCR con oligonucleótidos donados por la Dra. Rosa Navarro que contienen sitios de recombinación y la secuencia del gen en marco de lectura y se recombinó con el plásmido donador, (pDONR) creando un plásmido de entrada (pCV2) (Figura 17). Para expresarlo, se recombinó utilizando la estrategia "Gateway" en un plásmido de expresión pCV3, que tiene al gen *cgh-1* bajo el control del promotor de *pie-1*. (Figura 17)

Esta construcción se mandó secuenciar en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular al mismo tiempo que se hicieron los experimentos de biobalística para introducirlo en gusanos *C. elegans*.



Figura 17: Obtención del vector de expresión de Cgh-1::GFP de *C. elegans.* PCR, plásmido de entrada en donde 1 es el plásmido sin digerir, 2-4 clonas de pCV2 digerido con EcoRV para liberar el inserto de 576 bases. Vector de expresión o pCV3 en donde 1-4 son productos de PCR para verificar el plásmido, que da un producto de 1.6 kb.

Para la transformación por biobalística se usaron gusanos carentes del gen *unc-19* que son inmóviles. El gen *unc-119* viene en el plásmido de expresión como gen reportero y es capaz de rescatar el fenotipo de inmovilidad. Después de la biobalística se obtuvieron 4 líneas que se movían pero sólo 2 presentaron fluorescencia posiblemente por que el plásmido se insertó en una región diferente a la gónada.

La proteína de fusión se expresa de la manera ya reportada por la Dra. Rosa Navarro (Navarro *et al* 2001) en tinciones con anticuerpos anti-Cgh-1, en gónadas completas alrededor del núcleo y en la célula germinal de embriones tempranos.



Figura 18: expresión de la proteína de fusión: A) En embriones de 4 y 7 células de *C. elegans*, la proteína de fusión GFP::Cgh-1 se expresa en gránulos señalados por las flechas en la célula germinal. B) Ovocitos observados en la gónada hermafrodita adulta de *C. elegans*, las flechas señalan ovocitos, notar la mayor expresión alrededor del núcleo.

Se ha reportado que el homólogo de Cgh-1 en humano, RCK, se agrega en gránulos ante un estrés térmico (Kedersha *et al.*, 2005). Con estos antecedentes, se hizo un experimento preliminar sometiendo a los gusanos transformados a estrés térmico. Para este experimento, se tomaron gusanos y se colocaron en cajas con medio de crecimiento a baño María a 30° C por 1 hora, mientras que el control se dejó a 24° C. En los gusanos sometidos a estrés térmico se observó un aumento considerable en el número e intensidad de los gránulos en ovocitos y en un embrión de 2 células los gránulos se observan más en la célula somática (AB) que en la germinal (P1), demostrando que la proteína de fusión responde a estrés térmico (Figura 19).



Figura 19: Respuesta de la proteína de fusión ante choque térmico. En embriones de *C. elegans* de 2 células. Se observa una diferencia de la señal de la proteína verde fluorescente de la célula P1 (línea germinal) a la AB (somática); en el control se observa ligeramente más señal en la célula germinal mientras que en el choque térmico se observa mucha más señal en la célula somática.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El estudio de la regulación de la transcripción y traducción de los genes es de vital importancia para entender la diferenciación celular, es decir la forma en que los distintos tipos celulares adquieren su identidad. Dentro de este rubro, las helicasas de RNA juegan un papel esencial en estos dos eventos, por lo tanto, estudiar su función y regulación nos ayuda a entender los mecanismos que operan durante la diferenciación. Participando en la diferenciación de las células germinales, se han encontrado RNA helicasas y proteínas de unión a RNA en gránulos ribonucleoprotéicos encontrados solamente en células germinales y que se piensa son responsables de adjudicarles su identidad. Una de estas helicasas muy conservadas es Cgh-1, que se ha estudiado poco.

En este trabajo encontramos 2 secuencias genómicas muy parecidas a *cgh-1* en la base de datos de pez cebra en dos cromosomas diferentes, 16 y 18. Para la secuencia del cromosoma 18 la base de datos reporta 2 transcritos, probablemente productos de "*splicing*" alternativo. Estas secuencias candidatas se analizaron a través de un árbol filogenético en el que las comparamos con secuencias ya reportadas como homólogas de *cgh-1* de otros organismos para probar que si correspondieran a la familia de cgh. De lo contrario, las secuencias candidatas no corresponden al homólogo de *cgh-1* en pez cebra. Como grupo externo se usó la secuencia de la helicasa DEAD box eIF4A (Figura 6).

Es interesante hacer notar que la presencia de más de un locus para este gen no ha sido reportada en ningún otro organismo diferente de peces hasta la fecha, probablemente debido a que en peces la duplicación de genes es un fenómeno frecuente y también se observa en el pez globo *Tetraodon nigroviridis*, presente en el árbol filogenético. La conservación de ambos genes sugiere que son funcionales, por lo que sería muy interesante demostrarlo y saber si desempeñan la misma función o tienen funciones y expresiones diferenciales.

El gen que nombramos aquí *cgh-2* se encuentra en una región del genoma de pez cebra que ha sido secuenciada más recientemente, por lo que todos los experimentos se hicieron en base a la primera secuencia que salió,

cgh-1. Todos los oligonucleótidos se diseñaron en base a esta secuencia únicamente y al analizar la segunda nos dimos cuenta de que los experimentos de RT-PCR no distinguen entre ambas, por lo que estamos observando la expresión de los dos genes. Lo mismo ocurrió en el ensayo de hibridación *in situ*, la sonda diseñada de la base 41 a la 944 no diferencia la expresión de uno u otro, por lo que no podemos decir si es un gen, el otro o los dos los que se ven expresados.

Por otro lado, la señal que nos da el experimento de hibridación in situ es débil y poco clara, por lo que se debe revisar el diseño de la sonda, probar otras secuencias y mejorar las condiciones del experimento, como temperatura de hibridación, concentración de la sonda, tiempo de revelado y protocolo de aclaración de vitelo para tratar de obtener una señal más clara. Dentro de las perspectivas de este trabajo está diseñar oligonucleótidos y sondas que nos permitan diferenciar ambos transcritos y poder observar diferencias en su expresión en caso de que existan. Para esto se deberán buscar regiones que sean diferentes entre cgh-1 y 2 y sobre ellas diseñar las sondas. Esto nos daría una idea mucho más clara del sitio en donde se expresan ambos genes, si es somática o de células germinales y si tienen expresión diferencial. Reportes en organismos superiores como ratón y humano indican que esta proteína se expresa en tejido somático y que tiene una función importante en el silenciamiento de genes a través de microRNAs, (Chu y Rana, 2006) por lo que una expresión somática en pez cebra sugeriría que en este organismo cgh-1 desempeña este mismo papel. Por otro lado, en organismos inferiores como Drosophila melanogaster o C. elegans su expresión es exclusiva de la línea germinal y su función consiste en mantener silenciados mRNAs maternos que se acumulan en el ovocito y protegerlo de apoptosis, función que esperábamos demostrar en pez cebra debido a su posición filogenética. En ambos casos, la proteína forma parte de un complejo ribonucleoprotéico que selecciona mRNAs y los silencia. El mecanismo de selección de los RNA no está claro del todo en la línea germinal, pero como se ha sugerido en células somáticas, es probable que sea a través de microRNAs (Chu y Rana 2006). Sería muy interesante demostrar este mecanismo y comprobar si hay microRNAs en el complejo proteínico y probar si su secuencia tiene sitios de complementación en mRNAs

también presentes en dicho complejo. Esto nos daría indicios de la forma de selección de mRNAs que opera en el complejo, por lo que el siguiente paso sería comprobar que Cgh-1 es el responsable del reconocimiento del dúplex de RNA formado por el mRNA y su microRNA complementario. Para este fin, se deberá aislar el complejo protéico y extraer y secuenciar los mRNAs y RNAs pequeños que se encuentren en él y buscar secuencias que sean complementarias de los RNAs pequeños encontrados con los mRNAs del mismo complejo.

Por otro lado, para poder hacer estudios funcionales se necesitan más herramientas moleculares y nosotros optimizamos un protocolo para extraer proteína total de embriones de pez cebra, sin vitelo. Probamos también un anticuerpo utilizando dichos extractos protéicos, pero nos dimos cuenta que el anticuerpo está dirigido contra una región conservada entre Cgh-1 y Cgh-2, (YDDRFNLKGIEEQL) por lo que no podemos diferenciarlas. En el futuro se tiene proyectado realizar una inmunoprecipitación utilizando un anticuerpo específico para Cgh-1, para determinar las proteínas que se encuentran en el complejo, además de aislar e identificar a los RNAs que también se encuentren formando parte de dicho complejo. Para dicho experimento tenemos que diferenciar ambas proteínas, sobretodo si tienen expresión y/o funciones diferenciales, para lo cual se deben diseñar péptidos en regiones que sean diferentes entre ambas proteínas para generar anticuerpos específicos. Otra herramienta muy útil en el estudio de la función de las proteínas es la fusión de la proteína de interés a la verde fluorescente, que permite observar su localización subcelular. Realizamos la fusión de la proteína Cgh-1 de C. elegans con la GFP porque es un organismo más fácil de manipular, está más estudiado y en el futuro se quiere hacer un rescate de una mutante de cgh-1 en gusano con el gen de pez cebra usando el método de Gateway y biobalística para evaluar el grado de conservación funcional que presentan ambos genes. Para evaluar que la expresión de la proteína de fusión sea la esperada, la comparamos con una tinción con un anticuerpo anti-Cgh realizado por la Dra. Rosa Navarro (Navarro et al., 2001) y observamos el mismo patrón, es decir, en las gónadas, alrededor del núcleo de los ovocitos y en la célula germinal de embriones tempranos, demostrando que la expresión no se encuentra afectada

por la presencia de la proteína verde fluorescente. Por otro lado, se ha demostrado que Cgh-1 está presente en diversos gránulos ribonucleoprotéicos, entre ellos gránulos que responden a estrés, estos gránulos acumulan mRNAs cuando la célula o el organismo es sometido a algún tipo de estrés, por lo que aumentan de tamaño. Nosotros evaluamos si la proteína responde a estrés (aumenta la señal de la proteína de fusión en la célula somática) sometiendo a los gusanos transformados a estrés térmico, una hora a 30° C y observamos un aumento en la señal de la proteína de fusión en embriones de 2 células, en la célula somática (suponemos que en los gránulos de estrés) y una disminución en la señal de la célula germinal (suponemos que de gránulos P); que no se veía en los gusanos control. Esto probablemente se debe a que la proteína es capaz de movilizarse y traslocarse a los gránulos de procesamiento de RNA en respuesta a estrés con la finalidad de modificar el estado traduccional de mRNAs que se encuentren en dichos gránulos. También observamos en gusanos adultos un aumento en la señal de la proteína de fusión en la gónada, alrededor de los núcleos de los ovocitos en formación. Esta respuesta nos sugiere que la proteína de fusión responde a estrés térmico. Resta demostrar que esta proteína sea funcional y por lo tanto capaz de silenciar mRNAs dentro de los complejos ribonucleoprotéicos. Con estos resultados, validamos que nuestro gusano transformado puede ser usado para estudiar la función de la proteína Cgh-1 en el silenciamiento de mRNAs en gránulos germinales y determinar su papel en la función de la línea germinal.

La presente tesis es el principio de un gran proyecto a largo plazo cuyo objetivo es comprender un fenómeno de gran relevancia para la reproducción y sobrevivencia de la mayoría de los organismos, que es la determinación de la línea germinal y ofrece un primer acercamiento al problema y algunas estrategias para comenzar a responder las preguntas planteadas.

SEGUNDA PARTE: IMPLEMENTACIÓN DE UNA TÉCNICA DE CRIOCAPTURA Y TINCIÓN DE CÉLULAS EPIDERMALES.

ANTECEDENTES

La piel de los organismos tiene un papel fundamental manteniendo su forma, protegiéndolos de la deshidratación, de patógenos y otros factores del medio ambiente. El desarrollo de la piel ha sido poco estudiada en peces, no se sabe prácticamente nada acerca de su desarrollo y diferenciación a nivel molecular, en contraste con otros órganos (Webb y Kimelman 2005). Durante el desarrollo embrionario, el pez se encuentra rodeado por una capa de células conocida como peridermo, pero se desconoce si el peridermo participa más tarde en la generación de la piel. Se sabe que la epidermis se diferencia de una población epidermogénica del ectodermo y la dermis del mesodermo paraxial, excepto la región de la cabeza, cuyo origen son las células de la cresta neural. En embriones en 90% de epibolia, la epidermis consiste en una capa de células más o menos polarizadas cubiertas por el peridermo. A partir de esta etapa, comienza la diferenciación de las capas de la piel que sólo se conoce a nivel descriptivo (Le Guellec *et al.*, 2004).

A las 24 hpf, la piel consiste de 2 capas de células de 4 micras unidas por desmosomas y debajo de ellas se observa una capa de 0.2 micras de colágeno.

A las 32 hpf crece el espacio subepidermal y se forma una membrana basal. Más tarde, a las 48 hpf el estroma subepitelial de colágeno se engrosa a 0.5 micras. A las 58 hpf se ven algunos fibroblastos sobre las células musculares. A las 72 hpf se engrosa más el estroma primario y se forma el epitelio dermal que separa al estroma primario de colágeno de las células musculares. A los 5 dpf las células epidermales son más aplanadas, se engrosa la membrana basal que delimita a las células epidermales y el estroma dermal primario continúa acelular. A los 10 dpf cambia la organización de las fibras de colágeno en el estroma primario y se arreglan en láminas más densas y organizadas. A los 15 dpf se engruesa la epidermis y se forman varias capas más. La cara profunda de la dermis está delimitada por melanóforos y células endoteliales basales (Le Guellec *et al.,* 2004). A los 26 dpf se agregan más capas, aumenta el grosor de la piel a 14 micras. La dermis es de 5 micras y comienza a ser invadida por fibroblastos. El estroma primario se diferencia en 2 regiones, una región compacta y otra laxa. Las fibras de colágeno se engrosan a 50 nm. El colágeno es producido primero por las células epidermales basales y después por los fibroblastos que invaden la dermis.

En los peces adultos la estructura de la piel está organizada de la siguiente manera: La epidermis consiste de 3 estratos: uno superficial compuesto por una sola capa de células que presentan ornamentaciones. El estrato intermedio presenta un número variable de capas celulares, contiene células sensoriales, mucosas e indiferenciadas. El estrato profundo está compuesto por una capa de células, la capa basal que mantiene a la epidermis unida a la dermis a través de hemidesmosomas. La dermis está dividida en 2 regiones, una región superficial de colágeno laxo y otra profunda más compacta y transparente que permite que se vean las células pigmentarias de la hipodermis. La hipodermis separa la piel de las células musculares, compuesta por un espacio de colágena laxa, cromatóforos (melanóforos, iridóforos y xantóforos) vasculatura y células adiposas. Está bordeada por endotelio dermal. La superficie profunda de la hipodermis está interrumpida a nivel de cada miosepto (figura 20).



Figura 20: Desarrollo de la piel de pez:

 A) 24-72 hpf: primera deposición de colágeno en el estroma termal primario producida por las células de la capa epidermal.

B) 72 h- 5dpf: Engrosamiento del estroma primario.

C) 5-20 dpf: reorganización
 del estroma primario en
 lamelas, se forma la
 hipodermis.

D) 20-26 días: Invasión del estroma primario por fibroblastos que ahora son las que sintetizan el colágeno y regionalización del estroma dermal.

(Tomado de "Le Guellec et al., 2004)

Estudios en el pez cebra nos pueden llevar a entender los mecanismos generales del desarrollo de órganos como la piel, también entender el papel de los genes involucrados y de esta manera comprender enfermedades producidas por la falta o defectos en los genes homólogos de humanos. Por ejemplo, se han estudiado pacientes con enfermedades como el desorden de piel frágil, epidermolisis, el síndrome Hay-Wells o keratoderma palmoplantar estriado, que se sabe son resultado de mutaciones en los genes plakofilina-1, queratina-5, p63 y desmogleina-1, respectivamente. Sin embargo, existen muchos desórdenes y enfermedades que no se han estudiado con detalle y no se conocen los genes responsables.

El pez cebra es un muy buen modelo para hacer este tipo de estudios, es pequeño, lo que permite analizar muchas mutantes, condiciones o fármacos que nos permitan elucidar los mecanismos involucrados en el desarrollo de este órgano. En estudios previos del desarrollo de la epidermis de peces, se ha usado microscopía óptica, (Sugimoto *et al.,* 2005) pero el espesor del pez dificulta la observación de cada una de las capas epidérmicas, por lo que también se ha usado histología y microscopía electrónica, con la desventaja de que en los cortes obtenidos la epidermis nunca está en una orientación constante, lo que dificulta la identificación de cada capa de este órgano.

Por otro lado, en *C. elegans* se ha usado una técnica llamada "Freezecrack" para facilitar la inmunotinción de estructuras internas. Ésta técnica consiste en colocar gusanos en portaobjetos tratados con polilisina, colocar un cubreobjetos encima y sumergir este conjunto en nitrógeno líquido por algunos segundos para que se congele rápidamente. Inmediatamente después el cubreobjetos se separa de un solo movimiento fracturando el cuerpo del gusano. (Moorthy *et al.,* 2000; Epstein y Shakes, 1995). Este tejido puede fijarse y se teñirse con colorantes comerciales o para inmunodetecciones. Conociendo esta técnica, nosotros pensamos que podría ser de utilidad para separar las capas superficiales de la epidermis para poderla estudiar más fácilmente.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El desarrollo de la piel de pez es un campo poco explorado y no existe una técnica que nos permita obtener porciones extensas de epitelio en un solo plano, dada la curvatura del organismo. Tampoco existe un método que nos permita analizar en poco tiempo gran cantidad de embriones para identificar defectos finos en la epidermis, por ejemplo durante la inspección masiva de mutantes desconocidos provenientes de una mutagénesis a gran escala, o embriones expuestos a fármacos durante la búsqueda de alguno que altere el desarrollo de este órgano.

HIPÓTESIS:

El desarrollo de una técnica para criocaptura y tinción de células epidermales de larvas de pez cebra será de utilidad para el estudio de la formación de la epidermis en peces.

OBJETIVO GENERAL

Desarrollar una técnica de criocaptura y tinción de células epidermales del pez cebra en desarrollo.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Establecer las mejores condiciones para obtener células epidermales de larvas de pez cebra por medio de criocaptura.
- 2. Diseñar y probar un protocolo para fijar y teñir células epidermales con los colorantes Alexa 594-faloidina, Bodipy –ceramida y DAPI, implementando un sistema para teñir una sola preparación y otro para teñir 5 preparaciones simultáneas.
- Establecer el número óptimo de larvas montadas para criocaptura de células epidermales, para realizar un análisis de mutagénesis.
- **4.** Montar un protocolo para inmunotinción de células epidermales utilizando el anticuerpo anti β-catenina.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La técnica desarrollada en este trabajo soluciona el problema de la redondez del pez que impide estudiar un gran número de células epidermales a la vez. La técnica aprovecha el espacio de colágeno que separa las dos monocapas epidermales de las células musculares, que en esta etapa del desarrollo es débil. Ésta técnica constituye una alternativa muy útil para el estudio del desarrollo de la epidermis de pez, al ser capaz de teñirse con colorantes fluorescentes y para inmunodetecciones. La técnica permite la obtención de células epidermales de la cabeza y parte dorsal del tronco y cola sin alterar su posición con respecto a otras células, por lo que es posible determinar la posición de una o un grupo de células sobre el cuerpo del pez; además, en el tejido obtenido con esta técnica, se pueden diferenciar perfectamente las células de la monocapa externa y de la monocapa interna; de esta manera, podemos estudiar la integridad de este tejido. Al ser una técnica rápida y sencilla, es posible procesar una gran cantidad de larvas simultáneamente, con un buen rendimiento, que permite hacer estudios a gran escala, como probar el efecto de una gran cantidad de fármacos sobre el desarrollo de la epidermis o al hacer un análisis de una gran cantidad de mutantes relacionadas con el desarrollo de la epidermis en pez cebra.

Los resultados de este trabajo se presentan en el artículo titulado "Freeze-crack technique to study epidermal develop in zebrafish using differential interferente contrast microscopy and fluorescent markers" que se encuentra al final de esta tesis.

REFERENCIAS

Anderson P, Kedersha N (2006) RNA granules. JCB 172(6):803–808.

- Andrei MA, Ingelfinger D, Heintzmann R, Achsel T, Rivera-Pomar R, Lührmann R. (2005) A role for eIF4E and eIF4E-transporter in targeting mRNPs to mammalian processing bodies. RNA 11: 717-727.
- Akao Y, Marukawa O, Morikawa H, Nakao K, Kamei M, Hachiya T, Tsujimoto Y (1995) The rck/p54 candidate proto-oncogene product is a 54-kilodalton D-E-A-D box protein differentially expressed in human and mouse tissues. Cancer Res 55:3444-3449.
- Amacher S, (2001) Zebrafish Embryo as a Developmental System. ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES, John Wiley & Sons.
- Amikura R, Hanyu K, Kashikawa M, Kobayashi S (2001) Tudor protein is essential for the localization of mitochondrial RNAs in polar granules of Drosophila embryos. Mech Dev 107:97-104.
- Anderson P, Kedersha N. (2006) RNA granules. JCB 172(6): 803–808
- Bally-Cuif L, Schatz W, Ho R (1998) Characterization of the zebrafish Orb/CPEBrelated RNA binding protein and localization of maternal components in the zebrafish oocyte. Mech Dev 77:31-47.
- Bergkessel M., Reese J., (2004) An essential role for the Saccharomyces cerevisiae DEAD-box helicase DHH1 in G1/S DNA-damage checkpoint recovery. Genetics 167:21-33.
- Boag R, Nakamura A, Blackwell T, (2005) A conserved RNA-protein complex component involved in physiological germline apoptosis regulation in *C. elegans*. Development 132, 4975-4986.
- Braat A., Water S., Goos H., Bogerd J., Zivkovic D. (2000) Vasa protein expression and localization in the zebrafish. Mech Dev 95:271-274.
- Colegroove-Otero L, Minshall N, Standart N. (2005) RNA binding proteins in early development. Critical Rev in Bioch and Molecular Biology 40: 21-73.

- Coller JM, Tucker M, Sheth U, Valencia-Sanchez MA, Parker R. (2001) The DEAD box helicase, Dhh1p, functions in mRNA decapping and interacts with both the decapping and deadenylase complexes. RNA 7:1717-1727.
- Coller J, Parker R. (2005) General Translational Repression by Activators of mRNA Decapping. Cell 122:875–886.
- Chu C, Rana T (2006) Translation repression in human cells by microRNAinduced gene silencing requires RCK/p54. PLoS Biol 4:e210.
- de Moor C, Meijer H, Lissenden S. (2005) Mechanisms of translational control by the 3' UTR in development and differentiation. Seminars in Cell & Dev Biol 16: 49-58.
- Doitsidou M, Reichman-Fried M, Stebler J, Koprunner M, Dorries J, Meyer D, Esguerra CV, Leung T, Raz E (2002) Guidance of primordial germ cell migration by the chemokine SDF-1. Cell 111:647-659.
- Epstein, H.F. y Shakes D.C. (1995). *Caenorhabditis elegans*: Modern Biological Analysis of an Organism. *In* Methods in Cell Biology. Vol. 48. Academic Press Inc.
- Fraenkel P., Zon L. (2005) Zebrafish as a Model for Human Diseases, ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES, John Wiley & Sons.
- Geisler R *et al* (2007) Large-scale mapping of mutations affecting zebrafish development. BMC Genomics 8:11.
- Houart C. (2001) Zebrafish as an Experimental Organism ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES, John Wiley & Sons.
- Kedersha N, Stoecklin G, Ayodele M, Yacono P, Lykke-Andersen J, Fritzler M, Scheuner D, Kaufman R, Golan D, Anderson P (2005) Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. JCB 169:871–884.
- Kimmel C, Ballard W, Kimmel S, ullman B and Schilling T (1995) Stages of embryonic development of the Zebrafish. Dev Dyn 203: 253-310.
- Knaut H, Werz C, Geisler R, Nusslein-Volhard C; Tubingen 2000 Screen Consortium. (2003) A zebrafish homologue of the chemokine receptor Cxcr4 is a germ-cell guidance receptor. Nature 421:279-82.

- Krovel AV, Olsen LC (2004) Sexual dimorphic expression pattern of a splice variant of zebrafish vasa during gonadal development. Dev Biol 271:190-197.
- Ladomery M, Wade E, Sommerville J (1997) Xp54, the Xenopus homologue of human RNA helicase p54, is an integral component of stored mRNP particles in oocytes. Nucleic Acids Res 25:965-973.
- Leatherman J. and Jongens T. (2003) Transcriptional silencing and translational control: key features of early germline development. Bioessays 25:326-335.
- Le Guellec, D., G. Morvan-Dubois and J.Y. Sire. 2004. Skin development in bony fish with particular emphasis on collagen deposition in the dermis of the zebrafish (Danio rerio). Int J Dev Biol *48*:217-231.
- Matsumoto K, Kwon OY, Kim H, Akao Y (2005) Expression of rck/p54, a DEADbox RNA helicase, in gametogenesis and early embryogenesis of mice. Dev Dyn 233:1149-1156
- Minshall N, Thom G, Standart N (2001) A conserved role of a DEAD box helicase in mRNA masking. RNA 7:1728-1742.
- Minshall N, Standart N (2004) The active form of Xp54 RNA helicase in translational repression is an RNA-mediated oligomer. Nucleic Acids Res 32:1325-1334.
- Moorthy S, Chen L y Bennett V. (2000) Caenorhabditis elegans β-G Spectrin Is Dispensable for Establishment of Epithelial Polarity, but Essential for Muscular and Neuronal Function. JCB 149:915–930.
- Nakamura A, Amikura R, Hanyu K, Kobayashi S (2001) Me31B silences translation of oocyte-localizing RNAs through the formation of cytoplasmic RNP complex during Drosophila oogenesis. Development 128:3233-3242.
- Nasevicius A, Ekker SC (2000) Effective targeted gene 'knockdown' in zebrafish. Nat Genet 26:216-220
- Navarro RE, Shim EY, Kohara Y, Singson A, Blackwell TK (2001) cgh-1, a conserved predicted RNA helicase required for gametogenesis and

protection from physiological germline apoptosis in C. elegans. Development 128:3221-3232

- Patton E. Zon L. (2001) The art ans design of genetic screens: zebrafish. Nature Genet Reviews 2:956-966.
- Raz, E. (2003) Primordial germ-cell development: the zebrafish perspective. Nature Genet Reviews 4:690-700.
- Rocak S. and Linder P. (2004) DEAD box proteins: The driving forces behind RNA metabolism. Nature Reviews, Mol Cell Biol. 5: 232-241.
- Santos A. Lehmann R. 2004. Germ cell specification and migration in Drosophila and beyond. Current Biology 14:578-589.
- Sheth U, Parker R (2003) Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies. Science 300:805-808.
- Schisa J, Pitt J, Priess J. (2001) Analysis of RNA associated with P granules in germ cells of C. elegans adults. Development 128:1287-1298.
- Sugimoto M, Yuki M, Miyakoshi T, Maruko K (2005) The Influence of Long-Term Chromatic Adaptation on Pigment Cells and Striped Pigment Patterns in the Skin of the Zebrafish, Danio rerio. J. Exp. Zool. 303:430–440.
- Teixeira D, Sheth U, Valencia-Sanchez MA, Brengues M, Parker R (2005) Processing bodies require RNA for assembly and contain nontranslating mRNAs. RNA 11:371-382.
- Thisse B, Heyer V, Lux A, Alunni V, Degrave A, Seiliez I, Kirchner J, Parkhill JP, Thisse C (2004) Spatial and temporal expression of the zebrafish genome by large-scale in situ hybridization screening. Methods Cell Biol 77:505-519.
- Tomer K. and Linder P. (2001) DExD/H box helicases: from generic motors to specific dissociation functions. Molecular Cell 8:251-262.
- Tseng-Rogenski SS, Chong JL, Thomas CB, Enomoto S, Berman J, Chang TH (2003) Functional conservation of Dhh1p, a cytoplasmic DExD/H-box protein present in large complexes. Nucleic Acids Res 31:4995-5002.
- Wang D, Kennedy S, Conte D, Jr., Kim JK, Gabel HW, Kamath RS, Mello CC, Ruvkun G (2005) Somatic misexpression of germline P granules and

enhanced RNA interference in retinoblastoma pathway mutants. Nature 436:593-597.

- Webb, A.E. and D. Kimelman. 2005. Analysis of early epidermal development in zebrafish. Methods Mol Biol 289:137-146.
- Weidinger G., *et al.* (2003) *dead end*, a novel vertebrate germ plasm component, is required for zebrafish primordial germ cell migration and survival. Cur Biol, 13:1429–1434.
- Weston A, Sommerville J. (2006) Xp54 and related (DDX6-like) RNA helicases: roles in messenger RNP assembly, translation regulation and RNA degradation. Nuc Ac Res 3:3082–3094.

Wylie, Chris. (1999) Germ Cells. Cell 96:165-174.

- Yoon C, Kawakami K, Hopkings N. (1997) Zebrafish vasa homologue RNA is localized to the cleavage planes of 2- and 4-cell-stage embryos and is expressed in the primordial germ cells. Development 124, 3157-3166.
- Zhou Y, Louking M (2004) Sending RNAS into the futute: RNA localization and germ cell fate. Life 56:19-27.