

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**“ANÁLISIS DE DOS HÍBRIDOS PARA IDENTIFICAR  
PROTEÍNAS QUE INTERACTUAN CON LA HELICASA  
DE RNA VBH-1 EN *Caenorhabditis elegans*”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE;  
LICENCIADA EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA  
BÁSICA**

**PRESENTA:**

**AYDÉ MENDOZA OLIVA**

**MEXICO D.F.**

**2008**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

Este trabajo se realizó bajo la dirección de la **Dra. Rosa Estela Navarro González** en el Departamento de Biología Celular del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México. La realización de este trabajo recibió apoyo de los donativos PAPIIT-UNAM IN220306 y CONACYT 50896-Q.

Agradecemos a la **Maestra Laura Elena Valverde** su ayuda técnica durante la realización de la primera parte del ensayo de dos híbridos. Agradecemos a la **Bióloga Laura Silvia Salinas Velázquez** la asesoría y ayuda técnica durante la realización de este trabajo. También agradecemos **al Dr. Ernesto Maldonado** su asesoría para la realización de análisis de secuencias y sus valiosos comentarios a lo largo de la realización de este trabajo.

*«No tienes que comprenderlo todo en cuanto te lo dicen», dijo el grillo suavemente.*

*«En cualquier caso, aprender algo racionalmente no te hace ningún bien. Tienes que aprenderlo con el corazón y hacerte dueño de ello ».*

*Robert Fisher y Beth Kelly. El búho que no podía ulular (fragmento)*

*Dedico este trabajo a mis padres:*

*Marino Mendoza López y Lili Oliva Serrano*

*por su apoyo incondicional*

*y a la memoria de:*

*Anabel Lozano Oliva*

*por impulsarme a seguir adelante.*

## *Agradecimientos*

*Agradezco a la Dra. Rosa Navarro por haberme dado la oportunidad de participar en este proyecto, por todas sus enseñanzas, comentarios y observaciones durante la realización de este trabajo.*

*Al Dr. Ernesto Maldonado y a todos mis amigos del “antiguo” laboratorio 125 N: a Rocío, Carlos, Andrés, Casandra, Valeria, Daniel, Giovanni, Rodrigo, Silvia, Elena, Marta y a Adelma del lab 324 N por su amistad, ayuda constante y por todos los momentos compartidos.*

*A mis compañeros de la LIBB y a mis amigos por la confianza que me han brindado y por su valiosa amistad.*

*Agradezco a mi familia por todo el apoyo que me han dado a lo largo de mis estudios.*

*A Daniel por su cariño, por escucharme y apoyarme durante este tiempo he hemos compartido.*

## ÍNDICE

	<b>Pag.</b>
<b>RELACIÓN DE FIGURAS Y TABLAS</b>	1
<b>ABREVIATURAS</b>	2
<b>RESUMEN</b>	4
<b>INTRODUCCIÓN</b>	5
El <i>C. elegans</i> como un sistema experimental	5
Las células germinales	9
La línea germinal en el <i>C. elegans</i>	9
Gonadogénesis en el <i>C. elegans</i>	12
Los gránulos P en la línea germinal del <i>C. elegans</i>	15
Proteínas componentes de los gránulos P	16
RNAs asociados a los gránulos P en las células germinales del <i>C. elegans</i>	21
Las helicasas de RNA	22
La proteína Vasa: una helicasa de RNA esencial para la función de la línea germinal	23
<b>OBJETIVOS</b>	27
Objetivo general	27
Objetivos particulares	27
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	28
El ensayo de dos híbridos: un sistema para detectar interacciones entre proteínas	28
Condiciones experimentales del ensayo de dos híbridos	31
Purificación del DNA plasmídico de la levadura	32
Transformación de bacterias <i>E. coli</i>	32
Análisis tipo Southern blot para identificar los genes aislados en el ensayo de dos híbridos	34
Purificación de la sonda	34
Comprobación de la interacción de las proteínas VIP-1, -2 y -3 con VBH-1	36
Cruzas de levadura	37
Ensayo de actividad de $\beta$ -galactosidasa	39
Comparación de secuencias	40
Mantenimiento de los nematodos y cepas	
RNA de interferencia (RNAi) en <i>C. elegans</i>	40
Ensayo de RNA de interferencia	41

Observación de los nemátodos utilizando microscopía Nomarski	41
Inmunotinciones	42
Conteo de progenie	43
<b>RESULTADOS</b>	45
Las proteínas VIP -1, -2, -3 interactúan con la helicasa de RNA VBH-1	45
Motivos estructurales deducidos por la secuencia aminoacídica de las proteínas VIP	48
VIP-1 es una proteína con dominios de unión a RNA y es similar al factor de inicio de la traducción eIF4B	48
VIP-2 es una proteína de unión ácidos nucleicos con un dedo de zinc	49
VIP-3 es una proteína novedosa con función desconocida	49
Estudios funcionales	50
VIP-2 es importante para la fertilidad del <i>C. elegans</i>	50
La inhibición de la expresión de VIP-2 provoca defectos en las células germinales	52
Los animales <i>vip-2 (RNAi)</i> realizan la transición espermatogénesis/ovogénesis de forma prematura	55
La falta de VIP-2 no altera la localización celular de VBH-1	58
<b>DISCUSIÓN</b>	
La proteína VIP -2 interactúa con VBH-1	60
VIP-2 y VBH-1 participan en la espermatogénesis	62
La localización de VBH-1 en los gránulos P es independiente de VIP-2	63
La posible función de las proteínas VIP-1 y VIP-2 con VBH-1.	63
<b>CONCLUSIONES</b>	65
<b>REFERENCIAS</b>	66
<b>ANEXO</b>	75
<b>MEDIOS Y SOLUCIONES</b>	78

## RELACIÓN DE FIGURAS Y TABLAS

Figuras	Pag.
Fig.1 Anatomía del <i>C. elegans</i>	6
Fig.2 Ciclo de vida del <i>C. elegans</i>	8
Fig.3 Origen embrionario de la línea germinal	10
Fig.4 Segregación de los gránulos P durante el desarrollo embrionario	11
Fig.5 Representación esquemática del desarrollo de la gónada del hermafrodita	13
Fig.6 Estructura de la gonada del hermafrodita adulto	15
Fig.7 Los gránulos P en la gónada del animal adulto	16
Fig.8 Los gránulos polares en el embrión de <i>Drosophila</i>	23
Fig.9 Diagrama del metabolismo de la galactosa	29
Fig.10 Esquema general del sistema de dos híbridos	30
Fig.11 Esquema general de la técnica de replicación en placa	38
Fig.12 Escrutinio de las clonas positivas del doble híbrido mediante ensayo tipo Southern blot	46
Fig.13 Corroboración de la interacción de VIP-1, VIP-2 y VIP-3 mediante el ensayo de actividad de $\beta$ - galactosidasa	47
Fig.14 Los fenotipos de animales hermafroditas RNAi observados por microscopía Nomarski.	53
Fig.15 Transición prematura de espermatogénesis a ovogénesis en animales <i>vip-2</i> (RNAi)	57
Fig.16 Los animales <i>vip-2</i> (RNAi) expresan de forma normal a la proteína VBH-1.	59
Tablas	
Tabla 1 Proteínas presentes en los gránulos P	17
Tabla 2 Fertilidad en animales hermafroditas silvestres y <i>vip-2</i> (RNAi)	52
Tabla 3 Fenotipos en animales adultos	55
Tabla 4 Feminización de la gónada de animales L4	56
Anexo	
Fig. A Secuencia de la proteína VIP-1 y su alineamiento con una proteína de <i>C. briggsae</i> .	75
Fig. B Secuencia de VIP-2 y su alineamiento con la proteína CBG08182 de <i>C. briggsae</i>	76
Fig. C Secuencia de la proteína VIP-3 y su alineamiento con otra proteína del <i>C. elegans</i>	77

# ABREVIATURAS

AD	dominio de activación (activation domain)
ATP	trifosfato de adenosina
cDNA	ácido desoxirribonucleico codificante
CTD	Domino carboxilo terminal
DB	dominio de unión a DNA (DNA binding)
DEAD	motivo con aminoácidos ácido aspártico(D),ácido glutámico (E) y alanina (A)
DNA	ácido desoxirribonucleico
DTC	célula distal
GTP	trifosfato de guanosina
L1	estado larval 1
L2	estado larval 2
L3	estado larval 3
L4	estado larval 4
PGCs	eélulas germinales primordiales
PV	plásmido vacío
RGG	motivo con aminoácidos arginina (R) y glicina (G)
RNA	ácido ribonucleico
RNAi	RNA de interferencia
RRM	motivo de reconocimiento de RNA (RNA Recognition motif)
snRNPs	ribonucleoproteínas nucleares pequeñas
UTR	región no traducida del RNA mensajero
Zn CCCH Zn CCHC	motivos con un ión zinc enlazado por tres cisteínas (C) y una histidina (H)

## abreviaciones de genes

<i>cgh-1</i>	conserved germline RNA helicase
<i>glh-1, -2, -3 y -4</i>	germline helicase-1 a -4
<i>ife-1</i>	initiation Factor 4E (eIF4E) family
<i>mex-1 y -2</i>	muscle in excess -1 a 2
<i>msp</i>	major sperm protein
<i>oma-1, -2</i>	oocyte maturation defective

<i>pal-1</i>	posterior alae in males
<i>pgl-1, -2 y -3</i>	p granules abnormality -1 a -3
<i>pie-1</i>	pharynx and intestine in excess-1
<i>pos-1</i>	posterior segregation -1
<i>rff-1</i>	RNA-dependent RNA polimerase family
<i>rme-2</i>	receptor mediated endocytosis-2
<i>skn-1</i>	skinhead
<i>vbh-1</i>	vasa-belle-like helicase-1
<i>vip-1,-2,-3</i>	vbh-1 interacting protein -1 a -3
<i>tra-2</i>	transformer : XX animals transformed into males
<i>fog-2</i>	feminization of germline
<i>fem-3</i>	feminization of XX and XO animals
<i>gld-1 -2, y -3</i>	germline defective-1 a 3

## RESUMEN

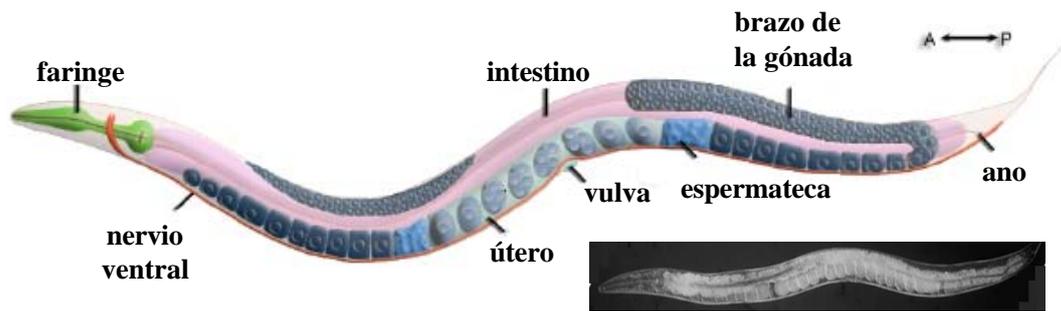
Las células germinales son las portadoras de la información genética en los organismos multicelulares. En algunos animales estas células son determinadas por componentes citoplasmáticos presentes en los ovocitos. Estos componentes citoplasmáticos se conocen como gránulos polares en *Drosophila* o gránulos P en el *C. elegans*. Entre los componentes de los gránulos polares mejor caracterizados está la proteína Vasa, una helicasa de RNA perteneciente a la familia DEAD. Vasa es esencial para la especificación y función de las células germinales en varios organismos. Belle es la helicasa de RNA más parecida a Vasa en el genoma de *Drosophila* y su función es importante para la línea germinal. En *C. elegans* el homólogo de *vasa* y *belle* es *vbh-1* (por sus siglas en inglés: vasa-belle like RNA helicase), cuya función es importante para la línea germinal. La falta de *vbh-1* provoca letalidad embrionaria e infertilidad en animales machos y hermafroditas. VBH-1 es importante para la espermatogénesis y en su ausencia los hermafroditas producen muy pocos espermatozoides e incluso pueden llegar a ser incapaces de formarlos. Con el propósito de elucidar la función que tiene VBH-1 en las células germinales, llevamos a cabo un ensayo de dos híbridos en el que aislamos proteínas que interaccionan físicamente con VBH-1. Encontramos tres proteínas que interaccionan con VBH-1 y las denominamos VIP (por sus siglas en inglés: VBH-1 interacting protein). Las proteínas VIP-1 y VIP-2 presentan motivos de unión a RNA mientras que la proteína VIP-3 tiene una función desconocida. Analizamos la función de VIP-2 por medio de RNAi y encontramos que al igual que VBH-1, VIP-2 es importante para el desarrollo de las células germinales. VIP-2 participa en la fertilidad de los animales particularmente en la regulación del cambio de espermatogénesis a ovogénesis. Encontramos que VIP-2 no es necesaria para la localización y expresión de VBH-1 en las células germinales. Nuestros resultados sugieren que la interacción de VBH-1 con VIP-2 es importante en el funcionamiento de las células germinales del *C. elegans*.

## INTRODUCCIÓN

Un organismo pluricelular es un conjunto ordenado de células que contienen el mismo genoma, pero que presentan especializaciones distintas. La estructura final puede ser enormemente compleja, pero se genera por un limitado repertorio de actividades celulares. Las células crecen, se dividen y mueren. Forman uniones mecánicas y generan fuerzas para sus desplazamientos y movimientos. Se diferencian mediante la expresión o inhibición de determinados grupos de proteínas. Producen señales moleculares que afectan a las células vecinas y a su vez responden a señales que las células vecinas envían. El genoma repetido de forma idéntica en todas las células, define las reglas según las cuales las diferentes actividades celulares posibles entrarán en juego. Mediante este proceso, en cada célula se establecen las directrices que conducirán al complicado proceso del desarrollo pluricelular por el cual se genera un organismo adulto a partir de un huevo fecundado. Todos los organismos pluricelulares pasan esta información genética de padres a hijos a través de las células germinales, las cuales se separan de las células somáticas en el desarrollo temprano para dar origen a los gametos adultos. Para tratar de entender como se llevan a cabo estos procesos, la Biología del Desarrollo utiliza animales como modelos de estudio, entre los que se encuentran por mencionar algunos: el nematodo (*Caenorhabditis elegans*), la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*), el pez cebra (*Danio rerio*), la rana (*Xenopus laevis*) y el ratón (*Mus musculus*).

### **El *C. elegans* como un sistema experimental**

En 1965, Sydney Brenner propuso al nematodo *Caenorhabditis elegans* como un organismo modelo para hacer estudios de Biología del Desarrollo y Neurociencias. Dentro de los principales atributos del *C. elegans* como un sistema experimental se encuentran: su transparencia, su simplicidad, el tener un ciclo de vida corto, un tamaño pequeño, presentar una alta producción de embriones (250-300) lo cual facilita los análisis genéticos, poseer un genoma pequeño y ser de fácil cultivo en el laboratorio (Wood, 1988) (Fig. 1).



**Fi**

**g. 1. Anatomía del *C. elegans*.** En la figura superior se observa un dibujo del animal hermafrodita adulto en donde se indican las estructuras que lo componen. En la figura inferior se muestra una fotografía de microscopía tipo Nomarski en donde se puede apreciar la transparencia del animal.

El *C. elegans* es un nematodo de vida libre, comúnmente encontrado en la arena de lugares templados en varias partes del mundo. Se alimenta principalmente de bacterias y se reproduce con un ciclo de vida corto de tan sólo 3 días y en condiciones óptimas puede vivir hasta tres semanas. El *C. elegans* es de fácil mantenimiento en el laboratorio, donde puede crecer sobre placas de agar o en cultivos líquidos empleando *Escherichia coli* como fuente de alimento. Los animales son fácilmente observados y manipulados con la ayuda de un microscopio de disección. Debido a que los animales son transparentes a lo largo de todo su ciclo de vida, su desarrollo puede ser observado en animales vivos por medio de microscopía de luz tipo Nomarski. Además se pueden obtener mutantes fácilmente empleando mutagénesis dirigida, agentes mutagénicos químicos o radiación ionizante (Wood, 1988).

El *C. elegans* presenta dos sexos: hermafrodita y macho, ambos de tan sólo 1 mm de longitud pero diferentes en apariencia cuando son adultos. Los hermafroditas producen ovocitos y espermatozoides y se reproducen por autofecundación o por fecundación cruzada tras la transferencia de espermatozoides de un macho a través de la cópula. La autofecundación puede producir una progenie homocigota, esto facilita la utilización del *C. elegans* como un organismo adecuado para los estudios genéticos (Alberts, 2002).

En general, los diversos estudios que se llevan a cabo con este organismo se realizan con poblaciones de hermafroditas de los cuales hay una mayor proporción que de

machos. Los machos aparecen espontáneamente dentro de poblaciones de hermafroditas. La frecuencia de aparición de machos en una población normal es de 1 por cada 500 animales (Wood, 1988), pero a partir de cruces se puede obtener el 50% de machos.

La embriogénesis del *C. elegans* dura aproximadamente 14 horas a 20° C, en la cual el ovocito fecundado forma por medio de divisiones celulares asimétricas 558 células que forman un pequeño nematodo en el interior del huevo. Una vez fuera del huevo, se producen más divisiones que provocarán el crecimiento y la maduración sexual del animal a medida que pasa por cuatro estadios larvarios sucesivos (L1, L2, L3 y L4) separados por las correspondientes mudas. Tras la última muda se alcanza el estado adulto y el nematodo hermafrodita inicia la producción de sus propios huevos. Todo el proceso de desarrollo, de embrión a adulto fértil, dura solamente tres días (Alberts, 2002) (Fig. 2). Por la transparencia del nemátodo se ha podido observar como las células se dividen, migran, se diferencian y mueren en el embrión, además se ha podido seguir el linaje celular desde el embrión hasta el organismo adulto. Este análisis de linaje es más difícil de realizar en animales de mayor tamaño, en los cuales cada una de las células ha de ser marcada en estadios tempranos para poder identificarla a ella y a su progenie (Alberts, 2002).

El hermafrodita adulto del *C. elegans* tiene 959 células somáticas y aproximadamente 2000 células germinales, mientras que el macho consta de 1031 células somáticas más aproximadamente 1000 células germinales (Alberts, 2002). Se ha reconstruido célula a célula la anatomía del nematodo mediante el estudio al microscopio electrónico de secciones seriadas. El mapa corporal de éste nematodo sencillo es básicamente el mismo que el de la mayoría de los animales superiores dado que consta de un cuerpo alargado con una simetría bilateral compuesto por los mismos tejidos básicos (nervio, músculo, intestino y piel) organizados según el mismo patrón básico (boca y encéfalo en el extremo anterior, y ano en el posterior). La pared externa del cuerpo está compuesta de dos capas: la epidermis protectora y la capa muscular subyacente. Un sencillo tubo de forma el intestino. Un segundo tubo, situado entre el intestino y la pared del cuerpo, constituye la gónada; la constitución de su pared es a base de células somáticas, con las células germinales en el interior de la misma (Alberts, 2002) (Fig. 1).



**Fig. 2. Ciclo de vida del *C. elegans*.** Representación esquemática de los estadios de desarrollo del animal a 20 °C. Las primeras divisiones del cigoto ocurren dentro del útero, en la etapa de gástrula el embrión es expulsado y el desarrollo embrionario continúa fuera del animal adulto. Después de 14 horas de embriogénesis eclosiona una larva L1. En ausencia de alimento esta larva es capaz de detener su desarrollo y reiniciarlo nuevamente cuando encuentra comida. Si las condiciones ambientales son desfavorables la larva L2 puede originar un estadio adicional conocido como larva “Dauer” capaz de sobrevivir varios meses y continuar su desarrollo una vez que los parámetros ambientales sean adecuados. En la figura, los números en parte central del círculo indican las horas aproximadas que dura cada estadio. Modificado de: Lewin, Genes 2000 (versión en línea: [www.ergito.com/index.jsp](http://www.ergito.com/index.jsp); sección: genética).

El genoma del *C. elegans* está ordenado en 6 cromosomas, 5 autosómicos y uno sexual. Los hermafroditas son diploides para los seis cromosomas (XX), mientras que los machos lo son para los cromosomas autosómicos, presentando solo un cromosoma sexual X (X0) (Wood, 1988). El tamaño del genoma haploide es de  $8 \times 10^7$  pares de bases que codifican para aproximadamente 19000 genes (Wood, 1988). Se estima que 2/3 partes de los genes humanos se encuentran representados en el genoma de este nematodo (Riddle *et al.*, 1997).

### Las células germinales

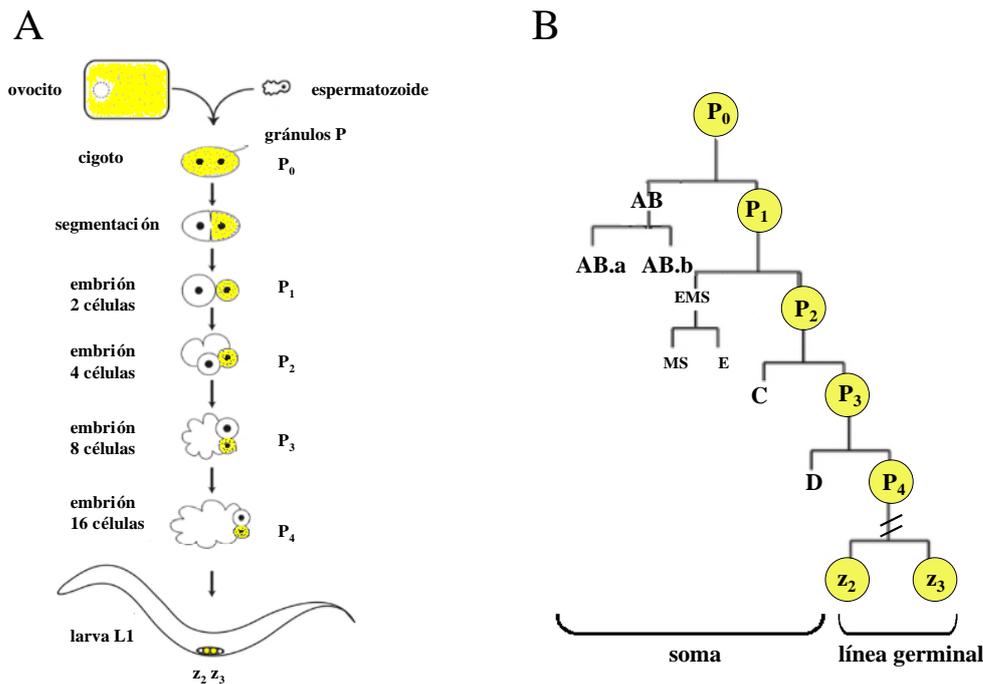
La línea germinal es un linaje de células especializadas que da origen a los ovocitos y espermatozoides y presentan propiedades especiales debido al papel tan importante que desempeñan. Las células germinales transmiten la información genética a la siguiente generación por ello se consideran inmortales. Las células germinales en algún momento de su vida son capaces de dar origen a todos los tejidos de un animal y por ello son consideradas totipotenciales; al mismo tiempo tienen que diferenciarse en los gametos especializados y se dividen por meiosis. El desarrollo de la línea germinal es de gran interés para el estudio de la perpetuación de las especies y la diferenciación celular (Saffman y Lasko, 1999).

En 1984, Owen comenzó los estudios del origen y la naturaleza de la línea germinal y sugirió que estas células se separan de las células somáticas para contribuir al desarrollo de un nuevo individuo. Basándose en gran parte de la observación de estructuras citoplasmáticas características de las células germinales, se piensa que la continuidad de las células germinales depende de estos factores citoplasmáticos que son heredados de una generación a la siguiente (Saffman y Lasko, 1999). Este citoplasma germinal es conocido en *Drosophila* como gránulos polares, en *Xenopus laevis* estas partículas son llamadas gránulos germinales, mientras que en *Caenorhabditis elegans* se conocen como gránulos P. Por medio de inyecciones de citoplasma germinal en la parte anterior de embrión de *Drosophila* se observó que éste es suficiente y capaz de inducir la formación de la línea germinal en un lugar exógeno (Wylie, 2000).

### **La línea germinal en el *C. elegans***

En *C. elegans*, como en varios organismos, la línea germinal es segregada de los linajes somáticos durante la embriogénesis temprana. En el embrión del *C. elegans*, cinco divisiones asimétricas producen a las seis células fundadoras conocidas como: AB, MS, E, C, D y P<sub>4</sub>. La primera división asimétrica parte al cigoto (P<sub>0</sub>) en un blastómero anterior de mayor tamaño denominado AB y en el blastómero posterior P<sub>1</sub> el cual es de menor tamaño. La célula P<sub>1</sub> pasa por otra división asimétrica que da lugar a los blastómeros EMS y P<sub>2</sub>. Una futura división asimétrica de EMS forma a los blastómeros MS y E. La división asimétrica de P<sub>2</sub> forma a los blastómeros C y P<sub>3</sub>. Por último la célula P<sub>3</sub> se divide asimétricamente en los blastómeros D y P<sub>4</sub>. De esta forma se completa la formación de las 6 células fundadoras, cuyos descendientes formarán los

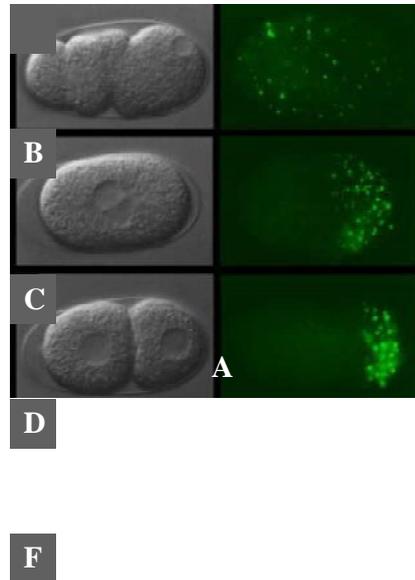
diferentes tipos celulares (Sulston *et al.*, 1983) (Fig. 3 B).



**Fig. 3. Origen embrionario de la línea germinal.** A) Este esquema representa la fertilización del ovocito y la segregación de los gránulos P ( representados en color amarillo) a las células precursoras de la línea germinal durante el desarrollo embrionario. B) En las primeras divisiones asimétricas del embrión se generan las células fundadoras de los tejidos somáticos (AB, MS, E, C, D) y la célula fundadora de la línea germinal (P<sub>4</sub>). Las células Z<sub>2</sub> y Z<sub>3</sub> precursoras de la línea germinal provienen de la división de la célula P<sub>4</sub>. Tomado de Hubbard y Greenstein. Introduction to the germ line (2005), WormBook, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.18.1, www.wormbook.org.

La célula P<sub>4</sub> entra al embrión durante la gastrulación en el estadio de 28 células y se divide simétricamente en el estadio de 100 células para formar las dos células precursoras de la línea germinal, Z<sub>2</sub> y Z<sub>3</sub>. Las células Z<sub>2</sub> y Z<sub>3</sub> se dividen en la gónada durante el desarrollo. Por analogía con otros sistemas, la célula P<sub>4</sub> y sus descendientes Z<sub>2</sub> y Z<sub>3</sub> se conocen como las células germinales primordiales (PGCs) (Hubbard y Greenstein, 2000). La diferenciación de los blastómeros somáticos de los blastómeros de la línea germinal en el *C. elegans* está determinado por la presencia de gránulos electrodensos citoplasmáticos denominados gránulos P, los cuales son específicos de la línea germinal (Saffman y Lasko, 1999). Los gránulos P están presentes en las células germinales a lo largo de todo el ciclo de vida del *C. elegans*. Los gránulos P se distribuyen en el ovocito y en los embriones recién fertilizados y antes de que ocurra la primera división migran a la parte posterior del embrión. En las divisiones posteriores,

los gránulos P segregarán asimétricamente de tal forma que solo se localizan en los precursores de las células germinales. Durante la ovogénesis, los gránulos P se asocian con el núcleo (Tenenhaus *et al.*, 1998) (Fig. 3A y 4).



**Fig. 4. Segregación de los gránulos P durante el desarrollo embrionario.** Los paneles de la izquierda son fotografías tomadas en Nomarski que muestran las primeras divisiones celulares. Los paneles de la derecha muestran la distribución de los gránulos P durante cada estadio embrionario que se presenta. Para observar a los gránulos P se utilizó un anticuerpo contra la proteína PGL-1, que se expresa específicamente en estas estructuras. **A)** Embrión de una sola célula en donde se observan los gránulos P distribuidos asimétricamente en el citoplasma. **B)** Los gránulos P comienzan a segregarse hacia lo que será el blastómero P<sub>1</sub>. **C)** Embrión de dos células, los gránulos P se encuentran en la célula P<sub>1</sub>. **D)** Los gránulos P en el blastómero P<sub>2</sub>. **E)** Embrión de cuatro células, los gránulos P se encuentran en la célula P<sub>1</sub>. **F)** Larva L1 donde muestran las células Z<sub>2</sub> y Z<sub>3</sub> que son las precursoras de las células germinales. Tomado de: [biology.kenyon.edu/courses/biol114/Chap11/Chapter\\_11](http://biology.kenyon.edu/courses/biol114/Chap11/Chapter_11)

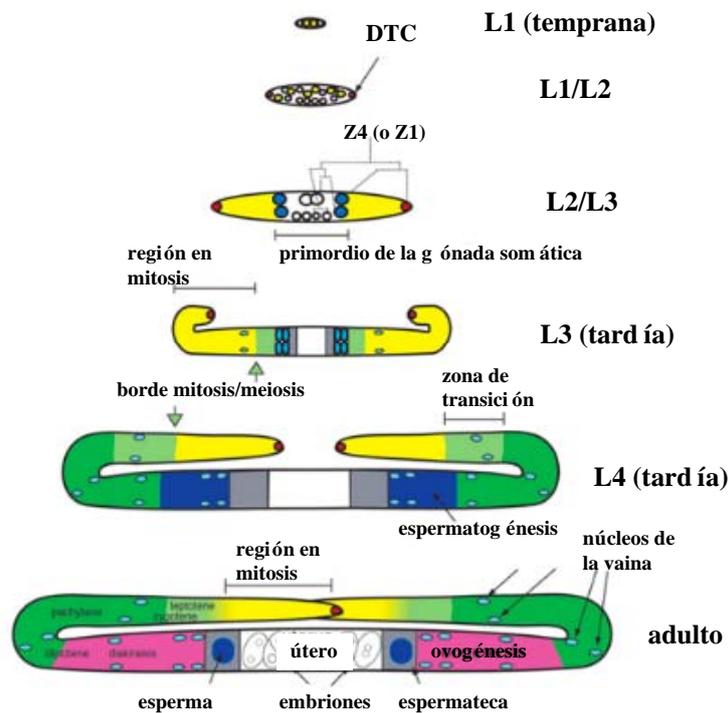
Todas las estructuras de la gónada somática del animal hermafrodita adulto, como son las células distales DTCs, las células de la vaina, las células de la espermateca, y el útero son derivadas de las Z1 y Z4, las cuales son descendientes del blastómero MS (Hubbard y Greenstein, 2000). En el macho adulto, la gónada es asimétrica con un solo brazo en forma de J, y las células Z1 y Z4 formarán las células de los vasos deferentes y la vesícula seminal. Las células Z1 y Z4 se generan relativamente tarde durante la embriogénesis y migran para asociarse con los precursores de la línea germinal. Los mecanismos que guían a las células Z1 y Z4 durante su migración hacia las células

germinales aún no se conocen claramente (Hubbard y Greenstein, 2000). En el caso de la diferenciación de las células somáticas, algunos de los destinos celulares en el embrión en estadios tempranos son especificados por dos factores de transcripción de origen materno: SKN-1 y PAL-1. Diversos estudios han demostrado que la transcripción de los genes *skn-1* y *pal-1* durante la embriogénesis se encuentra reprimida en los blastómeros de la línea germinal (Bowerman *et al.*, 1992; Bowerman *et al.*, 1993; Edgar *et al.*, 2001; Hunter y Kenyon, 1996). La represión transcripcional en los blastómeros de la línea germinal requiere de la proteína de origen materno PIE-1, la cual es un componente de los gránulos P y se encuentra presente de manera específica en los blastómeros de la línea germinal (Mello *et al.*, 1992; Mello *et al.*, 1996).

### **Gonadogénesis en el *C. elegans***

Inmediatamente después de eclosión del animal en el estadio L1, las células germinales primordiales (Z2 y Z3) se encuentran flanqueadas por los precursores de la gónada somática (Z1 y Z4). Estas cuatro células están separadas de los demás tejidos por la lámina basal de la gónada. Durante el desarrollo larvario, Z1 y Z4 se dividen para generar 143 células somáticas en el hermafrodita y 56 células en el macho (Hubbard y Greenstein, 2000).

Hacia la mitad del estadio L1, en el animal hermafrodita, Z1 y Z4 se dividen para formar las células distales DTCs, las cuales se localizan en los extremos anteriores de cada brazo de la gónada. Las células distales promueven la proliferación de las células germinales e inhiben las meiosis. Hacia el final del estadio larvario L1, en el animal hermafrodita se han formado 12 células somáticas descendientes de Z1 y Z4 y la línea germinal ha proliferado hasta aproximadamente 30 células. Durante L2/L3, 10 de las células somáticas se juntan en el centro para la formar la gónada somática. Las células germinales son relegadas de la parte central y son segregadas en dos poblaciones hacia los extremos anterior y posterior para formar los dos brazos de la gónada. Conforme avanza el desarrollo larval, las células somáticas en el centro de la gónada continúan dividiéndose para formar el útero y la espermateca. En el estadio L3 las regiones anterior y posterior de la gónada se elongan y en el estadio L4 el tejido gira 180 °C formando una gónada en forma de U (Hubbard y Greenstein 2000) (Fig. 5).



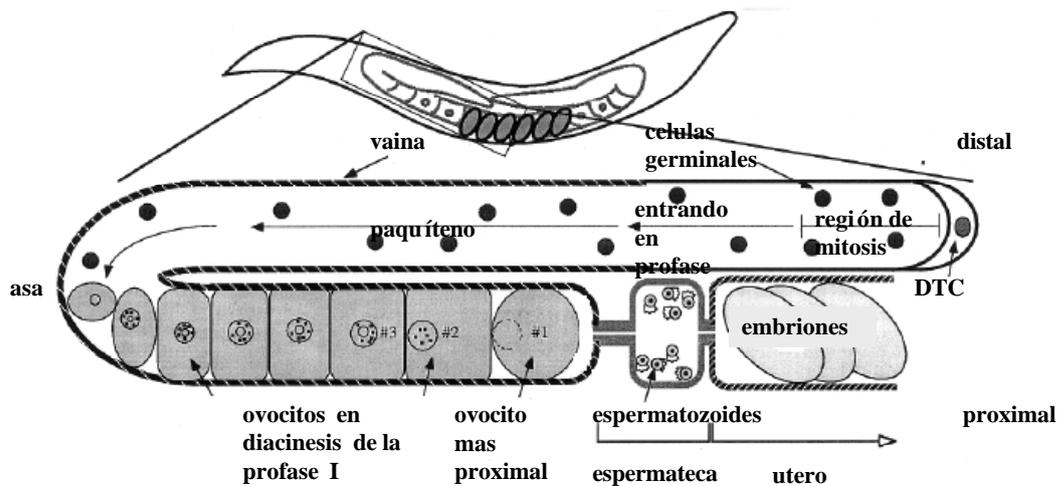
**Fig. 5. Representación esquemática del desarrollo de la gónada del hermafrodita** La figura ilustra el desarrollo post-embionario de la gónada del animal hermafrodita en los diferentes estadios. En amarillo se ilustran las células germinales que se encuentran en mitosis, en verde pálido se esquematiza la zona de transición (profase temprana de la meiosis I), en verde oscuro se muestra la zona de paquíteno, en azul oscuro se ilustran las células en espermatogénesis y en rosa las células en ovogénesis. El borde entre la mitosis y meiosis se comienza a apreciar en la etapa L3 tardía y se indica aquí con un gradiente en color amarillo/verde. De la gónada somática se muestra: las células DTC en color rojo, en azul claro se señalan los núcleos de las células de la vaina, en gris las células de la espermateca y en blanco se muestra el útero. Tomado de Hubbard y Greenstein. Introduction to the germ line (2005), WormBook, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.18.1, <http://www.wormbook.org>.

En los machos, las células Z1 y Z4 generan 10 células durante los estadios larvales L1 y L2. De estas células somáticas, 8 células se mueven únicamente hacia el extremo anterior originando una estructura asimétrica. Dos células somáticas (DTCs) se localizan en el extremo distal de la gónada. La función de las DTCs en el macho es promover la proliferación de las células germinales e inhibir la meiosis, mientras que el crecimiento de la gónada está relegado a la función de la célula de unión (male linker cell). El tejido gonadal se desarrolla primero con una dirección anterior y luego posteriormente hacia la cloaca (Wood, 1988). Durante L3 y L4 se forman las células

somáticas de la gónada, los vasos deferentes y la vesícula seminal (Hubbard y Greenstein, 2000).

La gónada del hermafrodita adulto está compuesta de dos tubos en forma de U que se encuentran unidos por el útero (Hubbard y Greenstein 2000). La gónada del *C. elegans* es un sincicio en el cual la población de las células germinales tienen membranas parciales. La parte distal de la gónada alberga a una población de células en mitosis las cuales son totipotenciales. Una señal proveniente de DTC mantiene a estas células en mitosis formando lo que se conoce como nicho de células totipotenciales. Conforme las células germinales se alejan de la célula distal la señal se pierde y las células entran en meiosis. Las primeras 40 células germinales de cada brazo de la gónada, que entran en meiosis se diferencian en 160 espermatozoides que se almacenan en cada una de las espermatecas. Una vez que los espermatozoides se han formado, durante el resto del periodo reproductivo del animal solamente se producen ovocitos. El ovocito más proximal madura con una señal proveniente de los espermatozoides y con esta señal las células somáticas de la vaina, que cubren a la gónada, se contraen moviendo al ovocito hacia la espermateca en donde es fecundado y posteriormente depositado en el útero (Fig. 6).

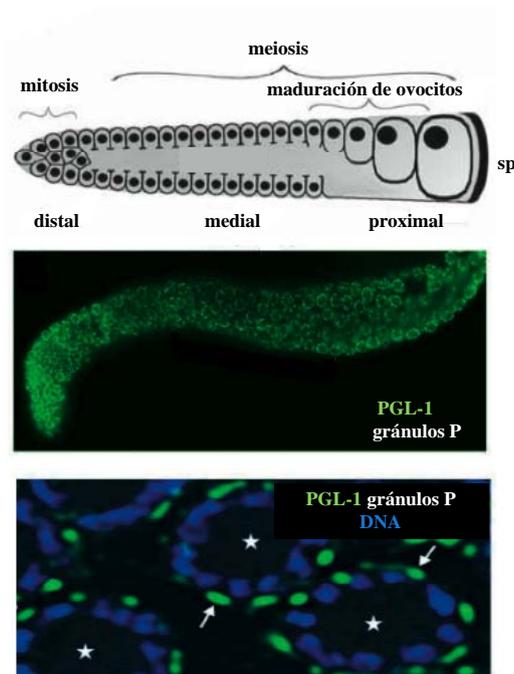
La señal de maduración de los ovocitos es la proteína MSP (Major Sperm Protein). Una mutación en el carboxilo terminal de la proteína MSP es capaz de promover la maduración de los ovocitos, pero no la contracción de las células de la vaina (Miller *et al.*, 2001). La gónada del macho presenta un solo tubo en forma de J y durante toda su etapa reproductiva produce únicamente espermatozoides (Hubbard y Greenstein, 2000).



**Fig. 6. Estructura de la gónada del hermafrodita adulto.** La gónada está compuesta de dos tubos en forma de U que se encuentran unidos por el útero. En la parte distal de la gónada se encuentran las células totipotenciales. Una señal proveniente de DTC mantiene a estas células en mitosis. Las células germinales que se alejan de la célula distal entran en meiosis. Las primeras 40 células germinales de cada brazo de la gónada, que entran en meiosis se convierten en 160 espermatozoides que se depositan en la espermateca. Una vez que los espermatozoides se han formado, solamente se producen ovocitos durante el resto del periodo reproductivo del hermafrodita. El ovocito más proximal madura con una señal proveniente de los espermatozoides y con esta señal las células somáticas de la vaina que cubren a la gónada se contraen moviendo al ovocito hacia la espermateca en donde es fecundado y posteriormente es depositado en el útero. Modificado de McCarter *et al.*, 1999.

### Los gránulos P en la línea germinal del *C. elegans*

Los gránulos P juegan un papel importante durante la especificación, el mantenimiento y el desarrollo de la línea germinal en el *C. elegans*. Las proteínas asociadas a los gránulos P del *C. elegans* son importantes para el desarrollo embrionario y el desarrollo de la línea germinal de este nematodo (Kawasaki *et al.*, 1998) (Fig. 4). Los gránulos P están formados de RNAs y numerosas proteínas, la mayoría de las cuales muestran uno o más motivos de unión a RNA (Anahita *et al.*, 2001). En algunos estadios del crecimiento del *C. elegans*, los gránulos P se encuentran asociados a los poros nucleares en la línea germinal, en donde se propone que reciben los transcritos que se desplazan desde el núcleo hacia el citoplasma (Pitt *et al.*, 2000) (Fig. 7).



**Fig. 7. Los gránulos P en la gónada del animal adulto.** A) En este esquema se muestra un solo brazo de la gónada en el cual se señalan tres regiones de la gónada adulta: la región distal en la cual las células germinales se encuentran dividiéndose por mitosis, la región medial en la cual las células entran en meiosis y la región proximal que muestra a las células germinales maduras. B) Se muestra la gónada de un animal silvestre teñida con un anticuerpo contra la proteína PGL-1, que es un componente de los gránulos P. C) Detalle de la distribución de los gránulos P alrededor del núcleo. En azul se muestran los núcleos de las células germinales teñidos con DAPI y en verde se detecta a PGL-1 en los gránulos P. Modificado de Pitt *et al.*, 2000.

### Proteínas componentes de los gránulos P

Algunos de los componentes que en el *C. elegans* se encuentran asociados a los gránulos P son: las proteínas de la familia PGL con motivos RGG, las proteínas GLH-1, -2, -3 y 4 con actividad de helicasa que pertenecen a la familia de proteínas DEAD y que tienen alta homología con la proteína Vasa de *Drosophila*, CGH-1 una helicasa de RNA, el factor de inicio de la traducción IFE-1, las proteínas Sm mejor conocidas por su papel en el splicing del RNA, las proteínas PIE-1, MEX-1, POS-1, OMA-1, y OMA-2 con motivos de dedos de zinc del tipo CCCH, MEX-3 y GLD-1 con dominios KH, y las poliadenilasas GLD-2 y GLD-3 (Tabla 1). Los únicos componentes que se sabe están presentes en los gránulos P durante todo el desarrollo del *C. elegans* son las proteínas PGL y GLH-1, -2, -3 y 4. No se ha encontrado ninguna mutación que resulte en la pérdida total de los gránulos P (Strome, 2005).

**Tabla. 1 Proteínas presentes en los gránulos P**

Proteínas	dominios/función	asociado a gránulos P en:	
		embriónes	adultos
PGL-1	RGG	si	si
PGL-2	no	no	si
PGL-3	RGG	si	si
GLH-1	Dominios helicasa tipo DEAD, 4 dedos Zn CCHC	si	si
GLH-2	Dominios helicasa tipo DEAD, 6 dedos Zn CCHC	si	si
GLH-3	Dominios helicasa tipo DEAD, 2 dedos Zn CCHC	si	si
GLH-4	Dominios helicasa tipo DEAD, 5 dedos Zn CCHC	si	si
CGH-1	Dominios helicasa tipo DEAD	si	si
PIE-1	2 dedos Zn CCHC	si	no
MEX-1	2 dedos Zn CCHC	si	si <sup>a</sup>
POS-1	2 dedos Zn CCHC	si	si <sup>a</sup>
OMA-1 <sup>b</sup>	2 dedos Zn CCHC	si	si <sup>a</sup>
OMA-2 <sup>b</sup>	2 dedos Zn CCHC	si	si <sup>a</sup>
MEX-3	2 dominios KH	si	si <sup>a</sup>
GLD-1	Dominio KH; represor de traducción	si	no
GLD-2	(PAP) poliadenilasa citoplasmática	si	no
GLD-3	Dominios tipo KH, PAP	si	moderado
proteínas Sm	Factores de splicing	si	si
IFE-1	Factor 4E de inicio de la traducción	desconocido <sup>c</sup>	desconocido <sup>c</sup>

a en ovocitos

b OMA-1 y OMA-2 fueron nombradas como MOE-1 y MOE-2, respectivamente, por Shimada *et al.*, 2002.

c GFP- IFE-1, bajo el promotor de *pie-1*, se asocia con gránulos P en embriones.

La tabla presenta una lista de las proteínas identificadas en los gránulos P. En la primera columna se enlistan las proteínas que se asocian a estas estructuras. En la segunda columna se indican los dominios que se han identificado en estas proteínas. En la tercera de estas

proteínas a los gránulos P se presenta en el embrión, en animales adultos o en ambos. Tabla tomada de Strome, S. Specification of the germ line (2005), WormBook, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.9.1, <http://www.wormbook.org>.

La proteína PGL-1 (P granules abnormality) es una proteína de unión a RNA de 730 aminoácidos que contiene en el extremo carboxilo terminal un motivo RGG comúnmente encontrado en proteínas que se unen a RNA (Kawasaki *et al.*, 1998). PGL-1 está presente en los gránulos P a lo largo de todos los estadios de desarrollo y es esencial para la fertilidad del *C. elegans*. El mensajero de *pgl-1* está expresado específicamente en la línea germinal de machos y de hermafroditas. Los animales mutantes para el gen *pgl-1* son estériles debido a una reducida proliferación de la línea germinal y a defectos en la gametogénesis (Kawasaki *et al.*, 1998). PGL-3 es un componente constitutivo de los gránulos P, mientras que PGL-2 se asocia a gránulos P en el desarrollo post-embriionario. Los hermafroditas mutantes en los genes *pgl-2* y *pgl-3* muestran defectos en la proliferación de la línea germinal, así como en la producción de gametos y embriones viables (Kawasaki *et al.*, 2004). Un ensayo de dos híbridos demostró que las proteínas PGL-1, PGL-2 y PGL-3 interactúan entre ellas, sin embargo la localización de cada proteína en los gránulos P no depende de su interacción. Este estudio también reveló que PGL-1 interactúa físicamente con el factor de inicio de la traducción IFE-1 (Kawasaki *et al.*, 2004).

Las proteínas GLH -1, -2, -3 y -4 fueron las primeras proteínas identificadas en los gránulos P. Los genes *glh* (germline helicase), presentan alta homología con el gen *vasa* de *Drosophila*. Las proteínas GLH-1 a -4 contienen nueve motivos conservados característicos de las helicasas de RNA pertenecientes a la familia DEAD así como un extremo amino terminal rico en residuos de glicina (GFGGX<sub>n</sub>). Estas proteínas contienen múltiples dedos de zinc del tipo CCHC. Las proteínas GLH-1 a -4 se encuentran presentes de manera constitutiva en los gránulos P en todos los estados de desarrollo y son redundantes para el funcionamiento de la línea germinal. Los animales

hermafroditas RNAi en los genes *glh -1* y *-4* son estériles ya que muestran una reducción de la producción de las células germinales (Kathleen *et al.*, 2000).

Otra proteína asociada a los gránulos P es CGH-1 (conserved germline RNA helicase). Esta helicasa se expresa específicamente en la línea germinal durante la gametogénesis y en los blastómeros P durante la embriogénesis temprana. La inhibición de la expresión de *cgh-1* por RNAi resulta en la producción de esperma no funcional y provoca la muerte por apoptosis de los ovocitos en desarrollo (Navarro *et al.*, 2001).

La proteína IFE-1 es una de las cinco isoformas del factor de inicio de la traducción eIF4E que se encuentra asociado a los gránulos P. Se piensa que esta asociación es dependiente de su interacción con PGL-1. IFE-1 es específicamente requerido durante la espermatogénesis a elevadas temperaturas. La asociación de este factor a los gránulos P sugiere que estas estructuras están involucradas en la regulación traduccional de sus RNA mensajeros contenidos (Anahita *et al.*, 2001).

MEX-1 (muscle excess) es una proteína con dedos de zinc requerida para la segregación adecuada de los gránulos P durante las primeras divisiones embrionarias. Durante la embriogénesis, la falta de *mex-1* ocasiona la localización anormal de PIE-1 en blastómeros somáticos, así como una asociación reducida con gránulos P, ésto provoca la pérdida de la línea germinal y una inadecuada diferenciación del tejido somático (Guedes y Priess, 1997).

Las proteínas Sm son componentes del complejo snRNPs (ribonucleoproteínas nucleares pequeñas) y participan en la catálisis durante la edición o splicing de los RNA mensajeros (Will y Luhrmann, 2001). En levaduras las proteínas Lsm (Sm-like) interactúan con RNA mensajeros para promover su degradación y se requieren para el procesamiento de RNA ribosomales y RNA de transferencia (Bouveret *et al.*, 2000; Tharun y Parker, 2001; Beggs *et al.*, 2005). Trabajos recientes han mostrado que las proteínas Sm son componentes de los gránulos P. De manera específica, la falta de estas proteínas y no de otros factores del complejo espliceosoma, provocan defectos en la localización y distribución de los gránulos P durante la embriogénesis, sugiriendo que este proceso es independiente de su actividad de edición de RNA mensajeros (Barbee *et*

*al.*, 2002). Las proteínas Sm son necesarias para mantener la expresión de PIE-1, GLD-1 y NOS-2 en los precursores de la línea germinal (Barbee *et al.*, 2006).

El gen *pie-1* (pharynx and intestine in excess) codifica para una proteína con dos dedos de zinc y se distribuye uniformemente en los ovocitos así como en embriones recién fertilizados. Los embriones mutantes para este gen no desarrollan línea germinal (Mello *et al.*, 1996). Durante la embriogénesis temprana PIE-1 se detecta sólo en los blastómeros germinales y es degradada de los blastómeros somáticos por ubiquitinación (DeRenzo *et al.*, 2003). Se ha sugerido que PIE-1 bloquea el proceso de elongación de la transcripción de los RNA mensajeros en los blastómeros de la línea germinal mediante la inhibición de factores que se asocian y activan a la RNA polimerasa II a través de la fosforilación de su dominio carboxilo terminal (CTD) (Seydoux y Dunn, 1997; Batchelder *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2003). Se piensa que este silenciamiento es necesario para suprimir la expresión de factores de diferenciación somáticos en los precursores de la línea germinal (Seydoux *et al.*, 1996).

Otros componentes de los gránulos P son las proteínas OMA-1, -2 y -3 que presentan motivos de dedos de zinc CCCH. En *C. elegans* se han identificado tres de estos genes *oma-1*, -2 y -3 relacionados funcional y estructuralmente (Shimada *et al.*, 2002). Las proteínas OMA-1 a -3 se acumulan de forma exclusiva en los gránulos P durante la embriogénesis y participan en la distribución adecuada de los componentes PGL-1, MEX-1 y PIE-1 los cuales tienen un papel preponderante en la especificación del linaje germinal (Shimada *et al.*, 2006). Al igual que en la embriogénesis, las proteínas OMA-1 a -3 co-localizan con los gránulos P en el citoplasma de los ovocitos y participan de manera redundante en la maduración éstos (Detwiler *et al.*, 2001; Shimada *et al.*, 2002).

POS-1 (posterior segregation) es otra proteína con dominios de zinc tipo CCCH y es crucial durante la especificación del linaje germinal. POS-1 participa en el establecimiento de la polaridad del embrión durante la segunda fase de la división asimétrica en las células germinales (Tabara *et al.*, 1999).

Las proteínas GLD-1 (germline defective) y MEX-3 presentan uno y dos dominios KH respectivamente (Jones *et al.*, 1996; Draper *et al.*, 1996). Estas proteínas participan en la inhibición de la traducción del RNA mensajero de origen materno del gen *pal-1* en la

línea germinal y en la embriogénesis temprana en la determinación de los blastómeros germinales (Mootz *et al.*, 2004). GLD-1 participa en la represión de la traducción de varios RNA mensajeros de origen materno, mientras que el único blanco identificado para MEX-3 es el RNA mensajero de *pal-1*. En la gónada del animal adulto, GLD-1 se localiza en el citoplasma de los ovocitos que inician la meiosis en la parte distal y MEX-3 se encuentra en los ovocitos en diferenciación en la parte proximal (Jones *et al.*, 1996; Draper *et al.*, 1996). El RNA mensajero de *pal-1* en su extremo 3' UTR contiene un elemento de represión para la línea germinal (GRE), a través del cual se unen GLD-1 y MEX-3, inhibiendo su traducción. Usando gradientes de sacarosa, se ha mostrado que el RNA mensajero de *pal-1* co-sedimenta con polisomas, en base a esto se ha sugerido que posiblemente GLD-1 y MEX-3 inhiben la traducción a nivel de la elongación, terminación o mediante la degradación del polipéptido naciente de este RNAm (Hunter y Kenyon, 1996; Mootz *et al.*, 2004).

### **RNAs asociados a los gránulos P en las células germinales del *C. elegans***

Se han encontrado pocos RNAs asociados a gránulos P. Los RNA mensajeros en los granulos P hasta ahora identificados son *nos-2*, *pos-1*, *mex-1*, *mex-3*, *skn-1*, y *gld-1*. *nos-2* es uno de los tres homólogos de *nanos* de *Drosophila* en *C. elegans*. Este gen participa en la incorporación de las PGCs en la gónada somática y actúa de manera redundante con *nos-1* en la sobrevivencia y proliferación de las células germinales durante el desarrollo post- embrionario (Subramaniam y Seydoux, 1999). La función de las proteínas de los genes *pos-1*, *mex-1*, *mex-3*, *skn-1* y *gld-1* se describió en los párrafos anteriores.

Los seis RNA mensajeros mencionados anteriormente son de origen materno, se localizan en los gránulos P, participan en el desarrollo embrionario y post- embrionario del linaje germinal. La mayoría de los RNA mensajeros asociados a los gránulos P pertenecen a la clase de transcritos que son retenidos selectivamente en los blastómeros germinales y degradados en los blastómeros somáticos (Seydoux y Fire, 1994). En los gránulos P no se han identificado RNA estructurales (5S, 5.8S, 18S, y 26S), ni tampoco RNAs que generalmente son abundantes en las células como los de actina o tubulina (Schisa *et al.*, 2001). La mayoría del tiempo los gránulos P se encuentran asociados a los poros nucleares en la línea germinal y se sugiere que participan en la regulación y

estabilización de los RNA mensajeros, debido a que tienen acceso a la mayoría de los transcritos que se desplazan desde el núcleo hacia el citoplasma.

### **Las helicasas de RNA**

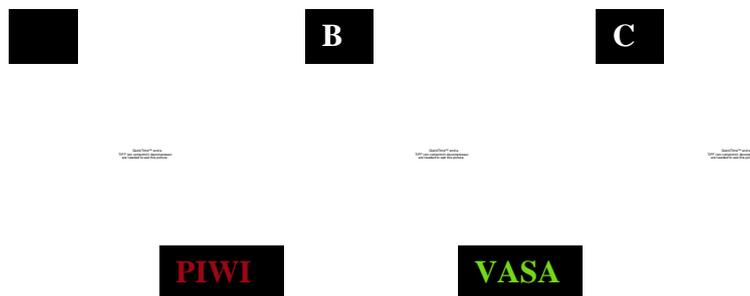
La molécula de RNA es sintetizada como una sola hebra lineal de nucleótidos, la cual puede adoptar estructuras altamente ordenadas a través del apareamiento de sus bases entre sí misma o con otras moléculas de RNA. Las helicasas de RNA son enzimas que participan en varios procesos celulares que involucran a la molécula de RNA y catalizan la alteración de las estructuras formadas; dichos procesos celulares son: transcripción, traducción, splicing, biogénesis de los ribosomas, estabilidad del RNA, transporte, recambio del RNA y degradación (Linder y Lasko, 2006; Mohamed, 2005). Trabajos recientes sugieren que las helicasas de RNA remodelan complejos de ribonucleoproteínas, ya sea promoviendo la interacción entre estos o terminando dichas interacciones (Fairman *et al.*, 2004; Jankowsky *et al.*, 2001). La secuencia de sus aminoácidos se caracteriza por la presencia de un dominio de helicasa en la parte central de la proteína (Linder *et al.*, 1989).

Bioquímicamente las helicasas de RNA son capaces de unir e hidrolizar un nucleótido trifosfato (NTP), principalmente el trifostato de adenosina (ATP). Ésta actividad hidrolítica es importante para su función (Tanner *et al.*, 2003). Basándose en la secuencia de su dominio helicasa, éstas proteínas se han clasificado en familias, como son la familia DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) y DEAH (Asp-Glu-Ala-His). A diferencia de las helicasas de DNA que participan en la replicación, la actividad de las helicasas de la familia DEAD no es procesiva y está limitada al desenrollamiento de segmentos pequeños (Benz *et al.*, 1999). El dominio de helicasa por sí solo no es suficiente para reconocer el RNAm blanco de manera muy específica. Sin embargo, algunos de los dominios de ésta proteína en las regiones amino y carboxilo tienen secuencias de unión a RNA o de interacción con otras proteínas que le ayudan a reconocer los RNAm a los que se unen (Mohamed, 2005).

## La proteína Vasa: una helicasa de RNA esencial para la función de la línea germinal

Vasa fue una de las primeras proteínas tipo DEAD que fueron identificadas en *Drosophila* (Linder *et al.*, 1989) y se sabe que participa en la traducción de RNAs mensajeros específicos (Linder y Lasko, 2006). Esta proteína está muy conservada y se ha identificado en diferentes organismos incluyendo mamíferos, en donde participa en el desarrollo de la línea germinal (Raz, 2000).

La función de Vasa se ha estudiado con mayor detalle en *Drosophila* donde se sabe que participa en la ovogénesis, la formación de los segmentos abdominales en el embrión y la especificación de la línea germinal. El citoplasma germinal es conocido en *Drosophila* como gránulos polares (Mahowald, 1968) y entre sus componentes se encuentran las proteínas Oskar, Vasa, Nanos, Tudor, Piwi entre otras. (Saffman y Lasko, 1999, Heather *et al.*, 2006) (Fig. 8).



**Fig. 8. Los gránulos polares en el embrión de *Drosophila*.** La figura muestra la localización posterior de los gránulos polares en un embrión de *Drosophila* en el ciclo 5 de desarrollo. **A)** En rojo se muestra la localización de la proteína PIWI, un componente de los gránulos polares. **B)** En verde se muestra la localización de VASA en los gránulos polares. **C)** Se muestra la co-localización de estas dos proteínas en los gránulos polares. Modificado de Heather *et al.*, 2006.

La proteína Vasa se requiere para el ensamblaje y la función del citoplasma germinal. Las mutantes en este gen tienen un inadecuado ensamblaje de los gránulos polares, así como una ovogénesis anormal. La progenie de moscas mutantes heterocigotas para el gen *vasa* puede completar la embriogénesis debido a la herencia materna de la proteína. Sin embargo, no expresan Vasa posteriormente en el desarrollo, y se convierten en hembras infértiles. Por otro lado, las mutantes en *vasa* que carecen de esta proteína durante su

desarrollo embrionario se mueren, debido a que la línea germinal no se forma correctamente (Hay *et al.*, 1988; Hay *et al.*, 1990; Lasko y Ashburner, 1990; Liang *et al.*, 1994).

La proteína Vasa presenta alta homología con el factor de inicio de la traducción eIF4A, otra proteína helicasa de la familia DEAD (Lasko y Ashburner, 1988). La actividad helicasa de este factor traduccional es la de disociar las estructuras secundarias que se forman en el extremo 5' de los RNA mensajeros favoreciendo la unión de éstos con los ribosomas, regulando así el inicio de la traducción de mensajeros específicos (Gingras *et al.*, 1999). Durante el desarrollo embrionario Vasa interacciona con el factor de inicio de la traducción eIF5B a través de su extremo carboxilo terminal (Carrera *et al.*, 2000; Johnstone y Lasko, 2004). Esta interacción regula positivamente la traducción de varios RNA mensajeros tales como: *gurken* durante la progresión de la ovogénesis; así como de *oskar*, *nanos* y *tudor* durante la especificación de las células germinales (Breitwieser *et al.*, 1996; Markussen *et al.*, 1997; Styhler *et al.*, 1998; Saffman y Lasko, 1999). Además de esta interacción importante para su función, Vasa interacciona con otras proteínas tales como Gustavus, la cual localiza a Vasa en el plasma polar y Fat Facets que estabiliza a Vasa en esta región impidiendo su degradación (Liu *et al.*, 2003; Styhler *et al.*, 2002).

En ratón, el homólogo de Vasa es Mvh, cuya expresión es específica de la línea germinal (Leroy *et al.*, 1989). Ratones machos mutantes homócigos para el gen de Mvh son capaces de formar células germinales primordiales (PGCs), sugiriendo que Vasa no es esencial en el desarrollo de la línea germinal. Sin embargo, estos animales son infértiles, a diferencia de las hembras que son fértiles. Esta diferencia se debe a que en las mutantes en Mvh, la espermatogénesis se encuentra bloqueada en la fase de leptóteno y cigóteno de la meiosis y por lo tanto estas células mueren por apoptosis, indicando con ello que este gen juega un papel para la progresión de la espermatogénesis (Tanaka *et al.*, 2000).

En humano, la proteína Vasa se expresa de manera abundante y específica en el citoplasma de las células germinales, así como en estadios tempranos de la embriogénesis en ambos sexos (Castrillon *et al.*, 2000). En estudios histológicos, se ha observado que la proteína Vasa y su mensajero se expresan en tejidos que presentan

tumores en las células germinales. Este resultado sugiere que Vasa podría ser utilizado como un biomarcador en el diagnóstico de tumores en estas células (Zeeman *et al.*, 2002).

Belle es una helicasa de RNA tipo DEAD de *Drosophila*. Belle muestra una alta homología con las proteínas Vasa de *Drosophila* y Ded1p de *Saccharomyces cerevisiae*, la cual se sabe está implicada en el proceso de inicio de la traducción (Chuang *et al.*, 1997; De la Cruz *et al.*, 1997). En ensayos de complementación se ha demostrado que la función de Dep1 puede ser sustituida por la proteína Belle sugiriendo que la función de esta helicasa de RNA en la traducción se ha conservado (Johnstone *et al.*, 2005). En *Drosophila*, la ausencia de Belle causa un retraso en el crecimiento de larvas y provoca esterilidad en hembras y machos. Las hembras homocigas para este gen llevan a cabo de manera normal el inicio de la ovogénesis, sin embargo alrededor del estadio 9 se observan defectos en este proceso y la mayoría de las cámaras de huevo degeneran. Belle co-localiza con Vasa en el plasma germinal así como en la parte posterior del ovocito en *Drosophila* (Johnstone *et al.*, 2005). En humano el homólogo de Belle es la proteína DDX3 o DBX (Mamiya y Worman, 1999) que se encuentra codificada en el cromosoma X. DDX3 se expresa tanto en el soma como en la línea germinal e interacciona con proteínas de la cápside del virus de la hepatitis C. La función de DDX3 aún no se conoce, pero se ha propuesto que la patogénesis del virus es posible gracias a la manipulación de la función de esta helicasa de RNA (Mamiya y Worman, 1999). El homólogo en el cromosoma Y es DBY y se expresa específicamente en la línea germinal del macho. La función de DBY es crucial durante la espermatogénesis y se cree que es el factor responsable de la esterilidad en la enfermedad azoospermia (Foresta *et al.*, 2000; Lahn y Page, 1997).

En el *C. elegans* el homólogo de *vasa* se nombró como *vbh-1* (vasa-belle like), por su similitud con *vasa* (35%) y *belle* (39 %) de *Drosophila*. La proteína VBH-1 se expresa en la línea germinal de animales hermafroditas y machos. VBH-1 se encuentra localizada en el citoplasma de las células germinales y es abundante en gránulos P en ambos sexos (Salinas *et al.*, 2007). VBH-1 es esencial para la función de la línea germinal en el nematodo *C. elegans*. Los animales hermafroditas *vbh-1(RNAi)* tienen un número reducido de hijos y un porcentaje pequeño de embriones se mueren durante la embriogénesis (Salinas *et al.*, 2007). Las células germinales en estos animales presentan

una serie de anormalidades como la presencia de ovocitos acumulados en la gónada y defectos en el esperma. Además de estos defectos, los animales hermafroditas carentes de la proteína VBH-1 no completan la espermatogénesis y realizan el cambio de espermatogénesis a ovogénesis de forma prematura en el estado larval L4 (Salinas *et al.*, 2007).

Aunque se conocen los fenotipos resultantes de la falta de VBH-1, aún no se han identificado los RNA mensajeros blancos de su supuesta actividad de helicasa. Por eso creemos que su función en la línea germinal podría llevarse a cabo por la interacción con otras proteínas, algo similar a lo mostrado en la interacción de Vasa con eIF5B. Por lo tanto, al ser VBH-1 una proteína de unión a RNA es posible que interaccione con proteínas que participan en procesos del metabolismo del RNA como: splicing, transporte, traducción o degradación durante el desarrollo de la línea germinal del *C. elegans*.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

El objetivo principal de esta investigación es aislar proteínas que interaccionen físicamente con la helicasa de RNA VBH-1 y que nos ayuden a entender su función en las células germinales, así como aislar más componentes de la línea germinal del *C. elegans*.

### **Objetivos particulares**

- Utilizando el sistema de dos híbridos, identificar proteínas que interaccionen físicamente con VBH-1 a partir de una biblioteca de cDNA del *C. elegans*.
- Estudiar el fenotipo causado por la falta de expresión de las proteínas aisladas, por medio de RNA de interferencia.

## *MATERIALES Y MÉTODOS*

### **El ensayo de dos híbridos: un sistema para detectar interacciones entre proteínas**

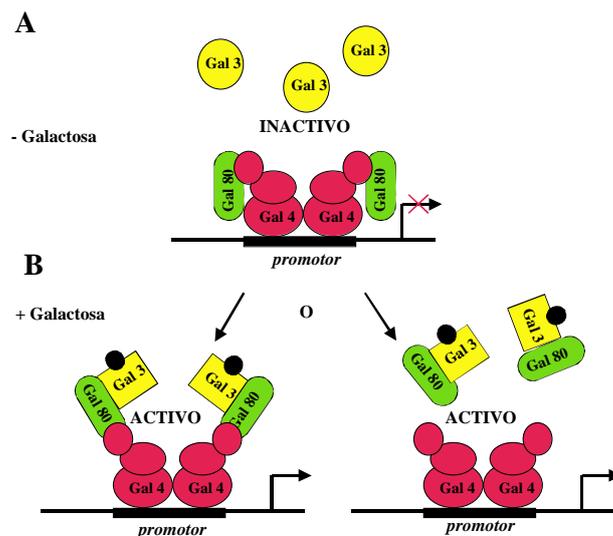
El ensayo de dos híbridos en levadura o Y2H (yeast two-hybrid), es un sistema genético implantado a finales de los ochenta (Fields y Song 1989), que permite la detección *in vivo* de interacciones proteína-proteína, sin la necesidad de disponer de anticuerpos o proteínas purificadas.

El sistema de dos híbridos ha tenido tres aplicaciones fundamentales: a) probar la interacción de un par de proteínas, que utilizando otros criterios se sospecha que interaccionan, b) definir el dominio o los aminoácidos que juegan un papel importante en la interacción, c) tamizar bibliotecas para identificar proteínas que interaccionen con una proteína dada (Solmaz, 2003). Además, este procedimiento experimental ha permitido iniciar los estudios de las redes de interacción entre proteínas funcionales (interactomas), que luego pueden ser analizadas topológicamente facilitando la integración con otros datos biológicos y la generación de modelos (Medina, 2005).

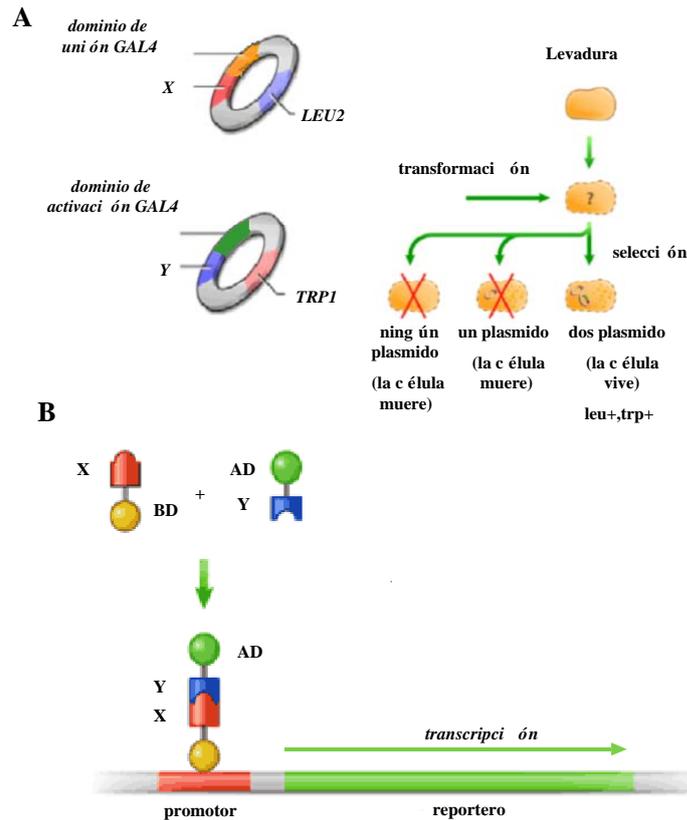
Para conocer cómo funciona el sistema de dos híbridos es necesario entender el proceso del metabolismo de la galactosa en la levadura. La galactosa es importada a la célula y convertida a galactosa-6-fosfato por la acción de 6 enzimas (GAL-1, GAL-2, PMG-2, GAL-7, GAL-10, MEL-1), las cuales son reguladas transcripcionalmente por las proteínas GAL-80, GAL-3, y GAL-4. Ésta última proteína juega un papel importante como transactivador capaz de unirse a DNA. En ausencia de galactosa, GAL-80 se encuentra unido a GAL-4 e inhibe su actividad transcripcional. En presencia de galactosa, GAL-3 se une a GAL-80 y provoca un cambio conformacional en esta proteína, lo cual permite liberar de su unión a GAL-4 y ejercer su función como activador transcripcional (Solmaz, 2003) (Fig. 9).

Al igual que otros activadores transcripcionales, GAL-4 es una proteína modular que requiere de un dominio de unión a DNA (DB por DNA-binding) y un dominio de activación (AD por activation domain). El sistema de doble híbrido aprovecha el hecho de que GAL-4 no puede funcionar como activador transcripcional a menos que se una

físicamente a un dominio de activación. Basados en estas observaciones, el ensayo de doble híbrido se lleva a cabo expresando en la levadura dos proteínas de fusión, una será la “carnada” y otra la “presa”. Para obtener estas proteínas híbridas el segmento que codifica el dominio de unión al DNA de GAL-4 se fusiona con el gen de la proteína usada como “carnada” y el segmento que codifica para el dominio de activación de GAL-4 se fusiona al gen de la proteína “presa”. Estas dos construcciones se integran en diferentes vectores y se introducen por transformación a una levadura portadora de un gen reportero. Si las dos proteínas interactúan físicamente el sistema se reconstituye y el factor transcripcional GAL-4 puede iniciar la transcripción del gen reportero (Solmaz, 2003) (Fig. 10). Cuando se usa el sistema de GAL-4, para evitar interferencias con GAL-4 y GAL-80 endógenos, las levaduras receptoras deben tener deleciones en estos genes, debido a esto las células de la levadura con estas deleciones crecen más lentamente que las silvestres.



**Fig. 9. Diagrama del metabolismo de la galactosa.** La galactosa es importada a la célula y convertida a galactosa-6-fosfato por la acción de 6 enzimas (GAL-1, GAL-2, PMG2, GAL7, GAL10, MEL1), las cuales son reguladas transcripcionalmente por las proteínas GAL-80, GAL-3, y GAL-4. **A)** En ausencia de galactosa, GAL-80 se encuentra unido a GAL-4 e inhibe su actividad transcripcional. **B)** En presencia de galactosa, GAL-3 se une a GAL-80 y provoca un cambio conformacional en esta proteína, lo cual permite liberar de su unión a GAL-4 y ejercer su función como activador transcripcional. Modificado de Solmaz, 2003.



**Fig. 10. Esquema general del sistema de dos híbridos.** El sistema de dos híbridos permite la detección *in vivo* de interacciones proteína-proteína. **A)** La figura muestra que para probar la interacción entre proteínas, una proteína de interés X se une al dominio de activación del factor transcripcional GAL-4 y la otra proteína Y se fusiona al dominio de unión a DNA de GAL-4. Estas proteínas se utilizan para transformar una cepa de levadura. Las levaduras que hayan obtenido los dos plásmidos se complementarán y podrán crecer en un medio selectivo. **B)** En esta sección se muestra que cuando la proteína de interés X usada como “cazadora” se une a la proteína Y que es la “presa”, el factor GAL-4 es reconstituido y activa la transcripción de un gen reportero, el cual permite visualizar la interacción. Modificado de [www.scq.ubc.ca/the-yeast-two-hybrid-assay-an-exercise-in-experimental-eloquence](http://www.scq.ubc.ca/the-yeast-two-hybrid-assay-an-exercise-in-experimental-eloquence).

Uno de los reporteros más utilizados es el gen *lacZ* de *E. coli* que codifica para la enzima  $\beta$ -galactosidasa y cuya expresión depende del promotor del gen GAL-1. Las células que reciben ambos genes y que reconstituyen el sistema se tiñen de azul cuando se encuentran en presencia de X-gal, un sustrato inicialmente incoloro de la  $\beta$ -galactosidasa. La hidrólisis del X-gal produce un compuesto (indoxil) que en contacto con el aire se transforma en índigo insoluble, el cual presenta un intenso color azul. Aquellas colonias que estén expresando la enzima se tornarán de un color azul más o

menos intenso en función de la cantidad de enzima que estén expresando (Solmaz, 2003).

### **Condiciones experimentales del ensayo de dos híbridos**

Los experimentos de doble híbrido en levadura (Fields y Song, 1989) se efectuaron utilizando el sistema de Invitrogen, de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el fabricante las cuales se resumen a continuación.

En el laboratorio previamente se había iniciado el ensayo de doble híbrido, en el cual se usó como “carnada” la secuencia completa del cDNA de *vbh-1* (isoforma b: 641 aa) fusionada al dominio de unión a DNA del factor transcripcional GAL-4 y se clonó en el vector pPC98 (Invitrogen) en los sitios *Sma* I y *Spe* I (plásmido pLV1). Por otro lado, se utilizó una biblioteca de cDNA (amablemente donada por el Dr. Marc Vidal) la cual fue elaborada utilizando los RNA mensajeros de varios estadios del desarrollo del *C. elegans* fusionada en marco al dominio de activación de GAL-4 en los sitios de corte de las enzimas *Not* I y *Sal* I del vector pPC86 (Invitrogen). La biblioteca y el plásmido pLV1 fueron utilizados para cotransformar a la cepa MaV103 de *Saccharomyces cerevisiae* (MATa, leu2-3, 112, trp1-901, his3Δ200, ade2-101, gal4Δ, gal80Δ, SPAL10::URA3, GAL1::lacZ, HIS3<sub>UAS GAL1</sub>::HIS3 @ LYS2, can1<sup>R</sup>, cyh2<sup>R</sup>).

Las células transformadas fueron a continuación sembradas en medios selectivos adecuados (sin leucina y sin triptofano). Para seleccionar las proteínas que interactúan con VBH-1 se usaron los genes reporteros de auxotrofia para histidina y *Lac Z*. Las levaduras que resultaron positivas para el ensayo se crecieron en medio líquido SD sin leucina y sin triptofano (Bio 101) a una temperatura de 30 °C y en agitación constante durante 2 días. De cada una de las clonas se hicieron alícuotas con glicerol al 15 % que se congelaron y guardaron a -70 °C.

El trabajo de esta tesis comenzó con el análisis de cada una de las clonas positivas del ensayo de doble híbrido y se describe a continuación.

### *Purificación del DNA plasmídico de la levadura*

Las clonas de levaduras positivas para el ensayo de dos híbridos que se habían almacenado a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ , se estriaron para colonia aislada en cajas Petri con medio SD Leu<sup>-</sup>, Trp<sup>-</sup> (Bio 101) y se crecieron a  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 3 días. Posteriormente, con un palillo estéril se tomó una colonia aislada y se volvió a crecer en medio líquido SD Leu<sup>-</sup>, Trp<sup>-</sup> a  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  y en agitación constante durante 2 días. Los plásmidos fueron aislados de acuerdo a las especificaciones del estuche de purificación de plásmido de levadura RPM (Bio 101).

### **Transformación de bacterias *E. coli***

Los plásmidos de la levadura aislados fueron electroporados en la cepa *KC8* de *Escherichia coli*. Las bacterias de la cepa *KC8* tienen varias auxotrofías que pueden ser complementadas con los marcadores de los plásmidos de la levadura, por lo que podemos seleccionar los plásmidos de la biblioteca de cDNA. Las auxotrofías leuB600 y trpC 9830 pueden ser complementadas con los genes LEU2 y TRP1 de los plásmidos pPC98 y pPC86 respectivamente.

Las células *KC8* electro-competentes se prepararon como se describe a continuación: una colonia de bacterias fue inoculada en 5 ml de medio LB adicionado con  $50\text{ }\mu\text{g/ml}$  de kanamicina y se creció en agitación constante a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante una noche. A la mañana siguiente, 2.5 ml de este cultivo se inocularon en 500 ml de LB y dejó crecer a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta alcanzar una D.O.<sub>600nm</sub> de 0.5. Posteriormente, las células se transfirieron a tubos para centrifuga y se mantuvieron en hielo durante 15 min. Las células se recuperaron por centrifugación a  $4^{\circ}\text{C}$  a  $3500\text{ g}$  durante 15 min. El sobrenadante se desechó por decantación y la pastilla se resuspendió en 25 ml de agua estéril fría, posteriormente se agregó un volumen de agua estéril fría necesario para tener 500 ml. Este paso se repitió una vez más, pero esta vez se resuspendió la pastilla en 250 ml de agua y se volvió a centrifugar. El sobrenadante se desechó y la pastilla se resuspendió en 25 ml de glicerol esteril frío (volumen final 10 %). Las células se transfirieron a tubos para centrifuga con capacidad de 50 ml y se centrifugaron a  $4500\text{ rpm}$  en un rotor Sorvall SS-34 a  $4^{\circ}\text{C}$  por 15 min. Las bacterias electro competentes se recuperaron en un volumen final de 1.5 ml de glicerol frío (10 %) y se hicieron alícuotas de  $500\text{ }\mu\text{l}$  cada una, las cuales fueron congeladas inmediatamente en nitrógeno líquido y almacenadas a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  para su uso posterior.

Para la electro-transformación de *E. coli* se mezclaron en tubo de 1.5 ml (Eppendorf), 40  $\mu$ l de bacterias electrocompetentes y 4 ng del plásmido aislado de la levadura. Como control positivo de la transformación se mezclaron 40  $\mu$ l de bacterias electrocompetentes y 4 ng del plásmido pPC86, el control negativo fueron células electrocompetentes sin DNA. Es importante que el plásmido esté resuspendido en un amortiguador de baja fuerza iónica o de preferencia agua, en este caso se usó agua milli Q estéril, debido a que un medio salino puede conducir la electricidad. La mezcla de bacterias y DNA se transfirió a celdas de electroporación estériles de 0.2 cm (USA Scientific), las cuales se mantuvieron en hielo antes de ser utilizadas. La electro-transformación se llevó a cabo utilizando un electroporador de BioRad en el cual la mezcla se sometió a un alto voltaje (2.5 kV) por aproximadamente 4 segundos. Para recuperar las bacterias se agregó 1 ml de medio SOC y se dejó incubar por 1 h a 37°C en agitación constante a 250 rpm. Para finalizar, las bacterias se recuperaron centrifugándolas a 8000 rpm durante 30 segundos y se sembraron en placa.

Debido a que las levaduras positivas para el doble híbrido, contenían a los dos plásmidos (pLV1 y pPC86/biblioteca de cDNA) el uso de selección auxotrófica en *E. coli* nos permitió realizar el análisis directo de un solo plásmido, en este caso el plásmido pPC86/biblioteca de cDNA que lleva el gen TRP1. Para lograr lo anterior, aproximadamente 100  $\mu$ l de las bacterias transformadas (resuspendidas con el medio SOC) fueron plaqueadas en cajas Petri que contenían un medio selectivo. El medio selectivo fue suplementado con los aminoácidos requeridos, en este caso solo se mantuvo la auxotrofia a triptofano para seleccionar a los plásmidos de la biblioteca de cDNA. Por último, las bacterias sembradas en las cajas con este medio selectivo se incubaron a 37 °C por 24 h hasta que aparecieran las primeras colonias de bacterias transformadas.

Una colonia por caja Petri se inoculó en 1.5 ml de medio LB (carbencilina 50  $\mu$ g/ml). El ADN plasmídico se aisló mediante la técnica de extracción alcalina (miniprep express según Birnboim, 1984) o usando el estuche comercial para aislar DNA plasmídico (Qiagen). Para confirmar la presencia del inserto se realizó una digestión con las enzimas de restricción *Not* I y *Sal* I. La digestión se efectuó en un volumen total de 20  $\mu$ l,

conteniendo: 7  $\mu\text{g}$  de DNA plasmídico, 1X de amortiguador para las enzimas (NEBuffer 3, BioLabs), 1X de albumina sérica bovina (BSA), 2 unidades de la enzima *Not* I, 4 unidades de la enzima *Sal* I y el volumen adecuado de agua Milli Q estéril. La digestión se incubó por 2.5 horas a 37 °C y posteriormente las muestras se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 0.9 % con bromuro de etidio y se dejaron migrar a 80 volts por aproximadamente 2.5 h. Para conocer las masas moleculares de los productos de la digestión se utilizaron los marcadores lambda DNA/*Hind* III o Trackit 1kb plus (Invitrogen).

En un estudio realizado previamente en el laboratorio, se encontró que 10 clonas positivas para el ensayo de dos híbridos contenían a un mismo gen (Y73B6BL.33). En base a esto se decidió continuar el análisis de identificación de las clonas restantes por medio de Southern blot utilizando a este gen como sonda.

### *Análisis tipo Southern blot para identificar los genes de las proteínas que interaccionan con VBH-1*

#### *Purificación de la sonda*

Aproximadamente 3  $\mu\text{g}$  del plásmido (conteniendo el gen Y73B6BL.33 usado como sonda) se digirieron con las enzimas *Sal* I y *Not* I para liberar el inserto, la muestra se corrió en un gel de agarosa 1.0 % y la banda correspondiente al inserto (de aproximadamente 2.3 kb) se aisló directamente del gel siguiendo el protocolo del estuche de extracción de DNA de geles (Qiagen). La purificación de la banda fue confirmada por electroforesis.

Los plásmidos digeridos que se separaron en un gel al 0.9 %, fueron fragmentados con una solución de 0.25 N de HCl por aproximadamente 10 min. Se enjuagó el gel tres veces con agua destilada. Después se desnaturalizó con una solución de 0.5 M de NaOH /1.5 M de NaCl durante 30 min y posteriormente se neutralizó con 0.5 M de Tris -HCl (pH 7.0) / 1.5 M de NaCl. Los plásmidos fragmentados en el gel de agarosa fueron

transferidos por capilaridad con amortiguador a una membrana Nylon (Hybond, Amersham) durante una noche, para transferir se utilizó un amortiguador de SSC 20 X. Una vez que los plásmidos fueron transferidos a la membrana de Nylon éstos fueron entrecruzados con una exposición a radiación UV a 1400 joules (Stratalinker 1800, Stratagene). Una vez fijado el DNA a la membrana se puede iniciar la pre-hibridación o se puede guardar la membrana a temperatura ambiente en un sobre cerrado para ser utilizada posteriormente.

La pre-hibridación de la membrana se realizó con una de solución de hibridación a la que se agregaron 100  $\mu$ l de DNA de espermatozoos de salmón (10 mg/ml) previamente hervidos por 5 min a 94 °C. La membrana se pre-incubó 6 h a 65 °C en rotación constante. Aproximadamente 1.5 horas antes de concluir la prehibridación de la membrana se inició el marcaje de la sonda radioactiva. La sonda de DNA se marcó con dCTP- $\alpha$ <sup>32</sup>P siguiendo el protocolo del sistema de oligonucleótidos al azar (Invitrogen) como se describe a continuación: 5  $\mu$ l de DNA utilizado como sonda y 13  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O milli Q estéril se mezclaron en un tubo de 1.5 ml (Eppendorf). Esta mezcla fue hervida por 5 min a 94 °C para separar las cadenas y posteriormente se mantuvo en hielo durante 2 min. Al concluir este tiempo se agregaron 2  $\mu$ l de cada uno de los nucleótidos dATP, dTTP y dGTP, 5  $\mu$ l del nucleótido radiactivo dCTP- $\alpha$ <sup>32</sup>P (Amersham) y 1  $\mu$ l de la enzima Klenow. La reacción de síntesis de la sonda radiactiva se dejó por 1 h a temperatura ambiente y el volumen total de reacción fue de 45  $\mu$ l. Al finalizar la síntesis de la sonda radiactiva se detuvo la reacción agregándose 5  $\mu$ l del amortiguador para detener la reacción. Los nucleótidos radiactivos que no se incorporaron a la sonda se eliminaron mediante columnas de sephadex microSpin G-50 (Amersham). La muestra que se recuperó fue hervida durante 5 min y se incubó en hielo por 2 min más. Finalmente se añadió a la membrana que se estaba pre-hibridando. La reacción de hibridación se realizó toda la noche a 65 °C en rotación constante.

Al término de la hibridación, se retiró la solución de hibridación y se desechó en el contenedor apropiado. La membrana se lavó 2 veces con el fin de eliminar el pegado inespecífico de la sonda. En el primer lavado se utilizaron 200 ml de una solución de lavado 1 (ver anexo) previamente calentada a 65°C. Este lavado se realizó durante 30 min a 65°C en rotación constante. Posteriormente, se retiró la solución y se incubó con 200 ml de la solución de lavado 2 previamente calentada a 65 °C. Finalmente, la

membrana se cubrió con plástico transparente y se colocó en contacto directo con una placa de fotografía (Kodak) durante 2-4 h aproximadamente a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Las imágenes se obtuvieron colocando la placa en una solución de revelado y fijado. Las clonas que dieron señal negativa en el Southern blot (lo cual indica que es un gen distinto al encontrado anteriormente), se secuenciaron y se identificaron los genes realizando un BLAST en la base de datos del *C. elegans* ([wormbase.org](http://wormbase.org)). Las proteínas identificadas en el ensayo de dos híbridos se nombraron VIP por sus siglas en inglés: VBH-1 interacting protein.

### **Comprobación de la interacción de las proteínas VIP-1, -2 y -3 con VBH-1**

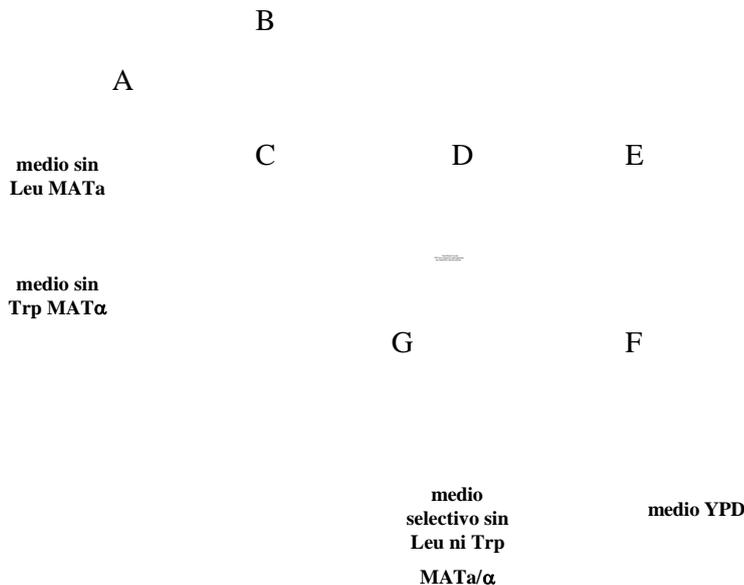
*Se confirmó la interacción de las proteínas VIP -1, -2 y -3 con VBH-1 por medio de cruza entre las cepas de levadura MaV103 (MAT $\alpha$ ) transformada con el plásmido pLV1 y la cepa MaV203 (tiene el mismo genotipo que MaV103 a excepción que esta es MAT $\alpha$ ) transformada por separado con los plásmidos pPC86/ vip-1, pPC86/ vip-2 y pPC86/ vip-3.*

*La transformación de las levaduras se realizó de la siguiente forma. Una colonia de levaduras se inoculó en 100 ml de medio YPD y se incubó a  $30^{\circ}\text{C}$  en agitación constante hasta alcanzar una D. O.  $600\text{ nm}$  de entre 0.5 y 1. Al terminar la incubación, las células se recuperaron centrifugándolas a  $4^{\circ}\text{C}$  en un rotor GSA a 4000 rpm durante 5 min. El sobrenadante se desechó y la pastilla se lavó con 100 ml de agua estéril y se volvió a centrifugar. Las levaduras recuperadas se resuspendieron en 1 ml de acetato de litio y amortiguador TE 1X (LiAc/ TE). En tubos Eppendorff estériles se colocaron por separado  $5\ \mu\text{l}$  ( $0.5\ \mu\text{g}$ ) de los plásmidos pLV1, pPC86/ vip-1, pPC86/ vip-2 y pPC86/ vip-3, y a cada uno de estos tubos se le agregó:  $20\ \mu\text{l}$  ( $200\ \mu\text{g}$ ) de DNA de esperma de salmón (calentado a  $94^{\circ}\text{C}$  durante 5 min),  $3\ \mu\text{l}$  de TE 10 X y  $2\ \mu\text{l}$  de agua milli Q estéril. A la mezcla de cada uno de estos tubos se le agregaron  $200\ \mu\text{l}$  de la suspensión de levaduras correspondientes: MaV203 para los plásmidos con los genes vip y MaV-103 para el plásmido pLV1. Como control negativo de la transformación se usó una mezcla sin plásmido, la cual se ajustó a  $30\ \mu\text{l}$  con TE 1X. Después de esto, a cada tubo se le agregaron  $900\ \mu\text{l}$  de PEG (Polietilen glicol) al 40 % (disuelto en acetato de litio y amortiguador TE 1X) y se dejaron incubar durante 30 min a  $30^{\circ}\text{C}$ . Al término de esta incubación, las células se sometieron a un choque térmico a  $45^{\circ}\text{C}$  durante 15 min y posteriormente se recuperaron centrifugándolas a 3000 rpm en una microfuga durante 5 segundos. La pastilla se resuspendió en  $600\ \mu\text{l}$  de TE 1X estéril y se tomaron  $200\ \mu\text{l}$  para sembrarse en un medio selectivo. En este caso las levaduras MaV103 transformadas con el plásmido pLV1 se sembraron en cajas Petri con medio SD sin leucina y las levaduras MaV203 con los plásmidos pPC86/ vip-1, pPC86/ vip-1 y pPC86/ vip-3 se plaquearon en cajas con medio SD sin triptofano y se dejaron incubar a  $30^{\circ}\text{C}$  durante 2-4 días hasta que aparecieran las colonias transformantes. Una vez obtenidas las transformantes se procedió a realizar una cruza.*

## **Cruzas de levadura**

La técnica que se utilizó para cruzar las cepas de levaduras fue la de replicación en placa que se describe a continuación. Usando un palillo estéril se tomó una colonia de las levaduras transformadas con el plásmido pLV1 y se sembró por estría recta dibujando 2 líneas paralelas en una caja Petri con medio SD sin leucina (Fig. 11 A). Por otro lado, se tomó una colonia de las levaduras transformadas con los plásmidos pPC86/ vip-1, pPC86/ vip-1 y pPC86/ vip-3 y se sembraron en 3 líneas paralelas en medio SD sin triptofano (Fig.11 A). Las levaduras se dejaron crecer por 2 días a 30 °C.

Para realizar la cruce se usó un aparato de replicación sobre el cual se colocó un lienzo de terciopelo estéril que se estiró de forma que no se formaran arrugas, y se apretó con el collar del aparato de replicación (Fig.11 B). La primera caja con las levaduras, se colocó de forma que estas quedaran en contacto con la superficie del terciopelo y se presionó firmemente (Fig. 11 C). Sobre este mismo terciopelo pero de forma perpendicular se colocó la segunda caja de levaduras con el propósito de formar líneas rectas que se cruzaran formando un ángulo de 90 grados entre sí (Fig. 11 D). Posteriormente una caja con medio YPD se colocó directamente sobre el terciopelo que contenía las levaduras en su superficie y se presionó firmemente para que éstas se transfirieran al medio (Fig. 11 E y F). El exceso de levadura se limpió de la caja replicando en terciopelo por lo menos 3 veces. Las levaduras se incubaron por una noche a 30 °C. Al día siguiente se repitió la replica presionando ésta caja con levaduras sobre el terciopelo. Las levaduras se transfirieron a una caja con medio selectivo SD si leucina ni triptofano, la cual se dejó incubar durante 2 días a 30 °C (Fig. 11 G).



**Fig. 11. Esquema general de la técnica de replicación en placa.** La técnica de replicación en placa se utilizó para cruzar las cepas de levadura MaV-103 (MAT $\alpha$ ), la cual contenía al plásmido pLV1 y a la cepa de levadura MaV-203 (MAT $\alpha$ ) con las secuencias de los genes vip-1, vip-2 y vip-3. **A)** Las levaduras transformadas con el plásmido pLV1 se sembraron por estría recta dibujando 2 líneas paralelas en una caja Petri con medio SD sin leucina y en otra caja con medio SD sin triptofano se sembraron por estría recta con tres líneas paralelas a las levaduras que con los plásmidos pPC86/ vip-1, pPC86/ vip-2 y pPC86/ vip-3. **B)** El aparato de replicación con el lienzo se armó tal como se observa en esta sección. **C)** La primera caja con las levaduras se colocó directamente sobre el lienzo y se presionó firmemente. **D)** Posteriormente la segunda caja se presionó sobre el lienzo de manera que se formaran líneas que se cruzaran de forma perpendicular. **E)** Después una caja con medio YPD se colocó directamente sobre el terciopelo que contenía las levaduras en su superficie y se presionó firmemente para que éstas se transfirieran al medio. Este paso se repitió con tres cajas con medio hasta eliminar el exceso de levaduras. **F)** La caja con las levaduras se incubó una noche a 30 °C. **G)** Al siguiente día se replicó esta caja, pero ahora las levaduras se transfirieron a una caja con medio selectivo sin leucina y sin triptofano, de esta forma sólo las levaduras que se encontraron en las intersecciones de las líneas se cruzaron y se complementaron.

Las cepas de levaduras MaV103 (MAT $\alpha$ ) y MaV203 (MAT $\alpha$ ) que se encontraron en contacto directo en las intersecciones formadas por las líneas, se cruzaron y sólo las levaduras con ambos plásmidos conteniendo los genes LEU2 y TRP1 que expresan a las proteínas de fusión fueron capaces de crecer en el medio selectivo SD sin estos aminoácidos (Fig.11 G). Después de haberse obtenido los parches en donde las levaduras se complementaron, se repitió la réplica en una caja nueva con medio SD sin dichos aminoácidos y sobre la cual se sembraron con un palillo estéril tres cepas de levadura control para el ensayo de hidrólisis de  $\beta$ -galactosidasa.

### **Ensayo de actividad de $\beta$ -galactosidasa**

Para realizar este ensayo se utilizó una membrana de nitrocelulosa (Hybond, Amersham), la cual se colocó en contacto directo sobre las levaduras en la caja Petri. Con un palillo estéril se presionó para que las levaduras se transfirieran correctamente a la membrana. La membrana con las levaduras expuestas hacia arriba se incubó en contacto con medio SD sin leucina ni triptofano en una caja Petri durante una noche a 30 °C. Al siguiente día la membrana se retiró del medio con unas pinzas y se congeló sumergiéndola completamente en nitrógeno líquido durante 20 segundos con el fin de que la pared de las levaduras se rompiera. Por otro lado, un filtro de papel Whatman del tamaño de la membrana se sumergió en 2.5 ml de amortiguador Z que contenía 1

mg /ml de X-gal. Este filtro se colocó en el interior de una caja Petri nueva y encima de éste se sobrepuso la membrana con levaduras previamente congelada. Después de esto, se tapó la caja y se incubó a 30 °C. Periódicamente se estuvo monitoreando esta incubación hasta que se detectara un color azul en las levaduras, resultado de la hidrólisis del X-gal por acción de la enzima  $\beta$ -galactosidasa producto del gen LacZ usado como reportero de la interacción entre las proteínas VIP y VBH-1. Los niveles de expresión de genes reporteros en un ensayo de dos híbridos puede variar desde una expresión muy fuerte a una muy débil sin embargo, estos niveles no reflejan las propiedades de afinidad de la interacción proteína-proteína in vivo. Para corroborar la interacción de las proteínas VIP con VBH-1 en este ensayo, se utilizaron como control dos cepas de levadura (MaVI03) del sistema Invitrogen, las cuales contenían dos plásmidos que expresaban proteínas de fusión. La cepa A se usó como control negativo y contenía los plásmidos pPC97 (GAL-4 DB, LEU2) y pPC86 (GAL-4 AD, TRP1) ambos sin ningún inserto de cDNA y por lo tanto no presentó interacción alguna. La cepa D se usó como control positivo, contenía a los plásmidos pPC97-Fos (cDNA Fos de rata, aminoácidos 132-211) y pPC86-Jun (cDNA Jun de ratón, aminoácidos 250-325). La interacción que presentó este control fue fuerte.

### **Comparación de secuencias**

Las secuencias codificantes de los genes del *C. elegans* vip-1 (Y73B6BL.33), vip-2 (W05H7.4e), vip-3 (R06A4.2) y de las proteínas CBGO5462, CBG08182 de *C. briggsae* se obtuvieron de wormbase.org. Los alineamientos de las proteínas se llevaron a cabo usando el software Mac Vector 7.2.3 (Accelrycs Inc. CA).

## *Estudios funcionales*

### **Mantenimiento y crecimiento de los nematodos**

El nemátodo *C. elegans* se creció en placas con medio NGM-lite, a las cuales se les colocó sobre la superficie unas gotas de un cultivo de la cepa OP50-1 de *E. coli*. El cultivo de *E. coli* se creció de 8-12 h en medio LB con 50  $\mu$ g/ml de estreptomicina. El medio NGM (Brenner, 1974) que se esterilizó por autoclave, se vació con ayuda de una pipeta en cajas Petri medianas y se dejó enfriar a temperatura ambiente por una noche. Al día siguiente se agregaron aproximadamente 200  $\mu$ l del cultivo de la cepa OP50-1 que se incubó a temperatura ambiente durante una noche. Las cajas se pueden almacenar a 4 °C por varias semanas. La cepa utilizada fue la *rrf-1* (ok589). *rrf-1*

codifica para una RNA polimerasa (RNA-dependent RNA polymerase family) requerida en el silenciamiento de la expresión de un gen por interferencia de RNA en tejidos somáticos, pero no en la línea germinal. La cepa *rrf-1 (ok589)* se obtuvo del Centro de Genética del *C. elegans* (CGC) y se mantuvo creciendo a 20 °C.

### **RNA de Interferencia (RNAi) en *C. elegans***

El silenciamiento de la expresión de un gen de manera transitoria puede llevarse a cabo a través de la interferencia de RNA, técnica conocida como RNAi (Fire *et al.*, 1998; Timmons *et al.*, 2003). Es un fenómeno presente en varios organismos, que consiste en el silenciamiento de la expresión de RNA mensajero a través de pequeños RNAs no codificantes. Cuando el RNA de doble cadena es introducido en un organismo, éste es cortado en fragmentos de aproximadamente 21 nucleótidos en el interior de la célula por la acción enzimática de la proteína DICER. Los fragmentos de RNA de doble cadena reciben el nombre de “pequeños RNAs de interferencia” (siRNA). Posteriormente estos siRNA se incorporan a proteínas formando el “complejo silenciador inducido por RNAi” o RISC. En este complejo los fragmentos de RNA sirven como molde para degradar el RNA mensajero complementario a ellos y de esta manera silenciar su expresión (Fraser *et al.*, 2000). Esta técnica se usa de manera exitosa en el *C. elegans* debido a que estos animales pueden ser alimentados con bacterias que producen RNA de doble cadena correspondiente al gen que se desea suprimir (Timmons *et al.*, 2003).

### **Ensayo de RNA de interferencia**

El laboratorio cuenta con una biblioteca de RNAi con los genes del *C. elegans* clonados en el plásmido ppd129.36 en bacterias *E. coli*. Para inducir la producción de RNA de doble cadena de los genes analizados en este trabajo, utilizamos el método de inducción de RNAi en medio líquido, que se describe a continuación. Las bacterias inducidas contenían al plásmido pPSZ1 con la secuencia completa de VBH-1, la secuencia del gen *vip-2* o únicamente al vector ppd129.36 (plásmido vacío PV).

En este ensayo se usaron tres cultivos de *E. coli* de la cepa HT115 D3 con los genes anteriormente mencionados. Para cada caso se obtuvo un cultivo crecido a 37 °C en agitación constante hasta alcanzar una D.O. <sub>595 nm</sub> de 0.6 en 500 ml de medio 2XYT con los antibióticos ampicilina y tetraciclina a una concentración de 50 µg/ml y 12.5 µg/ml respectivamente. Alcanzada la densidad óptica, se agregó a cada cultivo 0.4 mM de IPTG y se reincubó por 2 horas más a la misma temperatura.

Al término de la incubación las bacterias se recuperaron por centrifugación y se resuspendieron en un medio que contenía 25 ml de 2XYT, 25 ml de glicerol al 50 %, 0.4 mM de IPTG, ampicilina (50 µg/ml) y tetraciclina (12.5 µg/ml). Finalmente se hicieron alícuotas de 1 ml que se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y fueron almacenadas a – 70 °C.

Una alícuota de 1 ml de bacterias inducidas se centrifugó a 8000 rpm durante 2 min y se retiró el sobrenadante, la pastilla fue resuspendida en 100 µl de medio LB (50 µg/ml de ampicilina, 12.5 µg/ml de tetraciclina y 0.4 mM de IPTG). Posteriormente sobre la superficie de cajas Petri medianas y pequeñas con medio NGM-lite se colocaron 50 y 10 µl de bacterias resuspendidas en el medio respectivamente. Para realizar el doble RNAi de los genes *vbh-1* y *vip-2* (que se obtuvieron de la biblioteca de RNAi), se mezclaron 25 µl de de la suspensión de bacterias resuspendidas, inducidas con el gen correspondiente para sumar el total de 50 µl.

Cuando éstas cajas se secaron, se colocaron sobre la superficie de las cajas medianas 5 animales adultos de la cepa *rrf-1 (ok589)*. Dichos animales fueron incubados a 26 °C con bacterias inducidas para producir el RNA de doble cadena de los genes *vbh-1* o *vip-2*. La progenie de estos animales presentó un fenotipo *vbh-1* (RNAi) o *vip-2* (RNAi).

### **Observación de los nematodos utilizando microscopía Nomarski**

La observación de los nematodos se llevó a cabo utilizando una gota de agarosa al 2% colocada sobre un portaobjetos y sobre la cual se agregaron 10 µl de azida de sodio 40 mM disuelto en el amortiguador M9. Sobre esta gota se coloraron 20 animales para observación. La azida de sodio es ampliamente utilizada en nuestro campo de trabajo

para paralizar a los nemátodos y permitir su observación al microscopio. Es importante señalar que los animales permanecen vivos aunque inmóviles por alrededor de 30 min. Una vez que los animales dejaron de moverse, se colocó un cubreobjetos encima y se observaron por microscopía Nomarski. Se utilizó un microscopio Nikon Eclipse E600 equipado con una cámara digital AxioCam (Zeiss).

## **Inmunotinciones**

Como parte del análisis del fenotipo de los animales RNAi, se realizaron ensayos de inmunotinción con diferentes anticuerpos. Se usó un anticuerpo contra la proteína RME-2, el receptor del vitelo en el ovocito para identificar células germinales en ovogénesis. Por otra parte, también se hizo el análisis de la expresión de VBH-1 de animales adultos utilizando un anticuerpo contra esta proteína. El método utilizado en la inmunotinción se describe a continuación. En un cubreobjetos se agregó una gota de 30  $\mu$ l de M9 en donde se colocaron alrededor de 30 animales RNAi. Posteriormente, los animales se inmovilizaron con 5  $\mu$ l de tetramizol (0.01%) y se disecaron las gónadas haciendo un corte con agujas a nivel de la cabeza del animal. El cubreobjetos fue colocado sobre un portaobjetos con polilisina y congelado en nitrógeno líquido. Posteriormente se quitó el cubreobjetos del portaobjetos mientras la muestra estaba congelada. A esta técnica se le conoce como “freezcrack” y se utiliza para romper la cubierta de los embriones. La muestra se incubó inmediatamente en metanol a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 1 min; posteriormente se fijó en una solución de formol durante 20 min a temperatura ambiente. Al término de la fijación la muestra se lavó dos veces en PBT 1X por 10 min. Inmediatamente después la muestra se bloqueó con una gota de 30  $\mu$ l de suero de cabra al 30 % (Sigma) por 30 min a temperatura ambiente en una cámara húmeda. La cámara húmeda consiste de una caja Petri de 150 mm de diámetro forrada con papel aluminio, cuyo borde interior es sellado con sanitas húmedas. Al término de este tiempo, la muestra se incubó con el anticuerpo primario  $\alpha$ -RME-2 (1:500) o  $\alpha$ -VBH-1 (1: 1000) diluido en PBT y suero de cabra, durante una noche a  $4^{\circ}\text{C}$ . Al día siguiente la muestra se lavó con PBT 1X durante 10 min y se incubó con el anticuerpo secundario anti-conejo Cy3 (Molecular Probes) y DAPI (50 ng/ $\mu$ l) diluidos 1:100 en una solución de PBT y suero de cabra, durante 1 h a temperatura ambiente. Finalmente la muestra se lavó en PBT 1X por 10 min, posteriormente se colocaron 2  $\mu$ l de vectashield, se cubrió con un cubreobjetos y se selló con barniz. La muestra fue almacenada a  $4^{\circ}\text{C}$  y después fue observada al microscopio de fluorescencia. Se utilizó un microscopio Nikon Eclipse E600 equipado con una cámara digital AxioCam (Zeiss). Las imágenes fueron procesadas en Photoshop CS (Adobe).

## **Conteo de progenie**

El análisis del número de hijos de los animales *vip-2* (RNAi) se realizó de la siguiente manera: en el primer día 15 animales en estadio L4 *rrf-1* (*ok589*) o 15 animales L4 *rrf-1* (*ok589*), *vip-2* (RNAi) se colocaron individualmente en cajas pequeñas con bacterias con el plásmido vacío (control) o bacterias que producían RNA de doble cadena del gen

*vip-2*, respectivamente. Estas primeras cajas con nematodos, se nombraron como cajas 1. Al siguiente día, los animales referidos ahora como adultos de 1 día fueron colocados en nuevas cajas con comida (cajas 2) y las cajas 1 se guardaron a 26 °C. Después de 24 horas, los animales adultos de 2 días fueron colocados nuevamente sobre otras cajas nuevas con comida (cajas 3) y se continuó su incubación a 26 °C.

Después de que se retiraron los animales adultos de cada una de las cajas, los embriones depositados sobre la superficie de éstas se dejaron incubando por más de 14 horas, con el fin de que hasta el último embrión depositado terminara la embriogénesis y eclosionara convirtiéndose en larva L1. Al final de este período de tiempo se contaron los embriones presentes como embriones muertos. Las larvas de cada uno de los animales depositados en las cajas 1, 2 y 3 fueron contadas en el estado larval L3, por su fácil observación al microscopio. La progenie total de cada animal fue referida como la suma de larvas más los embriones muertos observados en cada una de las cajas. Los datos se analizaron en el programa excel (Microsoft).

## RESULTADOS

### La proteína VIP –2 interacciona con la helicasa de RNA VBH-1

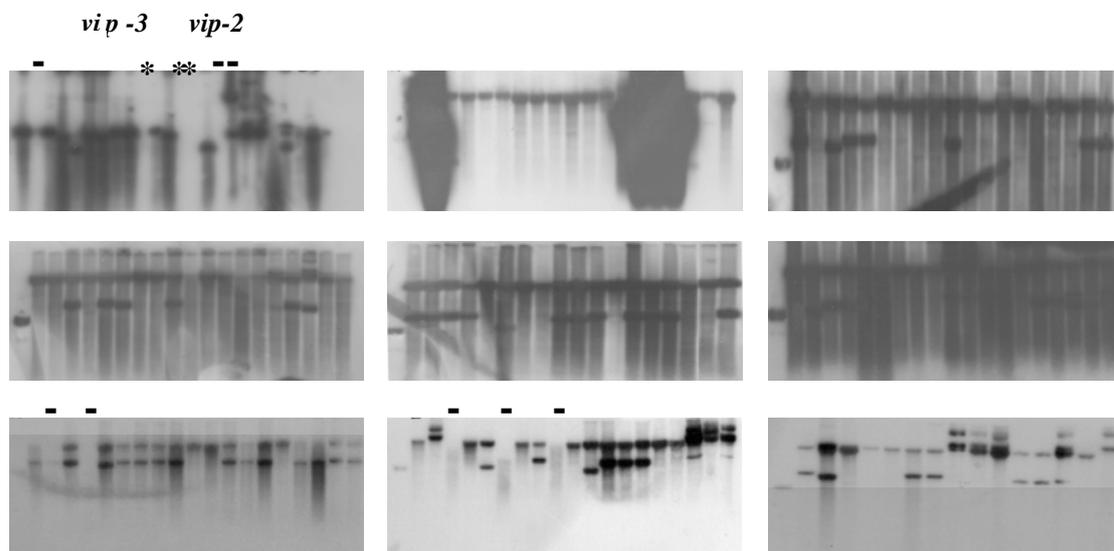
Las proteínas Vasa y Belle son helicasas de RNA pertenecientes a una familia con dominios tipo DEAD y que son importantes para la función de las células germinales. Se han identificado los homólogos para este grupo de proteínas en varios organismos, y su función se encuentra altamente conservada. Basados en evidencias experimentales se ha sugerido que este grupo de proteínas participan en la regulación de la traducción de los RNA mensajeros. Sin embargo, sus mecanismos de acción específicos aún no se conocen. Para el caso de Vasa, la proteína de la línea germinal mejor caracterizada, muchos de los blancos de su actividad helicasa no se han identificado y tampoco se ha observado que presente especificidad de unión a algún RNAm. Sin embargo se ha visto que su interacción con proteínas es importante para su función. El homólogo de Vasa y Belle en el *C. elegans* es la proteína VBH-1. Esta proteína se expresa específicamente en la línea germinal y es importante para la embriogénesis, gametogénesis y durante la transición de espermatogénesis a ovogénesis (Salinas *et al.*, 2007).

Con el propósito de aislar proteínas que se unan a VBH-1 y nos ayuden a entender mejor su función en las células germinales, así como aislar más componentes de la línea germinal se realizó un ensayo del tipo dos híbridos. En un trabajo previo en el laboratorio se fusionó la secuencia completa del cDNA de *vbh-1* correspondiente a la isoforma b al dominio de activación de *gal-4* (pLV1) y se utilizó una biblioteca de cDNA de dos híbridos (donada por el Dr. Marc Vidal). Antes de realizar el ensayo de dos híbridos, se probó que VBH-1 no fuera capaz de activar la transcripción por si sola.

La cepa MaV103 de levaduras se transformó con el plásmido pLV1 y con los plásmidos de la biblioteca de cDNA. Cuando una proteína de la biblioteca interaccionó físicamente con VBH-1, se reconstituyó el sistema y los dos dominios de GAL-4 se unieron. De esta forma GAL-4 reconstituido fue capaz de activar la transcripción de los genes reporteros *Lac Z* y *HIS3*. En este ensayo de interacción se obtuvieron un total de 242 clonas positivas de levadura. Diez clonas tomadas al azar, se secuenciaron y el resultado fue que todas ellas contenían el mismo gen: Y73B6BL.33. Este gen se nombró inicialmente como *vip-1* por sus siglas en inglés de VBH-1 interacting protein. En el trabajo de esta

tesis se realizó el escrutinio de 168 clonas, con el fin de identificar a las proteínas que interaccionan con VBH-1. Debido a que los plásmidos en la levadura se expresan en baja copia, una vez que fueron extraídos de éstas se utilizaron para transformar bacterias *E. coli* (cepa KC8). De esta forma se obtuvo un mayor número de copias haciendo posible su identificación.

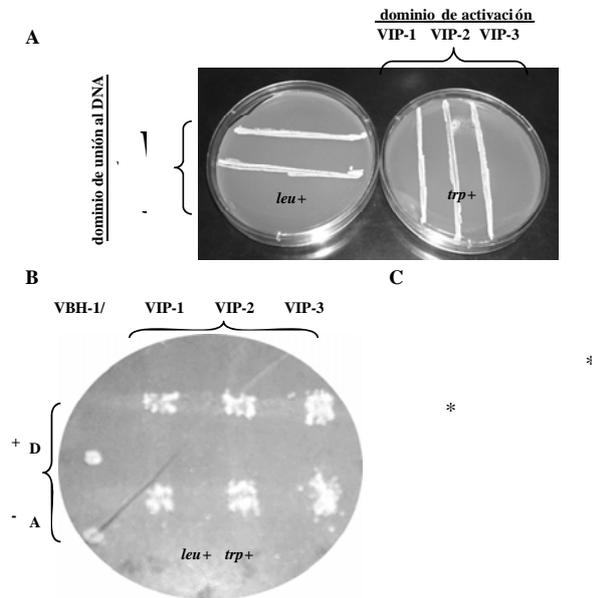
Debido a que secuenciar las 168 clonas resultaba muy caro, se decidió utilizar al gen *vip-1* como sonda en un ensayo tipo Southern blot para identificar clonas nuevas. Nuestra estrategia fue buscar clonas que dieran señal negativa al gen *vip-1*. Identificamos 2 genes nuevos: W05H7.4 y R06A4.2, los cuales llamamos *vip-2* y *vip-3*, respectivamente. De las 168 clonas hasta ahora analizadas, 165 contienen al gen *vip-1*, 2 clonas al *vip-2* y una clona a *vip-3* (Fig.12).



**Fig. 12. Escrutinio de las clonas positivas del doble híbrido mediante ensayo tipo Southern blot.** De las 242 clonas positivas del doble híbrido, se analizaron 168 clonas para identificar a los genes que contenían. Los plásmidos aislados fueron digeridos con las enzimas *Not I* y *Sal I*, los fragmentos producidos se separaron por electroforesis y posteriormente el DNA fue transferido a una membrana de nitrocelulosa. Como sonda de este análisis se usó el cDNA del gen *vip-1*. La estrategia que se siguió fue buscar genes diferentes al de *vip-1*. Los asteriscos (\*) señalan las clonas negativas de este ensayo y corresponden al cDNA de *vip-2* y *vip-3*. Los guiones (-) indican que no se cargó DNA en el gel.

*Para corroborar la interacción de las proteínas VIP-1, -2 y -3 con VBH-1 se repitió el ensayo de doble híbrido pero esta vez por medio de cruza. Se introdujo el plásmido pLV1 en la cepa MaV203 (MAT $\alpha$ ) y el plásmido que porta a *vip-1*, *vip-2* y *vip-3* por separado en cepa MaV103 (MAT $\alpha$ ). Únicamente las levaduras que contenían a la*

proteína VIP-2 fueron positivas para la actividad de  $\beta$ -galactosidasa (Fig. 13). Sin embargo, no descartamos la posibilidad de que las proteínas VIP-1 y VIP-3 interaccionan con VBH-1 y es recomendable repetir este ensayo más adelante para descartar que sean falsos positivos del ensayo inicial. En este trabajo consideramos a estas proteínas como posibles candidatos que interaccionan con VBH-1.



**Fig. 13. Corroboración de la interacción de VIP-1, VIP-2 y VIP-3 mediante el ensayo de actividad de  $\beta$ -galactosidasa.** El factor transcripcional GAL-4 reconstituído permite la transcripción del gen reportero Lac Z el cual codifica a la enzima  $\beta$ -galactosidasa. La hidrólisis del X-gal por esta enzima produce un compuesto indoxil que en contacto con el aire se torna color azul. **A)** En esta imagen se muestran las levaduras que contenían a la proteína híbrida VBH-1 unida al dominio de unión al DNA de GAL-4 y las proteínas VIP-1/-2/-3 unidas al dominio de activación de GAL-4, las cuales se cruzaron por replicación en caja. **B)** Las levaduras que se cruzaron se complementaron y fueron capaces de crecer en el medio selectivo sin leucina ni triptofano. **C)** Estas levaduras se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, en la cual las levaduras se lisaron y se incubaron con una solución que contenía X-gal. La hidrólisis de este compuesto reveló la interacción de VBH-1 con la proteína VIP-2. En el extremo lateral izquierdo del panel B se observan dos parches de levadura, los cuales corresponden a los controles utilizados en este ensayo. Como control positivo de la interacción se utilizó a la cepa D del sistema Invitrogen que contenía a los plásmidos pPC97-Fos (cDNA Fos de rata, aminoácidos 132-211) y pPC86-Jun (cDNA Jun de ratón, aminoácidos 250-325). La interacción que presentó este control fue fuerte y se señala con un asterisco (\*). La cepa A se usó como control negativo y contenía los plásmidos pPC97 y pPC86, ambos sin ningún inserto y por lo tanto no presentó interacción. La hidrólisis del X gal produjo un color azul indigo en el control positivo y en VBH-1/VIP-2, el cual se señala con asteriscos (\*).

## Motivos estructurales deducidos de la secuencia aminoacídica de las proteínas VIP

## **VIP-1 es una proteína con dominios de unión a RNA y es similar al factor de inicio de la traducción eIF4B**

Según la base de datos del *C. elegans* ([www.wormbase.org](http://www.wormbase.org), release WS174, October 04, 2007) el gen *vip-1* contiene 8 exones y 7 intrones y codifica para una proteína de 610 aminoácidos. Un estudio de RNAi masivo indicó que animales carentes de esta proteína tienen un tamaño pequeño, se ven enfermos y presentan letalidad embrionaria, lo que sugiere que su función no es específica de la línea germinal (Maeda *et al.*, 2001).

VIP-1 presenta tres dominios RRM, el primero abarca del aminoácido 66 al 133, el segundo del aminoácido 158 al 231 y el tercero del 326 al 391 (Fig. A, anexo). Los motivos RRM se encuentran en proteínas que unen RNA como las proteínas hnRNP (partículas de ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas), proteínas implicadas en la regulación del splicing y componentes del snRNP (ribonucleoproteínas nucleares pequeñas) (Marchler y Bryant, 2004). VIP-1 posee 67 % de identidad con la proteína CBG05462 de *C. briggsae*.

En una revisión de los mecanismos de regulación de la traducción en *C. elegans* (Rhoads *et al.*, 2006), se reportó que el gen (Y73B6BL.33) al cual nosotros nombramos como *vip-1*, es similar al factor de inicio de la traducción eIF4B. Los factores de inicio de la traducción catalizan los primeros pasos de este proceso, en el cual un complejo ternario de eIF2-GTP-Met tRNA se une a la subunidad ribosomal 40S para formar el complejo de iniciación 43S.

El reclutamiento de RNAs mensajeros al complejo de iniciación 43S requiere del factor eIF3, de PABP una proteína de unión a poli (A) y de la proteína eIF4A. El factor eIF4B pertenece al grupo de factores eIF4 el cual está formado de: eIF4A una helicasa de RNA, eIF4B una proteína de unión a RNA, eIF4H una proteína que actúa con eIF4B para estimular la actividad helicasa de eIF4A. eIF4A es una proteína de unión al cap de los RNA mensajeros y eIF4G participa en el reclutamiento de los RNAs mensajeros a la subunidad 40S (Rhoads *et al.*, 2006).

## **VIP-2 es una proteína de unión a ácidos nucleicos con un dedo de zinc**

De acuerdo a lo anotado en la base de datos del *C. elegans* ([www.wormbase.org](http://www.wormbase.org), release WS174, October 04, 2007), el gen *vip-2* tiene 5 formas alternativas de splicing, la mayor de ellas, la isoforma e contiene ocho exones y 7 intrones y codifica para 666 aminoácidos. En un estudio de interactoma de las proteínas de *C. elegans* se observó que VIP-2 interacciona con CGH-1, un componente de los gránulos P que se requiere para proteger a las células germinales de la muerte por apoptosis (Li *et al.*, 2004).

La proteína VIP-2 tiene 44 % de identidad con la proteína CBGO8182 predicha de *C. Briggsae* y no presenta homología con proteínas de otros organismos, sugiriendo que es una proteína específica del género *Caenorhabditis* (Fig. B, anexo). VIP-2 presenta un dedo de zinc del tipo CCCH (Cys<sub>x9</sub>-Cys<sub>x5</sub>-Cys<sub>x3</sub>-His) que abarca de la Cys<sub>476</sub> a la His<sub>496</sub> y tres cajas con secuencia RGG (Arg<sub>522</sub>-Gly<sub>572</sub>) (Fig. B, anexo). Las cajas RGG consisten de repeticiones múltiples de los aminoácidos Arg-Gly-Gly, a menudo intercaladas entre aminoácidos aromáticos y que se ha visto que se unen a RNA (Kiledjian y Dreyfuss, 1992).

## **VIP-3 es una proteína novedosa con función desconocida**

De acuerdo a la base de datos del *C. elegans* ([www.wormbase.org](http://www.wormbase.org), release WS174, October 04, 2007) el gen *vip-3* codifica para una proteína de 837 aminoácidos. Basado en un análisis de su secuencia, no tiene dominios conocidos ni parece estar presente en otros organismos, solo en el género *Caenorhabditis*. VIP-3 tiene una identidad de 67% con otra proteína desconocida del *C. elegans* (TI2E12.3) (Fig. C, anexo).

## **Estudios Funcionales**

### **VIP-2 es importante para la fertilidad del *C. elegans***

El laboratorio cuenta con una biblioteca de RNA de interferencia (RNAi) por alimentación, en la cual encontramos una clona para el gen *vip-2*, pero no para los genes *vip-1* y *vip-3*. Por esta razón en este estudio nos enfocamos primero al estudio de *vip-2*.

Para realizar el estudio de RNAi por alimentación se utilizó el sistema de inducción de RNA de doble cadena en líquido (ver materiales y métodos). Los experimentos de esta tesis se llevaron a cabo usando a la cepa *rrf-1(ok589)* y en adelante nos referiremos a ésta como cepa control para simplificar y la cual presenta un fenotipo silvestre. El gen *rrf-1* codifica para la proteína RRF-1 que es miembro de una familia de polimerasas de RNA llamadas RdRP (Sijen *et al.*, 2001). Animales mutantes en este gen no presentan defectos morfológicos ni tampoco anomalías en el crecimiento. Se decidió utilizar esta cepa debido a que presenta insensibilidad al RNAi en las células somáticas pero permite observar el silenciamiento de genes en la línea germinal, lo que nos facilitó identificar los fenotipos presentados en estas células en particular. (Sijen *et al.*, 2001).

Los experimentos de interrupción del gen *vip-2* en animales hermafroditas se hicieron con el propósito de observar su fenotipo y examinar si presentaban un fenotipo similar al de animales *vbh-1(RNAi)* que indicaran que probablemente estén participando en una misma vía de acción.

Los animales *vbh-1 (RNAi)* presentan una progenie reducida y letalidad embrionaria. Uno de los fenotipos característicos de la falta de VBH-1 es la acumulación de los ovocitos en la parte proximal de la gónada animales de jóvenes (Salinas *et al.*, 2007). Este fenotipo es característico de animales silvestres viejos que se han quedado sin espermatozoides. Estos animales son capaces de continuar con la maduración de sus ovocitos y recuperar su fertilidad si son cruzados con machos.

Realizando cruces de animales hermafroditas *vbh-1(RNAi)* con machos silvestres se observó que los animales pueden mejorar su fertilidad, pero no es comparable con la de los animales silvestres, lo que sugiere que VBH-1 tiene una función también en los ovocitos. Otro fenotipo que se ha observado en algunos animales *vbh-1(RNAi)* es que presentan un reducido número de espermatozoides y la presencia de pequeñas células germinales en la parte proximal de la gónada, que a juzgar por su tamaño pareciera que se encuentran en etapas tempranas de la espermatogénesis. A estos espermatozoides en desarrollo se le conoce como espermatozoides primarios y a este fenotipo se le conoce como feminización de la gónada de animales hermafroditas. Estos datos sugirieron que la proteína VBH-1 es importante para la función adecuada de los ovocitos y espermatozoides y para la regulación del cambio de espermatogénesis a ovogénesis que

ocurre en la gónada de los hermafroditas (Salinas *et al.*, 2007). Se hizo un análisis detallado del número de hijos que tienen los animales *vip-2 (RNAi)* y del porcentaje de letalidad embrionaria que presentan. Para esto se siguieron animales individuales de la cepa silvestre *rrf-1 (ok589)* alimentados con bacterias que contenían un plásmido vacío (PV) como control y animales *vip-2 (RNAi)*.

Los animales fueron seleccionados en el estadio larval L4 de desarrollo y se colocaron individualmente en una caja de Petri. Los animales se movieron aproximadamente cada 24 h a una caja nueva hasta que dejaron de tener hijos (3 días después aproximadamente). Un día después de sacar al animal adulto de la caja de Petri se observó la caja bajo el microscopio para detectar embriones muertos. La embriogénesis transcurre en 14 h, por lo que si algún embrión permanece inmóvil en la placa se toma como muerto. Los hijos del animal adulto se contaron en el estadio L3 o L4 porque es más fácil observarlos al microscopio.

Los animales *vip-2 (RNAi)* presentaron una reducción en el número de hijos de alrededor del 80 % con respecto a los animales control (PV) (100%). De forma interesante y a diferencia de los animales *vbh-1 (RNAi)*, los animales *vip-2 (RNAi)* no presentaron letalidad embrionaria (0%) (Tabla 2). Estos datos nos indican que al igual que VBH-1, VIP-2 es una proteína importante para la fertilidad.

**Tabla 2**

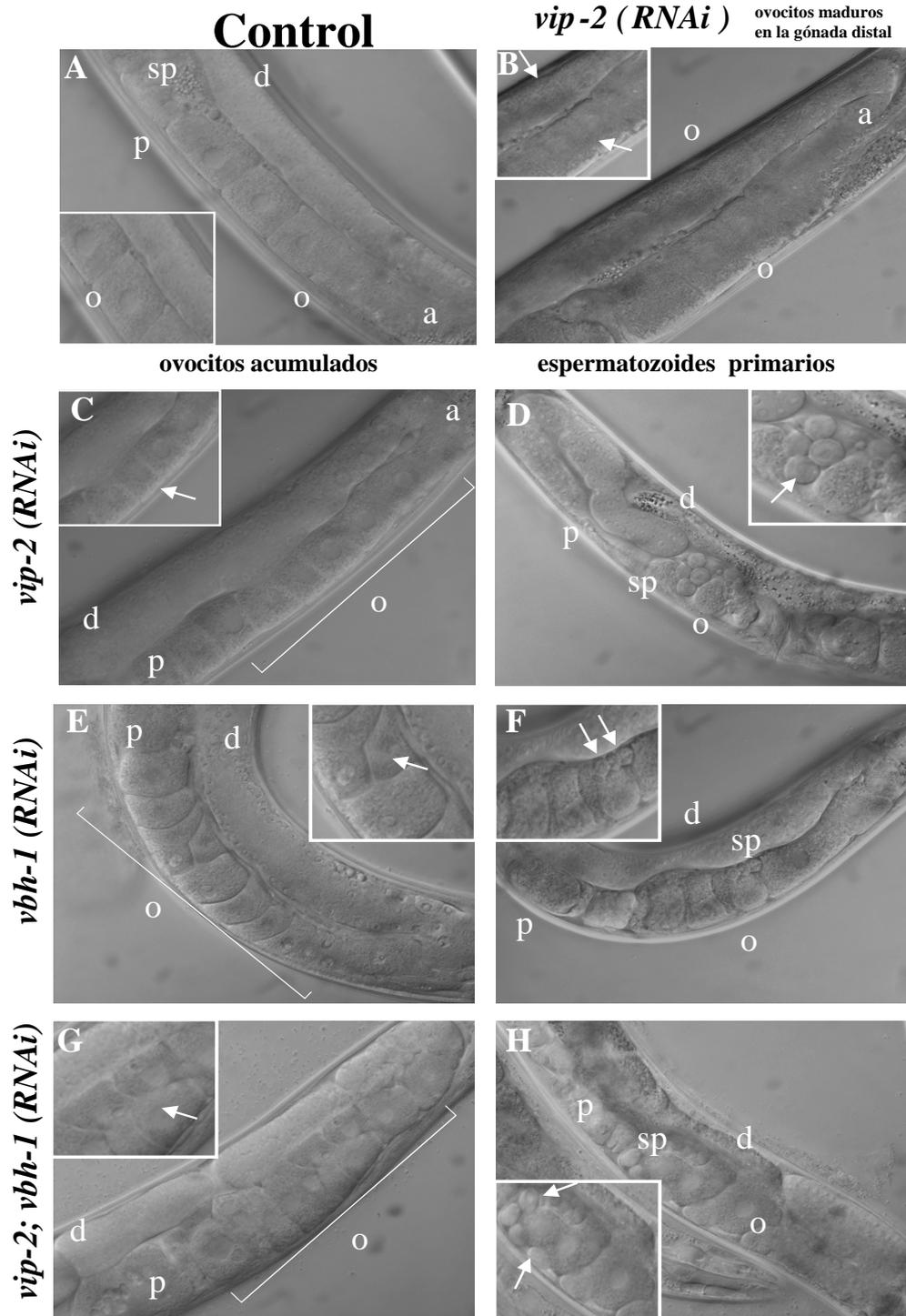
<b>Fertilidad en animales hermafroditas silvestres y <i>vip-2 (RNAi)</i></b>				
<b>genotipo</b>	<b>temperatura</b>	<b>progenie total</b>	<b>letalidad embrionaria</b>	<b>n</b>
control (PV)	26 °C	100 %	0%	28
<i>vip-2 (RNAi)</i>	26 °C	20.84 %	0%	28
<i>vip-2 (RNAi)</i> *	26 °C	11.7 %	23.3 %	27

Para estudiar la fertilidad de animales hermafroditas *vip-2 (RNAi)* los especímenes fueron seleccionados en la etapa L4 y se transfirieron a nuevas cajas cada 24 horas durante el transcurso de tres días. Sobre las cajas se contó el número de embriones muertos y la progenie que sobrevivió. Los embriones que no eclosionaron en el transcurso de 24 horas después de que se depositaran se consideraron como muertos. PV= plásmido vacío usado como control. \*Los datos de progenie de los animales *vip-2 (RNAi)* se tomaron de Salinas *et al.*, 2007.

## **La inhibición de la expresión de VIP-2 provoca defectos en las células germinales**

La gónada del *C. elegans* puede ser dividida en cuatro regiones principales debido a los procesos morfológicos que se observan: (1) la región distal o de mitosis está formada por una población de células germinales que se mantienen en mitosis constante por influencia de las células distales o DTCs, (2) la región de transición en donde las células entran en meiosis y se mueven hacia la región proximal de la gónada, (3) los núcleos en paquíteno ocupan una gran parte media de la gónada a la que se le denomina zona del paquíteno o asa y por último (4) la región proximal en donde se acumulan los ovocitos en diacinesis antes de entrar a la espermateca (Wood, 1988) (Fig. 6).

La interferencia de RNA en el gen *vip-2* mostró fenotipos de alteración en las células germinales. Se observó que en un porcentaje de animales (25 %), los ovocitos se acumularon en la parte proximal de la gónada (Fig. 14 C) (tabla 3). También se observó en algunos animales (53.57 %) la presencia de células de menor tamaño, las cuales inferimos que se trata de espermatoцитos primarios por su morfología y tamaño (Fig. 14 D).



**Fig. 14. Los fenotipos de animales hermafroditas *RNAi* observados por microscopía Nomarski.** En estas fotos se muestra un brazo de la gónada de animales adultos de un día crecidos a 26 °C. **A)** La gónada de animales control (PV) presentó un fenotipo normal (100 %) (n = 28). **B)** Muy rara vez los animales *vip-2 (RNAi)* mostraron ovocitos diferenciados en la zona de paquíteno (2 animales, a lo largo de todo el análisis). **C)** La gónada de animales *vip-2 (RNAi)* presentó ovocitos acumulados (25 %) y **D)** espermatozoides primarios (53.57 %) (n = 28). **E)** Los animales *vbh-1 (RNAi)* mostraron ovocitos

acumulados (57.14 %) y **F**) espermatozoides primarios (19.04 %) (n = 21). **G**) En los animales *vip-1; vbh-1(RNAi)* observamos la presencia de ovocitos acumulados (50%) y **H**) espermatozoides primarios (19.04%) (n = 22). Los recuadros muestran con mayor detalle una región de la gónada, donde se señala con flechas los defectos observados en las células germinales. Las letras indican las regiones de la gónada: d, distal; a, asa; sp, esperma; o, ovocitos; p, proximal.

Un fenotipo que se logró observar en contadas ocasiones (2 animales) y que no se presentó en animales *vbh-1(RNAi)* fue la presencia de ovocitos maduros en regiones distales de la gónada, en donde normalmente solo se encuentran células germinales sin madurar. Estos ovocitos en la región distal presentaron la misma morfología y desarrollo que los de la zona más proximal (Fig. 14 B). El 21.42% de los animales *vip-2(RNAi)* no muestran un fenotipo evidente (imágenes que no se muestran) (Tabla 3). No sabemos si la presencia de ovocitos acumulados en estos animales se deba a que no son fertilizados por los espermatozoides, por ausencia de espermatozoides, o sea un defecto propio de los ovocitos. Al parecer la ausencia de la proteína VIP-2 provoca defectos principalmente en la espermatogénesis, aunque no se probó si al cruzar los hermafroditas *vip-2 (RNAi)* con machos silvestres la fertilidad se restaura comprobando que esta proteína solo tiene una función en este proceso.

Los animales *vbh-1 (RNAi)* en nuestros experimentos mostraron los fenotipos descritos en Salinas *et al.*, 2007 los cuales son acumulación de los ovocitos (57.14 %) (Fig. 14 E) y presencia de esperma primario (19.04 %) (Fig. 14 F) (Tabla 3).

Debido a la interacción directa de los productos de los genes *vip-2* y *vbh-1*, y a los fenotipos en común que presentan, contemplamos la posibilidad de que estos dos genes estuvieran participando en una misma vía de regulación en la línea germinal. Con esta idea iniciamos estudios epistáticos, en los cuales eliminamos la expresión de estos dos genes al mismo tiempo, a lo que se conoce como doble RNAi (ver materiales y métodos).

En estos análisis, los animales *vip-2; vbh-1 (RNAi)* presentaron ovocitos acumulados (50 %) (Fig. 14 G) y presencia de esperma primario (22.72%) (Fig. 14 H) (Tabla 3). Observamos que en estos casos la presencia de ovocitos acumulados fue mayor que en *vip-2(RNAi)* (25%), pero menor que *vbh-1 (RNAi)* (57.14%). El fenotipo de la doble mutante es más parecido al fenotipo de los animales *vbh-1 (RNAi)* lo que indica que

*vbh-1* esta por arriba de *vip-2* y una posibilidad es que se encuentren participados en una misma vía de regulación.

**Tabla 3**

Fenotipos en animales adultos					
genotipo	temperatura	n	gónadas normales	gónadas con ovocitos acumulados	gónadas con espermatozoides primarios
control (PV)	26 °C	28	100 %	0%	0%
<i>vip-2 (RNAi)</i>	26 °C	28	21.42%	25%	53.57%
<i>vbh-1 (RNAi)</i>	26 °C	21	23.80%	57.14%	19.04%
<i>vip-2; vbh-1(RNAi)</i>	26 °C	22	27.27%	50%	22.72%

Animales adultos de un día de los fondos genéticos indicados fueron anestesiados para ser observados por microscopía Nomarski para determinar su fenotipo. PV= plásmido vacío usado como control.

### **Los animales *vip-2 (RNAi)* realizan la transición espermatogénesis/ovogénesis de forma prematura**

Debido a que los animales *vip-2 (RNAi)* presentaron el fenotipo de presencia de espermatozoides primarios, decidimos estudiar si en estos animales existía algún defecto durante la espermatogénesis que pudiera explicar dichos fenotipos. En el animal hermafrodita, bajo condiciones normales, las primeras 40 células germinales de cada brazo de la gónada que entran en meiosis se diferencian en espermatozoides durante el estado larval L4. Una vez que el esperma se ha formado, en el animal adulto, comienza la ovogénesis y continua durante el resto del periodo reproductivo del animal (Hubbard y Greenstein, 2000).

Cuando observamos por microscopía tipo Nomarski la gónada de algunos animales L4 *vip-2 (RNAi)* observamos la presencia de ovocitos diferenciados en la región proximal. En estos animales, la espermatogénesis aún no había concluido, sin embargo la ovogénesis ya se había iniciado.

Para confirmar que la ovogénesis inicia de manera prematura, realizamos ensayos de inmutación en la gónada de animales *vip-2(RNAi)*, usando un marcador específico de los ovocitos, la proteína RME-2 (receptor-mediated endocytosis). RME-2 es miembro de la superfamilia de receptores de LDL (lipoproteínas de baja densidad) y es el

receptor de las proteínas de vitelo (vitelogeninas) que son importadas desde el intestino (Grant y Hirsh, 1999).

Los animales silvestres hermafroditas en estadio L4 no presentaron señal positiva para la tinción de RME-2 (0%) (Fig. 15 B). Sin embargo, la gónada de algunos animales *vip-2(RNAi)* L4 (35%), si mostró señal (Fig. 15 D). De igual forma que lo reportado en Salinas *et al.*, 2007 en nuestros experimentos la gónada de algunos animales *vbh-1(RNAi)* fue positiva a esta señal (26.66%) (Fig. 15 F). Los animales *vip-2; vbh-1(RNAi)* también presentaron este fenotipo (31.8%) (Fig. 15 H) (Tabla 4).

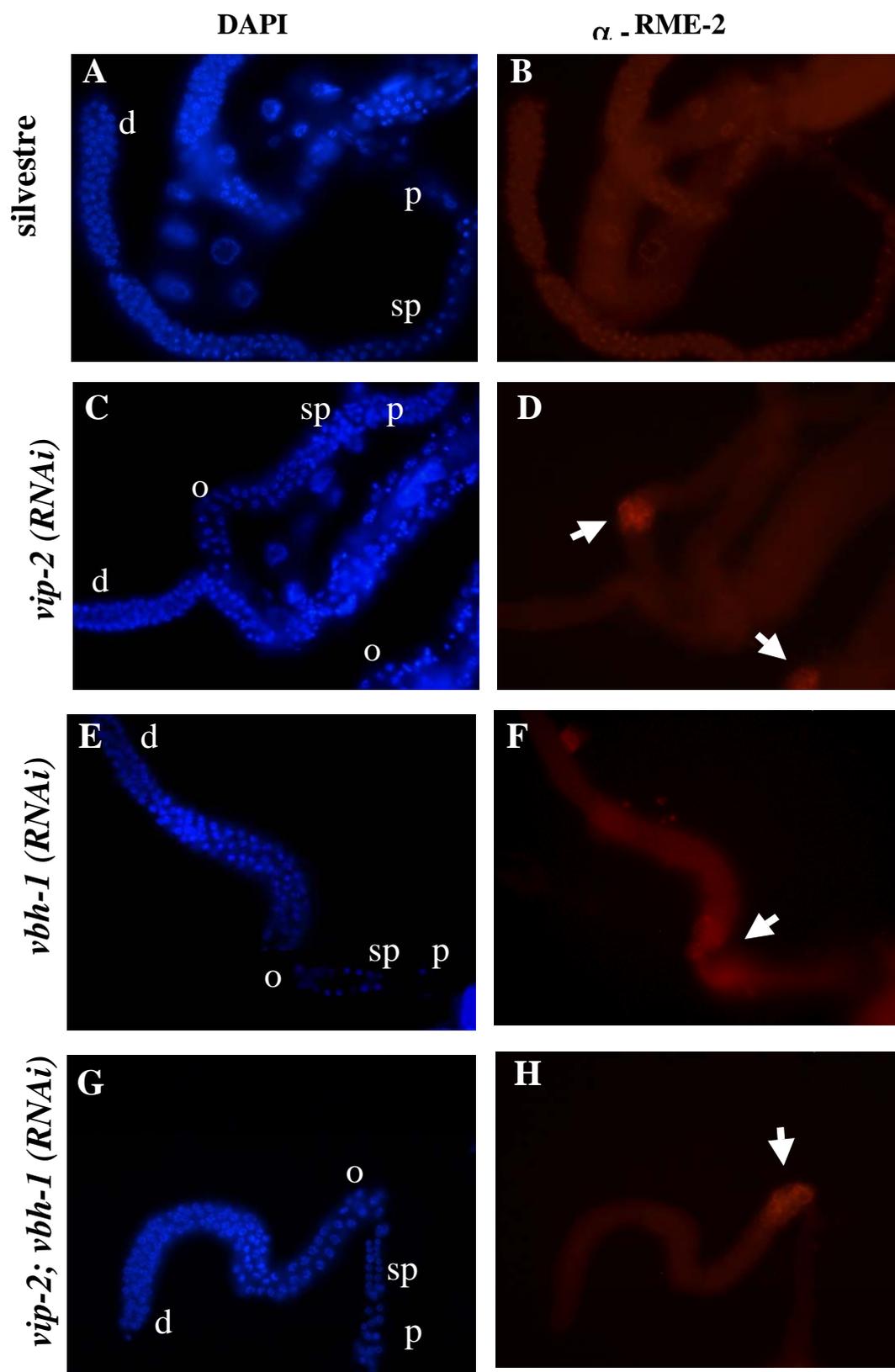
En estos resultados no existe un aumento en el fenotipo observado cuando se eliminan los dos genes lo que sugiere que estos dos genes actúan en la misma vía. Estos datos mostraron que al igual que VBH-1, la proteína VIP-2 es importante para la regulación del proceso de espermatogénesis, para la continua formación de espermatozoides y la inhibición de la ovogénesis en el estadio L4, ya que en ausencia de esta proteína, las células germinales realizan el cambio de espermatogénesis a ovogénesis de forma prematura.

Por los resultados mostrados en el doble RNAi creemos que las proteínas VBH-1 y VIP-2 se encuentra participando en esta vía de transición de espermatogénesis a ovogénesis pero se necesitaran más estudios epistáticos con otros genes que actúan en dicha vía para conocer el nivel en el cual VBH-1/VIP-2 están participando.

**Tabla 4**

Feminización de la gónada de animales L4				
genotipo	temperatura	n	gónadas normales	gónadas feminizadas
control (PV)	26 °C	16	100 %	0%
<i>vip-2 (RNAi)</i>	26 °C	20	65 %	35%
<i>vbh-1 (RNAi)</i>	26 °C	15	73.33%	26.66%
<i>vip-2; vbh-1(RNAi)</i>	26 °C	22	68.18%	31.81%

Las gónadas de animales hermafroditas en estado larval L4 de los fondos genéticos indicados fueron liberadas, fijadas y teñidas con DAPI y con un anticuerpo contra RME-2 para detectar las gónadas en las que se había iniciado prematuramente el cambio de espermatogénesis a ovogénesis. PV= plásmido vacío usado como control.



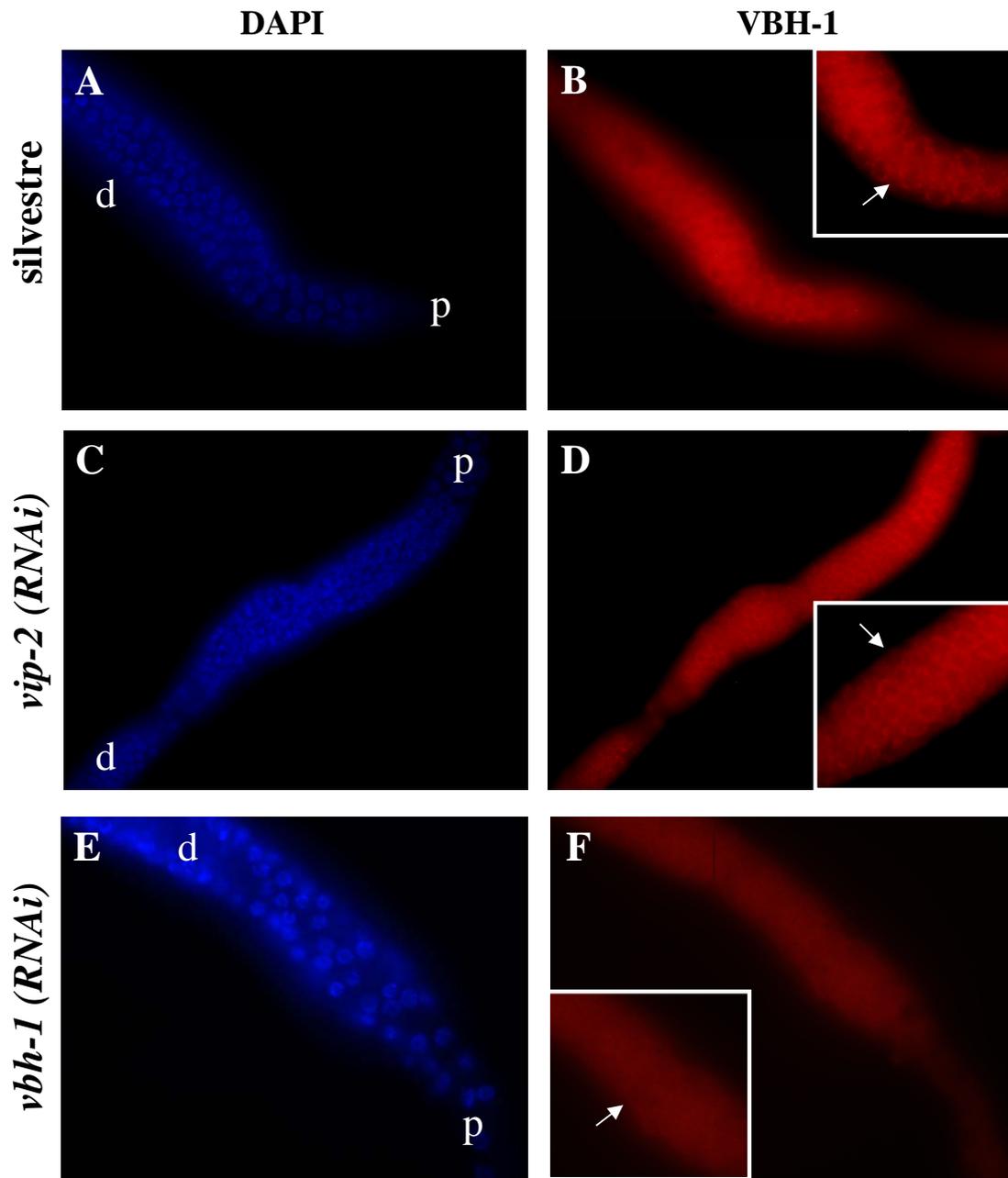
**Fig. 15. Transición prematura de espermatogénesis a ovogénesis en animales *vip-2* (RNAi).** La gónada de animales en estadio L4 de los diferentes fondos genéticos indicados, fue fijada y teñida para detectar la presencia de ovocitos usando un anticuerpo contra RME-2, el receptor del vitelo. Los núcleos de las células germinales se tiñeron con DAPI (A, C ,E y G). **A y B)** Los animales *rrf-1* (PV) usados como control no expresaron a la proteína RME-2 (0%) (n = 16). **C y D)** Los animales *vip-2* (RNAi) realizan la transición espermatogénesis/ovogenesis de forma prematura, como se puede observar son positivos para la proteína RME-2 (35 %) (n = 20). **E y F)** Los animales *vbh-1* (RNAi) también presentan

señal de RME-2 (26.66 %) (n = 16). **G y H)** Al igual que los casos anteriores, los animales *vip-2*; *vbh-1* (RNAi) también presentan señal de RME-2 (31.8 %) (n = 22). Los animales usados para estos experimentos se crecieron a 26 °C. Las abreviaturas usadas en la figura son: d, distal; sp, esperma; o, ovocitos; p, proximal

### **La falta de VIP-2 no altera la localización celular de VBH-1**

La proteína VBH-1 se expresa específicamente en la línea germinal del *C. elegans* (Salinas *et al.*, 2007). VBH-1 se asocia a los gránulos P y se expresa en el citoplasma de las células germinales de la gónada de animales hermafroditas y machos. En los machos, VBH-1 se observa en los espermatozoides primarios y secundarios pero no en los espermatozoides maduros. Durante la embriogénesis, VBH-1 se localiza en el citoplasma de los blastómeros somáticos y germinales (Salinas *et al.*, 2007). Para conocer si la interacción VIP-2/VBH-1 es necesaria para la localización y expresión de VBH-1 en las células germinales, teñimos la gónada de animales *vip-2* (RNAi) con un anticuerpo contra VBH-1.

No observamos cambios en la expresión ni en la localización de VBH-1 en la gónada de animales hermafroditas *vip-2* (RNAi) (Fig. 16 D). Como control observamos que los animales *vbh-1* (RNAi) mostraron una ausencia total en la expresión de VBH-1 (Fig 16 F). Después de estos resultados, concluimos que la interacción de VIP-2 con VBH-1 no es requerida para la localización y expresión de la proteína VBH-1 en las células germinales.



**Fig. 16. Los animales *vip-2 (RNAi)* expresan de forma normal a la proteína VBH-1.** La gónada de animales adultos de los diferentes fondos genéticos indicados fue teñida con un anticuerpo contra la proteína VBH-1. Los núcleos de las células se teñieron con DAPI (A, C y E). **A y B)** Los animales control (PV) expresan a VBH-1 en la región perinuclear de las células germinales. **C y D)** Los animales *vip-2 (RNAi)* expresan de forma normal a la proteína VBH-1. **E y F)** Los animales *vbh-1 (RNAi)* no expresan a VBH-1. Los animales usados para estos experimentos se crecieron a 26 °C. Las abreviaturas usadas en la imagen son: d, distal; p, proximal.

## DISCUSIÓN

### La proteína VIP-2 interacciona con VBH-1

VBH-1 es una proteína que se expresa específicamente en la línea germinal y su función es importante para el funcionamiento de las células germinales en el *C. elegans* (Salinas *et al.*, 2007). Utilizando un ensayo de dos híbridos encontramos que la proteína VIP-2 interacciona físicamente con VBH-1 y sugerimos la interacción con las proteínas VIP-1 y VIP-3. Las proteínas VIP-2 y VIP-3 no tienen homólogos evidentes en otros organismos solamente dentro del género *Caenorhabditis*.

La proteína VIP-1 tiene homólogos en otros organismos aunque su función todavía no está clara. Se ha reportado que es similar al factor de inicio de la traducción eIF4B. Analizando la estructura de la proteína VIP-1 encontramos que contiene dominios RRM que posiblemente utiliza para unirse a RNA. El factor eIF4B es una proteína de unión a RNA que participa durante los primeros pasos del inicio de la traducción y en conjunto con el eIF4H estimulan la actividad helicasa de eIF4A (Rhoads *et al.*, 2006). Se ha reportado que el homólogo de VBH-1 en *Drosophila*, la proteína VASA presenta alta homología con el factor de inicio de la traducción eIF4A, otra proteína helicasa de la familia DEAD (Lasko y Ashburner, 1988). La actividad helicasa de este factor traduccional es la de disociar las estructuras secundarias que se forman en el extremo 5' de los RNA mensajeros, favoreciendo la unión de estos con los ribosomas, regulando así el inicio de la traducción de mensajeros específicos (Gingras *et al.*, 1999). Además durante el desarrollo embrionario Vasa interacciona con el factor de inicio de la traducción, eIF5B a través de su extremo carboxilo (Carrera *et al.*, 2000; Johnstone y Lasko, 2004). Esta interacción regula positivamente la traducción de varios RNAs mensajeros (Breitwieser *et al.*, 1996; Markussen *et al.*, 1997; Styhler *et al.*, 1998). Es necesario repetir el ensayo de actividad de  $\beta$ -galactosidasa para determinar si la interacción de VIP-1 con VBH-1 y estudiar si tienen algún papel en la regulación de la traducción de RNA mensajeros en el *C. elegans*.

La proteína VIP-2 presenta en su secuencia cajas RGG, las cuales también unen RNA, además de incluir un dedo de zinc (CCCH), e interacciona con CGH-1, la cual es un componente de los gránulos P y gránulos de procesamiento en levadura.

Las proteínas con dedos de zinc son miembros de una superfamilia de proteínas que unen ácidos nucleicos. Estas proteínas contienen cisteínas e histidinas coordinadas por un ión zinc. La resolución de la estructura de algunas de estas proteínas por NMR (resonancia magnética nuclear) y por rayos X, ha permitido conocer la forma en que se unen a sus blancos. Además de las proteínas con dedos de zinc típicas que se unen a DNA, se han reportado muchas otras que presentan actividad de unión a RNA (Brown, 2005). Entre los pocos casos de estructuras RNA-proteína que se han resuelto se encuentran la de 5S-TFIIIA en los ovocitos de *Xenopus*. TFIIIA es una proteína con actividad de unión a DNA y a RNA que presenta nueve dedos de zinc. Por un lado, es un importante factor transcripcional para la RNA pol III y es esencial para la expresión del gen de rRNA 5S. Por otro lado se une a los RNA ribosomales 5S para formar un partícula de ribonucleoproteína que estabiliza al RNA y facilita su transportación, para ser utilizado en el ensamblaje de los ribosomas (Traci, 2005). Los mecanismos de reconocimiento de secuencia en el RNA son diferentes de aquellos comúnmente usados en el reconocimiento de DNA de doble cadena, donde una pequeña  $\alpha$ - hélice se une por enlaces de hidrógeno a las bases del surco mayor del DNA. El reconocimiento de RNA de doble cadena depende en gran parte de los contactos con los fosfatos y de algunas interacciones hidrofóbicas con algunas bases que se encuentran localizadas de manera accesible y permiten el reconocimiento de secuencias únicas. La unión a RNA de cadena sencilla se lleva a cabo por la intercalación de aminoácidos aromáticos entre las bases y la especificidad de la interacción se ve favorecida por la presencia de otros dominios de unión presentes en la proteína (Brown, 2005). En base a los dominios de unión a ácidos nucleicos que presentan las proteínas VIP-1 y VIP-2 y por su posible función en el metabolismo de RNA pensamos pudieran unir de manera específica los RNA mensajeros blancos para la helicasa de RNA VBH-1.

### **VIP-2 y VBH-1 participan en la espermatogénesis**

Nuestros experimentos de RNAi indican que al igual que VBH-1, VIP-2 es importante para la función y producción de los gametos. VIP-2 y VBH-1 participan en la formación apropiada de las células germinales para garantizar la fertilidad de los animales. Sin embargo, a diferencia de VBH-1, VIP-2 no es necesaria en el desarrollo embrionario de

este organismo. El fenotipo de acumulación de ovocitos, característico de animales *vbh-1 (RNAi)* está también presente en los animales *vip-2 (RNAi)*. Los animales *vip-2 (RNAi)* también tienen en la gónada espermatozoides primarios, una evidencia de defectos durante la espermatogénesis y es por esta razón que pensamos VBH-1 y VIP-2 participan de manera conjunta durante la espermatogénesis.

La transición de formación de espermatozoides a formación de ovocitos, en el animal hermafrodita requiere del control de dos factores de determinación sexual, las proteínas FEM-3 y TRA-2 así como de la represión traduccional por proteínas que se unen a sus RNA mensajeros (Ellis y Schedl, 2007). Cuando la espermatogénesis toma lugar en la etapa larval L4, la traducción del RNA mensajero de *tra-2*, que es el inductor de diferenciación femenina, es reprimida por las proteínas GLD-1 y FOG-2 (Ellis y Schedl, 2007). La represión de *tra-2* permite que el inductor de diferenciación masculina, FEM-3 se encuentre activo. De forma contraria, en la transición de espermatogénesis a ovogénesis, la traducción del RNA mensajero de *fem-3* es reprimida por FBF-1, FBF-2 y NOS-3 (Ellis y Schedl, 2007). En este trabajo encontramos que la falta de VIP-2 altera la regulación de esta vía, haciendo que la espermatogénesis no culmine y que se formen ovocitos de forma prematura, al igual que cuando VBH-1 no está presente. Desconocemos aún cómo es que participan estas proteínas en la vía y a que nivel actúan. Se ha propuesto que VBH-1 podría participar en la regulación de la traducción de los RNA mensajeros de esta vía (Salinas *et al.*, 2007). Estudios epistáticos entre VBH-1 y VIP-2 con otros genes de la vía podrían ayudar a entender el papel de VBH-1 y VIP-2 en el cambio de espermatogénesis a ovogénesis.

### **La localización de VBH-1 en los gránulos P es independiente de VIP-2**

La proteína VBH-1 se expresa de manera abundante en la región perinuclear asociándose a los gránulos P y en el citoplasma de las células germinales (Salinas *et al.*, 2007). Las proteínas GLH -1, -2, -3 y -4 de *C. elegans* y Vasa de *Drosophila* son requeridas para mantener la estructura de los gránulos P y de los gránulos polares, respectivamente (Breitwieser *et al.*, 1996; Kawasaki *et al.*, 1998). La proteína VBH-1 no es requerida para el ensamblaje ni la estructura de los gránulos P, hasta ahora no se

conoce de la existencia de algún componente que prevenga completamente la formación de estos gránulos en el *C. elegans*. VIP-2 no es necesaria para localizar a VBH-1 en estos sitios, ya que la eliminación de VIP-2 por RNAi no alteró la distribución ni la expresión de VBH-1 en los gránulos P. Algo semejante a lo ocurrido con VIP-2 y VBH-1, sucede con PGL-1, PGL-2 y PGL-3, las cuales interactúan físicamente, sin embargo su localización en los gránulos P es independiente de la interacción entre ellas (Kawasaki *et al.*, 2004).

### **La posible función de las proteínas VIP-1 y VIP-2 con VBH-1.**

Las proteínas DEAD box participan mediante interacciones con otras proteínas en procesos esenciales como son: la transcripción, la biogénesis de los ribosomas, el splicing, la edición y la exportación de los RNA mensajeros desde el núcleo y en el inicio de la traducción (Linder y Lasko, 2006). Se sabe que el dominio de helicasa de las proteínas DEAD por sí solo no es suficiente para reconocer el RNA mensajero blanco de manera específica. Sin embargo, algunos de los dominios de esta proteína en las regiones amino y carboxilo tienen secuencias de unión a RNA o de interacción con otras proteínas que le ayudan a reconocer los RNA mensajeros a los que se unen (Mohamed, 2005).

El extremo carboxilo de la proteína VBH-1 es rico en el aminoácido glicina, y también presenta regiones RGG (Salinas *et al.*, 2007). Las regiones ricas en glicina y las cajas RGG inicialmente se describieron como motivos que interactúan con RNA y generalmente se encuentran en asociación con otros dominios de unión a RNA y actualmente se sabe que estas regiones también están involucradas en interacciones proteína-proteína (Ghisolfi *et al.*, 1992; Cartegni *et al.*, 1996). Una posibilidad es que la interacción de VBH-1 con las proteínas VIP-1 y VIP-2 probablemente se lleve a cabo a través de sus motivos RGG y de su secuencia rica en glicinas. Esta interacción posiblemente favorezca la unión de RNAs a la proteína VBH-1 y le confiera especificidad por sus blancos, la cual a su vez se vería favorecida por la presencia de otros dominios de unión a RNA que presentan las proteínas VIP-1 y VIP-2.

En este trabajo describimos que en los diferentes aspectos del desarrollo de las células germinales analizados, la falta de VIP-2 o VBH-1, ya sea eliminando la expresión de

una proteína o de las dos en conjunto resulta en fenotipos similares. Estos datos indican que su interacción es importante para su función y que posiblemente se encuentran en una misma vía de regulación. En este trabajo también proponemos que la interacción de VIP-2 con VBH-1 le proporciona a esta última la especificidad por los RNA mensajeros para llevar a cabo su actividad de helicasa durante la transición de espermatogénesis a ovogénesis en el *C. elegans*.

## CONCLUSIONES

1. Usando el sistema de dos híbridos identificamos a tres proteínas que interaccionan con la helicasa de RNA VBH-1. VIP-1 es una proteína con motivos de unión a RNA del tipo RRM y es similar al factor de inicio de la traducción eIF4B. VIP-2 tiene dominios de unión a ácidos nucleicos. VIP-3 es una proteína con función desconocida. La única interacción que se comprobó fue la de VIP-2 con VBH-1
2. Las proteínas VIP-2 y VIP-3 sólo tienen homólogos en los nematodos *C. briggsae* y *C. elegans* pero no en otros organismos.
3. La proteína VIP-2 tiene un dedo de zinc del tipo CCCH y tres cajas RGG, lo que sugiere que puede unir RNA. VIP-2 es importante para la función de la línea germinal. La falta de esta proteína reduce la fertilidad en los animales hermafroditas debido a que hay defectos en la gametogénesis. VIP-2 es importante para la producción de espermatozoides y para garantizar la correcta transición de espermatogénesis a ovogénesis en la gónada del hermafrodita. El bloqueo de la expresión de VIP-2 no altera la localización ni la expresión de VBH-1 en las células germinales.
4. El papel de VIP-2 es similar al de VBH-1, lo que sugiere que estas proteínas interaccionan para realizar su función en la gónada y que probablemente participan en la misma vía.

## REFERENCIAS

Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J. *Biología Molecular de la Célula*. Ed. Omega (2002), 566-559.

Anahita A., Keiper B., Kawasaki I., Fan Y., Kohara Y., Rhoads R. y Strome S. An isoform of eIF4E is a component of germ granules and is required for spermatogenesis in *C. elegans*. *Development* (2001) *128*, 3899-3912.

Barbee S.A. y Evans T.C. The Sm proteins regulate germ cell specification during early *C. elegans* embryogenesis. *Developmental Biology* (2006) *291*, 132–143.

Barbee S.A., Lublin A.L. y Evans T.C. A novel function for the Sm proteins in germ granule localization during *C. elegans* embryogenesis. *Curr. Biol.* (2002) *12*, 1502–1506.

Batchelder C., Dunn M.A., Choy B., Suh Y., Cassie C., Shim E.Y., Shin T.H., Mello C., Seydoux G. y Blackwell T.K. Transcriptional repression by the *Caenorhabditis elegans* germ-line protein PIE-1. *Genes Dev.* (1999) *13*, 202–212.

Beggs J.D. Lsm proteins and RNA processing. *Biochem. Soc. Trans.* (2005) *33*, 433-438.

Benz J., Trachsel H., y Baumann U., Crystal structure of the ATPase domain of translation initiation factor 4A from *Saccharomyces cerevisiae*- the prototype of DEAD box protein family. *Structure* (1999) *7*, 671-679.

Birnboim H.C. A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymol.* (1984) *100*, 243-255.

Bouveret E., Rigaut G., Shevchenko A., Wilm M., Seraphin B. A Sm-like protein complex that participates in mRNA degradation. *EMBO.* (2000) *19*, 1661-1671.

Bowerman B., Draper B.W., Mello C. y Priess J.R. The maternal gene *skn-1* encodes a protein that is distributed unequally in early *C. elegans* embryos. *Cell* (1993) *74*, 443–452.

Bowerman B., Eaton B.A., Priess J.R. *skn-1*, a maternally expressed gene required to specify the fate of ventral blastomeres in the early *C. elegans* embryo. *Cell* (1992) *68*, 1061–1075.

Breitwieser W., Markussen F. H., Horstmann H. y Ephrussi A. Oskar protein interaction with Vasa represents an essential step in polar granule assembly. *Genes Dev.* (1996) *10*, 2179–2188.

Brenner S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* (1974) *77*, 71-94.

Brown S. Zinc finger proteins: getting a grip on RNA. *Current Opinion in Structural Biology* (2005) *15*, 94–98.

Carrera P., Johnstone O., Nakamura A., Casanova J., Jackle H., Lasko P. VASA mediates translation through interaction with a *Drosophila* yIF2 homolog. *Mol Cell* (2000) *5*, 181-187.

Cartegni L., Maconi M., Morandi E., Cobianchi F., Riva S., Biamonti G. HnRNP A1 selectively interacts through its Gly-rich domain with different RNA-binding proteins. *J Mol. Biol.* (1996) *4*; 259 (3): 337-4.

Castrillon D.H., Quade B.J., Wang T.Y., Quigley C., Crum C.P. The human VASA gene is specifically expressed in the germ lineage. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2000) *97*, 9585– 9590.

Chuang R.Y., Weaver P.L., Liu Z., Chang T.H. Requirement of the DEAD-box protein Ded1p for messenger RNA translation. *Science* (1997) *275*, 1468– 1471.

De la Cruz J., Iost I., Kressler D., Linder P. The p20 and Ded1 proteins have antagonistic roles in eIF4E-dependent translation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1997) *94*, 5201– 5206.

DeRenzo C., Reese K.J., y Seydoux G. Exclusion of germ plasm proteins from somatic lineages by cullin-dependent degradation. *Nature* (2003) *424*, 685–689.

Detwiler M.R., Reuben M., Li X., Rogers E. y Lin R. Two zinc finger proteins, OMA-1 y OMA-2, are redundantly required for oocyte maturation in *C. elegans*. *Dev. Cell.* (2001) *1*, 187-199.

Draper B.W., Mello C., Bowerman B., Hardin J. y Priess J.R. (1996). MEX-3 is a KH domain protein that regulates blastomere identity in early *C. elegans* embryos. *Cell* (1996) *87*, 205–216.

Edgar L.G., Carr S., Wang H., y Wood, W.B. Zygotic expression of the caudal homolog *pal-1* is required for posterior patterning in *Caenorhabditis elegans* embryogenesis. *Dev. Biol.* (2001) 229, 71–88.

Ellis R. y Schedl T. Sex determination in the germline. WormBook (2007) ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.82.2, www.wormbook.org

Fairman M. E., Maroney P. A., Wang W., Bowers H. A., Gollnick P., Nilsen T. W. y Jankowsky E. Protein Displacement by DExD/H “RNA Helicases” without duplex unwinding. *Science* (2004) 304, 730-734.

Fields S. y Song O.K. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* (1989) 340, 245-246.

Fire A., Xu S., Montgomery M.K., Kostas S.A., Driver S.E., y Mello C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* (1998) 391, 806-811.

Foresta C., Ferlin A., Moro E. Deletion and expression analysis of genes on the human Y chromosome revealed a major role for DBY in male infertility. *Hum. Mol. Genet.* (2000) 9, 1161– 1169.

Fraser A. G., Kamath R. S., Zperlen P., Martínez-Campos M., Sohrmann M. y Ahringer J. Functional genomics analysis of *C. elegans* chromosome 1 by systematic RNA interference. *Nature* (2000) 408, 325-330.

Ghisolfi L., Joseph G., Amalric F., Erard M. The glycine-rich domain of nucleolin has an unusual supersecondary structure responsible for its RNA-helix-destabilizing properties. *J Biol. Chem.* (1992) 267, 2955-2959.

Gingras A.C., Raught B. y Sonenberg N. eIF4 initiation factor: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu. Rev. Biochem.* (1999) 68, 913-963.

Grant B. y Hirsh D. Receptor-mediated endocytosis in the *Caenorhabditis elegans* oocyte. *Mol Biol Cell* (1999) 10, 4311-4326.

Guedes S. y Priess J.R. The *C. elegans* MEX-1 protein is present in germline blastomeres and is a P granule component. *Development* (1997) 124, 731–739.

Hay B., Jan L., Jan Y. A protein component of *Drosophila* polar granules is encoded by *vasa* and has extensive sequence similarity to ATP-dependent helicases. *Cell* (1988) 55, 577-587.

Hay B., Jan L., Jan Y. Localization of *vasa* a component of *Drosophila* polar granules, in maternal-effect mutants that alter embryonic anteroposterior polarity. *Development* (1990) 109, 425-433.

Heather B., Daniel N., Chris C. y Haifan L. The Role of PIWI and the miRNA machinery in *Drosophila* germline determination. *Current Biology* (2006) 16, 1–11.

Hubbard J.A. y Greenstein D. Introduction to the germ line. *WormBook* (2005), ed. The *C. elegans* Research Community, *WormBook*, doi/10.1895/wormbook.1.18.1.wormbook.org.

Hubbard J. A. y Greenstein D. The *Caenorhabditis elegans* gonad: a test tube for cell and developmental biology. *Developmental Dynamics* (2000) 218, 2-22

Hunter C.P., y Kenyon, C. Spatial and temporal controls target *pal-1* blastomere-specification activity to a single blastomere lineage in *C. elegans* embryos. *Cell* (1996) 87, 217–226.

Jankowsky E., Gross C.H., Shumann S., Pyle A.M. Active disruption of an RNA–protein interaction by a DExH/D RNA helicase. *Science* (2001) 291, 121–125.

Johnstone O. y Lasko P. Interaction with eIF5B is essential for Vasa function during development. *Development* (2005) 131, 4167-4178.

Johnstone O., Deuring R., Bock R., Linder P., Fuller M. T. y Lasko P. Belle is a *Drosophila* DEAD-box protein required for viability and in the germ line. *Developmental Biology* (2004) 277, 92-101.

Jones A.R., Francis R. y Schedl T. GLD-1, a cytoplasmic protein essential for oocyte differentiation, shows stage and sex-specific expression during *Caenorhabditis elegans* germline development. *Dev. Biol.* (1996) 180, 165–183.

Kathleen A. K., Pliny A.S., Leung-Chi A., Estevez A.O., Scott H.C. y Bennett K.L. Combinatorial RNA interference indicates GLH-4 can compensate for GLH-1; these two granule P components are critical for fertility in *C. elegans*. *Development* (2000) 127, 2907-2916.

Kawasaki I., Amiri A., Fan Y., Meyer N., Dunkelbarger S., Motohashi T., Karashima T., Bossinger O., y Strome S. The PGL family proteins associate with germ granules and function redundantly in *Caenorhabditis elegans* germline development. *Genetics* (2004) *167*, 645–661.

Kawasaki I., Shim Y.H., Kirchner J., Kaminker J., Wood W.B. y Strome, S. PGL-1, a predicted RNA-binding component of germ granules, is essential for fertility in *C. elegans*. *Cell* (1998) *94*, 635–645.

Kiledjian M. y Dreyfuss. Primary structure and binding activity of the hnRNP U protein: binding RNA through RGG box. *EMBO* (1992) *11*, 2655-2664.

Lahn B.T. y Page D.C. Functional coherence of the human Y chromosome. *Science* (1997) *278*, 675– 680.

Lasko P. y Ashburner M. Posterior localization of vasa protein correlates with, but is not sufficient for, pole cell development. *Genes Dev* (1990) *4*, 905 – 21.

Lasko P. y Ashburner M. The product of the *Drosophila* gene vasa is very similar to eukaryotic initiation factor-4A. *Nature* (1988) *335*, 611-617.

Leroy P., Alzari P., Sassoon D., Wolgemuth D., Fellous M. The protein encoded by a murine male germ cell-specific transcript is a putative ATP-dependent RNA helicase. *Cell* (1989) *57*, 549– 559.

Li S, Vidal M. A map interactoma network of the metazoan *C. elegans*. *Science* (2004) *303*, 540-543.

Liang L., Diehl-Jones W., Lasko P. Localization of vasa protein to the *Drosophila* pole plasm is independent of its RNA-binding and helicase activities. *Development* (1994) *120*, 1201-1211.

Linder P. y Lasko P. Bent out of Shape: RNA unwinding by the DEAD-box helicase Vasa. *Cell* (2006) *125*, 219-221.

Linder P., Lasko P., Ashburner M., Leroy P., Nielsen P., Nishi K. Birth of the D-E-A-D box. *Nature* (1989) *337*, 121– 122.

Liu N., Dansereau D.A., Lasko P. Fat facets interacts with vasa in the *Drosophila* pole plasm and protects it from degradation. *Curr Biol.* (2003) *13*, 1905–1909.

- Maeda I., Kohara Y., Yamamoto M., Sujimoto A. Large Scale analysis of gene function in *Caenorhabditis elegans* by high throughput RNAi. *Curr. Biol.* (2001) *11* (3), 171-176.
- Mahowald A.P. Polar granules of *Drosophila*. II Ultrastructural changes during early embryogenesis. *J. Exp. Zool.* (1968) *167*, 237-262.
- Mamiya N. y Worman H. J. Hepatitis C virus core protein binds to a DEAD box RNA helicase. *J. Biol. Chem.* (1999) *274*, 15751– 15756.
- Marchler A., Bryant S.H. “CD search: protein domains annotations on the fly. *Nucleic Acids Res.* (2004) *32*, 327-331.
- Markussen F. H., Breitwieser W. y Ephrussi A. Efficient translation and phosphorylation of Oskar require Oskar protein and the RNA helicase Vasa. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* (1997) *62*, 13–17.
- McCarter J., Bartlett B., Dang D y Schedl T. On the Control of Oocyte Meiotic Maturation and Ovulation in *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology* (1999) *205*, 111–128.
- Medina M. A. Los siete magnificos. *Encuentros de la Biología* (2005) *106*, 3-5.
- Mello C., Draper B.W., Krause M., Weintraub, H. y Priess J.R. The *pie-1* and *mex-1* genes and maternal control of blastomere identity in early *C. elegans* embryos. *Cell* (1992) *70*, 163–176.
- Mello C., Schubert C., Draper B., Zhang W., Lobel R. y Priess, J.R. The PIE-1 protein and germline specification in *C. elegans* embryos. *Nature* (1996) *382*, 710–712.
- Miller M. A., Viet Q., Min-Ho L., Kosinski M., Schedl T., Caprioli R. M. y Greenstein D. A Sperm cytoskeletal protein that signals oocyte meiotic maturation and ovulation. *Science* (2001) *291*, 2144-2147.
- Mohamed A. RNA Helicases: Regulators of differentiation. *Clinical Biochemistry* (2005) *38*, 499-503.
- Mootz D., Ho D.M. y Hunter C.P. The STAR/Maxi-KH domain protein GLD-1 mediates a developmental switch in the translational control of *C. elegans* PAL-1. *Development* (2004) *131*, 3263–3272.

- Navarro R.E., Shim E.Y., Kohara Y., Singson A., y Blackwell T.K. *cgh-1*, a conserved predicted RNA helicase required for gametogenesis and protection from physiological germline apoptosis in *C. elegans*. *Development* (2001) *128*, 3221–3232.
- Pitt J.N., Schisa J.A. y Priess J.R. P granules in the germ cells of *Caenorhabditis elegans* adults are associated with clusters of nuclear pores and contain RNA. *Dev. Biol.* (2000) *219*, 315–233.
- Raz E. The function and regulation of vasa-like genes in germ-cell development. *Genome Biology* (2000) *1*, 1017.1-1017.6
- Rhoads R.E., Tzventanka D.D., Nadajeda L. K. Mechanism and regulation of translation in *C. elegans*. (2006). Wormbook, ed. The *C. elegans* Research Community, Wormbook, doi/10.1985/wormbook.1.63.1, www.wormbook.org.
- Riddle D. L., Blumenthal T., Myer B. J. y Priess J. R. *C. ELEGANS* II. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press (1997).
- Saffman E. y Lasko P. Germline development in vertebrates and invertebrates. *Cell. Mol. Life Sci.* (1999) *55*, 1141-1163.
- Salinas L., Maldonado E., Macias M., Blackwell K y Navarro R. The DEAD box RNA helicase VBH-1 is required for germ cell function in *C. elegans*. *Genesis* (2007) *45*, 533-546
- Schisa J.A., Pitt J.N. y Priess J.R. Analysis of RNA associated with P granules in germ cells of *C. elegans* adults. *Development* (2001) *128*, 1287–1298.
- Seydoux G. y Dunn M.A. Transcriptionally repressed germ cells lack a subpopulation of phosphorylated RNA polymerase II in early embryos of *Caenorhabditis elegans* and *Drosophila melanogaster*. *Development* (1997) *124*, 2191–2201.
- Seydoux G. y Fire A. Soma-germline asymmetry in the distributions of embryonic RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Development* (1994) *120*, 2823–2834.
- Seydoux G., Mello C., Pettitt J., Wood W.B., Priess J.R., y Fire A. Repression of gene expression in the embryonic germ lineage of *C. elegans*. *Nature* (1996) *382*, 713–716.
- Shimada M., Kawahara H. y Doi H. Novel family of CCCH-type zinc-finger proteins, MOE-1, -2 and -3, participates in *C. elegans* oocyte maturation. *Genes to Cells* (2002) *7*, 933–947.

Shimada M., Yokosawa H. y Kawahara H. OMA-1 is a P granules-associated protein that is required for germline specification in *Caenorhabditis elegans*. *Genes to Cells* (2006) *11*, 383-396

Sijen T., Fleenor J., Simmer F., Thijssen K.L., Parrish S., Timmons L., Plasterk R.H., Fire A. On the role of RNA amplification in dsRNA triggered gene silencing. *Cell* (2001) *107*, 465-476.

Solmaz S. Yeast Two Hybrid Assay: A Fishing Tale. *BioTech Journal* (2003) *1*, 81-88.

Strome, S. Specification of the germ line. *WormBook* (2005), ed. The *C. elegans* Research Community, [WormBook,doi/10.1895/wormbook.1.9.1](https://doi.org/10.1895/wormbook.1.9.1). [wormbook.org](http://wormbook.org).

Styhler S., Nakamura A., Lasko P. VASA localization requires the SPRY-domain and SOCS-box containing protein, GUSTAVUS. *Dev. Cell* (2002) *3*, 865– 876.

Styhler S., Nakamura A., Swan A., Suter B. y Lasko P. vasa is required for GURKEN accumulation in the oocyte, and is involved in oocyte differentiation and germline cyst development. *Development* (1998) *125*, 1569–1578.

Subramaniam K. y Seydoux G. *nos-1* and *nos-2*, two genes related to *Drosophila nanos*, regulate primordial germ cell development and survival in *Caenorhabditis elegans*. *Development* (1999) *126*, 4861–4871.

Sulston J.E., Schierenberg E., White J.G. y Thomson J.N. The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* (1983) *100*, 64-119.

Tabara H., Hill R. J., Mello C., Priess J.R. y Kohara Y. *pos-1* encodes a cytoplasmic zinc-finger protein essential for germline specification in *C. elegans*. *Development* (1999) *126*, 1–11.

Tanaka S.S., Toyooka Y., Akasu R., Katoh-Fukui Y., Nakahara Y., Suzuki R. The mouse homolog of *Drosophila Vasa* is required for the development of male germ cells. *Genes Dev* (2000) *14*, 841– 853.

Tanner N.K., Cordin O., Banroques J., Doere M., Linder P. The Q motif: a newly identified motif in DEAD box helicases may regulate ATP binding and hydrolysis. *Mol Cell* (2003) *11*, 127– 138.

Tenenhaus C., Schubert C. y Seydoux G. Genetic requirements for PIE-1 localization and inhibition of gene expression in the embryonic germ line of *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* (1998) *200*, 212-224.

Tharun S. y Parker R. Targeting an mRNA for decapping: displacement of translation factors and association of Lsm1p-7p complex on deadenylated yeast mRNA. *Mol. Cell.* (2001) *8*, 1075-1083.

Timmons L., Tabara H., Mello C. y Fire A. Inducible systematic RNA silencing in *Caenorhabditis elegans*. *Molecular Biology of the Cell* (2003) *14*, 2972-2983

Traci M. Multiple modes of RNA recognition by zinc finger proteins. *Current Opinion in Structural Biology* (2005) *15*, 367-373.

Wiley J. y Sons L. *Caenorhabditis elegans*. *Yeast* (2000) *17*, 37-42.

Will C.L. y Luhrmann R. Spliceosomal UsnRNP biogenesis, structure and function. *Curr. Opin. Cell. Biol.* (2001) *13*, 290-301.

Wood W. B. The nematode *Caenorhabditis elegans*. Ed. New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press (1988).

Wylie C. Germ Cells. *Current Opinion in Genetics and Development* (2000) *10*, 410-413

Zeeman A-M., Stoop H., Boter M., Gillis A., Castrillon D.H., Oosterhuis J.W., Looijenga L. VASA is a specific marker for both normal and malignant human germ cells. *Lab Invest.* (2002) *82* 159-166.

Zhang F., Barboric M., Blackwell T.K. y Peterlin B.M. A model of repression: CTD analogs and PIE-1 inhibit transcriptional elongation by P-TEFb. *Genes Dev.* (2003) *17*, 748-758.





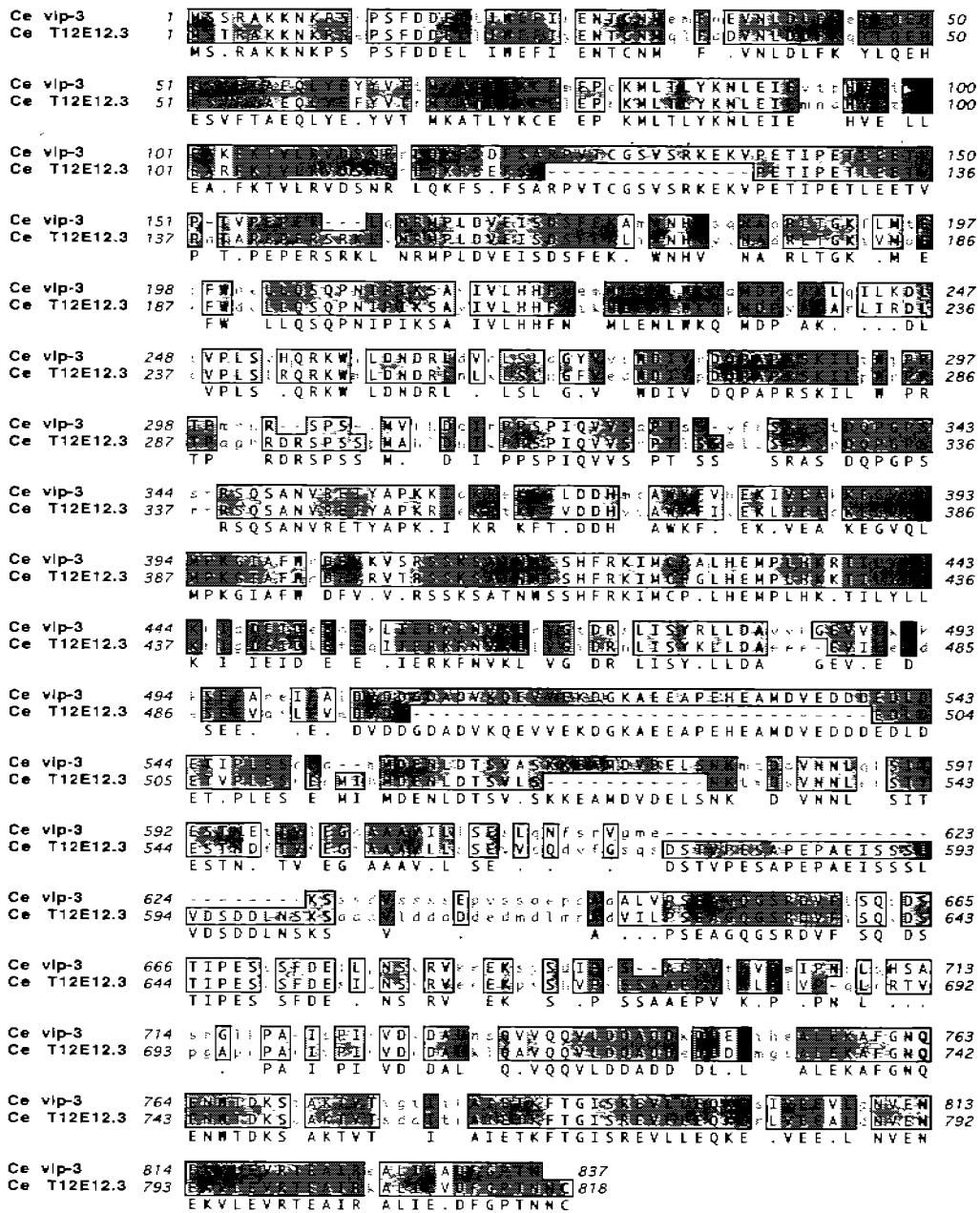


Fig. C. Secuencia de la proteína VIP-3 y su alineamiento con otra proteína del *C. elegans*. La proteína VIP-3 tiene 837 aminoácidos y presenta una identidad del 87 % con otra proteína desconocida del *C. elegans* (T12E12.3). La tercera línea muestra la secuencia conservada de las proteínas.

## MEDIOS Y SOLUCIONES

### Medio SOC

Contiene para 100 ml de agua:

2 g de bactotripton

0.5 g de extracto de levadura

5 g de NaCl

0.5 ml de  $MgCl_2$  2 M,

20 mM de glucosa.

### Medio selectivo

Por separado se prepararon dos soluciones:

- 1 litro de medio mínimo A 5X (solución de sales)

52.5 g de  $K_2HPO_4$

22.5 g de  $KH_2PO_4$

5 g de  $(NH_4)_2SO_4$

2.5 g de citrato de sodio dihidratado.

- Una mezcla de agar con agua

15 g de agar

775 ml de agua.

Ambas soluciones se esterilizaron en autoclave por 20 min a 120 °C.

Para hacer las placas se mezclaron: 775 ml de la mezcla de agar, 200 ml de medio mínimo A 5X, 1 ml de  $MgSO_4$ , 0.5 ml de tiamina al 1 %, 10 ml de cada uno de los aminoácidos requeridos (uracilo, leucina, histidina) en una concentración de 4 mg/ml y 1 ml de ampicilina a 50 mg /ml. Los aminoácidos, la tiamina el sulfato de magnesio y la glucosa se esterilizaron por filtración.

### Amortiguador SSC 20 X

3 M NaCl

0.3 M de citrato de sodio

### Solución de hibridación

reactivo de Denhardt 5X,

SDS 0.2%,

50 mM de amortiguador de fosfatos pH 6.5

5X SSC

### Solución de lavado (1)

178 ml de  $H_2O$  milli Q,

20 ml de SSC 20X

2 ml de SDS 10%

### Solución de lavado (2)

193 ml de  $H_2O$  milli Q

5 ml de SSC 20X

2 ml de SDS 10%

**LiAc/ TE**

0.1 M Acetato de litio

10 mM Tris pH 8.0

1mM EDTA

**Amortiguador Z pH 7.0**

60 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

40 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

10 mM KCl

1 mM MgSO<sub>4</sub>

50 μM β-mercaptoetanol

antes de usarse se le agregó 0.05 % de SDS, 1 mM de DTT y 1 mg /ml de X-gal

**Medio NGM (Brenner, 1974)**

Incluye para un litro:

2 g de NaCl

4 g de bactotripton

3 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

0.5 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

8 mg de colesterol

20 g de agar.

El medio se esterilizó por autoclave durante 20 min a 121°C a 15 lb de presión,

**Medio 2XYT**

Incluye para 500 ml:

2.5 g de NaCl

8 g de bactotripton

5 g de extracto de levadura

**Solución de fijado**

1.1 g de paraformaldehído, disuelto en 26.4 ml de agua MilliQ

3 ml de PBS 10X

2.4 ml HEPES 1M

48 μl MgSO<sub>4</sub> 1M

96 μl EGTA 250 mM