



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

UNAM
POSGRADO 

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

LA EXPRESIÓN DE LOS GENES *cgh-1a* Y
cgh-1b DURANTE EL DESARROLLO DEL
PEZ CEBRA (*Danio rerio*)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :
MAESTRO EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A :
JORGE LUIS CASTILLO ROBLES

Tutor: Dr. Ernesto Maldonado Olvera



MÉXICO, D. F.

Agosto 2011



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.

Alguien me habló todos los días de mi vida
al oído, despacio, lentamente.
Me dijo: ¡vive, vive, vive!
Era la muerte.

Jaime Sabines (Del mito)

RECONOCIMIENTOS

El presente trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Ernesto Maldonado en el departamento de Biología Celular y del Desarrollo del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutoral que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:
Dra. Hilda Lomeli Instituto de Biotecnología
Dr. Iván Velasco Instituto de Fisiología Celular

Para la realización de este proyecto fue necesaria la participación y el trabajo de las siguientes personas:

La Dra. Rosa Estela Navarro González fungió como co-directora de este proyecto y en su laboratorio y bajo su dirección se realizó buena parte del trabajo experimental de esta tesis, también contamos con la asistencia técnica de la M. En C. Laura Silvia Salinas Velásquez, Técnico Académico del laboratorio de la Dra Rosa E. Navarro.

El Biól. José Luis Ramos Balderas quien es Técnico Académico del laboratorio del Dr. Ernesto Maldonado y participó en los experimentos de RT-PCR semicuantitativo.

Los Técnicos del acuario, el M. En C. Vladimir Tonatiuh Pelcastre Campos y la Biól. Magda Elena Barrera Medina se encargaron del mantenimiento de nuestras colonias de peces para investigación. A la laboratorista María del Rocío Camarillo Villegas.

Los miembros de la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, UNAM: la Dra. Laura Ongay Larios, la Biol. María Guadalupe Códiz Huerta y la M. En C. Minerva Mora Cabrera

Los miembros de la Unidad de Microscopia del Instituto de Fisiología Celular, UNAM: la Dra. Olga Araceli Patrón Soberano, el Med. Cir. Rodolfo Paredes Díaz y el Biól. Gabriel Orozco Hoyuela

Los miembros de la Unidad de Computo del Instituto de Fisiología Celular, UNAM: Gerardo Coello Coutiño, Ana María Escalante Gonzalbo, Juan Manuel Barbosa Castillo, Ivette Rosas Arciniega, Francisco Pérez Eugenio y Michael Cruz Rojas

El jurado del examen para optar por el grado de Maestría en Ciencias (Bioquímicas) estuvo constituido por:

Presidente	Dr. Jesús Aguirre Linares	Instituto de Fisiología Celular
Vocal	Dr. Jesús Chimal Monroy	Instituto de Investigaciones Biomédicas
Secretario	Dr. Angel Zarain Herzberg	Facultad de Medicina
Suplente	Dra. Diana Escalante Alcalde	Instituto de Fisiología Celular
Suplente	Dr. Jaime Iván Velasco Velázquez	Instituto de Fisiología Celular

AGRADECIMIENTOS

Hubiese sido imposible llevar a cabo este trabajo sin la participación de las personas que me han brindado su apoyo y sobre todo su confianza.

De manera muy especial y sincera agradezco a la Dra. Rosa Navarro por permitirme realizar gran parte del proyecto en su laboratorio y bajo su dirección, por su ayuda invaluable y por las charlas y consejos, para mi tan valiosos en esos difíciles momentos.

Agradezco el apoyo y la confianza que siempre me brindo mi familia, a mi mamá, a mis hermanos Emmanuel, David y Valeria. A mi tía Toña, mi tío Efraín y a mis primos Efraín y Gaby por brindarme su casa durante mis estudios de maestría.

De igual forma agradezco a mis compañeros y amigos del instituto: Laura Láscarez, Silvia Salinas, Daniel Paz, Giovanni Silva, Emmanuel Villanueva, Javier García, Isabel Guerrero, Margarita Vargas, Teresa Gutiérrez y José Luis Ramos por todo el apoyo, consejos y buenos momentos que siempre me brindaron.

A la Sra. Rocío Camarillo por su amistad y su valiosa ayuda en el laboratorio.

A mi amigo Carlos, que me ha apoyado siempre, de manera incondicional, tanto en los buenos como en los malos momentos, y que también ha contribuido de manera importante a mi desarrollo personal y académico.

Al Dr. Ernesto Maldonado por sus enseñanzas y por permitirme realizar mi trabajo de tesis bajo su tutoría.

A mi comité tutorial conformado por la Dra. Hilda Lomeli y el Dr. Iván Velasco por sus valiosas aportaciones a este trabajo.

ÍNDICE

Carátula.....	I
Reconocimientos.....	III
Agradecimientos.....	IV
Índice.....	V
Resumen.....	1
Abreviaturas.....	2
Introducción.....	3
El pez cebra como modelo de estudio.....	3
El desarrollo embrionario del pez cebra.....	4
La línea germinal y las células germinales en pez cebra.....	5
Los gránulos germinales.....	9
Los cuerpos de procesamiento.....	9
Gránulos de RNA neuronales.....	10
El papel de la helicasa de RNA Cgh-1.....	10
Planteamiento del Problema.....	14
Hipótesis.....	14
Objetivos.....	15
Objetivo general.....	15
Objetivos particulares.....	15
Materiales y Métodos.....	16
Mantenimiento de una colonia de peces cebra.....	16
Disección de peces adultos para la extracción de órganos.....	16
Extracción de RNA total.....	16
Análisis tipo “western blot”.....	19
Inmunotinciones en embriones completos.....	20
Construcción de proteínas de fusión.....	20
Microinyección de morfolidos.....	23
Fotografía y mejoramiento de imágenes.....	24
Resultados.....	25
La expresión del mRNA de cgh-1a y cgh-1b en el pez cebra.....	25
La expresión de las proteínas Cgh-1 en el pez cebra.....	29
Inmunolocalización de las proteínas Cgh-1 en embriones de pez cebra.....	32
Efectos de bloquear la traducción de Cgh-1a con morfolidos.....	34
Construcción de las proteínas de fusión Cgh-1a-GFP y Cgh-1b-GFP.....	37
Expresión de las proteínas de fusión Cgh-1a-GFP y Cgh-1b-GFP.....	39
Discusión.....	42
Bibliografía.....	46

Resumen

Cgh-1 es una proteína altamente conservada, en los eucariontes conocida en otros organismos como p54/Xp54/Me31B/Dhh1/RCK. Pertenece a la familia de las helicasas de RNA con cajas DEAD, las cuales tienen un papel importante en varios procesos del control traduccional del RNA mensajero incluyendo su estabilización, almacenamiento y degradación. En *Drosophila* (Me31B) y *Xenopus* (Xp54) se expresa principalmente en la línea germinal y células somáticas de embriones en estadios tempranos del desarrollo. En los ovocitos de *Xenopus* (Xp54) es abundante en los complejos citoplásmicos que contienen mRNAs maternos silenciados. En el nematodo *C. Elegans* Cgh-1 se expresa tanto en células somáticas, promoviendo la degradación de mRNAs maternos, así como en células germinales participando en la estabilización y la represión traduccional de mRNAs maternos. Nosotros encontramos que en el genoma del pez cebra (*Danio rerio*) existen dos copias del gen *cgh-1*, a los cuales hemos llamado *cgh-1a* y *cgh-1b*. Por análisis de RT-PCR hemos observado los patrones de expresión de ambos genes durante el desarrollo temprano así como en órganos de peces adultos. Ambos genes parecen expresarse mayoritariamente en el cerebro, los testículos y los ovarios. A través de análisis de tipo western blot, en diversos estadios del desarrollo embrionario así como en diferentes órganos de peces adultos, hemos encontrado que ambas proteínas están presentes durante la embriogénesis temprana así como en los ovarios y los testículos de peces adultos. La inmunodetección de la proteína Cgh-1 en embriones de pez cebra sugiere que una o ambas proteínas se expresan en células germinales. La inyección del mRNA de la proteína de fusión Cgh-1a::GFP reveló la expresión en gránulos, en una zona que coincide con la ruta de migración de las células germinales primordiales, mientras que el mRNA de la proteína de fusión Cgh-1b::GFP presenta una expresión a lo largo de todo el cuerpo del pez de 24 horas pos-fertilización, pero no en todas las células. Un análisis más detallado muestra que Cgh-1b se encuentra en gránulos perinucleares. Por otro lado, la inyección del morfolino contra el mRNA de *cgh-1a* resultó en un retraso durante el desarrollo temprano del pez cebra.

Abreviaturas

Cgh: Conserved Germline Helicase (helicasa conservada de la línea germinal)

Dnd: Gen dead end

CGPs: células germinales primordiales

Hpf: horas pos-fertilización

Dpf: días pos-fertilización

RT: Reverse transcriptase (transcriptasa reversa)

RT-PCR: Reverse transcription polymerase chain reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa acoplada con Transcripción Reversa)

PCR: Polimerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)

GFP: Green fluorescent protein (proteína verde fluorescente)

RNA: Ribo Nucleic Acid (ácido ribonucleico)

RNAi: Ribo Nucleic Acid interference (ácido ribonucleico interferente)

DNA: Deoxyribonucleic acid (ácido desoxirribonucleico)

mRNA: Messenger RNA (RNA mensajero)

cDNA: complementary DNA (DNA complementario)

min: minutos

c.b.p.: cuanto baste para

kDa: kilo Daltones

INTRODUCCION

El pez cebra como modelo de estudio.

El pez cebra (*Danio rerio*) se ha consolidado en los últimos 30 años como un importante organismo modelo para estudiar la Biología del desarrollo de los vertebrados. Gracias a que su genoma está conservado con respecto al genoma humano y a la similitud de los procesos moleculares entre el pez cebra y otros organismos modelos como *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Xenopus laevis*, *Gallus gallus* (pollo) y *Mus musculus* (ratón), los estudios en este pez se pueden generalizar y enmarcar en problemas biológicos fundamentales, además de ser aplicables al humano (Veldman y Lin 2008; Pickart *et al.* 2004; Dahm y Geisler 2006; Chen y Ekker 2004; O'Connor *et al.* 2009).

Las células germinales dan lugar a la formación de las gametas sexuales (espermatozoides y ovocitos). El estudio de las células germinales primordiales (CGPs), como muchas otras áreas de la investigación en el pez cebra, es posible gracias a su fácil mantenimiento y reproducción en condiciones de laboratorio. La fertilización y la embriogénesis del pez cebra es externa y existe gran disponibilidad de material biológico debido a la cantidad de embriones que una sola pareja puede producir cada semana (100 a 200 embriones). Su genoma se está secuenciado en el "Sanger Center", en Inglaterra, y además existen mapas muy precisos de marcadores genéticos a lo largo de los 50 cromosomas de su genoma diploide. La transparencia del embrión y el corion (una membrana protectora que rodea al embrión) permite observar el desarrollo desde los primeros momentos de la fertilización hasta que el pez nada libremente. Esta transparencia también facilita diversos análisis como la localización de proteínas "*in vivo*" por medio de fusiones con la proteína verde fluorescente (GFP), en embriones fijados la localización de proteínas mediante inmunotinciones, y el análisis de los patrones de expresión de RNAs mensajeros por hibridaciones "*in situ*" mediante el uso de sondas antisentido. Es posible también realizar el marcaje de células individuales con la finalidad de determinar su destino tisular (Beis y

Stainier 2006). Además se han desarrollado diversas herramientas genéticas tales como mutagénesis en gran escala (Patton y Zon 2001), mapeo de genes, transgénesis, sobre-expresión de proteínas y el apagado específico de genes empleando morfolidos (RNAs antisentido) (Nasevicius 2000; Ekker 2000). Este amplio repertorio de metodologías son de gran ventaja para estudiar, a nivel molecular, fenómenos biológicos como la formación de las CGPs en el pez cebra (Blaser *et al.* 2005; Schlueter *et al.* 2007).

El desarrollo embrionario del pez cebra.

El desarrollo de un organismo comienza con la fusión de los genomas paterno y materno. En muchos organismos la activación del ovocito depende de la fusión del espermatozoide con la membrana del ovocito. Sin embargo en peces teleosteos como el pez cebra, la activación del ovocito normalmente ocurre solo por el contacto con el agua y no depende de la presencia del espermatozoide. La activación del ovocito dispara la reacción cortical la cual involucra cambios en el calcio intracelular seguido de la exocitosis de gránulos corticales resultando en cambios estructurales en la membrana del ovocito que entre otras cosas previene la poli-espermia (Sardet *et al.* 2002; Horner y Wolfner 2008). La activación del ovocito completa la meiosis (arrestada en la segunda metafase) y el núcleo del espermatozoide entra al citoplasma del ovocito solo por una región del polo animal conocida como el "micropilo". Una vez dentro los dos pronúcleos, estos se fusionan en un proceso que depende de microtúbulos y proteínas motoras, (Sharma y Kinsey 2008; Reinsch y Gonczy 1998; Kimura y Onami 2005) de este modo ambos gametos contribuyen de igual manera al contenido cromosómico. El ovocito tiene almacenado mRNAs que se conocen como "mRNAs maternos" los cuales son esenciales para el desarrollo temprano del embrión debido a que durante las primeras divisiones celulares no hay transcripción cigótica. En el caso del pez cebra, esta acumulación de RNAs mensajeros maternos le permite llevar a cabo 10 ciclos de división celular antes de que se inicie la transcripción cigótica, lo cual ocurre cuando ya se han formado 1024 células durante un estadio llamado transición de la blástula media (Kane 1999).

Una vez fertilizado el embrión, éste presenta una polaridad determinada, de modo que se distingue el polo germinativo o polo animal y el polo vegetativo, mientras que en el primero ocurren todas las divisiones celulares en el segundo se encuentran almacenados los RNAs maternos y los componentes que nutren al embrión mientras se desarrolla (Houston y King, 2000). La primera división celular ocurre 40 minutos después de la fertilización (Fig. 1 A-C) y mientras se lleva a cabo, los mRNAs maternos migran del polo vegetal al polo animal. Los primeros ciclos celulares duran 15 minutos cada uno, pero para el estadio de la transición mid-blastula, 3 hpf (horas post-fertilización) las divisiones celulares se vuelven más lentas y asincrónicas, por ejemplo; el ciclo celular 12 dura 33.5 minutos mientras que el 16 dura 4 horas. Posteriormente ocurre la epibolia en donde las células se mueven desde el polo animal hacia el polo vegetal y recubren el vitelo (Fig. 1 N-U), es al final de esta etapa que pueden distinguirse los ejes embrionarios antero-posterior y dorsal-ventral. La gastrulación comienza desde el estadio conocido como escudo (Fig. 1Q) y en esta etapa las células del embrión se dividen en dos capas, una superficial conocida como epiblasto (que da origen al ectodermo) y una interna que se le llama hipoblasto (que origina al mesodermo y al endodermo), posteriormente se desarrolla la placa neural y comienzan a formarse las somitas (Fig. 1 W-D'). En las siguientes etapas del desarrollo se forman algunos órganos como el cerebro, el corazón, los ojos, el pronefros y la notocorda (Fig. 1 D'). En la etapa de faríngea se termina de formar la notocorda y aparecen los primordios de los arcos branquiales. Posteriormente se forma el sistema circulatorio y el corazón comienza a latir (Fig. 1, E'). Finalmente entre las 48 y 72 horas ocurre la eclosión (la larva rompe el corión), se inicia la formación de órganos como el intestino y el hígado, y en esta etapa aparece la boca y comienzan a formarse las aletas (Kimmel *et al.* 1995).

La línea germinal y las células germinales en pez cebra.

Una de las decisiones más tempranas que ocurren en el embrión animal es la diferenciación de las células precursoras de la línea germinal. Las células germinales primordiales o CGPs son células que migran y dan

lugar a las células germinales o gametos que pueden ser espermatozoides u ovocitos. Estas células son responsables de que la información genética se transmita a las siguientes generaciones. En el caso del pez, cebra las CGPs se separan de las células somáticas durante el desarrollo temprano y migran de su lugar de origen, al lugar donde han de formarse las gónadas. En muchos animales, la formación de las CGPs involucra la formación de gránulos en el citoplasma conocidos como “plasma germinal”, a estos agregados se les conoce en *Drosophila melanogaster* como gránulos polares, en *C. elegans* como gránulos P y en *Xenopus laevis* y pez cebra como gránulos germinales (Carre *et al.* 2002; Wong *et al.* 2005; Standart y Minshall, 2008; Anderson y Kedersha 2006). El plasma germinal solo se presenta en células germinales y no en células somáticas y está compuesto de gránulos que contienen mRNAs, proteínas de unión a RNA y helicasas de RNA. Estos gránulos se han observado asociados con mitocondrias y poros nucleares (Knaut *et al.* 2002; Kloc *et al.* 2002; Strasser 2008). Se ha demostrado que la eliminación del plasma germinal conduce a la pérdida de las células germinales (Hashimoto *et al.* 2004).

En el pez cebra y en otros organismos como *Drosophila*, *C. elegans* y *Xenopus*, las CGPs se especifican en las primeras etapas de desarrollo mediante un mecanismo conocido como "preformación" o “predeterminación” que consiste en que la identidad de las células germinales está dada por la presencia de los gránulos germinales (Sedoux y Braun 2006; Extavour y Akam 2003). En el pez cebra los componentes del plasma germinal están almacenados en el ovocito maduro en dos zonas separadas (Theusch *et al.* 2006) las cuales se establecen durante la ovogénesis y las primeras divisiones celulares. Algunos mRNAs componentes del plasma germinal, tales como el de *dead end* (Weidenger *et al.* 2003), *nanos* (Köprunner *et al.* 2001) y *vasa* (Yoon *et al.* 1997) están presentes en el polo animal del ovocito mientras que otros mRNAs como *daz-like* y *bruno-like*, están almacenados inicialmente en el polo vegetal del ovocito (Maegawa *et al.* 1999). El proceso de fertilización induce un re-arreglo de los componentes del plasma germinal localizados transitoriamente en una estructura rica en mitocondrias llamada

“Cuerpo de Balbiani” o “nube mitocondrial” originalmente descrita en ovocitos de *Xenopus* (Minakhina y Stewards. 2005). El plasma germinal se transloca hacia el polo animal, localizándose posteriormente en forma de gránulos germinales adosados a los ejes de la primera y segunda división embrionaria (Fig. 1), este arreglo depende de la función de la actina y los microtúbulos. Dicha localización persiste hasta que el embrión tiene 16 células. En la etapa de 32 células, el plasma germinal se encuentra en cuatro células dando origen, por lo tanto, a cuatro CGPs (Pelegri *et al.* 1999; Theusch *et al.* 2006) Estas CGPs tienen división asimétrica lo que quiere decir que cada vez que se dividen solo heredan el plasma germinal a una de las células hijas. Se ha observado que poco después de la división celular, los componentes del plasma germinal se encuentran en ambas células hijas, sin embargo estos componente se degradan en la célula que será somática y permanecen en las células germinales (Kosaka *et al.* 2007). Por esta razón el número de 4 CGPs se mantiene constante hasta el estadio de 1000 células y a partir de ese momento las CGPs se multiplican simétricamente hasta formar 20 CGPs en el estadio de “domo” a las 4.5 hpf con aproximadamente 4000 células somáticas, (Fig. 1-M). En el estadio de 6 hpf hay 25 células germinales y en este momento se observa que las CGPs se agrupan en 4 posiciones específicas con respecto a los ejes corporales del embrión (Fig. 1M) (Yoon *et al.* 1997). Los 4 grupos de CGPs comienzan la migración hacia el sitio donde han de formarse las gónadas. Esta migración se sabe que es guiada por la quimiocina SDF-1 y la activación del su receptor CXCR4 (Raz y Reichman-Fried 2006; Blaser *et al.* 2006; Knaut *et al.* 2003). Cabe mencionar que muchos de los componentes del plasma germinal son proteínas de unión al RNA (como las helicasas de RNA), lo que sugiere que el control post-transcripcional es importante en el desarrollo de la línea germinal.

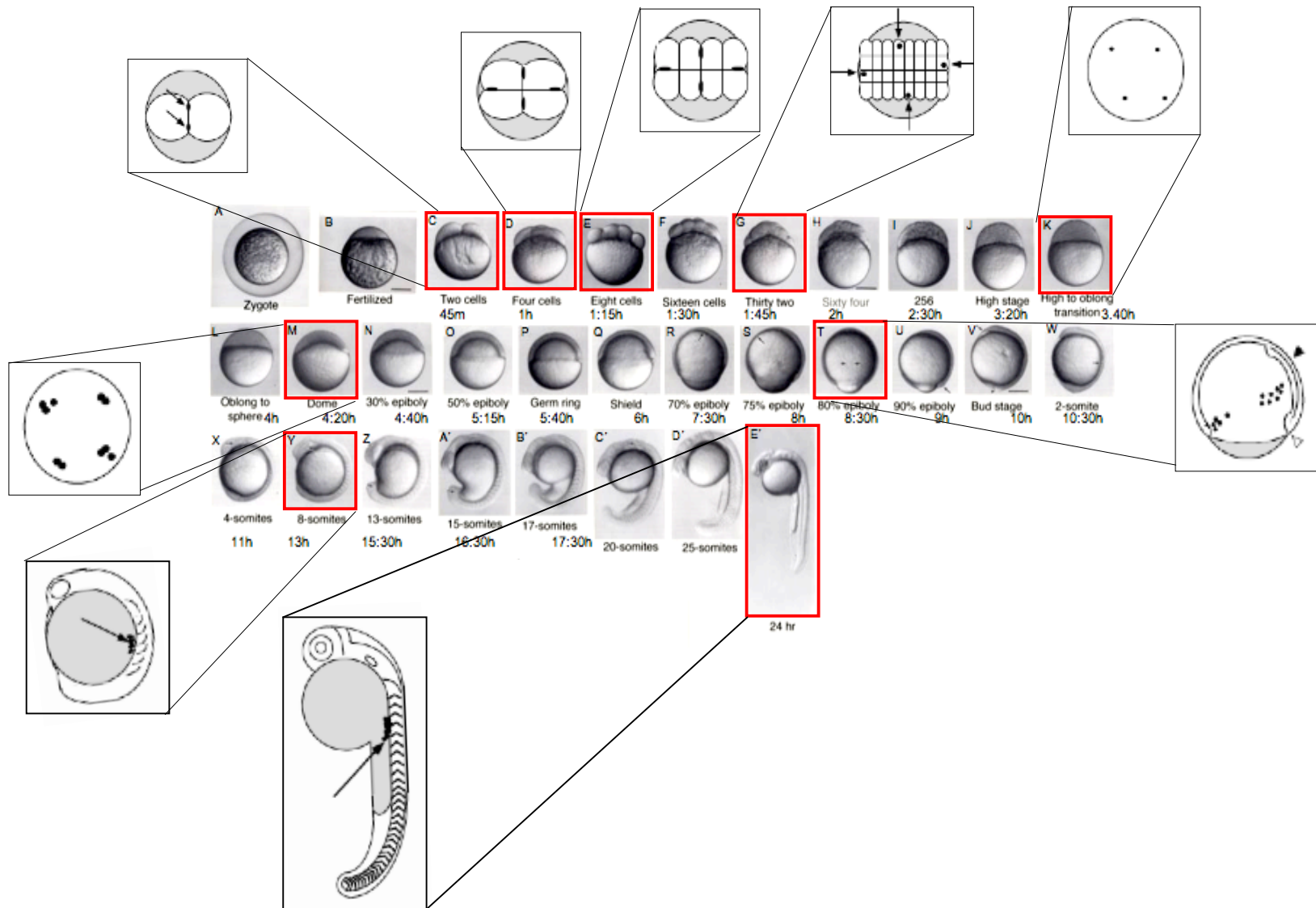


Figura 1. Etapas del desarrollo embrionario del pez cebra. Se esquematiza la localización del plasma germinal y la migración de las células germinales primordiales durante el desarrollo temprano.

Los gránulos germinales.

En los gránulos germinales se almacenan y procesan mRNAs y proteínas que son esenciales para la función de la línea germinal y la embriogénesis temprana (Wylie 1999; Strasser *et al.* 2008). En *Drosophila* se han encontrado varios componentes del citoplasma germinal como *vasa*, *nanos*, *tudor*, *oskar*, etc. Algunas de ellas son proteínas de unión al RNA involucradas en la migración y sobrevivencia de las células germinales (Wylie 1999; Santos y Lehmann 2004; Amikura 2001). En el pez cebra también se han identificado varios componentes de los gránulos germinales, como por ejemplo: *vasa (vas)*, *nanos-1 (nos)*, *dead end (dnd)*, *askopos (kop)*, *daz-like (dazl)* y *bruno-like (brul)* (Blaser *et al.* 2005, Köprunner *et al.* 2001, Weidinger *et al.* 2003, Yoon *et al.* 1997, Hashimoto *et al.* 2004). Sin embargo, poco se conoce sobre el mecanismo de ensamblaje de estos componentes (Kosaka *et al.* 2007). En el nemátodo *Caenorhabditis elegans* el bloquear la expresión de uno de los componentes de plasma germinal llamado *pgl-1*, empleando RNA de interferencia (RNAi), provoca que la células germinales se vuelvan células somáticas (Seydoux *et al.* 1996) mientras que en el pez cebra eliminar al gen *dnd*, también componente de gránulos germinales, induce que los peces sean infértiles (Weidinger *et al.* 2003). Lo anterior sugiere que los componentes de gránulos germinales son esenciales para la identidad y sobrevivencia de la línea germinal.

Los cuerpos de procesamiento.

Existen gránulos que también almacenan mRNAs pero que solo se presentan en células somáticas y que su origen se ha sugerido está relacionado en alguna forma con el de los gránulos germinales. A estos gránulos se les conoce como cuerpos de procesamiento (*P-bodies* en inglés) (Navarro *et al.* 2005; Teixeira *et al.* 2005), los cuales se ha observado, comparten algunos componentes con los gránulos germinales, entre los cuales se encuentra la proteína Cgh-1 (Navarro *et al.* 2001). En los cuerpos de procesamiento también se encuentran las proteínas que eliminan el CAP de los RNAs mensajeros llamadas decapping 1 (*dcp1*) y decapping 2 (*dcp2*), las cuales contienen actividad de exorribonuclasa 5' - 3' (Lin *et al.* 2008).

Gránulos de RNA neuronales.

Hace algunos años se describió la presencia de “cuerpos de procesamiento” en las dendritas neuronales, en regiones cercanas a las sinapsis, (Zeitelhofer *et al.* 2008). Estos se caracterizan por la presencia de dos proteínas conservadas, la proteína de unión a RNA Staufen y la proteína FMRP (*Fragile X Mental Retardation Protein*). Al estudiar cultivos de neuronas de hipocampo de ratón se sugirió que la función de estos gránulos es almacenar y transportar mRNAs, dirigiéndolos a las espinas dendríticas y una vez en contacto con las sinapsis, estos gránulos se desensamblan induciendo la traducción de los mRNAs almacenados (Zeitelhofer *et al.* 2008). En este estudio también se reportó que el homólogo de Cgh-1 en mamíferos RCK/p54 se encuentra presente en gránulos de RNA neuronales, junto con otros componentes que se encuentran también en los cuerpos de procesamiento (Zeitelhofer *et al.* 2008).

El papel de la RNA helicasa Cgh-1.

Las RNA helicasas son proteínas que se requieren para una gran variedad de procesos relacionados con el metabolismo y procesamiento de los RNAs mensajeros tales como: el control traduccional, la biogénesis de los ribosomas, la exportación del mRNA al citoplasma, el inicio de la traducción, la degradación del RNA y la excisión (*splicing*) del pre-mRNA. Las RNA helicasas tipo DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) han sido agrupadas en la superfamilia II de RNA helicasas y entre ellas se encuentran el factor traduccional eIF4A, p68, SRBM, PL10, etc. Alineamientos múltiples de varias RNA helicasas tipo DEAD han revelado nueve diferentes dominios altamente conservados (Fig. 2), entre ellos un dominio de unión a ATP formado por el motivo Walker A y el motivo Walker B. Los dominios conservados se encuentran en el centro de la proteína, flanqueados por los extremos amino y carboxilo los cuales presentan algunas variaciones entre los varios homólogos de la familia (Fig. 2). Entre las helicasas de RNA tipo DEAD que se encuentran asociadas a la línea germinal esta Vasa, PL10 y Cgh-1 (Conserved Germline RNA Helicase) (de la Cruz *et al.* 1999; Linder 2006; Silverman *et al.* 2003).

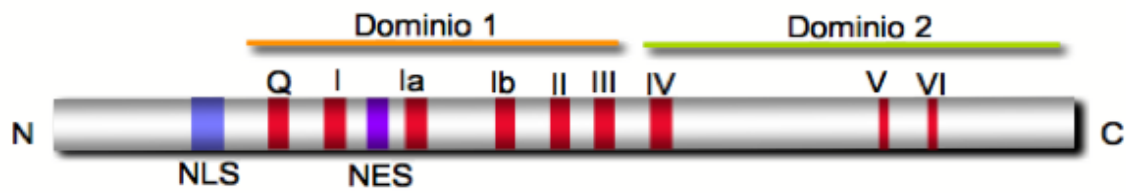


Figura 2. Las helicasas de RNA. Cgh-1 es una proteína que contiene dos dominios y nueve motivos conservados. En vertebrados se ha observado que presentan una secuencia de localización nuclear (NLS) y una secuencia de exportación al núcleo (NES).

Cgh-1 es una proteína altamente conservada presente en la línea germinal de distintos organismos. A sus homólogos en otras especies se le conoce como RCK o DDX6 en humanos (Akao *et al.* 1992), *p54* en ratón, *xp54* en *Xenopus*, como *me31B* en *Drosophila* y como *dhh1* en *S. cerevisiae* (Matsumoto *et al.* 2005; Navarro y Blackwell, 2005; Navarro *et al.* 2001). En nuestro grupo se identificaron dos homólogos de *cgh-1* en el genoma del pez cebra los cuales nombramos como Cgh-1a y Cgh-1b (fig 3).

Method: Neighbor Joining; Bootstrap (1000 reps); tie breaking = Systematic
Distance: Absolute (# differences)
Gaps distributed proportionally

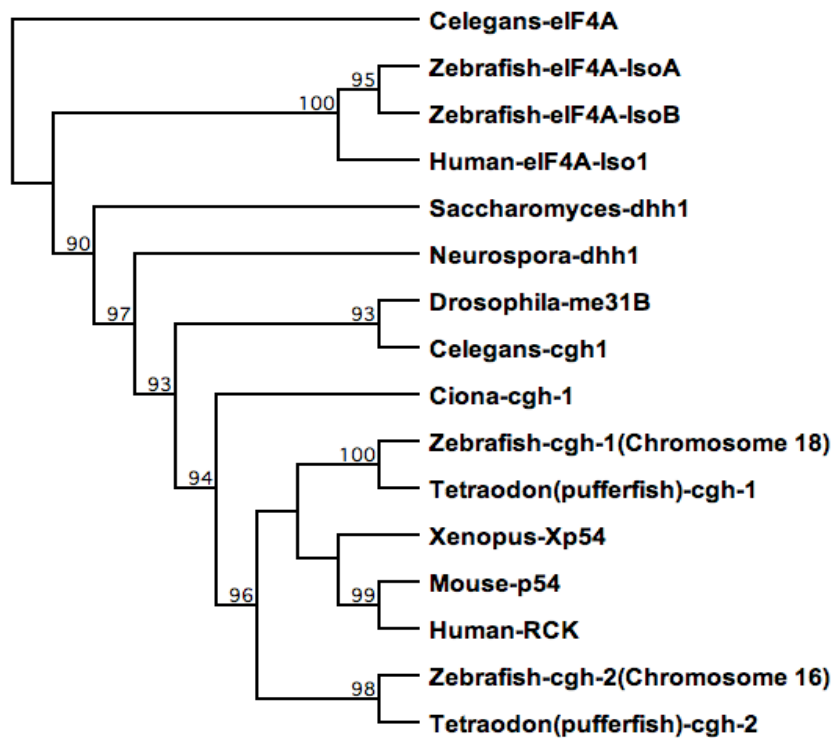


Figura 3. Árbol filogenético de los homólogos de *cgh-1* de pez cebra, Los números en los nodos representan el porcentaje de confianza.

Se ha descrito que el homólogo de Cgh-1 en *Xenopus* (*xp54*) puede rescatar la falta del gen de levadura (*dhh1*) (Tseng-Rogenski *et al.* 2003). En *S. cerevisiae* *dhh1* es esencial para re-iniciar el ciclo celular cuando éste se detiene en condiciones de estrés y, debido a su capacidad de unir RNA, se ha sugerido que influye en la estabilidad y la traducción de mRNAs (Bergkessel y Reese, 2004). En *C. elegans* se encontró que al eliminar la expresión del gen *cgh-1* por RNA de interferencia las células germinales mueren por apoptosis. También se observó y que Cgh-1 se encuentra localizado en los gránulos germinales de ovocitos (Navarro *et al.* 2001). En el ratón, Cgh-1 (p54) también se ha encontrado altamente expresado en células germinales como son ovocitos maduros y espermatoцитos primarios. Sin embargo, una vez fertilizado el ovocito su expresión disminuye gradualmente a lo largo del desarrollo (Matsumoto *et al.* 2005). El homólogo de Cgh-1 de

Xenopus (Xp54) se ha encontrado asociado a mRNAs, a las proteínas Argonauta y se le ha asociado a una actividad represora de la traducción (Minshall y Standard, 2004; Minshall *et al.* 2009).

Diversos trabajos indican que Cgh-1 podría tener un papel represor de la traducción en las células germinales, esto explicaría su asociación con estos gránulos que contienen diversos mRNAs (Minshall y Standart, 2004). El modelo para explicar como Cgh-1 inhibe la traducción en la línea germinal, consiste en que Cgh-1, junto con la proteína CPEB, se une al extremo 3' no poliadenilado de los mRNA mensajeros maternos (Standart y Minshall 2008). Este subcomplejo secuestra al factor de inicio de la traducción eIF4E, evitando que se una o lleve a cabo su función. Se piensa que la proteína eIF4E se requiere para unirse al 5'cap y evitar la unión de otros factores traduccionales (Minshall y Standart 2004 Standart y Minshall 2008). Este modelo funciona mejor si se considera una circularización del mRNA en donde los extremos 5' y 3' del RNA mensajero están unidos al mismo tiempo a este subcomplejo regulatorio.

Planteamiento del problema

Un aspecto clave en el desarrollo temprano de los organismos y el control de la diferenciación celular, es entender como los mRNA maternos se mantienen almacenados, de una manera estable y traduccionalmente reprimidos, durante la ovogénesis y la embriogénesis temprana.

Se han estudiado diferentes gránulos que contienen proteínas con una función represora de la traducción, como son los gránulos germinales en células germinales y los cuerpos de procesamiento en células somáticas, A la proteína Cgh-1, se le a encontrado en las células germinales participando en la estabilización y la represión traduccional de mRNAs maternos así como en células somáticas, promoviendo la degradación de mRNAs maternos. No existen estudios del homologo de Cgh-1 en el pez cebra, y tomando en cuenta que en este organismo existen dos copias del gen *cgh-1*, se vuelve interesante estudiar los patrones de expresión de cada uno de estos genes y sus proteínas correspondientes a lo largo del desarrollo y en organismos adultos.

Hipótesis.

Al ser Cgh-1a y Cgh-1b proteínas de unión al RNA altamente conservadas, proponemos que, en el pez cebra, estas formarán parte de los gránulos germinales y de los cuerpos de procesamiento de una manera diferencial.

Objetivo general.

Caracterizar los patrones de expresión tanto de los mRNAs como de las proteínas de los genes *cgh-1a* y *cgh-1b* del pez cebra. Determinar si las proteínas correspondientes son componentes de los gránulos germinales, los cuerpos de procesamiento o ambos, y describir los fenotipos resultantes del bloqueo de su expresión.

Objetivos particulares.

- 1) Utilizando RT-PCR y “western blot” determinar; en qué estadios del desarrollo, y en que tejidos de peces adultos, se detectan los mRNAs y las proteínas correspondientes a los genes *cgh-1a* y *cgh-1b*.
- 2) Mediante inmunotinciones, observar la distribución de las proteínas Cgh-1a y Cgh-1b en la línea germinal y en las células somática.
- 3) Empleando RNAs antisentido (morfolinos), bloquear la traducción de los mRNAs de *cgh-1a* y *cgh-1b* con la finalidad de observar efectos fenotípicos durante el desarrollo.
- 4) En ensayos *in vivo*, mediante proteínas de fusión, observar la localización sub-celular de CGH-1a y CGH-1b en estadios tempranos del desarrollo.

MATERIALES Y METODOS

Mantenimiento de una colonia de peces cebra.

Los peces se mantuvieron en tanques con un sistema semiautomatizado de recirculación continua que cuenta con temperatura controlada manteniendo el pH de entre 6.8 y 7.2 y la temperatura de 28° C. El vivario se mantuvo a una temperatura de 24° C con un fotoperiodo de 14 horas de luz y 10 de oscuridad. Las larvas de peces se alimentaron con paramecio tres veces al día y los adultos, 2 veces al día, con larvas de *Artemia* (*Artemia franciscana*) así como con hojuelas maceradas de alimento comercial para peces (TetraminPRO). Los embriones se obtuvieron por cruza naturales colocando un macho y una hembra en una caja de cruza por la tarde y colectando al día siguiente los huevos fecundados, se colocaron un máximo de 60 embriones en una caja petri y se mantuvieron en una incubadora a 28.5° C durante los primeros 5 días de desarrollo. Los diferentes estadios de desarrollo fueron identificados basándonos en Kimmel y colaboradores, 1995 (Kimmel *et al.* 1995). En algunos casos fue necesario retrasar el desarrollo por lo que algunos embriones se mantuvieron a 18° C.

Disección de peces adultos para la extracción de órganos.

Para disectar los peces, éstos fueron sacrificados primero colocándolos en anestésico frío (0.05 % de Tricaina a 4° C) por 30 min. Estos peces se disectaron en un microscopio estereoscópico sosteniendo a los peces con alfileres fijados a una placa de SYLGARD-184 un elastómero de silicona (DuPont) bañando los órganos con solución Ringer fría. Una vez colectados los diferentes órganos se mantuvieron en hielo en solución Ringer para extracción de proteína ó en Trizol (Invitrogen) para extracción de RNA.

Extracción de RNA total.

Para extraer el RNA total de embriones de diferentes estadios, así como de diferentes órganos de peces adultos, se utilizó el reactivo Trizol (Invitrogen) que se basa en el método de extracción por tiocianato de guanidina y fenol-cloroformo. Se colocaron aproximadamente 50 embriones ó

los órganos disectados de peces adultos en 0.8 ml de trizol, se homogenizaron las muestras utilizando un pistilo de plástico desechable y libre de RNAasas (VWR). Se agregaron 0.2 ml de cloroformo, se agitó y se formaron las fases por centrifugación, posteriormente se transfirió la fase acuosa a un tubo al cual se le agregaron 0.5 ml de alcohol isopropílico para precipitar el RNA. El precipitado se lavó 2 veces empleando 1 ml de etanol al 75%. Para eliminar el DNA genómico, se resuspendió la pastilla en un medio conteniendo TurboDNAsa (Ambion), en algunos casos fue necesario repetir este paso 2 o 3 veces consecutivas para eliminar el DNA genómico. La concentración y pureza del RNA total se obtuvo después de calentar la muestra a 65° C por 10 minutos y transfiriendo a hielo por 2 min midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm de una muestra diluida 200 veces y aplicando la siguiente formula a los valores de densidad óptica obtenida: $\text{Concentración} = \text{Abs}_{260} \times 40 \times \text{dilución} / 1000$. La pureza se obtuvo de dividir los valores de densidad óptica 260/280.

RT-PCR (Retrotranscripción y Reacción en Cadena de la Polimerasa)

A partir del RNA obtenido se sintetizo cDNA seguido de una amplificación por PCR con oligonucleótidos específicos.

Para sintetizar cDNA se mezcló en un tubo:

RNA	2 µg
Oligo dT 10 mM	1 µl
Mezcla de dNTPs	1 µl
Agua DEPC	c.b.p. 10 µl

Se incubó a 65° C por 5 minutos. Después se agregó la siguiente mezcla para la síntesis de cDNA:

Buffer RT 10X	2 µl
MgCl ₂ 25 mM	4 µl
DTT 0.1 mM	2 µl
RNase OUT (40 U/µl)	1 µl
Transcriptasa reversa SuperScript III (200 U/µl)	1 µl

La reacción se llevó a cabo incubando a 50° C por 5 min y se terminó aumentando la temperatura a 85° C por 5 minutos. Se añadieron al tubo 1.33 µl de RNasa H y se incubó a 37° C por 20 minutos. Como control se realizaron reacciones paralelas pero sin agregar la enzima transcriptasa reversa (controles -RT). Este cDNA se empleó como templado para realizar reacciones de PCR utilizando oligonucleótidos específicos, que amplifican un fragmento de 524 bp y 444 bp de los genes *cgh-1a* y *cgh-1b* respectivamente como control de carga se amplificó un fragmento del gen de Actina (Tabla 1). El PCR semicuantitativo se llevó a cabo empleando cDNA como templado, pero diluido 1:5, 1:50, 1:100, 1:500 y 1:1000 utilizando los mismos oligonucleótidos de *cgh-1a*, *cgh-1b* y Actina. Los oligonucleótidos fueron preparados por la compañía SIGMA-GENOSYS o por la unidad de biología molecular del Instituto de Fisiología Celular.

Tabla 1.- Oligonucleótidos diseñados para medir expresión de *cgh-1a* y *cgh-1b*

Nombre	Blanco	Posición	Secuencia	Objetivo
cv2	<i>cgh-1a</i>	42	GCTGTGGGAAGGACGACTTGC	Clonar y secuenciar
cv6	<i>cgh-1a</i>	1405	AAGAGGGAGGTGGGAGTAGAGGAA	Expresión RT-PCR
cv15	<i>cgh-1a</i>	881	TCCTGTTTCTACATTCATGCCAAG	Expresión RT-PCR
jc1	<i>cgh-1b</i>	944	TCCAGGCTCCAAATCAATCAGTCAA	Expresión RT-PCR
jc2	<i>cgh-1b</i>	1388	GCCACATACAGGCTCTTGTC AATGC	Expresión RT-PCR

Análisis tipo “western blot”.

Para la extracción de proteínas fue necesario remover el vitelo de los embriones y larvas, el vitelo se eliminó manualmente de larvas anestesiadas (0.04% de tricaina) en solución REP (Ringer con EDTA 1 mM y PMSF 0.3 mM). Estas muestras y los órganos disectados de adultos (cerebro, corazón, ojos, testículos y ovarios) se homogenizaron en una solución preparada disolviendo una pastilla de inhibidores de proteasas (Complete-Mini Protease Roche) en 5 ml de PBS (Buffer de fosfatos). Se maceraron vigorosamente las muestras con un pistilo estéril de cerámica y después se centrifugaron a 12,000 x g por 15 minutos a 4° C y se recuperó el sobrenadante descartando el precipitado. Se cuantificó la proteína por el método de Bradford. Las muestras se disolvieron en buffer de cargado (Tris-HCl 122 mM, SDS 5%, Glicerol 20% y azul de bromofenol 0.01%) para cargarse en un gel concentrador de poliacrilamida al 3% y un gel separador de 10%. El buffer de electroforesis empleado fue Glicina 200 mM, Tris-HCl 25 mM y SDS 0.1% y se corrió a 0.02 amperes durante 40 minutos a temperatura ambiente.

La transferencia se realizó a una membrana de nitrocelulosa previamente bañada en etanol y empleando como buffer de transferencia Tris-HCl 25 mM y metanol al 20%, pH 8.3. Para transferir se aplicaron 0.5 amperes en el cuarto frío por 2 horas. La membrana se bloqueó en TBS/Tween (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, Tween 0.1% a pH 7.4) con 5% de leche en polvo por una hora. Para la inmunodetección se agregó el anticuerpo primario y se incubó a 4° C toda la noche en agitación constante. Al día siguiente la membrana se lavó por 5 min en TBS/Tween a 4° C, repitiendo este lavado cinco veces. Se agregó el anticuerpo secundario (conjugado a peroxidasa de rábano) a una dilución de 1:1000 el cual se incubó 1 hora a 4° C. Posteriormente se retiró la solución con anticuerpo y se lavó la membrana tres veces (5 min cada vez) con TBS/Tween realizando un último lavado de 10 min en TBS. Para revelar se empleó un sistema de bioluminescencia (SuperSignal West Dura, Pierce) incubando la membrana en la solución de luminol y peróxido durante 5 minutos a temperatura ambiente, se enjuagó en TBS y se envolvió en plástico para exponer una

película fotográfica (Kodak) en el interior de un cassette. Después de la exposición se reveló y fijó la película fotográfica.

El anticuerpo primario utilizado (anti-Cgh-1) fue hecho, bajo pedido, por la compañía SIGMA. Se preparó inmunizando dos conejos con un péptido conjugado de secuencia CYDDRFNLKGIEEQL que está basado en un fragmento de la región carboxilo terminal de la proteína Cgh-1a. Cabe mencionar que al momento de mandar a hacer este anticuerpo no se había identificado a la proteína Cgh-1b. Esta secuencia también se encuentra en Cgh-1b por lo que existe la posibilidad de que este anticuerpo policlonal reconozca a ambos ortólogos.

Inmunotinciones en embriones completos.

Los embriones de pez cebra se colectaron en los estadios escogidos, se decorionaron y se fijaron en paraformaldehído al 4% en PBS por 1 hora a temperatura ambiente para posteriormente lavarse por 5 min con PBTX (PBS con Tritón X-100 0.2%) un total de 3 veces. Los embriones fueron incubados en la solución de bloqueo conteniendo 10% de suero de cabra en PBT (PBS con Tween 0.1%). El anticuerpo primario se colocó en 1% de suero de cabra en PBT a las diluciones indicadas en la sección de resultados. Para eliminar el excedente de anticuerpo los embriones se lavaron con PBTX 8 veces durante 30 minutos cada vez. El anticuerpo secundario (acoplado a Alexa fluor-488 ó a Alexa-fluor 594) se incubó toda la noche a una dilución de 1:200 y se lavó dos veces con PBTX por 1 hora cada vez. Los embriones fueron observados bajo un microscopio de fluorescencia (NIKON). El anticuerpo contra la proteína Dead end de pez cebra fue obtenido de la compañía Orbigen (cat PAB-11629).

Construcción de las proteínas de fusión.

Se empleó el sistema "Gateway" (Invitrogen) el cual consiste en clonar empleando el principio de la recombinación bacteriana. Se generan oligonucleótidos específicos del gen de interés (Tabla 2) pero que contienen las secuencias de recombinación (attB) que facilitan que el producto de PCR se inserte en el vector, también con sitios attB, por recombinación, es un

método que no emplea enzimas de restricción ni ligasas. Se diseñaron oligonucleótidos específicos para los genes *cgh-1a* y *cgh-1b* de pez cebra que amplifican el marco de lectura abierto y además insertaron los sitios attb1 del lado 5' y attb2 del lado 3'. Las reacciones de PCR se realizaron empleando una enzima correctora de errores (*proofreading*). Los productos de PCR se mezclaron, en una reacción de recombinación, con el vector de entrada pDONR221 en presencia de la mezcla de enzimas "BPclonase".

Producto de PCR con los sitios attB	1 a 10 μ l
pDONR221 (150 ng/ μ l)	2 μ l
Buffer de reacción BPclonase 5X	4 μ l
Buffer TE pH 8.0	c.b.p. 16 μ l
Mezcla BPclonase	4 μ l

La reacción se llevó a cabo a 25° C durante toda la noche deteniendo la reacción con 2 μ l de Proteinasa K incubando por 10 min a 37° C. La mezcla fue utilizada para transformar células competentes DH5 α utilizando kanamicina como marcador de selección. Se seleccionaron algunas clonas de ambas construcciones (*cgh-1a* y *cgh-1b*) que fueron probadas por restricción diagnóstica combinando a las enzimas de restricción *EcoRV* y *ApaI*. De dicho análisis se escogieron dos clonas, una de cada construcción, y se mandaron secuenciar a la Unidad de Biología Molecular del Instituto. Una vez confirmada la identidad de los genes clonados se purificó plásmido de cada clona y se procedió al siguiente paso.

La reacción anterior genera sitios de recombinación attL en los nuevos plásmidos (conocidos como plásmidos de entrada). Estos sitios recombinan con los sitios attR que están presentes en el vector destino, que en nuestro caso contiene a la proteína verde fluorescente (GFP) (plásmido pcDNA 6.2/C-Em GFP-DEST). Para fusionar a la GFP, en el extremo carboxilo de los genes de interés (*cgh-1a* y *cgh-1b*), se llevó a cabo la siguiente reacción:

Plásmido de entrada	1-10 μ l
pcDNA 6.2/C-Em GFP-DEST (300 ng/ μ l)	2 μ l
Buffer de reacción LRclonase 5X	4 μ l
Buffer TE pH	c.b.p. 16 μ l
Mezcla LRclonase	4 μ l

La mezcla se incubó a 25° C durante toda la noche. Para detener la reacción se adicionaron 2 μ l de Proteínasa K y se continuó la incubación por 10 min adicionales a 37° C. Se tomó una parte de la mezcla para transformar células competentes DH5 α empleando carbencilina (un análogo de la ampicilina) como marcador de selección. Se seleccionaron varias clonas que fueron probadas por digestión diagnóstica y dos de ellas (una de cada gen) fueron secuenciadas para confirmar que los genes de interés quedaron fusionados a la GFP.

Tabla 2.- Oligonucleótidos diseñados para clonar a *cgh-1a* y *cgh-1b* mediante el sistema Gateway y obtener las fusiones con GFP.

Nombre	Blanco	Secuencia	Objetivo
attB1FCGH1A	<i>cgh-1a</i>	GGGGACAAGTTTGTACAAAAA GCAGGCTTCGAAGGAGATAGA ACCATGAGTACAGCCAGAATGG AG	Clonar y secuenciar
attB2RCGH1A	<i>cgh-1a</i>	GGGGACCACTTTGTACAAGAAA GCTGGTCCAGTTTAACCTCCTC TCC	Clonar y secuenciar
attB1FCGH1B	<i>cgh-1b</i>	GGGGACAAGTTTGTACAAAAA GCAGGCTTCGAAGGAGATAGAA CCATGGCTACAGCGAGAACTGAG	Clonar y secuenciar
attB2RCGH1B	<i>cgh-1b</i>	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAG CTGGGTCATTAAGCTCGCCTGTT TTGTG	Clonar y secuenciar

Para producir RNA mensajero de cada fusión (Cgh-1a-GFP y Cgh-1b-GFP) ambos plásmidos fueron linearizados con la enzima de restricción PmeI la cual corta del lado 5' de la fusión después del sitio "polyA". Posteriormente se realizó una transcripción *in vitro* usando el promotor T7 presente en el plásmido del lado 3', justo río arriba de la fusión, para ello se empleó el kit mMMESSAGE-mMACHINE (Ambion). El mRNA obtenido se purificó y se cuantificó por su absorción a 260 nm de luz UV. Los embriones de pez cebra fueron microinyectados, en los estadios de 1 a 4 células, con aproximadamente 1 ng de mRNA (aproximadamente 3 nanolitros de mRNA a 300 ng/ μ l) disueltos en PBS filtrado y 0.05% de rojo de fenol. Los embriones inyectados se dejaron desarrollar hasta 24 y 48 hpf en donde fueron observados con microscopia de fluorescencia (Nikon).

Microinyección de morfolinos.

Como se menciona en la sección de resultados los morfolinos se basan en tecnología antisentido para bloquear la expresión de los genes de interés. Son análogos de ácidos nucleicos con anillos morfolinos que reemplazan a la ribosa y que se unen entre ellos por fosforodiamidatos en vez de fosfatos. Esto les confiere resistencia a ser degradados en el organismo, ya que no son reconocidos por ningún tipo de nucleasa. Los oligonucleótidos morfolinos que empleamos (descritos en la sección de resultados) se sintetizaron por la compañía "GeneTools" son de una sola hebra y contienen 25 nucleótidos cada uno.

Para microinyectar se utilizaron capilares de vidrio (borosilicato) de 1.0mm OD y 0.58 mm ID que fueron estirados para hacer microagujas en un equipo especial para ello ("Puller" de Sutter Instruments Inc.). El procedimiento consiste en calentar los capilares en su parte central y jalarlos por ambos extremos con una fuerza constante. Las microagujas se colocaron en un porta-agujas sujeto a un micromanipulador y conectado a un microinyector neumático (Tritech Research). Para calibrar el volumen de microinyección se colocó una gota de aceite mineral sobre un portaobjetos graduado (micrómetro objeto ZEISS) y en la gota se microinyectó una solución con colorante (rojo de fenol al 0.05%), el volumen de la gota se

calculó a partir de medir el diámetro y calcular el volumen de una esfera ($\frac{4}{3} \times \pi \times \text{radio}^3$). Los embriones se colectaron por la mañana recién fertilizados y se colocaron en el interior de surcos hechos en placas de agarosa 2% con el fin de inmovilizarlos mientras se realiza la microinyección, los embriones estuvieron sumergidos todo el tiempo en medio para embriones. Con este procedimiento fue posible microinyectar aproximadamente 150 embriones por placa de agarosa y con cada microaguja es posible microinyectar aproximadamente 75 embriones. Los embriones fueron microinyectados en el vitelo, en los estadios de 1 a 4 células, ya que en estos estadios existe un sincicio. Después de microinyectarlos, los embriones fueron transferidos a una caja de petri con medio para embriones y colocados en una incubadora refrigerada (Shel-Lab) y ahí se dejaron recuperar y desarrollarse a 28.5° C. Su desarrollo fue seguido minuciosamente con observaciones frecuentes bajo el microscopio estereoscópico (Nikon SMZ645). Cada microaguja se llenó con 1 μl de la solución conteniendo el morfolino que fue preparado a una concentración de 1.8, 3.6 ó 7.2 ng/nl (nanogramos / nanolitro). Los morfolinos se disolvieron en agua desionizada con 0.05% de rojo de fenol, se calentaron a 65° C por 10 min y se colocaron en hielo 2 min antes de cargarse en las microagujas.

Fotografía y mejoramiento de imágenes

Las micrografías de los embriones fueron adquiridas con una cámara digital Axiocam (Zeiss) conectadas a un microscopio con fluorescencia e iluminación Nomarsky marca Nikon. Las imágenes fueron capturadas con el programa Axiovision (Zeiss) y mejoradas en contraste y brillo con el programa Photoshop (Adobe).

Resultados

La expresión del mRNA de *cgh-1a* y *cgh-1b* en el pez cebra.

En el pez cebra, y en otros organismos, se ha observado que los RNAs mensajeros que codifican para componentes del citoplasma germinal se encuentran presentes en los ovocitos y durante la embriogénesis temprana (Kosaka *et al.* 2007). Algunos de estos mRNAs solo se expresan en células germinales y otros se expresan tanto en células germinales como en células somáticas. Por ejemplo, el mRNA del gen *dnd*, se encuentra en células somáticas y germinales durante las primeras divisiones celulares del embrión, sin embargo en células somáticas se degrada posteriormente mientras que en células germinales permanece estable (Weidinger *et al.* 2003). En este trabajo comenzamos por determinar si los RNAs mensajeros de *cgh-1a* y *cgh-1b* se encuentran presentes en ovocitos, embriones de diferentes estadios y en los peces adultos. Para ello se empleó el método del fenol-cloroformo tiocinato de guanidina (TRIZOL) para obtener RNA total tanto de ovocitos (extraídos de ovarios), como de embriones de los estadios de 32 células, Domo, 14 somitas, 24 hpf, 2, 3 y 5 dpf, así como de peces completos adultos (un macho y una hembra). Para cada muestra se determinó la pureza así como la concentración del RNA. Como se puede observar (Fig. 4A) el RNA total obtenido tiene un alto grado de pureza. Posteriormente se preparó cDNA de todas estas muestras en presencia o ausencia de retro-transcriptasa (RT) y se amplificó, por RT-PCR un fragmento de 400 bp del gen constitutivo de actina como control. En la Fig. 4B se aprecia que en ninguna de las muestras se detectó contaminación de DNA genómico ya que en las preparaciones sin RT no se observó amplificación.

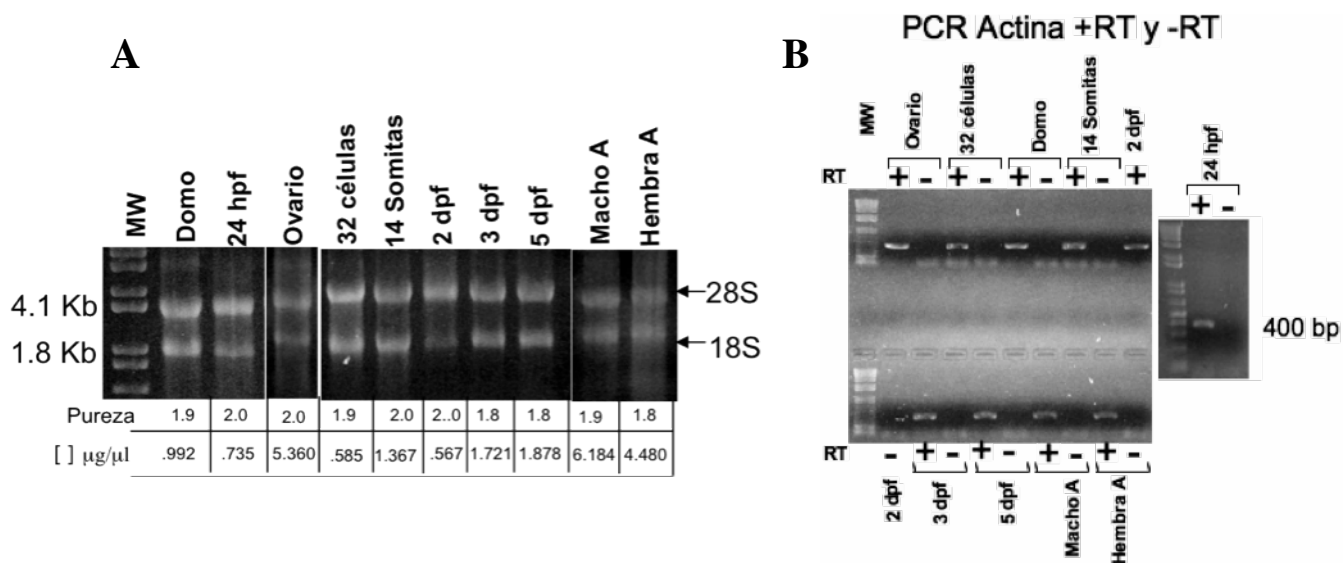


Figura 4. **Purificación y amplificación de RNA total de peces cebra.** (A) Electroforesis de ácidos nucleicos que muestra la obtención de RNA total de 8 diferentes estadios del desarrollo y de peces cebra adultos, bajo el gel se muestra la pureza y la concentración obtenida de cada muestra. (B) Amplificación por RT-PCR de un fragmento de 400 bp del gen constitutivo Actina, del cDNA de cada muestra, preparado con (+RT) y sin transcriptasa reversa (-RT). Este experimento control muestra que ninguna muestra tiene DNA genómico contaminante.

Para los cDNAs de interés se amplificó, por RT-PCR, un producto de 524 pb del gen *cgh-1a* con los oligos cv15 y cv6 (ver tabla 1), que son específicos para este gen (Fig 5A), y un producto de 444 pb del gen *cgh-1b* con los oligos jc1 y jc2 (ver tabla 1) que también son específicos (Fig. 5B). Como control de carga se amplificó un producto de 400 pb del gen constitutivo actina empleando los oligos ActinF y ActinR. Como resultado observamos que los RNAs mensajeros de *cgh-1a* y *cgh-1b* se expresan en los ovocitos, que ambos se expresan constitutivamente en todos los estadios del desarrollo analizados y que también se expresan tanto en peces adultos machos como hembras. Como este análisis no es cuantitativo, no podemos establecer diferencia en los niveles de expresión de ambos RNAs mensajeros aunque algunas bandas se vean más intensas que otras.

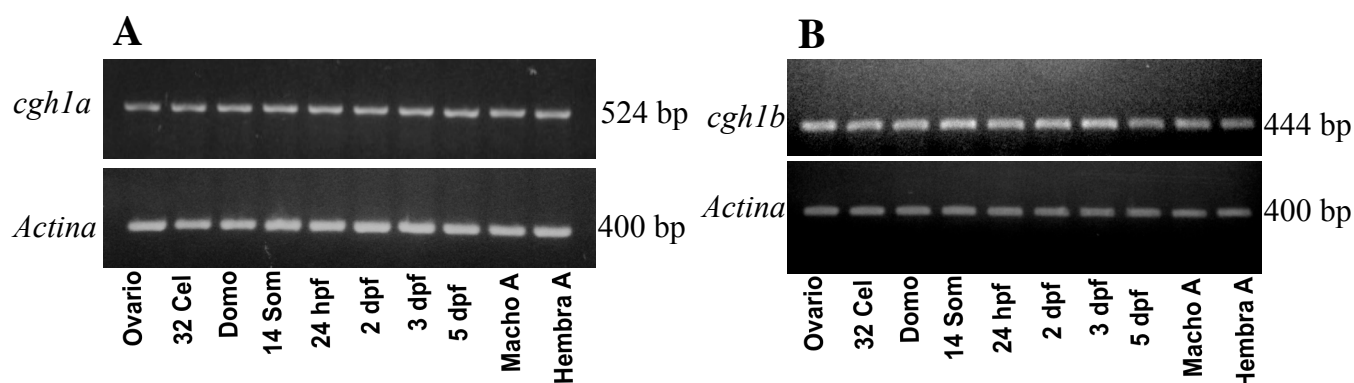


Figura 5. **Expresión de los genes *cgh-1a* y *cgh-1b* en peces adultos y en diferentes estadios de desarrollo.** Electroforesis de ácidos nucleicos en donde se observa que los RNAs mensajeros de los genes *cgh-1a* (A) y *cgh-1b* (B) se expresan en todos los estadios del desarrollo probados. Para las reacciones de RT-PCR se emplearon los oligonucleótidos cv6 y cv15 para amplificar a *cgh-1a* (524 bp) y jc1 y jc2 para amplificar a *cgh-1b* (444 bp). Como control de carga se amplificó un producto de 400 pb del gen constitutivo de la actina con los oligonucleótidos ActinF y ActinR.

Aunque los peces adultos mostraron tener presente el mRNA de *cgh-1a* y *cgh-1b* nos preguntamos si dichos mRNAs son preferentemente expresados por algunos tejidos, por lo que decidimos comparar los niveles de expresión de ambos genes en diferentes tejidos de peces adultos. Se escogieron el corazón, hígado, intestino, cerebro, ojos, testículos y ovarios, además se incluyó una hembra en la que el ovario fue removido. Para llevar a cabo este experimento se obtuvo RNA total de estos órganos y se preparó cDNA. Cabe mencionar que resultó un poco más difícil eliminar el DNA genómico de estas muestras (en particular del corazón e hígado), lo cual se logró con varios tratamientos con DNAasa. Posteriormente se hicieron RT-PCRs semicuantitativos amplificando *cgh-1a* y *cgh-1b* pero empleando cDNA sin diluir o diluido 1:50, 1:100, 1:500 o 1:1000 (Fig. 6). La razón de diluir el cDNA consiste en hacer limitante el templado lo que amplifica las diferencias en los niveles de expresión. Fue posible detectar la expresión del gen de actina aún en las mayores diluciones (dada su elevada expresión), en cambio

el mRNA de *cgh-1a* disminuye significativamente su expresión a partir de la dilución de 1:100 en todos los órganos excepto cerebro, testículo y ovario. Algo similar ocurre con el cDNA de *cgh-1b* pero hasta la dilución de 1:1000, en donde se observa una mayor expresión en intestino, cerebro, testículo y ovario. Nuestra interpretación de este resultado es que tanto *cgh-1a* como *cgh-1b* se expresan mayoritariamente en el cerebro, los testículos y los ovarios. Ésto se confirma con la observación de que en la hembra a la que se removió el ovario no se detecta la expresión de estos genes. Cabe mencionar que evidentemente *cgh-1b* se expresa más que *cgh-1a*. En el caso de *cgh-1b* también observamos una expresión significativa en el intestino.

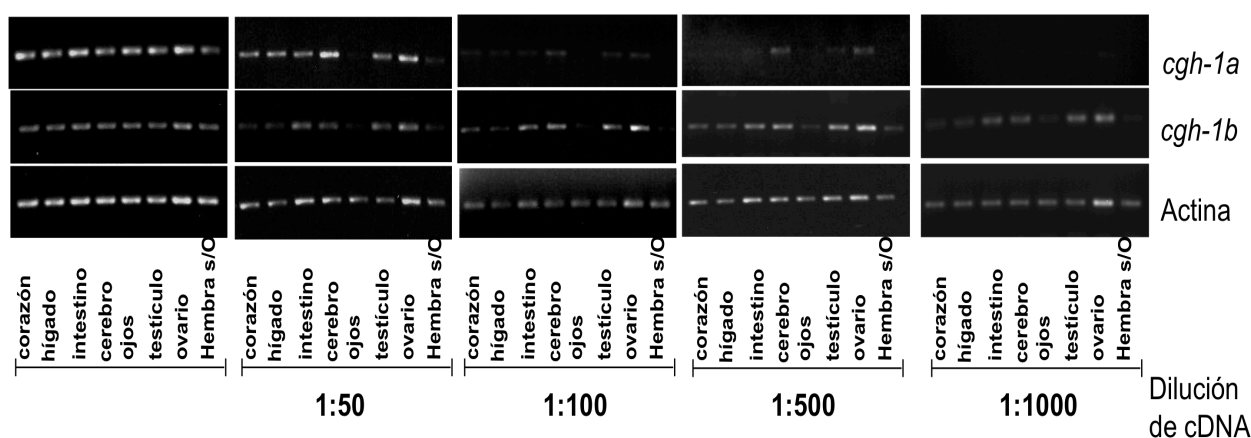


Figura 6. **RT-PCR semicuantitativo de la expresión de los RNA mensajeros de los genes *cgh-1a* y *cgh-1b* en tejidos de peces adultos.** Los paneles corresponden a electroforesis de ácidos nucleicos. Empleando diferentes diluciones de cDNA, se comparó la expresión de los genes *cgh-1a* y *cgh-1b* en diferentes órganos del pez cebra adulto. Éste se preparó a partir de RNA total obtenido de corazón, hígado, intestino, cerebro, ojos, testículo y ovario, además de una hembra completa sin ovario (hembra s/o). En el primer panel (sin dilución) se observa que ambos RNAs mensajeros se expresan en todos los órganos, mientras que en las diluciones del cDNA observamos diferencias en los niveles de expresión, en donde en general *cgh-1b* se expresa más que *cgh-1a*. También se encontró que ambos genes se expresan más en cerebro, ovario y testículo.

Expresión de las proteínas Cgh-1 en el pez cebra.

El observar que hay una expresión constante de los RNA mensajeros de *cgh-1a* y *cgh-1b* (Fig. 2) a lo largo del desarrollo embrionario del pez cebra sugiere que también las proteínas respectivas (Cgh-1a y Cgh-1b) podrían estar presentes a lo largo de la embriogénesis. Para confirmar lo anterior realizamos un análisis de tipo “western blot” con proteína obtenida de embriones de diferentes estadios de desarrollo. El anticuerpo utilizado fue preparado empleando como antígeno un péptido basado en una secuencia localizada en la región carboxilo de Cgh-1a (ver sección de metodología). Sin embargo, como dicha secuencia (péptido) es prácticamente idéntica en Cgh-1a y Cgh-1b (Fig. 7A) es muy posible que el anticuerpo reconozca a ambas proteínas. Este anticuerpo (fabricado en conejo) fue titulado primero con proteína total extraída de ovarios de hembras adultas, en donde determinamos que empleando una dilución de 1:1000 es posible detectar una banda de aproximadamente 53 kDa (Fig. 7B) que corresponde al peso molecular calculado para estas proteínas (Cgh-1a y Cgh-1b). Se extrajo la proteína total tanto de ovocitos como de embriones de diferentes estadios del desarrollo: 32 células, domo (4 hpf), 14 somitas (16 hpf), 24 hpf, 2 y 3 dpf, se cuantificó la concentración de proteína por el método de Biuret, posteriormente se realizaron “western blots”, utilizando como control de carga un anticuerpo comercial contra la proteína constitutiva Tubulina (Fig. 7C).

El anti-Cgh-1 detectó una sola banda de aproximadamente 53 kDa que fue detectada en ovocitos y en embriones de 32 células, domo y de 14 somitas, sin embargo se observa menos a los 24 hpf de desarrollo y para 2 dpf prácticamente ha desaparecido (Fig. 7C). Esta observación no necesariamente difiere con lo observado en la expresión de los RNA mensajeros de *cgh-1a* y *cgh-1b* a lo largo del desarrollo (Fig. 5) ya que los RT-PCRs no son experimentos cuantitativos mientras que el “western blot” si lo es.

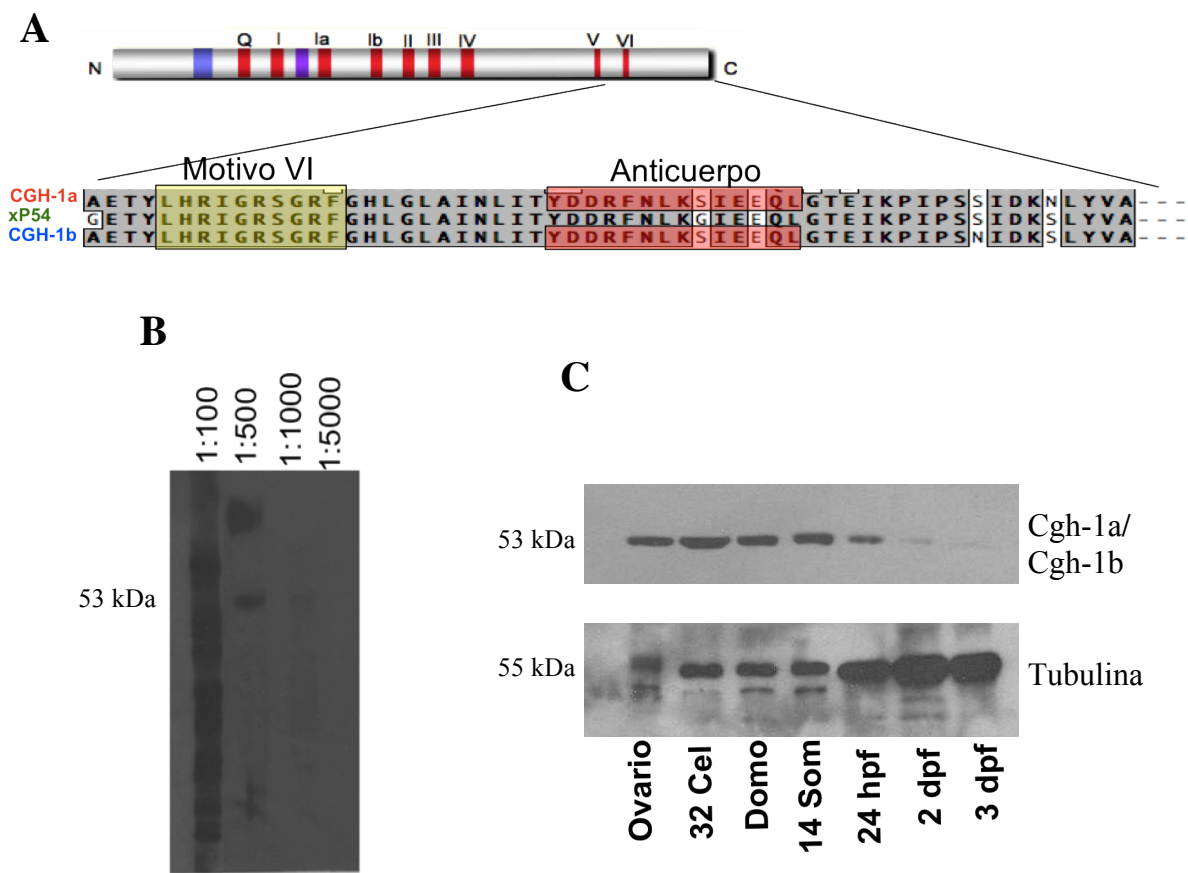


Figura 7. **Expresión de las proteínas Cgh-1a y Cgh-1b en diferentes estadios del desarrollo embrionario del pez cebra.** (A) Diagrama de la proteína Cgh-1 en donde se aprecia la región del carboxilo terminal en la que se basó la fabricación del anticuerpo anti-cgh-1, que fue titulado (B) por medio de análisis de tipo “western blot” y posteriormente empleado para determinar los estadios de desarrollo en donde mejor se expresan las proteínas Cgh-1a y Cgh-1b (C). Se observó que después de las 24 hpf su expresión disminuye.

En *C. elegans* y *Xenopus laevis* se ha reportado que *cgh-1* se expresa mayoritariamente en las gónadas (Noble *et al.* 2008; Minshall *et al.* 2009). Nuestros resultados de detección de mRNAs (Fig. 6) sugieren que las proteínas Cgh-1a y Cgh-1b también se expresarán mayoritariamente en las gónadas aunque también en el cerebro ya que son los tejidos en donde hubo mayor expresión de mRNAs. Para analizar la expresión de las proteínas Cgh-

1a y Cgh-1b se realizaron disecciones de peces adultos, de los cuales se extrajo cerebro, corazón, ojos, testículos y ovarios, posteriormente se obtuvo la proteína total de los diferentes órganos, se cuantificó la concentración de proteína de cada muestra por el método de Biuret, y se hicieron análisis tipo “western blot”, empleando nuestro anti-Cgh-1 y nuevamente el anticuerpo contra la proteína Tubulina como control de carga. En este análisis se observa claramente que la banda de aproximadamente 53 kDa, que podría representar la expresión de las proteínas Cgh-1 (a, b, o ambos) solo se encuentra en tejido gonadal de peces adultos. (Fig. 8) expresándose en mayores cantidades en el ovario que en testículo. Esto coincide con lo observado en los análisis de RT-PCR semicuantitativo (Fig. 6) ya que el mRNA de *cgh-1b* se expresaba mayoritariamente en ovario, testículo, cerebro e intestino. Sin embargo es contradictorio que el mRNA de *cgh-1b* se exprese en altos niveles en el cerebro pero no se detecta la expresión de la proteína en el cerebro por “western blot”.

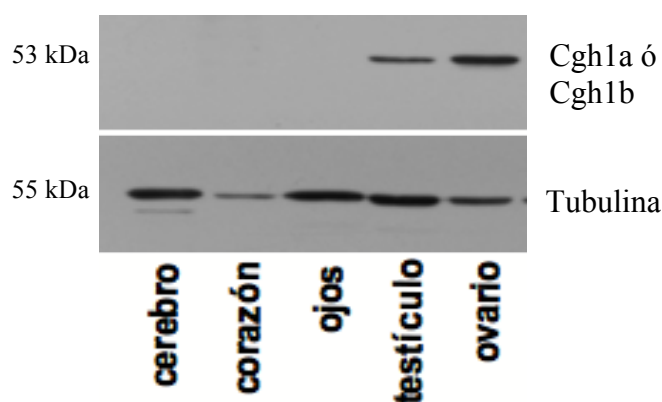


Figura 8. **La expresión de la proteína Cgh-1a ó Cgh-1b en órganos de peces adultos.** Se realizó un ensayo tipo “western blot” para determinar si la expresión de las proteínas Cgh-1a y Cgh-1b es específica de tejido gonadal o se expresa también en otro tipo de tejidos. Encontramos que el anti-Cgh-1 es capaz de detectar una banda de aproximadamente 53 kDa en extractos de proteínas de ovario y testículo pero no de cerebro, corazón y ojos.

Inmunolocalización de las proteínas Cgh-1 en embriones de pez cebra.

Como se mencionó en la introducción, varias proteínas de línea germinal (Vasa, Dead end, Askopos) se expresan en las CGPs durante el desarrollo embrionario del pez cebra, las CGPs son la células precursoras de la línea germinal. En esta parte decidimos determinar si las proteína Cgh-1a y Cgh-1b también se expresan en las CGPs. Para ello se llevaron a cabo inmunotinciones de embriones completos. Para identificar a las CGPs empleamos un anticuerpo comercial (fabricado en conejo) contra la proteína Dead end (gen *dnd*) de pez cebra que tiene una expresión específica en células germinales (Weidenger, 2003). En la figura 9 se puede observar que empleando una dilución de 1:1000 es posible reconocer a la proteína Dead end (49 kDa) en “western blots” (Fig. 9a). Cuando este anticuerpo se probó en embriones de 18 somitas se observó que el Anti-Dad reconoce a las CGPs las cuales en este estadio en particular se encuentran en el borde ventral del tronco, justo sobre la extensión del vitelo (Weidenger *et al*, 2003). El anticuerpo-anti-Cgh-1 también reconoce un grupo de células que coinciden en posición con las CGPs (Fig. 9D) sin embargo no se pudo hacer la co-localización ya que ambos anticuerpos fueron preparados en conejo. Cabe mencionar que la tinción con el anti-*dnd* se hizo en el estadio de 18 somitas mientras que con el anti-Cgh-1 se emplearon embriones de 48 hpf. Aunque nuestros datos no son concluyentes, este experimento sugiere que una o ambas de las proteínas Cgh-1 de pez cebra se expresan en CGPs.

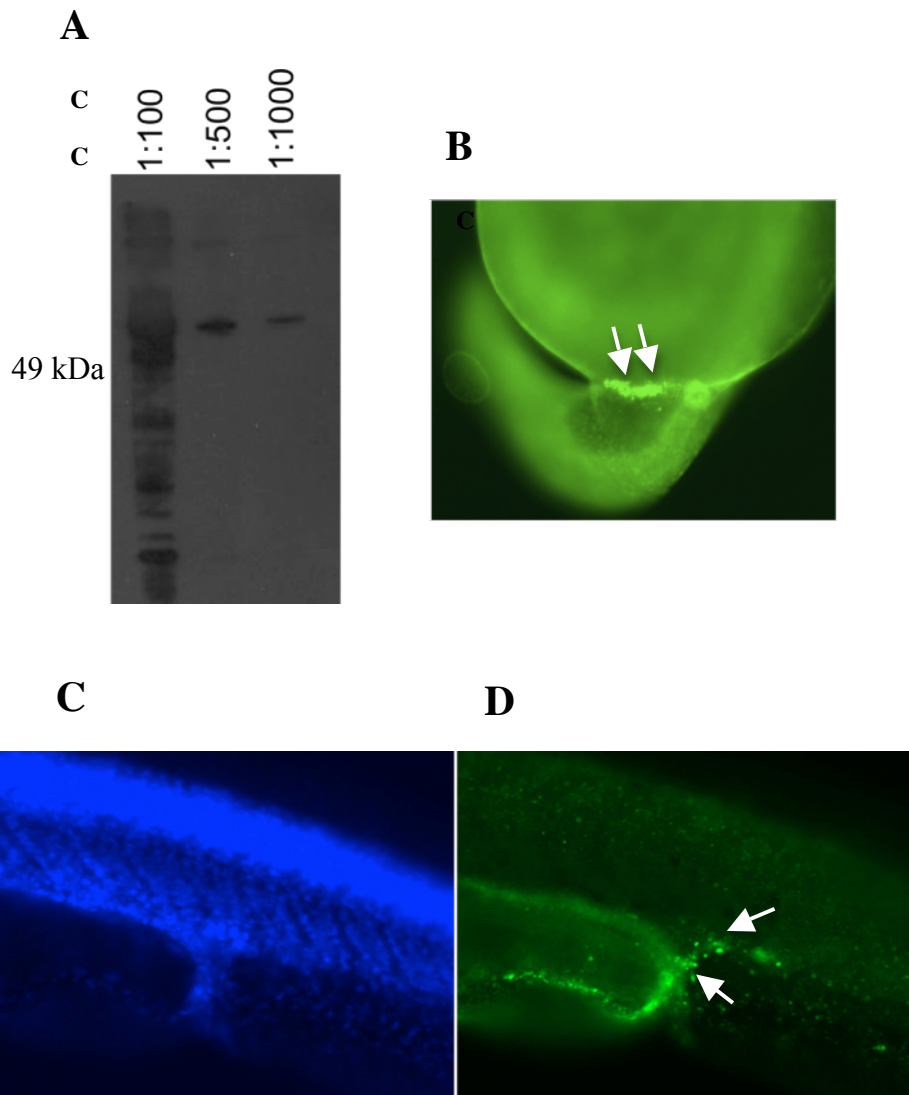


Figura 9. **Inmunodetección de la proteína Cgh-1 en embriones de pez cebra.** (A) Titulación por “western blot” del anticuerpo control contra la proteína “Dead end” de pez cebra. (B) Inmunotinción en embriones completos de 18 somitas con el Anti-Dead-end en donde se observan las células germinales primordiales (CGPs) en la parte ventral del tronco en el límite anterior de la extensión del vitelo (ver flechas) la parte anterior del embrión esta hacia la parte superior de la foto. (C y D) Peces de 2 dpf, se enfoca la zona ventral en donde termina la extensión del vitelo, lugar donde se localizan las CGPs en este estadio. En azul se ve la tinción con DAPI y en verde se observa un marcaje específico con el anti-Cgh-1 en la misma zona lo que sugiere que una o ambas de las proteínas de Cgh-1 se expresan en CGPs.

Efectos de bloquear la traducción de Cgh-1a con morfolinos.

Se ha descrito que la sobrevivencia de las células germinales depende de la presencia de componentes de gránulos germinales como *dnd* o *dazl*. Nos preguntamos si el eliminar la expresión de las proteínas Cgh-1 durante el desarrollo embrionario del pez cebra tendría consecuencias en la sobrevivencia de la línea germinal y posiblemente provocar infertilidad en los peces. Decidimos bloquear la expresión de *cgh-1a* empleando morfolinos.

Los morfolinos son oligonucleótidos formados por análogos de ácidos nucleicos de aproximadamente 25 bases y que tienen la capacidad de unirse específicamente a un mRNA blanco inhibiendo su traducción. Las bases que forman el morfolino corresponden a la secuencia antisentido de una región cercana al sitio de inicio de la traducción (ATG). Como controles del experimento se emplearon: un morfolino que se sabe que en pez cebra no tiene ningún efecto en el desarrollo (control negativo) y que además está fluoresceinado. Además de un morfolino contra el mRNA del gen *cordina* (*din*) (control positivo). Para introducir a los morfolinos se emplearon microinyecciones en los estadios de 1 a 4 células de desarrollo (ver sección de metodología).

Al inyectar el morfolino control negativo observamos peces con fluorescencia pero sin ningún defecto aparente, sin embargo 10% de los embriones inyectados no sobreviven, es posible que esto se deba a que en ocasiones las microinyecciones dañan al embrión (Fig. 10A). Después como un control positivo se usó el morfolino de la proteína Cordina. La proteína Cordina se une a BMP4 y BMP2 evitando que se unan a sus receptores lo que induce que el ectodermo se convierta en sistema nervioso. El mutante de Cordina de pez cebra tiene una placa neural muy reducida y una región del mesodermo ventral aumentada de tamaño (ventralización) (Little y Mullins 2004). Después de estandarizar las condiciones experimentales en el uso de morfolinos se logró fenocopiar los defectos de ventralización característicos de la falta de Cordina (Fig. 10B) al inyectar 1.8 y 3.6 ng de morfolino. Observamos embriones con una cabeza reducida en tamaño, un tronco más corto y la punta de la cola doblada hacia la parte ventral, lo anterior es similar

a lo ya reportado (Little y Mullins 2004). En el caso de los morfantes de *Cordina* se obtuvo un 85% de sobrevivencia.

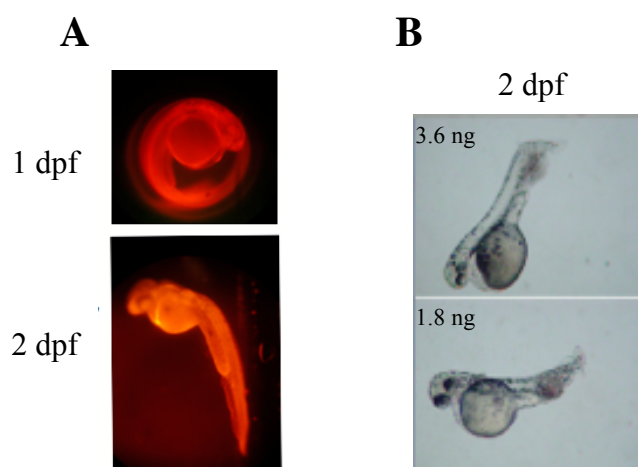


Figura 10. **El efecto de los morfolinolinos control al microinyectarlos en embriones de pez cebra.** (A) Primero se microinyectó el control negativo flouresceinado hasta obtener el 90% de sobrevivencia sin que los peces presentaran ningún defecto. (B) Después se microinyectó, como control positivo, el morfolino del gen *cordina* que induce una ventralización, se reprodujo el fenotipo reportado obteniéndose el 85% de sobrevivencia. En cada experimento se inyectaron entre 90 y 100 embriones en el estadio de 2 células.

Una vez estandarizada la técnica de microinyección inyectamos el morfolino de *cgh-1a*. Comenzamos inyectando 1.8 ng del morfolino con lo cual no obtuvimos ningún resultado en varias repeticiones. Pensamos que existía la posibilidad de que *cgh-1a* y *cgh-1b* fueran redundantes, por lo cual no veríamos ningún fenotipo hasta inyectar los dos morfolinolinos. Posteriormente concentramos el morfolino e inyectamos el mismo volumen pero ahora a mayor concentración, de manera que inyectamos 3.6 ng, observando un fenotipo durante el desarrollo temprano de los peces microinyectados, dicho fenotipo parece ser un retraso en el desarrollo (Fig. 11A). Después duplicamos el volumen, inyectando 7.2 ng, observando que el fenotipo de retraso en el desarrollo se hacía más severo (Fig. 11A). Cabe mencionar que ninguno de estos morfantes sobrevive hasta la etapa adulta.

Para establecer que los defectos observados se deben a la falta de Cgh-1a realizamos un ensayo de “western blot” utilizando proteína extraída de un grupo de embriones microinyectados con el morfolino control negativo y embriones microinyectados con 7.2 ng de morfolino de *cgh-1a*. En este análisis de “western blot” se observó una disminución de la banda de 53 kDa en los embriones tratados con el morfolino de *cgh-1a* (Fig. 11B). Esto puede deberse a que el anticuerpo reconoce a las dos proteínas, por lo tanto la banda observada puede corresponder a la proteína CGH-1B. A pesar de esto, el análisis sugiere que la expresión de Cgh-1a se ve alterada lo cual parece, conlleva a defectos pleiotrópicos o generales del desarrollo, lo que implicaría que la función de Cgh-1a no está confinada a las células germinales sino que es más general.

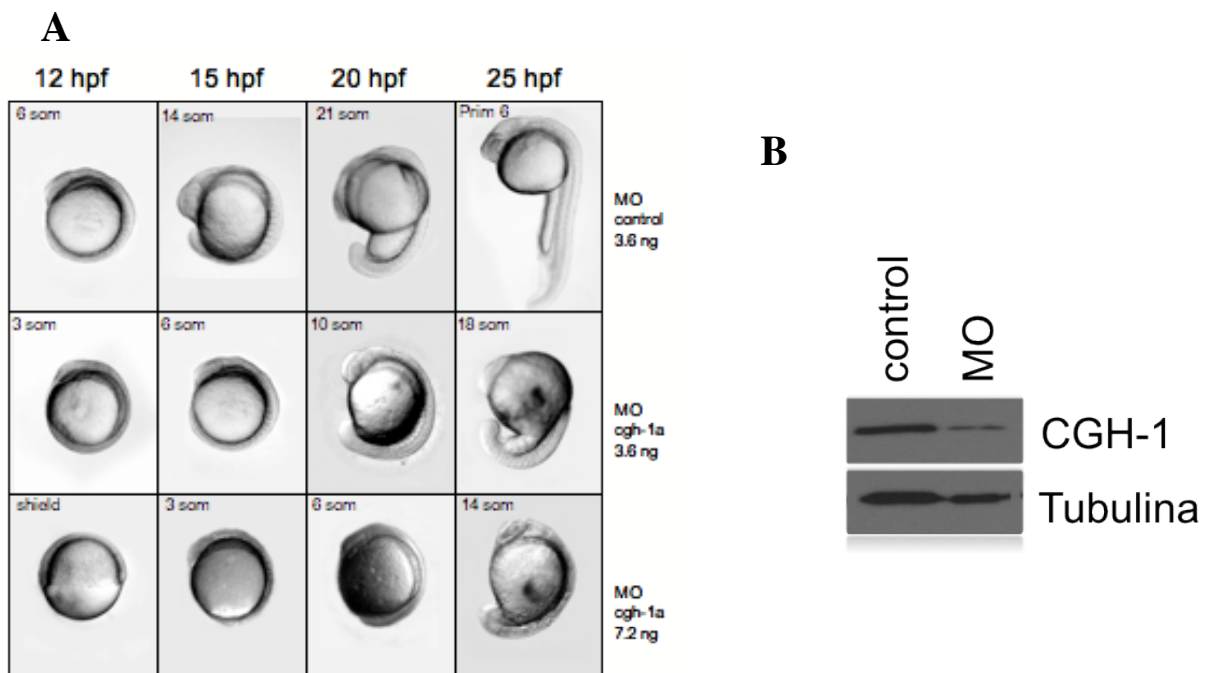


Figura 11. **Defectos en el desarrollo provocados por la microinyección del morfolino contra *cgh-1a*.** (A) Embriones microinyectados en el estadio de dos células con 3.6 ng y 7.2 ng de morfolino *cgh-1a* presentan un retraso en el desarrollo que es aparente 12 horas después de ser microinyectados. (B) “Western blot” de peces microinyectados con el morfolino control negativo y microinyectados con 7.2 ng de morfolino *cgh-1a*. Se utilizó el anticuerpo contra Cgh-1 y como control de carga un anticuerpo contra la proteína Tubulina.

Construcción de las proteínas de fusión Cgh-1a-GFP y Cgh-1b-GFP

En otros organismos como *C. elegans* (Navarro *et al.* 2001) y *D. melanogaster* (Nakamura *et al.* 2001) se ha descrito que los homólogos de Cgh-1 se encuentran asociados a gránulos germinales. Nosotros nos preguntamos si lo mismo ocurre en el pez cebra, por esa razón se construyeron proteínas de fusión en donde se unió a la proteína verde fluorescente del lado carboxilo terminal tanto de Cgh-1a como de Cgh-1b, para posteriormente observar su localización intracelular al expresarlos en embriones de pez cebra. Estas fusiones se llevaron a cabo empleando el sistema "Gateway" que se basa en la recombinación del DNA del fago λ en el cromosoma de la bacteria *Escherichia coli* por medio de unas secuencias cortas denominadas "att" presentes en ambos genomas. Los sitios "att" confieren orientación y especificidad para los eventos de recombinación.

En un primer paso se amplificaron, mediante RT-PCR, los genes *cgh-1a* y *cgh-1b* a partir de RNA total de ovario (Fig. 12A-C) utilizando oligonucleótidos específicos, pero que incluyeron secuencias de recombinación "att" (ver Tabla 1). Mientras que para *cgh-1b* se obtuvo un producto de PCR solo variando la concentración de $MgCl_2$ en la reacción de PCR (Fig. 12C), para el caso de *cgh-1a* fue necesario enriquecer primero el producto de PCR con oligonucleótidos específicos que no cuentan con los sitios "att" y posteriormente utilizando los oligonucleótidos "att" generar el producto de PCR esperado (Fig 12B). Los productos de PCR se clonaron en el vector pDONR221 en presencia de la enzima de recombinación BP clonasa. Las clonas de *cgh-1a* (Fig. 12D) y *cgh-1b* (Fig. 12E) se verificaron mediante una digestión diagnóstica (geles en Fig. 12D y E) y mandadas a secuenciar. Posteriormente se hizo una segunda reacción de recombinación mezclando los plásmidos generados con el plásmido destino (pcDNA 6.2/C-Em GFP-DEST) en presencia de la enzima de recombinación LR clonasa. En este paso quedó la proteína verde fluorescente (GFP) fusionada al gen de interés del lado carboxilo terminal y en marco de lectura abierto. Ambas construcciones Cgh-1a-GFP y Cgh-1b-GFP se verificaron por digestiones diagnósticas (Fig. 12F y 12G) y por secuenciación. Después de linealizar y purificar estos plásmidos (Fig. 12H y 12I) se llevó a cabo una transcripción "in

in vitro” utilizando el promotor de la RNA polimerasa T7 que contiene el vector justo río arriba de la construcción para generar mRNAs 5'-cap (protegidos) (Fig. 12J y K).

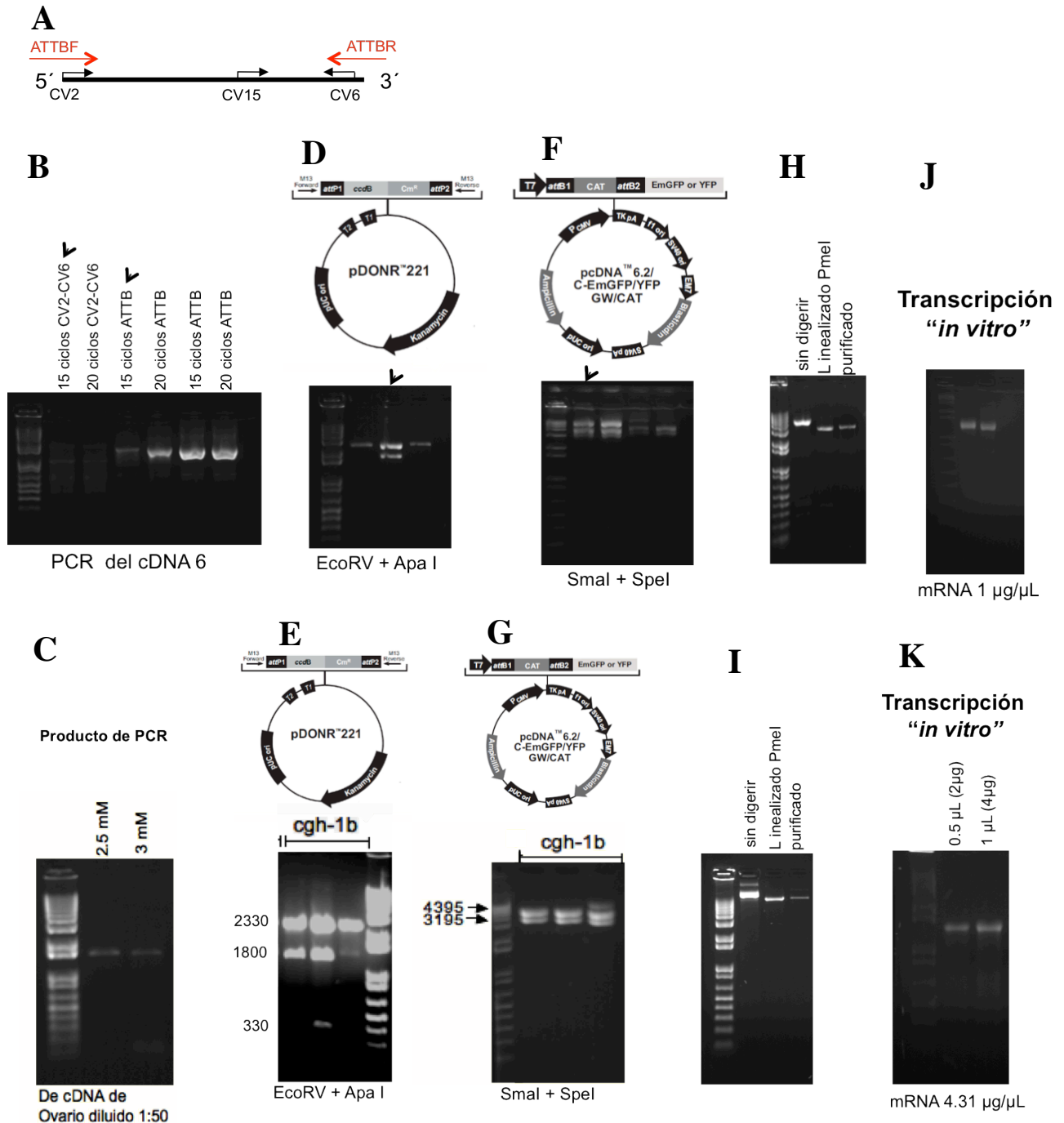


Figura 12. **Construcción de las proteínas de fusión Cgh-1a-GFP y Cgh-1b-GFP.** La clonación del gen *cgh-1a* requirió enriquecer el producto de PCR empleando oligonucleótidos sin sitios “att” (oligonucleótidos CV2 y CV6 en A) este enriquecimiento se hizo por duplicado, con 15 y 20 ciclos. Se eligió el de

15 ciclos (primer carril en B), para después obtener el producto esperado con oligonucleótidos “att” (A y tercer carril en B). Las flechas en B, D y F marcan el producto que se eligió para continuar con el siguiente paso durante la construcción de la proteína de fusión Cgh-1a. El gen *cgh-1b* fue amplificado directamente con oligonucleótidos “att” los cuales funcionaron mejor cuando el medio de PCR tenía 2.5 mM de MgCl₂ (C). Ambos productos de PCR fueron clonados en el vector pDONR221 y las clonas seleccionadas por patrones de digestión (EcoRV + Apal) (D para *cgh-1a* y E para *cgh-1b*). Estos plásmidos fueron recombinados con el vector pcDNA 6.2/C-Em GFP-DEST y las clonas resultantes seleccionadas por su patrón de digestión (SmaI + SpeI) (F para *cgh-1a* y G para *cgh-1b*) y su identidad confirmada por secuenciación. Las dos construcciones se linearizaron utilizando a la enzima de restricción PmeI (H para *cgh-1a* e I para *cgh-1b*) con el fin de llevar a cabo una transcripción *in vitro* (producir mRNA) empleando el sitio de reconocimiento a la RNA polimerasa del fago T7. Se produjeron, por transcripción *in vitro* los RNA mensajeros de *cgh-1a* (J) y de *cgh-1b* (K) añadiendo un extremo 5'-cap en cada uno para evita su degradación al microinyectarse.

Expresión de las proteínas de fusión Cgh-1a-GFP y Cgh-1b-GFP

Con el fin de expresar las proteínas de fusión Cgh-1a-GFP y Cgh-1b-GFP se produjeron los mRNAs (5'-cap) por transcripción “*in vitro*” y fueron microinyectados en embriones de pez cebra entre los estadios de 1 a 4 células. Observamos que los embriones microinyectados con la fusión Cgh-1a-GFP si expresan esta fusión, la cual se monitoreó por la presencia de GFP en un grupo de células específicas en embriones de 24 hpf (Fig. 13A), lo cual es inesperado ya que las microinyecciones de mRNAs tienden a expresarse inespecíficamente sin preferir ningún tipo celular. Las observaciones de estos embriones fueron realizadas “*in vivo*” bajo el microscopio de fluorescencia. Resultó interesante que el sitio de expresión de estas células coincide con la ruta de migración de CGPs en este estadio de desarrollo. Sin embargo, no logramos confirmar que se trata de CGPs ya que no se lograron completar los experimentos de inmunotinción con el

anticuerpo marcador de CGPs en pez cebra (anti-dnd). El análisis a mayor aumento de las células marcadas por las microinyecciones de Cgh-1a-GFP reveló un patrón de expresión granular (Fig. 13B), lo que sugiere que Cgh-1a se expresa en gránulos citoplasmáticos que pudieran ser gránulos de RNA como los gránulos germinales o los cuerpos de procesamiento.

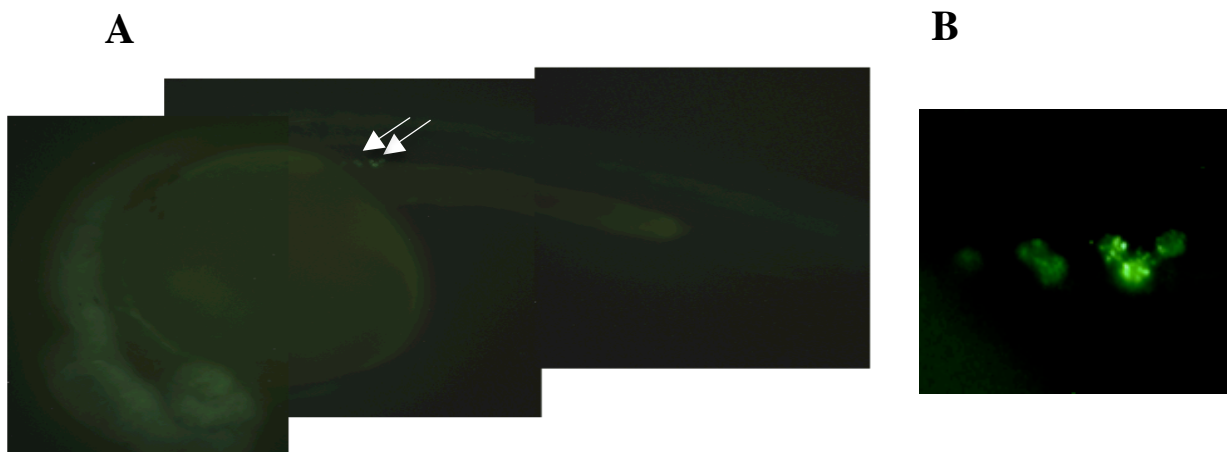


Figura 13. **Expresión de la fusión Cgh-1a-GFP en embriones de pez cebra de 24 hpf.** Embriones que fueron microinyectados con el mRNA de la proteína de fusión Cgh-1a-GFP. A las 24 hpf las larvas fueron fotografiadas en un microscopio de fluorescencia en un aumento de 20X (A) y de 40X (B). Las células que expresan la fusión coinciden con la ruta de migración de las CGPs durante el desarrollo y además se expresan en forma granular en las células que expresan la fusión.

Las microinyecciones del mRNA de la fusión Cgh-1b-GFP dieron un resultado diferente, ya que se observó una expresión dispersa en diferentes partes de los embriones. Cabe mencionar que en estos embriones no se lograron obtener observaciones “*in vivo*”, por lo que fue necesario realizar inmunotinciones con un anticuerpo anti-GFP (Fig. 14A). Al contrastar estos embriones con el colorante de núcleos DAPI se observó (a mayor aumento) que las proteínas de fusión parecen expresarse en la periferia de los núcleos (Fig. 14B), lo que coincide con la localización de algunos gránulos de RNA como los gránulos P de *C. elegans*, o incluso los cuerpos de procesamiento.

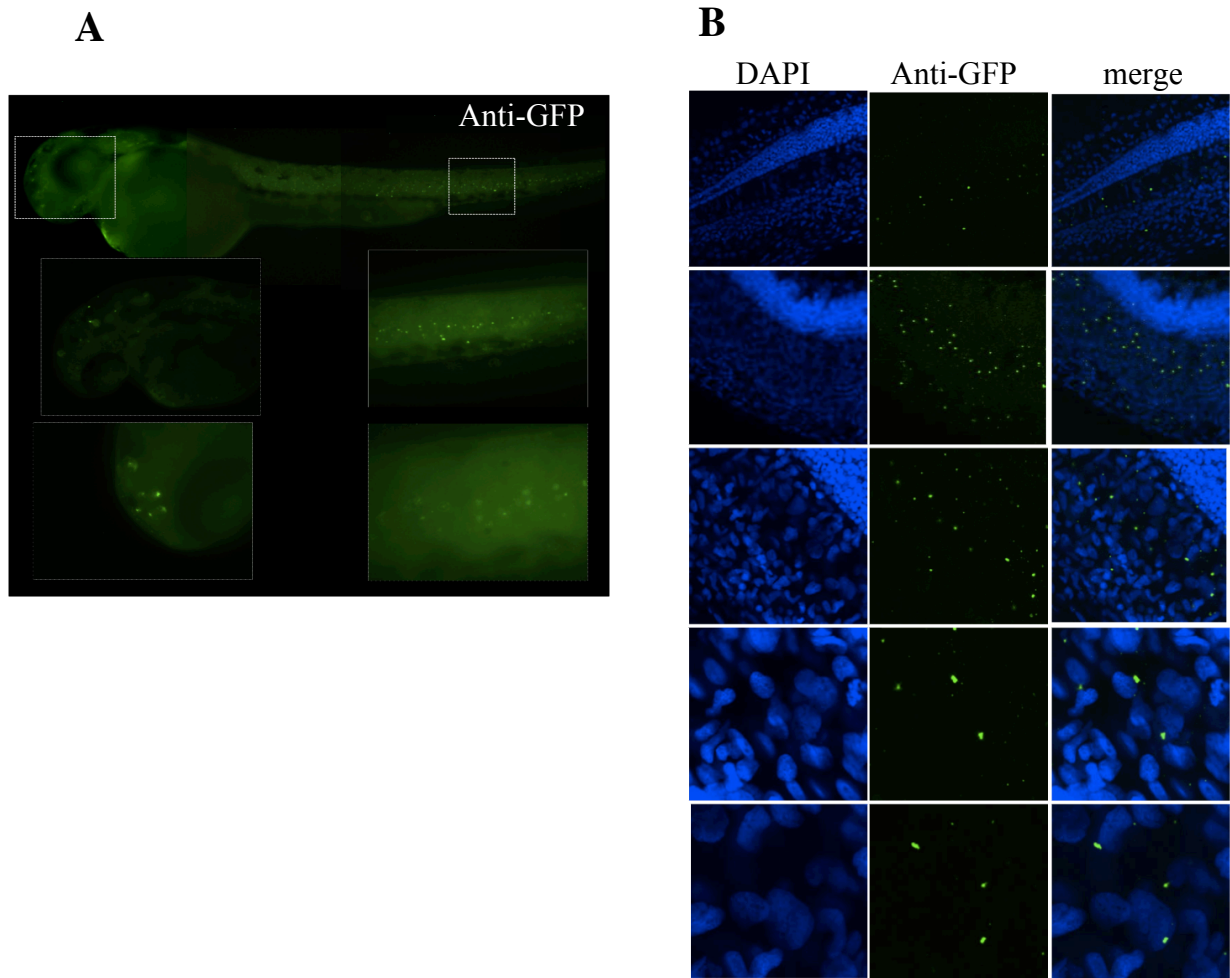


Figura 14. **Expresión de la fusión Cgh-1b-GFP en embriones de pez cebra de 2 dpf.** Embriones que fueron microinyectados con el mRNA de la proteína de fusión Cgh-1b-GFP. Las larvas de 2 dpf fueron fijadas y tratadas con un anticuerpo anti-GFP y con el colorante de núcleos DAPI. Como se puede observar el marcaje se observa en diferentes regiones del tronco de los peces cuando se visualizan a un aumento de 20X (A). En mayores aumentos (40X) se observa que las proteínas de fusión se observan en la periferia de los núcleos (B).

Discusión

En organismos como *Drosophila*, *C. elegans*, *Xenopus* y pez cebra, un aspecto clave en el desarrollo temprano es la regulación del mRNA. Los mRNAs maternos son producidos durante la ovogénesis y almacenados en el ovocito, donde se mantienen traduccionalmente reprimidos hasta que ocurre la fertilización. mRNAs específicos están localizados en regiones discretas del ovocito, una vez que a ocurrido la fertilización se activa la traducción de estos mRNAs maternos de una manera espacio y tiempo especifica. La presencia de los mRNAs maternos permite que la transcripción cigotica sea reprimida durante los primeros ciclos de división, lo cual permite una rápida síntesis del DNA y división celular. (Johnstone y Lasko., 2001) En un embrión las primeras células germinales que se pueden observar contienen gránulos formados de RNA y proteínas, llamado comúnmente citoplasma germinal, el cual contiene las moléculas determinantes de las células germinales (Houston y King, 2000). Estudiamos uno de éstos componentes del citoplasma germinal, el gen *cgh-1*, el cual está conservado en diferentes organismos. El resultado de un análisis *in silico*, mostró que en el pez cebra existen dos copias del gen *cgh-1* a los cuales hemos llamado *cgh-1a* y *cgh-1b*. En peces teleostos, como el pez cebra, existió una duplicación parcial de su genoma (Taylor *et al*, 2003; Amores *et al*, 1998) y se sabe que algunos genes tienden a ser retenidos después de una duplicación simple o una duplicación parcial del genoma. En este sentido, se dice que un par de genes duplicados se han “subfuncionalizado” si cada una de las dos copias del gen lleva a cabo sólo un subconjunto de las funciones que el gen ancestral tenía antes de la duplicación. (Conant y Wolfe, 2008).

Mediante RT-PCR estudiamos la expresión de los RNA mensajeros de ambos genes durante el desarrollo temprano y en diferentes órganos de peces adultos. Observamos que los RNAs mensajeros tanto de *cgh-1a* y *cgh-1b* se expresan en todos los estadios del desarrollo analizados, y que también se encuentran presentes en extractos de peces adultos completos (Fig. 5). Esto demuestra que el RNA de ambos genes es materno y que está presente a lo largo del desarrollo temprano y hasta un estado adulto. Sin embargo, se trata de un análisis cualitativo mas no cuantitativo, por lo que

solo estamos observando la presencia o ausencia de estos mRNA. Para analizar con más detalle los niveles de expresión sería necesario realizar un RT-PCR semicuantitativo, tal como se hizo con los órganos de peces adultos, o para mas precisión, hacer un análisis de PCR en tiempo real. Por un análisis de RT-PCR semicuantitativo realizado en el RNA extraído del corazón, hígado, intestino, cerebro, ojos, testículos y ovarios, se observó que *cgh-1a* y *cgh-1b* se expresan en todos estos órganos pero en diferentes niveles. Al parecer el mRNA de *cgh-1b* se expresa más que el mRNA de *cgh-1a* (Fig. 6), ésto se concluyó ya que en las diluciones del cDNA por arriba de 1:100 *cgh-1b* mantiene su expresión mientras que las bandas que representan la expresión de *cgh-1a* cada vez son más tenues hasta que en la dilución 1:1000 ya no se pueden apreciar. Al mismo tiempo, encontramos que el cerebro y el ovario tienen una mayor expresión de *cgh-1a* cuando se compara con otros órganos (ver dilución 1:500 en la figura 6). También *cgh-1b* parece estar expresado mayoritariamente en algunos órganos como ovario, testículo, cerebro e intestino (ver dilución 1:1000 en la figura 6). Una posible interpretación de estos resultados es que la expresión de *cgh-1a* esté mas restringida a línea germinal manteniendo una expresión en bajos niveles en los demás tejidos, mientras que *cgh-1b* aunque enriquecido en línea germinal y cerebro, tiene un expresión significativa y más extendida al resto de los tejidos somáticos. Interesantemente Cgh-1 no solo forma parte del citoplasma germinal, también se le ha encontrado en los cuerpos de procesamiento (P-bodies) de células somáticas de *C. elegans* (Boag *et al.* 2008). Debido a que los gránulos germinales solo se encuentran en las células germinales, en ovario y testículos, y los cuerpos de procesamiento se encuentran en ambas, células somáticas y células germinales, se podría pensar que *cgh-1a* este formando parte, principalmente de los gránulos germinales, y *cgh-1b* aunque también este presente en estos gránulos, se encuentre en los cuerpos de procesamiento de las células somáticas. Como se discutirá más adelante, estos resultados concuerdan con los obtenidos con las microinyecciones de las proteínas de fusión.

A la par de los estudios de la expresión de los RNAs mensajeros realizamos estudios sobre la expresión de las proteínas Cgh-1a y Cgh-1b, Sin

embargo estos estudios son difíciles de interpretar ya que el anticuerpo con el que disponemos fue diseñado contra una secuencia (DRFNLKGIEEQL) de la región carboxilo terminal de Cgh-1a, que es muy similar en Cgh-1b (DRFNLKGIEDQL). Los ensayos tipo “western blot” de estas proteínas, a lo largo del desarrollo embrionario del pez cebra, muestran que una o ambas proteínas se expresa en ovario y en los estadios de 32 células, domo, 14 somitas. Sin embargo en el estadio de 24 hpf la expresión disminuye drásticamente a los 2 dpf y es casi indetectable a los 3 dpf. Interesantemente en el ensayo “western blot” donde se probó contra diferentes órganos de peces adultos, como son: cerebro, corazón, ojos testículo y ovario, su expresión se encontró restringida a la línea germinal, aunque más enriquecido en el ovario. Este resultado no necesariamente contrasta con los obtenidos por RT-PCR, que muestran una expresión consistente de ambos mensajeros a lo largo del desarrollo, ya que la técnica de RT-PCR es más sensible que los análisis de “western blot” y en los RT-PCR basta con que exista poca cantidad de templado de un mRNA para amplificar la expresión de este y lograr ver una banda. Si por alguna razón el anticuerpo solamente reconociera a Cgh-1a esto explicaría el porque aparece este patrón de expresión en el “western blot”, sin embargo hasta el momento no tenemos ninguna evidencia de que eso ocurra.

Cabe la posibilidad de que el RNA de estas proteínas estén presentes en las células somáticas pero bajo un estricto control post-transcripcional, de manera que la traducción ocurra solo bajo ciertas condiciones o estímulos. Por ejemplo, se ha estudiado la formación de complejos de RNAs y proteínas que se forman bajo ciertas condiciones de estrés, a estos complejos se les ha llamado “gránulos de estrés”, y se ha visto que contienen a la proteína CGH-1 (Wilczynska *et al.*, 2005).

Uno de los experimentos realizados en este trabajo consistió en realizar inmunotinciones en embriones completos para identificar los órganos o tejidos en donde se expresan las proteínas Cgh-1 de pez cebra, aún cuando no podemos diferenciar entre las formas 1a y 1b, debido a que el anticuerpo posiblemente reconozca a ambas. Las inmunotinciones en larvas de 2 dpf muestran que esta proteína se expresa en un grupo de células que

coinciden en posición de las CGPs en este estadio, sin embargo con este experimento no podemos afirmar que realmente una o ambas de las proteínas Cgh-1 estén presentes en las CGPs ya que no fue posible hacer una co-localización con el marcador de células germinales Dnd, debido a que ambos anticuerpos fueron producidos en conejo. Por otro lado si se corrobora este resultado respaldaría lo encontrado en los análisis de “western blot” donde también la expresión se restringe a la línea germinal.

Con las proteínas de fusión se obtuvieron datos interesantes, ya que su expresión fue diferencial. La microinyección del mRNA que codifica para proteína CGH-1a-GFP se expresó en un grupo de células, en una zona que coincide con la ruta de migración de las CGPs. Sin embargo este resultado no es contundente ya que es necesario demostrar que efectivamente se trata de CGPs. Aun así, esto parece respaldar lo que encontramos tanto en los “western blot” como con las inmunotinciones. Por otro lado, la microinyección del mRNA que codifica para proteína CGH-1b-GFP se observó, que tiene una expresión a lo largo de todo el cuerpo del pez, y al parecer, esta expresándose en focos discretos alrededor de los núcleos, como se ha descrito para los cuerpos de procesamiento, los cuales también contienen a la proteína CGH-1 (Navarro *et al.* 2001). Al igual que en el caso de la proteína CGH-1a-GFP es indispensable confirmar si realmente se trata gránulos de RNA, en este caso, cuerpos de procesamiento.

Como estrategia para establecer la función de la proteína Cgh-1a se empleó un morfolino (RNA antisentido modificado) que bloquea su expresión durante el desarrollo. El bloquear la expresión de *cgh-1a* mediante su morfolino causa un retraso en el desarrollo del pez cebra. A pesar de lo observado no se puede afirmar que este retraso en el desarrollo realmente se deba a la inyección del morfolino de *cgh-1a* ya que se sabe que en algunos casos la inyección de un morfolino activa la expresión del gen *p53* y como respuesta induce la apoptosis en los embriones (Robu *et al.* 2007), por lo anterior se debe repetir este experimento inyectando al mismo tiempo el morfolino de *p53* para impedir su activación y observar si este fenotipo se debe solamente a bloquear la traducción de *cgh-1a*.

BIBLIOGRAFÍA

- Akao, Y., Seto, M., Yamamoto, K., Lida, S., Nakazawa, S., Inazawa, J., Abe, T., Takahashi, T., and Ueda, R. (1992). The RCK gene associated with t(11;14) translocation is distinct from the MLL/ALL-1 gene with t(4;11) and (11;19) translocations. *Cancer Res* 52, 6083-7.
- Amikura R, Hanyu K, Kashikawa M, Kobayashi S, (2001) Tudor protein is essential for the localization of mitochondrial RNAs in polar granules of *Drosophila* embryos. *Mech Dev* 107: 97- 104.
- Amores, A., Force, A., Yan, Y.-L., Joly, L., Amemiya, C., Fritzy, A., Ho, R.K., Langeland, J., Prince, V., Wang, Y.-L. (1998). Zebrafish hox clusters and vertebrate genome evolution. *Science*. 282: 1711–1714.
- Anderson P, Kedersha N. (2006) RNA granules. *J Cell Biol*. Mar 13;172(6):803-8.
- Beis D, Stainier DY. (2006) In vivo cell biology: following the zebrafish trend. *Trends Cell Biol*. Feb;16(2):105-12.
- Bergkessel, M., and Reese, J. C. (2004) An essential role for the *Saccharomyces cerevisiae* DEAD-box helicase DDH1 in G1/S DNA-damage checkpoint recovery. *Genetics* 167, 21-33.
- Blaser H, Eisenbeiss S, Neumann M, Reichman-Fried M, Thisse B, Thisse C, Raz E. (2005) Transition from non-motile behaviour to directed migration during early PGC development in zebrafish. *J Cell Sci*. 1;118(Pt 17):4027-38.
- Blaser H, Reichman-Fried M, Castanon I, Dumstrei K, Marlow FL, Kawakami K, Solnica-Krezel L, Heisenberg CP, Raz E. (2006) Migration of zebrafish primordial germ cells: a role for myosin contraction and cytoplasmic flow. *Dev Cell*. 11(5):613-27.
- Boag PR, Atalay A, Robida S, Reinke V, Blackwell TK. (2008). Protection of specific maternal messenger RNAs by the P body protein CGH-1 (Dhh1/RCK) during *Caenorhabditis elegans* oogenesis. *J Cell Biol*. Aug 11;182(3):543-57.

- Carré D, Djediat C, Sardet C. (2002) Formation of a large Vasa-positive germ granule and its inheritance by germ cells in the enigmatic Chaetognaths. *Development*. 129(3):661-70.
- Chen E, Ekker SC. Zebrafish as a genomics research model. (2004) *Curr Pharm Biotechnol*. Oct;5(5):409-13.
- Dahm R, Geisler R. Learning from small fry: the zebrafish as a genetic model organism for aquaculture fish species. (2006). *Mar Biotechnol (NY)*. Jul-Aug;8(4):329-45.
- de la Cruz J, Kressler D, Linder P. (1999) Unwinding RNA in *Saccharomyces cerevisiae*: DEAD-box proteins and related families. *Trends Biochem Sci*. May;24(5):192-8.
- Ekker SC. Morphants: a new systematic vertebrate functional genomics approach. (2000). *Yeast*. Dec;17(4):302-306.
- Extavour CG, Akam M. (2003) Mechanisms of germ cell specification across the metazoans: epigenesis and preformation. *Development*. Dec;130(24):5869-84.
- Hashimoto Y, Maegawa S, Nagai T, Yamaha E, Suzuki H, Yasuda K, Inoue K. (2004) Localized maternal factors are required for zebrafish germ cell formation. *Dev Biol*. Apr 1;268(1):152-61.
- Horner VL, Wolfner MF. (2008) Mechanical stimulation by osmotic and hydrostatic pressure activates *Drosophila* oocytes in vitro in a calcium-dependent manner. *Dev Biol*. 1;316(1):100-9.
- Houston DW, King ML. Germ plasm and molecular determinants of germ cell fate. (2000) *Curr Top Dev Biol*. 50:155-81.
- Kane D. A. (1999). Cell cycles and development in the embryonic zebrafish. *Methods Cell Biol*. 59; 11-26.
- Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF. (1995) Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn*. Jul;203(3):253-310.
- Kimura A, Onami S. (2005) Computer simulations and image processing reveal length-dependent pulling force as the primary mechanism for *C. elegans* male pronuclear migration. *Dev Cell*. 8(5):765-75

- Kloc M, Dougherty MT, Bilinski S, Chan AP, Brey E, King ML, Patrick CW Jr, Etkin LD. (2002) Three-dimensional ultrastructural analysis of RNA distribution within germinal granules of *Xenopus*. *Dev Biol.* Jan 1;241(1):79-93.
- Knaut H, Steinbeisser H, Schwarz H, Nüsslein-Volhard C. An evolutionary conserved region in the *vasa* 3'UTR targets RNA translation to the germ cells in the zebrafish. (2002) *Curr Biol.* 12(6):454-66.
- Knaut H, Werz C, Geisler R, Nüsslein-Volhard C; Tübingen 2000 Screen Consortium. (2003). A zebrafish homologue of the chemokine receptor *Cxcr4* is a germ-cell guidance receptor. *Nature.* Jan 16;421(6920):279-82.
- Köprunner M, Thisse C, Thisse B, Raz E. A zebrafish *nanos*-related gene is essential for the development of primordial germ cells. (2001) *Genes Dev.* 15(21):2877-85.
- Kosaka K, Kawakami K, Sakamoto H, Inoue K. Spatiotemporal localization of germ plasm RNAs during zebrafish oogenesis. (2007) *Mech Dev.*124(4):279-89.
- Lin MD, Jiao X, Grima D, Newbury SF, Kiledjian M, Chou TB. (2008) *Drosophila* processing bodies in oogenesis. *Dev Biol.* Oct 15;322(2):276-88.
- Linder P. Dead-box proteins: a family affair--active and passive players in RNP-remodeling. (2006). *Nucleic Acids Res*;34(15):4168-80.
- Little SC, Mullins MC. (2004) Twisted gastrulation promotes BMP signaling in zebrafish dorsal-ventral axial patterning. *Development.* Dec;131(23):5825-35.
- Maegawa S, Yasuda K, Inoue K. Maternal mRNA localization of zebrafish *DAZ*-like gene. (1999) *Mech Dev.* 81(1-2):223-6.
- Matsumoto K, Kwon OY, Kim H, Akao Y. (2005) Expression of *rck/p54*, a DEAD-box RNA helicase, in gametogenesis and early embryogenesis of mice. *Dev Dyn*, 233: 1149-1156.
- Minakhina S, Steward R. Axes formation and RNA localization. (2005) *Curr Opin Genet Dev.* 15(4):416-21.

- Minshall N, and Standart N. (2004) The active form of Xp54 RNA helicase in translational repression is an RNA-mediated oligomer. *Nucleic Acids Res.* 32: 1325- 1334.
- Minshall N, Kress M, Weil D, Standart N. (2009). Role of p54 RNA helicase activity and its C-terminal domain in translational repression, P-body localization and assembly. *Mol Biol Cell.* May;20(9):2464-72.
- Nakamura A, Amikura R, Hanyu K, Kobayashi S. (2001) Me31B silences translation of oocyte-localizing RNAs through the formation of cytoplasmic RNP complex during *Drosophila* oogenesis. *Development.* Sep;128(17):3233-42.
- Nasevicius, A. and S.C. Ekker, Effective targeted gene 'knockdown' in zebrafish. (2000) *Nat Genet.*, 26(2): p. 216-220.
- Navarro, R. E., and Blackwell, T. K. (2005). Requirement for P granules and meiosis for accumulation of the germline RNA helicase CGH-1. *Genesis* 42, 172-80
- Navarro, R. E., Shim, E. Y., Kohara, Y., Singson, A., and Blackwell, T. K. (2001). Cgh-1, a conserved predicted RNA helicase required for gametogenesis and protection from physiological germline apoptosis in *C. elegans*. *Development* 128, 3221-32.
- Noble SL, Allen BL, Goh LK, Nordick K, Evans TC. (2008) Maternal mRNAs are regulated by diverse P body-related mRNP granules during early *Caenorhabditis elegans* development. *J Cell Biol.* Aug 11;182(3):559-72.
- O'Connor MN, Salles II, Cvejic A, Watkins NA, Walker A, Garner SF, Jones CI, Macaulay IC, Steward M, Zwaginga JJ, Bray SL, Dudbridge F, de Bono B, Goodall AH, Deckmyn H, Stemple DL, Ouwehand WH; Bloodomics Consortium. (2009). Functional genomics in zebrafish permits rapid characterization of novel platelet membrane proteins. *Blood.* May 7;113(19):4754-62.
- Patton EE, Zon LI. (2001) The art and design of genetic screens: zebrafish. *Nat Rev Genet.* Dec;2(12):956-66.
- Pelegri F, Knaut H, Maischein HM, Schulte-Merker S, Nüsslein-Volhard C. (1999) A mutation in the zebrafish maternal-effect gene *nebel* affects

- furrow formation and vasa RNA localization. *Curr Biol.* 16-30;9(24):1431-40.
- Pickart MA, Sivasubbu S, Nielsen AL, Shriram S, King RA, Ekker SC. Functional genomics tools for the analysis of zebrafish pigment. (2004). *Pigment Cell Res.* Oct;17(5):461-70.
- Raz E, Reichman-Fried M. Attraction rules: germ cell migration in zebrafish. (2006). *Curr Opin Genet Dev.* 16(4):355-9.
- Reinsch S, Gönczy P. Mechanisms of nuclear positioning. (1998). *J Cell Sci.* 111 (Pt 16):2283-95.
- Robu ME, Larson JD, Nasevicius A, Beiraghi S, Brenner C, Farber SA, Ekker SC. p53 activation by knockdown technologies. (2007) *PLoS Genet.* May 25;3(5):e78.
- Santos AC, Lehmann R. (2004). Germ cell specification and migration in *Drosophila* and beyond. *Curr Biol.* Jul 27;14(14):R578-89.
- Sardet C, Prodon F, Dumollard R, Chang P, Chênevert J. (2002). Structure and function of the egg cortex from oogenesis through fertilization. *Dev Biol.* 241(1):1-23.
- Schlueter PJ, Peng G, Westerfield M, Duan C. (2007). Insulin-like growth factor signaling regulates zebrafish embryonic growth and development by promoting cell survival and cell cycle progression. *Cell Death Differ.* 14(6):1095-105.
- Seydoux G, Braun RE. Pathway to totipotency: lessons from germ cells. (2006) *Cell.* 1;127(5):891-904.
- Seydoux, G., Mello, C. C., Pettitt, J., Wood, W., Priess, J., Fire, A. (1996). Repression of gene expression in the embryonic germ lineage of *C. elegans*. *Nature* 382, 713-716.
- Sharma D, Kinsey WH. (2008). Regionalized calcium signaling in zebrafish fertilization. *Int J Dev Biol.*;52(5-6):561-70.
- Silverman E, Edwalds-Gilbert G, Lin RJ. (2003) DExD/H-box proteins and their partners: helping RNA helicases unwind. *Gene.* Jul 17;312:1-16.
- Standart N, Minshall N. Translational control in early development: CPEB, P-bodies and germinal granules. (2008) *Biochem Soc Trans.* Aug;36(Pt 4):671-6.

- Strasser MJ, Mackenzie NC, Dumstrei K, Nakkrasae LI, Stebler J, Raz E. (2008) Control over the morphology and segregation of Zebrafish germ cell granules during embryonic development. *BMC Dev Biol.* May 28;8:58.
- Taylor J, S. Braasch I. Frickey T. (2003). Genome Duplication, a Trait Shared by 22,000 Species of Ray-Finned Fish. *Genome Res.* 13: 382-390
- Teixeira D, Sheth U, Valencia-Sanchez MA, Brengues M, Parker R. (2005). Processing bodies require RNA for assembly and contain nontranslating mRNAs. *RNA.* Apr;11(4):371-82.
- Theusch EV, Brown KJ, Pelegri F. Separate pathways of RNA recruitment lead to the compartmentalization of the zebrafish germ plasm. (2006). *Dev Biol.* 1;292(1):129-41.
- Tseng-Rogenski SS. Chong JL, Thomas CB, Enomoto S, Berman J, Chang TH. (2003) Functional conservation of Dhh1p, a cytoplasmic DExD7H-box protein present in large complexes. *Nucleic Acids Res* 31: 4995-5002.
- Veldman MB, Lin S. Zebrafish as a developmental model organism for pediatric research. (2008). *Pediatr Res.* 64(5):470-6.
- Weidinger G., Stebler J., Slanchev K., Dumstrei K., Wise C., Lovell-Badge R., Thisse C., Thisse B., Raz E. (2003). dead end, a novel vertebrate germ plasm component, is required for zebrafish primordial germ cell migration and survival. *Curr Biol.* Aug 19;13(16):1429-34.
- Wilczynska, A., C. Aigueperse, M. Kress, F. Dautry, and D. Weil. (2005). The translational regulator CPEB1 provides a link between dcp1 bodies and stress granules. *J. Cell Sci.* 118:981–992.
- Wolke U., Weidinger G., Köprunner M., Raz E. (2002). Multiple levels of posttranscriptional control lead line-specific gene expression in the zebrafish. *Curr Biol.* Feb 19;12(4):289-94.
- Wong MD, Jin Z, Xie T. Molecular mechanisms of germline stem cell regulation. (2005) *Annu Rev Genet.*;39:173-95.
- Wylie, C. (1999) Germ cells. *Cell* 96:165-174.
- Yoon C, Kawakami K, Hopkins N. Zebrafish vasa homologue RNA is localized to the cleavage planes of 2- and 4-cell-stage embryos and is

expressed in the primordial germ cells. (1997) *Development*.
124(16):3157-65.

Zeitelhofer M, Macchi P, Dahm R. (2008) Perplexing bodies: The putative
roles of P-bodies in neurons. *RNA Biol.* Oct-Dec;5(4):244-8.