



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular

Función de RhoA en la localización del plasma germinal en el
pez cebra

T E S I S

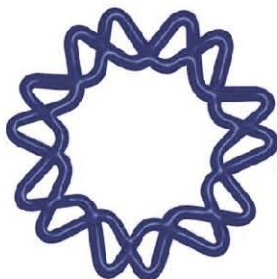
Que para obtener el título de:

Maestro en Ciencias Bioquímicas

Presenta:

Jerónimo Roberto Miranda Rodríguez

Tutora: Dra. Denhí Schnabel Peraza



Cuernavaca, Morelos

2012



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

¡Muchas gracias a todos!

Resumen

La determinación de la línea germinal en el pez cebra requiere la acumulación, durante la ovogénesis (el proceso de formación de un óvulo), de RNAs y proteínas específicos en un organelo sin membrana que recibe el nombre de plasma germinal. Luego de la fertilización, el plasma germinal migra y se localiza en la región distal de los primeros dos septos de división celular, lo cual es esencial para la especificación de las células germinales primordiales (las células que darán lugar a los gametos). La localización correcta del plasma germinal se logra gracias a la interacción dinámica entre microtúbulos y microfilamentos impulsados por motores moleculares como la miosina.

Propusimos a la proteína Rho-GTPasa RhoA como una importante molécula coordinadora de la dinámica del citoesqueleto responsable de la migración del plasma germinal puesto que hay evidencia de que RhoA regula la polimerización de filamentos de actina y la contractilidad de la miosina, tanto durante la gastrulación de pez cebra como en diferentes líneas celulares en cultivo. La miosina está localizada en los primeros septos de división celular durante la embriogénesis temprana del pez y nuestros experimentos de inmunotinción confirmaron la localización de RhoA a estas mismas estructuras en las mismas etapas del desarrollo. Marqué componentes del plasma germinal durante la ovogénesis: a *nanos* mRNA, por medio de hibridaciones *in situ*, o bien, a la actina polimerizada por medio de una tinción con faloidina fluorescente. Vi que en las primeras etapas de la ovogénesis, RhoA colocaliza con el plasma germinal. Cuando inhibí específicamente la actividad de RhoA inyectando la exoenzima C3 en embriones recién fertilizados, se alteró la migración de al menos un componente del plasma germinal (el mRNA del gen *nanos*) en los septos de división.

Concluimos que RhoA colocaliza con el plasma germinal durante la ovogénesis y que la migración y localización del plasma germinal durante las primeras divisiones celulares es dependiente de la actividad de RhoA.

Índice general

Agradecimientos	I
Resumen	III
Índice de figuras	VI
Índice de tablas	IX
1. Introducción	1
1.1. El plasma germinal	1
1.2. El plasma germinal en el pez cebra	4
1.3. Las Rho-GTPasas y el transporte de RNAs mensajeros	8
2. Antecedentes	10
3. Hipótesis y Objetivos	12
3.1. Hipótesis	12
3.2. Objetivos	12
4. Metodología	13
4.1. Cuidado de los peces y recolección de embriones	13
4.2. Inmunofluorescencia en cortes de ovario	13
4.2.1. Soluciones	14
4.3. Inmunohistoquímica en cortes de ovario	16
4.4. Inmunofluorescencia en embriones completos	17
4.5. Gel para proteínas y <i>Western blot</i>	18
4.5.1. Purificación de proteínas	18
4.5.2. Preparación del gel	18
4.5.3. Transferencia de proteínas	18
4.5.4. Inmuno	19
4.5.5. Revelado	19
4.5.6. Soluciones	19
4.6. Ensayo de competencia de anticuerpo anti-RhoA con péptido	20
4.7. Clonación de fragmentos de mRNA y síntesis de sondas	22
4.7.1. Extracción de RNA	22
4.7.2. Síntesis de cDNA	22

4.7.3.	PCR	23
4.7.4.	Clonación del producto de PCR en un plásmido	24
4.7.5.	Preparación de células competentes y transformación	24
4.7.6.	Síntesis de sondas de RNA marcadas con digoxigenina	26
4.7.7.	Medios de cultivo y <i>buffers</i>	26
4.8.	Hibridación <i>in situ</i> en embriones u ovarios completos	27
4.9.	Hibridaciones <i>in-situ</i> para detección de <i>nanos</i>	29
4.10.	Hibridación <i>in situ</i> en cortes de ovario.	29
4.11.	Inyección de toxina C3	31
4.12.	Análisis estadístico	32
5.	Resultados	33
5.1.	Localización de RhoA durante la ovogénesis y colocalización con el plasma germinal	33
5.2.	Localización de RhoA en embriones de 1, 2 y 4 células	36
5.3.	Inyecciones de C3, inhibidor de RhoA, en embriones	37
6.	Discusión	44
6.1.	Resumen	44
6.2.	RhoA y el plasma germinal en la ovogénesis	45
6.3.	RhoA y el plasma germinal luego de la fertilización	48
7.	Conclusiones	51

Índice de figuras

1.1. Estrategia experimental de Illmensee y Mahowald en 1974 para transplante del plasma germinal en embriones de <i>Drosophila melanogaster</i>	2
1.2. Determinación de la línea germinal en <i>Caenorhabditis elegans</i>	3
1.3. Esquematización de la migración del plasma germinal durante la ovogénesis y la embriogénesis temprana en el pez cebra	7
1.4. Papel del citoesqueleto en la translocación del plasma germinal durante las dos primeras divisiones celulares del pez cebra.	8
4.1. Inmunofluorescencia en cortes de ovario probando diferentes bloques	15
4.2. Localización de RhoA en cortes de ovario revelada con diaminobenzidina	17
4.3. Intensidad de pixeles en un ensayo de competencia del anticuerpo anti RhoA	21
4.4. Competencia de anticuerpo anti-Rho en gel de proteínas	21
4.5. Mapa del plásmido TOPO	26
4.6. Hibridación <i>in-situ</i> contra <i>nanos</i> mRNA	29
5.1. La expresión de RhoA en ovocitos sugiere un gradiente	34
5.2. Colocalización del plasma germinal y RhoA en ovocitos	35
5.3. Colocalización de <i>nanos</i> y RhoA en cortes seriados de ovocitos	35
5.4. Patrón de localización de RhoA en embriones de 1 a 4 células, inmunofluorescencia.	36
5.5. Defectos en la embriogénesis con inyecciones de C3 a IC 3.3 nM.	38
5.6. Mortalidad en embriones inyectados con C3	39
5.7. Porcentaje de embriones con desarrollo normal o anómalo en los experimentos de inyección	41
5.8. Localización de <i>nanos</i> en embriones control e inyectados con C3	42
5.9. Clasificación de embriones en normales o anormales basado en la distribución del mRNA <i>nanos</i>	43
5.10. Cuantificación de embriones con distribuciones normales o anormales del mRNA <i>nanos</i>	43

6.1. Cortes histológicos adyacentes y colocalización en la nube mitocondrial	46
6.2. Resumen de eventos en los que la habilidad de RhoA para controlar al citoesqueleto puede ser importante para la dinámica del plasma germinal.	50

Índice de tablas

1.1. RNAs mensajeros y proteínas presentes en el plasma germinal del pez cebra. Adaptado de la revisión de [Ewen-Campen et al., 2010]	5
1.2. Etapas de la ovogénesis en pez cebra	6
4.1. Oligos utilizados para la clonación de fragmentos génicos a partir de cDNA.	24

1

Introducción

1.1. El plasma germinal

En la mayoría de los animales hay una clara distinción entre las células germinales, que sirven para la reproducción del organismo, y las células somáticas, como neuronas, hepatocitos y el resto de las células del cuerpo, que cumplen una multitud de funciones. Todas las células germinales de un animal descienden de las células germinales primordiales (CGP) cuyo destino se determina temprano en el desarrollo del organismo. Las CGP migran a las gónadas del embrión donde recibirán señales de proliferación y diferenciación hacia gametos. Las CGP guardan una gran incógnita pues son una población celular comprometida a dar lugar únicamente a los gametos pero a la vez tienen la capacidad de ser totipotenciales. Según la hipótesis que se ha articulado para explicar este fenómeno, el determinante para el destino germinal inhibe los genes necesarios para entrar en otros linajes celulares. Por lo tanto, convertirse en una CGP sería el destino por defecto de una célula totipotencial que no se compromete a ningún otro destino celular (Revisado por [Wylie, 1999]). Se conocen dos estrategias para decretar la segregación de las CGP: la primera estrategia es utilizada por mamíferos y salamandras; las CGP son inducidas por interacciones intercelulares durante la etapa de gastrulación. Podemos llamar a esta estrategia la de los factores embrionarios porque involucra genes transcritos por el genoma del embrión, en contraste con la segunda estrategia: la estrategia de los factores maternos (genes expresados durante la ovogénesis) es utilizada por los organismos *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta), *Caenorhabditis elegans* (nematodo), *Xenopus laevis* (rana africana) y *Danio rerio* (pez cebra), entre otros. Esta estrategia se basa en la producción de RNA's mensajeros y proteínas, por parte de la madre, que son depositados en sus ovocitos dentro de una región citoplásmica conocida como plasma germinal. Luego de la fertilización, las células a las que se segrega el plasma germinal durante las primeras divisiones celulares son las que se convertirán en las CGP [Gilbert, 2010]. El plasma germinal se identificó por primera vez en embriones de la mosca de la fruta. El núcleo del cigoto de

este organismo se divide 13 veces sin citocinesis de por medio de modo que el embrión es un sincicio al principio de su desarrollo. Los núcleos migran hacia la periferia del embrión y entonces comienza la celularización. Se sabe que las células germinales se forman después de la celularización en el polo posterior del embrión. Illmensee y Mahowald, en 1974 [Illmensee and Mahowald, 1974], transplantaron una porción de citoplasma del polo posterior de un embrión donador en la etapa de sincicio, a un embrión receptor en la misma etapa del desarrollo. El trasplante se realizó al polo anterior, donde no se desarrollan normalmente células germinales. No obstante, el embrión receptor sí desarrolló células germinales en este lugar, lo cual llevó la conclusión de que el citoplasma en el polo posterior contiene el determinante de la línea germinal (ver Figura 1.1).

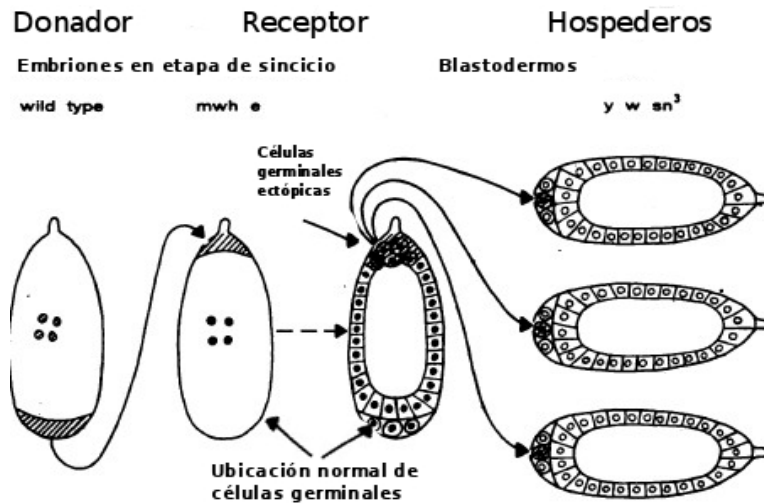


Figura 1.1. Estrategia experimental de Illmensee y Mahowald en 1974 para trasplante del plasma germinal entre embriones de *Drosophila melanogaster*. Se transplantó plasma polar desde el polo posterior del embrión donador, al polo anterior del receptor (zonas sombreadas), durante la etapa de sincicio. En el paso a la etapa de blastodermo se forman células alrededor de los núcleos. Las células que se formaron en el lugar del trasplante presentaban una morfología muy similar a las células germinales silvestres. Posteriormente, las células ectópicas se transplantaron a embriones hospederos donde se vio que generaban gametos viables [Illmensee and Mahowald, 1974].

El plasma germinal es visible como gránulos densos en electrones en imágenes de microscopía electrónica. En el nemátodo, estos gránulos, conocidos como gránulos P, se localizan en el polo posterior del embrión unicelular. La primera división celular da como resultado un blastómero anterior, somático, y un blastómero posterior, conocido como P1, que contiene los gránulos P, es decir, el plasma germinal. En las tres siguientes divisiones celulares, el plasma germinal se segrega sólo a uno de los dos blastómeros dando como resultado a P2,

P3, y P4, cada uno descendiente del anterior y heredero del plasma germinal. Las células descendientes de P4: Z3 y Z2, segregan ambas los gránulos P y son las fundadoras de la línea germinal (Revisado en [Ikenishi, 1998]) (ver también Figura 1.2).

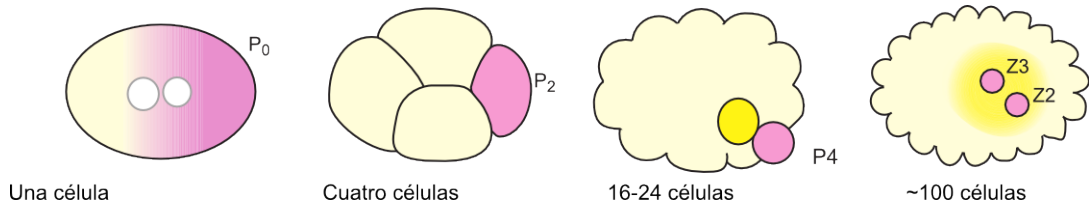


Figura 1.2. Determinación de la línea germinal en *Caenorhabditis elegans*

En la etapa de una célula, incluso antes de la fusión de los dos núcleos, el plasma germinal (morado) se estabiliza preferentemente en el polo posterior. La primera división resulta en el blastómero P_1 capturando la mayor parte del plasma germinal. El plasma germinal se segrega asimétricamente en la siguiente división dando como resultado P_2 en la etapa de cuatro células. Este proceso continúa hasta la división de P_4 que no es asimétrica respecto a la distribución del plasma germinal y da como resultado a Z2 y Z3, precursoras de la línea germinal (En la etapa de 100 células). Figura tomada de [Nakamura and Seydoux, 2008].

Esta visión tradicional, ha sido puesta en duda recientemente por la caracterización de una mutante en la cual los gránulos P se desintegran antes de la mitosis y sus componentes no se segregan asimétricamente. A pesar de esto, los gránulos vuelven a formarse durante la interfase únicamente en el blastómero germinal (P_2 , P_3 y P_4). Los embriones mutantes son fértiles; indicando que la segregación asimétrica de los gránulos P puede ser consecuencia y no causa de la determinación de la línea germinal por otros medios [Gallo et al., 2010].

En el ovocito de la rana, el plasma germinal también se manifiesta como un material electrodenso, granular, al que se le puso el nombre de *nuage* (nube) cuando se observó por primera vez. El plasma germinal colocaliza con la nube mitocondrial (también conocida como cuerpo de Balbiani), una estructura con una gran concentración de mitocondrias y fibrillas, adyacente al núcleo. La nube mitocondrial está implicada en un sistema de transporte de RNA's mensajeros conocido como la vía METRO (messenger transport organizer). Este sistema se encarga de transportar al polo vegetal del ovocito varios RNA's, entre ellos los transcritos del plasma germinal de la rana (Revisado en [King et al., 2005]). De esta manera, el plasma germinal y la nube mitocondrial migran juntos hacia el polo vegetal del embrión; ahí se segregan a todos los blastómeros durante las primeras dos divisiones celulares. La tercera división celular es perpendicular al polo animal-vegetal y segrega por primera vez cuatro blastómeros germinales en el polo vegetal y cuatro blastómeros somáticos en el polo animal (Revisado por [Ikenishi, 1998]).

En embriones de pez cebra, durante la etapa de cuatro células, el *nuage* electrodenso se localiza en la región distal de los septos de división celular. Inoue y sus colaboradores, en 2004, constataron que esa región corresponde al plasma

germinal, pues luego de retirarla observaron una disminución considerable en el número de células germinales [Hashimoto et al., 2004] (Ver Figura 1.3).

1.2. El plasma germinal en el pez cebra

Se han identificado varias de las moléculas implicadas en la determinación de la línea germinal en diferentes organismos modelo. Estas moléculas se han encontrado localizadas en el plasma germinal de los organismos en que se forma, como el pez cebra. Entre las moléculas que conforman el plasma germinal en pez cebra se encuentran los RNA's mensajeros de *vasa*, *nanos*, *tudor*, *dazl* y *dead-end*. En este trabajo no nos concentramos en la función de estos genes. Sin embargo, mencionamos, por ser interesantes, sus características comunes: se traducen sólo en momentos determinados del desarrollo de las células germinales, codifican para proteínas de unión a RNA y funcionan en la degradación de mensajeros, impiden la expansión de retrotransposones o la traducción de proteínas; lo cual apoya la hipótesis de la formación de células germinales por inhibición de los genes de otros destinos celulares. También es interesante que hay homólogos de estos genes en organismos que no poseen plasma germinal, por ejemplo, el ratón y el humano, y que estos homólogos también están implicados en la determinación de la línea germinal (Tabla 1.1).

El origen materno de los componentes del plasma germinal implica que se producen durante la ovogénesis; por ello es importante e interesante ahondar un poco en esta etapa del desarrollo.

La ovogénesis del pez cebra está dividida en cinco etapas definidas por criterios bioquímicos y morfológicos (Tabla 1.2). En las primeras cuatro etapas las principales características del ovocito son la gran actividad transcripcional, la enorme cantidad de nucleolos y de actividad endocítica, y que están orientados al crecimiento y la acumulación de RNA's proteínas y lípidos con el propósito de convertirse en un óvulo maduro, una gran célula (750 μm), con una rica organización interna, capaz de contender con el estrés osmótico y dar lugar a un nuevo organismo [Lessman, 2009] y [Selman et al., 1993].

En la etapa I del desarrollo del ovocito, puede encontrarse a los transcritos de *dazl*, *vasa* y *nanos* en una zona muy definida del ovocito: la nube mitocondrial del pez cebra, que parece ser una estructura homóloga a la nube mitocondrial (o cuerpo de Balbiani) en los ovocitos de la rana africana. Es muy interesante que tanto en la rana como en el pez cebra, la formación y migración del cuerpo de Balbiani y el establecimiento del eje animal-vegetal son interdependientes, es decir, mutantes que afectan la formación del cuerpo de Balbiani también son deficientes en el establecimiento del eje animal-vegetal. La determinación del eje animal-vegetal es la primera asimetría que se produce en el desarrollo de estos organismos [Nojima et al., 2010]. Siguiendo con la ovogénesis en el pez cebra, en la etapa II, la nube mitocondrial se desintegra en el polo vegetal y la distribución de los RNA's *vasa* y *nanos* se vuelve un gradiente a lo largo del ovocito, con una menor concentración en el polo animal. En la etapa III los RNA's parecen anclarse a la corteza del ovocito; *dazl* y *nanos* localizan en una franja estrecha

<i>RNA</i> o Proteína	Función de la proteína codificada	Distribución filogenética
<i>vasa</i>	Codifica una helicasa de RNA dependiente de ATP , por lo que podría participar en la regulación traducional.	Se han encontrado ortólogos en la mayoría de animales estudiados.
<i>nanos</i>	Codifica una proteína con un dominio dedo de zinc CCHC que une RNA con alta afinidad pero baja especificidad	Se han encontrado ortólogos en la mayoría de animales estudiados
<i>tudor</i>	Las proteínas con dominios Tudor interactúan con residuos metilados de arginina y lisina de proteínas diversas, así como la maquinaria que metila esos residuos. Un ejemplo son las proteínas de la familia PIWI, implicadas en la contención de transposones en la línea germinal.	Pez cebrá, mosca de la fruta y ratón.
<i>dead-end</i>	Probablemente funge como protectora de RNAs contra degradación	Pez cebrá, rana africana, gallo, y ratón
<i>daz-like</i>	Se sabe poco sobre su función salvo que une RNA	Pez cebrá, rana, mosca, ratón, humano
<i>askopos</i>	Posee un dominio de unión a ATP pero parece hacer honor al significado de su nombre en griego: sin propósito	Pez cebrá
<i>brul</i>	Tanto el RNA como la proteína se encuentran en el plasma germinal. Múltiples dominios de unión a RNA	Pez cebrá, ctenophoros, planaria, mosca de la fruta
<i>granulito</i>	Morfolinos contra el gen no presentan ningún fenotipo	Vertebrados
Ziwi	Proteína de la familia argonauta. Asociada con piRNAs, una clase de RNAs pequeños, su rol como silenciadora de elementos transponibles en la línea germinal es indispensable para la fertilidad.	Se han encontrado ortólogos en la mayoría de animales estudiados
Buckyball	Proteína cuya localización es necesaria y suficiente para la formación de células germinales. Su papel parece estar relacionado con la agregación de los componentes del plasma germinal.	La proteína se encuentra en el plasma germinal del pez cebrá.
Hermes	Proteína de unión a RNA involucrada en la vía METRO de transporte de RNAs en ovocitos de rana	Pez cebrá, rana africana, ratón, humano.

Tabla 1.1. RNAs mensajeros y proteínas presentes en el plasma germinal del pez cebrá. Adaptado de la revisión de [Ewen-Campen et al., 2010]

Etapa	Diámetro μ m	Características
IA Crecimiento primario (fase pre-folículo)	7 - 20	Acumulación de nucleolos alrededor de la vesícula germinal (núcleo).
IB Crecimiento primario (fase de folículo)	20 -140	Aparición de cromosomas descondensados y aumento en la actividad transcripcional. Ovocito transparente. Formación del cuerpo de balbiani o nube mitocondrial adyacente a la vesícula germinal
II Alveolos corticales	140 - 340	Se observan hasta 1500 nucleolos involucrados en la síntesis de RNA ribosomal. Aparición de alveolos corticales, agregados de proteínas y carbohidratos, que opacan la vesícula germinal
III Vitelogénesis	340-690	Alveolos corticales se mueven a la periferia. Acumulación de vitelogenina y lípidos
IV Maduración	690-730	Migración de la vesícula germinal al polo vegetal del ovocito y liberación del primer cuerpo polar (meiosis)
V Óvulo	730-750	Liberación del óvulo maduro

Tabla 1.2. Etapas de la ovogénesis en pez cebra

en la corteza del polo vegetal; mientras que el mensajero de *vasa* se encuentra en un patrón similar pero por toda la corteza del ovocito [Kosaka et al., 2007]. Los RNAs mensajeros permanecen anclados a la corteza durante la maduración del ovocito y hasta la fertilización. La etapa V de la ovogénesis marca la maduración y liberación del óvulo. En contacto con el agua, el óvulo se activa y cambia su organización interna. Contracciones de los microfilamentos de actina en el polo animal provocan el transporte del ooplasma por medio de corrientes axiales con dirección al polo animal (Revisado en [Pelegri, 2003]). Gracias a las corrientes axiales, los RNA's del plasma germinal, que se encontraban anclados en el polo vegetal del ovocito, ya se encuentran en el polo animal en el momento de las primeras divisiones celulares (Figura 1.3). La excepción es el transcrito de *dazl*, que al momento de la fertilización permanece enriquecido en el polo vegetal del óvulo y migra posteriormente por una ruta dependiente de microtúbulos, a lo largo de la corteza del ovocito [Theusch et al., 2006]. Los RNAs de *vasa*, *nanos*, y *dead-end*, entre otros, que constituyen lo que se ha denominado como plasma germinal animal por su localización al momento de la fecundación, se desplazan hacia la periferia del blastodisco (blastodisco es el nombre que se le da a la célula y luego a la capa de células que dará lugar al embrión, diferenciándolas del vitelo) y a la vez son concentrados en bandas definidas durante las primeras divisiones celulares, de manera que para la etapa de cuatro células toman su característica localización distal en los septos de división celular. El plasma germinal animal forma gránulos que parecen estar asociados a filamentos de actina. Se hipotetiza que el plasma germinal animal es desplazado hacia la periferia por la acción de los microtúbulos astrales que están formándose durante la división celular. En este modelo, los microtúbulos astrales empujan hacia la periferia a

los filamentos de actina a los cuales está asociado el plasma germinal en forma de gránulos RNA-proteína [Theusch et al., 2006]. Otro conjunto de microtúbulos, el arreglo de microtúbulos del septo (FMA, por *furrow microtubule array*), está asociado a la compactación de la banda del plasma germinal. El FMA es un arreglo de microtúbulos que se encuentran a ambos lados del septo de división, perpendiculares a éste y paralelos entre si. Los microtúbulos del FMA sufren una reorganización, dependiente de miosina, enriqueciéndose e inclinándose hacia la región distal del septo. Esto coincide temporal y espacialmente con la compactación del plasma germinal (Figura 1.4). Aunque la función primordial del FMA parece ser el transporte de vesículas hacia las membranas en formación durante la división celular, se propone que ha sido aprovechado para la agregación del plasma germinal [Lindeman and Pelegri, 2010].

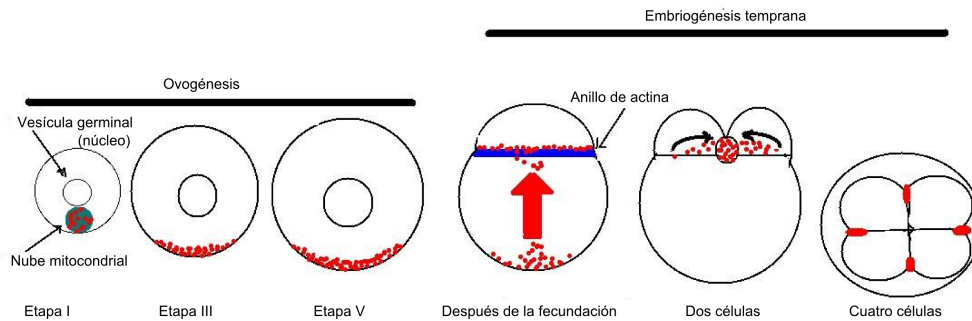


Figura 1.3. Esquemmatización de la migración del plasma germinal durante la ovogénesis y la embriogénesis temprana. Los mRNA's del plasma germinal se muestran como puntos rojos. El polo vegetal está orientado hacia abajo y el polo animal hacia arriba excepto en la etapa de cuatro células en la que se muestra una vista desde el polo animal. En la Etapa I de la ovogénesis el plasma germinal está asociado a la nube mitocondrial, formando un cúmulo conocido como cuerpo de Balbiani, adyacente al núcleo. Los mRNAs del plasma germinal se asocian a la corteza a partir de la etapa III. Luego de la fertilización, los mRNAs se translocan a la primera célula y durante las primeras divisiones celulares se concentran en cuatro puntos en los límites entre las células.

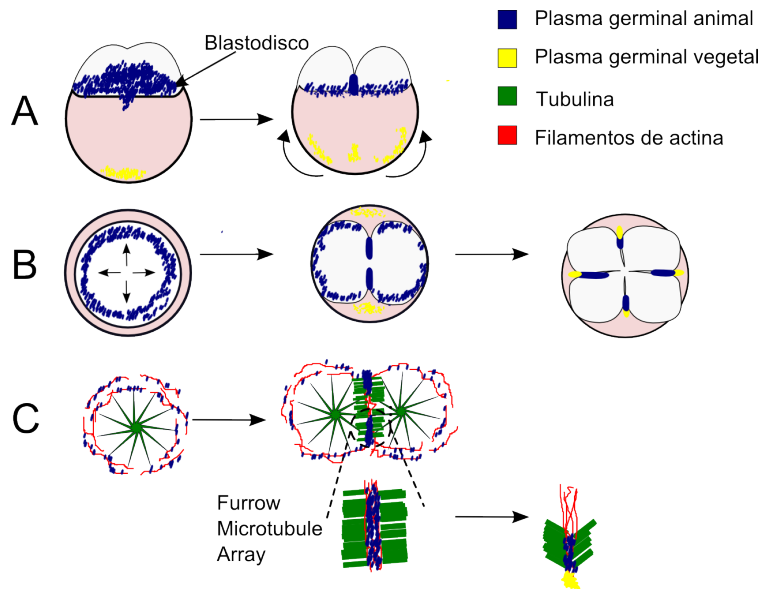


Figura 1.4. Papel del citoesqueleto en la translocación del plasma germinal durante las dos primeras divisiones celulares. (A) Vista lateral. La translocación del plasma germinal animal (azul) al blastodisco antecede a la del plasma germinal vegetal (amarillo). (B) Vista animal. Los agregados de RNA tienen un patrón circular que va excluyéndose del centro y a partir de la primer división celular se enriquece en los septos de división celular. (C) La misma perspectiva que (B) pero mostrando las estructuras del citoesqueleto relevantes. Los gránulos de plasma germinal se encuentran asociados a filamentos de actina que a su vez son excluidos hacia la periferia, por acción de los microtúbulos (verde). Durante las primeras divisiones celulares, la compactación del plasma germinal coincide con la remodelación del arreglo de microtúbulos del septo *Furrow Microtubule Array*, también en color verde (Basado en [Lindeman and Pelegri, 2010])

1.3. Las Rho-GTPasas y el transporte de RNAs mensajeros

Las Rho-GTPasas son una familia de proteínas pequeñas que participan como reguladores de múltiples procesos celulares, tales como la remodelación del citoesqueleto, la apoptosis, regulación génica y el establecimiento de polaridad celular. Se dice que actúan como “interruptores” porque ciclan entre un estado inactivo, en unión a GDP y un estado activo, en unión a GTP. En su estado activo pueden reconocer a sus efectores y uniéndose a ellos, generar una respuesta hasta que el GTP se hidroliza, momento en que la asociación GTPasa-efector se disuelve. En mamíferos, la familia de las Rho-GTPasas está compuesta por 16 miembros, pero sólo de tres se dispone de una buena cantidad de información funcional: Rac1, CDC42 y RhoA. Estudios en varios tipos celulares de mamíferos, en moscas de la fruta, nemátodos y levadura muestran que

Rac1, CDC42 y RhoA conectan a receptores de la membrana con el ensamblaje de estructuras de actina-f (Revisado en [Etienne-Manneville and Hall, 2002]). Cdc42 y Rac1 se han encontrado formando parte de complejos con proteínas del citoesqueleto (tubulina, tau, actina e internexina) y la proteína Staufén de mamífero [Villace et al., 2004]. Staufén participa en el transporte de RNAs en el desarrollo temprano en la mosca de la fruta y en neuronas de organismos adultos [Czaplinski and Singer, 2006]. Todo lo anterior sugiere que Cdc42 y Rac1 pueden formar parte de complejos de transporte de RNAs. RhoA ha sido implicada en la localización, independiente de microtúbulos, de RNAs mensajeros en pseudopodios de células tumorales a través de su efector Rho cinasa (ROCK), que unida a RhoA-GTP (forma activa) promueve la actividad de la miosina II [Stuart et al., 2008]. Otro trabajo indica que la vía de señalización RhoA-ROCK \rightarrow miosina II promueve el transporte del RNA mensajero de la β -actina hacia el frente de migración de fibroblastos en cultivo [Latham et al., 2001]. La localización depende de una secuencia *zipcode* en la región 3' no traducida (3' UTR), la cual es reconocida por proteínas específicas. El complejo RNA-proteínas resultante es transportado sobre los filamentos de actina por la actividad motora de la miosina II. A menudo, las regiones no traducidas del extremo 3' UTR de muchos mensajeros son señales en *cis*, necesarias y suficientes para su localización. La región 3' UTR de *Xcat2*, el gen homólogo de *nanos* en la rana, es suficiente para guiar la localización a la nube mitocondrial del pez cebra, indicando que existe conservación entre las vías de localización de transcritos. Sin embargo, los motivos de secuencia cruciales para la localización de *Xcat2*, 6 repeticiones del pentanucleótido UGCAC, no se han encontrado en los mensajeros del pez cebra [Kosaka et al., 2007].

En el pez cebra se han encontrado 32 homólogos de las Rho-GTPasas de humano y se ha demostrado que son expresadas en el pez adulto o en el embrión. Se encontraron cinco genes homólogos de RhoA: *rhoaa*, *rhoab*, *rhoac*, *rhoad* y *rhoae*; dos homólogos de Rac1: *rac1* y *rac1b*; y cuatro homólogos de CDC42: *cdc42a-SV1*, *cdc42a-SV2*, *cdc42b* y *cdc42c* [Salas-Vidal et al., 2005].

También son relevantes otro tipo de efectores de RhoA: las forminas son proteínas con un dominio FH2, capaces de nuclear filamentos lineales de actina. Se ha demostrado que muchas de ellas actúan como efectoras de las Rho GTPasas [Young and Copeland, 2010]. Cappucino, una formina que en la mosca de la fruta interactúa con Rho, es necesaria para la formación de filamentos de actina necesarios para el anclaje del plasma germinal [Tanaka et al., 2011]. Cappucino también ayuda a provocar las corrientes citoplásmicas en el ovocito y está implicado en la polaridad celular [Young and Copeland, 2010]. Se piensa que la formación del anillo citocinético en animales sucede en dos fases: la polimerización de actina, mediada por forminas (especialmente Dia), y la concentración de miosina II en puntos discretos. Aunque las fases son independientes entre sí, ambas pueden ser promovidas por RhoA, la primera fase a través de Dia, y la segunda a través de ROCK [Pollard, 2010]. También hay estudios que afirman que las forminas, incluyendo a Dia, son capaces de unirse a microtúbulos y filamentos de actina (Revisado en [Bartolini and Gundersen, 2010]).

2

Antecedentes

Empleando inhibidores farmacológicos en embriones de pez cebra, se demostró que RhoA participa en la citocinesis regulando el ensamblaje de la actina y la localización de la beta-catenina por una vía dependiente de ROCK, que podría funcionar a través de la miosina II [Lai et al., 2005].

Otra evidencia en ese sentido viene del patrón de expresión de la proteína RhoA en la etapa de dos y cuatro células: RhoA aparece claramente enriquecida en los septos de división celular mientras que Cdc42 y Rac1 tienen una localización predominantemente citoplásmica durante la misma etapa [Salas-Vidal, comunicación personal]. Esto es congruente con la observación de embriones tempranos de erizo de mar y de rana africana transfectados con GFP fusionada con el fragmento de unión a RhoA de la Rhotekina, que es un efector de RhoA, y permitió ver zonas de alta concentración de RhoA activa en tiempo real: justo antes de la citocinesis se forma alrededor del septo una banda bien definida y relacionada con tal precisión espacial y temporal con la constricción del septo que permite a los autores concluir que RhoA establece la maquinaria citocinética de actina contráctil [Bement et al., 2005] (presumiblemente a través de ROCK).

En la etapa de cuatro células del desarrollo del pez cebra se han aplicado tratamientos a los embriones con blebistatina y ML7, dos drogas que bloquean farmacológicamente la actividad de la miosina II [Urven et al., 2006]. Los resultados son alteraciones en la dinámica y la localización de actina filamentosa, tubulina, β -catenina y el plasma germinal en los septos de división celular. Se observan defectos en la disolución del anillo de contracción de actina, los microtúbulos del arreglo de microtúbulos del septo (FMA) no adoptan una orientación normal con respecto al anillo de división y no se observa localización del plasma germinal en la región distal de los septos de división celular sino en regiones más centrales. Bloquear la actividad de la miosina II no afecta del todo la formación de los primeros septos de división celular, sugiriendo que la localización del plasma germinal y la citocinesis son hasta cierto punto independientes. A pesar de eso, se sabe que la localización correcta del plasma germinal a los septos de división celular en el pez cebra es sensible a errores en la citocinesis: los embriones mutantes *cei* (*cellular island*, una mutación en la cinasa Aurora B) se caracteri-

zan por un septo de división celular acortado, pero aparte de eso normal, en la zona central del primer blastómero. La región distal del septo, donde el plasma germinal es reclutado normalmente, es precisamente la región más sensible a la pérdida de Aurora B. En los mutantes *cei*, el reclutamiento del plasma germinal se reduce o no sucede. No obstante, el plasma germinal que alcanza a ser agregado se recluta en ocasiones a dos puntos en el centro del blastodisco correspondientes a los extremos del septo truncado que se observa en estas mutantes [Yabe et al., 2009]. Otro ejemplo es *nebel*, un pez cebra mutante que presenta defectos en la citocinesis y en la conformación del arreglo de microtúbulos del septo (FMA). Los embriones *nebel* también segregan mal el plasma germinal. Asimismo, desestabilizar los microtúbulos farmacológicamente con nocodazol, después de la fertilización, impide la correcta segregación del plasma germinal a la región distal [Pelegri et al., 1999]. Por otro lado, antes de la fertilización, los ovocitos de pez mutantes en la proteína *microtubule actin crosslinking factor 1* (Macf1) poseen un cuerpo de Balbiani anormalmente agrandado y que no migra hacia el polo vegetal. Macf1 tiene dominios de unión tanto a microfilamentos como a microtúbulos y los mutantes poseen defectos en la distribución de ambas estructuras del citoesqueleto. Esto facilita la suposición de que la migración y ensamblaje del cuerpo de Balbiani dependen de la correcta coordinación entre actina y tubulina [Gupta et al., 2010]. Recordando que el cuerpo de Balbiani es la estructura donde se localizan los mRNAs del plasma germinal durante la ovogénesis temprana, no es aventurado suponer que la coordinación dinámica del citoesqueleto es importante también en la ovogénesis para la migración del plasma germinal.

Las mitocondrias también están íntimamente relacionadas con el cuerpo de Balbiani. En células en cultivo de mamífero y de mosca se ha implicado a RhoA en la regulación de la velocidad de migración de las mitocondrias y su anclaje al citoesqueleto. Sin embargo, la acción parece ser a través de su otro efector, Diaphanous/mDia, una formina cuya actividad promueve la polimerización de microfilamentos de actina así como la estabilización de microtúbulos. Otros organelos aparte de las mitocondrias no son afectados por la inhibición de RhoA de acuerdo a este estudio [Minin et al., 2006].

En un estudio reciente se ha descubierto que Rho1, el homólogo de RhoA en la mosca, está enriquecido en el polo posterior de los embriones de este organismo. Recordando que el polo posterior es el lugar donde se localiza el plasma germinal de la mosca, los autores proponen que Rho1 pudiera ser quien estimula la formación en el polo posterior de los filamentos de actina de los que se piensa que son responsables del anclaje del plasma germinal [Tanaka et al., 2011].

3

Hipótesis y Objetivos

3.1. Hipótesis

Se propone que RhoA, remodelando del citoesqueleto, es una importante reguladora de la localización del plasma germinal en pez cebra, tanto durante la ovogénesis como durante las primeras divisiones celulares en la embriogénesis temprana.

3.2. Objetivos

- Establecer si existe colocalización de la proteína RhoA y el plasma germinal durante la ovogénesis y el desarrollo temprano en el pez cebra.
- Inhibir la actividad de RhoA en embriones tempranos y caracterizar el efecto sobre la localización del plasma germinal.

4

Metodología

4.1. Cuidado de los peces y recolección de embriones

Los peces adultos se mantienen en una pecera a 28°C, son alimentados tres veces al día, y están sometidos a un ciclo de 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad.

Para obtener embriones, los peces adultos se ponen a cruzar el día anterior y al inicio del ciclo de luz, al día siguiente, se recuperan los embriones de la pecera, se lavan, y se cultivan a 28°C en una incubadora hasta que llegan a la etapa deseada en su desarrollo. Para más información sobre la crianza del pez cebra ver [Westerfield, 1994]

4.2. Inmunofluorescencia en cortes de ovario

Para el seguimiento de los patrones de expresión, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia sobre cortes de ovario, de la siguiente manera:

- Los ovarios se fijan con solución MEMFA durante al menos 12 horas, a 4°C.
- Se pasan a gradientes sucesivamente mayores de sacarosa hasta llegar a sacarosa al 30%, con el fin de protegerlos del daño por el frío extremo.
- Se incluyen en Tissue-tek (Sakura Finetek), resina que se vuelve sólida a -20°C y que permite hacer cortes en el microtomo crióstato.
- Los cortes se adhieren a un cubre objetos (Corning) y se secan en una campana de vacío durante media hora. Pueden guardarse a -20°C.
- Para proseguir con el experimento, los cortes se permeabilizan bañándolos en acetona durante 20 minutos.

- Se bloquean con solución de bloqueo durante dos horas a temperatura ambiente.
- Posteriormente se agrega el anticuerpo primario diluido 1/500 vol/vol en la misma solución de bloqueo, donde se incuban a 4°C durante toda la noche.
- Antes de agregar el anticuerpo secundario se lavan tres veces con PBS para quitar el exceso de anticuerpo primario.
- El anticuerpo secundario está acoplado al fluoróforo alexa 488. Se agrega diluido 1/500 vol/vol en solución de bloqueo.
- Los cortes se montan con glicerol para su observación en el microscopio confocal. Para el control negativo se omite la incubación con anticuerpo primario.

4.2.1. Soluciones

- MEMFA: MOPS (USB) 2.08 g, EGTA 400 μ L de Stock 0.5M, $MgSO_4$ (Sigma) 24 mg, Formalina (Sigma) 10 mL *stock* 37% en 100mL H_2O .
- PBS *stock* 20x: Disolver NaCl (J.T. Baker) 80 g, KCl (USB) 2 g, Na_2HPO_4 heptahidratado (J.T. Baker) 26.8 g, KH_2PO_4 (J.T. Baker) 2.4 g, en 800 mL de H_2O ; ajustar el pH a 7.4 con HCl 1M; ajustar el volumen a 1 L de H_2O
- Probamos dos soluciones de bloqueo distintas:
 1. Solución de albúmina de suero bovino, fracción V (USBiological) 3%, suero de cabra en PBS 1x.
 2. Solución de albúmina de suero bovino, fracción V (USBiological) 1%, Tritón X-100 (Sigma) al 0.5% y gelatina de pescado al 0.45% (Sigma) en PBS 1X.

Ambas soluciones dieron resultados muy similares en cuanto a fluorescencia y señal de fondo (Ver Figura 4.1). En los siguientes experimentos utilizamos únicamente la solución de bloqueo con albúmina y gelatina de pescado.

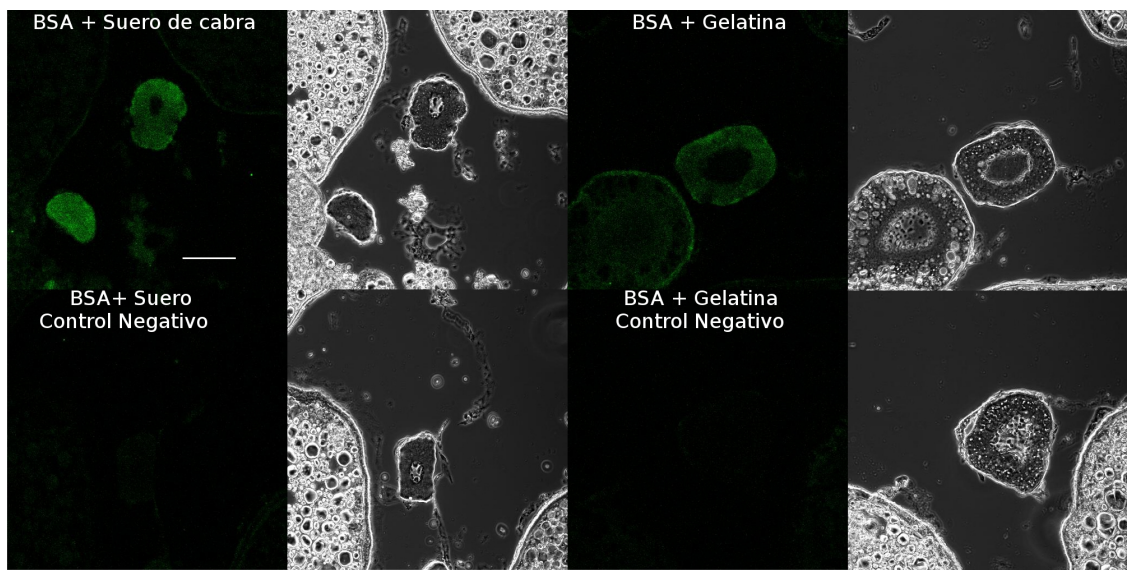


Figura 4.1. Inmunofluorescencia (Alexa 488 anti-conejo) en cortes de ovario con diferentes bloqueos. Bloqueo con BSA 3% y suero de cabra (Columnas de la izquierda) y con BSA 1%, tritón X100 y gelatina de pescado (Columnas de la derecha). La fila superior muestra la señal utilizando el anticuerpo anti-RhoA, la fila inferior muestra la señal en ausencia del anticuerpo primario. Barra: 100 μm .

4.3. Inmunohistoquímica en cortes de ovario

Para esta técnica utilizamos un kit de Vector Laboratories: *Ready to Use Vectastain Universal Quick Kit*. Este kit provee de anticuerpos, sueros y enzimas diluidos de antemano. También posee un sistema de amplificación de la señal que lo hace altamente sensible: el anticuerpo secundario tiene incorporadas varias moléculas de biotina. La enzima peroxidasa, responsable en última instancia de la cantidad de señal, está ligada a estreptavidina que a su vez se une de forma prácticamente irreversible a la biotina. De este modo un solo anticuerpo secundario puede tener varias peroxidasas adosadas.

- Los cortes al crióstato, luego de ser deshidratados y almacenados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ se enjuagan brevemente en agua de la llave y luego en PBS 1x.
- Los cortes se incuban por alrededor de 10 minutos en suero de bloqueo
- Por una hora se incuban con anticuerpo primario diluido 1/500 vol/vol en PBS con 1.5 % de suero de bloqueo.
- Se lavan las laminillas por 5 minutos en PBS 1x.
- Se incuban las laminillas en anticuerpo secundario biotinilado por 10 minutos.
- Se lavan las laminillas por 5 minutos en PBS 1x.
- Se incuban las laminillas en el reactivo estreptavidina/peroxidasa por 5 minutos.
- Se lavan las laminillas por 5 minutos en PBS 1x.
- Se incuban las secciones en Diamino benzidina, sustrato de la peroxidasa hasta que la coloración llegue a la intensidad deseada (aproximadamente dos minutos).
- Se enjuagan las laminillas con agua de la llave y se montan para su observación (Figura 4.2).

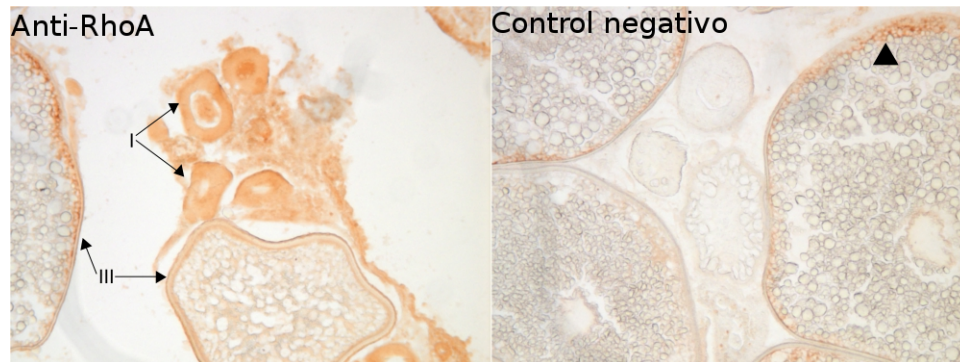


Figura 4.2. Localización de RhoA en cortes de ovario revelada con diamino-benzidina En los ovocitos del estadio I, los más pequeños, se puede ver la localización de RhoA en el citoplasma; por el contrario, en los ovocitos más grandes (estadio III), RhoA solo se concentra en la membrana. Los ovocitos que fungieron como control negativo no se tiñeron excepto por una franja en la periferia de los ovocitos en estadio III que suponemos representa tinción inespecífica (cabeza de flecha).

4.4. Inmunofluorescencia en embriones completos

- Los embriones en la etapa del desarrollo deseada se fijan en paraformaldehído al 4% a 4°C durante una noche.
- Los embriones se lavan 3 veces por cinco minutos con PBS 1x, para quitar el paraformaldehído
- Los embriones deben decorionarse con fórceps finos y bloquearse al menos 3 horas en solución de bloqueo (PBS 1X, Tritón 0.1% y gelatina de pescado 0.45%).
- Posteriormente, se incuban con solución de bloqueo que contiene el anticuerpo primario (conejo anti-RhoA, Santa Cruz Biotechnology) en una concentración 1/100 vol/vol, a 4°C por toda la noche y con agitación ligera.
- Al día siguiente, los embriones se lavan en solución de bloqueo y se incuban por lo menos una hora con un anticuerpo fluorescente (alexa 488 anti-conejo, Invitrogen) en la misma concentración.
- Luego de lavarse de nuevo se montan en glicerol para su observación en el microscopio confocal (Zeiss LSM 510 META).

4.5. Gel para proteínas y *Western blot*

4.5.1. Purificación de proteínas

- Luego de decorionar los embriones, suspenderlos en solución de lisis.
- Agitar a 4 °C durante 1 hora.
- Centrifugar a velocidad máxima durante 10 minutos.
- Tomar alícuotas y guardar las muestras a - 20 °C para cuantificar proteínas.
- Agregar amortiguador de muestra y poner en baño maría durante 5 minutos.
- Pasar a hielo inmediatamente.
- Centrifugar a velocidad máxima a 4 °C 10 minutos.
- Tomar el sobrenadante y hacer alícuotas que se guardan a - 20 °C si se utilizaran en un periodo corto, de lo contrario, guardar a -70 °C.

4.5.2. Preparación del gel

- Lavar los vidrios con agua y jabón, con etanol y finalmente con acetona.
- Acomodar los vidrios para el gel y agregar las soluciones de acrilamida para el gel inferior y superior.
- Lavar los pozos con H_2O tres veces y secar con papel Whatman para eliminar burbujas.
- En la cámara de corrida cargar en seco las muestras y llenar la cámara con buffer de corrida frío.
- Correr los geles con el amperaje constante a 50 mA durante el tiempo necesario para la separación de las muestras.

4.5.3. Transferencia de proteínas

- Remojar dos esponjas, dos papeles Whatman y una membrana en blotting buffer.
- Poner una esponja seguida de un papel Whatman, la membrana, el gel, otro papel Whatman y una esponja cuidando de que no se formen burbujas entre los materiales.
- Correr la transferencia, con un hielo en la cámara, a 400 mA por 50 min. en buffer de transferencia.

4.5.4. Inmuno

- Lavar membrana con H_2O para quitar el exceso de buffer.
- Teñir con *Ponceau* para revisar si las proteínas se transfirieron correctamente.
- Lavar con TBST, bloquear con leche 5% diluída en TBST, durante una hora a temperatura ambiente.
- Agregar el anticuerpo primario (conejo anti RhoA, Santa Cruz Biotechnology) diluido 1:1000 en la misma solución de bloqueo a 4°C toda la noche.
- Lavar tres veces con TBST 10 minutos cada vez y agregar el anticuerpo secundario diluido 1:5000 en TBST con leche al 5% durante una hora a temperatura ambiente.
- Lavar tres veces con TBST 10 minutos cada vez.

4.5.5. Revelado

- Eliminar el exceso de TBST
- Hacer una solución 2x de solución #1 de Lumiglo en TBST y mezclar con el mismo volumen de solución #2 en concentración 2x. Incubar la membrana en esta solución durante un minuto.
- Poner la membrana entre dos plásticos lisos y transparentes y poner en contacto con el film, en obscuridad. Dar varios tiempos de exposición, hasta 30 minutos.
- Bañar en el revelador durante 1 minuto. Lavar con H_2O y pasar al fijador durante 1 minuto.
- Lavar con agua y escurrir.

4.5.6. Soluciones

- Solución de lisis, En 10 mL de H_2O : Tris (Invitrogen) 1M pH 7.4 250 μ L, EDTA 0.5M 40 μ L, *Protease inhibitor mix* (Libre de EDTA, Roche) 1 tableta, NP40 25 μ L. Hacer alícuotas de 1 mL y congelar a -20°C.
- Amortiguador de muestra 4x, Stock, Tris (Invitrogen) 0.5M pH 6.8 1.25 mL, SDS 10% 2.3 mL, Glicerol 1mL, β -mercaptoetanol 500 μ L, Azul de bromofenol 0.01 g, disolver en 10 mL de H_2O . Hacer alícuotas y guardar a -20°C.
- Amortiguador de corrida, 500 mL (10x). Tris (Invitrogen) 15.15 g, glicina (Bio-Rad) 74.55 g, SDS (Bio-Rad) 5 g.

- Amortiguador de transferencia, 500mL. Tris (Invitrogen) 1.51 g, glicina (bio-Rad) 7.2 g, metanol (J.T. Baker) 100 mL.
- *Ponceau*, 250 mL. *Ponceau S* (Bio-Rad) 0.25 g, ácido acético 12.5 mL.
- TBS 10x. Diluir en 500 mL H_2O : Tris (Invitrogen) 12.11 g, NaCl (J.T. Baker) 48.83 g.
- TBST. Diluir una parte de TBS 10x en 9 partes de agua y agregar 250 μ L de Tween 20 (Sigma) por cada 500 mL de solución.

4.6. Ensayo de competencia de anticuerpo anti-RhoA con péptido

Para analizar la especificidad del anticuerpo utilizado para detectar la proteína RhoA se llevó a cabo un experimento de inmunofluorescencia en cortes de ovario como se explica en la sección 4.2. Sin embargo, para algunos de los cortes se utilizó un anticuerpo incubado previamente con el péptido de 13 aminoácidos que va del aminoácido 119 al 132 de la proteína RhoA-p21 y que es la secuencia que reconoce el anticuerpo. Las competencias se hicieron con concentraciones molares 10 y 50 veces mayores de péptido que de anticuerpo (1μ L de anticuerpo = 1.33×10^{-12} moles, 1μ L de péptido = 1.33×10^{-9} moles) en 50μ L de agua destilada durante 2 horas y en agitación ligera. Como comparación se incubó la misma cantidad de anticuerpo en ausencia de péptido y 50μ L de agua sin péptido ni anticuerpo. Luego de la incubación, se diluyó cada mezcla en 500μ L de solución de bloqueo y esa solución se utilizó para proseguir con el experimento de inmunofluorescencia. Las imágenes se tomaron con el microscopio confocal. Se subió la intensidad del láser hasta tener una alta fluorescencia del control positivo y se usaron esas condiciones para analizar las siguientes muestras. La cuantificación de la fluorescencia se hizo utilizando el software ImageJ 1.42q. Se cuantificó la fluorescencia del citoplasma de ovocitos en el estadio I. La fluorescencia promedio de las imágenes tomadas del control positivo es más de tres veces mayor que en las imágenes de la competencia (Figura 4.3). Hay una diferencia pequeña entre la fluorescencia de las muestras con 10 x y 50 x de péptido, la fluorescencia de la competencia con 50 x péptido incluso parece mayor a la competencia con 10 x.

Adicionalmente, se bloqueó el anticuerpo anti-RhoA incubándolo con el péptido antigénico en TBST + leche 5%, con una concentración molar del péptido mil veces mayor a la del anticuerpo. El anticuerpo bloqueado y un anticuerpo no bloqueado se utilizaron para un experimento de *Western Blot* como se describió en la sección 4.5, utilizando proteína extraída de embriones de 24 horas de pez cebra. En la Figura 4.4 puede verse el resultado de este experimento que apoya la especificidad de nuestro anticuerpo contra RhoA.

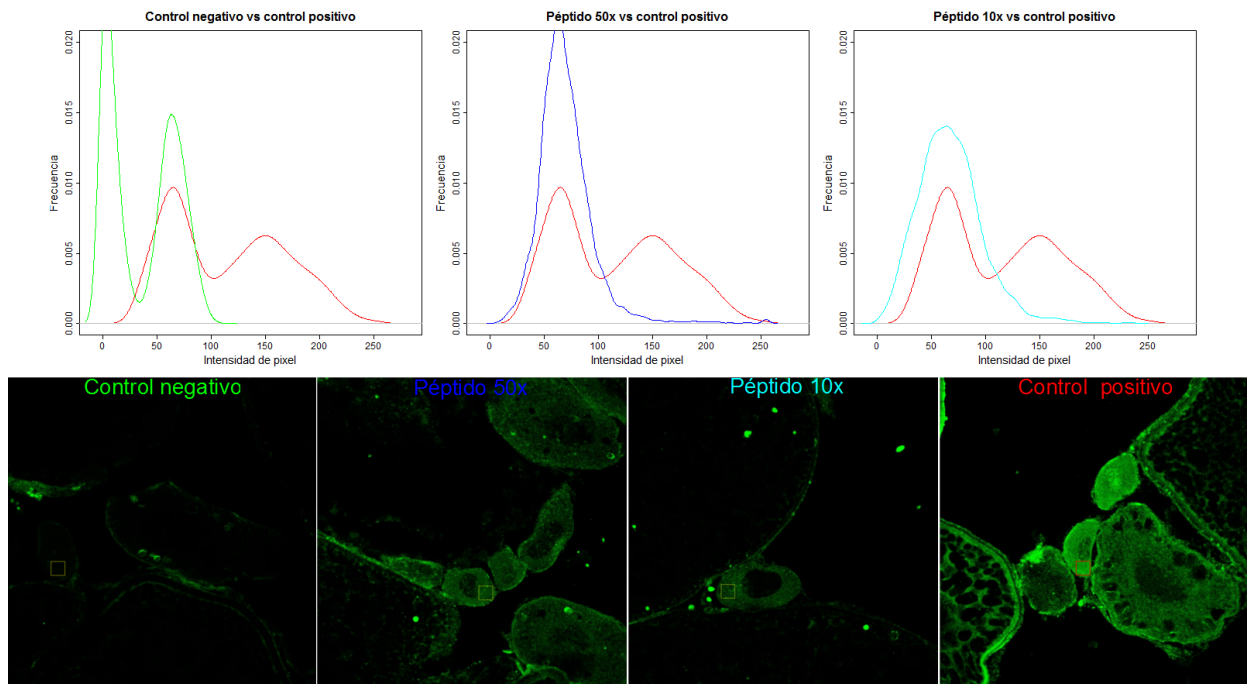


Figura 4.3. Intensidad de pixeles en un ensayo de competencia del anticuerpo anti RhoA Panel Superior. Densidad de la intensidad de los pixeles en las imágenes de fluorescencia. Verde: Control negativo, sin anticuerpo anti-RhoA. Azul: anticuerpo pre-incubado con 50x péptido. Cian: anticuerpo pre-incubado con 10x péptido. Rojo: Control positivo, anticuerpo incubado *sin* péptido. Se comparan todos los tratamientos con el control positivo. Panel inferior. Un pequeño cuadro en las imágenes muestra la región que se cuantificó en cada caso.

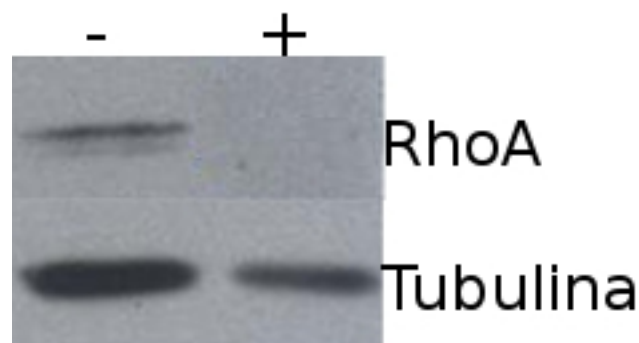


Figura 4.4. Competencia de anticuerpo anti-RhoA en gel de proteínas. Lado izquierdo (-) membrana incubada con anticuerpo en **ausencia** de péptido. Lado derecho (+), membrana incubada con anticuerpo y péptido competidor 1:100. No pudimos detectar señal de RhoA al incubar el anticuerpo con el péptido.

4.7. Clonación de fragmentos de mRNA y síntesis de sondas

4.7.1. Extracción de RNA

- El ovario de pez cebra se homogeneiza dentro de un tubo de microcentrífuga congelado con nitrógeno líquido al que se le agrega 1 mL de TRIzol (Invitrogen).
- El ovario se pipetea con una jeringa hasta disolverlo. El homogeneizado se centrifuga a 12,000 x g por 10 minutos a 4 °C para deshacerse del material insoluble. Esto da como resultado un sobrenadante nítido que contiene al RNA y que se transfiere a un tubo nuevo.
- Para permitir la disociación de complejos ribonucleoprotéicos se incuba el homogeneizado por 5 min de 15 a 30 °C.
- Se añaden 0.2 ml de cloroformo por 1 mL de TRIzol (Invitrogen).
- El tubo se agita vigorosamente con el vórtex por 15 segundos y se incuba de 15 a 30 °C de 2 a 3 min.
- Se centrifuga la muestra a no más de 12,000 x g por 15 min a 4 °C.
- Luego de la centrifugación, la mezcla se separa en una fase orgánica de color rojo y una fase acuosa incolora en la parte superior, donde reside el RNA.
- La fase acuosa se transfiere a un nuevo tubo donde se precipitará el RNA, para conseguirlo se mezcla con 0.5 mL de isopropanol por cada mL de TRIzol usado en la homogeneización inicial.
- Se incuban las muestras de 15 a 30 °C por 10 minutos y se centrifugan a no más de 12,000 x g por 10 min a 4 °C.
- Se retira el sobrenadante y el material sedimentado se lava con etanol al 75 %, mezclándolo con ayuda del vórtex y centrifugando a no más de 7,500 x g por 5 min a 4 °C.
- Para resuspender el RNA se deja secar brevemente el etanol evitando la pérdida completa de humedad pues esto disminuye la solubilidad del RNA. El RNA se solubiliza con agua libre de RNAsas con ayuda de un poco de pipeteo y una incubación a 60 °C por 10 min.

4.7.2. Síntesis de cDNA

A un tubo de microcentrífuga se añade lo siguiente:

- 1 μ L oligo dT (500 μ g/mL) y 50-250 ng de *random primers*

- 3 μg de RNA total
- 1 μL de dNTP *mix* 10 nM
- Aforar a 12 μL con agua estéril.

Calentar la mezcla por 5 minutos a 65 °C y enfriarlas en hielo rápidamente, agregar:

- 4 μL de 5X *First-Strand buffer* [250 mM Tris-HCl (pH 8.3 a temperatura ambiente), 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂]
- 2 μL 0.1M DTT
- 1 μL RNaseOUT inhibidor de ribonucleasa recombinante.

Mezclar suavemente e incubar a 37 °C por 2 minutos. Agregar 1 μL de M-MLV transcriptasa reversa (Invitrogen) e incubar a 25 °C por 10 min. Incubar a 37 °C por 50 min y posteriormente inactivar la reacción calentando a 70°C por 15 min.

4.7.3. PCR

Deseamos ver la localización de los genes *vasa*, *nanos*, *dead-end* y *daz-like* pertenecientes al plasma germinal y de *zorba*, un gen que marca el polo animal durante la ovogénesis. Ya existen sondas reportadas para estos transcritos, pero debido a la falta de información completa sobre la secuencia de las sondas de RNA de *nos1* [Kopranner et al., 2001], *vas* [Yoon et al., 1997] y *dazl* [Maegawa et al., 1999] y que la sonda de *dnd* [Weidinger et al., 2003] se sintetizó a partir de cDNA de pollo, decidimos clonar y sintetizar nuestras propias sondas antisentido a partir de cDNA de ovario de pez cebra. Se diseñaron sondas antisentido para los RNA's de *vasa*, *nanos*, *dead-end*, *daz-like* y *zorba* cuidando que sólo hibriden con una región determinada del RNA blanco. Es importante destacar que estas sondas no son las que han sido reportadas anteriormente y por lo tanto deben ser validadas en experimentos de hibridación *in situ* que reproduzcan los patrones de expresión ya reportados para estos RNA's mensajeros. Las regiones elegidas se amplificaron por PCR. Para una reacción de PCR se coloca en un tubo lo siguiente:

- Buffer 10x: 2.5 μL
- *MgCl₂*: 0.75 μL
- dNTP's: 1 μL
- *Primer* derecho y *Primer* izquierdo (ver cuadro 4.1): 1 μL de cada uno
- *H₂O*: 16.55 μL
- Taq polimerasa (Invitrogen): 0.2 μL

- cDNA: 2 μ L

El programa de PCR utilizado es el siguiente:

- 95 °C 2 min
- 40 ciclos: 95 °C 30 s, Tm °C (ver cuadro 4.1) 30 s, 72 °C 2 min.
- 72 °C 10 min
- 6 °C 10 min

Gene	Primer Izquierdo	Primer Derecho	Tamaño del producto	Tm °C
<i>dazl</i>	gcggtcgattatgtgcac	atcaataccgccgacgaa	493	62
<i>dnd</i>	gtccgaccaccagtgagc	tcggcacaaggtttggat	407	62
<i>nos</i>	acaacggcgagactgagg	cctgtagcgagcctgctg	452	60
<i>vas</i>	gcgtgtccacctgtacc	ttcatcacgggagccaact	402	64
<i>zorb</i>	aggctggaccccagaaac	catgcgtggcttcagttg	493	62

Tabla 4.1. Oligos utilizados para la clonación de fragmentos génicos a partir de cDNA.

4.7.4. Clonación del producto de PCR en un plásmido

Preparación de una reacción de ligación:

- Producto fresco de PCR 2 μ L
- 10X Buffer de ligación 1 μ L
- Vector plasmídico pCRII-TOPO (Invitrogen) 2 μ L
- Aforar con agua estéril a 9 μ L
- Agregar 1 μ L de T4 DNA ligasa para un volumen final de 10 μ L. Incubar la reacción de ligación a 14 °C toda la noche.

Los productos de PCR se insertaron en el plásmido TOPO vector. Este plásmido contiene en cada lado sitios de restricción únicos para varias enzimas y dos promotores opuestos lo cual permite linearizar el plásmido y transcribir la secuencia insertada en ambas direcciones.

4.7.5. Preparación de células competentes y transformación

Preparación de células [Inoue et al., 1990]:

- Inocular una colonia de una caja petri fresca en 5 mL de medio SOB en un matraz y dejar crecer durante el día o toda la noche a 37 °C

- Inocular 200 mL de SOB a un matraz con 1 mL del precultivo.
- Crecer las células con agitación vigorosa (200 - 250 rpm) a 18 °C hasta una OD_{600} de 0.6.
- Pre-enfriar el rotor a 4 °C. Colocar todos el material de plástico y de vidrio en el cuarto frío.
- Colocar en hielo el cultivo y tubos *Falcon* de 50 mL por al menos 10 minutos.
- Transferir el cultivo a 4 tubos de 50 mL pre-enfriados y centrifugar a 3000 rpm por 10 minutos a 4 °C.

Todas las manipulaciones deben llevarse a cabo en el cuarto frío

- Retirar el sobrenadante y resuspender con delicadeza el sedimento en amortiguador de transformación frío en un volumen de 1/3 del volumen original. Incubar por 10 minutos a 4 °C.
- Centrifugar las células a 3000 rpm y resuspenderlas con delicadeza en amortiguador de transformación frío en 1/12 del volumen original. Añadir DMSO a una concentración final de 7% e incubar en hielo por 10 minutos.
- Dividir en alícuotas de 200 μ L en tubos *ependorf* enfriados y congelar inmediatamente en nitrógeno líquido para su almacenamiento a 80 °C.

Transformación:

- Incubar en hielo por treinta minutos 50 μ L de células competentes junto con 2 μ L de reacción de ligación.
- Calentar súbitamente las células a 42 °C por 45 s sin agitar y transferir inmediatamente de vuelta al hielo.
- Agregar 250 μ L de medio S.O.C a temperatura ambiente. Agitar horizontalmente durante una hora a 225 rpm en un agitador horizontal.
- Platear de 10 a 200 μ L de células transformadas en cajas con medio LB sólido con ampicilina (100 μ g/mL) y X-gal.
- Incubar las cajas a 37 °C toda la noche.

El plásmido TOPO contiene el gen *lacZ* que vuelve a las colonias de bacterias de color azul en presencia de X-gal, sin embargo, el sitio de inserción interrumpe la secuencia de *lacZ* (Figura 4.5) por lo cual se seleccionan las colonias blancas que son las que contienen un inserto. Se seleccionaron varias colonias de cada caja y por medio de digestiones con EcoRI se comprobó la presencia de insertos del tamaño deseado. Algunas de estas colonias se seleccionaron para cultivarse de nuevo en medio LB con ampicilina, de este cultivo se extrajo el plásmido con un *kit* de *miniprep* (Qiagen) y se mandó a secuenciar. Las secuencias de DNA obtenidas correspondieron con los genes clonados y también nos permitieron ver la orientación en que insertaron.

4.7.6. Síntesis de sondas de RNA marcadas con digoxigenina

Las muestras de DNA purificado de cada colonia con el inserto de *nanos*, se linearizaron dos veces, una con la enzima HindIII y otra con la enzima XbaI. Se incubaron durante 7 horas a 37°C en presencia de ribonucleótidos marcados con digoxigenina y con las enzimas Sp6 (muestra linearizada con XbaI) o T7 (muestra linearizada con HindIII) para transcribir las sondas antisentido y sentido, respectivamente (Ver mapa en Figura 4.5). Las sondas se purifican utilizando el protocolo de las columnas NucAway Spin de la marca Ambion, se cuantifican y se almacenan a -20°C.

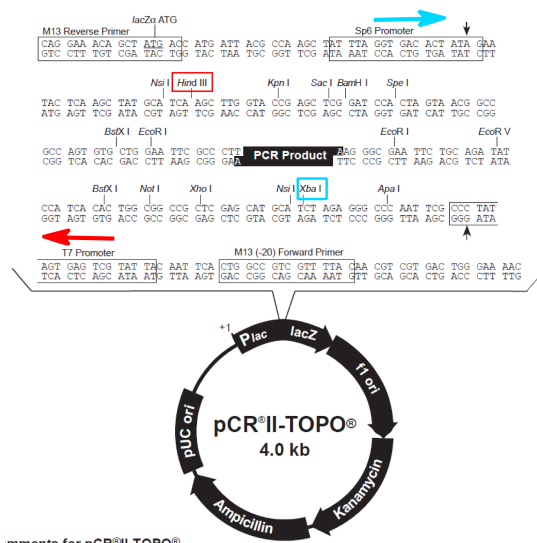


Figura 4.5. Mapa de plásmido TOPO. El plásmido TOPO contiene al gen *lacZ* interrumpido por el sitio de inserción del producto de PCR (ampliación). Los cuadros azul y rojo marcan los sitios de corte. El color se corresponde con el promotor que se utilizó para la transcripción.

4.7.7. Medios de cultivo y buffers

- Medio SOB: 2 % bactotriptona (Becton Dickinson), 0.5 % extracto de levadura (Becton Dickinson), 10 mM NaCl (J. T. Baker), 2.5 mM KCl (USB), 10 mM $MgCl_2$ (J. T. Baker), 10 mM $MgSO_4$.
- Amortiguador de transformación: 10 mM Hepes, 55 mM $MnCl_2$, 10 mM $CaCl_2$ (Sigma), 250 mM KCl.
- Medio LB (Luria-Bertani) A 950 mL de agua desionizada, agregar: 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura y 10 g de NaCl (J. T. Baker). Agitar

hasta disolver. Ajustar el pH a 7.0 con 5 N NaOH. Ajustar el volumen de la solución a 1 L con agua desionizada. Esterilizar por autoclaveado.

- Medio SOC: A 950 ml de agua desionizada añadir: 20 g triptona, 5 g extracto de levadura y 0.5 g de NaCl.
Agitar hasta que se disuelva y añadir 10 mL de una solución 250 mM KCl. Ajustar el pH a 7.0 con NaOH 5N. Ajustar el volumen de la solución a 1 L con agua desionizada y autoclavar. Añadir, cuando se haya enfriado a menos de 60 °, glucosa a una concentración final de 20 mM. Justo antes de usar, agregar 5 mL de una solución 2 M de $MgCl_2$.

4.8. Hibridación *in situ* en embriones u ovarios completos

Todas las soluciones utilizadas para este método se preparan con agua tratada con dietilpircarbonato (DEPC, Sigma) para inhibir la actividad de ribonucleasas. Los embriones se fijan en la etapa deseada en paraformaldehído al 4 %. Se decorionan y se deshidratan transfiriéndolos a soluciones de PBST con concentraciones progresivamente mayores de metanol hasta llegar a metanol al 100 %, en estas condiciones pueden almacenarse por varios meses a -20°C.

1. er Día

- Rehidratación de los embriones. Lavar con 75 %, 50 %, y 25 % metanol en PBST y hacer 4 lavados con PBST 100 % por 5 minutos.
- Para permeabilizar a los embriones se incuban en una solución de proteinasa K (10 μ g/ ml) por 30 segundos, después de este tiempo se fijan rápidamente en paraformaldehído al 4 %.
- Siguen dos lavados con PBST por 5 minutos cada uno.
- Al terminar, los embriones se bañan en solución de prehibridación (50 % formamida de-ionizada, 5X SSC, 0.1 % Tween 20, 50 mg/mL de heparina, 500 mg/mL de tRNA, pH ajustado a 6.0 con 460 μ L de ácido cítrico 1M para 50 mL de solución) por 2 a 5 horas a 70°C.
- La solución se reemplaza con solución de hibridación que es solución de pre-hibridación más 30 a 200 ng de sonda de RNA (cuya síntesis se describe en 4.7), la incubación con la sonda se hace toda la noche a 70°C.

2. do Día

- Lavar con solución de prehibridación sin heparina ni tRNA reemplazándola con SSC 2X progresivamente por medio de lavados con
- Solución de prehibridación al 75 %, SSC 2X 25 %;
- Solución de prehibridación y SSC 2X al 50 %;

- Solución de prehibridación al 25 %, SSC 2X 75 %; y
- 100 % SSC 2 X (Solución stock de SSC 20X: 175.3 g de NaCl (J.T. Baker) y 88.2 g de sal de ácido cítrico trisodio en un 1 litro de agua) por 10 minutos cada uno.
- Hacer dos lavados de 30 minutos con SSC 0.2X. Todos estos lavados se hacen a 70°C.
- Posteriormente se reemplaza el SSC por PBST a temperatura ambiente con lavados 25,50, 70 y 100 % de PBST disuelto en SSC 0.2X.
- Se incuba a los embriones por 3 a 4 horas en solución de bloqueo
- Se incuba toda la noche en solución de bloqueo con anticuerpo anti-digoxigenina a 4°C.

3. er Día

- Se retira el anticuerpo anti-digoxigenina con seis lavados de 15 minutos en PBST a temperatura ambiente.
- Se lava a los embriones en solución AP- (100 mM Tris -HCl, pH 9.5, 100mM NaCl (J.T. Baker) y 0.1 % Tween 20 (vol/vol)) por 15 minutos a temperatura ambiente
- Se prosigue con tres lavados con AP+ (solución AP-, 50 mM $MgCl_2$) por cinco minutos cada uno . Revelado.
- A 10 ml de AP+ se agregan 35 μ l de BCIP y 35 μ l de NBT, esta es la solución de revelado, en ella se sumerge a los embriones protegiéndolos de la luz y monitoreando el proceso de revelado hasta que se alcance el grado deseado de coloración.
- En ese momento, se desecha la solución de revelado y se lava con solución *Stop* (PBST + EDTA 1mM) por 15 minutos 3 veces.
- En este momento los embriones pueden ser retratados bajo el microscopio y en solución *Stop* pueden almacenarse a 4°C por varias semanas.
- A la par de la *in-situ* con la sonda antisentido se sigue un procedimiento idéntico con otro grupo de embriones pero usando una sonda sentido como control negativo [Thisse and Thisse, 2008].
- De manera alterna a la tinción con NBT/BCIP, pueden utilizarse sustratos que se vuelven fluorescentes; nosotros usamos *Fast Red*, de Sigma. Este sustrato, luego de reaccionar con la peroxidasa se vuelve un precipitado insoluble, de color rojo y cuya fluorescencia puede observarse con el mismo set de filtros utilizado para rodamina. El procedimiento para la tinción con *Fast Red* es muy similar al que se utiliza para teñir con NBT/BCIP. La diferencia estriba únicamente en la solución de tinción: se diluyen las sales *Fast-red* TR y Naftol-AS-MX-fosfato en una concentración de 250 y 500 μ g/ml, respectivamente, en amortiguador 100 mM Tris-HCl pH 8.2 + 0.1 % Tween.

La solución *Stop* no necesita EDTA pues la solución de tinción no contiene magnesio [Hauptmann, 2001], [Jowett, 2001].

4.9. Hibridaciones *in-situ* para detección de *nanos*.

Necesitamos validar que la sonda de *nanos* que sintetizamos funciona de manera específica porque está diseñada para reconocer una sección del mRNA mensajero distinta a la de trabajos anteriores (ver sección 4.7). Con ese objetivo en mente, se realizó una hibridación *in situ* con la sonda para el mRNA de *nanos* en embriones completos en la etapa de 4 células como se describió en la sección 4.8. Las imágenes se muestran en la Figura 4.6. Ni la sonda antisentido ni el control negativo muestran tinción de fondo. Además, la localización de *nanos* coincide con lo reportado anteriormente [Koprunner et al., 2001].

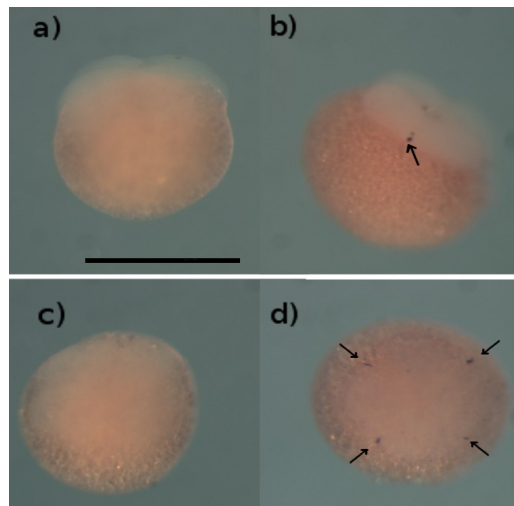


Figura 4.6. Hibridación *in-situ* contra *nanos* mRNA. Con una sonda de RNA con la secuencia de *nanos* a) y c) que no se espera que hibride con ningún RNA endógeno y por lo tanto no se ve ninguna señal. b) y d) Con una sonda anti sentido a *nanos* revela la ubicación de este mRNA del plasma germinal en los septos de división celular (flechas). a) y b) son vistas laterales, polo vegetal hacia arriba, mientras que c) y d) son vistas desde el polo animal. Barra = 1 mm

4.10. Hibridación *in situ* en cortes de ovario.

1. er Día

- Las laminillas con los cortes se sumergen durante tres minutos en agua tratada con DEPC.

- Lavar tres veces por tres minutos en PBS 1x.
- Permeabilizar el tejido con proteinasa K disuelta en PBST en una concentración de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante 20 minutos.
- Reemplazar la proteinasa K con paraformaldehído al 4 %, fijando por 20 minutos a temperatura ambiente.
- Lavar el paraformaldehído con PBST tres veces por tres minutos cada vez.
- Cambiar el paraformaldehído con solución de hibridación “falsa” durante tres minutos.
- Solución de hibridación “falsa”: Formamida 50 %, 0.1 % Tween, 25 % SSC 20X (Solución stock de SSC 20X: 175.3 g de NaCl (J.T. Baker) y 88.2 g de sal de ácido cítrico trisodio en un 1 litro de agua) en H₂O DEPC, agregar ácido cítrico para dar un pH de alrededor de 5.5.
- Demarcar las laminillas, colocarlas horizontalmente sobre una cámara húmeda, libre de RNAsas y agregar 400 μL de solución de hibridación a cada laminilla. Dejar las laminillas de este modo a 55°C por dos horas.
- Solución de hibridación: Solución de hibridación “falsa” más 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de heparina y 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de tRNA.
- Incubar toda la noche a 55°C con sonda RNA-DIG sentido o anti-sentido 0.25 ng por μL de solución de hibridación . Cubrir las laminillas con cubreobjetos libres de RNAsas.

2. do Día

- Quitar la solución de hibridación y los cubreobjetos y lavar con:
 - 100 % solución de hibridación “falsa”, brevemente a 55°C
 - 75 % solución de hibridación “falsa”/25 % 2x SSC, 5 min a 55 °C
 - 50 % solución de hibridación “falsa”/50 % 2x SSC, 5 min a 55 °C
 - 25 % solución de hibridación “falsa”/75 % 2x SSC, 5 min a 55 °C
 - 2x SSC, 10 min a 55 °C
 - 0.2x SSC, dos veces 15 minutos cada una, a temperatura ambiente
 - 75 % 0.2xSSC/25 % PBST, 3 min a temperatura ambiente
 - 50 % 0.2xSSC/50 % PBST, 3 min a temperatura ambiente
 - 25 % 0.2xSSC/75 % PBST, 3 min a temperatura ambiente
 - PBST, 5 min a temperatura ambiente
- Delinear las laminillas con plumón hidrofóbico, colocarlas en la cámara húmeda y bloquear con 400 μL de solución de bloqueo por dos o tres horas a temperatura ambiente.
- Solución de bloqueo: 5 % suero de oveja, 2 mg / mL BSA en PBST.

- Reemplazar la solución de bloqueo con anticuerpo anti-DIG 1:5000 en solución de bloqueo (130 μL). Incubar toda la noche a 4°C.

3. er Día

- Lavar en PBST seis veces por 10 minutos cada una.
- Lavar con solución AP, dos veces 5 minutos cada una a temperatura ambiente
- Incubar laminillas en solución de tinción (NBT/BCIP en solución AP) a temperatura ambiente y a oscuras.
- Monitorear bajo el microscopio luego de treinta minutos y después a intervalos crecientes, el progreso de la tinción.
- Parar la tinción reemplazando la solución de tinción con PBS pH 5.5, lavar con PBS 2-3 veces a temperatura ambiente por 10-30 minutos cada vez.
- Fijar con paraformaldehído al 4% por 1 hora, a oscuras.
- Montar para observar en el microscopio.

4.11. Inyección de toxina C3

- Se crean jeringas de vidrio en un puller horizontal a partir de capilares de vidrio de 10 micras de diámetro.
- Se inyecta una droga inhibidora de RhoA, la exoenzima C3 (Biomol/Enzo) producida por la bacteria *Clostridium botulinum*. Las drogas inyectadas se disuelven en amortiguador de inyección (NaCl (J.T. Baker) 68,5 mM, KCl (USB) 1.35mM, Na_2HPO_4 (J.T. Baker) 5mM y KH_2PO_4 (J.T. Baker) 1mM. Diluimos 50 mg de la toxina en 400 μL para tener un *Stock* en concentración 1 μM . Para la inyección, se colectan los embriones en la etapa de una célula.
- Se acomodan en los surcos hechos en una caja con agarosa. Las jeringas tienen que romperse contra una superficie. Para calcular el volumen aproximado de inyección, se introduce la aguja en aceite mineral, se inyecta y se mide el diámetro de la burbuja formada.
- Los embriones se inyectan con cuidado, perforando el vitelo, no los blastómeros.
- Se inyectaron burbujas de 100 a 150 μm de diámetro. La dilución de la solución inyectada está dada por el cociente entre el volumen del embrión (al que tomamos como una esfera de radio = 700 μm) y el volumen de la burbuja inyectada (a la que igualmente se toma por esférica). El volumen de una esfera está dado por $V = \frac{4\pi r^3}{3}$. Si se inyecta una burbuja de 150 μm de diámetro en un embrión de 700 μm de diámetro, la solución se diluirá $\frac{350^3}{75^3} \approx 101$ veces. Es decir, si inyectamos el *stock* de droga 1 μM , la concentración intracelular será de ≈ 10 nM.

4.12. Análisis estadístico

Las pruebas estadísticas se llevaron a cabo utilizando el *software* R [R Development Core Team, 2011]. Las pruebas utilizadas fueron las de Kruskal-Wallis de suma de rangos y la prueba de Wilcoxon; ambas son pruebas no paramétricas que no requieren que las muestras sigan una distribución normal. La prueba de Kruskal-Wallis es equivalente a una ANOVA y se lleva a cabo con varios grupos al mismo tiempo. El valor p es la probabilidad de que todos los grupos analizados tengan la misma media, por lo tanto, un valor p bajo señala que al menos alguno de los grupos tiene una media distinta a los demás. La prueba de Wilcoxon compara las medias de dos poblaciones y da una probabilidad de que las dos medias sean iguales.

5

Resultados

5.1. Localización de RhoA durante la ovogénesis y colocalización con el plasma germinal

Para establecer si RhoA y el plasma germinal colocalizan durante la ovogénesis empezamos mirando la localización de RhoA en cortes de ovocito por inmunofluorescencia (Metodología 4.2). El patrón de expresión de RhoA esperado para estos experimentos es un gradiente de concentración con una mayor presencia de la proteína en el polo vegetal, que es donde migra el plasma germinal durante la ovogénesis. En algunos cortes se presenta un gradiente muy claramente (Figura 5.1d), en otros se insinúa, pero en muchos ovocitos la expresión de RhoA no parece estar polarizada. Puesto que tomamos el ovario completo, los cortes muestran ovocitos en varias etapas de la ovogénesis y en orientaciones diversas. No podemos descartar que no ver el gradiente en todos los ovocitos se deba a su orientación variable respecto al plano de corte y la dificultad para detectar un gradiente tridimensional en cortes esencialmente bidimensionales.

Se ha reportado que la tinción con faloidina fluorescente puede revelar la localización de la nube mitocondrial o cuerpo de Balbiani en ovocitos de pez cebra en la etapa I [Marlow and Mullins, 2008]. Una co-tinción de la actina y RhoA en cortes muestra que RhoA se localiza en la nube mitocondrial (Figura 5.2). No encontramos ejemplos de ovocitos en los que pudiera verse la nube mitocondrial marcada con actina sin la presencia de RhoA en el mismo lugar, lo cual es una fuerte evidencia de que RhoA colocaliza con la nube mitocondrial y por tanto, con los RNA's asociados al plasma germinal desde las etapas más tempranas de la ovogénesis.

La tinción con faloidina sólo permite marcar al plasma germinal en esta primera etapa de la ovogénesis pero la dinámica de los mRNAs del plasma germinal es más amplia. Para comparar la localización de estos mRNAs con la localización de la proteína RhoA nos vimos obligados a cambiar de inmunofluorescencia a inmunohistoquímica pues la hibridación *in-situ* fluorescente es una técnica que no hemos podido estandarizar aún.

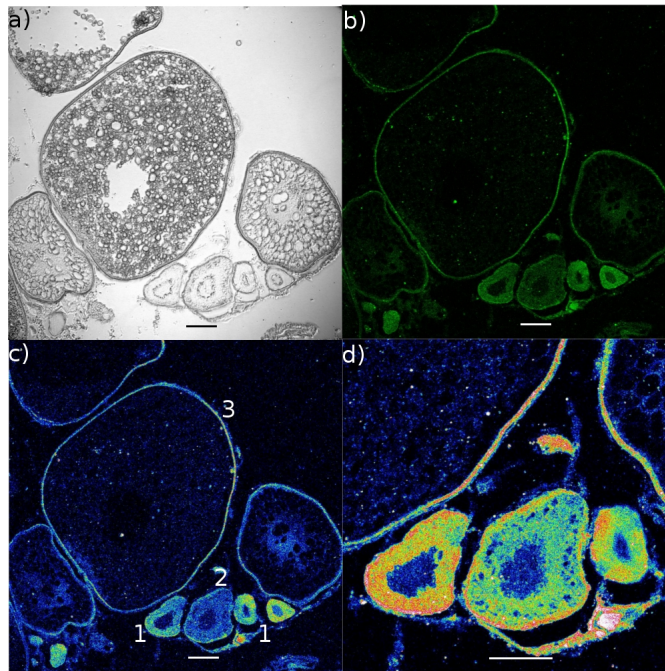


Figura 5.1. La expresión de RhoA en ovocitos sugiere un gradiente. a) Corte de ovario que muestra ovocitos en diferentes etapas de maduración. b) Imagen en fluorescencia del mismo corte. c) La misma imagen con los pixeles codificados según su intensidad: los pixeles de mayor intensidad en colores cálidos y los pixeles menos intensos en azules. La etapa de desarrollo de los ovocitos está marcada con números arábigos por claridad. d) Imagen de los mismos ovocitos en etapas I y II tomada a mayor aumento, con colores falsos para mostrar más claramente el gradiente de intensidad de fluorescencia. Barras: 100 μm .

Hicimos cortes seriados de un ovario para hacer la comparación entre el plasma germinal y RhoA, por medio de una hibridación *in situ* e inmunohistoquímica en cortes sucesivos, los resultados se muestran en la Figura 5.3. Estos resultados apoyan la conclusión obtenida en los experimentos con fluorescencia y los amplían para sugerir que el gradiente de RhoA que habíamos observado con anticuerpos fluorescentes coincide, en efecto, con la expresión de *nanos*, un mRNA importante del plasma germinal (Ver Figura 5.3 C y D). En los ovocitos de las etapas III en adelante, RhoA se localiza en la corteza. En algunos de estos ovocitos, la localización a la corteza se da de manera asimétrica, es decir, en un lado de la corteza la tinción es visiblemente más intensa que en el lado opuesto. La faloidina no sirve como marcador del plasma germinal en estas etapas, localizándose de manera homogénea por toda la corteza. A partir de la etapa III, *nanos* mRNA es difícil de detectar.

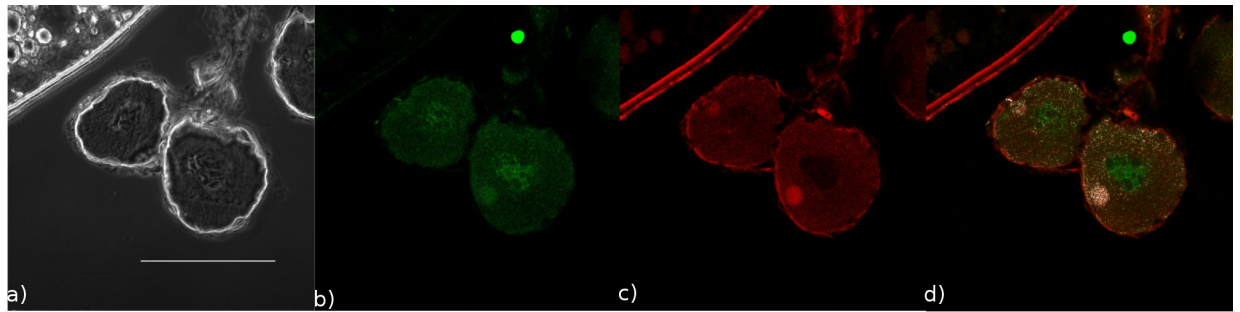


Figura 5.2. Colocalización del plasma germinal y RhoA en ovocitos. a) Corte donde se observan dos ovocitos en etapa I. b) Inmunofluorescencia contra RhoA. c) Tinción de filamentos de actina utilizando faloidina fluorescente. d) Sobrelape de b) y c) donde se han resaltado en blanco los pixeles co-localizados que tienen una mayor intensidad en ambas imágenes. Barra: 100 μm

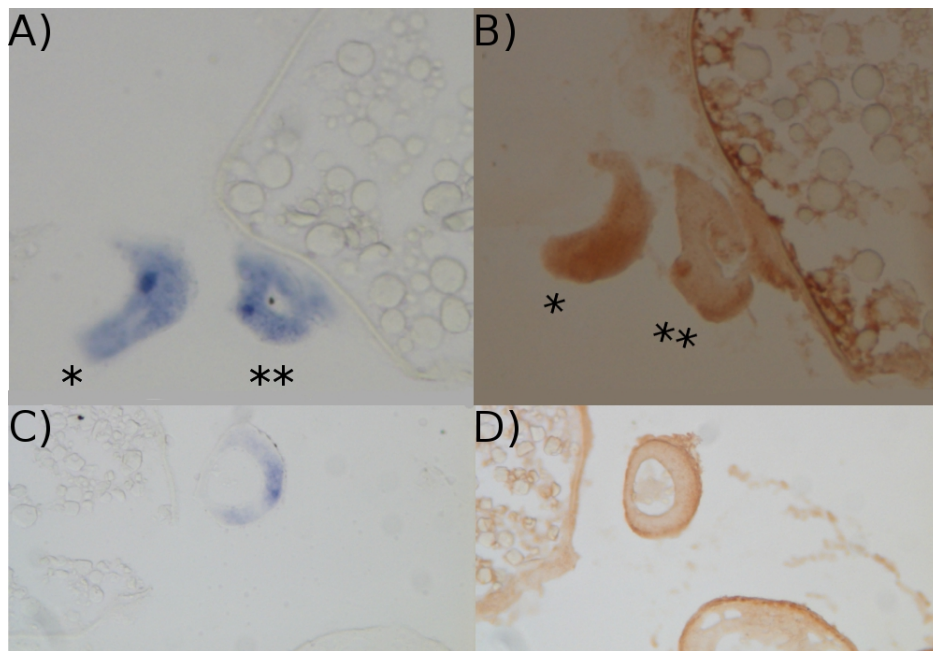


Figura 5.3. Colocalización de *nanos* y RhoA en cortes seriados de ovocitos. A) y C) Localización de *nanos* mRNA. B) y D) Localización de RhoA. El ovocito marcado con ** en A) y B) muestra zonas de mayor intensidad de tinción en ambas figuras, revelando un punto, probablemente la nube mitocondrial, donde *nanos* y RhoA coinciden. El ovocito marcado con * no muestra colocalización porque probablemente el corte en B) ya no corresponde al citoplasma del ovocito como sugiere que no pueda verse el núcleo. El ovocito en el centro de C) y D) muestra mayor intensidad del lado derecho que del izquierdo para ambos marcadores sugiriendo que coinciden en un gradiente.

5.2. Localización de RhoA en embriones de 1, 2 y 4 células

Hicimos inmunotinciones contra RhoA en embriones completos de 1, 2 y 4 células (Metodología 4.4). En los embriones de 1 célula la proteína RhoA se encuentra dispersa por todo el blastómero. En la etapa de 2 células, la proteína se localiza preferencialmente en el primer septo de división celular. En la etapa de 4 células, RhoA se localiza en los dos septos, pero en el septo más corto (presuntamente el primero en formarse), la banda de expresión de RhoA es más ancha y más intensa que en el septo más largo (Ver Figura 5.4). La diferencia en la localización de RhoA en los dos septos es consistente con un papel putativo en la activación de la miosina II, que sólo aparece en un septo de división celular de manera tardía, cuando ya comienza a darse la siguiente ronda de citocinesis [Urven et al., 2006].

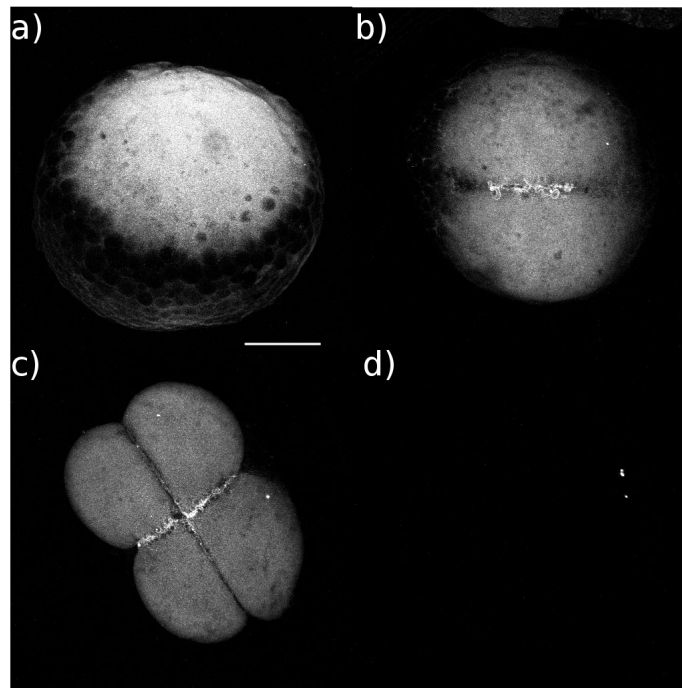


Figura 5.4. Patrón de localización de RhoA en 1 célula (a), 2 células (b) y 4 células (c). Se observa la localización homogénea luego de la fecundación y su posterior enriquecimiento en los septos de división celular. Nótese que en c), la banda de RhoA es más ancha e intensa en el septo más corto (Septo horizontal). Control negativo (d). Las imágenes son proyecciones de máxima intensidad de varios cortes en el confocal. Barra: 200 μm

5.3. Inyecciones de C3, inhibidor de RhoA, en embriones

Para conocer el efecto de RhoA sobre el transporte de los mRNAs del plasma germinal se inhibió la actividad de esta proteína inyectando la toxina C3 (Metodología 4.11). C3 es una toxina producida por la bacteria *Clostridium botulinum*; tiene actividad de ADP ribosil transferasa y ejerce su acción selectivamente sobre las Rho-GTPasas Rho: tiene una afinidad muy baja por otras Rho-GTPasas y para efectos prácticos no las afecta. La enzima inactiva a Rho ribosilándola en el residuo 41 de asparagina.

Para la inhibición de RhoA en embriones hemos utilizado como referencia un artículo donde se comprueba que la inyección con esta toxina produce defectos en la epibolia (migración celular) y la citocinesis [Lai et al., 2005]; ambos son procesos en los que la activación de la miosina II es indispensable. En este trabajo, los investigadores inyectaron la toxina C3 en grupos de embriones de una célula y monitorearon la mortalidad en diferentes momentos del desarrollo. Ellos no ven una mortalidad significativa hasta las 24 horas post fertilización (hpf) con concentraciones de 120 pM y 1.2 nM de toxina.

Nosotros inyectamos concentraciones crecientes de la toxina comenzando con 100 pM y seguimos hasta concentraciones de 3 a 10 nM. Fue hasta estas concentraciones cuando una fracción de los embriones inyectados presentó deformaciones en distintas etapas del desarrollo, sobre todo durante la epibolia (a partir de las 4 hpf) pero también a las 24 hpf (Figura 5.5). Estos embriones se contaron y se hizo evidente que el tratamiento con una concentración de toxina mayor a 3 nM aumenta el número de embriones con defectos (Figura 5.6).

Inyectamos la droga C3, en concentraciones de 3 a 10 nM en embriones en 8 experimentos independientes; como control utilizamos un grupo de embriones sin inyectar para todos los experimentos así como un grupo de embriones inyectados con amortiguador de inyección en los primeros 5 experimentos o amortiguador de inyección con BSA con una concentración molar equivalente a las inyecciones con enzima C3. Los resultados de sobrevivencia y número de embriones deformes en cada periodo de tiempo se muestran en la Figura 5.7. Las gráficas de barras muestran los resultados de todos los experimentos (Figura 5.7A), los primeros experimentos con sólo amortiguador como control de inyección (Figura 5.7B) y los experimentos en los que inyectamos BSA como control (Figura 5.7C). Asimismo muestran los resultados de la prueba de Kruskal-Wallis, donde un valor p bajo señala que los embriones de alguno de los grupos están muriendo más, en promedio.

En la Figura 5.7 se puede ver que la significancia estadística de las diferencias entre el número de muertos es baja cuando se toman en cuenta por separado los experimentos con amortiguador o BSA, pero cuando se toman en cuenta todos los experimentos el nivel de significancia es mayor. Esta diferencia puede deberse principalmente al número de experimentos, pero independientemente de esto vemos que la droga inyectada a estas concentraciones sí tiene un efecto en el desarrollo y la supervivencia de los embriones y presumiblemente está

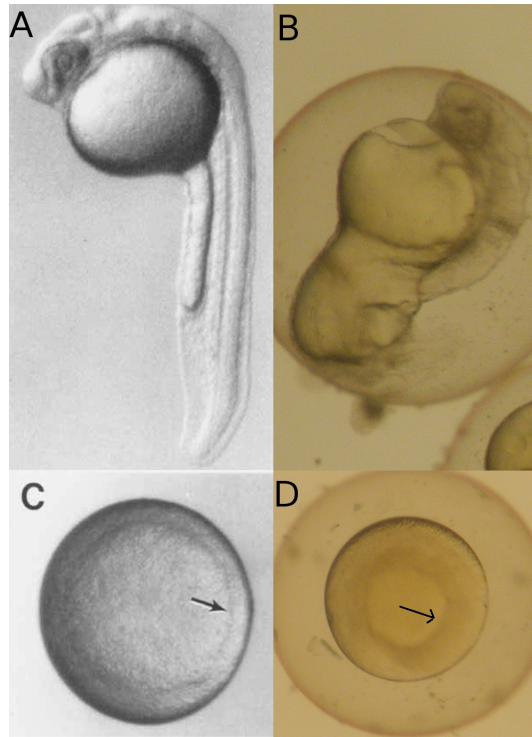


Figura 5.5. Defectos en la embriogénesis con inyecciones de C3 a IC 3.3 nM. Embriones normales de 24 horas post-fertilización (A) o en la etapa de anillo germinal (C) cuando la epibolia está un 50 % de completa. (B y D) Embriones inyectados con toxina que mostraron defectos en su desarrollo. (A y C tomados de [Kimmel et al., 1995])

inhibiendo a RhoA.

La siguiente pregunta es si la inhibición es lo suficientemente rápida para interferir con la migración del plasma germinal en la etapa de 4 células, aproximadamente de 1 a 1 1/2 horas después de la inyección.

Durante los experimentos de inyección, cada una de las poblaciones de embriones: no inyectados, inyectados con amortiguador e inyectados con C3, se dividió en dos. La primera población se incubó a 28 °C para supervisar su desarrollo y arrojó los resultados arriba mencionados. La segunda población se fijó en la etapa de cuatro células y se utilizó para hacer hibridaciones *in situ* contra un mRNA característico del plasma germinal: *nanos*, con el objetivo de comparar su distribución en embriones control con la de embriones inyectados.

La distribución de *nanos* en una población de embriones tiene variaciones entre uno y otro por diferencias individuales en el avance de la citocinesis en el momento en que fueron fijados. Es decir, que el patrón de localización mostrado en la Figura 4.6 es la regla pero también hay embriones en los cuales *nanos* se encuentra en uno de los septos localizado en una franja más alargada, proba-

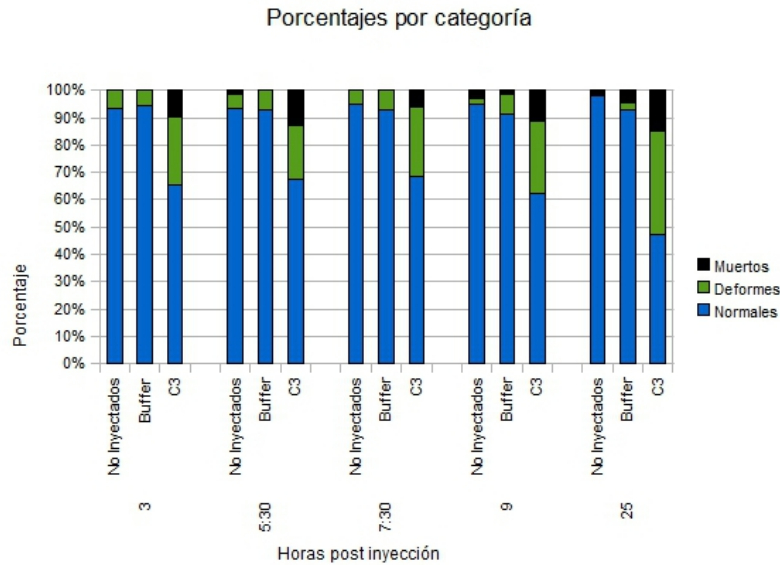


Figura 5.6. Mortalidad en embriones inyectados con C3. Porcentaje de embriones normales, deformes (incluyendo no fertilizados) o muertos en relación al total de embriones en el tiempo descrito (los embriones muertos se retiran, por lo que en cada periodo de tiempo el número de embriones se reduce), los embriones fueron inyectados con nada, amortiguador de inyección o $1 \mu\text{M}$ de la enzima C3 disuelta en amortiguador de inyección (concentración intra celular resultante: 3.3 nm).

blemente porque fueron fijados antes de que pudiera completarse la constricción hacia la región distal (Figura 5.8A).

También encontramos distribuciones anormales o aberrantes en todas las poblaciones de embriones, por ejemplo, puntos de tinción a la mitad del blastodisco (Figura 5.9G).

Los embriones se clasificaron en normales o anormales de acuerdo a su distribución de *nanos* para cuantificar la proporción de embriones que pertenecían a cada grupo en cada experimento. Se clasificaron como normales los embriones cuya localización de *nanos* era puntual en el límite distal del septo (Figura 5.9A) o tenían una franja continua en el mismo (Figura 5.9C). Se clasificaron como anormales los embriones con puntos de tinción a la mitad del blastodisco como el mostrado en la Figura 5.9G. Otros ejemplos de embriones clasificados como anormales son los que presentaban franjas alargadas a lo largo del septo pero se encontraban punteadas o interrumpidas (Figura 5.9F y Figura 5.9B).

Un patrón de localización interesante que sólo observamos en embriones inyectados con droga fue el mostrado en la figura 5.8D. Esta clase de embriones presentaba un vitelo anormalmente teñido, sobre todo en la parte baja y en la mayoría de los casos los blastómeros se encontraban libres de tinción, lo que nos sugirió que en estos embriones la tranlocación de *nanos* mRNA del vitelo al

blastodisco, que ocurre durante la fertilización, se ve afectada por la inhibición de RhoA.

La gráfica en la figura 5.10 muestra las medias y las desviaciones estándar de las categorías normales o anormales de cuatro hibridaciones *in situ* independientes para embriones no inyectados, o seis hibridaciones para embriones inyectados con amortiguador o C3. La prueba de suma de rangos de Kruskal-Wallis arrojó un valor p de 0.01831. Indicando una buena probabilidad de diferencia entre las medias y dando pie a hacer comparaciones pareadas, para lo cual utilizamos la estadística de la suma de rangos de Wilcoxon. Se muestra que existe una diferencia significativa entre ambos grupos control cuando se les compara con los grupos inyectados con toxina.

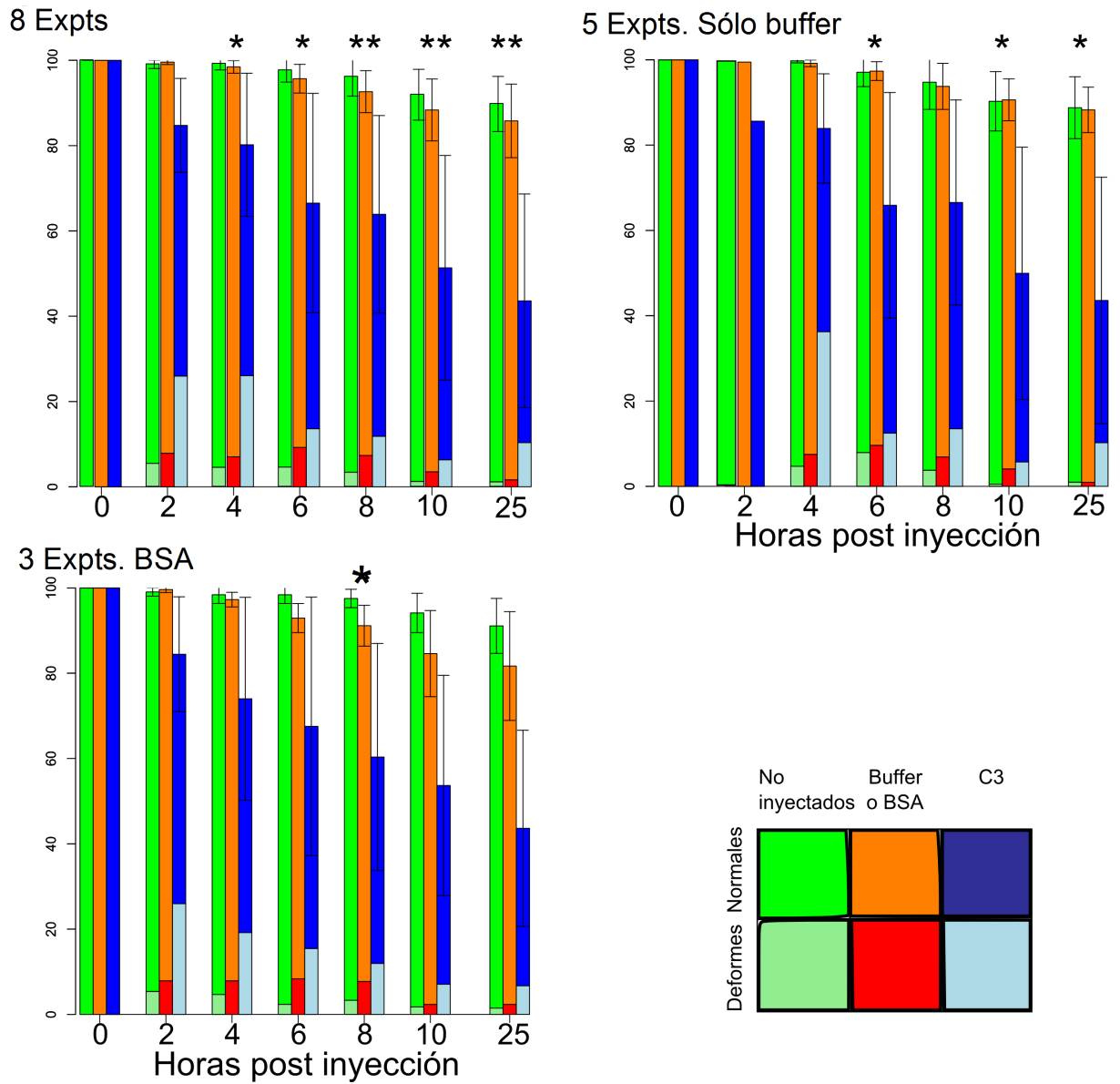


Figura 5.7. Porcentaje de embriones con desarrollo normal o anómalo en los experimentos de inyección. A) Datos de los 8 experimentos. (B) Experimentos donde se inyectó como control amortiguador de inyección o C) amortiguador de inyección con BSA (C). La altura de las barras inferiores representa el promedio de embriones deformes mientras que la de la barra superior representa el promedio de embriones normales. La suma de ambas alturas es el porcentaje de embriones vivos en un tiempo dado. Las barras de error representan la desviación estándar del número total de embriones vivos (suma de embriones normales y deformes). * valor $p < 0.05$, ** valor $p < 0.01$, prueba de Kruskal-Wallis de suma de rangos.

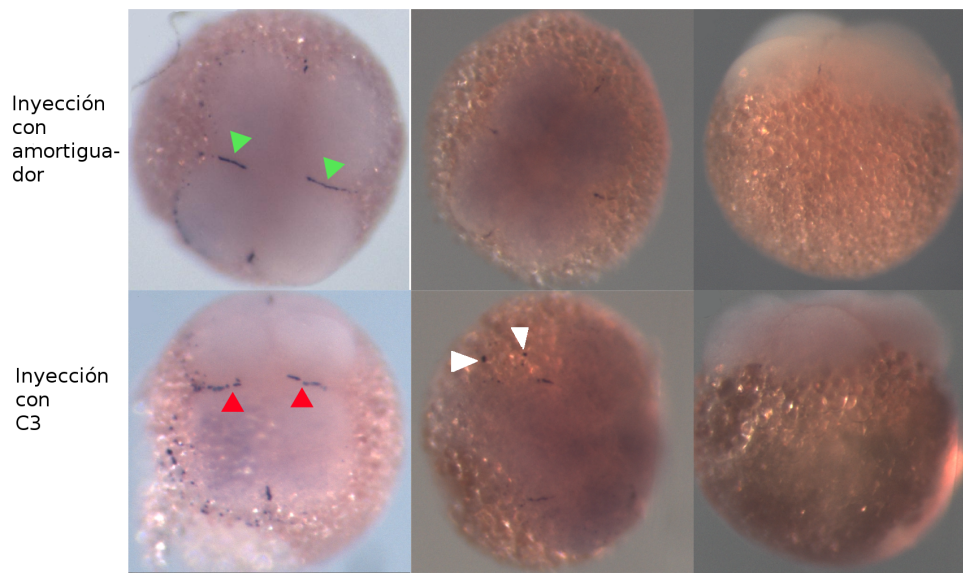


Figura 5.8. Localización de *nanos* en embriones control e inyectados con C3. Comparación de ovocitos en etapa de cuatro células, vistos desde el polo animal y teñidos contra *nanos*. Los embriones en la fila superior fueron inyectados únicamente con amortiguador mientras que los embriones en el panel inferior fueron inyectados con la toxina C3. En la columna izquierda, ambos embriones presentan un septo de división celular no completamente constreñido, con franjas en lugar de puntos (cabezas de flechas). Sin embargo las franjas en el embrión inyectado (cabezas de flecha verdes) son continuas, mientras que las franjas en el embrión inyectado con C3 (cabezas de flecha rojas) son irregulares y punteadas. En la columna de enmedio, el embrión superior, inyectado con amortiguador, presenta una tinción normal, mientras que en el embrión inferior, inyectado con C3, hay puntos de tinción fuera del blastómero, en el vitelo (cabezas de flecha blancas). Última columna, embriones en la misma etapa desde una perspectiva lateral, con el polo animal hacia arriba. El embrión en el panel superior fue inyectado con amortiguador y el embrión en el panel inferior con toxina C3. El embrión superior presenta un vitelo sin coloración, a diferencia del vitelo del embrión inferior. Encontramos embriones parecidos a éste último en varias inyecciones independientes y nunca los encontramos en los embriones control. Los embriones de cada columna corresponden a una misma cruce y aproximadamente las mismas condiciones de inyección.

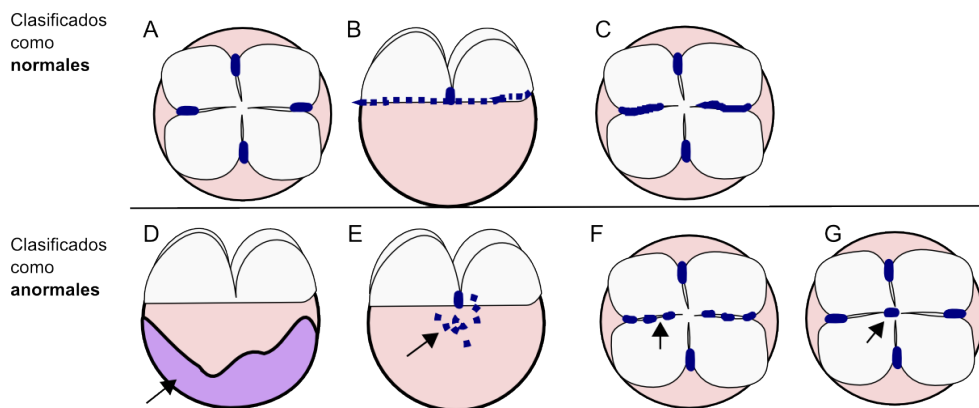


Figura 5.9. Clasificación de embriones en normales o anormales basado en la distribución de *nanos*. La fila superior (A-C) ilustra la clase de patrones de localización de *nanos* (representada en azul) que clasificamos como normales. A: Un embrión con los cuatro agregados de plasma germinal. B: Embriones con tinción igual que A, pero que adicionalmente presentaban gránulos entre los blastómeros y el vitelo. C: Embriones con la tinción igual que A, excepto por un alargamiento de las franjas de plasma germinal en uno de los septos de división celular. **Franja inferior (D-G)** Ilustra los patrones de localización de *nanos* clasificados como anormales. La característica sobresaliente está señalada con una flecha. D: tinción en el polo vegetal. E: tinción cercana a los blastómeros pero fuera de ellos. F: Franjas alargadas y discontinuas o fragmentadas. G: Tinción en el centro del blastodisco.

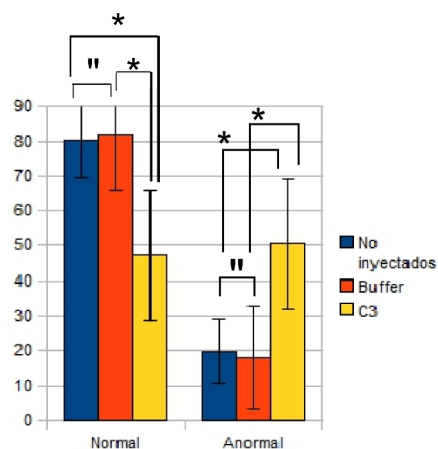


Figura 5.10. Cuantificación de embriones con distribuciones normales o anormales del mRNA de *nanos*. La prueba de Kruskal-Wallis a los tres grupos da un valor p de 0.01831 indicando que es probable una diferencia entre las medias. " : valor $p > .05$, * :valor $p < .05$. Prueba de Wilcoxon-Mann-Whitney. *Buffer vs* no inyectados: valor $p = 0.7484$. *No inyectados vs* C3: valor $p = 0.01905$. *Buffer vs* C3: valor $p = 0.02002$

6

Discusión

6.1. Resumen

La localización correcta del plasma germinal es necesaria para la determinación de la línea germinal en el pez cebra y otros organismos. El plasma germinal es un tema de gran interés que comprende cuestiones evolutivas y reproductivas, así como, a nivel celular, cuestiones sobre determinación, potencialidad, localización de transcritos e interacciones de éstos con el citoesqueleto.

En este trabajo nos propusimos ver la relación entre el patrón de localización y la actividad de RhoA y la localización del plasma germinal durante la ovogénesis y hasta la segunda división celular. Para ello nos valimos de la técnica de hibridación *in situ* para detectar el mRNA de *nanos*, utilizándolo como un marcador del plasma germinal, como ya había sido reportado por otros [Kosaka et al., 2007] [Kopranner et al., 2001]. En breve, *nanos* mRNA se localiza en la nube mitocondrial en la ovogénesis temprana, migra formando un gradiente hacia la corteza del polo vegetal en la ovogénesis tardía, desde donde se traslada al polo animal del embrión luego de la fertilización; una vez ahí, *nanos* mRNA se concentra en la región distal de los septos de división celular.

Utilizando inmunofluorescencia e inmunohistoquímica reprodujimos el patrón de localización de la proteína RhoA durante las primeras divisiones celulares (Salas-Vidal, comunicación personal), además de describir por primera vez su patrón de localización durante la ovogénesis: RhoA también se localiza en la nube mitocondrial en la ovogénesis temprana, forma un gradiente hacia la corteza del ovocito y durante las primeras divisiones se encuentra en el septo de división celular. Así, RhoA recapitula a grandes rasgos la localización dinámica del plasma germinal durante las etapas estudiadas.

Por otro lado, la inyección de un inhibidor de la actividad de RhoA provocó defectos en la localización del plasma germinal luego de la fertilización y hasta la etapa de cuatro células.

6.2. RhoA y el plasma germinal en la ovogénesis

Tenemos una buena evidencia de que RhoA se localiza en la nube mitocondrial al principio de la ovogénesis. Es un resultado sugerente de una posible función de RhoA en la agregación o la migración de la nube mitocondrial. La evidencia viene de dos experimentos independientes: en el primero revelamos la localización de RhoA en secciones histológicas por inmunofluorescencia y vimos que coincidía con la nube mitocondrial teñida con faloidina fluorescente. En el segundo experimento teñimos el plasma germinal haciendo una hibridación *in situ* contra el mRNA de *nanos*, en un corte, y vimos que coincidía con RhoA, a quien detectamos inmunohistoquímicamente con diaminobenzidina en el corte inmediatamente siguiente. Nunca observamos un ovocito con la nube mitocondrial teñida con faloidina en donde RhoA no coincidiera con ésta, pues la detección fluorescente permite observar ambas estructuras simultáneamente, i.e., en el mismo corte. Utilizando las técnicas histoquímicas también observamos colocalización entre RhoA y *nanos* mRNA pero, dado que en este caso detectamos cada molécula en cortes contiguos, hubo ocasiones en que la nube mitocondrial aparecía en un ovocito, en un corte, sin que RhoA estuviera localizada en el mismo ovocito en el corte siguiente. Esto se explica comparando el tamaño promedio de $50 \mu\text{m}$ de la nube mitocondrial y el grosor de $15 \mu\text{m}$ de los cortes, de modo que la nube mitocondrial puede estar contenida en un máximo de tres cortes. Si, por azar, el corte donde vemos a *nanos* mRNA es el tercero, el siguiente corte no podremos observar a la nube mitocondrial (ver Figura 6.1).

En ovocitos de la etapa II, RhoA se localiza en el citoplasma y en algunos de estos casos pudimos detectar un gradiente de concentración. Desafortunadamente, en estas etapas no es posible detectar al plasma germinal tiñendo con faloidina. A pesar de ello, las tinciones en cortes contiguos utilizando diaminobenzidina indican que el gradiente de concentración de RhoA coincide con el gradiente de *nanos* mRNA, en algunos ovocitos. De la etapa III de la ovogénesis en adelante, donde RhoA se localiza en la corteza, se puede decir poco por que ni la actina ni *nanos* mRNA sirven para marcar al plasma germinal en estas etapas.

En resumen, tenemos a grandes rasgos, tres eventos:

1. Localización en la nube mitocondrial de los mRNAs del plasma germinal, representados por *nanos*. En este evento, durante la etapa I de la ovogénesis, es donde contamos con evidencia más contundente de la colocalización de RhoA con el plasma germinal. Pues tanto la tinción con faloidina como la *in situ* contra *nanos* coinciden con la tinción de RhoA.
2. Migración del plasma germinal hacia la corteza, identificada con un gradiente de *nanos* mRNA en el citoplasma. En este punto sólo contamos con evidencia proveniente de inmunohistoquímica en cortes seriados. Sin embargo, el hecho de que RhoA se encuentre en la nube mitocondrial hace difícil pensar que el gradiente tome la dirección contraria.
3. Anclaje de RhoA a la corteza. En este evento no tenemos evidencia de que

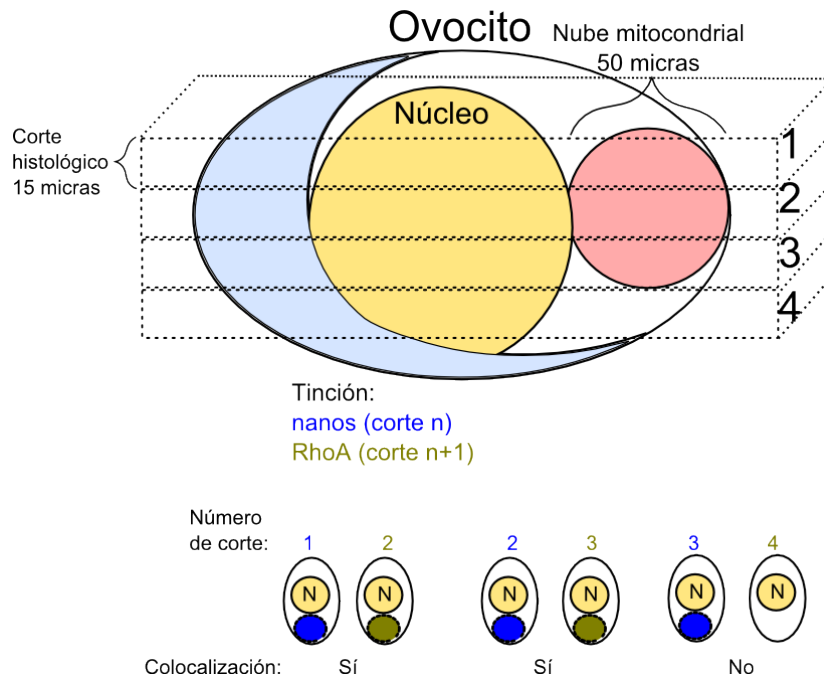


Figura 6.1. Cortes histológicos adyacentes y colocalización en la nube mitocondrial. Colocalización entre *nanos* mRNA, revelado con NBT/BCIP, que da un color azul, y RhoA, revelada con diaminobenzidina, que da un color café. Se muestran distintas combinaciones de cortes y tinciones que ilustran la causa de que pueda detectarse la colocalización en la nube mitocondrial por esta estrategia, pero que en ciertas en ocasiones no coincida.

RhoA colocalice con el plasma germinal. Los mRNAs del plasma germinal tienen diferentes regiones de anclaje a la corteza: *dazl*, por ejemplo, se ubica muy definidamente en el polo vegetal, mientras que *vasa* no tiene una localización polarizada sino que se localiza a lo largo de toda la corteza.

Sería interesante utilizar líneas transgénicas con RhoA fusionada a proteínas fluorescentes. La fusión tendría que ser en el extremo N-terminal de RhoA para que no interfiera con su prenilación y por ende con la localización normal de la proteína. La ventaja sería que podríamos seguir la localización de RhoA *in vivo* y en el ovocito completo, lo cual retiraría las incertidumbres inherentes a la detección en cortes. Otra extensión a futuro interesante en este punto es el uso de nuevos anticuerpos capaces de reconocer a RhoA unida a GTP (NewEast Biosciences), es decir, a la conformación activa. Esto permitiría ver si coincide la actividad de RhoA con el plasma germinal.

En contraste con los mRNA's, son escasas las proteínas que se sabe que localizan en la nube mitocondrial de pez cebra. De ellas, sólo la localización de una se descubrió en el pez cebra antes que en algún otro organismo: Bucky-

ball [Bontems et al., 2009]. Por ello, nuestros resultados son muy interesantes, pues encontramos una proteína localizada en la nube mitocondrial sin que hasta ahora haya evidencia de que participa en la determinación de la línea germinal. Aún no tenemos evidencia de que la presencia de RhoA en la nube mitocondrial sea necesaria para su agregación o para la especificación de las células germinales ni sabemos qué proporción de la población de RhoA está activa. Sin embargo, el conocido papel de los miembros de la familia Rho como remodeladores del citoesqueleto, aunado a la evidencia que liga a microfilamentos y microtúbulos con el plasma germinal durante la ovogénesis de pez cebra [Gupta et al., 2010], la rana [Gard, 1999] y la mosca de la fruta [Micklem, 1995], nos permite especular que RhoA tiene una función en la morfología y la migración del plasma germinal y la nube mitocondrial.

En pez cebra, los filamentos de actina están enriquecidos en la nube mitocondrial [Marlow and Mullins, 2008]. Hasta ahora no ha aparecido un trabajo que muestre que la actividad de la miosina tiene un papel en esta etapa. Probablemente, los filamentos de actina ayudan a la agregación y soporte de la estructura estáticamente.

Cabe preguntarse ¿Puede RhoA influir sobre la polimerización de actina dentro de la nube mitocondrial? o, por el contrario ¿Es la concentración de RhoA en la nube mitocondrial dependiente de la red filamentosa de actina? Sin excluir una combinación de ambas posibilidades, el reporte de Liao *et al.* nos hace inclinarnos por la primera [Liao et al., 2011]. En sus experimentos en células humanas, Liao *et al.* muestran que para la localización del mRNA de Dia, un efector de RhoA, al retículo endoplásmico, es necesaria la presencia de RhoA activada. Proponen que la localización del mRNA se da por la interacción entre RhoA activa y el dominio de Dia con el que normalmente interactúa, prematuramente traducido, que actuaría como péptido señal. Con la nube mitocondrial también se asocia el retículo endoplásmico [Kloc et al., 2004]. Sería interesante buscar la localización del mensajero o la proteína Dia en la nube mitocondrial del pez cebra porque a través de Dia, RhoA puede guiar la polimerización de filamentos de actina lineales [Young and Copeland, 2010]. Otro artículo interesante a este respecto es el de Minin *et al.* [Minin et al., 2006] quienes muestran que el dúo RhoA - Dia promueve el anclaje de las mitocondrias a los filamentos de actina, al menos en células de mamífero y de la mosca.

En contra de estas especulaciones está el hecho de que inhibir la formación de filamentos de actina con citocalasina B en el ovocito de rana no afecta la asociación de los mRNAs del plasma germinal con la nube mitocondrial. Asimismo, en ovocitos de pez cebra mutantes en el gen *microtubule actin crosslinking factor*, se forma una nube mitocondrial y *vasa* y *dazl*, mRNAs del plasma germinal, son reclutados a ella, pero no migran hacia la corteza y terminan difuminándose por el citoplasma [Gupta et al., 2010], indicándonos que la coordinación entre microtúbulos y actina no es requerida para la formación de la nube mitocondrial ni el reclutamiento de los mRNAs del plasma germinal pero probablemente sí lo es para la migración hacia el polo vegetal. Un poco más adelante en la ovogénesis, el tratamiento con citocalasina sí afecta el anclaje de la nube mitocondrial y los mRNAs del plasma germinal a la corteza del ovocito [Kloc and Etkin, 1995].

Este anclaje es dependiente de la polimerización de actina; RhoA, que en esas etapas también se localiza en la corteza, pudiera ser importante para permitirlo. También cabe la posibilidad de que RhoA no tenga una función activa en la nube mitocondrial y que sólo la aproveche como medio de transporte.

En el ovocito de la mosca también son esenciales los filamentos de actina corticales para el anclaje del plasma germinal. Es muy interesante que recientemente se descubrió que Rho1, que es el homólogo de RhoA en la mosca, se localiza en el polo posterior de los ovocitos, en el mismo lugar donde se ancla el plasma germinal de este organismo [Tanaka et al., 2011].

6.3. RhoA y el plasma germinal luego de la fertilización

En embriones tempranos de rana y erizo, una estrecha zona de RhoA activa marca en la corteza el lugar de formación del septo de división celular [Bement et al., 2005]. RhoA también se localiza en el septo de división en una variedad de organismos y su inactivación o eliminación evita la formación del septo. Los efectores principales de RhoA involucrados en la citocinesis son: Dia y otras forminas, la cinasa dependiente de Rho (ROCK) y la Citron cinasa (CitK). En breve, las forminas promueven la polimerización de actina necesaria para la formación del anillo contráctil. ROCK regula la miosina, que genera la fuerza necesaria para la ingresión del anillo contráctil [Piekny et al., 2005]. Finalmente, RhoA también activa a CytK, que es necesaria para completar la citocinesis en algunas células, pero su efecto sobre el citoesqueleto y mecanismo de acción durante la citocinesis siguen en disputa [Bassi et al., 2011].

Inhibimos la actividad de RhoA con la toxina C3 en embriones recién fertilizados. Otros habían reportado con anterioridad que la inyección de C3 provocaba defectos en el desarrollo y mortalidad de manera dependiente de la dosis [Lai et al., 2005]. Inyectamos concentraciones crecientes de C3 hasta que observamos defectos en el desarrollo y muerte en un número significativo de embriones. De este modo, utilizamos el porcentaje de embriones afectados como un estimador indirecto de la efectividad de la inhibición de RhoA. Una manera en que se vio afectada la migración del plasma germinal fue que el mRNA de *nanos* se localizó en el vitelo de algunos embriones (ver Figura 5.9D). Nuestra primera impresión al ver esto fue que RhoA es necesaria para la migración de *nanos* mRNA desde el vitelo hacia el polo animal. Sin embargo, esta migración ocurre antes de o justo en el momento de la fertilización [Theusch et al., 2006] y [Howley and Ho, 2000], por lo que es imposible inyectar la toxina antes de que ya haya migrado una parte del mRNA. ¿De donde viene entonces la tinción en el vitelo? En un trabajo del grupo del Dr. Robert K. Ho se mostró que el mRNA de *vasa*, otro integrante del plasma germinal, se trasloca rápidamente al polo animal en óvulos activados pero hay una fracción rezagada que puede verse como líneas de tinción en la corteza y por el interior del vitelo, y que parecen

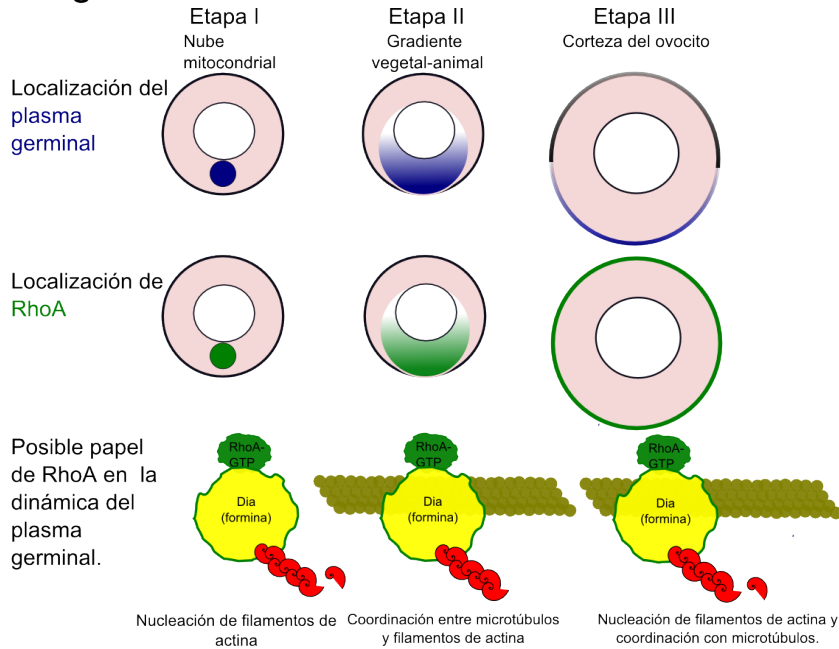
fluir hacia el polo animal [Howley and Ho, 2000]. Probablemente, una población de *nanos*, que se comporta de un modo similar, es la que observamos retenida en el vitelo cuando RhoA es inhibida.

El tratamiento de los embriones con inhibidores de miosina afecta la migración del plasma germinal una vez dentro del septo pero no afecta su localización al mismo [Urven et al., 2006]. Por lo tanto, quizás podemos descartar la acción de la miosina en este primer efecto. Resta analizar si se está interfiriendo con la estabilidad de los microtúbulos o con la polimerización de actina.

El otro fenotipo interesante fue la disfunción que sufrió la migración del plasma germinal *dentro* del septo de división celular sin que a simple vista pudiéramos detectar defectos en la fisiología del mismo. El plasma germinal, en lugar de formar una banda dentro del septo que luego se contrae hacia la región distal, formó una serie de puntos o líneas cortas y discontinuas. Se han visto defectos en la migración del plasma germinal dentro del septo cuando se inhibe la actividad de la miosina [Urven et al., 2006]. La activación de RhoA, a través de ROCK sobre la fosforilación de la miosina está bien documentada [Piekny et al., 2005]; así que es natural pensar que esta es la vía principal que está siendo interferida al inhibir RhoA. Sin embargo, existe otra mutante, *nebel* que provoca defectos en la migración del plasma germinal dentro del septo de división; estos efectos se pueden imitar con el tratamiento con fármacos inhibidores del ensamblaje de microtúbulos, como el nocodazol [Pelegri et al., 1999]. La migración del plasma germinal depende de la correcta formación del anillo contráctil de actina, de su contracción por medio de la miosina y de la formación del arreglo de microtúbulos del septo. RhoA tiene la capacidad, en teoría, de influir sobre estos tres procesos durante la citocinesis y no podemos descartar que el efecto observado se deba a la pérdida de cualquiera de ellos.

Como hemos mencionado, la acción de RhoA en la citocinesis se da a través de tres efectores. ¿Cual efector contribuye en mayor medida a la migración del plasma germinal? Se requerirá en un futuro inhibir por separado a cada uno de los efectores y comparar los efectos resultantes en la migración del plasma germinal (Figura 6.2).

Ovogénesis



Primeras divisiones celulares

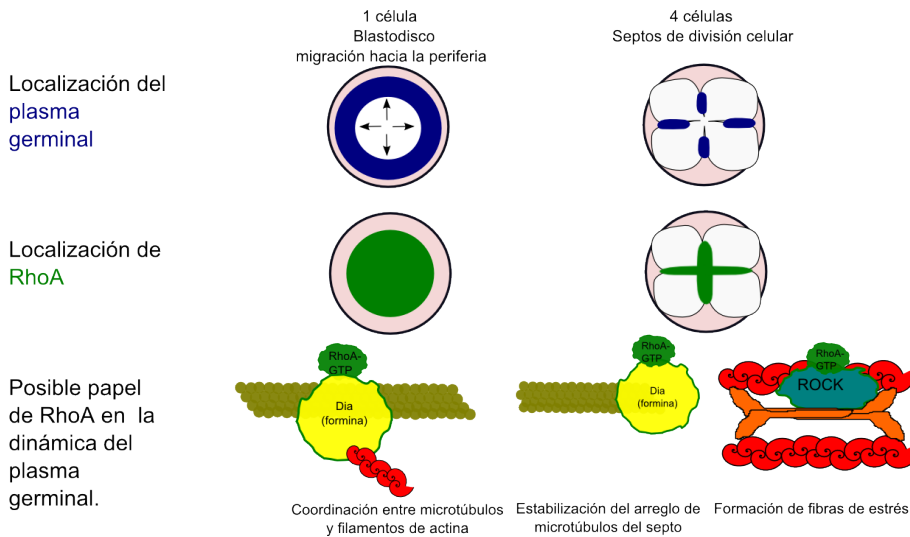


Figura 6.2. Durante la ovogénesis, probablemente sea más importante la acción de Dia coordinando la polimerización de actina con los microtúbulos, para crear sitios de anclaje para el plasma germinal. En la etapa de migración dentro de los septos de migración celular se vuelve más relevante la capacidad de RhoA de activar a la miosina II a través de su efector ROCK y formar fibras de estrés.

7

Conclusiones

- RhoA se localiza en el cuerpo de Bailbiani o nube mitocondrial, junto con los mRNAs del plasma germinal, en los ovocitos de estadio I. En ovocitos más avanzados, forma un gradiente de concentración para terminar anclada a la corteza del ovocito.
- RhoA está enriquecida en los septos de división celular, lugar donde el plasma germinal se segrega, durante las primeras divisiones celulares.
- La inhibición de la actividad de RhoA interfiere con la correcta localización del mRNA de *nanos* en al menos dos distintas etapas de su migración: la translocación al polo animal y la compactación en los septos de división celular.

Bibliografía

- [Bartolini and Gundersen, 2010] Bartolini, F. and Gundersen, G. G. (2010). Formins and microtubules. *Biochim. Biophys. Acta* *1803*, 164–173.
- [Bassi et al., 2011] Bassi, Z. I., Verbrugghe, K. J., Capalbo, L., Gregory, S., Montembault, E., Glover, D. M. and DÁvino, P. P. (2011). Sticky/Citron kinase maintains proper RhoA localization at the cleavage site during cytokinesis. *J. Cell Biol.* *195*, 595–603.
- [Bement et al., 2005] Bement, W. M., Benink, H. A. and von Dassow, G. (2005). A microtubule-dependent zone of active RhoA during cleavage plane specification. *J. Cell Biol.* *170*, 91–101.
- [Bontems et al., 2009] Bontems, F., Stein, A., Marlow, F., Lyautey, J., Gupta, T., Mullins, M. C. and Dosch, R. (2009). Bucky ball organizes germ plasm assembly in zebrafish. *Curr. Biol.* *19*, 414–422.
- [Czaplinski and Singer, 2006] Czaplinski, K. and Singer, R. H. (2006). Pathways for mRNA localization in the cytoplasm. *Trends Biochem. Sci.* *31*, 687–693.
- [Etienne-Manneville and Hall, 2002] Etienne-Manneville, S. and Hall, A. (2002). Rho GTPases in cell biology. *Nature* *420*, 629–635.
- [Ewen-Campen et al., 2010] Ewen-Campen, B., Schwager, E. E. and Extavour, C. G. (2010). The molecular machinery of germ line specification. *Mol. Reprod. Dev.* *77*, 3–18.
- [Gallo et al., 2010] Gallo, C. M., Wang, J. T., Motegi, F. and Seydoux, G. (2010). Cytoplasmic partitioning of P granule components is not required to specify the germline in *C. elegans*. *Science* *330*, 1685–1689.
- [Gard, 1999] Gard, D. L. (1999). Confocal microscopy and 3-D reconstruction of the cytoskeleton of *Xenopus* oocytes. *Microsc. Res. Tech.* *44*, 388–414.
- [Gilbert, 2010] Gilbert, S. F. (2010). *Developmental Biology*. Ninth edition, Sinauer Associates.

- [Gupta et al., 2010] Gupta, T., Marlow, F. L., Ferriola, D., Mackiewicz, K., Dapprich, J., Monos, D. and Mullins, M. C. (2010). Microtubule actin cross-linking factor 1 regulates the Balbiani body and animal-vegetal polarity of the zebrafish oocyte. *PLoS Genet.* *6*, e1001073.
- [Hashimoto et al., 2004] Hashimoto, Y., Maegawa, S., Nagai, T., Yamaha, E., Suzuki, H., Yasuda, K. and Inoue, K. (2004). Localized maternal factors are required for zebrafish germ cell formation. *Dev. Biol.* *268*, 152–161.
- [Hauptmann, 2001] Hauptmann, G. (2001). One-, two-, and three-color whole-mount in situ hybridization to *Drosophila* embryos. *Methods (San Diego, Calif.)* *23*, 359–72.
- [Howley and Ho, 2000] Howley, C. and Ho, R. K. (2000). mRNA localization patterns in zebrafish oocytes. *Mech. Dev.* *92*, 305–309.
- [Ikenishi, 1998] Ikenishi, K. (1998). Germ plasm in *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila* and *Xenopus*. *Dev. Growth Differ.* *40*, 1–10.
- [Illmensee and Mahowald, 1974] Illmensee, K. and Mahowald, A. P. (1974). Transplantation of posterior polar plasm in *Drosophila*. Induction of germ cells at the anterior pole of the egg. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *71*, 1016–1020.
- [Inoue et al., 1990] Inoue, H., Nojima, H. and Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* *96*, 23–28.
- [Jowett, 2001] Jowett, T. (2001). Double in situ hybridization techniques in zebrafish. *Methods (San Diego, Calif.)* *23*, 345–58.
- [Kimmel et al., 1995] Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B. and Schilling, T. F. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn.* *203*, 253–310.
- [King et al., 2005] King, M. L., Messitt, T. J. and Mowry, K. L. (2005). Putting RNAs in the right place at the right time: RNA localization in the frog oocyte. *Biol. Cell* *97*, 19–33.
- [Kloc et al., 2004] Kloc, M., Bilinski, S. and Etkin, L. D. (2004). The Balbiani body and germ cell determinants: 150 years later. *Curr. Top. Dev. Biol.* *59*, 1–36.
- [Kloc and Etkin, 1995] Kloc, M. and Etkin, L. D. (1995). Two distinct pathways for the localization of RNAs at the vegetal cortex in *Xenopus* oocytes. *Development* *121*, 287–297.
- [Koprunner et al., 2001] Koprunner, M., Thisse, C., Thisse, B. and Raz, E. (2001). A zebrafish nanos-related gene is essential for the development of primordial germ cells. *Genes Dev.* *15*, 2877–2885.

- [Kosaka et al., 2007] Kosaka, K., Kawakami, K., Sakamoto, H. and Inoue, K. (2007). Spatiotemporal localization of germ plasm RNAs during zebrafish oogenesis. *Mech. Dev.* *124*, 279–289.
- [Lai et al., 2005] Lai, S. L., Chang, C. N., Wang, P. J. and Lee, S. J. (2005). Rho mediates cytokinesis and epiboly via ROCK in zebrafish. *Mol. Reprod. Dev.* *71*, 186–196.
- [Latham et al., 2001] Latham, V. M., Yu, E. H., Tullio, A. N., Adelstein, R. S. and Singer, R. H. (2001). A Rho-dependent signaling pathway operating through myosin localizes beta-actin mRNA in fibroblasts. *Curr. Biol.* *11*, 1010–1016.
- [Lessman, 2009] Lessman, C. A. (2009). Oocyte maturation: converting the zebrafish oocyte to the fertilizable egg. *Gen. Comp. Endocrinol.* *161*, 53–57.
- [Liao et al., 2011] Liao, G., Ma, X. and Liu, G. (2011). An RNA-zipcode-independent mechanism that localizes Dial mRNA to the perinuclear ER through interactions between Dial nascent peptide and Rho-GTP. *J. Cell. Sci.* *124*, 589–599.
- [Lindeman and Pelegri, 2010] Lindeman, R. E. and Pelegri, F. (2010). Vertebrate maternal-effect genes: Insights into fertilization, early cleavage divisions, and germ cell determinant localization from studies in the zebrafish. *Mol. Reprod. Dev.* *77*, 299–313.
- [Maegawa et al., 1999] Maegawa, S., Yasuda, K. and Inoue, K. (1999). Maternal mRNA localization of zebrafish DAZ-like gene. *Mech. Dev.* *81*, 223–226.
- [Marlow and Mullins, 2008] Marlow, F. L. and Mullins, M. C. (2008). Bucky ball functions in Balbiani body assembly and animal-vegetal polarity in the oocyte and follicle cell layer in zebrafish. *Dev. Biol.* *321*, 40–50.
- [Micklem, 1995] Micklem, D. R. (1995). mRNA localisation during development. *Dev. Biol.* *172*, 377–395.
- [Minin et al., 2006] Minin, A. A., Kulik, A. V., Gyoeva, F. K., Li, Y., Goshima, G. and Gelfand, V. I. (2006). Regulation of mitochondria distribution by RhoA and formins. *J. Cell. Sci.* *119*, 659–670.
- [Nakamura and Seydoux, 2008] Nakamura, A. and Seydoux, G. (2008). Less is more: specification of the germline by transcriptional repression. *Development* *135*, 3817–3827.
- [Nojima et al., 2010] Nojima, H., Rothhamel, S., Shimizu, T., Kim, C. H., Yonemura, S., Marlow, F. L. and Hibi, M. (2010). Syntabulin, a motor protein linker, controls dorsal determination. *Development* *137*, 923–933.
- [Pelegri, 2003] Pelegri, F. (2003). Maternal factors in zebrafish development. *Dev. Dyn.* *228*, 535–554.

- [Pelegri et al., 1999] Pelegri, F., Knaut, H., Maischein, H. M., Schulte-Merker, S. and Nüsslein-Volhard, C. (1999). A mutation in the zebrafish maternal-effect gene *nebel* affects furrow formation and vasa RNA localization. *Current biology : CB* *9*, 1431–40.
- [Piekny et al., 2005] Piekny, A., Werner, M. and Glotzer, M. (2005). Cytokinesis: welcome to the Rho zone. *Trends Cell Biol.* *15*, 651–658.
- [Pollard, 2010] Pollard, T. D. (2010). Mechanics of cytokinesis in eukaryotes. *Curr. Opin. Cell Biol.* *22*, 50–56.
- [R Development Core Team, 2011] R Development Core Team (2011). R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0.
- [Salas-Vidal et al., 2005] Salas-Vidal, E., Meijer, A. H., Cheng, X. and Spaink, H. P. (2005). Genomic annotation and expression analysis of the zebrafish Rho small GTPase family during development and bacterial infection. *Genomics* *86*, 25–37.
- [Selman et al., 1993] Selman, K., Wallace, R. A., Sarka, A. and Qi, X. (1993). Stages of oocyte development in the zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Journal of Morphology* *218*, 203–224.
- [Stuart et al., 2008] Stuart, H. C., Jia, Z., Messenberg, A., Joshi, B., Underhill, T. M., Moukhles, H. and Nabi, I. R. (2008). Localized Rho GTPase activation regulates RNA dynamics and compartmentalization in tumor cell protrusions. *J. Biol. Chem.* *283*, 34785–34795.
- [Tanaka et al., 2011] Tanaka, T., Kato, Y., Matsuda, K., Hanyu-Nakamura, K. and Nakamura, A. (2011). *Drosophila* Mon2 couples Oskar-induced endocytosis with actin remodeling for cortical anchorage of the germ plasm. *Development* *138*, 2523–2532.
- [Theusch et al., 2006] Theusch, E. V., Brown, K. J. and Pelegri, F. (2006). Separate pathways of RNA recruitment lead to the compartmentalization of the zebrafish germ plasm. *Dev. Biol.* *292*, 129–141.
- [Thisse and Thisse, 2008] Thisse, C. and Thisse, B. (2008). High-resolution in situ hybridization to whole-mount zebrafish embryos. *Nat Protoc* *3*, 59–69.
- [Urven et al., 2006] Urven, L. E., Yabe, T. and Pelegri, F. (2006). A role for non-muscle myosin II function in furrow maturation in the early zebrafish embryo. *J. Cell. Sci.* *119*, 4342–4352.
- [Villace et al., 2004] Villace, P., Marion, R. M. and Ortin, J. (2004). The composition of Staufen-containing RNA granules from human cells indicates their role in the regulated transport and translation of messenger RNAs. *Nucleic Acids Res.* *32*, 2411–2420.

- [Weidinger et al., 2003] Weidinger, G., Stebler, J., Slanchev, K., Dumstrei, K., Wise, C., Lovell-Badge, R., Thisse, C., Thisse, B. and Raz, E. (2003). dead end, a novel vertebrate germ plasm component, is required for zebrafish primordial germ cell migration and survival. *Curr. Biol.* *13*, 1429–1434.
- [Westerfield, 1994] Westerfield, M. (1994). *Zebrafish Book: A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish*. Inst Of Neuro Science.
- [Wylie, 1999] Wylie, C. (1999). Germ Cells. *Cell* *96*, 165 – 174.
- [Yabe et al., 2009] Yabe, T., Ge, X., Lindeman, R., Nair, S., Runke, G., Mullins, M. C. and Pelegri, F. (2009). The maternal-effect gene cellular island encodes aurora B kinase and is essential for furrow formation in the early zebrafish embryo. *PLoS Genet.* *5*, e1000518.
- [Yoon et al., 1997] Yoon, C., Kawakami, K. and Hopkins, N. (1997). Zebrafish vasa homologue RNA is localized to the cleavage planes of 2- and 4-cell-stage embryos and is expressed in the primordial germ cells. *Development* *124*, 3157–3165.
- [Young and Copeland, 2010] Young, K. G. and Copeland, J. W. (2010). Formins in cell signaling. *Biochim. Biophys. Acta* *1803*, 183–190.