



Universidad Nacional Autónoma de México

MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

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

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS
BIOQUÍMICAS

PRESENTA:
JERÓNIMO ROBERTO MIRANDA RODRÍGUEZ

Tutora principal:
Denhí Schnabel Peraza
Instituto de Biotecnología/UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:
María del Rayo Sánchez Carbente
Centro de Investigación en Biotecnología/UAEM
Rosa Estela Navarro González
Instituto de Fisiología Celular/UNAM



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

Quiero agradecer a todos los que hicieron posible este trabajo:

Los integrantes del laboratorio de la doctora Hilda Lomelí Buyoli. La M. en C. Dulce Pacheco Benítez por el apoyo y el cuidado de los peces y la M. en C. Laura Ramírez Ángeles por su apoyo experimental.

Mis compañeros, amigos, colegas y maestros en el Instituto de Biotecnología. Los integrantes del Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada. Los miembros de la unidad de docencia.

Mi tutora, la doctora Denhí Schnabel Peraza, de quien tuve el honor de ser el primer alumno de doctorado. Gracias por tu guía, tu inteligencia y tu generosidad.

El Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) por su apoyo económico para viajes y congresos.

El CONACyT, que me otorgó la beca número 310641.

La doctora María del Rayo Sánchez Carbente y la doctora Rosa Estela Navarro González, miembros de mi comité tutorial.

Los integrantes del jurado que leyeron esta tesis, los doctores: Celina García Meléndrez, Verónica Narváez Padilla, Diana María Escalante Alcalde, Alberto Darszon Israel y Luis Cárdenas Torres.

Mis amigos de la licenciatura en ciencias genómicas, en quienes puedo confiar aún después de casi 10 años. Pablo, por su ayuda en los momentos más sombríos. Lisandro, de científico, poeta y loco, tú tienes mucho. Karla, por tu amor y tus opiniones sobre todas las cosas.

Mi familia. Mis papás, que dan todo por sus hijos. Mis hermanos, que me enseñan e inspiran siguiendo cada uno sus sueños.

Resumen

Los animales que se reproducen sexualmente segregan un grupo de células especializadas para tal fin, los gametos. El primer paso de esta segregación ocurre durante el desarrollo embrionario.

En los cigotos de muchos animales existe un citoplasma especializado conocido como *plasma germinal*, consistente de mRNAs y proteínas específicos. La internalización del plasma germinal a una célula embrionaria es suficiente para marcar su destino como progenitora de los gametos. Es necesario que los componentes del plasma germinal se concentren y se localicen correctamente, de lo contrario, ocurren defectos en la determinación de los gametos y, consecuentemente, en la fertilidad del organismo.

En el pez cebra, el plasma germinal se localiza en múltiples etapas. La actina, la tubulina y las proteínas motoras asociadas a cada una deben coordinarse para la migración del plasma germinal a su sitio final. Aún faltan por conocerse a fondo los mecanismos que controlan al citoesqueleto durante este proceso.

Las Rho GTPasas son una familia de proteínas pequeñas capaces de controlar la dinámica tanto de los microtúbulos como de los microfilamentos. Nuestra hipótesis fue que éstas tenían un papel importante en la regulación de la localización de los mRNAs del plasma germinal en el embrión de pez cebra. En particular, varias líneas de evidencia nos hicieron enfocarnos en el papel de la Rho GTPasa RhoA en este fenómeno.

Por medio de tinciones inmunofluorescentes, observamos la presencia de RhoA y de su efectora ROCK durante las primeras divisiones del embrión de pez. Hicimos hibridaciones *in situ* de los mRNAs *nanos*, *vasa* y *dazl*, marcadores del plasma germinal. La tinción simultánea de RhoA y los marcadores del plasma germinal mostró un solapamiento en la localización de ambos componentes en los septos de división celular.

Evaluamos el efecto de inhibidores enzimáticos y farmacológicos de RhoA o de ROCK en la distribución espacial de los mRNAs del plasma germinal. Se observó una correlación entre la disminución de la Rho GTPasa membranar debido a su inhibición y defectos en la localización de los mRNAs.

Además de la embriogénesis temprana, se analizó el efecto de la deslocalización del plasma germinal en la determinación de las células germinales. La inhibición de RhoA o de ROCK provoca un decremento en esta población debido a los errores de localización previos. Los inhibidores de RhoA y ROCK también causan la desorganización de los microtúbulos pero no de los filamentos de actina, lo cual sugiere que RhoA controla la migración del plasma germinal predominantemente a través de sus efectos sobre la tubulina.

Este trabajo muestra que las proteínas RhoA y ROCK están íntimamente relacionadas con el plasma germinal del pez cebra. En especial, ROCK se concentra en los puntos que corresponden al plasma germinal en las etapas de 2 y 4 células. Además, la actividad de RhoA y ROCK es necesaria para coordinar los microtúbulos durante la migración de los mRNAs del plasma germinal en el embrión temprano. La ausencia de actividad RhoA y de ROCK resulta en última instancia en una disminución de las células germinales.

Los resultados abonan al entendimiento de los procesos moleculares y celulares de la determinación de la línea germinal en el pez cebra. De manera más general, contribuyen a conocer los mecanismos del citoesqueleto que promueven la localización heterogénea de mRNAs dentro de la célula.

Abstract

Animals that reproduce sexually segregate a group of specialized cells for this purpose, the gametes. The first step of this segregation occurs during embryonic development.

In the zygotes of many animals there is a specialized cytoplasm known as *germ plasm*, consisting of mRNAs and specific proteins. The internalization of the germ plasm to an embryonic cell is enough to determine its fate as progenitor of the gametes. It is necessary that the components of the germ plasm concentrate and locate correctly, otherwise, defects in the determination of the gametes and, consequently, in the fertility of the organism occur.

In zebrafish, the germ plasm is located in multiple steps. Actin, tubulin, and the motor proteins associated with each must be coordinated for the migration of the germ plasm to its final site. The mechanisms that control the cytoskeleton during this process are yet to be fully understood.

Rho GTPases are a family of small proteins capable of controlling the dynamics of both microtubules and microfilaments. Our hypothesis was that these had an important role in the regulation of the germ plasm mRNA localization in the zebrafish embryo. In particular, several lines of evidence made us focus on the role of the RhoGTPase RhoA in this phenomenon.

By immunofluorescent staining, we observed the presence of RhoA and its ROCK effector during the first divisions of the fish embryo. We performed *in situ* hybridizations of *nanos*, *vasa* and *dazl* mRNAs, germ plasm markers. Simultaneous RhoA staining and germ plasm markers showed an overlap in the localization of both components in the cell division furrows.

We evaluated the effect of enzymatic and pharmacological inhibitors of RhoA or ROCK on the spatial distribution of the germ plasm mRNAs. We observed a correlation between the decrease of the membrane Rho due to its inhibition and defects in the location of the mRNAs.

In addition to early embryogenesis, the effect of germ plasm delocalization in the determination of germ cells was analyzed. Inhibition of RhoA or ROCK causes a decrease in this population due to previous localization errors.

RhoA and ROCK inhibitors also cause disorganization of microtubules but not of actin filaments, suggesting that RhoA predominantly controls the migration of germ plasm through its effects on tubulin.

This work shows that the RhoA and ROCK proteins are closely related to the germ plasm of the zebrafish. In particular, ROCK concentrates on the spots corresponding to the germ plasm in the 2- and 4-cell stages. In addition, the activity of RhoA and ROCK is necessary to coordinate the microtubules during the migration of the germ plasm mRNAs in the early embryo. The absence of RhoA and ROCK activity results ultimately in a decrease in germ cells.

The results support the understanding of the molecular and cellular processes of the determination of the germ line in the zebrafish. More generally, they contribute to the knowledge of the mechanisms of the cytoskeleton that promote the heterogeneous localization of mRNAs within the cell.

Abreviaturas

mRNA	RNA mensajero	
CGP	Células Germinales Primordiales.....	3
UTR	Región no traducida	
FMA	Arreglo de microtúbulos del septo (por <i>Furrow Microtubule Array</i>)	13
GDI	<i>Guanine nucleotide Dissociation Inhibitor</i>	16
GAP	<i>GTPase Activating Protein</i>	16
GEF	<i>Guanine nucleotide Exchange Factor</i>	16
PFA	Paraformaldehído	26
PBS	Phosphate buffered saline	27
PBST	PBS + Triton X-100 o Tween	
NBT/BCIP	<i>Nitro Blue Tetrazolium/ 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphate</i>	
cDNA	DNA complementario	29
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa	
TCA	Ácido tricloroacético	
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético	
myo-p	miosina fosforilada.....	15

Índice general

1. Introducción	1
1.1. Localización subcelular de mRNAs	1
1.2. El plasma germinal	3
1.3. El pez cebra	7
1.3.1. El plasma germinal en el pez cebra	8
1.3.2. El citoesqueleto en la citocinesis y migración del plasma germinal	12
1.4. Las Rho-GTPasas, reguladoras del citoesqueleto	16
1.4.1. Las RhoGTPasas y el transporte de mRNAs	18
2. Antecedentes	20
3. Hipótesis y Objetivos	24
3.1. Hipótesis	24
3.2. Objetivos	24
4. Métodos	25
4.1. Cuidado de los peces, recolección de embriones e identificación de etapas del desarrollo.	25
4.2. Inmunofluorescencia en embriones completos	25
4.2.1. Inmunofluorescencia de RhoA-GTP	26
4.2.2. Inmunofluorescencia de tubulina	27
4.2.3. <i>Buffers</i>	28
4.3. Clonación de fragmentos de mRNA y síntesis de sondas	28
4.3.1. Extracción de RNA	28
4.3.2. Síntesis de DNA complementario	29
4.3.3. PCR	30
4.3.4. Clonación del producto de PCR en un plásmido	31
4.3.5. Preparación de células competentes y transformación	31
4.3.6. Síntesis de sondas de RNA marcadas con digoxigenina	32
4.3.7. Medios de cultivo y <i>buffers</i>	33
4.4. Hibridación <i>in situ</i> en embriones u ovarios completos	34
4.4.1. <i>Buffers</i>	35
4.5. Hibridación <i>In situ</i> fluorescente + Inmunofluorescencia	36
4.5.1. <i>Buffers</i>	37

4.6.	Inyección de inhibidores	37
4.6.1.	<i>Buffers</i>	38
4.7.	Análisis filogenéticos, estadísticos y procesamiento de imágenes	38
4.8.	Clasificación de embriones por inspección visual	40
5.	Resultados	41
5.1.	Localización de las Rho GTPasas durante la localización del plasma germinal	41
5.2.	Participación de Rho en la localización de los mRNAs del plasma germinal animal	44
5.2.1.	Inhibición de Rho con C3	44
5.2.2.	Papel de Rho: Inhibición con Rhosin	48
5.3.	Papel de ROCK en la localización del plasma germinal	51
5.4.	Efecto de los inhibidores sobre los microtúbulos	55
5.5.	Participación de la vía Rho/ROCK en la localización del plasma germinal vegetal	57
5.6.	Efectos de la deslocalización del plasma germinal durante las 4 células sobre el desarrollo de células germinales en las etapas de 128 células y 24 hpf . . .	58
6.	Discusión	62
6.1.	Papel de RhoA y ROCK en el control del citoesqueleto y la localización del plasma germinal	62
6.1.1.	Localización de las Rho GTPasas	62
6.1.2.	Maduración del septo: citoesqueleto y localización del plasma germinal	63
6.1.3.	RhoA y localización del plasma germinal fuera del septo	65
6.1.4.	Papel de los efectores de Rho	65
6.1.5.	Posible interacción con la señalización de calcio	67
6.2.	Migración del plasma germinal vegetal	68
6.3.	La deslocalización del plasma germinal altera la determinación de la línea germinal	69
7.	Conclusiones	72
8.	Perspectivas	73
8.1.	Localización de ROCK y la miosina fosforilada en los gránulos germinales .	73
8.2.	Fenotipos de deslocalización del plasma germinal	73
8.3.	Papel de otros efectores de RhoA	74
8.4.	Mecanismo de localización de <i>dazl</i>	75
A.	Apéndice	76
A.1.	Análisis de secuencias filogenético	76
A.2.	Expresión de mRNAs de los 5 genes <i>rho</i> en pez cebra durante la ovogénesis	79

Índice de figuras

1.1. Funciones de localización subcelular de mRNAs	2
1.2. Estrategia experimental de Illmensee y Mahowald en 1974 para trasplante del plasma germinal en embriones de <i>Drosophila melanogaster</i>	4
1.3. Resumen del desarrollo del pez cebra	8
1.4. Esquema de la migración del plasma germinal durante la ovogénesis y la embriogénesis del pez cebra	12
1.5. Papel del citoesqueleto en la translocación del plasma germinal durante las dos primeras divisiones celulares del pez cebra.	14
1.6. Ciclo de regulación de las RhoGTPasas	17
2.1. Colocalización del plasma germinal y RhoA en ovocitos	21
2.2. Patrón de localización de RhoA en embriones de 1 a 4 células por inmunofluorescencia.	22
2.3. Localización de <i>nanos</i> en embriones control e inyectados con C3	23
4.1. Mapa del plásmido TOPO	33
4.2. Esquema de anomalías de localización del plasma germinal animal	40
5.1. Localización de RhoGTPasas, ROCK y miosina durante las primeras divisiones de la embriogénesis	42
5.2. Localización de RhoA en 2, 4 y 8 células	43
5.3. Localización de RhoA-GTP en 2, 4 y 8 células	43
5.4. Efecto de la inyección de C3 sobre RhoA y el plasma germinal	45
5.5. Cuantificación de anomalías en la localización del plasma germinal producidas por C3	47
5.6. Supervivencia de embriones inyectados con distintas concentraciones de C3	48
5.7. Inhibición con Rhosin y efecto en el plasma germinal	49
5.8. Efecto de la inhibición de Rho sobre el citoesqueleto de actina	51
5.9. Localización de ROCK y la miosina fosforilada	52
5.10. Efecto de la inhibición de ROCK con H-1152 sobre la localización del plasma germinal	53
5.11. Distribución de la actina en embriones inyectados con H-1152	54
5.12. Efecto de la inhibición de ROCK con H-1152 sobre la miosina fosforilada	55
5.13. Efecto de los inhibidores sobre los microtúbulos	56
5.14. Efecto de los inhibidores sobre los mRNAs de <i>dazl</i> y <i>zorba</i>	58

5.15. Efecto de la inhibición de Rho/ROCK sobre la especificación de la línea germinal	60
5.16. Efecto de la inhibición de ROCK sobre las células germinales de la blástula .	61
6.1. Tipos de defectos en la localización del plasma germinal del polo animal . .	67
A.1. Comparación de secuencias de las proteínas Rho de pez cebra	78
A.2. Árbol filogenético de las secuencias de aminoácidos de RHOA,-B y -C de humano y sus homólogos en peces	79
A.3. RT-PCR e hibridaciones <i>in situ</i> de los cinco parálogos <i>rho</i> en pez cebra. . . .	80

Índice de tablas

1.1. RNAs mensajeros y/o proteínas frecuentemente presentes en el plasma germinal de diferentes animales	6
1.2. Etapas de la ovogénesis en pez cebra	10
4.1. Anticuerpos primarios utilizados	26
4.2. Oligonucleótidos utilizados para la clonación de fragmentos génicos a partir de cDNA.	30
4.3. Identificadores de ENSEMBL de las secuencias de aminoácidos utilizadas para el árbol filogenético. RHOA, RHOB y RHOC de humano y sus homólogos en diferentes especies de peces.	39
5.1. Proporción de embriones anormales inyectados con C3 por categoría	46
5.2. Proporción de embriones anormales inyectados con Rhosin por categoría .	50
5.3. Defectos en el número o distribución de las células germinales en embriones de 24 horas inyectados con Rhosin o H-1152 al principio del desarrollo . . .	59
A.1. Número de aminoácidos idénticos entre pares de Rho's predichas por el genoma de pez cebra	76

1

Introducción

1.1. Localización subcelular de mRNAs

Se acostumbra pensar que un mRNA, una vez exportado del núcleo, se difunde homogéneamente por el citoplasma, donde se traduce a la proteína que codifica. Sin embargo, muchas veces el camino del mRNA no termina en este punto sino que le espera una fina regulación post-transcripcional que incluye su localización a regiones específicas dentro de la célula (Czaplinski y Singer, 2006).

Se ha propuesto que la localización subcelular de mRNAs cumple diversas funciones (ver ejemplos en la Figura 1.1; (revisado en Martin y Ephrussi, 2009; Holt y Bullock, 2009):

1. La determinación de destinos celulares a través de la herencia asimétrica de mRNAs durante la división celular.
2. La localización acoplada a represión traduccional facilita que una proteína se traduzca en el momento, lugar y en respuesta al estímulo adecuados. Esto permite, por ejemplo, la generación de gradientes de concentración de proteínas por medio de la traducción local y selectiva de mRNAs.

Existen numerosos estudios sobre los mRNAs *oskar*, *gurken*, *bicoid* y *nanos* que los han establecido como ejemplos clásicos de generación de gradientes y patrones por localización durante la ovogénesis de *Drosophila*. La localización de *bicoid* al polo anterior y de *nanos* y *oskar* al polo posterior del ovocito es necesaria para la determinación de este eje (revisado en Kugler y Lasko, 2009). Cuando el ovocito es fecundado, los mRNAs de *bicoid* y *nanos* comienzan a traducirse, produciendo sus respectivas proteínas en gradientes opuestos. El mRNA de *oskar* se localiza al polo posterior antes que *nanos* (Forrest y Gavis, 2003). La traducción de la proteína Oskar en el polo posterior induce la formación de largos filamentos de actina que son necesarios para el anclaje de otros mRNAs y proteínas en esta región del embrión, entre los que se encuentra el mRNA de *nanos* (Ephrussi et al., 1991). Por su parte, la localización del mRNA de *gurken* al extremo dorsal-anterior del ovocito es necesaria para la formación del eje dorso-ventral del embrión (revisado en Riechmann y Ephrussi, 2001).

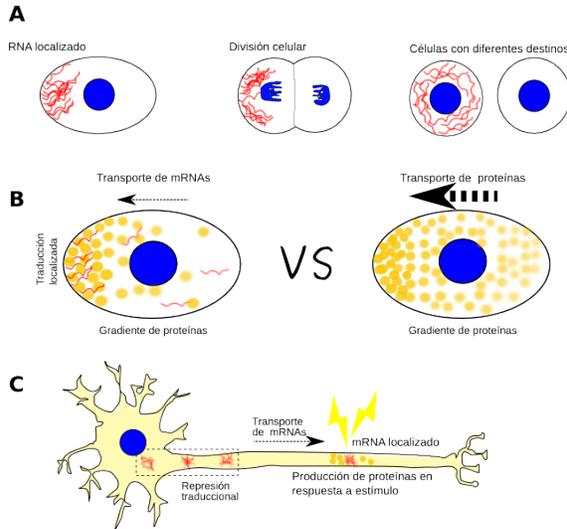


Figura 1.1. Funciones de localización subcelular de mRNAs. A) Un mRNA localizado a un polo de la célula es heredado asimétricamente durante la división celular. Este mRNA puede ser un factor de diferenciación dando a cada una de las células hijas destinos distintos. B) Cuando es necesaria la generación de un gradiente de proteína (un morfógeno, por ejemplo), es más eficiente transportar un mRNA y generar el gradiente a partir de su traducción que transportar una por una las proteínas. C) Una célula (por ejemplo, una neurona) puede localizar mRNAs a una región específica donde la traducción de su proteína se regula no sólo espacialmente, sino temporalmente.

El citoesqueleto es necesario para la localización de estos mRNAs: *oskar*, *bicoid* y *gurken* migran gracias a la red de microtúbulos y a la proteína motora dineína, mientras que la localización del mRNA de *nanos* se da por su difusión y retención selectiva por filamentos de actina en el polo posterior (revisado en Kugler y Lasko, 2009).

Además de servir como transporte y anclaje para los mRNAs localizados, el citoesqueleto puede regular la traducción de mRNAs: un ejemplo es el mRNA de la *ciclina B1*, el cual se localiza en gránulos en el polo animal de ovocitos inmaduros de pez cebra, donde se encuentra reprimido traduccionalmente. Los microfilamentos de actina mantienen la estabilidad de los gránulos de mRNA y por lo tanto, controlan indirectamente el momento en que se traduce la ciclina B1 (Kotani et al., 2013).

La localización de mRNAs es esencial para el desarrollo de ovocitos y embriones tempranos de muchas especies animales (Medioni et al., 2012). Los ovocitos y embriones tempranos son células gigantes en comparación con otros tipos celulares. Asimismo, los ovocitos de la mayoría de las especies están polarizados pues deben contener la información necesaria para la formación de los ejes embrionarios. La transcripción del DNA a mRNA se inhibe luego de la fertilización durante un periodo prolongado. Es justo durante este periodo que varias señales espaciales sobre la orientación del embrión deben coordinarse de manera precisa en el tiempo; así que esta responsabilidad recae sobre mRNAs y proteínas que muchas veces se localizan asimétricamente.

Ya hemos mencionado los ejemplos clásicos de mRNAs localizados en el embrión de *Drosophila melanogaster*, sin embargo, este fenómeno está mucho más extendido: un estudio se dedicó a ubicar 2198 mRNAs distintos por hibridación *in situ* en etapas tempranas del desarrollo de la mosca; de ellos, el 71 % tienen una localización subcelular específica. La variedad de patrones de localización va desde grandes dominios embrionarios a localizaciones más acotadas en membranas, núcleos o centrosomas (Lécuyer et al., 2007). La gran cantidad de mRNAs localizados, así como la gran variedad de patrones sugieren que la localización de mRNAs es un fenómeno muy importante para la regulación de la fisiología celular.

La formación del plasma germinal es un ejemplo muy claro de la regulación de un proceso clave del desarrollo embrionario en diversas especies por medio de la localización de mRNAs.

1.2. 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. Se piensa que 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 (Gilbert, 2010).

Se conocen dos mecanismos generales para determinar la segregación de las CGP: la epigénesis y la preformación. El primer mecanismo de segregación, la epigénesis, la utilizan los mamíferos y ajolotes, entre otros. En ésta, las CGP son inducidas por interacciones intercelulares durante etapas más avanzadas del desarrollo gracias a genes transcritos por el genoma del embrión. Por su parte, la preformación se vale de factores de herencia materna, es decir, mRNAs y proteínas que provienen del genoma de la madre y que son heredados al embrión por estar presentes en el citoplasma del óvulo al momento de la fertilización (Marlow, 2010). En el caso de la preformación, ciertos mRNAs y proteínas son depositados durante la ovogénesis dentro de una región citoplásmica específica conocida como plasma germinal. Luego de la fertilización, el cigoto comienza a dividirse provocando una herencia asimétrica del plasma germinal. Las células a las que se segrega el plasma germinal durante este momento son las que se convertirán en las CGP. La estrategia de preformación 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 (Gilbert, 2010).

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 base de la totipotencialidad, al dar lugar al cigoto. 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 en Wylie, 1999). A este respecto, es interesante que hay un grupo pequeño de genes que están relacionados con la formación de las células germinales y otras células multipotenciales en variedad de animales. Estos genes, que se listan en la Tabla 1.1, incluyen a *vasa*, *nanos*, *dazl* y *piwi* y comparten características comunes: muchos codifican para proteínas de unión a RNA y funcionan en la regulación post-traduccional: degradación de mensajeros, control de la expansión de retrotransposones o la traducción de proteínas (Ewen-Campen et al., 2010); lo cual apoya la hipótesis de la formación de células germinales por inhibición de los genes de otros destinos celulares (Ciosk et al., 2006; Seydoux y Braun, 2006).

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 trece 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 en el polo posterior del embrión. Illmensee y Mahowald, en 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 a la conclusión de que el citoplasma en el polo posterior contiene el determinante de la línea germinal (ver Figura 1.2).

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 por microscopía electrónica. 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 en Ikenishi, 1998).

Los homólogos en pollo de *vasa* y *dazl*, marcadores del plasma germinal, tiñen en ovocitos de pollo una estructura granular, perinuclear, que también contiene espectrina, retículo endoplásmico y mitocondrias (Tsunekawa et al., 2000; Lee et al., 2015); sugiriendo

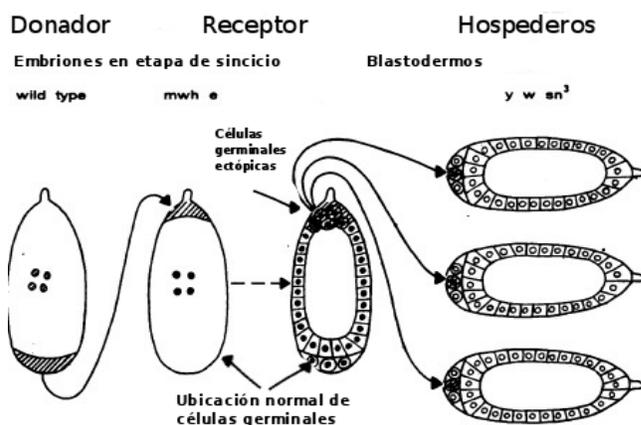


Figura 1.2. Estrategia experimental de Illmensee y Mahowald (1974) para trasplante del plasma germinal entre embriones de *Drosophila melanogaster* (Illmensee y Mahowald, 1974). Se transplantó plasma polar desde el polo posterior del embrión donador, al polo anterior del receptor (zonas sombreadas), 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 (Figura tomada de Illmensee y Mahowald, 1974).

la presencia de una nube mitocondrial asociada a componentes del plasma germinal, de forma análoga a *Xenopus*, *Danio* y *Drosophila*. Luego de la fertilización, el plasma germinal se localiza en la parte basal de los primeros septos de división celular, de un modo muy parecido a la localización del plasma germinal en pez cebra, que se explicará más adelante. (Tsunekawa et al., 2000; Lee et al., 2015).

Los gránulos P son el plasma germinal de *C. elegans* y 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. 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 ambos los gránulos P y son las fundadoras de la línea germinal (revisado en Ikenishi, 1998).

Es interesante que en los organismos en los que no existe un plasma germinal, los homólogos de los genes que lo componen (e. g., *nanos*, *vasa*, *piwi*) también son necesarios para la formación de la línea germinal (Tabla 1.1), aunque también se expresan en otras poblaciones multipotenciales (Johnson et al., 2005).

Algunos invertebrados marinos y otros animales escasamente estudiados no segregan sus CGP durante la embriogénesis. En su lugar, estos organismos segregan una población de células troncales que es capaz de dar lugar tanto a células germinales como células somáticas. Estas células troncales también expresan muchos de los genes relacionados con el plasma germinal y, en algunos casos, conservan su potencial hasta la adultez, contribuyendo a la regeneración de tejidos somáticos pero también a la reproducción sexual o asexual (Juliano et al., 2010).

En resumen, la reproducción de todos los animales estudiados hasta ahora depende de un pequeño grupo de genes cuya función se conoce poco. Sin embargo, incluso especies muy emparentadas difieren en el modo de restringir la expresión de estos genes a las futuras células germinales (Solana, 2013; Kumano, 2015).

RNA o Proteína	Función de la proteína codificada	Distribución filogenética	Referencias
<i>vasa</i>	Codifica una helicasa de RNA dependiente de ATP, por lo que podría participar en la regulación traduccional.	Se han encontrado ortólogos en la mayoría de animales estudiados.	Raz (2000); Gustafson y Wessel (2010); Yoon et al. (1997); Komiya et al. (1994); Knaut et al. (2000); Hay et al. (1988); Fujiwara et al. (1994)
<i>nanos</i>	Codifica una proteína con un dominio de zinc CCHC que une RNA con alta afinidad pero baja especificidad	Se han encontrado ortólogos en la mayoría de animales estudiados	Tsuda et al. (2003); Kopranner et al. (2001); Subramaniam y Seydoux (1999); Nüsslein-Volhard et al. (1987)
<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 cebra, mosca de la fruta y ratón.	Vagin et al. (2009); Boswell y Mahowald (1985); Ponting (1997)
<i>dead-end</i>	Probablemente funge como protectora de RNAs contra degradación	Pez cebra, rana africana, gallo, y ratón	Kedde et al. (2007)
<i>daz-like</i>	Se sabe poco sobre su función salvo que une RNA	Pez cebra, rana, mosca, ratón, humano	Houston y King (2000); Eberhart et al. (1996); Reijo et al. (1995); Karashima et al. (2000); Ruggiu et al. (1997)
<i>brul</i>	Tanto el RNA como la proteína se encuentran en el plasma germinal. Múltiples dominios de unión a RNA	Pez cebra, ctenophoros, planaria, mosca de la fruta	Guo et al. (2006); Kim-Ha et al. (1995); Hashimoto et al. (2006)
Piwi	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	Reddien et al. (2005); Cox et al. (1998); Aravin et al. (2006); Malone et al. (2009); Funayama et al. (2010)
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.	Conservada en todos los vertebrados pero un papel en el plasma germinal sólo se ha demostrado en el pez cebra. No obstante, el ratón parece haberlo perdido y podría haberse vuelto un pseudogen en humanos y ajolotes.	Bontems et al. (2009); Marlow y Mullins (2008); Āākugor et al. (2016)
Hermes	Proteína de unión a RNA involucrada en la vía METRO de transporte de RNAs en ovocitos de rana	Pez cebra, rana africana, ratón, humano.	Kosaka et al. (2007); Zearfoss et al. (2004)

Tabla 1.1. RNAs mensajeros y/o proteínas frecuentemente presentes en el plasma germinal de diferentes animales. Adaptado de la revisión de Ewen-Campen et al. (2010).

1.3. El pez cebra

El pez cebra o *Danio rerio* es un organismo nativo de la región del Himalaya. Su pequeño tamaño (5 cm como adulto) y la facilidad de su crianza lo hicieron desde el siglo pasado un pez muy popular en acuarios y estudios de toxicidad ambiental (Laale, 1977).

El pez cebra como organismo modelo también ofrece varias ventajas para el estudio del desarrollo embrionario: su progenie es relativamente numerosa y fácil de obtener durante todo el año; los embriones se desarrollan fuera de la madre desde el momento de la fertilización, lo cual permite estudiar las fases más tempranas del desarrollo; son transparentes, facilitando la observación por diferentes técnicas de microscopía; y su tamaño y accesibilidad posibilitan muchas manipulaciones embrionarias como la microinyección. Estas y otras cualidades hacen a los embriones del pez cebra el modelo favorito de muchos para el estudio de procesos celulares y del desarrollo en vertebrados (Lawson y Wolfe, 2011; Lele y Krone, 1996).

En la Figura 1.3 se esquematizan de manera muy resumida las primeras 24 horas del desarrollo del pez cebra. Luego de la fertilización, divisiones celulares sincronas duplican el número de células cada 15 minutos (Figura 1.3, A-E). Esto da lugar a una blástula que, luego del ciclo celular 13 comienza a adelgazarse radialmente al tiempo que va cubriendo el vitelo en dirección vegetal, un proceso que se conoce como epibolia. Paralelamente, sucede la gastrulación, en la que un grupo de células se internaliza para formar las capas embrionarias (Figura 1.3, F-H) (Warga y Kimmel, 1990). Al concluir la epibolia, comienza la etapa de segmentación, que recibe este nombre por la formación sucesiva de las somitas (Figura 1.3, I). Durante este periodo se forman los primordios de los órganos primarios, ojos, riñones y corazón, entre otros. Al terminar el periodo de segmentación y comenzar el periodo de faríngrula, a las 24 horas luego de la fertilización, el plan corporal ya está bien establecido. Durante este periodo puede verse latir el corazón y comienza la circulación sanguínea (Figura 1.3, J) (Kimmel et al., 1995). Las etapas específicas relevantes para este trabajo son:

- Periodo de división celular temprana; etapas de 2, 4 y 8 células; 45 min a 1.25 horas luego de la fertilización.
- Periodo de blástula temprana; etapas de 128 y 256 células; 2.25 a 2.5 horas luego de la fertilización.
- Periodo de faríngrula; etapa Prim-5, o etapa de 24 horas; 24 horas después de la fertilización.

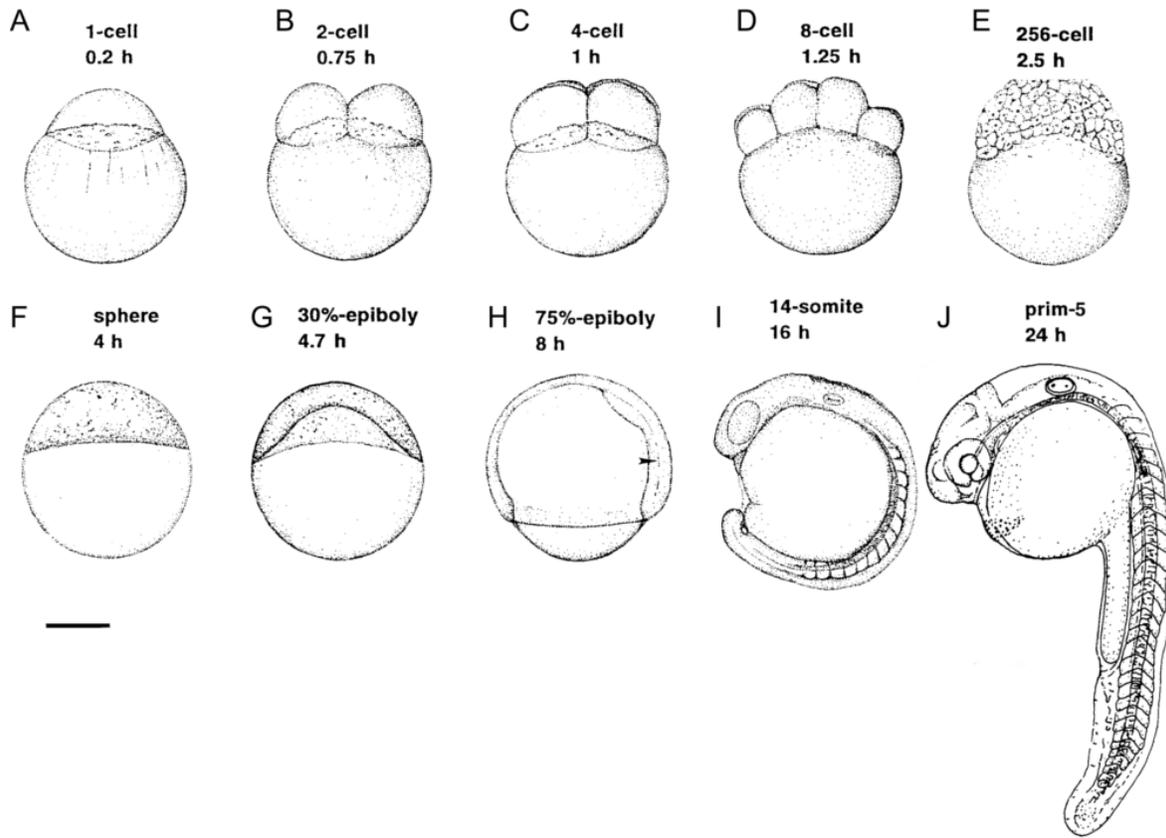


Figura 1.3. Resumen del desarrollo del pez cebra. (A) Minutos después de la fertilización, el primer blastómero se encuentra encima del vitelo en lo que se conoce como etapa de una célula. (A-F) Periodo de división celular: las divisiones del blastómero se suceden cada 15 minutos y duplican el número de células. Casi todas las etapas de este periodo se nombran de acuerdo al número de células presentes en el embrión (*e. g.* etapa de 4-células) (G-H) Gastrulación y epibolia. En este periodo, se internalizan ciertas células para dar lugar a las distintas capas embrionarias (gastrulación) y paralelamente, las células migran hacia el polo vegetal hasta cubrir por completo el vitelo (epibolia). (I-J) Segmentación. Se forman los primordios de los órganos primarios. El latir del corazón ya es distinguible para las 24 horas del desarrollo. Imágenes y estadios de acuerdo a Kimmel et al. (1995). Se han omitido etapas intermedias y se muestran sólo las más significativas para este trabajo y otras etapas representativas.

1.3.1. El plasma germinal en el pez cebra

La clonación del homólogo de *vasa* (Yoon et al., 1997), permitió obtener un primer marcador de la línea germinal en el pez cebra. Como se esperaba, el mRNA de *vasa* marcó a un conjunto de células que por criterios morfológicos se confirmó eran las CGP. Sin embargo, en etapas mucho más tempranas del desarrollo, cuando el embrión apenas posee cuatro células, el mRNA de *vasa* se agregaba en gránulos que se localizaban de una manera muy particular en los extremos de los dos septos de división (Yoon et al., 1997).

Este peculiar patrón de localización se observó también con el mRNA de *nanos* (Korrunner et al., 2001), otro marcador de la línea germinal evolutivamente conservado.

Correspondió a Hashimoto et al., en 2004, tomar ventaja de la facilidad de manipu-

lación embrionaria del pez para constatar la importancia de esta localización de *nanos* y *vasa*. Luego de retirar con una minijeringa las cuatro porciones correspondientes, observaron una disminución considerable en el número de células germinales (Hashimoto et al., 2004) sin afectar visiblemente ningún otro proceso morfogénético. Los investigadores concluyeron que estas cuatro porciones constituían el plasma germinal del pez cebra.

Este patrón característico de localización en el pez ha permitido no sólo confirmar la relación de genes relacionados a la línea germinal que ya se conocían en otros organismos (e.g. *vasa*, *nanos*, *tudor*, *dazl* y *dead-end*), sino que también ha permitido la identificación de nuevas proteínas como *bucky-ball* (Ver tabla 1.1).

Se sabe que los componentes del plasma germinal son de herencia materna. Por esta razón, ahondaremos en la ovogénesis de este organismo.

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 RNAs, proteínas y lípidos con el propósito de convertirse en un óvulo maduro, de 750 µm de diámetro con una rica organización interna, capaz de contender con el estrés osmótico y dar lugar a un nuevo organismo (Lessman, 2009; Selman et al., 1993).

En la etapa I de la ovogénesis, puede encontrarse a los transcritos de *dazl*, *vasa* y *nanos* en una zona muy definida del ovocito: el cuerpo de Balbiani o nube mitocondrial (Kosaka et al., 2007) (Figura 1.4, A), una estructura homóloga al cuerpo de Balbiani de 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).

A menudo, las regiones no traducidas del extremo 3' UTR de muchos mensajeros son señales *in cis*, necesarias y suficientes para su localización. *Xcat2* es el gen homólogo de *nanos* en la rana. Su mRNA se localiza en el cuerpo de Balbiani de los ovocitos del anfibio y la región 3' UTR de *Xcat2* es suficiente para guiar la localización al cuerpo de Balbiani 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 pentanucleónido UGCAC, no se han encontrado en los mensajeros del pez cebra (Kosaka et al., 2007).

No se sabe exactamente qué proteínas se unen a estos motivos en las regiones 3' UTR de los mRNAs del cuerpo de Balbiani. Un candidato es Hermes, una proteína de unión a RNA que se localiza en el cuerpo de Balbiani tanto en rana como en el pez cebra (Zearfoss et al., 2004; Kosaka et al., 2007). Hermes puede unirse al mRNA de *bucky ball* (Heim et al., 2014), que codifica para una proteína conservada en vertebrados y que en pez cebra se demostró que es necesaria para la formación del cuerpo de Balbiani y por consecuencia para el establecimiento del eje animal-vegetal (Marlow y Mullins, 2008) (Ver tabla 1.1). Además del mRNA, Hermes es capaz de interactuar directamente con Bucky-ball. Ésto

puede explicar la formación del cuerpo de Balbiani con ayuda de un ciclo de amplificación: la traducción localizada de Bucky-ball recluta a Hermes, que a su vez une al mRNA de *bucky-ball* promoviendo su traducción localizada (Heim et al., 2014).

El cuerpo de Balbiani está conservado en los ovocitos de muchos animales, parece ser un centro de organización y distribución de mRNAs. Al proseguir a la etapa II la ovogénesis en el pez cebra, el cuerpo de Balbiani migra desde su localización perinuclear hacia el polo vegetal, donde se desintegra. Los mRNAs contenidos en el cuerpo de Balbiani, *vasa* y *nanos*, toman la forma de un gradiente a lo largo del ovocito, con una mayor concentración en el polo vegetal. En la etapa III los RNAs parecen anclarse a la corteza del ovocito; *dazl* localiza en una franja estrecha 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; el mensajero de *nanos* se distribuye de manera homogénea por el citoplasma (Kosaka et al., 2007). Los mRNAs permanecen cada uno en su respectiva localización durante la maduración del ovocito y hasta la fertilización (Figura 1.4, B y C).

magellan es una mutante que muestra la importancia del citoesqueleto en la migración y desintegración del cuerpo de Balbiani. *magellan* es una lesión en el gen que codifica para la proteína *microtubule actin crosslinking factor 1* (Macf1). Los ovocitos de peces mutantes en 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, podemos afirmar que la coordinación dinámica del citoesqueleto es importante en la ovogénesis para la migración del plasma germinal.

Etapa	Diámetro μm	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 animal 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

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 provocan el transporte del ooplasma por medio de corrientes axiales con dirección al polo animal para formar el primer blastómero (Figura 1.3, A) (Fernandez et al., 2006).

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 antes de comenzar las primeras divisiones celulares (Figura 1.4, D) (revisado en Pelegri, 2003).

La excepción son los transcritos de *dazl* y *brul*, que al momento de la fertilización permanecen enriquecidos en el polo vegetal del cigoto y migran posteriormente hacia el polo animal a lo largo de la corteza (Theusch et al., 2006; Suzuki et al., 2000). Por esto, a las partículas ribonucleoproteicas que contienen a *dazl* y *brul* se les conoce como plasma germinal vegetal.

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 (Figura 1.4, F). El plasma germinal vegetal se reúne en esta etapa con el plasma germinal animal. Ambos grupos de mRNAs se localizan en los 4 puntos de la región distal y sobrelapan espacialmente, aunque el plasma germinal vegetal se localiza un poco más cercano al vitelo (Figura 1.4, E y F) (Theusch et al., 2006).

La proteína Bucky-ball, que hemos mencionado como una de los principales componentes del cuerpo de Balbiani, vuelve a tener en esta etapa un papel crucial: Bucky-ball se localiza en la región distal de los septos de división. Al mismo tiempo, la sobreexpresión del mRNA de *ucky-ball* es suficiente para aumentar el número de blastómeros que se reclutan al destino germinal (Bontems et al., 2009; Riemer et al., 2015).

Durante las siguientes divisiones celulares, los agregados del plasma germinal se internalizan a 4 de los blastómeros que se mantienen relativamente inmóviles, cerca del margen del blastodisco (Figura 1.4, G). Alrededor de las 3 horas post-fertilización, las células que heredaron el plasma germinal se especifican como CGP, coincidiendo más o menos en el tiempo con la transición de la blástula media y la activación de la transcripción cigótica en las células somáticas. Posteriormente, aproximadamente en el inicio de la gastrulación, las CGP del pez adquieren movilidad y migran hacia la línea media en formación, siguiendo señales específicas de atracción. De este modo, 24 horas después de la fertilización, se pueden encontrar dos grupos de CGP a ambos lados de la línea media del embrión, en la que será su posición definitiva dentro de las futuras gónadas (Figura 1.4, H) (Blaser et al., 2005; Raz, 2003).

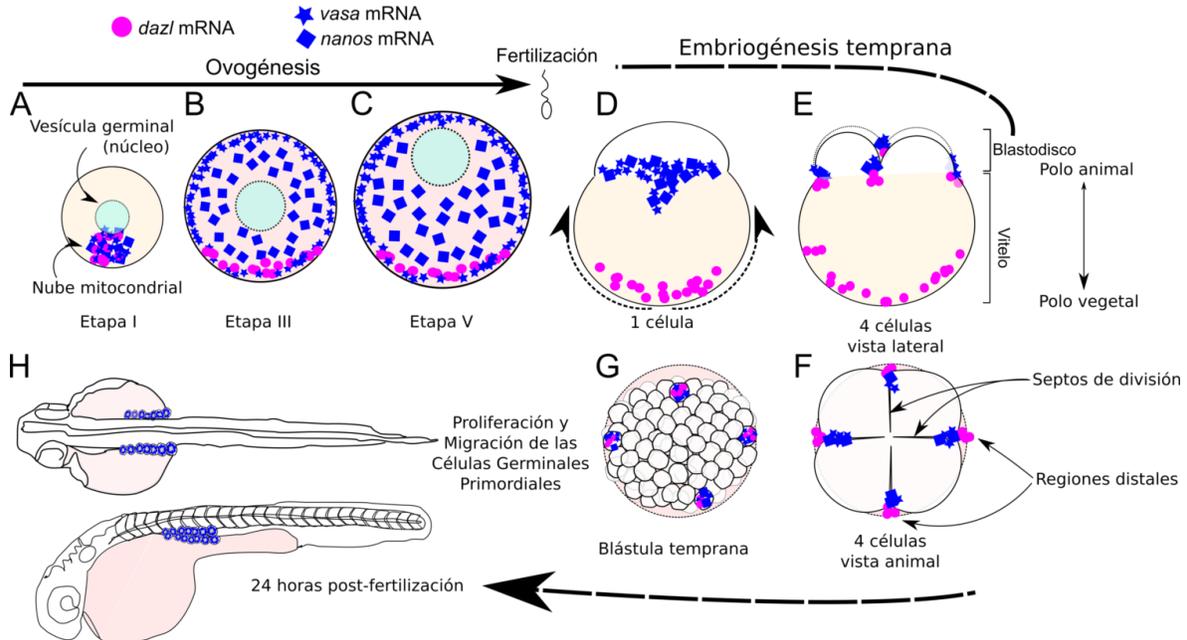


Figura 1.4. Esquema de la migración del plasma germinal durante la ovogénesis y la embriogénesis temprana. En la Etapa I de la ovogénesis, el plasma germinal está asociado a la nube mitocondrial, formando un cúmulo conocido como cuerpo de Balbiani, adyacente al núcleo (A). A partir de la etapa III (B) y hasta la etapa V (C), los mensajeros de *vasa* (estrellas azules) y *dazl* (círculos rosas) se asocian a la corteza, en el caso de este último, de manera asimétrica concentrándose sólo en el polo vegetal. *nanos*, cuyo mRNA está representado como cuadrados azules, se distribuye homogéneamente por el citoplasma. Luego de la fertilización, los mRNAs germinales del polo animal (*vasa* y *nanos*, entre otros) se translocan a la primera célula (D), distinguiéndose de *dazl*, representante del plasma germinal vegetal, cuya translocación es tardía. Durante las primeras dos divisiones ambos grupos convergen por vías distintas a los septos de división (E y F). Más adelante en el desarrollo, los agregados del plasma germinal se internalizan a los blastómeros que se convertirán en las CGP (G y H).

1.3.2. El citoesqueleto en la citocinesis y migración del plasma germinal

En este trabajo, nos concentramos en buena medida en la breve etapa inmediatamente posterior a la fertilización y que abarca las primeras tres divisiones celulares (Figura 1.3, A-D). Aunque breve, este periodo ofrece una dinámica muy interesante de migración de mRNAs y que hasta hace poco había sido escasamente estudiada.

Lo que se conoce sobre los procesos celulares de estas etapas tempranas se debe principalmente al estudio de los fenotipos derivados de dos tamizados de mutantes de herencia materna (Dosch et al., 2004; Pelegri et al., 2004).

Es importante recordar que al momento de la fertilización, el plasma germinal puede dividirse en dos con base en su localización: el plasma germinal animal, representado por *vasa* y *nanos*; y el plasma germinal vegetal, cuyo representante en la mayoría de los estudios es el mensajero de *dazl*.

En la etapa de 1 célula, en la primera media hora luego de la fertilización, el plasma

germinal animal y el plasma germinal vegetal se encuentran en polos opuestos del embrión (Figura 1.5, A). Los microfilamentos de actina se organizan en anillos concéntricos distribuidos por todo el blastodisco. Los mRNAs del plasma germinal animal se agrupan en gránulos que parecen estar asociados a los filamentos de actina. Por su parte, el áster de microtúbulos se localiza en la región central del blastodisco (Figura 1.5, B) (Theusch et al., 2006). Los microtúbulos que emanan del áster van avanzando progresivamente hacia la periferia del blastodisco. Se piensa que esta acción de los microtúbulos desplaza a los filamentos de actina y a los gránulos de plasma germinal asociados a ellos. Conforme son desplazados hacia la periferia, los gránulos de mRNA van fusionándose en partículas de mayor tamaño (Figura 1.5, C) (Theusch et al., 2006).

Paralelamente a estos movimientos, el plasma germinal vegetal va migrando gradualmente por la corteza del vitelo en dirección al blastodisco (Figura 1.5, D). Cuando el áster se duplica durante la primera división celular, los microtúbulos siguen desplazando al plasma germinal pero ahora en dos direcciones contrapuestas que coinciden en el futuro surco de división. Los gránulos del plasma germinal siguen agregándose en partículas cada vez mayores, al mismo tiempo que se enriquecen en el septo de división, pues este es el lugar donde los microtúbulos de los husos mitóticos se encuentran (Figura 1.5, E y F) (Pelegrí et al., 1999; Nair et al., 2013).

Para que los microtúbulos desplacen al plasma germinal animal hacia la periferia se requiere una interacción física entre la tubulina y la actina. Una de las proteínas que puede cumplir esta función se descubrió durante el estudio de la mutante *motley* de pez cebra. Ésta es una mutante en el gen *birc5b*, homólogo de la Survivina, que en mamíferos es un componente del *Chromosomal Passenger Complex* (Vagnarelli y Earnshaw, 2004). Los embriones *motley* presentan defectos en la segregación de los cromosomas durante la meiosis y mitosis. Ésto es esperado, dada la homología con la Survivina, sin embargo, estos mutantes también presentan defectos en la organización de microtúbulos y de filamentos de actina en la embriogénesis temprana, indicando que este gen pudiera mediar la interacción entre estos componentes. Los mRNAs del plasma germinal no se localizan al septo de división celular en embriones mutantes *motley*. Aunado a esto, la agregación de estas partículas hacia la periferia antes de la primera división se obstaculiza por la falta de *birc5/motley* (Nair et al., 2013).

Otro conjunto de microtúbulos, el Arreglo de microtúbulos del septo (FMA), 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 sí (Figura 1.5, F) (Jesuthasan, 1998). Los microtúbulos del FMA sufren una reorganización dependiente de miosina, enriqueciéndose y orientándose hacia la región distal del septo. Esto coincide temporal y espacialmente con la compactación del plasma germinal animal (Figura 1.5, H) (Urven et al., 2006). 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 y Pelegrí, 2010).

El mismo proceso que ocurrió en el primer septo de división se repite en el segundo, de modo que para el final de la etapa de cuatro células, el plasma germinal animal se

encuentra compactado en 4 puntos. Para este momento, el plasma germinal vegetal ha alcanzado el blastodisco y se encuentra en los 4 puntos con el plasma germinal animal (Figura 1.5, G, asteriscos) (Theusch et al., 2006).

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 caracterizan por un septo de división celular acortado que no se extiende hacia la región distal. En los mutantes *cei*, el reclutamiento

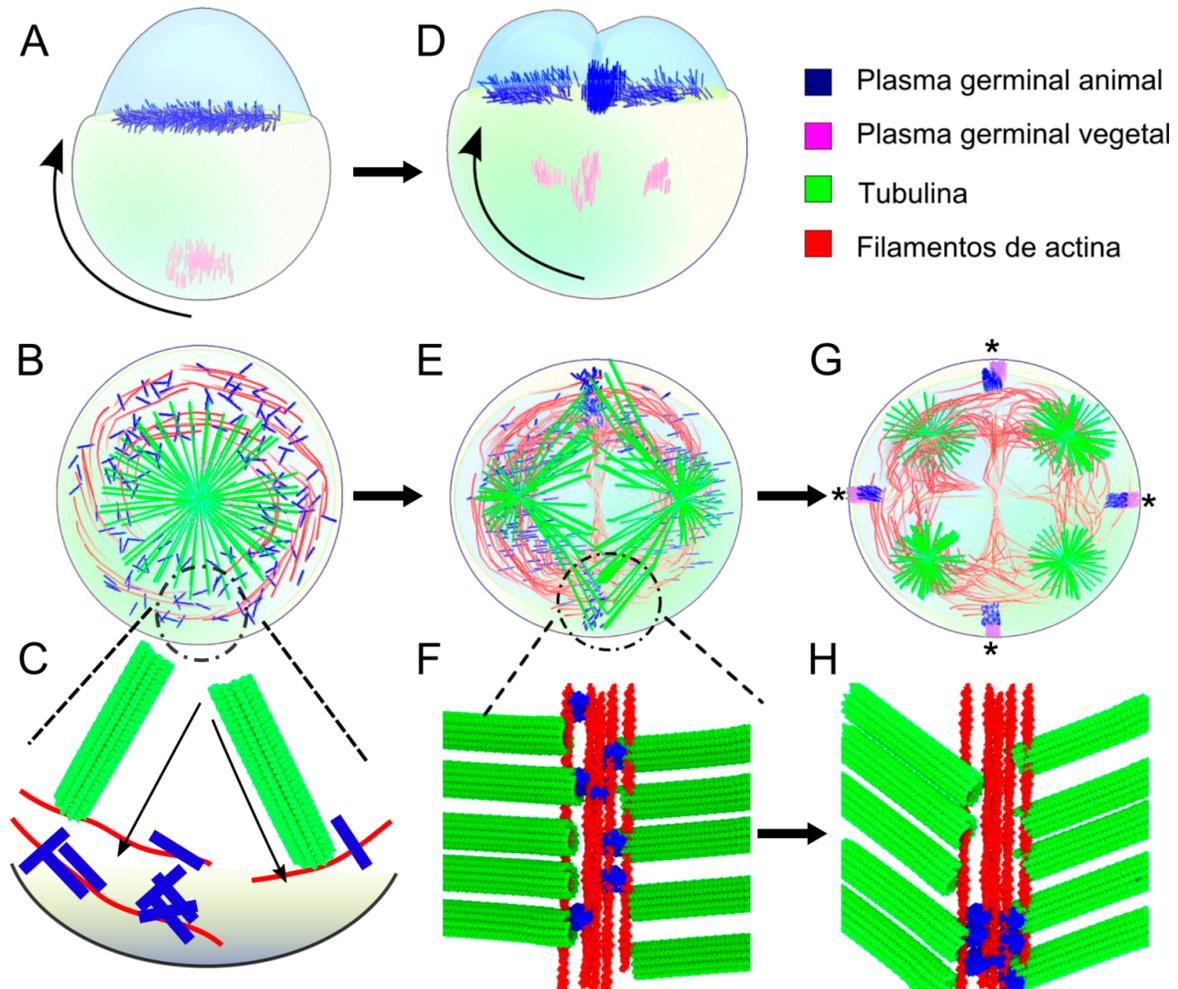


Figura 1.5. Papel del citoesqueleto en la translocación del plasma germinal durante las dos primeras divisiones celulares. (A,D) Vista lateral. La translocación del plasma germinal animal (azul) al blastodisco antecede a la del plasma germinal vegetal (magenta). (B, E, G) Vista animal ilustrando distribución de actina, tubulina y las partículas de plasma germinal animal. (*) Localización final del plasma germinal en los septos de división. (C, F, H) Acercamiento a las estructuras del citoesqueleto y su interacción con el plasma germinal animal. 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 (C). Durante las primeras divisiones celulares, la compactación del plasma germinal coincide con la remodelación del FMA (F, H) (basado en Lindeman y Pelegri, 2010)

del plasma germinal al septo de división 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 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).

En cuanto a la conexión entre el plasma germinal y el citoesqueleto, la proteína más interesante es quizás la miosina II no-muscular quien se activa al ser fosforilada en su cadena ligera regulatoria. Se ha descubierto que la miosina II fosforilada marca la región distal del septo de división y colocaliza con las partículas de mRNA de *nanos* (Nair et al., 2013; Eno y Pelegri, 2013). La miosina fosforilada (myo-p) se ha utilizado como un marcador del plasma germinal en el pez (Eno y Pelegri, 2013), a pesar de no tener ningún papel conocido en la determinación de la línea germinal. Sin embargo, la inhibición farmacológica de la actividad de la miosina obstaculiza la compactación del plasma germinal dentro del septo (Urven et al., 2006).

Por último, se ha demostrado que otro componente del citoesqueleto, la Kinesina-1, es necesaria para la agregación del plasma germinal al septo de división. El hecho de que la Kinesina-1 sea esencial para la agregación del plasma germinal en pez cebra, pero su ausencia no afecte de ningún modo la división celular, muestra que estos dos procesos relacionados (migración del plasma y citocinesis) son hasta cierto punto independientes (Campbell et al., 2015).

Los mRNAs del plasma germinal no son los únicos con una localización diferencial en el polo animal: el mRNA de *squint* codifica un morfógeno de la familia Nodal y se localiza en dos blastómeros en la etapa de 4 células del desarrollo del pez cebra. La localización temprana de este mensajero es necesaria para la correcta formación del eje dorsoventral del embrión. La localización de *squint* depende de la integridad de los microtúbulos pero no de la actina. No se conoce el mecanismo exacto por el cual el mRNA de *squint* se concentra en los blastómeros dorsales en la etapa de cuatro células o cómo se elige a estos blastómeros (Gore et al., 2005).

Por otro lado, se conoce poco acerca de la localización de los mRNAs del plasma germinal vegetal, *dazl* y *bruno*. Existía la hipótesis de que la migración del mRNA de *dazl* es dependiente de microtúbulos, pues existe durante un breve periodo un arreglo de microtúbulos en la región más vegetal del vitelo que funciona como pista para la migración de un grupo distinto de mRNAs: los determinantes dorsales. Los mRNAs que codifican para las proteínas Syntabulina (Nojima et al., 2010), Wnt8 (Lu et al., 2011) y Grip2a (Ge et al., 2014) se localizan, al igual que *dazl*, en el polo vegetal pero migran gracias al arreglo de microtúbulos de manera asimétrica hacia el futuro lado dorsal. La dirección de este arreglo de microtúbulos efímero predice la orientación del lado dorsal, tan temprano en el desarrollo que ni siquiera ha terminado el primer ciclo celular (Tran et al., 2012).

No obstante el parecido macroscópico entre la localización vegetal del plasma germinal

y los determinantes dorsales, a nivel subcelular, estos dos grupos no comparten el mismo espacio: los determinantes dorsales ocupan una región más externa de la corteza mientras que *dazl* ocupa una región adyacente más profunda. Más aún, a diferencia de los determinantes dorsales, *dazl* tiene una migración simétrica que depende de filamentos de actina (Welch y Pelegri, 2014).

La agregación del plasma germinal a los lugares correctos es esencial para la formación de un organismo fértil. Aún con la presencia de todos los determinantes germinales, si éstos se dispersan y no se agregan correctamente en la región distal, las células germinales no se especifican en el embrión (Campbell et al., 2015). Al mismo tiempo, para la localización correcta del plasma germinal se requieren componentes del citoesqueleto, proteínas motoras y adaptadoras que muchas veces participan en eventos paralelos del desarrollo. Las señales que coordinan la acción de diferentes componentes del citoesqueleto para asegurar la correcta localización del plasma germinal aún no se conocen.

1.4. Las Rho-GTPasas, reguladoras del citoesqueleto

Las Rho-GTPasas son una familia de proteínas pequeñas que participan como reguladoras de múltiples procesos celulares, tales como la remodelación del citoesqueleto, la apoptosis, la regulación génica y el establecimiento de polaridad celular (Etienne-Manneville y Hall, 2002). Se dice que actúan como “interruptores” o *switches* porque ciclan entre un estado inactivo, en unión a GDP y un estado activo, en unión a GTP. En su estado inactivo, las Rho-GTPasas son secuestradas en el citoplasma por proteínas conocidas como *Guanine nucleotide Dissociation Inhibitors* (GDIs) (DerMardirossian y Bokoch, 2005). En contraste, en su estado activo las Rho GTPasas se translocan a la membrana, donde pueden reconocer a sus efectores y uniéndose a ellos, generar una respuesta. En el momento en que el GTP se hidroliza, la asociación GTPasa-efector se disuelve, y el *switch* vuelve a apagarse.

Los **efectores** de las Rho GTPasas son proteínas con funciones diversas, cinasas, proteínas de andamiaje o facilitadoras de la polimerización del citoesqueleto (revisado en Aelst y D'Souza-Schorey, 1997; Bishop y Alan, 2000).

Dos tipos de proteínas regulan el cambio del estado de las Rho GTPasas. Las proteínas *GTPase Activating Proteins* (GAPs) catalizan la hidrólisis del GTP a GDP e inactivan a las Rho GTPasas (revisado en Moon, 2003). Por el contrario, las proteínas *Guanine nucleotide Exchange Factors* (GEFs), promueven la disociación del GDP y la unión de un GTP, activando a las Rho GTPasas (Figura 1.6) (revisado en Rossman et al., 2005).

En mamíferos, la familia de las Rho-GTPasas está compuesta por 20 miembros, pero sólo de tres se dispone de una buena cantidad de información funcional: Rac1, CDC42 y RhoA. Esto se debe a que estas tres son las fundadoras de la familia y son las únicas presentes en todos los organismos desde la levadura hasta los cordados (Boureux et al., 2006). Estudios en varios tipos celulares muestran que Rac1, CDC42 y RhoA conectan a receptores de la membrana con el ensamblaje de estructuras de actina-f (revisado en Etienne-Manneville y Hall, 2002).

De las 3 Rho GTPasas más estudiadas (Rho, Rac y Cdc42), RhoA en particular regula

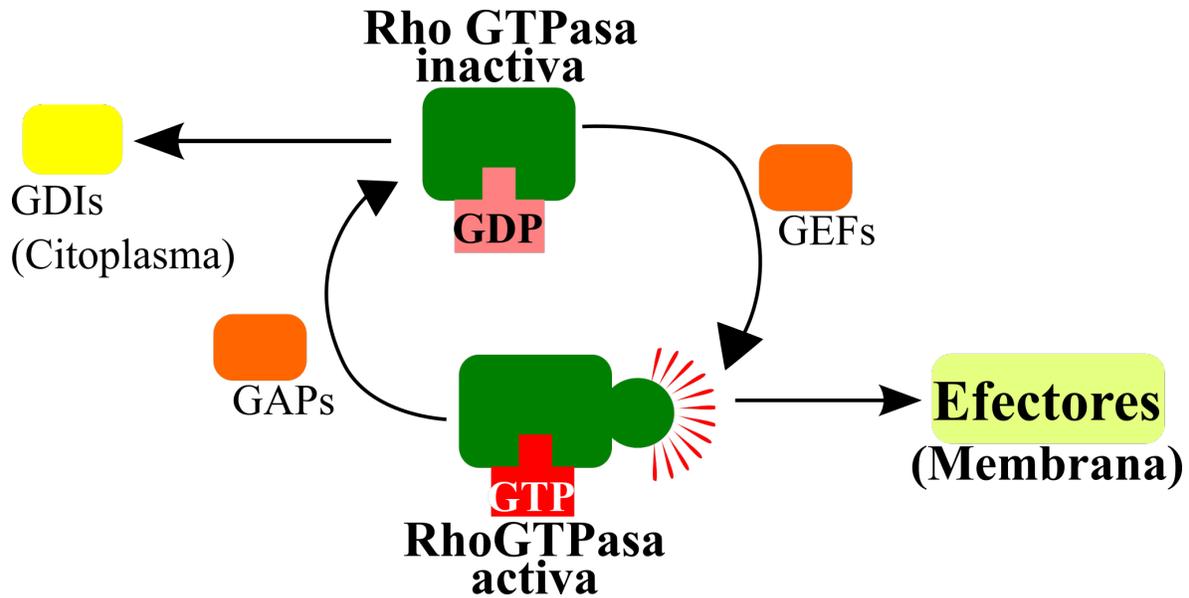


Figura 1.6. Ciclo de regulación de las RhoGTPasas.

positivamente la citocinesis en muchos tipos de células animales (revisado en Piekny et al., 2005). Rho participa principalmente a través de tres de sus efectores: las forminas, ROCK y Citron cinasa. Las forminas son proteínas con un dominio FH2, capaces de nuclear filamentos lineales de actina (Young y Copeland, 2010). Por medio de las forminas, RhoA promueve la polimerización de filamentos de actina en el septo de división (Watanabe et al., 2010). Por su lado, ROCK fosforila a la cadena reguladora de la miosina II en su serina 19, activándola (Amano et al., 1996); esto promueve el ensamble del anillo contráctil en conjunción con la actina (Matsumura, 2005). La Citron cinasa, activada por Rho, fosforila a la miosina en la treonina 18 y la serina 19 (Yamashiro et al., 2003). La función de la Citron cinasa es menos clara y al parecer participa en las etapas finales de la citocinesis (Naim et al., 2004).

Aunque su papel en la citocinesis está conservado en los animales, muchos tipos celulares parecen no necesitar a Rho para llevarla a cabo. Incluso, un mismo tipo celular puede requerir a Rho para la citocinesis si se encuentra despegada del sustrato pero prescindir de ésta si las células hijas tienen una matriz sobre la cual tirar en direcciones opuestas durante la división (O'Connell et al., 1999; Kanada et al., 2005; Yoshizaki et al., 2004).

En el pez cebra se han encontrado 32 homólogos de las Rho GTPasas 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).

1.4.1. Las RhoGTPasas y el transporte de mRNAs

Cdc42 y Rac1 se han encontrado formando parte de complejos con proteínas del citoesqueleto (tubulina, tau, actina e internexina) y la proteína Staufen de mamífero (Villace et al., 2004). Staufen participa en el transporte de RNAs en el desarrollo temprano en la mosca de la fruta y en neuronas de organismos adultos (Czaplinski y Singer, 2006). Por su parte, Rac1 está directamente implicada en la función de la proteína de unión a RNA FMRP; la activación de Rac1 puede interferir con la regulación de FMR sobre sus mensajeros blanco (De Rubeis et al., 2013), uno de los cuales es justo el mRNA de *rac1* (Lee et al., 2003). Todo lo anterior sugiere que Cdc42 y Rac1 son parte funcional de complejos de transporte y procesamiento de RNAs.

Por su parte, a RhoA se le ha implicado en la localización 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 ->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; Hill et al., 1994). La localización depende de una secuencia *zipcode* en el extremo 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.

Se ha involucrado a RhoA también en la regulación post-transcripcional de la sintasa de óxido nítrico endotelial, la osteocalcina y la sialoproteína del hueso (Laufs y Liao, 1998; Chaplet et al., 2004; Ohnaka et al., 2001). La sobre expresión de RhoA promueve la degradación de estos transcritos a través de un mecanismo desconocido. Por el contrario, el silenciamiento de Rho promueve un alza en los niveles de los transcritos de osteocalcina, sialoproteína y sintasa de óxido nítrico que es independiente de la transcripción *de novo*, apuntando a que RhoA regula la estabilidad del mensajero existente más que la producción de nuevos.

En el mismo sentido, se ha involucrado a RhoA y a ROCK, así como a los activadores río arriba de esta vía, Wnt/Dishevelled, en la formación y mantenimiento de gránulos de estrés y cuerpos P (*P-bodies*) (Tsai y Wei, 2010; Sahoo et al., 2011; Takahashi et al., 2011). RhoA y ROCK se localizan en estos gránulos de mRNAs y parecen ser esenciales para su formación (Tsai y Wei, 2010). Tanto gránulos de estrés como cuerpos P se conforman por proteínas que están involucradas en la degradación, traducción y transporte de mRNAs específicos. La formación de cuerpos P de mRNA también sirve para detener la traducción como mecanismo de defensa contra infecciones. Por ello, algunos virus son capaces de promover la activación de RhoA y así interferir con la formación de cuerpos P para su propio beneficio (Corcoran et al., 2012). La íntima relación de RhoA con gránulos de estrés y cuerpos P es importante en el contexto de este trabajo pues muchos componentes de éstos se comparten con los gránulos del plasma germinal (revisado en Schisa, 2012).

Los datos anteriores sugieren que la regulación entre Rho GTPasas y proteínas de regulación post-transcripcional es bidireccional y bastante estrecha. Son de mucha importancia los datos sobre el rol de RhoA y ROCK, pero no Cdc42 y Rac1 en la dinámica

de gránulos de ribonucleoproteínas, pues estas estructuras comparten tanto morfología como componentes moleculares con los gránulos germinales.

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 y Copeland, 2010).

Dia está relacionada con un proceso de localización de mRNA poco convencional mediado por RhoA. El mRNA mensajero de Dia se localiza en el retículo endoplásmico de fibroblastos. El mecanismo de localización no involucra secuencias *zipcode* en la región no codificante. En cambio, se requiere la traducción parcial del mRNA de Dia inmediatamente después de la salida del núcleo. El péptido señal resultante interactúa con Rho activa. Por un mecanismo desconocido, todo el complejo formado por RhoA y el mRNA de Dia a medio traducir es translocado al retículo endoplásmico (Liao et al., 2011; Liao y Liu, 2013).

2

Antecedentes

RhoA tiene un papel prominente en la citocinesis de muchos organismos (ver sección 1.4). Empleando inhibidores farmacológicos, se demostró que RhoA participa en la citocinesis regulando el ensamblaje de la actina y la localización de la β -catenina por una vía dependiente de ROCK, que podría funcionar a través de la miosina II (Lai et al., 2005).

Trabajos recientes han mostrado que la miosina II fosforilada colocaliza con el plasma germinal en la región distal de los septos de división celular en embriones de 2 y 4 células de pez cebra (Nair et al., 2013). Si en embriones de cuatro células se inhibe la actividad de la miosina II con las drogas blebistatina y ML7, se altera la localización de actina polimerizada, tubulina y β -catenina. Además, los microtúbulos del FMA no adoptan una orientación normal con respecto al surco de división y el plasma germinal no se localiza en la región distal de los septos de división celular sino en regiones más centrales (Urven et al., 2006). 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.

En embriones tempranos de pez cebra, RhoA está ubicada en los septos de división celular donde de manera normal se localizan los RNAs del plasma germinal (Salas-Vidal et al., comunicación personal). Se sabe que RhoA es capaz de activar la miosina II a través de su efector ROCK, de modo que la actividad de RhoA en el septo pudiera ser importante para la segregación del plasma germinal durante la embriogénesis.

Rho1, el homólogo de RhoA en la mosca, está enriquecido en el polo posterior de los embriones de este organismo, donde también se localiza el plasma germinal. 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).

Durante mis estudios de maestría, encontramos más evidencia de una posible relación entre RhoA y la localización de los mensajeros del plasma germinal: observamos la localización de Rho en el cuerpo de Balbiani durante la ovogénesis del pez cebra (Figura 2.1). El cuerpo de Balbiani es el lugar donde todos los mRNAs del plasma germinal se localizan en la etapa I de la ovogénesis, independientemente de que diverjan en su localización futura (Figura 1.4 y (Kosaka et al., 2007)). Kosaka *et al.* sugieren, basados en deleciones del 3' UTR,

que la localización al cuerpo de Balbiani es un primer paso necesario para la localización final de *dazl* en los septos de división.

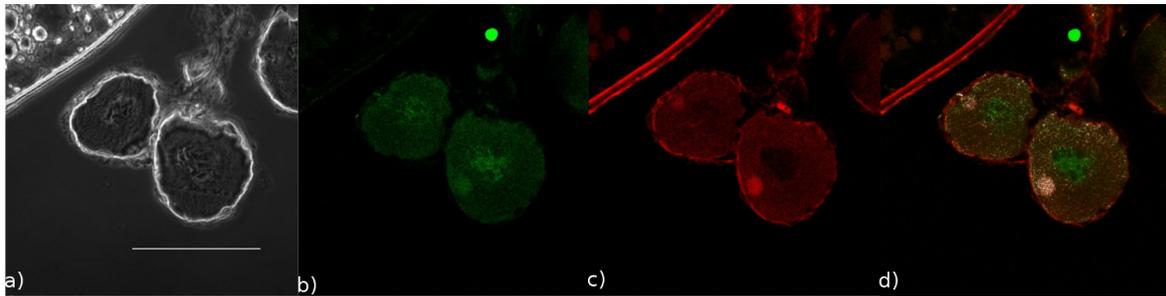


Figura 2.1. Colocalización del plasma germinal y RhoA en ovocitos de pez cebra. a) Imagen de contraste de fases de una sección de ovocitos en etapa I. b) Inmunofluorescencia contra RhoA. c) Tinción de filamentos de actina utilizando faloidina fluorescente, que en esta etapa marca al cuerpo de Balbiani (Marlow y Mullins, 2008) d) Sobrelape de b) y c) donde se han resaltado en blanco los pixeles co-localizados que tienen una mayor intensidad en ambas imágenes. Nótese la estructura blanca y redonda en el citoplasma de ambos ovocitos que marca la colocalización de RhoA con el cuerpo de Balbiani. Barra: 100 μm (Figura tomada de Jeronimo R., 2012)

En el trabajo de maestría, también observamos el patrón de localización de RhoA en las etapas de 1, 2 y 4 células. RhoA está presente en la etapa de 1 célula, lo cual indica que la proteína es de herencia materna (el genoma del embrión se activa varias horas después); sin embargo, su localización muestra un patrón homogéneo en el blastómero (Figura 2.2, A). En la etapa de 2 células, RhoA se concentra claramente en el primer septo de división y esto se repite en la etapa de 4 células para el segundo septo de división, que es perpendicular al primero (Figura 2.2, B y C). Como se detalló en la sección 1.3.1, el plasma germinal del pez cebra se concentra en la región distal de los dos primeros septos de división. En resumen, RhoA se colocaliza con el plasma germinal en las etapas más tempranas de la ovogénesis, y luego, cuando el plasma llega a su posición final en los septos de división, RhoA está a grandes rasgos en la misma región, por ello, decidimos investigar si la actividad de RhoA estaba implicada en la localización de los mRNAs del plasma germinal.

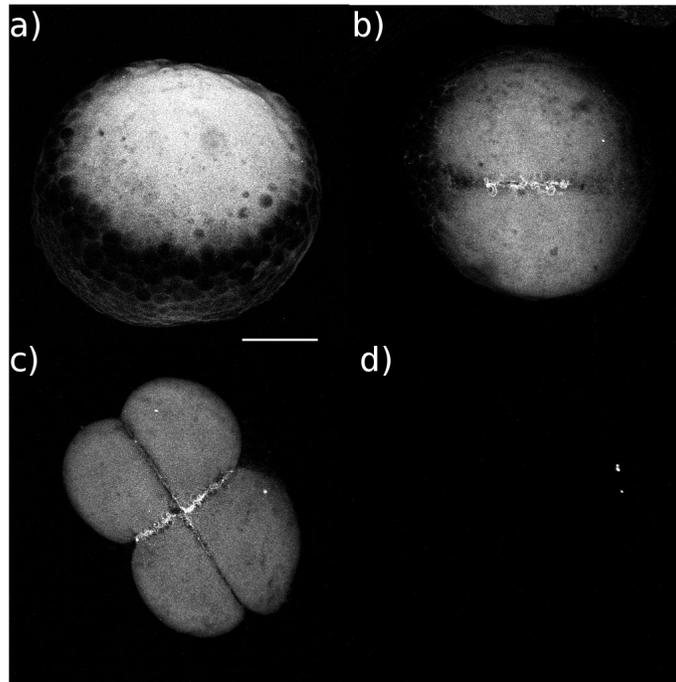


Figura 2.2. Patrón de localización de RhoA en 1 célula (a), 2 células (b) y 4 células (c). Se observa la localización homogénea luego de la fecundación y su posterior enriquecimiento en los septos de división celular. Nótese que en c), la banda de RhoA es más ancha e intensa en el septo más corto (Septo horizontal). Control negativo (d). Las imágenes son proyecciones de máxima intensidad de varios cortes en el confocal. Barra: 200 μ m. (Figura tomada de Jeronimo R., 2012)

La exoenzima C3 de *Clostridium botulinum* cataliza la ADP ribosilación específica de RhoA, RhoB y RhoC en su asparagina 41 (Vogelsgesang et al., 2007). Esta modificación covalente vuelve a la Rho GTPasa inactiva (Aktories y Frevert, 1987).

Inyectamos la exoenzima C3 en embriones de pez en el estadio de 1 célula. Encontramos evidencia de que la inhibición de la actividad de Rho en embriones tempranos interfiere con la localización correcta de al menos un mRNA del plasma germinal: *nanos*. En los embriones control, observamos septos en los cuales *nanos* se localizaba en franjas continuas en el septo de división pero aparentemente aún no se había compactado (Figura 2.3, A, cabezas de flecha verdes). En embriones comparables inyectados con C3, encontramos que estas franjas se veían interrumpidas e irregulares (Figura 2.3, B, cabezas de flecha rojas).

Los embriones inyectados con *buffer* tienen una localización normal de *nanos* sólo en cuatro puntos (Figura 2.3, C). En contraste, cuando inyectamos C3, detectamos instancias en las que múltiples puntos se localizaban fuera los septos de división e incluso fuera del blastómero, en el vitelo (Figura 2.3, D, cabezas de flecha blancas).

Vistos desde una perspectiva lateral, los embriones inyectados presentan una coloración aberrante en el vitelo en comparación con los embriones control (Figura 2.3, E y F). Al inyectar la toxina, encontramos embriones con una tinción anormal en el vitelo, lo cual nos sugería que la actividad de RhoA es necesaria para la translocación del mRNA de *nanos*

desde su posición ubicua en el citoplasma del ovocito al blastodisco al llevarse a cabo la fertilización (Figura 2.3, F).

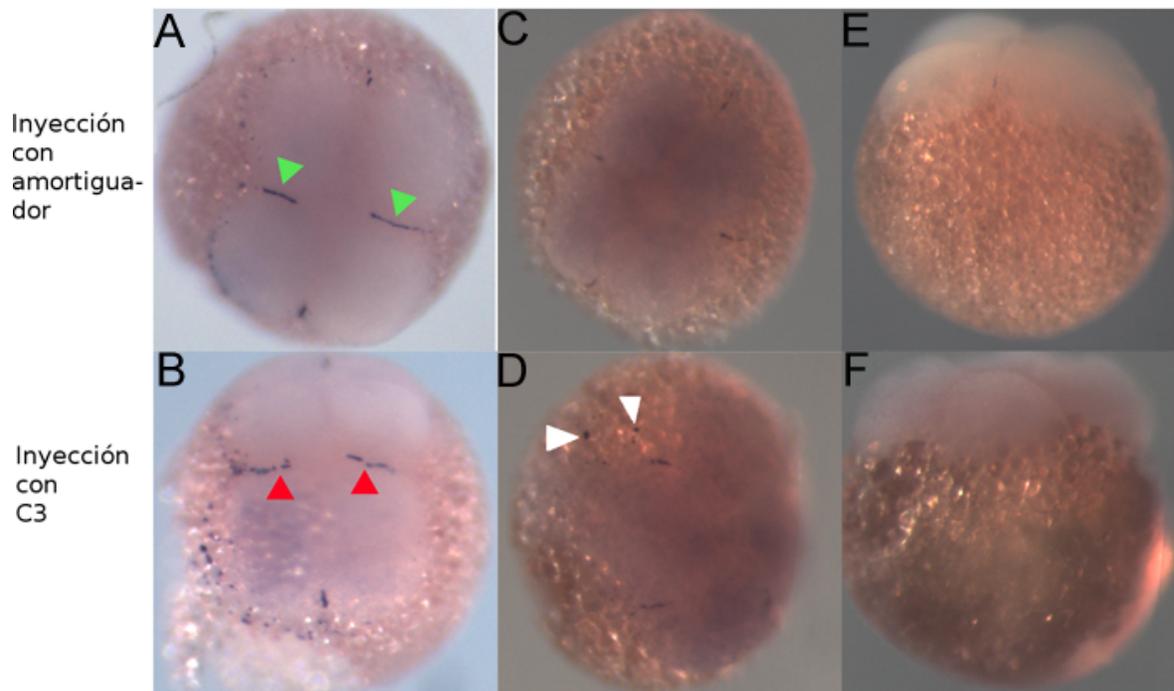


Figura 2.3. Localización de *nanos* en embriones control e inyectados con C3. Comparación de embriones en etapa de cuatro células, teñidos contra *nanos* y vistos desde el polo animal (A-D) o desde una vista lateral (E-F) . Los embriones en la fila superior fueron inyectados únicamente con *buffer* (A, C, E) mientras que los embriones en el panel inferior fueron inyectados con la toxina C3 (B, D, F) (Figura tomada de Jeronimo R., 2012)

En este trabajo profundizaremos en la comprensión de los mecanismos celulares y moleculares que participan en el proceso de segregación de componentes esenciales para la formación de la línea germinal.

3

Hipótesis y Objetivos

3.1. Hipótesis

Las Rho GTPasa RhoA, a través del citoesqueleto, controla la correcta localización del plasma germinal del pez cebra en la etapa de cuatro células.

3.2. Objetivos

1. Determinar la presencia y localización de las Rho GTPasas durante la etapa de cuatro células.
2. Evaluar la participación de las Rho GTPasas, durante la embriogénesis temprana, en la localización de los mRNAs de *nanos*, *vasa* y *dazl*.
3. Estudiar los efectores de las Rho GTPasas involucrados en la localización del plasma germinal durante la embriogénesis temprana.

4

Métodos

4.1. Cuidado de los peces, recolección de embriones e identificación de etapas del desarrollo.

Los peces adultos se mantienen 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. Las hembras y los machos se mantienen separados.

Para obtener embriones, los adultos se meten en la misma pecera el día anterior con una barrera que permita el contacto visual pero no físico entre machos y hembras. Al inicio del ciclo de luz, al día siguiente, se retira la barrera y posteriormente, se recuperan los embriones del fondo de la pecera, se lavan, y se cultivan a 28°C en una incubadora hasta que llegan a la etapa deseada en su desarrollo (Westerfield, 1994).

La identificación de distintas etapas del desarrollo del pez se hizo visualmente, utilizando como referencia el sistema de Kimmel et al. (1995) (ver también Figura 1.3).

4.2. Inmunofluorescencia en embriones completos

Procedimiento para los anticuerpos que sólo requieren fijación con PFA 4% (ver tabla 4.1). Tomado de (Mendieta-Serrano et al., 2013).

- Fijar los embriones en la etapa del desarrollo deseada en PFA al 4% a 4°C durante una noche.
- Al término de la fijación, lavar los embriones 3 veces con PBST 1x por 10 minutos cada vez. Durante el primer lavado, decorionar a los embriones con fórceps finos.
- Incubar los embriones en metanol a -20°C toda la noche. Cuando los embriones se tiñeron con faloidina fluorescente para ver la actina, este paso se omitió.
- Bloquear durante 4 horas en solución de bloqueo.

Proteína	Compañía y No. Cat.	Fijación	Especie
RhoA humana	Santa Cruz Biotechnology, sc-179	Paraformaldehído (PFA) 4 %	Conejo IgG policlonal
ROCK-2α pez cebra	Anaspec, 55431s	PFA 4 %	Conejo IgG policlonal
RhoA-GTP vertebrados	NewEast Biosciences, 26904	TCA 10 %	Ratón IgG2b, IgM monoclonal
Miosina humana, Cadena ligera 2 fosforilada	Cell signaling technology, 3671S	4 % PFA	Conejo policlonal
Rac1 humana	Santa Cruz Biotechnology, sc-217	PFA 4 %	Conejo IgG policlonal
Cdc42 humana	Santa Cruz Biotechnology, sc-87	PFA 4 %	Conejo IgG policlonal
α-tubulina pollo	Sigma, T9026	Glutaraldehído 0.25 %; PFA 4 %	Ratón IgG1, monoclonal

Tabla 4.1. Anticuerpos primarios utilizados en las inmunofluorescencias.

- Incubar con el anticuerpo primario (ver tabla 4.1) diluído 1:100 en solución de bloqueo a 4°C por toda la noche y con agitación ligera.
- Al día siguiente, lavar los embriones en solución de bloqueo e incubar por 2 horas con un anticuerpo secundario fluorescente (alexa 488 ó 647 anti-conejo, Molecular Probes, Invitrogen) diluído 1:100 en solución de bloqueo. Al término de la incubación, realizar 3 lavados de 10 minutos cada uno con PBST 1x.
- Incubar a los embriones con RNAsa (Roche) 1:100 durante 1 hora a temperatura ambiente. Al término de la incubación, realizar 3 lavados de 10 minutos cada uno con PBST 1x.
- Para teñir los núcleos, incubar a los embriones en *Hoechst* o *Sytox green* (Molecular Probes) diluído 1:4000 en solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente. Al término de la incubación, realizar 3 lavados de 10 minutos cada uno con PBST 1x.
- Incubar a los embriones en faloidina fluorescente (Molecular Probes) diluída 1:100. Al término de la incubación, realizar 3 lavados de 10 minutos cada uno con PBST 1x.
- Montar los embriones en agarosa de bajo punto de fusión al 1 % para su observación en el microscopio confocal.
- Las imágenes se adquirieron ya sea en un microscopio confocal FV1000, Olympus o en un microscopio confocal Zeiss LSM510 META utilizando un objetivo 10x de apertura numérica 0.3.

4.2.1. Inmunofluorescencia de RhoA-GTP

- Fijar los embriones en la etapa del desarrollo deseada en Ácido tricloroacético (TCA) al 10 % toda la noche a 4°C (Nishimura y Yonemura, 2006).

- Al término de la fijación, lavar 1 vez con Phosphate buffered saline (PBS) 1x y 2 veces con PBST 1x por 10 minutos cada vez. Decoronar con fórceps finos.
- Bloquear durante 4 horas en solución de bloqueo.
- Incubar con el anticuerpo primario anti RhoA-GTP (ver tabla 4.1) diluído 1:100 en solución de bloqueo a 4°C por toda la noche y con agitación ligera.
- Al día siguiente, lavar en solución de bloqueo 3 veces por 10 minutos cada una.
- Incubar por 2 horas con un anticuerpo secundario fluorescente (alexa 488 ó 647 anti-ratón, Molecular Probes, Invitrogen) diluído 1:100 en solución de bloqueo. Al término de la incubación, realizar tres lavados de 10 minutos cada uno con PBST 1x.
- Montar los embriones en agarosa de bajo punto de fusión al 1 % para su observación en el microscopio confocal.
- Las imágenes se adquirieron ya sea en un microscopio confocal FV1000, Olympus o en un microscopio confocal Zeiss LSM510 META utilizando un objetivo 10x de apertura numérica 0.3.

4.2.2. Inmunofluorescencia de tubulina

- Para la fijación en la inmuno de α -tubulina utilizamos el protocolo descrito en Theusch et al. (2006). Decoronar a los embriones previo a la fijación. En la etapa del desarrollo deseada agregar fijador para tubulina (ver sección 4.2.3). Incubar en el fijador 6 horas a temperatura ambiente y luego, toda la noche a 4°C.
- Al día siguiente, lavar en PBS 1x 10 minutos e incubar en 0.5 mg/ml NaBH₄ diluído en PBS 1x por 30 minutos a temperatura ambiente.
- Lavar los embriones 3 veces con PBST 1x 10 minutos cada vez.
- Incubar los embriones en metanol a -20°C toda la noche. Cuando los embriones se tiñeron con faloidina fluorescente para ver la actina, este paso se omitió.
- Bloquear durante 4 horas en solución de bloqueo.
- Incubar con el anticuerpo primario anti- α -tubulina (ver tabla 4.1) diluído 1:500 en solución de bloqueo a 4°C por toda la noche.
- Al día siguiente, lavar los embriones en solución de bloqueo e incubar por 2 horas con un anticuerpo secundario fluorescente (alexa 488 ó 647 anti-ratón) diluído 1:100 en solución de bloqueo. Al término de la incubación, realizar 3 lavados de 10 minutos cada uno con PBST 1x.
- Incubar a los embriones con RNAsa 1:100 durante 1 hora a temperatura ambiente. Al término de la incubación, realizar 3 lavados de 10 minutos cada uno con PBST 1x.

- Para teñir los núcleos, incubar a los embriones en *Hoechst* o *Sytox green* diluído 1:4000 en solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente. Al término de la incubación, realizar 3 lavados de 10 minutos cada uno con PBST 1x.
- Incubar a los embriones en faloidina fluorescente diluída 1:100. Al término de la incubación, realizar 3 lavados de 10 minutos cada uno con PBST 1x.
- Montar los embriones en agarosa de bajo punto de fusión al 1 % para su observación en el microscopio confocal.
- Las imágenes se adquirieron en un microscopio confocal FV1000, Olympus con objetivos 20x y 40x ambos de apertura numérica 0.75.

4.2.3. *Buffers*

- PBS 1x: 8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.44 g Na₂HPO₄, 0.24 g KH₂PO₄ en 1 L dd H₂O. Ajustar a pH 7.4.
- PBST 1x: PBS 1x, Tritón X-100 1 % (vol/vol).
- Solución de bloqueo: PBS 1X, Tritón X-100 1 % (vol/vol) y BSA 0.1 % (w/v).
- Fijador de tubulina: 4 % PFA, 0.25 % glutaraldehído, 5 mM EGTA y 0.2 % Triton X-100.

4.3. Clonación de fragmentos de mRNA y síntesis de sondas

4.3.1. Extracción de RNA

Para la extracción de mRNA se utilizó del reactivo TRIzol (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

- 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 la mano por 15 segundos y se incuba de 25 °C de 2 a 3 min.

- Se centrifuga la muestra a 12,000 x g por 15 min a 4 °C.
- Luego de la centrifugación, la mezcla se separa en una fase orgánica de color rosa 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 25 °C por 10 minutos y se centrifugan a 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.

4.3.2. Síntesis de DNA complementario

Para la síntesis de DNA complementario (cDNA) se utilizó el kit de la transcriptasa reversa M-MLV de Invitrogen, siguiendo las instrucciones del fabricante. A un tubo de microcentrífuga se añade lo siguiente:

- 1 µL oligo dT (Invitrogen) (500µg/mL)
- 50-250 ng de *random primers* (Invitrogen)
- 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* (Invitrogen)
- 2 µL 0.1M DTT
- 1 µL RNaseOUT inhibidor de ribonucleasa recombinante (Invitrogen)

Mezclar suavemente e incubar a 37 °C por 2 minutos. Agregar 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.

Gen	Primer Sentido	Primer Antisentido	Producto (pb)	Tm (°C)	ENSEMBLID
<i>dazl</i>	gcggtcgattatgtgcatc	atcaataccgccgacgaa	493	62	ENSDARG00000036214
<i>nos</i>	acaacggcgagactgagg	cctgtagcgagcctgctg	452	60	ENSDARG00000068255
<i>vas</i>	gcgtgtccacctgctacc	ttcatcacgggagccact	402	64	ENSDARG00000014373
<i>zorb</i>	aggctggaccccagaaac	catgctggcttcagttg	493	62	ENSDARG00000008454
<i>rhoaa</i>	cgggggttcaggagggtcat	ctgcgacaggacaggaggca	605	60	ENSDARG00000026845
<i>rhoab</i>	acacctcccctcacattcgcca	ccccctcccctcccattgccc	444	60	ENSDARG00000094673
<i>rhoac</i>	gccaggagacttggacggga	gcttagcagagccgggcag	475	59	ENSDARG00000099709
<i>rhoca</i>	aggatggcaggatatacacgcaca	acgccctgtggacgacaaa	539	59	ENSDARG00000021309
<i>rhocb</i>	gcgcgcacacacacacacac	caccgagcatcataaacagaggca	315	58	ENSDARG00000018328

Tabla 4.2. Oligonucleótidos utilizados para la clonación de fragmentos génicos a partir de cDNA.

4.3.3. PCR

Deseamos ver la localización de los genes *vasa*, *nanos*, 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), 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*, *daz-like*, *zorba*, *rhoaa*, *rhoab*, *rhoac*, *rhoca* y *rhocb* cuidando que sólo hibriden con una región determinada del RNA blanco. 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* antisentido y *Primer* sentido (ver cuadro 4.2): 1 µL de cada uno
- H₂O: 16.55 µL
- Taq polimerasa (Invitrogen): 0.2µL
- cDNA: 2 µL

El programa de PCR utilizado es el siguiente:

- 95 °C 2 min
- 40 ciclos: 95 °C 30 s, Tm °C (ver Tabla 4.2) 30 s, 72 °C 2 min
- 72 °C 10 min
- 6 °C 10 min

4.3.4. Clonación del producto de PCR en un plásmido

Los productos de PCR se insertaron en el plásmido pcrII-TOPO (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del proveedor. 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 (Figura 4.1).

Preparación de una reacción de ligación:

- Producto fresco de PCR 2 μ L
- 10X Buffer de ligación 1 μ L
- Vector 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.

4.3.5. Preparación de células competentes y transformación

Preparación de células de *E. coli* DH5- α (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 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 OD₆₀₀ 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 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 *buffer* 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 μL en tubos *eppendorf* enfriados y congelar inmediatamente en nitrógeno líquido para su almacenamiento a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Transformación:

- Incubar en hielo por treinta minutos 50 μL de células competentes junto con 2 μL de reacción de ligación.
- Calentar súbitamente las células a $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 45 s sin agitar y transferir inmediatamente de vuelta al hielo.
- Agregar 250 μL 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 μL de células transformadas en cajas con medio LB sólido con ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y X-gal.
- Incubar las cajas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ toda la noche.

El plásmido TOPO (Life Technologies) 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 4.1) 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.

4.3.6. Síntesis de sondas de RNA marcadas con digoxigenina

Las muestras de DNA purificado de cada colonia con los insertos correspondientes, se linearizaron dos veces por separado, una con la enzima HindIII y otra con la enzima XbaI. Las reacciones de transcripción de sonda se prepararon con las RNA polimerasas T7 y Sp6 (ambas de Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para cada reacción, en un tubo *eppendorf* se agregó lo siguiente:

- 1 μg de plásmido linearizado
- 2 μL nucleótidos marcados con digoxigenina
- 2 μL 10x *buffer* de transcripción
- 1 μL Inhibidor de RNAsas
- 2 μL Sp6 (si el DNA fue linearizado con XbaI) o T7 (si el DNA fue linearizado con HindIII) Ver mapa en Figura 4.1.

Aforar a un volumen de 20 μ L con agua libre de RNAsas. Mezclar suavemente e incubar por 7 horas a 37°C.

Las sondas se purifican utilizando el protocolo de las columnas NucAway Spin (Ambion), se cuantifican y se almacenan a -20°C.

4.3.7. Medios de cultivo y buffers

- *First-Strand buffer*: 250 mM Tris-HCl (pH 8.3 a temperatura ambiente), 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂.
- Medio SOB: 2 % bactotripton, 0.5 % extracto de levadura, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄.
- *Buffer de transformación*: 10 mM Hepes, 55 mM MnCl₂, 10 mM CaCl₂, 250 mM KCl.
- Medio LB (Luria-Bertani) A 950 mL de agua desionizada, agregar: 10 g de tripton, 5 g de extracto de levadura y 10 g de NaCl. 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 tripton, 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

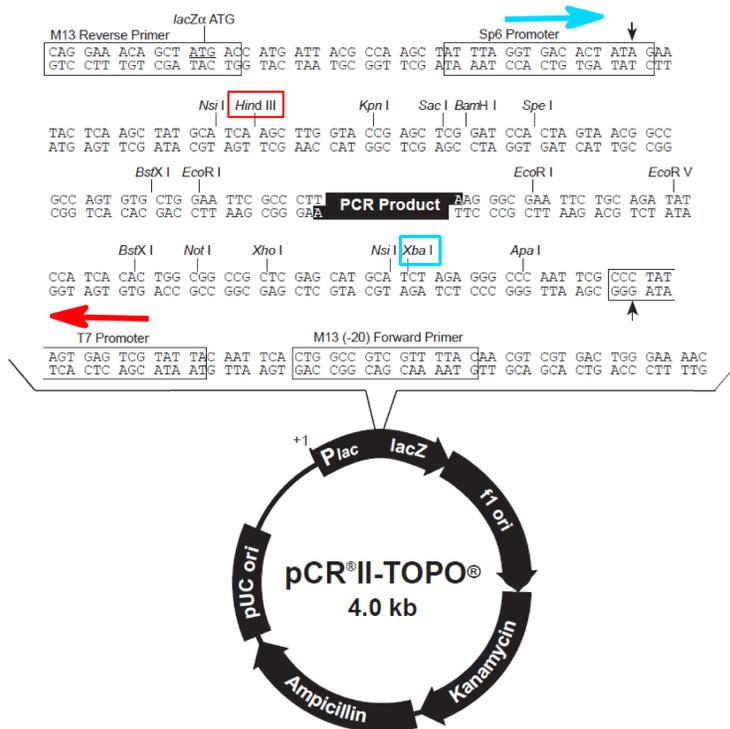


Figura 4.1. Mapa de plásmido TOPO. El plásmido TOPO contiene al gen *lac* interrumpido por el sitio de inserción del producto de PCR (ampliación). Los cuadros azul y rojo marcan los sitios de corte. El color se corresponde con el promotor que se utilizó para la transcripción.

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 $MgCl_2$.

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

Utilizamos esencialmente el protocolo descrito en (Thisse y Thisse, 2008). Todas las soluciones utilizadas para este método se preparan con agua tratada con dietilpicrocarbonato (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.

Primer día

- Rehidratación de los embriones. Lavar con 75 %, 50 %, y 25 % metanol en PBST, 5 minutos cada vez. Lavar 4 veces con PBST 100 % por 5 minutos cada vez.
- Para permeabilizar a los embriones se incuban en una solución de proteinasa K (10 µg/ ml) por 30 segundos para los embriones menores al estadio de 1-somita, y 10 minutos para los embriones de 24 horas (Thisse y Thisse, 2008). después de este tiempo se transfieren rápidamente a paraformaldehído al 4 % y se fijan durante 20 minutos a temperatura ambiente
- Realizar dos lavados con PBST por 5 minutos cada uno.
- Al terminar, los embriones se incuban en solución de prehibridación por 2 a 5 horas a 70°C.
- La solución se reemplaza con solución de hibridación más 100 ng de sonda de RNA (cuya síntesis se describe en 4.3), la incubación con la sonda se hace toda la noche a 70°C en agitación ligera.

Segundo día

- Lavar brevemente con solución de prehibridación
- Reemplazar progresivamente la solución de prehibridación por PBST a temperatura ambiente con lavados de 25, 50 y 75 % de SSC 2X disuelto en solución de prehibridación; 10 minutos cada lavado a 70 °C
- Lavar con 100 % SSC 2x por 10 minutos a 70°C
- Hacer dos lavados de 30 minutos cada uno con SSC 0.2X a 70°C
- Reemplazar progresivamente el SSC por PBST a temperatura ambiente con lavados 25, 50 y 75 de PBST disuelto en SSC 0.2X; 10 minutos cada lavado

- Lavar con PBST 1x por 10 minutos a temperatura ambiente
- Se incuba a los embriones por 3 a 4 horas en solución de bloqueo
- Se incuba toda la noche con anticuerpo anti-digoxigenina disuelto 1:10,000 en solución de bloqueo a 4°C con agitación ligera

Tercer día

- Retirar el anticuerpo anti-digoxigenina con 6 lavados de 15 minutos en PBST a temperatura ambiente con agitación suave
- Lavar a los embriones en solución AP⁻ por 5 minutos a temperatura ambiente
- Proseguir con tres lavados con AP⁺ por 5 minutos cada uno
- Sumergir a los embriones en solución de revelado 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* por 15 minutos 3 veces.
- Reemplazar la solución *Stop* por glicerol y dejar incubando toda la noche a temperatura ambiente con agitación suave.
- A la mañana siguiente, poner glicerol nuevo. En esta solución los embriones pueden fotografiarse bajo el microscopio y conservarse durante varios meses a 4°C.
- A la par de la hibridación *in-situ* con la sonda antisentido se sigue un procedimiento idéntico con otro grupo de embriones pero usando una sonda sentido como control negativo.

Fotografiamos a los embriones teñidos con NBT/BCIP bajo un estereomicroscopio (Leica MZ 12.5) utilizando una cámara CCD (AxioCam MRc 5, Zeiss) y el programa AxioVision Rel .48. Se tomaron fotos de los embriones en distintos planos de enfoque para reconstruir una imagen utilizando el programa Helicon Focus (Helicon Soft).

4.4.1. *Buffers*

- PBS 10x: 10.8 g de Na₂HPO₄, 65g de NaH₂PO₄, 80 g de NaCl y 2 g de KCl disueltos en un litro de agua.
- SSC 20x: (Solución stock de SSC 20X: 175.3 g de NaCl y 88.2 g de sal de ácido cítrico trisodio en un 1 litro de agua.
- Solución de prehibridación: 50 % formamida de-ionizada, 5X SSC, 0.1 % Tween 20, pH ajustado a 6.0 con 460 µL de ácido cítrico 1M para 50 mL de solución.

- Solución de hibridación: Solución de prehibridación más 50 mg/mL de heparina y 500 mg/mL de tRNA.
- Solución de bloqueo: 1 x PBT, 2% suero de oveja (vol/vol), 2 mg/ml albúmina de suero bovino.
- Solución AP⁻: 100 mM Tris-HCl, pH 9.5, 100mM NaCl y 0.1% Tween 20 (vol/vol).
- AP⁺: agregar 50 mM MgCl₂ a solución AP⁻.
- Solución de revelado: diluir 175 µg de BCIP y 350 µg de NBT por cada mL de solución AP⁺.
- Solución *Stop*: PBST + EDTA 1mM

4.5. Hibridación *In situ* fluorescente + Inmunofluorescencia

Utilizamos el sustrato *Fast Red* para las hibridaciones *in situ* fluorescentes. Este sustrato, luego de reaccionar con la fosfatasa alcalina, se vuelve un precipitado insoluble, de color rojo y cuya fluorescencia puede observarse excitando a 543 nm y observando longitudes de onda mayores a 560 nm (Murdoch et al., 1990; Lauter et al., 2011). El procedimiento para la tinción con *Fast Red* es muy similar al que se utiliza para teñir con NBT/BCIP. Para la tinción fluorescente por hibridación *in situ* hay que seguir los pasos descritos en la sección 4.4 hasta el paso en que se retira el anticuerpo anti-digoxigenina. En ese momento:

- Lavar 6 veces por 15 minutos cada una con PBST 1x a temperatura ambiente con agitación suave
- Lavar dos veces los embriones en solución AP⁻ pH 8.2 por 5 minutos cada vez a temperatura ambiente
- Incubar los embriones en solución AP⁺ pH 8.2 2 veces por 5 minutos cada vez
- Incubar a los embriones en solución de revelado *Fast-red* protegiéndolos de la luz y monitoreando el proceso de revelado hasta que se alcance el grado deseado de coloración.
- Lavar 2 veces por 5 minutos cada vez con solución AP⁻
- Lavar 3 veces por 10 minutos cada vez con PBST 1x (No utilizar solución *Stop* pues el EDTA puede interferir con la inmuno siguiente)
- Fijar en PFA 4% toda la noche a 4 °C
- Seguir los pasos para inmunofluorescencia descritos en la sección 4.2 omitiendo únicamente la incubación en metanol.

4.5.1. *Buffers*

- Solución AP⁻ pH 8.2: 100 mM Tris-HCl, pH 8.2, 100mM NaCl y 0.1% Tween 20 (vol/vol).
- Solución AP⁺ pH 8.2: agregar 50 mM MgCl₂ a solución AP⁻ pH 8.2.
- Solución de revelado *Fast-red*: diluir las sales *Fast-red* TR (Sigma) y Naftol-AS-MX-fosfato (Sigma) en una concentración de 250 y 500 µg/ml, respectivamente, en 100 mM Tris-HCl pH 8.2, NaCl 100 mM, MgCl₂ 50 mM y 0.1% Tween (Hauptmann, 2001; Jowett, 2001)

4.6. Inyección de inhibidores

Se prepararon jeringas de vidrio en un puller horizontal (Sutter Instruments) a partir de capilares de vidrio (1.0 mm diámetro externo x 0.78 mm diámetro interno; Harvard Apparatus). La toxina inhibidora de RhoA, la exoenzima C3 permeable (Cytoskeleton, Inc.) se preparó como *Stocks* a 4.16 µM en agua destilada. Las moléculas pequeñas inhibidoras Rhosin (Calbiochem) y H-1152 (Enzo life sciences) se reconstituyeron con DMSO a una concentración de 25 mM.

Estas soluciones *Stock* se diluyeron a concentraciones listas para inyectar en *buffer* de inyección a las siguientes concentraciones:

- C3 (M. W. 24 KDa): 520 nM
- Rhosin (M. W. 354.8 Da): 5 mM
- H-1152 (M. W. 392.4 Da): 50 µM ó
- Para inyectar las drogas se diluyeron a las concentraciones especificadas en los resultados en *buffer* de inyección.
- Para la inyección, se colectan los embriones en la etapa de una célula y se acomodan en los surcos hechos en una caja con agarosa.
- Las puntas de las jeringas deben romperse levemente para permitir el flujo del líquido.
- Se deposita una gota de aceite mineral encima de una regla micrométrica
- Para calcular el volumen aproximado de inyección, se introduce la punta de la jeringa en el aceite mineral, se inyecta una burbuja y se mide el diámetro de la misma utilizando la regla micrométrica.
- Los embriones se inyectan con cuidado, perforando el vitelo.
- Se inyectaron gotas de 200 µm de diámetro.

La fórmula del volumen de una esfera es $V = \frac{4\pi r^3}{3}$. Para encontrar el volumen de nuestra burbuja de 200 μm de diámetro, dividimos $200/2 = 100$ y dividimos entre 1000 para obtener 0.1 mm de radio, que sustituiremos por r . Convertimos a mm porque así obtendremos el volumen en unidades de μL ya que $1 \text{ mm}^3 = 1 \mu\text{L}$. El volumen de una esfera de 200 μ de diámetro es entonces $V = \frac{4\pi 0.1^3}{3} \approx 4.19 \times 10^{-3} \mu\text{L} = 4.19 \text{ nL}$

4.6.1. *Buffers*

buffer de inyección: NaCl 68.5 mM, KCl 1.35mM, Na_2HPO_4 5mM y KH_2PO_4 1mM

4.7. Análisis filogenéticos, estadísticos y procesamiento de imágenes

Para la construcción del árbol filogenético, descargamos las secuencias peptídicas en formato *fasta* de RHOA, RHOB y RHOC de humano así como sus homólogos en los genomas de peces (incluyendo al pez cebra) anotados en la base de datos Ensembl (Flicek et al., 2014). En el caso de genes con múltiples variantes de *splicing*, sólo se descargaron las secuencias peptídicas de 193 aminoácidos. Los identificadores de las secuencias son los siguientes:

Se utilizó el programa CLUSTAL 2.0.11 (Larkin et al., 2007) para convertir las secuencias a un alineamiento múltiple. A partir de éste último, utilizamos los programas de Phylip para generar 10000 réplicas de bootstrap cuyo consenso generó un árbol por el algoritmo de *Neighbour-Joining*.

Los mismos alineamientos se utilizaron para representar la conservación de aminoácidos específicos por medio de los programas WebLogo (Crooks et al., 2004) y CLC Sequence viewer 6.7.1.

Donde se indican pruebas estadísticas, se llevaron a cabo utilizando el programa Prisma 7.03 (GraphPad Software, Inc).

Las imágenes de fluorescencia adquiridas en el microscopio confocal se procesaron y analizaron utilizando el programa FIJI (Schindelin et al., 2012). Para medir la intensidad de fluorescencia, los diferentes planos de las series de confocal se convirtieron en proyecciones de máxima intensidad. Se seleccionaron manualmente las regiones que corresponden al plasma germinal de cada embrión y se cuantificó la intensidad media de los pixeles dentro de las mismas. La intensidad media de cada embrión se dividió entre la intensidad media promedio de los embriones control para comparar intensidades entre dos experimentos.

Especie	RHOA	RHOB	RHOC
<i>Homo sapiens</i>	ENSP00000400175	ENSP00000272233	ENSP00000285735
<i>Poecilia formosa</i>	ENSPFOP00000017610		
	ENSPFOP00000019175	ENSPFOP00000020736	ENSPFOP00000000695
	ENSPFOP00000000151		
<i>Astyanax mexicanus</i>	ENSAMXP00000008607		ENSAMXP00000017009
	ENSAMXP00000015052		ENSAMXP00000000033
	ENSAMXP00000005988		
<i>Gadus morhua</i>	ENSGMOP00000008758		
	ENSGMOP00000011856		ENSGMOP00000007173
	ENSGMOP00000002530		
<i>Latimeria chalumnae</i>	ENSLACP00000004714		
<i>Danio rerio</i>	ENSDARP00000040644		ENSDARP000000084961
	ENSDARP00000072903		ENSDARP000000002761
	ENSDARP00000109720		
<i>Takifugu rubripes</i>	ENSTRUP00000027633	ENSTRUP00000046512	ENSTRUP00000033038
	ENSTRUP00000030234		ENSTRUP00000046795
<i>Oryzias latipes</i>	ENSORLP00000023403	ENSORLP00000015802	ENSORLP00000010127
<i>Xiphophorus maculatus</i>	ENSXMAP00000016927		
	ENSXMAP00000004471		ENSXMAP00000008123
	ENSXMAP00000019414		
<i>Gasterosteus aculeatus</i>	ENSGACP00000013141		ENSGACP00000012671
	ENSGACP00000007509	ENSGACP00000012750	ENSGACP00000007188
	ENSGACP00000001569		
<i>Tetraodon nigroviridis</i>	ENSTNIP00000008794		ENSTNIP00000018092
	ENSTNIP00000018066	ENSTNIP00000004748	ENSTNIP00000021444
	ENSTNIP00000017700		
<i>Oreochromis niloticus</i>	ENSONIP00000015577		
	ENSONIP00000022648		ENSONIP00000018468
	ENSONIP00000002091	ENSONIP00000025753	ENSONIP00000015456
	ENSONIP00000023779		

Tabla 4.3. Identificadores de ENSEMBL de las secuencias de aminoácidos utilizadas para el árbol filogenético. RHOA, RHOB y RHOC de humano y sus homólogos en diferentes especies de peces.

4.8. Clasificación de embriones por inspección visual

Clasificamos a los embriones de 4 células en normales o anormales basándonos en tinciones contra *nanos* o *vasa* reveladas con NBT/BCIP.

En el esquema 4.2, se resumen los patrones de tinción que clasificamos como normales o anormales. Consideramos como “normales” a los embriones que tienen tinción en los 4 puntos en la región distal (Figura 4.2, A). Una tinción normal en los 4 puntos acompañada de señal homogénea en el margen del blastodisco también se clasificó como normal, pues se sabe que existen partículas más pequeñas de mRNPs fuera de los cuatro agregados principales que se degradan después de la etapa de 8 células (Eno y Pelegri, 2013).

Las anomalías que observamos en la localización del plasma germinal caen en cuatro categorías (Figura 4.2, C-F). La primera categoría es la **falta de compactación dentro del septo**, que se caracteriza por agregados que se extienden fuera de la región distal formando una “línea punteada” a lo largo del mismo (Figura 4.2, C). La segunda categoría de anomalías consiste en la **localización del plasma germinal al centro del septo**. En este caso el plasma germinal sí se compacta, pero el agregado no se ancla a la región distal sino que migra al centro del blastodisco, en la intersección de los dos septos de división existentes en ese momento (Figura 4.2, D). La tercera categoría se determina por la presencia de **agregados ectópicos fuera del septo de división** en los márgenes del blastodisco (Figura 4.2, E), esta localización ectópica y asimétrica es distinta a la tinción normal en la periferia del blastodisco (Figura 4.2, B). La cuarta categoría se trata simplemente de embriones con **falta de tinción** (Figura 4.2, F).

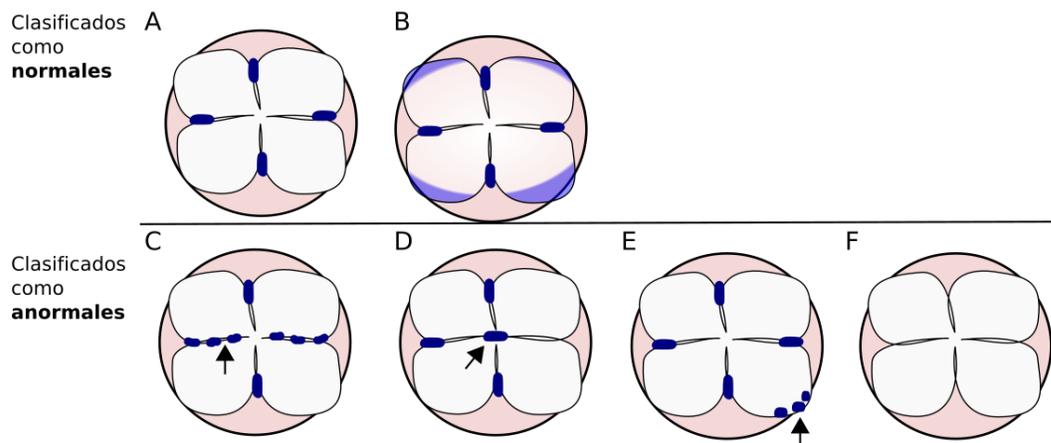


Figura 4.2. Esquema de anomalías de localización del plasma germinal animal. Embriones clasificados como normales (arriba), o anormales (fila de abajo). Las flechas marcan la característica que define a cada tipo de clasificación.

5

Resultados

5.1. Localización de las Rho GTPasas durante la localización del plasma germinal

RhoA, Rac1 y Cdc42 son las RhoGTPasas que más se han estudiado. Puesto que proponemos un papel de las Rho GTPasas en la localización del plasma germinal, decidimos ver si estaban presentes en los embriones de pez. Las tres Rho GTPasas están presentes en la transición entre las etapas de 4 y 8 células, el momento en que hay ocho núcleos pero sólo pueden distinguirse claramente dos septos de división. Sin embargo, existen diferencias en su localización, como se muestra en la Figura 5.1. Rac1 se localiza en el citoplasma mientras que Cdc42 muestra una ligera señal en el primer septo de división celular. RhoA se localiza muy claramente dentro de los primeros dos surcos de división, formando una característica cruz (Figura 5.1, A).

La localización de RhoA en los primeros dos septos es muy interesante, pues el plasma germinal también se localiza allí, aunque comprimido hacia la región distal. Para comparar la localización de RhoA y el plasma germinal, teñimos simultáneamente ambos componentes por inmunofluorescencia e hibridación *in situ*, respectivamente. Pudimos observar que los agregados menos compactos del plasma germinal se localizan adyacentes al dominio de RhoA e incluso hay cierto solapamiento (Figura 5.1, E; Flecha y **). En el otro septo, cuando el plasma germinal se encuentra bien compactado, RhoA parece excluir al plasma germinal (Figura 5.1, E; cabeza de flecha y *). Estos resultados hicieron que nos decantáramos por estudiar a RhoA como posible candidato para el control de la localización del plasma germinal.

Debido a que RhoA se concentra en los septos durante las etapas de 2, 4 y 8 células, que es cuando se compacta el plasma germinal, decidimos caracterizar a mayor detalle su localización en este periodo. En la etapa de 2 células, RhoA se enriquece en una franja que marca el primer surco de división y permanece en este primer surco por al menos otros dos ciclos de división (Etapas de 4 y 8 células; Figura 5.2, A-C). Además, durante la etapa de 4 células, el segundo septo de división también se marca con RhoA. El patrón de RhoA forma entonces una cruz que divide a los cuatro blastómeros y permanece así al menos

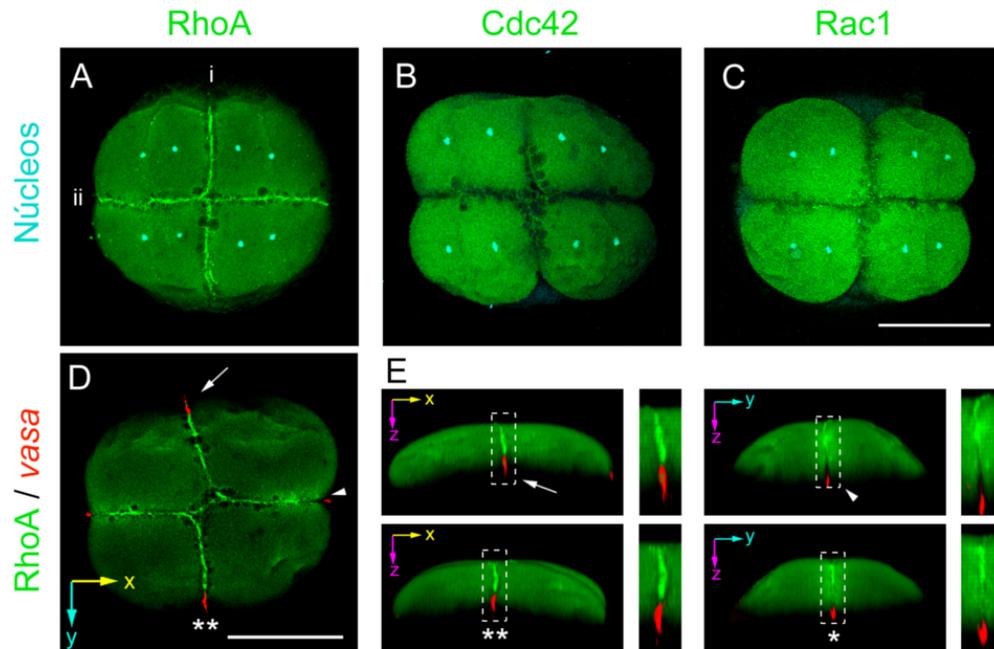


Figura 5.1. Localización de RhoGTPasas durante las primeras divisiones de la embriogénesis. Localización de RhoA (A) Cdc42 (B) y Rac1 (C) en la etapa de cuatro células. RhoA, a diferencia de Cdc42 y Rac1, se enriquece claramente en ambos septos de división (i y ii marcan la posición del primer y segundo septo, respectivamente). Cdc42 parece tener una leve localización a uno de los septos (B, asterisco), mientras que Rac1 tiene una localización completamente homogénea. (D) Co-tinción de RhoA y el mensajero de *vasa*. (E) Vistas laterales y detalles de los cuatro septos a partir de la rotación de una reconstrucción en 3D de (D). Barras: 100 μm .

durante la tercera división celular (Etapa de 8 células, Figura 5.2, C). El hecho de que la señal de RhoA en el primer surco no desaparezca durante el segundo ciclo celular, y que tanto la señal del primer y segundo surco se mantengan aún durante la tercera división sugiere que RhoA puede jugar un papel durante la maduración y mantenimiento del surco de división, más que un papel durante la formación del mismo, como es el caso con otros organismos (Piekny et al., 2005; Wagner y Glotzer, 2016). Cabe recalcar, sin embargo, que en la etapa de 8 células, aunque RhoA se mantiene en el primer y segundo surco, no lo detectamos en los septos de la tercera división (Figura 5.2).

La localización de las Rho GTPasas a la membrana plasmática está asociada con su estado activo (sección 1.4). En el septo de división se encuentran las membranas de ambos blastómeros además de gran cantidad de vesículas exocíticas y endocíticas (Feng et al., 2002). Por ello, aunque el anticuerpo reconoce tanto al estado activo como al inactivo, el enriquecimiento de RhoA en los septos de división sugiere una localización membranal y por tanto, que se encuentra activa allí. Para confirmar esto, hicimos otra inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo comercial que reconoce sólo a RhoA unida a GTP, es decir, su conformación activa. El patrón de localización con este anticuerpo confirma que la actividad de RhoA se concentra especialmente en los septos de división, primero durante

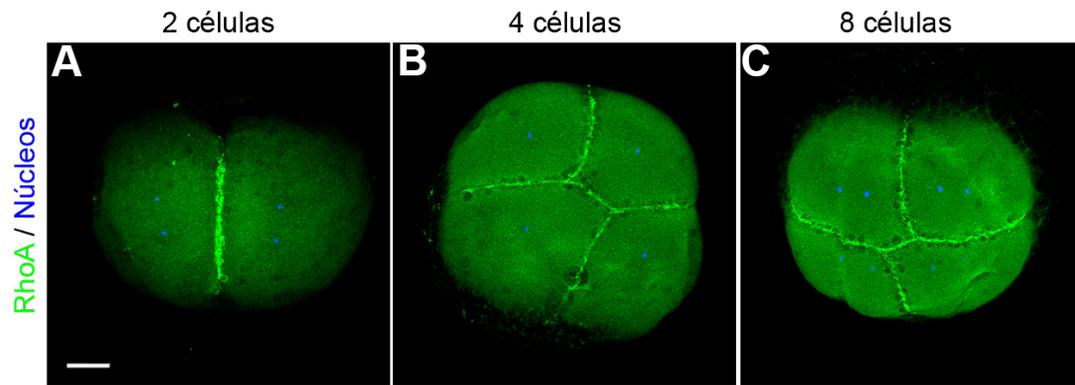


Figura 5.2. Localización de RhoA en 2, 4 y 8 células. Inmunolocalización durante las etapas de 2 (A), 4 (B) y 8 células (C), utilizando un anticuerpo contra RhoA (verde). Barra: 100 μ m

la etapa de dos células (Figura 5.3, A). La inmuno contra Rho-GTP también coincide con la inmunofluorescencia contra RhoA total en que no se limita sólo al septo que se está formando en esa etapa. En la etapa de 4 células hay señal de Rho-GTP en ambos septos, tanto el más reciente como el que se formó en el ciclo anterior (Figura 5.3, B). Lo mismo sucede durante la etapa de 8 células, el primer y segundo septo permanecen marcados aún cuando ya está en curso la tercera división celular. Sin embargo, a diferencia de la inmunofluorescencia contra RhoA total, el anticuerpo contra RhoA-GTP también marca los septos que corresponden a la tercera división celular (Figura 5.3, C).

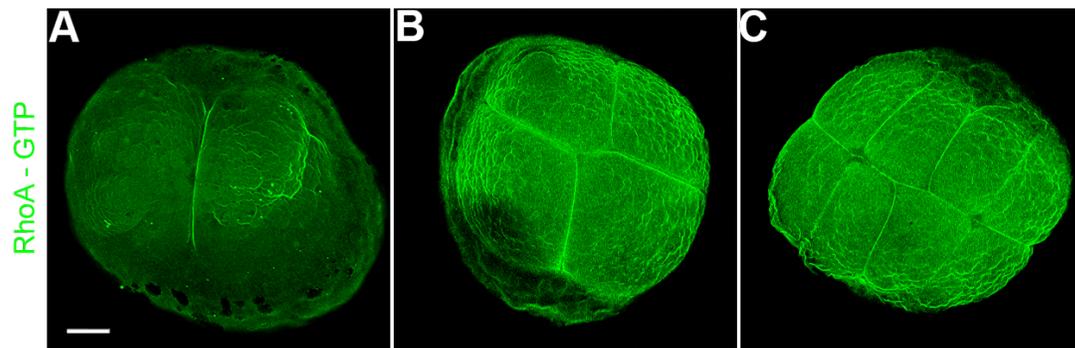


Figura 5.3. Localización de RhoA-GTP en 2, 4 y 8 células. Inmunolocalización durante las etapas de 2 (A), 4 (B) y 8 células (C), utilizando un anticuerpo contra RhoA unida a GTP que corresponde a su forma activa (verde). Barra: 100 μ m

5.2. Participación de Rho en la localización de los mRNAs del plasma germinal animal

5.2.1. Inhibición de Rho con C3

En los antecedentes (sección 2), presentamos nuestro trabajo previo en el que inyectamos embriones con la toxina C3 de *Clostridium botulinum*; el tratamiento resultó en la deslocalización del mRNA de *nanos* en embriones de 4 células.

La toxina C3 inhibe específica e irreversiblemente a RhoA por medio de la ADP-ribosilación de su asparagina 41 (Aktories y Frevert, 1987). Se ha reportado que la inhibición por la toxina C3 conduce a la exclusión de RhoA de la membrana por su secuestro por parte de GDIs en el citoplasma (Genth et al., 2003).

Para el presente trabajo, inyectamos la toxina C3 en embriones de una célula y los dejamos desarrollarse hasta la etapa de 4 células, momento en que los fijamos con PFA. En estos embriones marcamos a RhoA y al plasma germinal simultáneamente para ver si los defectos de localización del plasma germinal previamente observados se acompañan de alteraciones en la distribución de RhoA.

En la Figura 5.4, se muestran embriones representativos de las inyecciones con *buffer* o C3. En los embriones inyectados con *buffer* puede verse claramente la señal de RhoA a todo lo largo del septo, mientras que el plasma germinal se restringe a su localización normal dentro de la región distal. Los embriones inyectados con C3 (Figura 5.4, A y B) a menudo tienen un septo en donde el dominio de RhoA no se extiende hasta la región distal y esto coincide con la localización incorrecta del plasma germinal a la parte central del septo de división celular. Estas imágenes muestran una clara relación entre la extensión de la localización de RhoA y la localización del plasma germinal animal marcado tanto con la sonda de *vasa* como con la sonda de *nanos*.

El enriquecimiento normal de RhoA activa dentro del septo también se ve afectado por la inyección del inhibidor C3 (Figura 5.4, C). Lo cual es más evidencia de que el tratamiento con C3 inhibe a RhoA.

Hicimos hibridaciones *in situ* reveladas con NBT/BCIP contra los mRNAs de *nanos* y *vasa*, porque esto nos permite analizar a los embriones bajo el estereomicroscopio, y así podemos cuantificar la proporción de fenotipos presentes en un buen número de embriones.

Realizamos 4 experimentos independientes para la sonda de *nanos* y 5 experimentos independientes para la sonda de *vasa*. Cada experimento independiente consiste en la inyección de un grupo de embriones con C3 y otro grupo de embriones con *buffer* seguidos del ensayo de hibridación *in situ* con la respectiva sonda. En cada experimento, cuantificamos en el grupo de los embriones tratados con el inhibidor la proporción de embriones que se ajusta a la categoría “normal” o “anormal”. A su vez, desglosamos al grupo “anormal” en cuatro diferentes categorías: falta de compactación dentro del septo; localización del plasma germinal al centro del septo; agregados ectópicos fuera del septo; y falta de tinción. Los criterios utilizados para esta subclasificación fueron descritos en la sección 4.8. Las proporciones de estas categorías son variables entre experimento y entre sonda, pero la

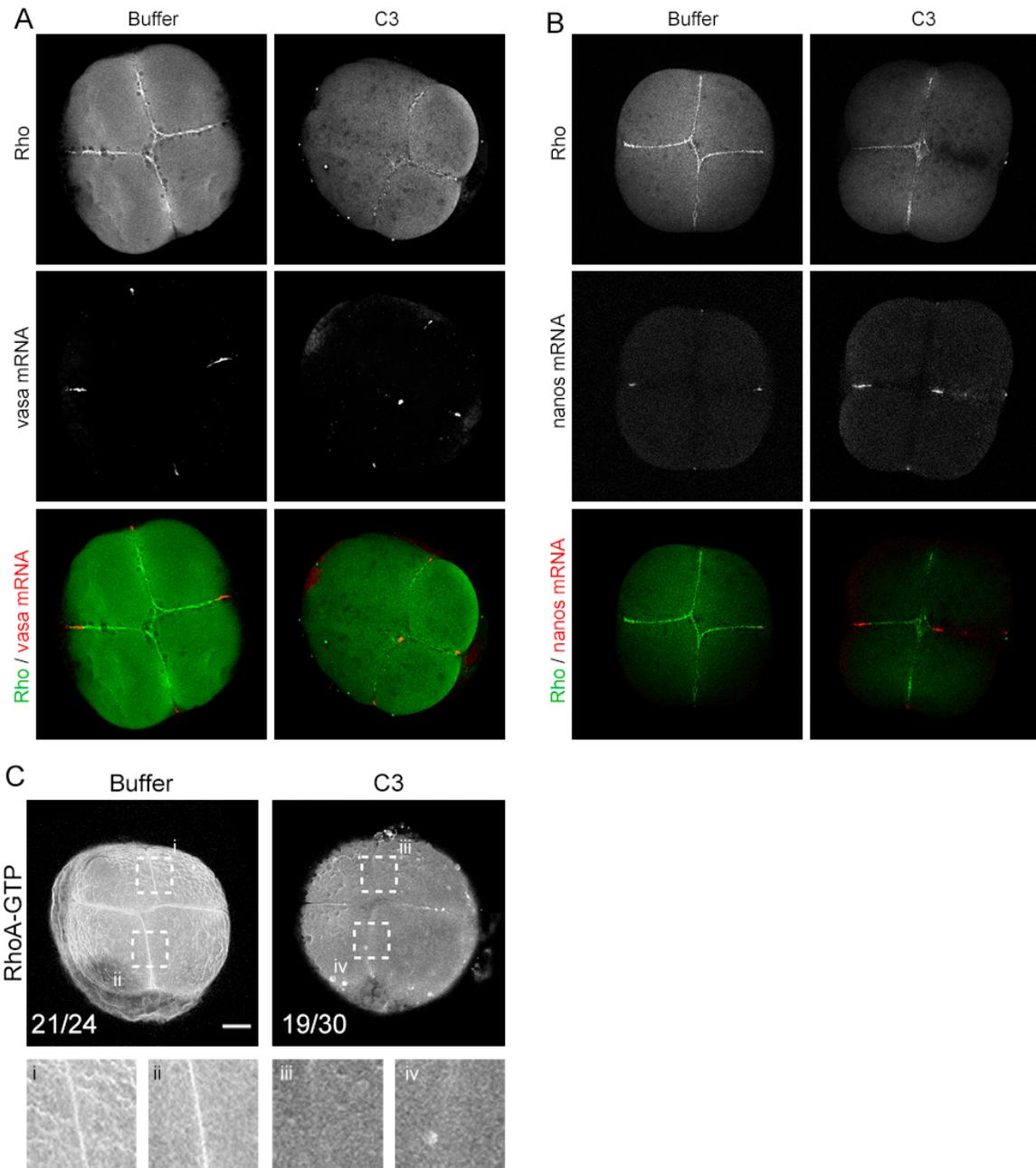


Figura 5.4. Efecto de la inyección de C3 sobre la localización del plasma germinal y RhoA. En los embriones inyectados con *buffer*, RhoA (verde) se localiza normalmente en el septo pero se ve deslocalizada en embriones inyectados con la toxina C3. La deslocalización de RhoA por C3 está asociada al desplazamiento del plasma germinal (rojo) hacia la región central del blastodisco visto con los marcadores *vasa* (A) y *nanos* (B). (C) la inyección de C3 también provoca la deslocalización de la forma activa de RhoA dentro del septo. Barra: 100 μ m

tendencia apunta a que la inhibición con C3 afecta de distintas maneras la localización de *nanos*, con un ligero sesgo hacia la falta de compactación. Por otro lado, la inyección de C3 se ve reflejada principalmente en la falta de compactación del mRNA de *vasa* y en su localización al centro del septo (Tabla 5.1).

Como parte del análisis, juntamos el número de embriones en las cuatro categorías bajo el grupo “anormales”. En la Figura 5.5, mostramos ejemplos de embriones considerados como “normales” o “anormales” teñidos con *nanos* o *vasa*. Como ya se ha mencionado, los embriones normales presentan cuatro agregados simétricos y bien compactados en la región distal (Figura 5.5, A, a, C, c). Los embriones agrupados como “anormales” pueden tener más de un defecto de localización a la vez, por ejemplo, falta de compactación dentro del septo (Figura 5.5, B y b) y agregados ectópicos fuera del septo (Figura 5.5, B *). Asimismo, el embrión teñido con *vasa*, tiene un agregado del plasma germinal dentro del septo (Figura 5.5, D y d) y falta de tinción o tinción reducida en 3 de los cuatro septos de división (Figura 5.5, flechas).

El promedio de embriones normales en los 4 experimentos con la sonda de *nanos* es de 35% en el grupo inyectado con C3 pero de 80% para los embriones control (Figura 5.5, E). En total se analizó la localización de *nanos* en 94 embriones control y 99 inyectados con C3. En el caso de *vasa* los resultados son muy similares: en 5 experimentos distintos, la proporción promedio de embriones normales fue de 27% en el grupo inyectado con C3 mientras que los embriones normales en el grupo control son el 90% (Figura 5.5, E). Para esta sonda se analizaron en total 98 embriones control y 113 inyectados con C3. La diferencia entre los grupos de embriones tratados y el grupo control es significativa para los experimentos con ambas sondas.

Paralelamente a la fijación en la etapa de 4 células, dejamos desarrollarse a un grupo de embriones de cada tratamiento para medir la sobrevivencia. Inyectamos tres concentraciones distintas de C3 permeable (C3) para obtener una curva que abarca dos órdenes de magnitud: 1, 10 y 100 nM. Estas concentraciones se han reportado antes en experimentos en pez cebra (1 nM Lai et al. (2005)) y *Xenopus* (100 nM Kishi et al. (1993)). Aunque en ovocitos de *Xenopus* se han utilizado concentraciones de hasta 3.33 μ M (Benink y Bement, 2005). Para las diferentes concentraciones y sus respectivos controles de inyección, registramos la supervivencia a las 24 horas (Figura 5.6). La inyección de 1 nM C3 prácticamente no afecta la sobrevivencia de los embriones. La inyección de 10 nM provoca un descenso en la supervivencia a las 24 horas a sólo el 40% de los embriones. Por su parte, cuando inyectamos 100 nM C3, típicamente menos del 10% de los embriones sobrevive. En la Figura

Fenotipo	C3/ <i>nanos</i>	C3/ <i>vasa</i>
Falta de compactación dentro del septo	37.97 \pm 17.3	47.09 \pm 3.95
Localización del plasma germinal al centro del septo	12.75 \pm 15.91	47.09 \pm 3.95
Agregados ectópicos fuera del septo	25.11 \pm 10.72	8 \pm 4
Falta de tinción	24.16 \pm 17.85	0

Tabla 5.1. Proporción de embriones anormales inyectados con C3 por categoría. La media y variación de la proporción de embriones que caen en diferentes categorías de defectos en la tinción de *nanos* o *vasa* al ser inyectados con C3. Un embrión puede entrar en más de una categoría.

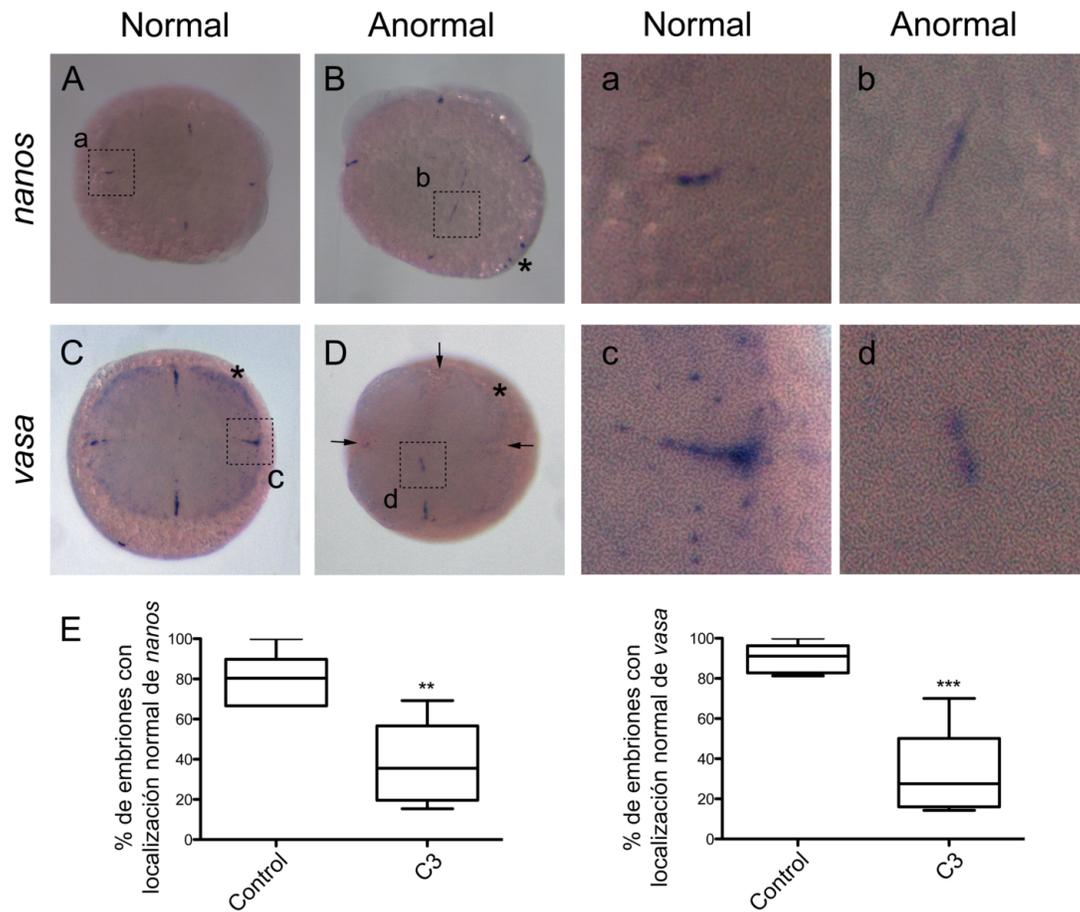


Figura 5.5. Cuantificación de anomalías en la localización del plasma germinal producidas por la inyección de C3. Patrones de localización ilustrativos de embriones normales o anormales teñidos con *nanos* o *vasa* (vista del polo animal). Los recuadros punteados en las columnas de la izquierda marcan acercamientos a los gránulos del plasma que se muestran a la derecha. En las gráficas se muestra el porcentaje de embriones que tuvieron una localización normal o anormal en los distintos tratamientos. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, prueba t de student.

5.6, mostramos imágenes de embriones representativos, uno inyectado con *buffer* y otro inyectado con una concentración de 520 nM C3, lado a lado. Los efectos sobre la morfología en las etapas tempranas son difíciles de observar sin marcadores moleculares, incluso, en la etapa de blástula temprana ambos embriones son prácticamente indistinguibles. Sin embargo, y como ha sido reportado (Lai et al., 2005), hay ciertos efectos acumulativos en la división celular y la migración de modo que los embriones tratados se lisan en el momento en el que los embriones control comienzan la gastrulación. A esta concentración, los embriones no sobreviven hasta las 24 horas.

Nosotros sólo observamos los efectos en la migración del plasma en la etapa de cuatro células cuando inyectamos esta última concentración, 520 nM, pero a causa de la mortalidad subsiguiente de los embriones, decidimos usar otro inhibidor de RhoA.

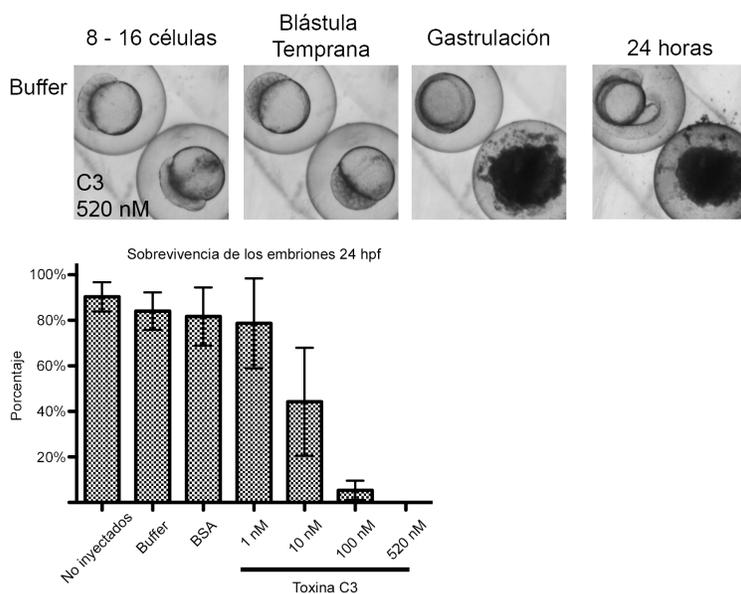


Figura 5.6. Sobrevivencia de embriones inyectados con distintas concentraciones de C3. Cuatro etapas de el seguimiento de un embrión control al lado de un embrión inyectado con la concentración de enzima que utilizamos para el trabajo. Gráfica de sobrevivencia a las 24 horas de embriones inyectados con 1 μ M BSA o 1, 10, 100 y 520 nM C3 y controles.

5.2.2. Papel de Rho: Inhibición con Rhosin

Rhosin es una molécula pequeña que inhibe específicamente a RhoA. Rhosin se une a la superficie alrededor del triptofano 58 de RhoA bloqueando su activación por GEFs (Shang et al., 2012). Esta molécula ya se ha usado para inhibir la actividad de RhoA en embriones y ovocitos de cerdo (Zhang et al., 2014). Utilizamos Rhosin como una manera alternativa de inhibir la actividad de RhoA de manera reversible (no covalente). Además, nos dimos cuenta de que a diferencia de la inhibición con la toxina C3, la inyección de Rhosin no mata a los embriones.

La Figura 5.7 muestra los resultados de estos experimentos. La inhibición de RhoA con Rhosin afecta la localización de RhoA en el septo (Figura 5.7, A, a1, D, d1). Esto es importante, pues un efecto de la inhibición de Rho es su translocación de la membrana al citoplasma (Genth et al., 2003). El posicionamiento de los septos de división no parece afectarse por la inhibición de RhoA. Incluso puede verse en la imagen en fluorescencia que los septos de división se forman pero se definen casi por la exclusión de RhoA de los mismos. Al mismo tiempo, la deslocalización de Rho está relacionada con la localización incorrecta del plasma germinal hacia la región central del septo (Figura 5.7, B, b1, E, e1). 3 de 5 embriones inyectados con Rhosin mostraron septos con una tinción reducida de RhoA que coincidían con la falta de compactación del plasma germinal (Figura 5.7, F, f1) en contraste con los embriones control que tienen un plasma bien compactado en el extremo del septo marcado con RhoA (Figura 5.7, C, c1).

Hicimos 5 repeticiones independientes de los experimentos con Rhosin para la sonda de *nanos* y 3 repeticiones independientes para *vasa* tiñendo de nueva cuenta con NBT/BCIP. Clasificamos a los embriones en normales o anormales con los mismos criterios que utilizamos en los ensayos con C3. En el promedio de estos experimentos, los mensajeros de *nanos* tienen una localización normal en el 90% de los embriones control

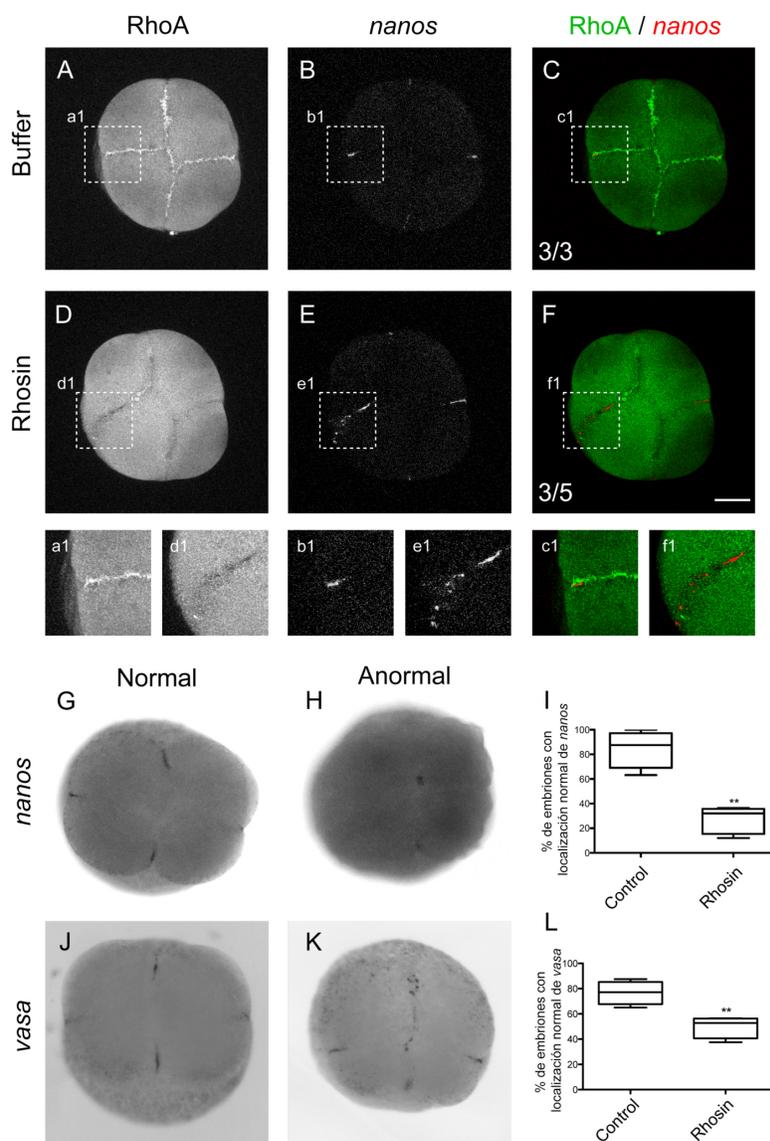


Figura 5.7. Tratamiento con el inhibidor de de Rho, Rhosin y efecto sobre el plasma germinal (A, a1, B, b1, C, c1) Embrión inyectado con *buffer* tiene una localización normal tanto de RhoA (A) como de *nanos* (B). La inyección de Rhosin merma la cantidad de RhoA en el septo de división (D, d1) acompañada de deslocalización del plasma germinal por falta de compactación a la región distal (E y e1). (G,H,J,K) Embriones teñidos con la sonda contra el mRNA de *nanos* (G,H) o *vasa* (J,K) para ilustrar la clasificación binaria Normal/Anormal, de acuerdo al patrón de localización. (I,L) Cuantificación de los embriones basada en esta clasificación. Se muestra el porcentaje de embriones que presentan una localización normal o anormal de cada sonda después de ser inyectados con buffer o el inhibidor de Rho. Número de embriones analizados: *nanos* Control: 80/ Rhosin:97; *vasa* Control:79/Rhosin:83. Barra: 100 μ m.

pero sólo en el 30 % de los embriones con Rhosin. En el caso del mRNA de *vasa* las proporciones de embriones normales son de 80 % en el control y 50 % en los tratados (Figura 5.7, I, L). La proporción de embriones normales en los embriones tratados en ambos casos es significativamente menor a la encontrada en los embriones inyectados control.

Mencionamos cuatro tipos de anomalías de localización del plasma germinal en los embriones tratados con C3. Observamos los mismos cuatro tipos de anomalías en los embriones tratados con Rhosin. Por ejemplo, el embrión anormal teñido con *nanos* que se muestra en la Figura 5.7 tiene el plasma germinal bien compactado, es decir, en un pequeño punto, pero no se ancla en la región distal sino que se deslocaliza hasta prácticamente el centro del blastodisco (Figura 5.7, H). Por su parte, el embrión anormal teñido con la sonda de *vasa* (Figura 5.7, K), tiene señal en la región distal pero no está compactada, sino dispersa por todo lo largo del septo hasta la región central.

Esto no quiere decir que después del tratamiento todos los embriones teñidos con *nanos* o con *vasa* muestren el mismo patrón mostrado en la figura, sino que hay variación en las proporciones de distintos defectos entre experimentos y sondas (Tabla 5.2), como en el caso de la inyección con C3. A grandes rasgos, la única tendencia que notamos es que la mayor proporción de embriones anormales con ambas sondas caen en la categoría **localización del plasma germinal al centro del septo** (47 y 37 % para *nanos* y *vasa*, respectivamente).

Fenotipo	Rhosin/ <i>nanos</i>	Rhosin/ <i>vasa</i>
Falta de compactación dentro del septo	31.97 ± 20.21	18.25 ± 11.72
Localización del plasma germinal al centro del septo	47.34 ± 21.17	37.93 ± 32.85
Agregados ectópicos fuera del septo	15.85 ± 2.05	34.6 ± 33.54
Falta de tinción	4.82 ± 4.03	24.12 ± 22.06

Tabla 5.2. Proporción de embriones anormales inyectados con Rhosin por categoría. La media y variación de la proporción de embriones que caen en diferentes categorías de defectos en la tinción de *nanos* o *vasa* al ser inyectados con Rhosin. Un embrión puede entrar en más de una categoría.

La primer función que se descubrió de las Rho GTPasas fue la remodelación del citoesqueleto de actina (Hall, 1998) aunque se sabe que también pueden regular la dinámica de microtúbulos (Eng y Gundersen, 2005).

La deslocalización del plasma germinal al inhibir a RhoA nos hizo preguntarnos si estos defectos se debían a una disminución o desorganización de los microfilamentos de actina. En la etapa de cuatro células, la actina se encuentra en los septos de división celular, en un patrón muy parecido al de Rho (Figura 5.8, A y C). Para nuestra sorpresa, la inhibición de Rho por C3 o Rhosin (Figura 5.8, B,D) no afecta la organización de la actina en el embrión de cuatro células.

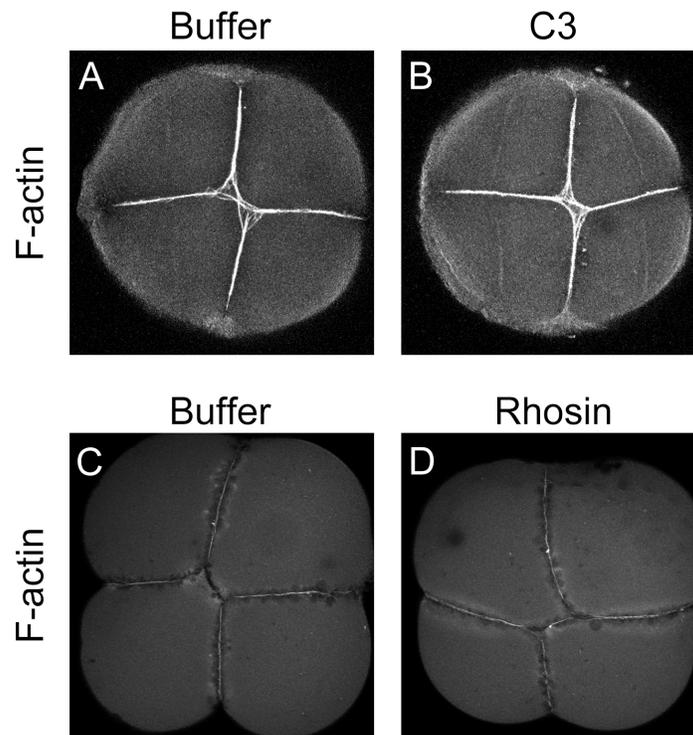


Figura 5.8. Efecto de la inhibición de Rho sobre el citoesqueleto de actina. Localización de la actina en embriones control (A y C) o en embriones inyectados con los inhibidores de Rho, C3 (B) o Rhosin (D).

5.3. Papel de ROCK en la localización del plasma germinal

Rho tiene dos efectores principales, ROCK y la formina mDia (Narumiya et al., 2009). A través de mDia, Rho promueve la nucleación y elongación de filamentos lineales de actina (Goode y Eck, 2007); mientras que la función de ROCK es promover la fosforilación de la miosina (Amano et al., 1996). Nosotros vimos que la polimerización de actina no estaba afectándose durante la inhibición de Rho. Por otro lado, se sabe que la miosina, que es un blanco de ROCK, tiene un papel central en la compactación del plasma germinal (Urven et al., 2006; Nair et al., 2013). Por estas razones, decidimos investigar el papel de ROCK en la localización del plasma germinal.

Utilizamos un anticuerpo para ver la localización de ROCK durante las primeras divisiones. En las etapas de 2, 4 y 8 células, ROCK también se localiza en los septos de división. A diferencia de Rho, sin embargo, ROCK está más enriquecido en la región distal de los septos, es decir, la región más cercana a la periferia del blastodisco (Figura 5.9, A). Al menos en los primeros dos septos, ROCK se localiza en la región distal, donde puede estar interactuando con el plasma germinal.

La interacción con Rho activa resulta en la desinhibición de la actividad de cinasa de ROCK. Uno de los sustratos principales de esta actividad es la cadena ligera reguladora de la miosina. Utilizamos un anticuerpo que reconoce esta modificación para mostrar la distribución de la miosina fosforilada (myo-p) en las etapas de 2, 4 y 8 células (Figura

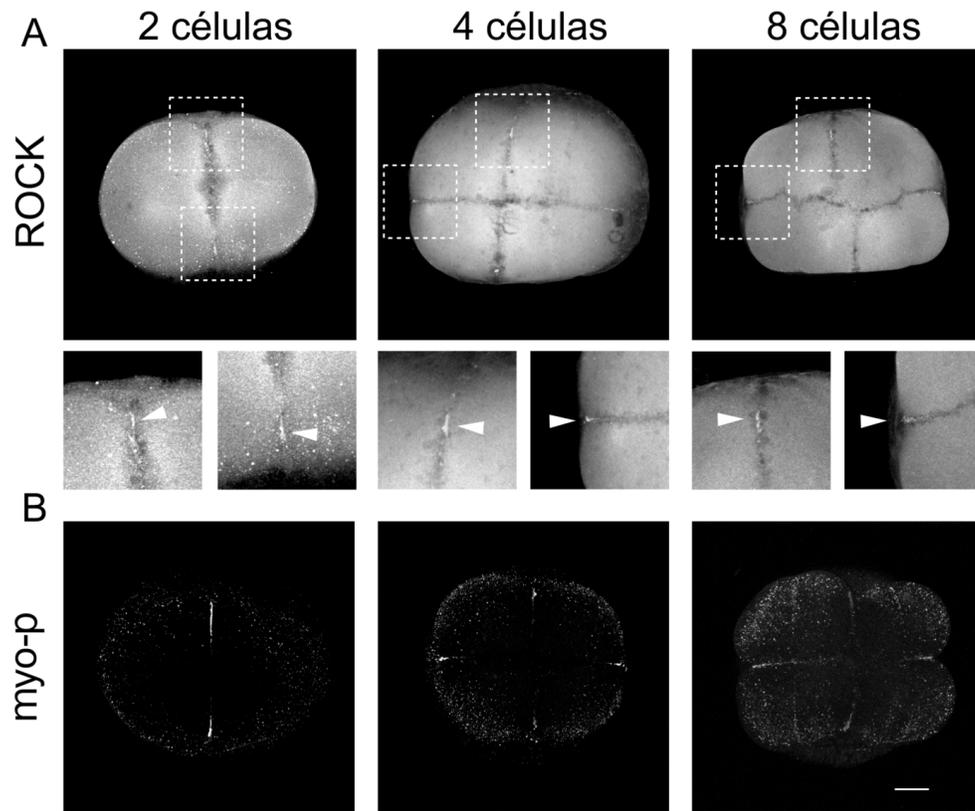


Figura 5.9. Localización de ROCK y la miosina fosforilada. Localización de ROCK en las etapas de 2, 4 y 8 células (A). Se muestran en los aumentos los extremos distales de algunos septos donde se acumula ROCK (cabezas de flecha). Localización de la myo-p en las mismas etapas (B).

5.9, B). La myo-p se encuentra localizada en forma de puntos dentro del embrión, que se excluyen de la zona central del blastodisco y se enriquecen en especial en las zonas distales de los septos de división, de manera muy similar a ROCK. Otros grupos han determinado que estas regiones enriquecidas en myo-p corresponden al plasma germinal (Nair et al., 2013; Eno y Pelegri, 2013).

Se sabe que ROCK tiene la capacidad de fosforilar a la miosina. Por ello, y tomando en cuenta los resultados anteriores sobre el papel de Rho, propusimos que ROCK juega un papel en la localización del plasma germinal. Para investigarlo, nos valimos de un inhibidor específico de ROCK, el compuesto H-1152 (Sasaki et al., 2002), éste es un inhibidor potente pero reversible que compite con el ATP por la unión al sitio activo de ROCK (Jacobs et al., 2006).

El diseño experimental fue prácticamente el mismo que con los inhibidores de Rho. Como control, inyectamos *buffer* con una concentración equivalente de DMSO. De cada grupo experimental, apartamos embriones de manera aleatoria para fijación con PFA y posterior tinción por hibridación *in situ*. Luego de teñir a los embriones con las sondas de *nanos* y *vasa* los clasificamos en normales o anormales utilizando los mismos criterios que se han explicado más arriba.

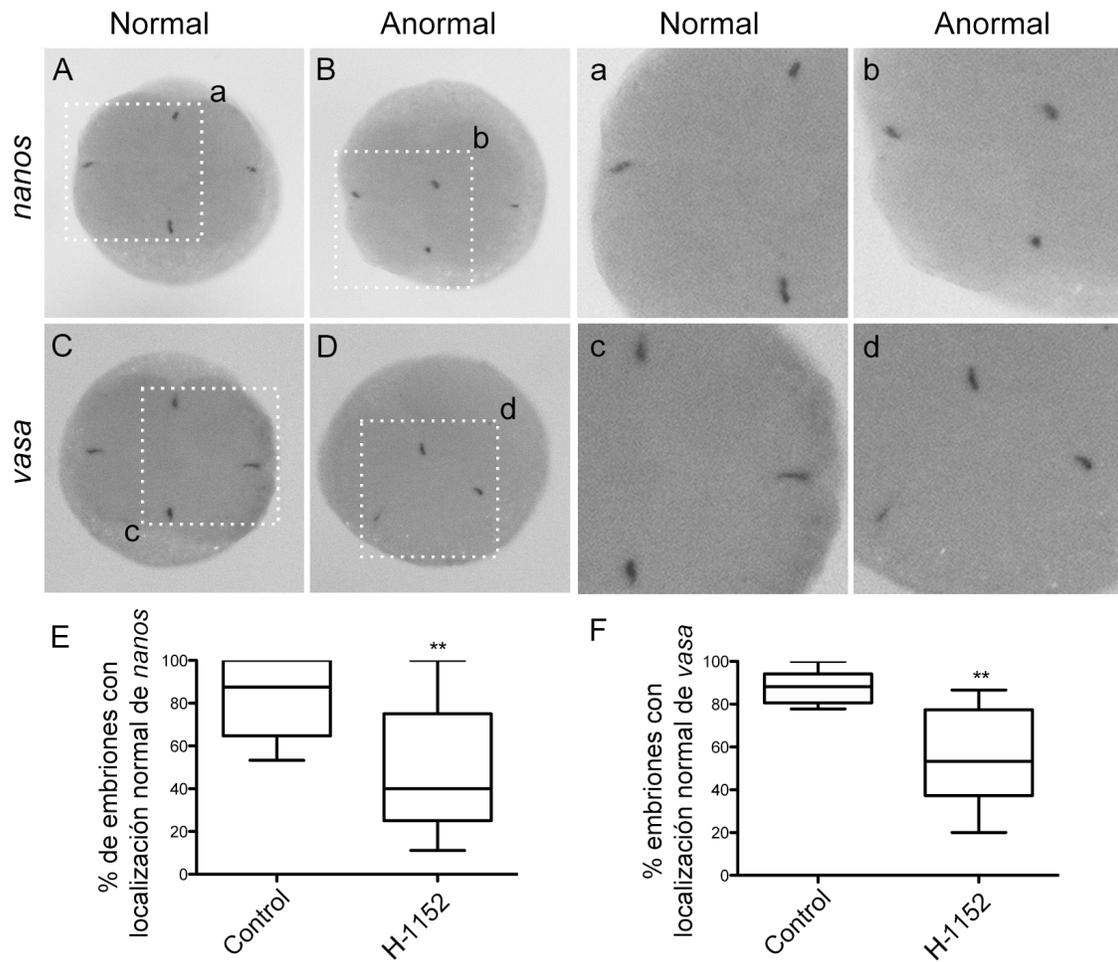


Figura 5.10. Efecto de la inhibición de ROCK con H-1152 sobre la localización del plasma germinal. (A, a, C, c) Localización normal de los mRNAs de *nanos* y *vasa* en la etapa de 4 células. (B,b,D,d) Localización anormal del plasma germinal en el centro del septo de división. (E-F) Cuantificación del porcentaje de embriones que caen en una u otra clasificación con los diferentes tratamientos: inyectados con *buffer* o con el inhibidor de ROCK. El número de embriones para cada experimento es: Para *nanos* Control:160 / H-1152: 209; *vasa* Control:138 / H-1152:131.

En cuanto al plasma germinal animal, los resultados son similares a las inhibiciones de Rho cuantitativamente: las proporciones de embriones con anomalías son muy similares con un promedio de 60% de los embriones tratados pero sólo un 12% en los embriones control, para el mRNA de *nanos* (Figura 5.10, E) y un promedio de 47% de embriones anormales entre los inyectados con H-1152 en comparación con 12% en los embriones control para el mRNA de *vasa* (Figura 5.10, F). Cualitativamente, hay diferencias entre la inhibición de Rho y ROCK: en los embriones inyectados con inhibidores de Rho encontramos las cuatro clases de defectos descritos en la Figura 4.2, pero los embriones inyectados con H-1152 muestran predominantemente agregados del plasma germinal bien condensados pero deslocalizados hacia la región central del blastómero (Figura 5.10,

B,b,D,d).

Teñimos los filamentos de actina en embriones control y tratados con H-1152. Al igual que en el caso de la inhibición de Rho, no se manifestó ningún defecto evidente en la distribución de los filamentos de actina en el septo de los embriones tratados en comparación con la distribución normal en los embriones control (Figura 5.11).

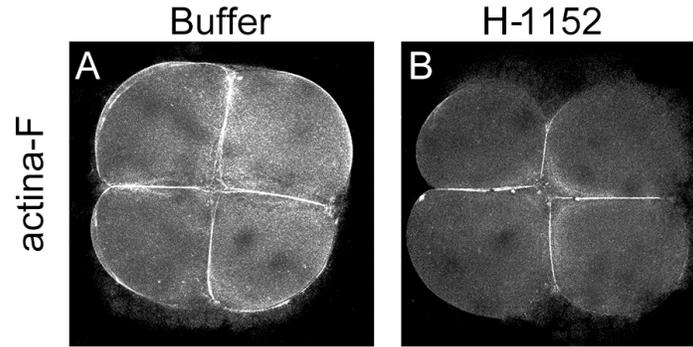


Figura 5.11. Distribución de la actina en embriones inyectados con H-1152. Actina polimerizada marcada con faloidina fluorescente en un embrión inyectado con *buffer* (A) y un embrión inyectado con el inhibidor H-1152 (B)

Para confirmar la eficacia de la inhibición de ROCK, nos valimos de que su actividad promueve justamente la modificación de la miosina que reconoce nuestro anticuerpo. Además, se ha reportado que la myo-p co-localiza con el plasma germinal y es constituyente del mismo (Nair et al., 2013; Eno y Pelegri, 2013). Utilizando este anticuerpo, observamos el efecto sobre la intensidad y distribución de la myo-p provocado por la inyección de H-1152. Analizamos la intensidad de la miosina en los cuatro puntos más intensos que corresponden al plasma germinal, para un conjunto de ≈ 20 embriones por tratamiento (Figura 5.12). Tomados así, hay una tendencia significativa a la baja de la señal de la myo-p, incluso en embriones en los que la localización no se ve tan afectada. Esto es evidencia de que el inhibidor H-1152 provoca un descenso en la actividad de ROCK que se ve reflejado en una disminución parcial de su producto.

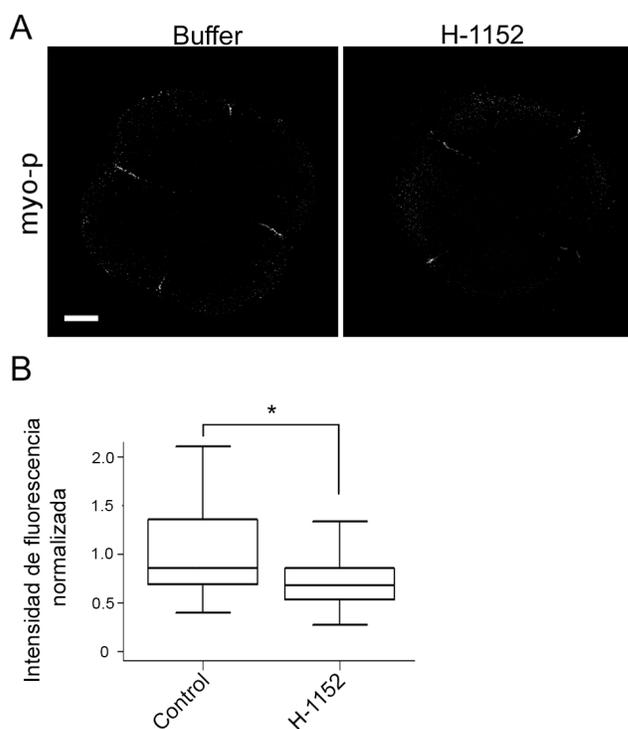


Figura 5.12. Efecto de la inhibición de ROCK con H-1152 sobre la miosina fosforilada (myo-p). (A) Inmunofluorescencia contra la myo-p en embriones de cuatro células control o inyectados con el inhibidor de ROCK. Puede observarse el enriquecimiento de la miosina en los agregados del plasma germinal (B) Se cuantificó la intensidad de la señal fluorescente en el área del plasma germinal en 19 (*buffer*) o 24 (H-1152) embriones. La señal de la myo-p en el plasma germinal es significativamente menor entre los embriones control y los inyectados con el inhibidor de ROCK de acuerdo a la prueba t de student, * $p < 0.05$

5.4. Efecto de los inhibidores sobre los microtúbulos

La deslocalización del plasma germinal puede deberse a defectos en el citoesqueleto provocados por la inhibición de la vía Rho/ROCK. Sin embargo, vimos que la inhibición de Rho no afecta la organización de la actina (Figura 5.8). A pesar de su efecto sobre la myo-p, la inhibición de ROCK tampoco afecta la organización de la actina con respecto a los embriones control (Figura 5.11).

Tanto Rho como ROCK son necesarios para la compactación de los mRNAs a la región distal, probablemente a través de la activación de la miosina. En el septo de división se forma un arreglo de microtúbulos paralelos entre sí con una orientación perpendicular al septo, el Arreglo de microtúbulos del septo (FMA) (ver Figura 1.5). En embriones control, los microtúbulos del FMA sufren un desplazamiento inclinándose con respecto al septo, dando la apariencia de flechas que apuntan hacia la región distal (Figuras 5.13 a2, c2 y e2). Éste es un proceso normal que depende de la actividad de la miosina y está relacionado con la compactación del plasma germinal (Urven et al., 2006). En los septos más maduros, la remodelación del arreglo de microtúbulos da lugar a la deposición de una banda compacta de tubulina a lo largo del septo (Figuras 5.13 a1, c1, e1). Ambas estructuras de microtúbulos se desorganizan en embriones inyectados tanto con los inhibidores de Rho (Rhosin y C3) como con H-1152 (Figuras 5.13 B, C, F). El FMA no se remodela y mantiene su orientación perpendicular al septo (Figuras 5.13, b2, d2, f2). Por su parte, la banda de tubulina del septo maduro se ve sustituida por microtúbulos desorganizados alrededor del septo en los embriones tratados (Figura 5.13 b1, d1, f1). Estos resultados sugieren que Rho y ROCK

median la localización del plasma germinal sobre todo a través de la remodelación del FMA en un proceso dependiente de la actividad de la miosina.

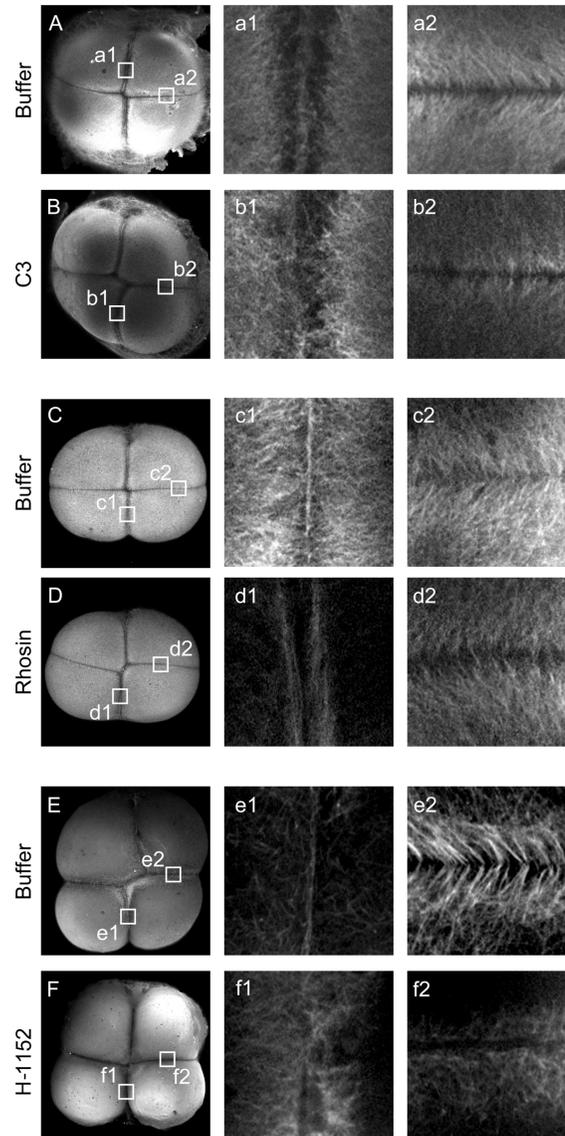


Figura 5.13. Efecto de la inhibición de Rho y ROCK sobre la organización de los microtúbulos. Embriones teñidos con un anticuerpo contra α -tubulina. En el panel superior, se muestra una comparación de la organización de la tubulina entre embriones inyectados con buffer (A,C,E) o C3 (B), Rhosin (D) o H-1152(F), con especial atención al FMA organizado alrededor del septo de división. Columna del centro: acercamientos al primer septo de división. El FMA coalesce en una delgada franja reflejando la maduración de los septos de embriones normales (a1, c1, e1). La misma franja no se forma adecuadamente en los septos equivalentes en embriones inyectados con inhibidores de la vía Rho/ROCK (b1, d1, f1). Columna derecha: acercamientos al FMA en el segundo septo de división. El FMA en los septos en proceso de maduración se organiza en filamentos a ambos lados del septo con una inclinación hacia la región distal (a2, c2, e2). En los septos tratados con inhibidor, el FMA se desorganiza y pierde su orientación hacia la región distal (b2, c2, f2).

5.5. Participación de la vía Rho/ROCK en la localización del plasma germinal vegetal

RhoA y ROCK a través de la miosina y los microtúbulos, controlan la localización correcta del plasma germinal animal representado por los mRNAs de *nanos* y *vasa*.

El mRNA de *dazl* es un marcador del plasma germinal vegetal que en la etapa de 4 células también se localiza en la región distal de los septos de división. No obstante, *dazl* migra por trayectos distintos al plasma germinal animal: se concentra en el polo vegetal desde etapas tempranas de la ovogénesis y permanece allí hasta la fertilización, cuando comienza a translocarse hacia el polo animal por mecanismos que aún se desconocen (Sección 1.3.1). Para ver si Rho y ROCK también participan en la localización del plasma germinal vegetal, hicimos experimentos de inhibición y marcamos a los embriones con una sonda contra *dazl*. El mRNA de *dazl* se localiza de manera normal en los 4 puntos en la región distal de los septos en la etapa de cuatro células (Figura 5.14 A, a, C, c). Los embriones sin tinción en la región distal del septo (Figura 5.14 B, b, D, d) los clasificamos como “anormales”. Buena parte del mRNA de *dazl* permanece anclado en una franja en el polo vegetal en la posición que ocupa desde la ovogénesis. Todos los embriones, tanto los embriones normales como los anormales mantienen esta tinción de *dazl* en la región vegetal, lo cual nos sirvió como un control interno de que la falta de tinción en el polo animal no se debe a un problema con la hibridación *in situ* (Figura 5.14 C, D).

Cuantificamos la proporción de embriones normales y anormales en grupos inyectados con los dos inhibidores de Rho y el inhibidor de ROCK. La inyección con C3 provoca una disminución significativa en el número de embriones con tinción normal en el septo de división (Figura 5.14), F). Sin embargo, estos resultados no se repiten con el inhibidor Rhosin ni con el inhibidor de ROCK: en ninguno de estos encontramos una diferencia significativa con los embriones control (Figura 5.14, G, H).

dazl no requiere compactarse dentro del septo como sucede con el plasma germinal animal. Quizás por ello, no vimos toda la gama de fenotipos que vimos al analizar a *nanos* y *vasa*. La ausencia de *dazl* en el polo animal es causada probablemente por la obstrucción de su migración desde su posición inicial en el polo vegetal.

Hicimos hibridaciones *in situ* control contra un mRNA con otro patrón de localización, *zorba*, que se localiza normalmente al polo animal de manera homogénea (Figura 5.14), E). La distribución o intensidad del mRNA de *zorba* no sufrió ninguna alteración en embriones inyectados con la enzima C3 (Figura 5.14), I). Esto significa que la falta de tinción de *dazl* no se debe a que C3 provoque un bloqueo general de la localización de mRNAs en el polo animal.

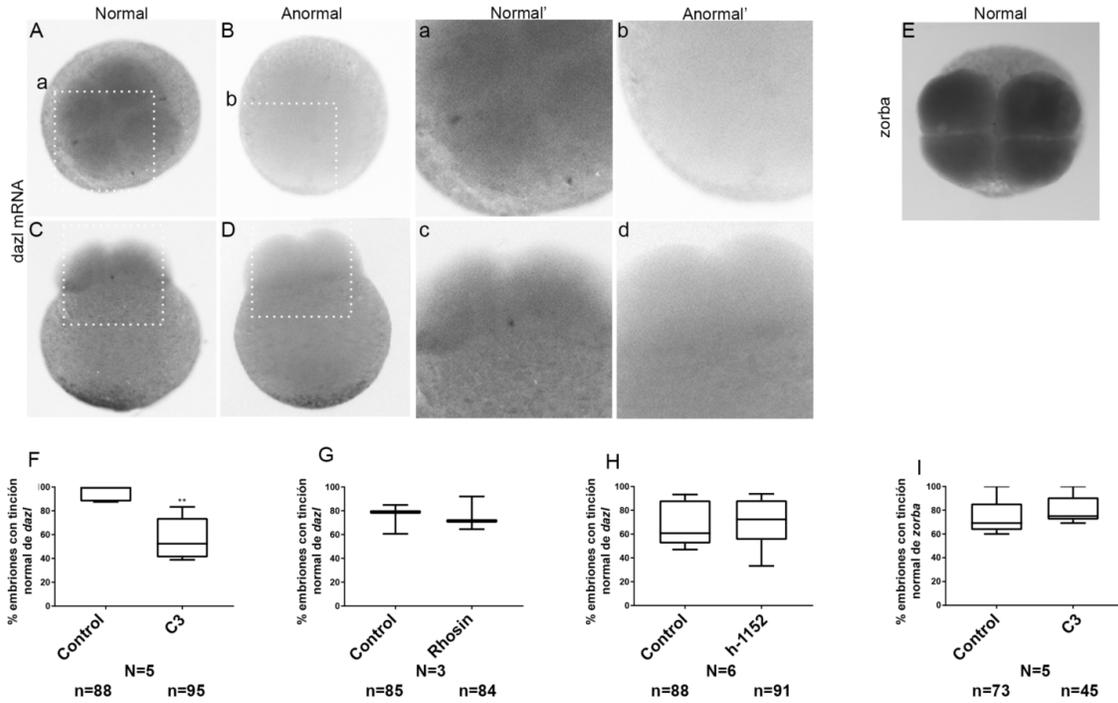


Figura 5.14. Efecto de los inhibidores sobre los mRNAs de *dazl* y *zorba*. (A-D) Embriones teñidos con la sonda de *dazl* desde una vista animal (A,B) o una vista lateral con el polo animal hacia arriba y el polo vegetal hacia abajo (C-D). (a-d) acercamientos a las regiones donde normalmente se localiza el plasma germinal. Los embriones “anormales” carecen de tinción en estos puntos (b,d). (E) El mRNA de *zorba* es un mRNA que se distribuye homogéneamente por los blastómeros en el polo animal. (F-I) Cuantificación del porcentaje de embriones normales en diferentes tratamientos para los mRNAs *dazl* (F-H) y *zorba* (I). ** $p < 0.01$. N=número de experimentos independientes. n=total de embriones analizados.

5.6. Efectos de la deslocalización del plasma germinal durante las 4 células sobre el desarrollo de células germinales en las etapas de 128 células y 24 hpf

Los gránulos del plasma germinal y el plasma germinal vegetal se reúnen durante la etapa de cuatro células en la región distal de los septos de división para formar cuatro agregados de plasma germinal (Theusch et al., 2006). Más adelante, en la etapa de 32 células, los cuatro agregados se internalizan a cuatro células determinando su destino como Células Germinales Primordiales (CGP) que son la población fundadora de la línea germinal. Para saber qué sucede con las CGP más adelante en el desarrollo si se deslocaliza el plasma germinal, seguimos algunos embriones inyectados hasta 24 horas después de la fertilización. En este momento ya se ha establecido el plan corporal del embrión y las CGP se han congregado en los sitios de las futuras gónadas (Figura 5.7, C).

Se puede utilizar a los mRNAs del plasma germinal como marcadores de las CGP en la etapa de 24 horas. Las CGP se acumulan en el lugar donde comienza la cola y la proyección del vitelo. Si se examina a los embriones desde una posición dorsal puede verse un grupo

de CGP a cada lado de la línea media (Figura 5.15, A,C). El inhibidor enzimático de Rho, C3, provocó la muerte de los embriones al inicio de la gastrulación (Figura 5.6). Por su parte, los inhibidores farmacológicos, Rhosin y H-1152, no provocan muerte ni defectos morfológicos a simple vista a las 24 horas, por lo que fijamos algunos de estos embriones. Al marcar las CGP notamos 4 tipos de anomalías: embriones que tenían una tinción reducida en la futura gónada (Figura 5.15, B); embriones que tenían tinción en sólo una de las dos gónadas prospectivas (Figura 5.15, D); embriones con tinción ectópica fuera de la gónada y embriones sin tinción.

Cuantificamos la distribución de cada tipo de anomalía entre los embriones inyectados. El mayor grupo de anomalías en células germinales en los embriones tratados con Rhosin es el de los embriones que sólo tienen tinción en una de las gónadas (Tabla 5.3). En el grupo tratado con H-1152, predominan los embriones con tinción ectópica fuera de la gónada y no encontramos ninguno con falta de tinción (Tabla 5.3).

Al inyectar cualquiera de los dos inhibidores farmacológicos, hay un descenso significativo en el porcentaje de embriones clasificados como normales (Figura 5.15 E,F)

Fenotipo	Rhosin	H-1152
Tinción reducida	29.7 ± 20.57	38.52 ± 1.48
Sólo una de las gónadas	40.11 ± 16.77	16.11 ± 6.11
Señal ectópica fuera de la gónada	27.21 ± 12.14	45.37 ± 4.62
Falta de tinción	24.16±17.85	0

Tabla 5.3. Defectos en el número o distribución de las células germinales en embriones de 24 horas inyectados con Rhosin o H-1152 al principio del desarrollo. Datos obtenidos de 5 experimentos de inyección independientes para cada inhibidor. Número total de embriones analizados: Rhosin: 57; H-1152: 30

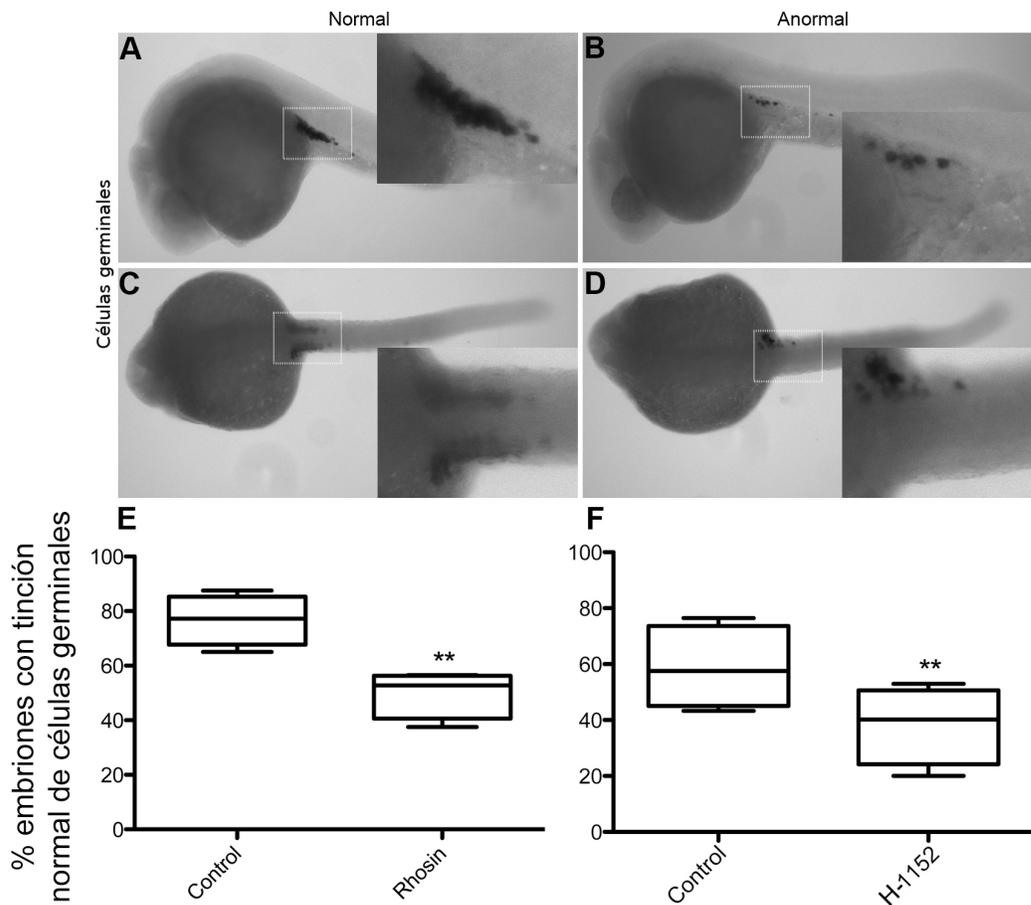


Figura 5.15. Efecto de la inhibición de Rho/ROCK sobre la especificación de la línea germinal en la etapa de blástula y a las 24 horas. (A-D) Células germinales teñidas por hibridación *in situ* en embriones de 24 horas. Vista lateral (A,B) o vista dorsal (C,D). (A,C) Para la etapa de 24 horas, las CGP han migrado hacia las gónadas embrionarias y se agrupan allí en dos cúmulos a ambos lados de la línea media. Sin embargo, hay embriones anormales en los cuales la cantidad de células germinales se ve disminuida (B,D). Cuantificación de embriones con una tinción normal en las células germinales inyectados con Rhosin (E) o H-1152 (F) desde la etapa de 1-célula.

Nosotros propusimos que la disminución de las CGP a las 24 horas se debe la especificación de un menor número de ellas provocada por la deslocalización del plasma germinal en etapas muy tempranas. Sin embargo, los resultados podrían explicarse de igual manera por una afectación en la proliferación o supervivencia de las CGP una vez especificadas. Para distinguir entre ambas posibilidades, repetimos los experimentos para una etapa intermedia, la etapa de 128 células durante el periodo de la blástula temprana.

Los agregados del plasma germinal se integran a un subconjunto de blastómeros en la etapa de 32 células. Estas células se convertirán en las CGP que migran hacia las gónadas embrionarias durante la somitogénesis. Cuando los embriones tienen 128 a 256 células, las CGP ya se han especificado por la internalización del plasma germinal pero no han iniciado su división ni su migración, por lo que cualquier cambio en el número

observado de ellas se debe probablemente a su especificación. Así, contamos el número de células por embrión en un grupo control y otro inyectado con el inhibidor de ROCK para estimar si la deslocalización del plasma en las 4-células influye en el número de células germinales que se especifican; lo cual podría explicar las observaciones a las 24 horas. Hay una disminución en el número de embriones con 4 células germinales, el número típico en embriones control (Figura 5.16, D). Esto sugiere que defectos en la localización del plasma germinal muy temprano en el desarrollo sí tienen un efecto en la posterior formación de las células germinales.

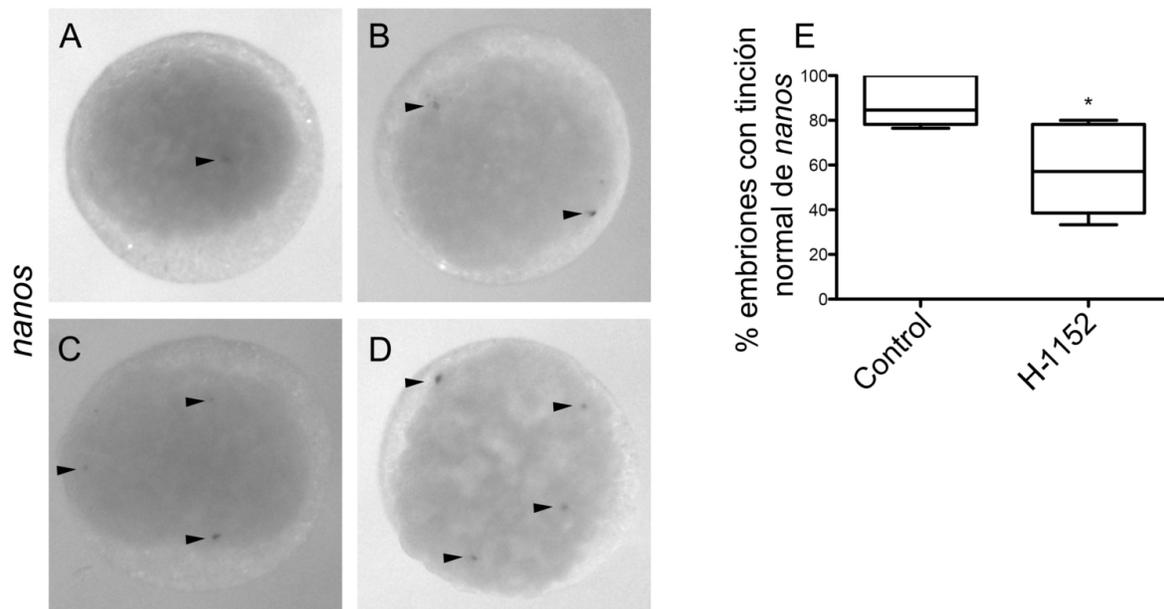


Figura 5.16. Efecto de la inhibición de ROCK sobre las células germinales de la blástula temprana. (A-D) Ejemplos de embriones en etapa de blástula temprana (128-256 células) con 1 (A), 2 (B), 3 (C) o 4 (D) células germinales. El número normal de células germinales en esta etapa es 4. El resultado de la internalización de los agregados del plasma germinal en etapas anteriores. (E) Cuantificación de embriones con una disminución de CGP en esta etapa. * $p < 0.05$

6

Discusión

6.1. Papel de RhoA y ROCK en el control del citoesqueleto y la localización del plasma germinal

6.1.1. Localización de las Rho GTPasas

Nuestro estudio muestra que RhoA se encuentra como proteína de herencia materna desde las primeras divisiones celulares en el pez cebra. RhoA se localiza preferencialmente en los dos primeros septos de división. Esto coincide a grandes rasgos con las estructuras del plasma germinal que son necesarias para la determinación de los gametos del embrión. Rac y Cdc42, las otras dos Rho GTPasas que evaluamos, también se encuentran en estas etapas pero su localización no muestra ningún patrón particular.

Existe evidencia de que las 3 Rho GTPasas se regulan entre sí, por ejemplo, durante el cerrado de heridas en ovocitos de *Xenopus*, RhoA y Cdc42 se inhiben la una a la otra, delimitando sus dominios de activación de manera mutuamente excluyente (Benink y Bement, 2005). Rho y Rac también tienen una relación mutuamente antagónica bien estudiada (Nimnual et al., 2003; Ohta et al., 2006). Esto es consistente con el enriquecimiento únicamente de Rho al septo de división pero no de Rac ni de Cdc42. No se puede descartar que Rac y Cdc42 tengan un papel indirecto en los procesos que estamos estudiando pues su actividad fuera del septo podría estar constriñendo a RhoA a su localización normal.

Para activar a sus efectores, RhoA debe encontrarse en su conformación unida a GTP; un anticuerpo que reconoce sólo a esta conformación también muestra un enriquecimiento de RhoA en el septo. No obstante, los patrones de los dos anticuerpos contra RhoA muestran ligeras discrepancias. En el caso de Rho-GTP las franjas en el septo de división son quizás un poco más delgadas y definidas (Figura 5.2 vs Figura 5.3). Esto sería congruente con una hipótesis de que para mantener un anillo contráctil se requiere de un mecanismo de “threadmilling” que consiste de una zona central con Rho activa (la franja delgada de Rho-GTP) y dos flancos de Rho inactiva a ambos lados (la diferencia de grosor del anticuerpo RhoA, que reconoce tanto a la forma activa como a la inactiva) (Burkel et al., 2012).

Otra discordancia entre los anticuerpos es que Rho-GTP muestra señal en todos los septos durante la tercera división (Figura 5.3, C) mientras que el anticuerpo contra Rho

total sólo parece localizarse en los primeros dos septos (Figura 5.2, C). Es posible que esto se deba a que ambas tinciones no se hayan hecho en etapas exactamente equivalentes y no puede descartarse que el anticuerpo contra Rho total muestre señal en los septos de etapas posteriores. Para confirmar esto, sin embargo se requerirían otras herramientas pues, al menos en nuestras manos, los protocolos de fijación para los dos anticuerpos son incompatibles entre sí.

Alternativamente, los antígenos de ambos anticuerpos podrían no coincidir del todo. El genoma del pez cebra contiene 3 parálogos de RhoA (RhoAa, RhoAb, RhoAc) y 2 parálogos de RhoC (RhoCa y RhoCb), y todos menos RhoAb se transcriben durante la ovogénesis (ver Apéndices). El anticuerpo contra RhoA total reconoce a los parálogos de RhoA y quizás a RhoCb, pero muy probablemente no reconoce a RhoCa. El anticuerpo contra RhoA activa, al reconocer una conformación tridimensional, podría unirse a los parálogos de RhoC adicionalmente a RhoA y mostrar un patrón ligeramente distinto.

No obstante, la alta concordancia entre estos dos anticuerpos en los primeros dos septos de división, además de la disrupción de ambos patrones con los inhibidores es muy buena evidencia de que allí es donde RhoA se encuentra activa principalmente.

A este respecto, es interesante que también detectamos a ROCK únicamente en los primeros dos septos de división, aunque a diferencia de Rho, se restringe a la región distal. ROCK podría colocalizar con el plasma germinal y sobre todo con la myo-p, lo cual sugiere que ROCK es responsable de fosforilar a la miosina en esta zona. Sin embargo, la myo-p, a diferencia de RhoA y ROCK, también se encuentra en los septos del tercer ciclo celular. Otras cinasas podrían estar fosforilando a la miosina fuera del primer y segundo septo. Asimismo, el anticuerpo que utilizamos sólo reconoce a ROCK2 α por lo que no podemos descartar que ROCK1 o ROCK2b se localicen en los septos del tercer ciclo celular.

6.1.2. Maduración del septo: citoesqueleto y localización del plasma germinal

La citosinesis del pez cebra puede a grandes rasgos dividirse en tres pasos en orden secuencial: posicionamiento del septo, ingresión y maduración (Webb et al., 1997).

La figura 6.1, resume en un esquema los estudios en los que se han visto distintos fenotipos de deslocalización del plasma germinal animal. La disrupción general de la tubulina o la actina justo después de la fertilización impide seriamente la ingresión de los septos de división y la agregación del plasma germinal (Theusch et al., 2006). Los cuatro agregados son reemplazados por un gran número de pequeños gránulos que no se compactan unos con otros y se distribuyen homogéneamente por el blastodisco (Figura 6.1, A).

Los fenotipos que vemos al inhibir a Rho difieren de esto en cuanto a la localización de mRNAs pero también morfológicamente: la inhibición de Rho no afecta ni el posicionamiento ni la ingresión del septo; lo cual argumenta que su inhibición no promueve la despolimerización general de microtúbulos ni de actina.

Luego de la ingresión, sucede la maduración del septo que es esencial para mantener la compactación del embrión durante las primeras divisiones celulares (Jesuthasan, 1998). En

la maduración del septo las membranas de las dos células hijas se juntan en una especie de “cerrado de cremallera”. Así, el septo maduro consiste en la interfaz entre dos membranas que se mantienen unidas gracias a la β -catenina y cadherina (Jesuthasan, 1998).

La inhibición de la actividad de la miosina o la despolimerización transitoria de tubulina por un tratamiento rápido con nocodazol afectan la maduración del septo pero no inhiben ni la formación ni la ingresión (Urven et al., 2006; Jesuthasan, 1998).

RhoA parece tener un efecto en la compactación y anclaje del plasma germinal durante la etapa de maduración del septo. Esto se ve apoyado por su localización prolongada dentro de los mismos. Es decir, el enriquecimiento de RhoA no es transitorio, se mantiene en los primeros dos septos de división y no desaparece incluso cuando ya está formándose el tercero.

Tanto la actividad de la miosina como la integridad de los microtúbulos se requieren para la localización de la β -catenina y de las vesículas exocíticas que ayudan a la remodelación de la membrana (Urven et al., 2006; Jesuthasan, 1998). La inhibición de la miosina o de los microtúbulos da lugar a una deslocalización del plasma germinal dentro del septo: la inhibición de la miosina tiene como consecuencia la falta de compactación (Figura 6.1, B) mientras que la inhibición transitoria de los microtúbulos hace que los agregados compactos se localicen de manera anormal en el centro del septo (Figura 6.1, C) (Urven et al., 2006; Jesuthasan, 1998).

Los embriones inyectados con C3 y Rhosin presentan los dos tipos de defectos. Esto nos sugiere que RhoA, de manera congruente con su localización al septo de división, controla tanto la actividad de la miosina como la dinámica de los microtúbulos para organizar la correcta compactación y anclaje del plasma germinal.

Dado que la inhibición de Rho afecta tanto la actividad de la miosina como la remodelación de los microtúbulos, el efecto de los inhibidores de la vía Rho sobre la localización del plasma germinal podría explicarse por una falla en la maduración del septo: si la “cremallera” del septo se mantiene abierta en regiones proximales, el plasma germinal podría deslocalizarse hacia esas regiones.

Una alternativa es que la compactación y localización del plasma germinal sean independientes de la maduración del septo pero que ambos efectos sean dependientes de RhoA y la dinámica de los microtúbulos. Un experimento que podría ayudar a discernir entre las dos posibilidades sería interferir con la β -catenina o la cadherina. Ambas moléculas son esenciales para la maduración del septo pero están vía abajo de la organización de la tubulina (Jesuthasan, 1998) (y probablemente río abajo de RhoA también). Ambas moléculas parecen ser de herencia materna y no existen, hasta donde sabemos, inhibidores farmacológicos de su actividad; no obstante, la aparición de nuevas técnicas de edición genómica para el pez cebra y otros organismos hacen factible obtener mutantes para estudiar el papel de éstas más a detalle (Hwang et al., 2013). En el caso de la E-cadherina, existe también la opción de usar anticuerpos inhibidores, pues de hecho, la función de estas moléculas se descubrió gracias a anticuerpos que bloqueaban la adhesión celular (Yoshida-Noro et al., 1984).

6.1.3. RhoA y localización del plasma germinal fuera del septo

Al inhibir a RhoA, cada embrión puede presentar cuatro tipos de fenotipos anormales distintos. Los cuatro fenotipos podrían ser pasos intermedios de la vía de localización del plasma germinal. Si se inyecta el inhibidor tempranamente, por ejemplo, antes del enriquecimiento del plasma germinal en los septos, obtendríamos un embrión con agregados ectópicos fuera del septo; mientras que si inyectamos un embrión más tarde pero antes de la compactación hacia la región distal veríamos un embrión con falta de compactación dentro del septo. Sabemos que esto ocurre hasta cierto grado porque la localización del plasma germinal ocurre en un lapso relativamente corto (1 1/4 h) y no es posible inyectar a todos los embriones al mismo tiempo.

La aparición de agregados ectópicos fuera del septo de división es un fenotipo inédito que no se ha observado en otro tipo de mutantes o estudios farmacológicos. El fenotipo más cercano lo presenta una mutante en la kinesina-1 que provoca que los mRNAs no se agreguen ni se localicen al plano del septo de división (Campbell et al., 2015). RhoA podría controlar la actividad de la kinesina a través de la kinectina, una proteína activadora de la kinesina que interactúa con las Rho GTPasas y es un probable efector (Hotta et al., 1996; Vignal et al., 2001). Por el contrario, podría ser la kinesina la encargada de restringir a RhoA o activadores de RhoA hacia el septo de división (Vale et al., 2009). Sería muy interesante saber si los embriones mutantes en la kinesina-1 localizan a RhoA, ROCK o la myo-p al septo de división.

Otra explicación del fenotipo sería que RhoA no transportara al plasma germinal al septo pero que una vez allí, promoviera su anclaje al mismo. Esto sería más consistente con el hecho de que RhoA se localiza dentro del septo de división. En *Drosophila*, Rho participa en el anclaje del plasma germinal dependiente de la endocitosis y de Oskar. La proteína Oskar, que tiene un papel esencial en la localización del plasma germinal en el ovocito de la mosca, estimula la endocitosis en el polo posterior reclutando a la proteína endosomal Mon2. Ésta, a su vez, recluta a la formina Cappuccino y a Rho1 para promover la nucleación de filamentos de actina requeridos para el anclaje del plasma germinal (Tanaka et al., 2011). Aunque la proteína Oskar no existe en vertebrados, se ha establecido la presencia de vesículas endocíticas en el septo de división del pez cebra (Feng et al., 2002). Estudios futuros ayudarán a descubrir el papel de las forminas y otros efectores de RhoA tanto sobre la localización del plasma germinal como sobre los múltiples pasos de la citocinesis en el embrión de pez.

6.1.4. Papel de los efectores de Rho

La cinasa ROCK es uno de los efectores más estudiados de RhoA. Uno de sus principales sustratos de fosforilación es la cadena ligera de la miosina (Narumiya et al., 2009). La myo-p, a su vez, se agrega en gránulos junto con *vasa* y *nanos* como constituyente del plasma germinal (Nair et al., 2013; Eno y Pelegri, 2013).

Encontramos que la localización de ROCK semeja en buena medida los puntos de localización del plasma germinal dentro del septo. Similar a RhoA, su inhibición también provoca defectos en la agregación hacia la región distal.

Al inhibir a RhoA y ROCK, uno de los principales fenotipos que observamos es la deslocalización de un agregado bien compactado del plasma hacia el centro del blastodisco (Figura 6.1, C). Este fenotipo también se observa en mutantes del pez cebra como *cei* (Yabe et al., 2009) y *nebel* que tienen defectos en la organización de los microtúbulos (Pelegri et al., 1999). La deslocalización al centro también se observa al despolimerizar los microtúbulos con nocodazol durante la etapa de cuatro células (Pelegri et al., 1999). Aunado a esto, la inhibición tanto de RhoA como ROCK muestra defectos en la organización de los microtúbulos. Por todo lo anterior, suponemos que los microtúbulos median el papel de RhoA y ROCK en la localización del plasma germinal.

ROCK es más conocido por sus efectos activadores de la miosina pero existe bastante evidencia de que puede regular la dinámica de microtúbulos independientemente de ella. Aparte de la cadena ligera de la miosina, blancos de fosforilación de ROCK incluyen a las proteínas Tau, MAP2 (Amano et al., 2003), CRMP-2 (Arimura et al., 2005), y TPPP1/p25 (Schofield et al., 2012) reguladoras del ensamblaje de microtúbulos. La doblecortina también es sustrato de ROCK y promueve la estabilidad y la unión de los microtúbulos en haces (*bundling*) (Horesh et al., 1999; Amano et al., 2010).

Hay diferencias cualitativas entre los papeles de Rho y ROCK en la localización del plasma. La inhibición de ROCK parece afectar el anclaje a la región distal más que la compactación, es decir, se forman cuatro agregados pero con frecuencia se pierde su localización distal y se encuentran en posiciones ectópicas hacia el centro del blastodisco. Por su parte, la inhibición de RhoA comprende una gama más amplia de defectos que incluyen a los descritos para ROCK así como falta de tinción y tinción ectópica fuera del septo, sugiriendo que otros efectores de RhoA podrían estar participando en la localización del plasma germinal. ROCK parece ser necesario principalmente para el anclaje en la región distal. Esto es consistente con las diferentes distribuciones de las dos proteínas, ambas se encuentran en el septo pero mientras RhoA está distribuido prácticamente a todo lo largo, ROCK se encuentra enriquecido solamente en la región distal.

El hecho de que no observemos un efecto en la polimerización de la actina es un argumento en contra de la participación de las forminas, cuya función principal es justamente la formación de microfilamentos (Goode y Eck, 2007). Aún así, se ha reportado que también las forminas tienen una función reguladora de microtúbulos por lo cual no se puede descartar que tengan una participación en la localización del plasma germinal (Palazzo et al., 2001; Bartolini et al., 2008; Breitsprecher y Goode, 2013). El estudio de las forminas en este proceso podría facilitarse por el descubrimiento de un inhibidor farmacológico del dominio FH2 común a toda la familia (Rizvi et al., 2009) que ya ha demostrado su eficacia *in vivo* en ovocitos de ratón (Kim et al., 2015).

Existen otros efectores de Rho que se han estudiado menos que pudieran tener un papel en el proceso de localización de mRNAs (Thumkeo et al., 2013). Un candidato es la Citron cinasa, otro efector de Rho normalmente asociado al anillo citocinético y que también es capaz de fosforilar a la cadena ligera de la miosina (Yamashiro et al., 2003).

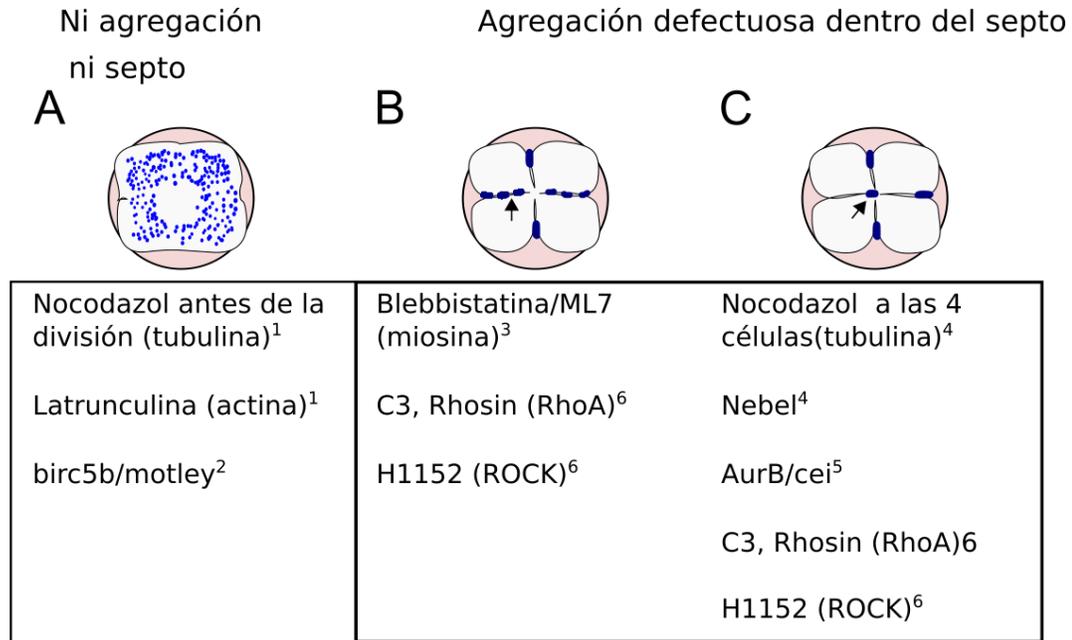


Figura 6.1. Tipos de defectos en la localización del plasma germinal del polo animal. Representación gráfica de los dos modos en que el plasma germinal (azul) pierde su localización, junto con las mutantes o los inhibidores que provocan cada uno. **Izquierda:** los defectos más graves ocurren con tratamientos en los que la formación del septo se impide por completo y el plasma germinal permanece desagregado en múltiples partículas esparcidas por el blastodisco. **Derecha** El plasma germinal se recluta al septo pero permanece elongado, la compactación no ocurre eficientemente y los agregados se localizan erróneamente en la región central del embrión. 1 Theusch et al. (2006). 2 Nair et al. (2013). 3 Urven et al. (2006). 4 Pelegri et al. (1999). 5 Yabe et al. (2009). 6 Miranda-Rodríguez et al. (2017) [Este trabajo].

6.1.5. Posible interacción con la señalización de calcio

La ingresión de cada uno de los primeros dos septos de división en el embrión de pez cebra está precedida por una ola de señalización de Ca^{2+} procedente del retículo endoplásmico y dependiente de la señalización por inositol trifosfato (IP3) (Webb et al., 1997; Lee et al., 2004a, 2006). Tanto el retículo endoplásmico como el receptor IP3R se localizan en los septos de división a la par que las olas de señalización de Ca^{2+} (Lee et al., 2004a). La señalización de calcio se requiere para el ensamblaje de la banda de actina del anillo contráctil (Li et al., 2008).

El Ca^{2+} también podría ser necesario en la modulación de la contractilidad de la miosina; pues la calmodulina se localiza en la región distal de los septos (Webb et al., 2014). Nosotros vimos que ROCK se localiza en la región distal de los septos y nuestros resultados muestran que participa en la fosforilación de la miosina. Sin embargo, la inhibición de ROCK no resulta en la completa desaparición de la myo-p, lo que sugiere que la vía de la calmodulina y el Ca^{2+} , así como otras kinasas aún no contempladas, podrían suplir a ROCK en la regulación de la myo-p.

La señalización por Ca^{2+} en los surcos de división también promueve la activación de la kinesina kif-23, que promueve la fusión de vesículas exocíticas durante la remodelación

de la membrana, probablemente a través de los microtúbulos del FMA (Li 2006, Li 2008).

La señalización por Ca^{2+} durante la citocinesis se ha estudiado extensivamente, sobre todo en los eventos de la maduración del septo (Webb et al., 1997; Lee et al., 2004b; Li et al., 2006, 2008; Webb et al., 2014). Nosotros encontramos que la vía de RhoA/ROCK afecta eventos relacionados con la maduración del septo como la actividad de la miosina y la remodelación de microtúbulos. En el futuro hará falta explorar si existe una relación funcional entre RhoA y el Ca^{2+} .

Una posibilidad interesante es que la señalización de RhoA en el septo esté río arriba de la liberación de Ca^{2+} . Se sabe que una vez depletado el Ca^{2+} endógeno, se requiere la función del canal TRPC1 para renovar las reservas de Ca^{2+} y proseguir con la maduración del septo del embrión (Chan et al., 2015). En células humanas, RhoA puede activar la interacción de IP3R con TRPC1 induciendo la entrada de Ca^{2+} luego de la depleción del retículo endoplásmico (Mehta et al., 2003). Se ha mostrado que el IP3R (Lee et al., 2004a), el canal TRPC1 (Chan et al., 2015) y RhoA (este trabajo) se localizan todos en el septo de división del embrión de pez cebra. Por ello, es atractiva la hipótesis de que RhoA se requiera para sostener la prolongada señalización de Ca^{2+} necesaria para la maduración del septo. Asimismo, sería interesante saber cómo afecta la inhibición de las olas de Ca^{2+} a la localización del plasma germinal.

6.2. Migración del plasma germinal vegetal

Utilizando a Rhosin, un inhibidor reversible de RhoA, confirmamos que RhoA-GTP es necesaria en el septo de división para la localización de *vasa* y *nanos*. No obstante, ni Rhosin ni el inhibidor de ROCK afectan significativamente a *dazl*. Los dos grupos de mRNAs migran por distintas vías espaciales. *nanos* y *vasa* comienzan el desarrollo en el polo animal y se localizan en el septo de división celular en un proceso secuencial. Por su parte, el mRNA de *dazl* migra tardíamente desde el polo vegetal y se concentra directamente en la región distal de los septos (Theusch et al., 2006). El efecto de los inhibidores sobre *nanos* y *vasa* pero no sobre *dazl* indica que también las vías moleculares que posibilitan la migración difieren entre el plasma vegetal animal y el vegetal.

La inhibición con C3 sí afecta la localización de todos los mRNAs del plasma germinal. Esto se contrapone con los resultados de los dos inhibidores farmacológicos. Sabemos que la exoenzima C3 inhibe a RhoA de manera cualitativamente distinta a Rhosin, pues mientras C3 modifica covalentemente a Rho, inactivándola permanentemente (Vogelsgesang et al., 2007), Rhosin se une de manera reversible y sólo evita su activación por GEFs, pero su mecanismo de acción sugiere que no inactiva a RhoA si ya está cargada con GTP (Shang et al., 2012). Esto podría traducirse en una diferencia cuantitativa de inhibición. El recambio de RhoA activa por inactiva y viceversa es muy rápido dentro del anillo citocinético y esta dinámica ayuda a mantener bien definido el dominio de actividad (Burkel et al., 2012). Una hipótesis a probar es que la unión de RhoA con GTP tenga una vida media mayor en el vitelo, donde se localiza *dazl*, que en el blastodisco, donde se localizan *vasa* y *nanos*. Bajo estas condiciones, Rhosin sería eficiente inhibiendo a RhoA en el polo animal pero

no en el polo vegetal, mientras que C3 sería igual de eficiente en todo el embrión. Para la medición de la actividad de RhoA en el vitelo y el blastodisco podrían expresarse sensores de la actividad de RhoA basados en FRET (Aoki y Matsuda, 2009) que ya han sido utilizados en embriones de pez *in vivo*, aunque en otras etapas (Kardash et al., 2010).

No existe evidencia de que C3 ADP-ribosile a otras GTPasas aparte de RhoA, B y C. Sin embargo, se sabe que C3 puede unirse a la GTPasa RalA y que esta interacción interfiere con la función de C3 así como con la de RalA (Wilde et al., 2002). Esta interacción podría explicar la diferencia entre los fenotipos provocados por C3 y los provocados por Rhosin. No se conoce el patrón de expresión de RalA en estas etapas, pero un posible enriquecimiento de esta proteína en el vitelo bloquearía la capacidad de C3 de inhibir a RhoA.

Por otro lado, sería interesante estudiar la función de RalA en la migración de las células germinales en el pez cebra. Se sabe que RalA media la migración celular mediada por la citosina SDF-1 (de Gorter et al., 2008), misma que está implicada en la llegada de las CGP a las gónadas en el pez cebra (Doitsidou et al., 2002). Sin embargo, los embriones inyectados con C3 mueren antes de la migración de las CGP por lo que habría que inhibir de una manera distinta a RalA.

Se sabe muy poco hasta la fecha sobre los mecanismos de translocación del plasma germinal vegetal. La migración del mRNA de *dazl* hacia el polo animal depende de la integridad del citoesqueleto de actina pero no de los microtúbulos (Welch y Pelegri, 2014). Se desconoce qué tipos de filamentos de actina o qué reguladores se encuentran río arriba de su migración. Por otro lado, estudios de delección han determinado que el extremo 3' no traducido es el responsable de la translocación de *dazl* (Kosaka et al., 2007), así que estudios futuros podrían basarse en la identificación de proteínas de unión a estos motivos.

6.3. La deslocalización del plasma germinal altera la determinación de la línea germinal

La localización y agregación del plasma germinal en la región distal de los septos de división es necesaria para la correcta segregación de estos determinantes. Se sabe que los agregados aislados que no se localizan en la región distal son progresivamente degradados conforme avanza el desarrollo de manera que sólo los mRNAs correctamente localizados contribuyen a la determinación de la línea germinal (Wolke et al., 2002). Los embriones tratados con inhibidores farmacológicos de Rho y ROCK sobreviven las etapas más tempranas del desarrollo. Este hecho nos permitió interrogar qué sucede con el plasma germinal después de su deslocalización.

En la etapa de 24 horas del desarrollo del pez, ya se ha establecido en buena medida el plan corporal del embrión. Las Células Germinales Primordiales (CGP), proliferan y migran hacia las gónadas que en este momento están en proceso de formación (Raz, 2003). Notamos una disminución significativa en las CGP en las gónadas de estos embriones cuando fueron tratados previamente con los inhibidores. Puesto que estos embriones se desarrollan normalmente, esto sugiere que la deslocalización del plasma germinal en la etapa de 4 células sí tiene repercusiones en el número de CGP determinadas.

En ninguno de los trabajos anteriores sobre localización del plasma germinal se siguió a los embriones para saber qué ocurría con la determinación de las CGP, a excepción de un reporte reciente de mutantes en la kinesina-1 (Campbell et al., 2015). En estos peces, las partículas del plasma germinal se distribuyen homogéneamente y no se agregan al septo. Los embriones mutantes, al no agregar el plasma germinal prácticamente no poseen ninguna célula germinal a las 24 horas. A pesar de dejar intacto el septo de división, la ausencia de Kinesina-1 vuelve ineficiente el transporte de los determinantes dorsales, resultando en diferentes grados de dorsalización (Campbell et al., 2015). En este trabajo, encontramos un efecto mucho más modesto sobre las CGP, pero no encontramos ningún efecto morfológico al menos con los inhibidores químicos.

Nuestro trabajo sobre RhoA y ROCK se complementa de manera interesante con la mutante de la Kinesina-1. En ambos estudios se afecta la localización del plasma germinal animal sin influir en la citocinesis, mostrando que estos dos procesos son independientes entre sí. Las mutantes de la Kinesina-1 demuestran que la localización del plasma germinal al septo de división es completamente necesaria para la formación de CGP, pero la Kinesina-1 afecta la localización de otros mRNAs diferentes al plasma germinal y afecta la formación de los ejes embrionarios. RhoA y ROCK, por su lado, son necesarios para lograr una compactación eficiente una vez dentro del septo y la formación de un número normal de CGP.

Una explicación complementaria de la reducción en el número de CGP es que la inhibición de la vía Rho/ROCK afecta la migración, supervivencia o proliferación de las CGP en el periodo que va desde su determinación hasta la agregación en las gónadas. Por ello, contamos las CGP en la etapa de 128 a 256 células. En esta etapa, los agregados del plasma germinal ya se han incorporado a las CGP, pero es una etapa previa a la proliferación y migración de las mismas. Cualquier cambio en su número puede atribuirse a efectos sobre la internalización del plasma germinal. Nuestros resultados muestran una disminución de las CGP desde este momento lo cual sugiere que la disminución subsecuente en la etapa de 24 horas se debe en buena proporción a una menor internalización de agregados del plasma germinal que es provocada por los errores de localización durante la etapa de cuatro células.

Cuando inhibimos a Rho y ROCK, en muchos casos los agregados del plasma germinal no desaparecen en la etapa de 4 células, sólo se dispersan dentro o fuera del septo en agregados más pequeños o se compactan en agregados de tamaño normal localizados hacia la región central. ¿Qué ocasiona que estos agregados se pierdan en los embriones de 128 células? Se ha reportado que la myo-p se agrega en los septos de la tercera división celular además de los primeros dos septos. Sin embargo, los agregados de la tercera división son de menor tamaño debido a que hay un menor número de partículas luego de la agregación del primer y segundo septo (Eno y Pelegri, 2013). Se ha propuesto que hay un umbral de tamaño por debajo del cual los agregados de plasma germinal se desintegran antes de poderse internalizar a los blastómeros en la etapa de 32 células. De este modo, podría explicarse la degradación o dispersión de los mRNAs que no se compactan dentro del septo de división celular.

Esto no afectaría a los agregados de tamaño normal que se deslocalizan hacia la región

central del septo. Estos agregados pueden contener cantidades suficientes de mRNAs del plasma germinal animal para no ser degradados. No obstante, nuestros resultados sugieren que su localización ectópica no permite que se asocien con el plasma germinal vegetal, cuya localización no se ve afectada por la inhibición con Rhosin o H-1152.

En el embrión de pez cebra, el principal encargado de la degradación de transcritos maternos es el microRNA mir-430 (Giraldez et al., 2006). mir-430 puede desadenilar al mRNA de *nanos* tan pronto como 2 horas después de la fertilización (Mishima et al., 2006) (la etapa de 256 células se da a las 2.5 hpf). Los mRNAs del plasma germinal son protegidos de la degradación mediada por mir-430 en la línea germinal justamente gracias al producto del mRNA de *dazl* que se pega a sus 3' UTR (Takeda et al., 2009). Por este mecanismo, la separación de *dazl* del plasma germinal animal provocada por la deslocalización de este último podría llevar a la degradación de *nanos* a pesar de agregarse en partículas de tamaño normal.

7

Conclusiones

- RhoA se localiza en los dos primeros septos de división celular del embrión de pez cebra en las etapas de 2, 4 y 8 células. No así Rac1 o Cdc42.
- ROCK, la cinasa efectora de RhoA, se localiza en la región distal de los primeros dos septos de división, en un patrón muy parecido al del plasma germinal y la miosina fosforilada.
- La inhibición de RhoA por dos distintos tratamientos resulta en defectos en la localización de los mRNAs de *vasa* y *nanos*.
- La inhibición de ROCK causa predominantemente sólo uno de los defectos provocados por la inhibición de RhoA: la deslocalización del plasma germinal compactado hacia el centro del blastodisco.
- La inhibición de RhoA provoca su deslocalización en la membrana del septo. Esto se correlaciona con los defectos de localización del plasma germinal.
- La inhibición de RhoA o de ROCK interfiere con la organización del arreglo de microtúbulos del septo, pero no con la distribución de los filamentos de actina.
- A pesar de los defectos en posicionamiento de los mRNAs, los embriones tratados con inhibidores reversibles prosiguen su desarrollo hasta las 24 horas. Sin embargo, a consecuencia de la deslocalización del plasma germinal, un número significativamente menor de células germinales se concentran en las gónadas de estos embriones.

8

Perspectivas

8.1. Localización de ROCK y la miosina fosforilada en los gránulos germinales

Uno de los resultados más interesantes de este trabajo es la localización de ROCK y la miosina fosforilada (myo-p) en la región distal de los septos de división. No obstante, ninguna de las dos proteínas tiene dominios de interacción con RNAs.

En células en cultivo, ROCK I y RhoA forman parte funcional de gránulos de estrés (Tsai y Wei, 2010). En pez cebra, en las etapas de 4 y 16 células, comparables con este trabajo, existen gránulos de estrés que contienen a la helicasa P54. Sin embargo, estos gránulos son distintos a los gránulos germinales marcados con myo-p (Zampedri et al., 2016). Por ello, una interacción de ROCK y la myo-p con los gránulos del plasma germinal, es además de inesperada, probablemente específica y no se debe a su interacción con un componente genérico de gránulos de mRNAs.

Una extensión de estos resultados podría consistir en la identificación de las proteínas o RNAs del plasma germinal con los que interactúan tanto ROCK como la myo-p y que promueven su localización a la región distal de los septos de división. Se ha reportado que la myo-p interactúa con la proteína Nanos (Xu et al., 2010). Esto podría contribuir a desentrañar los mecanismos de control de la morfología de los gránulos de mRNA así como su coordinación con el citoesqueleto.

8.2. Fenotipos de deslocalización del plasma germinal

La inhibición de RhoA resulta en distintos defectos en la localización de *vasa* y *nanos*. Por ejemplo, en ocasiones, el plasma germinal aparece compactado en el centro del blastodisco en lugar de en la región distal. En otro fenotipo observado, el plasma germinal no se compacta, fragmentándose a lo largo del septo de división. Sería atractivo utilizar técnicas que permitan seguir la migración del plasma germinal en tiempo real para estudiar más a detalle estos fenotipos. Esto podría realizarse con la inyección de sondas de mRNA marcadas fluorescentemente o la utilización de peces transgénicos que expresan la

proteína Bucky-ball unida a GFP (Riemer et al., 2015). La observación *in vivo* del plasma germinal luego de la inhibición de RhoA o ROCK permitirá también saber si los gránulos deslocalizados del plasma germinal son internalizados a células, si se degradan y en qué etapa lo hacen.

El citoesqueleto también sería muy interesante de observar por microscopía fluorescente *in vivo*. Una posibilidad para ello es la utilización de las sondas SiR-actin y SiR-tubulin, fluoróforos que emiten en el rojo lejano cuando se unen a los microfilamentos o a los microtúbulos (Lukinavičius et al., 2014). La utilización SiR-actin y SiR-tubulin no sólo ayudaría a entender el papel del citoesqueleto en la localización del plasma germinal sino que permitirá resolver preguntas sobre la citocinesis y desarrollo temprano del pez cebra que hasta ahora no se han estudiado dinámicamente. Asimismo, la observación dinámica del citoesqueleto y el plasma germinal simultáneamente ayudaría a saber si los distintos fenotipos de deslocalización de mRNAs se correlacionan con distintas maneras de desorganización del citoesqueleto de tubulina.

8.3. Papel de otros efectores de RhoA

ROCK también participa en la localización del plasma germinal. Sin embargo, el fenotipo observado al inhibir a ROCK es sobre todo la deslocalización del plasma germinal compactado hacia el centro del blastodisco. El fenotipo provocado por la inhibición de ROCK es un subconjunto de los provocados por Rho, sugiriendo que ROCK participa en menos vías o que tiene un papel más acotado. La diferencia no parece estar en la potencia de inhibidores pues la proporción de embriones afectados es similar.

¿A qué se debe esta diferencia? RhoA activa otros efectores además de ROCK. De éstos, los principales son las forminas y la Citron cinasa. La actividad de las forminas y la Citron cinasa, dependiente de RhoA pero no de ROCK, podría explicar la mayor cantidad de fenotipos observados con RhoA.

Hay por lo menos 10 genes en el genoma del pez cebra que codifican para forminas que pueden interactuar con RhoA. Estos genes son homólogos de Diaphanous, FMNL y DAAM, de mamífero. Su expresión ya se está estudiando en el laboratorio y su contribución funcional a diversos procesos del desarrollo se puede evaluar con mutantes generadas por la técnica CRISPR-Cas9 o con el uso de inhibidores farmacológicos. El estudio de las forminas es particularmente interesante porque hay evidencia de que pueden orquestrar la interacción entre microtúbulos y filamentos de actina (Bartolini y Gundersen, 2010).

De la Citron cinasa se conoce poco sobre su función, pero ha sido implicada en el control de la citocinesis tardía y la fosforilación de la treonina 18 y la serina 19 (Yamashiro et al., 2003; Naim et al., 2004). A falta de un inhibidor farmacológico específico de la Citron cinasa, no estudiamos su función en el presente trabajo, pero técnicas de mutagénesis dirigida como Crispr-Cas9 ayudarán en el futuro a discernir su función en la localización del plasma germinal o en otros procesos del desarrollo.

8.4. Mecanismo de localización de *dazl*

C3 afecta la localización de *dazl* pero no así los inhibidores farmacológicos. El hecho de que Rhosin y H-1152 afecten la localización de *nanos* y *vasa* a la región distal, pero permitan que *dazl* se localice en la misma región sugiere que el anclaje de *dazl* a la región distal es independiente de los otros mRNAs. Habría que hacer hibridaciones *in situ* simultáneas contra *dazl* y ya sea *vasa* o *nanos* en embriones tratados con inhibidores para constatar si aunque el plasma germinal animal se encuentre deslocalizado, *dazl* es capaz de anclarse.

Otro posible experimento sería ver la localización de *dazl* en embriones mutantes de Kinesina-1 en los cuales *vasa* y *nanos* están ausentes en el 100% de los septos (Campbell et al., 2015). Si *dazl* se localiza en el septo de división celular a pesar de la completa ausencia de *vasa* o *nanos* en estas mutantes, sería evidencia de que su mecanismo de localización es independiente de estos últimos mRNAs.

Apéndice A

Apéndice

A.1. Análisis de secuencias filogenético

La familia de las RhoGTPasas contiene 20 proteínas miembro en mamíferos, entre las que se cuentan RhoA, RhoB, RhoC, RhoH, pero también Cdc42 y Rac1 (Heasman y Ridley, 2008). En 2005, se anotaron en el genoma del pez cebra 32 genes de RhoGTPasas de acuerdo a la comparación con las proteínas de mamíferos (Salas-Vidal et al., 2005).

Cinco genes en el genoma del pez cebra fueron anotados como homólogos de RHOA de humano en virtud de la estructura exón-intrón y la similitud de secuencia. Estos genes fueron nombrados *rhoaa*, *rhoab*, *rhoac*, *rhoad* y *rhoae* (Salas-Vidal et al., 2005). *rhoaa*, *rhoab* y *rhoad* se encuentran en el cromosoma 8, *rhoac* en el cromosoma 23 y *rhoae* en el cromosoma 6. Sin embargo, posteriormente *rhoae* y *rhoae* se reclasificaron como homólogos de *rhoc* de humano y se renombraron en Ensemble como *rhoa* y *rhocb*, respectivamente.

Las proteínas predichas para estos cinco genes *rho* son altamente similares entre sí: cada una de las cinco proteínas consiste de 193 aminoácidos de los cuales 174 se comparten entre las cinco. La similitud en comparaciones pareadas es aún mayor: las *rho* de pez más distintas entre sí, RhoAa y RhoCa sólo difieren en 15 aminoácidos (92.22% de identidad). El par de *rho* más idéntico lo forman RhoAa y RhoAc con sólo 6 aminoácidos diferentes entre sí (96.89% de identidad). El número de aminoácidos idénticos entre las cinco RhoA se muestra en la tabla A.1.

Proteína	Pez cebra					Humano	
	RhoAa	RhoAb	RhoAc	RhoCa	RhoCb	RhoA	RhoC
RhoAa		181	187	178	181	180	175
RhoAb	181		182	179	180	185	174
RhoAc	187	182		182	186	186	177
RhoCa	178	179	182		186	178	179
RhoCb	181	180	186	186		182	180

Tabla A.1. Número de aminoácidos idénticos entre pares Rho's predichas por el genoma de pez cebra, además de RhoA y RhoC de humano. En cada columna, la celda verde indica la proteína con la mayor identidad de aminoácidos.

En mamíferos, RhoA comparte con las proteínas RhoB y RhoC un 84% y 92% de identidad de aminoácidos, respectivamente Heasman y Ridley (2008), así como activadores y represores tanto endógenos como exógenos que no comparten con otras RhoGTPasas (por ejemplo, la toxina C3 de *Clostridium botulinum* que inhibe a RhoA, -B y -C pero no a Rac o Cdc42).

Un número reducido de aminoácidos diferentes entre las RhoGTPasas se encargan de la especificidad por efectores o reguladores: sólo cuatro aminoácidos de RhoA que no comparte con Rac1 o Cdc42 son suficientes para la interacción específica con el activador PDZ-RhoGEF (Wheeler y Ridley, 2004). Uno de estos aminoácidos es la valina 43 de RhoA, que en RhoC está sustituida por una isoleucina (Oleksy et al., 2006).

Esta diferencia en la posición 43 es la única que se encuentra en los primeros 122 aminoácidos y está muy conservada. Hicimos una comparación de secuencia entre todas las proteínas anotadas como RhoA y RhoC en especies de pez en la base de datos de Ensembl. Todos los homólogos de RhoA en peces, incluyendo al pez cebra, tienen una valina en la posición 43, mientras que todos los homólogos de RhoC presentan la isoleucina característica en la misma posición. (Figura A.1, A). Este cambio es funcionalmente relevante: la valina 43 es esencial para la unión de RhoA con el activador XPLN y otros GEFs (Arthur et al., 2002; Sloan et al., 2012). En cambio, la isoleucina 43 en RhoC disminuye la afinidad de la misma con sus activadores.

Los aminoácidos 118 a 131 de la secuencia de RHOA de humano constituyen el epítipo del anticuerpo que utilizamos para este estudio. De los homólogos de RHOA en pez, RhoAc contiene idéntica la secuencia del epítipo. RhoAa y RhoAb sólo difieren de la secuencia del epítipo en el último aminoácido. Por esta razón, nosotros suponemos que el anticuerpo anti-RhoA reconoce a sus 3 homólogos en el pez cebra. Sin embargo, RhoCb también contiene una sola diferencia en el último aminoácido del epítipo, por lo cual es probable que el anticuerpo también reconozca este homólogo de RHOA en el pez. Por el contrario, pensamos que el anticuerpo no reconoce a RhoCa pues su secuencia tiene 4 diferencias con el epítipo, dos de ellas en posiciones centrales (Figura A.1, B).

La localización subcelular de las Rho depende en buena medida de los aminoácidos de la región hipervariable del carboxilo terminal (Wang et al., 2003). Los últimos trece aminoácidos hacia el C terminal contienen 10 del total de 19 sitios en que las RhoA de pez difieren entre sí. RhoCa y RhoCb contienen una secuencia de 6 aminoácidos básicos que constituyen una señal canónica de localización nuclear. Mientras que en RhoAa-c esta señal está interrumpida por una glicina (Figura A.1, C). La localización subcelular distinta de cada variante puede dictar qué proteínas efectoras o reguladoras interactúan con ella (Bravo-Cordero et al., 2013).

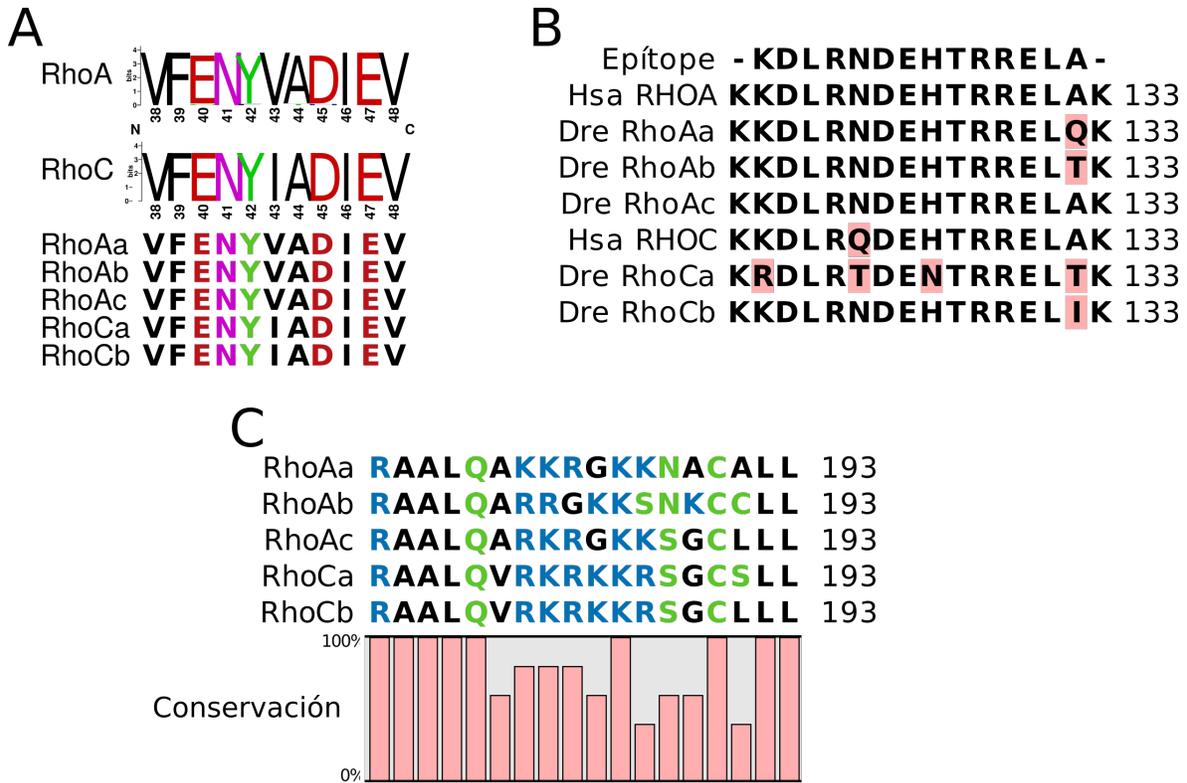


Figura A.1. Comparación de secuencias de las proteínas Rho de pez cebra. A: Comparación de las Rho de pez cebra con las proteínas RhoA, que en todas las especies contienen una valina en la posición 43, y con la subfamilia RhoC, cuyos miembros contienen una isoleucina en su lugar. “RhoA” y “RhoC” son una representación gráfica de las frecuencias de aminoácidos de las proteínas de peces y humano en esas posiciones. B: Comparación del epítotope del anticuerpo contra RhoA con las proteínas de humano y de pez cebra. Los aminoácidos coloreados difieren de la secuencia reconocida por el anticuerpo. C: Comparación del C terminal de las 5 Rho de pez. RhoCa y RhoCb tienen una señal de localización nuclear putativa en la forma de 6 argininas y lisinas seguidas. Esta señal putativa de aminoácidos básicos se interrumpe por una glicina en RhoAa, RhoAb y RhoAc

Generamos árboles filogenéticos por el método de *neighbour-joining* con *bootstrap*. El árbol muestra las relaciones filogenéticas entre las secuencias de proteína de RHOA, RHOB y RHOC de humano y las homólogas de éstas en todos los genomas de peces que han sido anotados en Ensembl, incluyendo al pez cebra. Obtuvimos un árbol que puede dividirse en 3 subgrupos correspondientes a RHOA, RHOB y RHOC de humano (Figura A.2). Como el árbol muestra, RhoAa, RhoAb y RhoAc de pez cebra (subrayadas en el área roja de la figura A.2, A) se agrupan con todas las proteínas anotadas como RhoA de todos los demás organismos. Mientras que RhoCa y RhoCb de pez cebra tienen mayor similitud con las proteínas anotadas como RhoC de humano y de otros organismos (área verde en la figura A.2). No parece existir un homólogo de RhoB en pez cebra, a pesar de que hay peces que sí poseen este gen incluyendo a medaka (*Oryzias latipes*). Una observación interesante es la sobrerrepresentación de RhoA en las duplicaciones en peces, existiendo más parálogos de RhoA que de RhoB y RhoC juntos. Por su parte, es notorio que RhoB no parece estar duplicado en el genoma de ningún pez y más bien tiende a perderse.

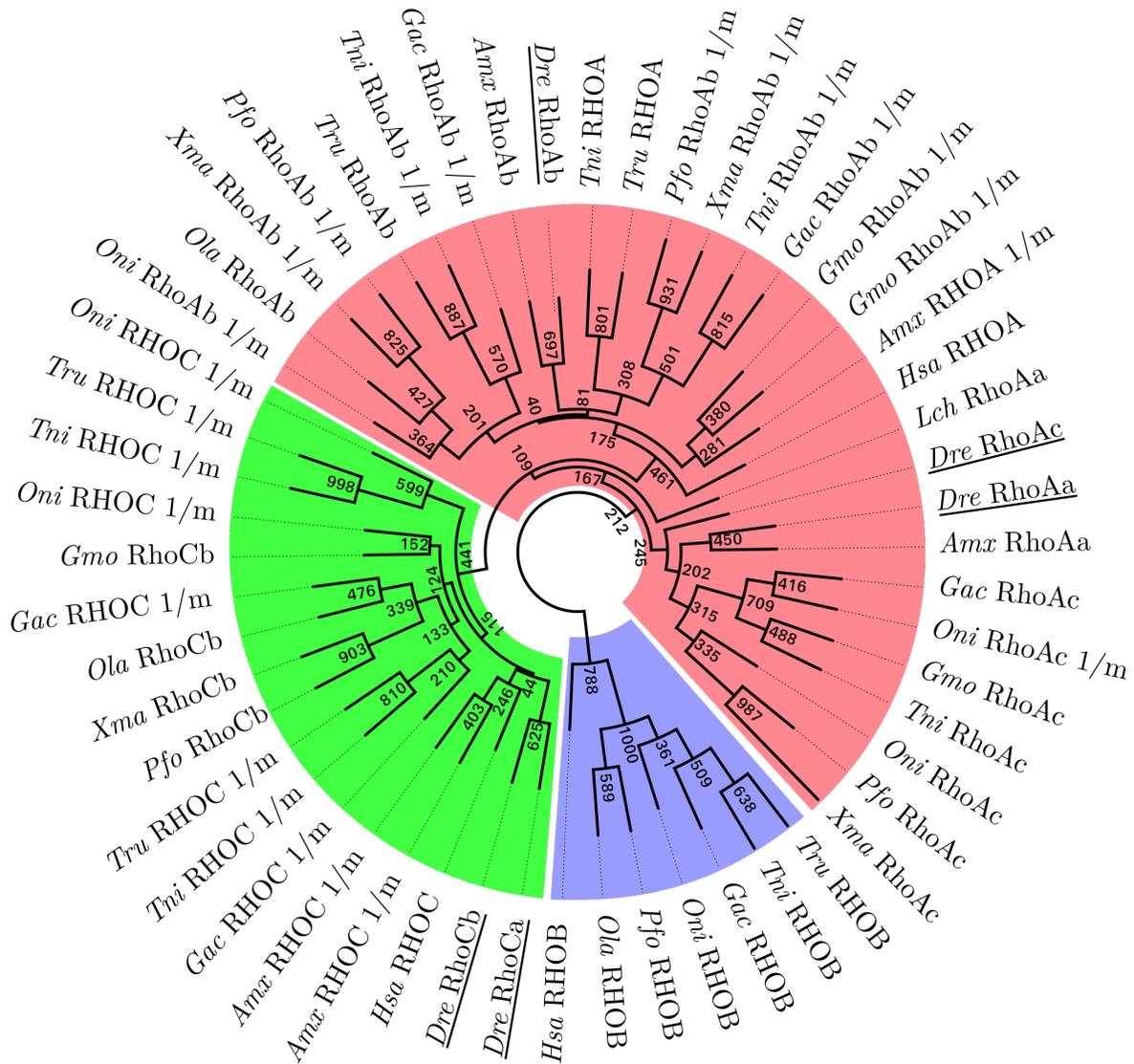


Figura A.2. Árbol filogenético de las secuencias de aminoácidos de RHOA, -B y -C de humano y sus homólogos en peces. El árbol, generado por el algoritmo de *neighbour-joining* es el consenso de 1000 réplicas de *bootstrap*. Rojo: Subfamilia RhoA; Azul: Subfamilia RhoB; Verde: Subfamilia RhoC. Las proteínas de pez cebra se encuentran subrayadas. Las abreviaturas de las especies son las siguientes: Hsa: *Homo sapiens*, Tru: *Takifugu rubripes*, Gac: *Gasterosteus aculeatus*, Gmo: *Gadus morhua*, Ol: *Oryzias latipes*, Dre: *Danio rerio*, Pfo: *Poecilia formosa*, Amx: *Astyanax mexicanus*, Lch: *Latimeria chalumnae*, Xma: *Xiphophorus maculatus*, Tni: *Tetraodon nigroviridis*, Oni: *Oreochromis niloticus*.

A.2. Expresión de mRNAs de los 5 genes *rho* en pez cebra durante la ovogénesis

Habiendo concluido que existen tres homólogos de RhoA y dos de RhoC en pez. El siguiente paso para disectar su función fue determinar su presencia y localización en las etapas relevantes. Puesto que no contamos con anticuerpos que pudieran distinguir entre

cada una de las cinco *rho* por su alta similitud de aminoácidos, se realizaron ensayos de RT-PCR. Utilizamos oligos que identifican regiones variables de los extremos 3' UTR para poder identificar a cada gen por separado. Pudimos detectar la presencia de las cinco Rho en extractos de mRNA de ovario (Figura A.3, A). Utilizando oligos alternativos, obtuvimos los mismos resultados excepto por *rhoab*, que no fuimos capaces de amplificar. Esto es evidencia de que al menos 4 de las 5 Rho se expresan en los ovocitos.

Cabe mencionar, sin embargo, que utilizamos como templado RNA total de ovario, por lo cual una señal positiva no necesariamente indica la expresión del gen en los ovocitos pues el RNA podría provenir de las células somáticas que integran al ovario: células de la teca, de la granulosa, tejido adiposo y epitelial.

Esto nos motivó a hacer hibridaciones *in situ* en el ovario de pez, utilizando sondas que reconocen a cada uno de los cinco mensajeros de *rho*. Los resultados se muestran en la figura A.3, B. Concluimos que cuatro de las cinco *rho* se expresan en los ovocitos y podrían contribuir con su proteína de manera materna durante las primeras etapas de la embriogénesis. La excepción, *rhoab*, posiblemente está expresada sólo en las células somáticas del ovario y podemos descartarla en un papel en la localización del plasma germinal.

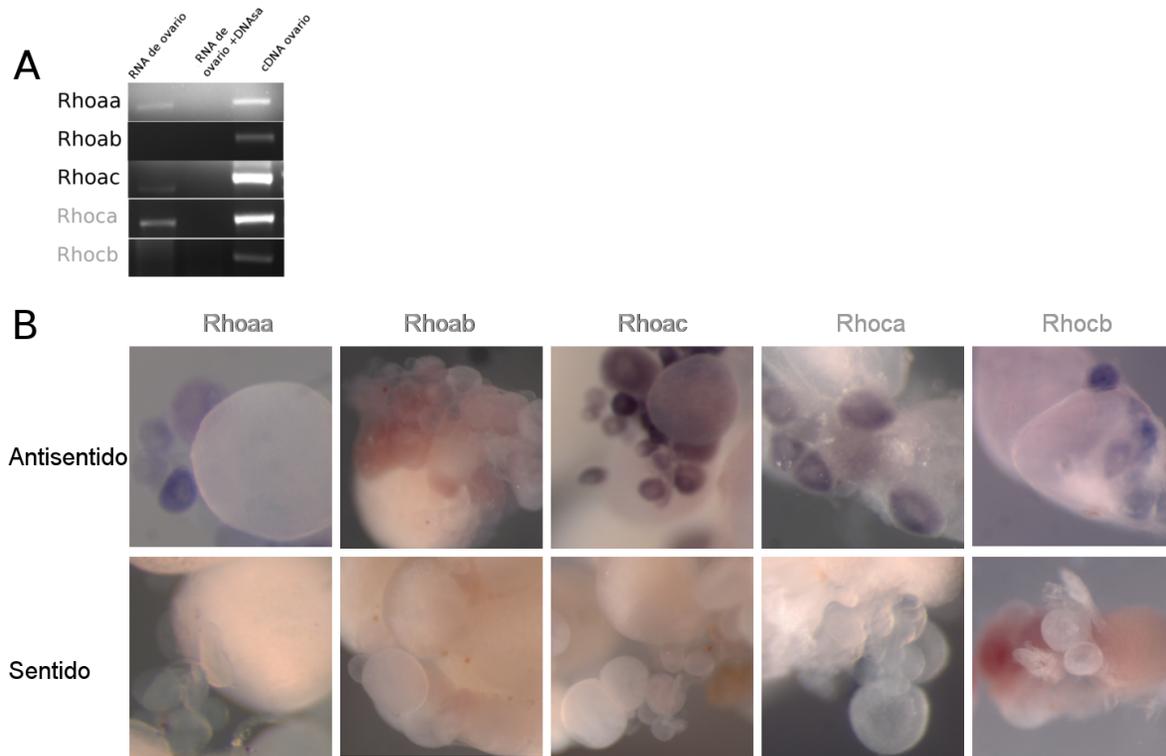


Figura A.3. RT-PCR e hibridaciones *in situ* de los cinco parálogos *rho* en pez cebra. Barra: 100 μ m.

Bibliografía

- Aelst, L. V. y D'Souza-Schorey, C. (1997). Rho GTPases and signaling networks. *Genes & Development* 11, 2295–2322.
- Aktories, K. y Frevert, J. (1987). ADP-ribosylation of a 21-24 kDa eukaryotic protein(s) by C3, a novel botulinum ADP-ribosyltransferase, is regulated by guanine nucleotide. *The Biochemical journal* 247, 363–368.
- Amano, M., Ito, M., Kimura, K., Fukata, Y., Chihara, K., Nakano, T., Matsuura, Y. y Kaibuchi, K. (1996). Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). *J. Biol. Chem.* 271, 20246–20249.
- Amano, M., Kaneko, T., Maeda, A., Nakayama, M., Ito, M., Yamauchi, T., Goto, H., Fukata, Y., Oshiro, N., Shinohara, A., Iwamatsu, A. y Kaibuchi, K. (2003). Identification of Tau and MAP2 as novel substrates of Rho-kinase and myosin phosphatase. *Journal of neurochemistry* 87, 780–790.
- Amano, M., Tsumura, Y., Taki, K., Harada, H., Mori, K., Nishioka, T., Kato, K., Suzuki, T., Nishioka, Y., Iwamatsu, A. y Kaibuchi, K. (2010). A proteomic approach for comprehensively screening substrates of protein kinases such as Rho-kinase. *PloS one* 5, e8704.
- Aoki, K. y Matsuda, M. (2009). Visualization of small GTPase activity with fluorescence resonance energy transfer-based biosensors. *Nature protocols* 4, 1623–1631.
- Aravin, A., Gaidatzis, D., Pfeffer, S., Lagos-Quintana, M., Landgraf, P., Iovino, N., Morris, P., Brownstein, M. J., Kuramochi-Miyagawa, S., Nakano, T., Chien, M., Russo, J. J., Ju, J., Sheridan, R., Sander, C., Zavolan, M. y Tuschl, T. (2006). A novel class of small RNAs bind to MILI protein in mouse testes. *Nature* 442, 203–207.
- Arimura, N., MÃnager, C., Kawano, Y., Yoshimura, T., Kawabata, S., Hattori, A., Fukata, Y., Amano, M., Goshima, Y., Inagaki, M., Morone, N., Usukura, J. y Kaibuchi, K. (2005). Phosphorylation by Rho kinase regulates CRMP-2 activity in growth cones. *Molecular and cellular biology* 25, 9973–9984.
- Arthur, W. T., Ellerbroek, S. M., Der, C. J., Burridge, K. y Wennerberg, K. (2002). XPLN, a guanine nucleotide exchange factor for RhoA and RhoB, but not RhoC. *J. Biol. Chem.* 277, 42964–42972.

- Bartolini, F y Gundersen, G. G. (2010). Formins and microtubules. *Biochim. Biophys. Acta* *1803*, 164–173.
- Bartolini, F, Moseley, J. B., Schmoranzler, J., Cassimeris, L., Goode, B. L. y Gundersen, G. G. (2008). The formin mDia2 stabilizes microtubules independently of its actin nucleation activity. *The Journal of cell biology* *181*, 523–536.
- Benink, H. A. y Bement, W. M. (2005). Concentric zones of active RhoA and Cdc42 around single cell wounds. *J. Cell Biol.* *168*, 429–439.
- Bishop, A. L. y Alan, H. (2000). Rho GTPases and their effector proteins. *Biochemical Journal* *348*, 241–255.
- Blaser, H., Eisenbeiss, S., Neumann, M., Reichman-Fried, M., Thisse, B., Thisse, C. y Raz, E. (2005). Transition from non-motile behaviour to directed migration during early PGC development in zebrafish. *J. Cell. Sci.* *118*, 4027–4038.
- Bontems, F., Stein, A., Marlow, E., Lyautey, J., Gupta, T., Mullins, M. C. y Dosch, R. (2009). Bucky ball organizes germ plasm assembly in zebrafish. *Curr. Biol.* *19*, 414–422.
- Boswell, R. E. y Mahowald, A. P. (1985). tudor, a gene required for assembly of the germ plasm in *Drosophila melanogaster*. *Cell* *43*, 97–104.
- Boureaux, A., Vignal, E., Faure, S. y Fort, P. (2006). Evolution of the Rho Family of Ras-Like GTPases in Eukaryotes. *Molecular Biology and Evolution* *24*, 203–216.
- Bravo-Cordero, J. J., Sharma, V. P., Roh-Johnson, M., Chen, X., Eddy, R., Condeelis, J. y Hodgson, L. (2013). Spatial regulation of RhoC activity defines protrusion formation in migrating cells. *J. Cell. Sci.* *126*, 3356–3369.
- Breitsprecher, D. y Goode, B. L. (2013). Formins at a glance. *Journal of cell science* *126*, 1–7.
- Burkel, B., Benink, H., Vaughan, E., von Dassow, G. y Bement, W. (2012). A Rho GTPase signal treadmill backs a contractile array. *Developmental cell* *23*, 384–396.
- Campbell, P. D., Heim, A. E., Smith, M. Z. y Marlow, F. L. (2015). Kinesin-1 interacts with Bucky ball to form germ cells and is required to pattern the zebrafish body axis. *Development* *142*, 2996–3008.
- Chan, C. M., Chen, Y., Hung, T. S., Miller, A. L., Shipley, A. M. y Webb, S. E. (2015). Inhibition of SOCE disrupts cytokinesis in zebrafish embryos via inhibition of cleavage furrow deepening. *International Journal of Developmental Biology* *59*, 289–301.
- Chaplet, M., Detry, C., Deroanne, C., Fisher, L., Castronovo, V. y BellahcÃlne, A. (2004). Zoledronic acid up-regulates bone sialoprotein expression in osteoblastic cells through Rho GTPase inhibition. *Biochemical Journal* *384*, 591–598.

- Ciosk, R., DePalma, M. y Priess, J. R. (2006). Translational regulators maintain totipotency in the *Caenorhabditis elegans* germline. *Science* *311*, 851–853.
- Corcoran, J. A., Khapersky, D. A., Johnston, B. P., King, C. A., Cyr, D. P., Olsthoorn, A. V. y McCormick, C. (2012). Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus G-Protein-Coupled Receptor Prevents AU-Rich-Element-Mediated mRNA Decay. *Journal of Virology* *86*, 8859–8871.
- Cox, D. N., Chao, A., Baker, J., Chang, L., Qiao, D. y Lin, H. (1998). A novel class of evolutionarily conserved genes defined by piwi are essential for stem cell self-renewal. *Genes & development* *12*, 3715–3727.
- Crooks, G. E., Hon, G., Chandonia, J. M. y Brenner, S. E. (2004). WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res.* *14*, 1188–1190.
- Czaplinski, K. y Singer, R. H. (2006). Pathways for mRNA localization in the cytoplasm. *Trends Biochem. Sci.* *31*, 687–693.
- de Gorter, D. J. J., Reijmers, R. M., Beuling, E. A., Naber, H. P. H., Kuil, A., Kersten, M. J., Pals, S. T. y Spaargaren, M. (2008). The small GTPase Ral mediates SDF-1-induced migration of B cells and multiple myeloma cells. *Blood* *111*, 3364–3372.
- De Rubeis, S., Pasciuto, E., Li, K. W., Fernández, E., Di Marino, D., Buzzi, A., Ostroff, L. E., Klann, E., Zwartkuis, F. J. T., Komiyama, N. H., Grant, S. G. N., Poujol, C., Choquet, D., Achsel, T., Posthuma, D., Smit, A. B. y Bagni, C. (2013). CYFIP1 Coordinates mRNA Translation and Cytoskeleton Remodeling to Ensure Proper Dendritic Spine Formation. *Neuron* *79*, 1169–1182.
- DerMardirossian, C. y Bokoch, G. M. (2005). GDIs: central regulatory molecules in Rho GTPase activation. *Trends in Cell Biology* *15*, 356–363.
- Doitsidou, M., Reichman-Fried, M., Stebler, J., Káprunner, M., D'Áurries, J., Meyer, D., Esguerra, C. V., Leung, T. y Raz, E. (2002). Guidance of Primordial Germ Cell Migration by the Chemokine SDF-1. *Cell* *111*, 647–659.
- Dosch, R., Wagner, D., Mintzer, K., Runke, G., Wiemelt, A. y Mullins, M. (2004). Maternal control of vertebrate development before the midblastula transition: mutants from the zebrafish I. *Developmental cell* *6*, 771–780.
- Eberhart, C. G., Maines, J. Z. y Wasserman, S. A. (1996). Meiotic cell cycle requirement for a fly homologue of human Deleted in Azoospermia. *Nature* *381*, 783–785.
- Eng, C. H. y Gundersen, G. G. (2005). *Rho Proteins and Microtubules* pp. 265–296. Dordrecht: Springer Netherlands.
- Eno, C. y Pelegri, F. (2013). Gradual recruitment and selective clearing generate germ plasm aggregates in the zebrafish embryo. *Bioarchitecture* , *3*, 125–132.

- Ephrussi, A., Dickinson, L. K. y Lehmann, R. (1991). oskar organizes the germ plasm and directs localization of the posterior determinant nanos. *Cell* , 66, 37–50.
- Etienne-Manneville, S. y Hall, A. (2002). Rho GTPases in cell biology. *Nature* , 420, 629–635.
- Ewen-Campen, B., Schwager, E. E. y Extavour, C. G. (2010). The molecular machinery of germ line specification. *Mol. Reprod. Dev.*, 77, 3–18.
- Feng, B., Schwarz, H. y Jesuthasan, S. (2002). Furrow-specific endocytosis during cytokinesis of zebrafish blastomeres. *Experimental cell research* , 279, 14–20.
- Fernandez, J., Valladares, M., Fuentes, R. y Ubilla, A. (2006). Reorganization of cytoplasm in the zebrafish oocyte and egg during early steps of ooplasmic segregation. *Dev. Dyn.*, 235, 656–671.
- Flicek, P., Amode, M. R., Barrell, D., Beal, K., Billis, K., Brent, S., Carvalho-Silva, D., Clapham, P., Coates, G., Fitzgerald, S., Gil, L., GirÅşn, C. G., Gordon, L., Hourlier, T., Hunt, S., Johnson, N., Juettemann, T., KÅd'hÅd'ri, A. K., Keenan, S., Kulesha, E., Martin, F. J., Maurel, T., McLaren, W. M., Murphy, D. N., Nag, R., Overduin, B., Pignatelli, M., Pritchard, B., Pritchard, E., Riat, H. S., Ruffier, M., Sheppard, D., Taylor, K., Thormann, A., Trevanion, S. J., Vullo, A., Wilder, S. P., Wilson, M., Zadissa, A., Aken, B. L., Birney, E., Cunningham, F., Harrow, J., Herrero, J., Hubbard, T. J., Kinsella, R., Muffato, M., Parker, A., Spudich, G., Yates, A., Zerbino, D. R. y Searle, S. M. (2014). Ensembl 2014. *Nucleic Acids Research* , 42, D749–D755.
- Forrest, K. M. y Gavis, E. R. (2003). Live imaging of endogenous RNA reveals a diffusion and entrapment mechanism for nanos mRNA localization in *Drosophila*. *Current biology* : CB , 13, 1159–1168.
- Fujiwara, Y., Komiya, T., Kawabata, H., Sato, M., Fujimoto, H., Furusawa, M. y Noce, T. (1994). Isolation of a DEAD-family protein gene that encodes a murine homolog of *Drosophila vasa* and its specific expression in germ cell lineage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* , 91, 12258–12262.
- Funayama, N., Nakatsukasa, M., Mohri, K., Masuda, Y. y Agata, K. (2010). Piwi expression in archeocytes and choanocytes in demosponges: insights into the stem cell system in demosponges. *Evolution & development* , 12, 275–287.
- Ge, X., Grotjahn, D., Welch, E., Lyman-Gingerich, J., Holguin, C., Dimitrova, E., Abrams, E. W., Gupta, T., Marlow, F. L., Yabe, T., Adler, A., Mullins, M. C. y Pelegri, F. (2014). Hecate/Grip2a acts to reorganize the cytoskeleton in the symmetry-breaking event of embryonic axis induction. *PLoS Genet.*, 10, e1004422.
- Genth, H., Gerhard, R., Maeda, A., Amano, M., Kaibuchi, K., Aktories, K. y Just, I. (2003). Entrapment of Rho ADP-ribosylated by *Clostridium botulinum* C3 exoenzyme in the Rho-guanine nucleotide dissociation inhibitor-1 complex. *J. Biol. Chem.*, 278, 28523–28527.

- Gilbert, S. F. (2010). *Developmental Biology*. Ninth edition, Sinauer Associates.
- Giraldez, A. J., Mishima, Y., Rihel, J., Grocock, R. J., Van Dongen, S., Inoue, K., Enright, A. J. y Schier, A. F. (2006). Zebrafish MiR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs. *Science (New York, N.Y.)* 312, 75–79.
- Goode, B. L. y Eck, M. J. (2007). Mechanism and Function of Formins in the Control of Actin Assembly. *Annual Review of Biochemistry* 76, 593–627.
- Gore, A. V., Maegawa, S., Cheong, A., Gilligan, P. C., Weinberg, E. S. y Sampath, K. (2005). The zebrafish dorsal axis is apparent at the four-cell stage. *Nature* 438, 1030–1035.
- Guo, T., Peters, A. H. F. M. y Newmark, P. A. (2006). A Bruno-like gene is required for stem cell maintenance in planarians. *Developmental cell* 11, 159–169.
- Gupta, T., Marlow, F. L., Ferriola, D., Mackiewicz, K., Dapprich, J., Monos, D. y Mullins, M. C. (2010). Microtubule actin crosslinking factor 1 regulates the Balbiani body and animal-vegetal polarity of the zebrafish oocyte. *PLoS Genet.* 6, e1001073.
- Gustafson, E. A. y Wessel, G. M. (2010). Vasa genes: emerging roles in the germ line and in multipotent cells. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 32, 626–637.
- Hall, A. (1998). Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 279, 509–514.
- Hashimoto, Y., Maegawa, S., Nagai, T., Yamaha, E., Suzuki, H., Yasuda, K. y Inoue, K. (2004). Localized maternal factors are required for zebrafish germ cell formation. *Dev. Biol.* 268, 152–161.
- Hashimoto, Y., Suzuki, H., Kageyama, Y., Yasuda, K. y Inoue, K. (2006). Bruno-like protein is localized to zebrafish germ plasm during the early cleavage stages. *Gene expression patterns : GEP* 6, 201–205.
- Hauptmann, G. (2001). One-, two-, and three-color whole-mount in situ hybridization to *Drosophila* embryos. *Methods (San Diego, Calif.)* 23, 359–72.
- Hay, B., Jan, L. Y. y Jan, Y. N. (1988). A protein component of *Drosophila* polar granules is encoded by vasa and has extensive sequence similarity to ATP-dependent helicases. *Cell* 55, 577–587.
- Heasman, S. J. y Ridley, A. J. (2008). Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9, 690–701.
- Heim, A. E., Hartung, O., Rothhamel, S., Ferreira, E., Jenny, A. y Marlow, F. L. (2014). Oocyte polarity requires a Bucky ball-dependent feedback amplification loop. *Development* 141, 842–854.

- Hill, M. A., Schedlich, L. y Gunning, P. (1994). Serum-induced signal transduction determines the peripheral location of beta-actin mRNA within the cell. *The Journal of Cell Biology* 126, 1221–1229.
- Holt, C. y Bullock, S. (2009). Subcellular mRNA localization in animal cells and why it matters. *Science (New York, N.Y.)* 326, 1212–1216.
- Horesh, D., Sapir, T., Francis, F., Wolf, S. G., Caspi, M., Elbaum, M., Chelly, J. y Reiner, O. (1999). Doublecortin, a stabilizer of microtubules. *Human molecular genetics* 8, 1599–1610.
- Hotta, K., Tanaka, K., Mino, A., Kohno, H. y Takai, Y. (1996). Interaction of the Rho family small G proteins with kinectin, an anchoring protein of kinesin motor. *Biochemical and biophysical research communications* 225, 69–74.
- Houston, D. W. y King, M. L. (2000). A critical role for Xdazl, a germ plasm-localized RNA, in the differentiation of primordial germ cells in *Xenopus*. *Development (Cambridge, England)* 127, 447–456.
- Hwang, W. Y., Fu, Y., Reyon, D., Maeder, M. L., Kaini, P., Sander, J. D., Joung, J. K., Peterson, R. T. y Yeh, J.-R. J. (2013). Heritable and precise zebrafish genome editing using a CRISPR-Cas system. *PloS One* 8, e68708.
- Ikenishi, K. (1998). Germ plasm in *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila* and *Xenopus*. *Dev. Growth Differ.* 40, 1–10.
- Illmensee, K. y 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, H., Nojima, H. y Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96, 23–28.
- Jacobs, M., Hayakawa, K., Swenson, L., Bellon, S., Fleming, M., Taslimi, P. y Doran, J. (2006). The structure of dimeric ROCK I reveals the mechanism for ligand selectivity. *The Journal of biological chemistry* 281, 260–268.
- Jeronimo R., M.-R. (2012). Funcion de RhoA en la localizacion del plasma germinal en el pez cebra. Master's thesis Instituto de Biotecnologia, Universidad Nacional Autonoma de Mexico.
- Jesuthasan, S. (1998). Furrow-associated microtubule arrays are required for the cohesion of zebrafish blastomeres following cytokinesis. *J. Cell. Sci.* 111 (Pt 24), 3695–3703.
- Johnson, J., Bagley, J., Skaznik-Wikiel, M., Lee, H. J., Adams, G. B., Niikura, Y., Tschudy, K. S., Tilly, J. C., Cortes, M. L., Forkert, R., Spitzer, T., Iacomini, J., Scadden, D. T. y Tilly, J. L. (2005). Oocyte generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells in bone marrow and peripheral blood. *Cell* 122, 303–315.

- Jowett, T. (2001). Double in situ hybridization techniques in zebrafish. *Methods* (San Diego, Calif.) *23*, 345–58.
- Juliano, C. E., Swartz, S. Z. y Wessel, G. M. (2010). A conserved germline multipotency program. *Development* *137*, 4113–4126.
- Kanada, M., Nagasaki, A. y Uyeda, T. Q. P. (2005). Adhesion-dependent and contractile ring-independent equatorial furrowing during cytokinesis in mammalian cells. *Molecular biology of the cell* *16*, 3865–3872.
- Karashima, T., Sugimoto, A. y Yamamoto, M. (2000). *Caenorhabditis elegans* homologue of the human azoospermia factor DAZ is required for oogenesis but not for spermatogenesis. *Development* (Cambridge, England) *127*, 1069–1079.
- Kardash, E., Reichman-Fried, M., Mañótre, J.-L., Boldajipour, B., Papusheva, E., Messerschmidt, E.-M., Heisenberg, C.-P. y Raz, E. (2010). A role for Rho GTPases and cell-cell adhesion in single-cell motility in vivo. *Nature cell biology* *12*, 47–53; sup pp 1–11.
- Kedde, M., Strasser, M. J., Boldajipour, B., Oude Vrielink, J. A. F., Slanchev, K., le Sage, C., Nagel, R., Voorhoeve, P. M., van Duijse, J., Åyrom, U. A., Lund, A. H., Perrakis, A., Raz, E. y Agami, R. (2007). RNA-binding protein Dnd1 inhibits microRNA access to target mRNA. *Cell* *131*, 1273–1286.
- Kim, H.-C., Jo, Y.-J., Kim, N.-H. y Namgoong, S. (2015). Small molecule inhibitor of formin homology 2 domains (SMIFH2) reveals the roles of the formin family of proteins in spindle assembly and asymmetric division in mouse oocytes. *PloS one* *10*, e0123438.
- Kim-Ha, J., Kerr, K. y Macdonald, P. M. (1995). Translational regulation of oskar mRNA by bruno, an ovarian RNA-binding protein, is essential. *Cell* *81*, 403–412.
- Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B. y Schilling, T. F. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn.* *203*, 253–310.
- King, M. L., Messitt, T. J. y 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.
- Kishi, K., Sasaki, T., Kuroda, S., Itoh, T. y Takai, Y. (1993). Regulation of cytoplasmic division of *Xenopus* embryo by rho p21 and its inhibitory GDP/GTP exchange protein (rho GDI). *J. Cell Biol.* *120*, 1187–1195.
- Knaut, H., Pelegri, E., Bohmann, K., Schwarz, H. y Nüsslein-Volhard, C. (2000). Zebrafish vasa RNA but not its protein is a component of the germ plasm and segregates asymmetrically before germline specification. *The Journal of cell biology* *149*, 875–888.
- Komiya, T., Itoh, K., Ikenishi, K. y Furusawa, M. (1994). Isolation and characterization of a novel gene of the DEAD box protein family which is specifically expressed in germ cells of *Xenopus laevis*. *Developmental biology* *162*, 354–363.

- Kopranner, M., Thisse, C., Thisse, B. y Raz, E. (2001). A zebrafish nanos-related gene is essential for the development of primordial germ cells. *Genes Dev.* *15*, 2877–2885.
- Kosaka, K., Kawakami, K., Sakamoto, H. y Inoue, K. (2007). Spatiotemporal localization of germ plasm RNAs during zebrafish oogenesis. *Mech. Dev.* *124*, 279–289.
- Kotani, T., Yasuda, K., Ota, R. y Yamashita, M. (2013). Cyclin B1 mRNA translation is temporally controlled through formation and disassembly of RNA granules. *J. Cell Biol.* *202*, 1041–1055.
- Kugler, J. y Lasko, P. (2009). Localization, anchoring and translational control of oskar, gurken, bicoid and nanos mRNA during *Drosophila* oogenesis. *Fly* *3*, 15–28.
- Kumano, G. (2015). Evolution of germline segregation processes in animal development. *Dev. Growth Differ.* .
- Laale, H. W. (1977). The biology and use of zebrafish, *Brachydanio rerio* in fisheries research. *Journal of Fish Biology* *10*, 121–173.
- Lai, S. L., Chang, C. N., Wang, P. J. y Lee, S. J. (2005). Rho mediates cytokinesis and epiboly via ROCK in zebrafish. *Mol. Reprod. Dev.* *71*, 186–196.
- Larkin, M., Blackshields, G., Brown, N., Chenna, R., McGettigan, P., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J., Gibson, T. y Higgins, D. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* *23*, 2947–2948.
- Latham, V. M., Yu, E. H., Tullio, A. N., Adelstein, R. S. y Singer, R. H. (2001). A Rho-dependent signaling pathway operating through myosin localizes beta-actin mRNA in fibroblasts. *Curr. Biol.* *11*, 1010–1016.
- Laufs, U. y Liao, J. K. (1998). Post-transcriptional Regulation of Endothelial Nitric Oxide Synthase mRNA Stability by Rho GTPase. *Journal of Biological Chemistry* *273*, 24266–24271.
- Lauter, G., SÁúll, I. y Hauptmann, G. (2011). Two-color fluorescent in situ hybridization in the embryonic zebrafish brain using differential detection systems. *BMC Developmental Biology* *11*, 43.
- Lawson, N. D. y Wolfe, S. A. (2011). Forward and Reverse Genetic Approaches for the Analysis of Vertebrate Development in the Zebrafish. *Developmental Cell* *21*, 48–64.
- Lécuyer, E., Yoshida, H., Parthasarathy, N., Alm, C., Babak, T., Cerovina, T., Hughes, T., Tomancak, P. y Krause, H. (2007). Global analysis of mRNA localization reveals a prominent role in organizing cellular architecture and function. *Cell* *131*, 174–187.
- Lee, A., Li, W., Xu, K., Bogert, B. A., Su, K. y Gao, F.-B. (2003). Control of dendritic development by the *Drosophila* fragile X-related gene involves the small GTPase Rac1. *Development* *130*, 5543–5552.

- Lee, H. C., Choi, H. J., Lee, H. G., Lim, J. M., Ono, T. y Han, J. Y. (2015). DAZL Expression Explains Origin and Central Formation of Primordial Germ Cells in Chicken. *Stem Cells Dev.* .
- Lee, K. W., Ho, S. M., Wong, C. H., Webb, S. E. y Miller, A. L. (2004a). Characterization of mid-spindle microtubules during furrow positioning in early cleavage period zebrafish embryos. *Zygote (Cambridge, England)* *12*, 221–230.
- Lee, K. W., Webb, S. E. y Miller, A. L. (2004b). Ca²⁺ released via IP₃ receptors is required for furrow deepening during cytokinesis in zebrafish embryos. *International Journal of Developmental Biology* *47*, 411–421.
- Lee, K. W., Webb, S. E. y Miller, A. L. (2006). Requirement for a localized, IP₃R-generated Ca²⁺ transient during the furrow positioning process in zebrafish zygotes. *Zygote (Cambridge, England)* *14*, 143–155.
- Lele, Z. y Krone, P. (1996). The zebrafish as a model system in developmental, toxicological and transgenic research. *Biotechnology Advances* *14*, 57–72.
- Lessman, C. A. (2009). Oocyte maturation: converting the zebrafish oocyte to the fertilizable egg. *Gen. Comp. Endocrinol.* *161*, 53–57.
- Li, W. M., Webb, S. E., Chan, C. M. y Miller, A. L. (2008). Multiple roles of the furrow deepening Ca²⁺ transient during cytokinesis in zebrafish embryos. *Developmental biology* *316*, 228–248.
- Li, W. M., Webb, S. E., Lee, K. W. y Miller, A. L. (2006). Recruitment and SNARE-mediated fusion of vesicles in furrow membrane remodeling during cytokinesis in zebrafish embryos. *Experimental cell research* *312*, 3260–3275.
- Liao, G. y Liu, G. (2013). Immediate Translation of Formin DIAPH1 mRNA after Its Exiting the Nucleus Is Required for Its Perinuclear Localization in Fibroblasts. *PLoS ONE* *8*.
- Liao, G., Ma, X. y Liu, G. (2011). An RNA-zipcode-independent mechanism that localizes Dia1 mRNA to the perinuclear ER through interactions between Dia1 nascent peptide and Rho-GTP. *J. Cell. Sci.* *124*, 589–599.
- Lindeman, R. E. y 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.
- Lu, F. I., Thisse, C. y Thisse, B. (2011). Identification and mechanism of regulation of the zebrafish dorsal determinant. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *108*, 15876–15880.
- Lukinavičius, G., Reymond, L., D'Este, E., Masharina, A., GÄüttfert, F., Ta, H., GÄijther, A., Fournier, M., Rizzo, S., Waldmann, H., Blaukopf, C., Sommer, C., Gerlich, D. W., Arndt, H.-D., Hell, S. W. y Johnsson, K. (2014). Fluorogenic probes for live-cell imaging of the cytoskeleton. *Nature Methods* *11*, 731–733.

- Maegawa, S., Yasuda, K. y Inoue, K. (1999). Maternal mRNA localization of zebrafish DAZ-like gene. *Mech. Dev.* *81*, 223–226.
- Malone, C. D., Brennecke, J., Dus, M., Stark, A., McCombie, W. R., Sachidanandam, R. y Hannon, G. J. (2009). Specialized piRNA pathways act in germline and somatic tissues of the *Drosophila* ovary. *Cell* *137*, 522–535.
- Marlow, F. (2010). Maternal Control of Development in Vertebrates: My Mother Made Me Do It! Colloquium series on developmental biology, Morgan & Claypool Life Sciences.
- Marlow, F. L. y 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.
- Martin, K. y Ephrussi, A. (2009). mRNA localization: gene expression in the spatial dimension. *Cell* *136*, 719–730.
- Matsumura, F. (2005). Regulation of myosin II during cytokinesis in higher eukaryotes. *Trends in cell biology* *15*, 371–377.
- Medioni, C., Mowry, K. y Besse, F. (2012). Principles and roles of mRNA localization in animal development. *Development (Cambridge, England)* *139*, 3263–3276.
- Mehta, D., Ahmmed, G. U., Paria, B. C., Holinstat, M., Voyno-Yasenetskaya, T., Tiruppathi, C., Minshall, R. D. y Malik, A. B. (2003). RhoA interaction with inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor and transient receptor potential channel-1 regulates Ca²⁺ entry Role in signaling increased endothelial permeability. *Journal of Biological Chemistry* *278*, 33492–33500.
- Mendieta-Serrano, M. A., Schnabel, D., Lomeln, H. y Salas-Vidal, E. (2013). Cell proliferation patterns in early zebrafish development. *Anatomical record (Hoboken, N.J. : 2007)* *296*, 759–773.
- Miranda-Rodríguez, J. R., Salas-Vidal, E., Lomelí, H., Zurita, M. y Schnabel, D. (2017). RhoA/ROCK pathway activity is essential for the correct localization of the germ plasm mRNAs in zebrafish embryos. *Developmental Biology* *421*, 27–42.
- Mishima, Y., Giraldez, A. J., Takeda, Y., Fujiwara, T., Sakamoto, H., Schier, A. F. y Inoue, K. (2006). Differential regulation of germline mRNAs in soma and germ cells by zebrafish miR-430. *Current biology : CB* *16*, 2135–2142.
- Moon, S. (2003). Rho GTPase-activating proteins in cell regulation. *Trends in Cell Biology* *13*, 13–22.
- Murdoch, A., Jenkinson, E. J., Johnson, G. D. y Owen, J. J. (1990). Alkaline phosphatase-fast red, a new fluorescent label. *Journal of Immunological Methods* *132*, 45–49.

- Naim, V., Imarisio, S., Di Cunto, F., Gatti, M. y Bonaccorsi, S. (2004). *Drosophila* citron kinase is required for the final steps of cytokinesis. *Molecular biology of the cell* 15, 5053–5063.
- Nair, S., Marlow, F., Abrams, E., Kapp, L., Mullins, M. y Pelegri, F. (2013). The chromosomal passenger protein birc5b organizes microfilaments and germ plasm in the zebrafish embryo. *PLoS genetics* 9.
- Narumiya, S., Tanji, M. y Ishizaki, T. (2009). Rho signaling, ROCK and mDia1, in transformation, metastasis and invasion. *Cancer and Metastasis Reviews* 28, 65–76.
- Nimnual, A. S., Taylor, L. J. y Bar-Sagi, D. (2003). Redox-dependent downregulation of Rho by Rac. *Nature cell biology* 5, 236–241.
- Nishimura, Y. y Yonemura, S. (2006). Centralspindlin regulates ECT2 and RhoA accumulation at the equatorial cortex during cytokinesis. *J. Cell. Sci.* 119, 104–114.
- Nojima, H., Rothhamel, S., Shimizu, T., Kim, C. H., Yonemura, S., Marlow, F. L. y Hibi, M. (2010). Syntabulin, a motor protein linker, controls dorsal determination. *Development* 137, 923–933.
- Nüsslein-Volhard, C., Frohnhöfer, H. G. y Lehmann, R. (1987). Determination of anteroposterior polarity in *Drosophila*. *Science (New York, N.Y.)* 238, 1675–1681.
- O’Connell, C. B., Wheatley, S. P., Ahmed, S. y Wang, Y. L. (1999). The small GTP-binding protein rho regulates cortical activities in cultured cells during division. *The Journal of cell biology* 144, 305–313.
- Ohnaka, K., Shimoda, S., Nawata, H., Shimokawa, H., Kaibuchi, K., Iwamoto, Y. y Takayanagi, R. (2001). Pitavastatin enhanced BMP-2 and osteocalcin expression by inhibition of Rho-associated kinase in human osteoblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 287, 337–342.
- Ohta, Y., Hartwig, J. H. y Stossel, T. P. (2006). FilGAP, a Rho- and ROCK-regulated GAP for Rac binds filamin A to control actin remodelling. *Nature cell biology* 8, 803–814.
- Oleksy, A., Opaliński, ., Derewenda, U., Derewenda, Z. S. y Otlewski, J. (2006). The molecular basis of RhoA specificity in the guanine nucleotide exchange factor PDZ-RhoGEF. *J. Biol. Chem.* 281, 32891–32897.
- Palazzo, A. F., Cook, T. A., Alberts, A. S. y Gundersen, G. G. (2001). mDia mediates Rho-regulated formation and orientation of stable microtubules. *Nature cell biology* 3, 723–729.
- Pelegri, F. (2003). Maternal factors in zebrafish development. *Dev. Dyn.* 228, 535–554.

- Pelegri, F., Dekens, M., Schulte-Merker, S., Maischein, H.-M., Weiler, C. y Nüsslein-Volhard, C. (2004). Identification of recessive maternal-effect mutations in the zebrafish using a gynogenesis-based method. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 231, 324–335.
- Pelegri, F., Knaut, H., Maischein, H. M., Schulte-Merker, S. y 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, A., Werner, M. y Glotzer, M. (2005). Cytokinesis: welcome to the Rho zone. *Trends Cell Biol.* 15, 651–658.
- Ponting, C. P. (1997). Tudor domains in proteins that interact with RNA. *Trends in biochemical sciences* 22, 51–52.
- Raz, E. (2000). The function and regulation of *vasa*-like genes in germ-cell development. *Genome biology* 1, REVIEWS1017.
- Raz, E. (2003). Primordial germ-cell development: the zebrafish perspective. *Nat. Rev. Genet.* 4, 690–700.
- Reddien, P. W., Oviedo, N. J., Jennings, J. R., Jenkin, J. C. y Sánchez Alvarado, A. (2005). SMEDWI-2 is a PIWI-like protein that regulates planarian stem cells. *Science (New York, N.Y.)* 310, 1327–1330.
- Reijo, R., Lee, T. Y., Salo, P., Alagappan, R., Brown, L. G., Rosenberg, M., Rozen, S., Jaffe, T., Straus, D. y Hovatta, O. (1995). Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene. *Nature genetics* 10, 383–393.
- Riechmann, V. y Ephrussi, A. (2001). Axis formation during *Drosophila* oogenesis. *Current opinion in genetics & development* 11, 374–383.
- Riemer, S., Bontems, F., Krishnakumar, P., Gömann, J. y Dosch, R. (2015). A functional Bucky ball-GFP transgene visualizes germ plasm in living zebrafish. *Gene Expression Patterns* 18, 44–52.
- Rizvi, S. A., Neidt, E. M., Cui, J., Feiger, Z., Skau, C. T., Gardel, M. L., Kozmin, S. A. y Kovar, D. R. (2009). Identification and characterization of a small molecule inhibitor of formin-mediated actin assembly. *Chemistry & biology* 16, 1158–1168.
- Rossman, K. L., Der, C. J. y Sondek, J. (2005). GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6, 167–180.
- Ruggiu, M., Speed, R., Taggart, M., McKay, S. J., Kilanowski, F., Saunders, P., Dorin, J. y Cooke, H. J. (1997). The mouse *Dazl* gene encodes a cytoplasmic protein essential for gametogenesis. *Nature* 389, 73–77.

- Sahoo, P. K., Murawala, P., Sawale, P. T., Sahoo, M. R., Tripathi, M. M., Gaikwad, S. R., Seshadri, V. y Joseph, J. (2011). Wnt signalling antagonizes stress granule assembly through a Dishevelled-dependent mechanism. *Biology Open* 1, 109–119.
- Salas-Vidal, E., Meijer, A. H., Cheng, X. y 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.
- Sasaki, Y., Suzuki, M. y Hidaka, H. (2002). The novel and specific Rho-kinase inhibitor (S)-(+)-2-methyl-1-[(4-methyl-5-isoquinoline)sulfonyl]-homopiperazine as a probing molecule for Rho-kinase-involved pathway. *Pharmacology & therapeutics* 93, 225–232.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.-Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P. y Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods* 9, 676–682.
- Schisa, J. A. (2012). New insights into the regulation of RNP granule assembly in oocytes. *Int Rev Cell Mol Biol* 295, 233–289.
- Schofield, A. V., Steel, R. y Bernard, O. (2012). Rho-associated coiled-coil kinase (ROCK) protein controls microtubule dynamics in a novel signaling pathway that regulates cell migration. *The Journal of biological chemistry* 287, 43620–43629.
- Selman, K., Wallace, R. A., Sarka, A. y Qi, X. (1993). Stages of oocyte development in the zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Journal of Morphology* 218, 203–224.
- Seydoux, G. y Braun, R. E. (2006). Pathway to totipotency: lessons from germ cells. *Cell* 127, 891–904.
- Shang, X., Marchioni, F., Sipes, N., Evelyn, C. R., Jerabek-Willemsen, M., Duhr, S., Seibel, W., Wortman, M. y Zheng, Y. (2012). Rational design of small molecule inhibitors targeting RhoA subfamily Rho GTPases. *Chem. Biol.* 19, 699–710.
- Sloan, C. M., Quinn, C. V., Peters, J. P., Farley, J., Goetzinger, C., Wernli, M., DeMali, K. A. y Ellerbroek, S. M. (2012). Divergence of Rho residue 43 impacts GEF activity. *Small GTPases* 3, 15–22.
- Solana, J. (2013). Closing the circle of germline and stem cells: the Primordial Stem Cell hypothesis. *Evodevo* 4, 2.
- Stuart, H. C., Jia, Z., Messenberg, A., Joshi, B., Underhill, T. M., Moukhles, H. y Nabi, I. R. (2008). Localized Rho GTPase activation regulates RNA dynamics and compartmentalization in tumor cell protrusions. *J. Biol. Chem.* 283, 34785–34795.
- Subramaniam, K. y Seydoux, G. (1999). *nos-1* and *nos-2*, two genes related to *Drosophila nanos*, regulate primordial germ cell development and survival in *Caenorhabditis elegans*. *Development (Cambridge, England)* 126, 4861–4871.

- Suzuki, H., Maegawa, S., Nishibu, T., Sugiyama, T., Yasuda, K. y Inoue, K. (2000). Vegetal localization of the maternal mRNA encoding an EDEN-BP/Bruno-like protein in zebrafish. *Mechanisms of Development* 93, 205–209.
- Takahashi, S., Sakurai, K., Ebihara, A., Kajihō, H., Saito, K., Kontani, K., Nishina, H. y Katada, T. (2011). RhoA activation participates in rearrangement of processing bodies and release of nucleated AU-rich mRNAs. *Nucleic Acids Research* 39, 3446–3457.
- Takeda, Y., Mishima, Y., Fujiwara, T., Sakamoto, H. y Inoue, K. (2009). DAZL relieves miRNA-mediated repression of germline mRNAs by controlling poly(A) tail length in zebrafish. *PloS one* 4, e7513.
- Tanaka, T., Kato, Y., Matsuda, K., Hanyu-Nakamura, K. y Nakamura, A. (2011). *Drosophila* Mon2 couples Oskar-induced endocytosis with actin remodeling for cortical anchorage of the germ plasm. *Development* 138, 2523–2532.
- Theusch, E. V., Brown, K. J. y Pelegri, F. (2006). Separate pathways of RNA recruitment lead to the compartmentalization of the zebrafish germ plasm. *Dev. Biol.* 292, 129–141.
- Thisse, C. y Thisse, B. (2008). High-resolution in situ hybridization to whole-mount zebrafish embryos. *Nat Protoc* 3, 59–69.
- Thumkeo, D., Watanabe, S. y Narumiya, S. (2013). Physiological roles of Rho and Rho effectors in mammals. *European Journal of Cell Biology* 92, 303–315.
- Tran, L. D., Hino, H., Quach, H., Lim, S., Shindo, A., Mimori-Kiyosue, Y., Mione, M., Ueno, N., Winkler, C., Hibi, M. y Sampath, K. (2012). Dynamic microtubules at the vegetal cortex predict the embryonic axis in zebrafish. *Development* 139, 3644–3652.
- Tsai, N.-P. y Wei, L.-N. (2010). RhoA/ROCK1 signaling regulates stress granules formation and apoptosis. *Cellular signalling* 22, 668.
- Tsuda, M., Sasaoka, Y., Kiso, M., Abe, K., Haraguchi, S., Kobayashi, S. y Saga, Y. (2003). Conserved role of nanos proteins in germ cell development. *Science (New York, N.Y.)* 301, 1239–1241.
- Tsunekawa, N., Naito, M., Sakai, Y., Nishida, T. y Noce, T. (2000). Isolation of chicken vasa homolog gene and tracing the origin of primordial germ cells. *Development* 127, 2741–2750.
- Urven, L. E., Yabe, T. y 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.
- Vagin, V. V., Wohlschlegel, J., Qu, J., Jonsson, Z., Huang, X., Chuma, S., Girard, A., Sachidanandam, R., Hannon, G. J. y Aravin, A. A. (2009). Proteomic analysis of murine Piwi proteins reveals a role for arginine methylation in specifying interaction with Tudor family members. *Genes & development* 23, 1749–1762.

- Vagnarelli, P. y Earnshaw, W. C. (2004). Chromosomal passengers: the four-dimensional regulation of mitotic events. *Chromosoma* 113, 211–222.
- Vale, R. D., Spudich, J. A. y Griffis, E. R. (2009). Dynamics of myosin, microtubules, and Kinesin-6 at the cortex during cytokinesis in *Drosophila* S2 cells. *The Journal of cell biology* 186, 727–738.
- Vignal, E., Blangy, A., Martin, M., Gauthier-Rouvière, C. y Fort, P. (2001). Kinectin is a key effector of RhoG microtubule-dependent cellular activity. *Molecular and cellular biology* 21, 8022–8034.
- Villace, P., Marion, R. M. y 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.
- Vogelsgesang, M., Pautsch, A. y Aktories, K. (2007). C3 exoenzymes, novel insights into structure and action of Rho-ADP-ribosylating toxins. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 374, 347–360.
- Wagner, E. y Glotzer, M. (2016). Local RhoA activation induces cytokinetic furrows independent of spindle position and cell cycle stage. *The Journal of cell biology* 213, 641–649.
- Wang, L., Yang, L., Luo, Y. y Zheng, Y. (2003). A novel strategy for specifically down-regulating individual Rho GTPase activity in tumor cells. *J. Biol. Chem.* 278, 44617–44625.
- Warga, R. M. y Kimmel, C. B. (1990). Cell movements during epiboly and gastrulation in zebrafish. *Development* 108, 569–580.
- Watanabe, S., Okawa, K., Miki, T., Sakamoto, S., Morinaga, T., Segawa, K., Arakawa, T., Kinoshita, M., Ishizaki, T. y Narumiya, S. (2010). Rho and anillin-dependent control of mDia2 localization and function in cytokinesis. *Molecular biology of the cell* 21, 3193–3204.
- Webb, S. E., Goulet, C., Chan, C. M., Yuen, M. Y. y Miller, A. L. (2014). Biphasic assembly of the contractile apparatus during the first two cell division cycles in zebrafish embryos. *Zygote* 22, 218–228.
- Webb, S. E., Lee, K. W., Karplus, E. y Miller, A. L. (1997). Localized calcium transients accompany furrow positioning, propagation, and deepening during the early cleavage period of zebrafish embryos. *Dev. Biol.* 192, 78–92.
- Welch, E. y Pelegri, F. (2014). Cortical depth and differential transport of vegetally localized dorsal and germ line determinants in the zebrafish embryo. *Bioarchitecture* 5, 13–26.
- Westerfield, M. (1994). *Zebrafish Book: A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish*. Inst Of Neuro Science.

- Wheeler, A. P. y Ridley, A. J. (2004). Why three Rho proteins? RhoA, RhoB, RhoC, and cell motility. *Exp. Cell Res.* *301*, 43–49.
- Wilde, C., Barth, H., Sehr, P., Han, L., Schmidt, M., Just, I. y Aktories, K. (2002). Interaction of the Rho-ADP-ribosylating C3 Exoenzyme with RalA. *Journal of Biological Chemistry* *277*, 14771–14776.
- Wolke, U., Weidinger, G., Kopranner, M. y Raz, E. (2002). Multiple levels of posttranscriptional control lead to germ line-specific gene expression in the zebrafish. *Curr. Biol.* *12*, 289–294.
- Wylie, C. (1999). Germ Cells. *Cell* *96*, 165 – 174.
- Xu, Y., Wang, H., Zhou, J., Lei, Y., Zhou, Y., Yang, Q., Ye, D., Li, W. y Deng, F. (2010). Zebrafish Nanos interacts with and regulates the phosphorylation of Mylz2. *Biochimie* *92*, 1812–1817.
- Yabe, T., Ge, X., Lindeman, R., Nair, S., Runke, G., Mullins, M. C. y 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.
- Yamashiro, S., Totsukawa, G., Yamakita, Y., Sasaki, Y., Madaule, P., Ishizaki, T., Narumiya, S. y Matsumura, F. (2003). Citron kinase, a Rho-dependent kinase, induces diphosphorylation of regulatory light chain of myosin II. *Molecular biology of the cell* *14*, 1745–1756.
- Yoon, C., Kawakami, K. y 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.
- Yoshida-Noro, C., Suzuki, N. y Takeichi, M. (1984). Molecular nature of the calcium-dependent cell-cell adhesion system in mouse teratocarcinoma and embryonic cells studied with a monoclonal antibody. *Developmental Biology* *101*, 19–27.
- Yoshizaki, H., Ohba, Y., Parrini, M.-C., Dulyaninova, N. G., Bresnick, A. R., Mochizuki, N. y Matsuda, M. (2004). Cell type-specific regulation of RhoA activity during cytokinesis. *The Journal of biological chemistry* *279*, 44756–44762.
- Young, K. G. y Copeland, J. W. (2010). Formins in cell signaling. *Biochim. Biophys. Acta* *1803*, 183–190.
- Zampedri, C., Tinoco-Cuellar, M., Carrillo-Rosas, S., Diaz-Tellez, A., Ramos-Balderas, J. L., Pelegri, F. y Maldonado, E. (2016). Zebrafish P54 RNA helicases are cytoplasmic granule residents that are required for development and stress resilience. *Biology Open* *5*, 1473–1484.
- Zearfoss, N. R., Chan, A. P., Wu, C. F., Kloc, M. y Etkin, L. D. (2004). Hermes is a localized factor regulating cleavage of vegetal blastomeres in *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.* *267*, 60–71.

- Zhang, Y., Duan, X., Cao, R., Liu, H. L., Cui, X. S., Kim, N. H., Rui, R. y Sun, S. C. (2014). Small GTPase RhoA regulates cytoskeleton dynamics during porcine oocyte maturation and early embryo development. *Cell Cycle* 13, 3390–3403.
- Ååkugor, A., Tveiten, H., Johnsen, H. y Andersen, Å. (2016). Multiplicity of Buc copies in Atlantic salmon contrasts with loss of the germ cell determinant in primates, rodents and axolotl. *BMC evolutionary biology* 16, 232.