

UCH-RE
Biotecnología
MISS
C.1

**HOMEOSTASIS DE COBRE EN EMBRIONES DE PEZ CEBRA (*Danio rerio*):
CLONAMIENTO Y CARACTERIZACION DEL GEN *CTR1* (COPPER
TRANSPORTER 1)**

Tesis

Entrega a la Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al título de
Ingeniero en Biotecnología Molecular

Por

Natalia Cristina Mackenzie Felsenhardt

Director de Tesis: Dr. Miguel Allende Connelly





**“HOMEOSTASIS DE COBRE EN EMBRIONES DE PEZ CEBRA
(*Danio rerio*): CLONAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DEL GEN
CTR1 (COPPER TRANSPORTER1)”.**

Memoria de Título entregada a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

NATALIA CRISTINA MACKENZIE FELSENHARDT

Director de Memoria de Título
Dr. Miguel Allende Connelly

Firma manuscrita en tinta azul sobre una línea horizontal.

Comisión de Evaluación de la Memoria de Título

Dra. Rosalba Lagos Mónico
Presidente Comisión

Firma manuscrita en tinta azul sobre una línea horizontal.

Dr. Nicolás Guiliani

Firma manuscrita en tinta azul sobre una línea horizontal.



Santiago de Chile, Diciembre, 2003

DEDICATORIA

A mi madre Cristina, a mi padre John, a mi hermana Michelle,

a Valeria

a Emilio

a Paula

AGRADECIMIENTOS

A Claudia d' Alancon por su generosidad y eterno apoyo

A Marcia Gaete por su paciencia y sus consejos

A Mónica Brito por su organización y su disposición,

A Michelle de Saint Pierre por su música

A Andrés Sarrazin por sus discusiones

A Eduardo Villablanca por su amistad

A Rodrigo Young por sus consejos

A Carolina Achondo por el cuidado de los peces

a Florencio Espinoza por todos los favores,

a Juan Silva por los lavados

y le agradezco a mi tutor de tesis Miguel Allende por permitirme haber tenido todo lo anterior, todos los viajes y por los maravillosos dos años con los que empecé todo lo que queda por delante.

INDICE DE CONTENIDO	PAG.
DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	ii
INDICE GENERAL	iii
INDICE DE TABLAS	v
INDICE DE FIGURAS	vi
ABREVIATURAS	viii
RESUMEN	x
ABSTRACT	xi
I. INTRODUCCION	1
II. MATERIALES Y METODOS	13
Material biológico	13
Reactivos para biología molecular	13
Reactivos para hibridación <i>in situ</i>	16
Inmunocitoquímica	16
Reactivos para inyección	16
Soluciones	17
Otros	18
Métodos	19
Análisis de parámetros morfológicos	19
Detección de necrosis por naranjo de acridino	19
Inducción por cobre de <i>hsp70-gfp</i>	20
Clonamiento de <i>ctr1</i> de pez cebra	20

Southern Blot	24
Mapeo de <i>ctr1</i> de pez cebra	25
RT-PCR	28
Preparación de sonda de RNA para hibridación <i>in situ</i>	29
Hibridación <i>in situ</i>	30
Morfolino <i>ctr1</i> de pez cebra	32
Síntesis de RNA <i>ctr1-myc</i> de pez cebra	33
Inhibición de la expresión de <i>ctr1</i>	34
Necrosis en embriones MO <i>ctr1</i>	35
III. RESULTADOS	36
Toxicidad de cobre: efectos en el desarrollo embrionario	36
Respuesta a estrés inducida por cobre	40
Necrosis con NA	41
Clonamiento de <i>ctr1</i>	43
Locus genómico, estructura genómica	43
RT-PCR	45
Hibridación <i>in situ</i>	49
Inyección de MO <i>ctr1</i>	50
Interferencia de la función del gen por MO <i>ctr1</i>	50
Análisis fenotípico de los morfantes MO <i>ctr1</i>	52
Muerte celular de morfantes	54
IV. DISCUSION	56
V. CONCLUSION	71
VI. REFERENCIAS	73

INDICE DE TABLAS

N° TABLA	PAG
1 Proteínas que unen cobre, su función biológica y las consecuencias de su deficiencia	3
2 Valores gráfico porcentaje vejigas normales v/s μM CuSO_4	39

INDICE DE FIGURAS

Nº FIGURA

- 1 Esquema del transporte y distribución de cobre en *Saccharomyces cerevisiae*
- 2 Metabolismo de cobre en humanos. Modelo de absorción y distribución de cobre en humanos a nivel celular.
- 3 a) Plásmido pGEM-T 3000 pb b) Southern blot de *ctr1*
- 4 Plásmido pCS2+MT más el inserto de *ctr1* de pez cebra unido a las 6 copias del epítotope myc
- 5 Efectos morfológicos generados por CuSO₄ sobre larvas de pez cebra
- 6 Gráfico Concentración de CuSO₄ v/s % de vejigas normales de larvas de pez cebra
- 7 Larvas transgénicas hsp70-GFP de 3.5dpf expuestas a 100 µM de CuSO₄
- 8 Necrosis en embriones expuestos a diferentes concentraciones de CuSO₄ visualizada con naranja de acridina
- 9 Secuencia proteica deducida del gen *ctr1* de pez cebra (*zctr1*) alineado con los ortólogos de rata (*rctr1*) y humano (*hctr1*).
- 10 Estructura genómica y locus genómico del gen *ctr1* de pez cebra.
- 11 Comparación de las secuencias genómicas del gen *ctr1* de pez cebra con el humano
- 12 Expresión del gen *ctr1* de pez cebra durante del desarrollo determinado por RT-PCR
- 13 Hibridación *in situ* de *ctr1* de pez cebra
- 14 Bloqueo específico de la proteína Ctr1 de pez cebra por el morfolino *ctr1*
- 15 Inyección de morfolinós: controles y fenotipo morfante

16 Necrosis en embriones control y morfantes a 3 dpf teñidos con naranjo de acridina

SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

AP	Fosfatasa alcalina
BMB	Solución de bloqueo
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
DAB	Diamino Bencidina
dpf	Días post fertilización
DO	Densidad óptica
DTM	Dominio transmembrana
DTT	Ditiotrietol
E N°	Estadio embrionario de ratón
EDTA	Etilen Diamina tetra acetato
EtOH	Etanol
GFP	Proteína fluorescente verde
GTP	Guanocin tri-fosfato
hpf	Horas post fertilización
hsp70	Proteína de estrés térmico
Kb	Kilobases
KO	Ratónnock out
LS	Suero de bovino
MAB	Tampón de ácido maleico
MABT	Tampón de ácido maleico más triton
MIT	Instituto de Tecnología de Massachusetts
MO	Morfolino DNA
Morfantes	Embriones inyectados con morfolino
Myc	Epítopes Myc

NTP/BCIP	Nitro blue tetrazolium chloridre/5-bromo-4-chloro-3-indolyphosphate
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino
PBST	Tampón fosfato salino más tritón
PFA	Paraformaldehído
RACE	3' rapid amplification cDNA ends
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	Reacción polimerasa en cadena - Transcriptasa reversa
SSC	Citrato salino de sodio
TAE	Tris-acetato-EDTA
UV	Ultra violeta

RESUMEN

Todos los organismos vivos requieren cobre para su crecimiento y normal desarrollo. Por su alto potencial redox, el cobre es un cofactor esencial para una gran variedad de proteínas metabólicas. Debido al escaso conocimiento que se tiene del rol del ion cobre en el desarrollo embrionario de vertebrados, en la presente tesis fueron analizados efectos morfológicos, fisiológicos y moleculares generados por cobre en embriones de pez cebra expuestos al metal. Se determinó que los embriones de pez cebra son sensibles a concentraciones desde 2 μ M de sulfato de cobre presentando problemas de movilidad, edemas pericárdicos y defectos en reacciones frente a estímulos. A nivel molecular, se clonó el gen que codifica para el transportador de alta afinidad Ctr1 (Copper transporter 1) de pez cebra, el cual posee 655 bp, presentando 87 % de similitud y 69 % de identidad con el gen que codifica para el transportador descrito en rata (*rctr1*) y 70 % de identidad con el de humano (*hctr1*). También se analizó la expresión espacio-temporal de *ctr1* durante la embriogénesis. Resultados del RT-PCR muestran una expresión continua del gen desde 0 horas post fertilización (0 hpf) (RNA materno) hasta el pez adulto. También se determinó la expresión del gen *ctr1* en diferentes órganos de pez adulto como agallas, cabeza, ovario e intestino, siendo éste último el que presentaba mayor expresión. Para el análisis espacial se realizó hibridación *in situ* a diferentes estadíos del desarrollo, utilizando una sonda del gen previamente clonado. Con el fin de comenzar estudios funcionales del gen fue perturbado el normal funcionamiento del gen *ctr1* utilizando oligonucleótidos antisentido (morfolinos). Los embriones inyectados presentaron retraso en el desarrollo, reducción del tamaño de cabeza y ojos, necrosis mayoritariamente en la cabeza, y defectos de motilidad.

ABSTRACT

Living organisms require copper for their growth and development. Due to its high redox potential, copper is an essential cofactor for a variety of metabolic proteins while several human diseases are attributed to defects in copper metabolism.

Because little is known about the role of copper in early embryonic development in vertebrates, the morphological, physiological and molecular effects of copper ion exposure on the development of zebrafish embryos have been analyzed in this thesis. Zebrafish embryos are sensitive to concentrations as low as 2 μ M copper ion and the observed effects are retardation in growth, deficiency in motility and in position, pericardic edemas, and failure of the swim bladder to inflate. Cell death was analyzed by staining the embryos exposed to different concentrations of copper with acridine orange. At a molecular level, the zebrafish high-affinity Copper Transporter gene *ctr1* was cloned: a 655 bp fragment was obtained that presented 69 % identity with rat *ctr1* (*rctr1*) and 70 % identity with human *ctr1*, *hctr1*. Spatial and temporal expression of the gene was analyzed during embryogenesis. RT-PCR shows continuous expression of the gene beginning at 0 hours post fertilization (hpf) (maternal RNA), 50% epiboly, 12 hpf, 24 hpf, 48 hpf, 5 days post fertilization (dpf) and adult zebrafish. Expression of *ctr1* in different organs such as gills, head, ovary and gut was detected, being this last organ the one that presents highest expression. For the analysis of spatial expression *in situ* hybridization was performed at different stages of development. The expression of *ctr1* was detected starting at 5 hpf embryos and was found at all stages examined (15, 24, 48 hpf and 4 dpf.). We interfered with *ctr1* gene function using antisense morpholino oligonucleotides. Injected embryos present developmental delay, reduction in the size of head and eyes, necrosis (specifically in the head), and motility dysfunction.

1. INTRODUCCION

Los iones metálicos son elementos vitales para el normal desarrollo de toda célula viva debido a que participan como cofactores en un sinnúmero de reacciones biológicas esenciales para el normal funcionamiento de todos los organismos. Debido a esto, es fundamental que la distribución celular de los iones metálicos sea correcta y precisa, ya que errores en las concentraciones intracelulares pueden causar daño a corto plazo sobre elementos metabólicos vitales, o bien generar daños irreparables que pueden derivar en muerte celular.

En los organismos vivos, la homeostasis de los iones metálicos es finamente regulada por diferentes procesos de incorporación, almacenamiento y secreción, y para esto existe una serie de transportadores en cada compartimiento celular que mantienen un delicado balance en las actividades de transporte a través de las membranas. Una baja actividad en los transportadores de cualquier ion metálico puede generar desregulación en el crecimiento celular o un crecimiento celular limitado, pero a la vez, un exceso en sus funciones puede ser altamente tóxico para la célula. Estudios en transportadores de metales indican una acción coordinada de los sistemas de absorción y secreción para lograr una correcta homeostasis en los tejidos (Peña y col, 1999). En algunos de los organelos celulares y en la membrana plasmática existen transportadores de alta y baja afinidad los cuales funcionan en coordinación para mantener el balance correcto de las concentraciones de los iones metálicos (Heideger, 1997; Eide, 1998; Radinsky and Kaplan, 1999). Por ejemplo, el sistema vacuolar de las células eucarióticas juega un rol esencial en la homeostasis de los

iones metales no sólo porque permite el almacenamiento de éstos, sino también porque provee de la cantidad necesaria de transportadores en las diferentes membranas celulares a través de la vía de secreción. Por otra parte, los organelos que evolucionaron de la endosimbiosis bacteriana (mitocondrias, cloroplastos y peroxisomas) sirven como reservorios vitales de iones y contribuyen al sistema global de regulación homeostática utilizando sus propios sistemas de almacenamiento y transporte (Nelson, 1992; Supek y col., 1997).

Los diferentes iones metálicos pueden agruparse en iones redox activos como Fe^{++} , Cu^{++} , Co^{++} , Mn^{++} , y iones redox no activos como Ca^{++} y Zn^{++} . El calcio y el zinc están destinados a cumplir funciones relacionadas con el metabolismo de DNA ya que la presencia de metales redox activos en lugares como, por ejemplo, el núcleo celular, podrían generar reacciones que terminarían dañando los ácidos nucleicos. Generalmente los iones redox activos cumplen importantes funciones como cofactores de enzimas que participan en reacciones redox y en la conversión de componentes activos que contienen oxígeno.

El ion cobre es un micronutriente esencial para la vida. Debido a que el cobre gana y cede electrones fácilmente, posee propiedades redox únicas que le permiten actuar como cofactor enzimático en una gran variedad de reacciones biológicas. Sin embargo, esta misma propiedad lo hace potencialmente tóxico en condiciones poco controladas. El cobre participa como cofactor enzimático en reacciones tales como la erradicación de radicales libres (superóxido dismutasa), respiración y fotosíntesis (citocromo oxidasa), formación de tejido conectivo (lisil oxidasa), desarrollo neurológico (dopamina β -hidroxilasa), producción de melanina (tirosinasa), coagulación de la sangre (factor V y VIII), y homeostasis de hierro (ceruloplasmina),

entre otras (Tabla.1). El cobre también participa en reacciones no enzimáticas poco estudiadas hasta ahora en procesos como la angiogénesis, la mielinización neural, y la acción de endorfinas. Debido a que las proteínas que requieren cobre participan en una gran variedad de procesos biológicos, la deficiencia en estas enzimas o alteraciones en sus actividades generarían condiciones de extremo riesgo para cualquier organismo vivo.

Tabla 1 Proteínas de unión a cobre. Función biológica y consecuencias de su deficiencia (Peña y col, 1999).

Nombre de la enzima	Función biológica	Consecuencias de deficiencia o defecto
Cu/Zn SOD	Erradicación de radicales libres	Daño oxidativo de componentes celulares
Citocromo C oxidasa	Transporte de electrones en la mitocondria	Deficiencia de ATP: miopatía, ataxia
Lisil oxidasa	Entrecruzamiento de colágeno y elastina	Síntomas de tejido conectivo: Ruptura vascular, torsión
Dopamina β -hidroxilasa	Producción de catecolaminas	Desbalance hipotalámico: hipotermia, hipotensión, deshidratación, somnolencia
Tirosinasa	Producción de melanina	Despigmentación
Peptidilglicina monooxigenasa	Bioactivación de hormonas peptídicas	Mal funcionamiento hormonal
Ceruloplasmina	Ferroxidasa, transporte de Cu	Anemia
F a c t o r de coagulación V y VIII	Coagulación sanguínea	Sangramiento desrregulado
Angiogenina	Formación de la vasculatura	Deficiencia en el desarrollo de la vasculatura
Metalotioneina	Secuestro de cobre	Toxicidad por cobre
Proteína de prion	Reducción de Cu^{2+}	Alteración del ritmo circadiano, variadas enfermedades
Proteína precursora de β -amiloide	Reducción de Cu^{2+}	Enfermedad de Alzheimer familiar
Hepaestina	Salida de hierro del intestino	Anemia ligada al sexo

Para lograr una correcta homeostasis de cobre es fundamental mantener una perfecta relación entre la absorción del metal y la distribución de éste hacia las células de manera que se encuentre disponible en concentraciones adecuadas para realizar los procesos bioquímicos esenciales, previniendo siempre la acumulación a niveles tóxicos, o bien por el contrario, el déficit del metal disponible. Para esto existe una amplia red de mecanismos moleculares que permiten a la célula mantener el control de este proceso. Las primeras nociones que se tuvieron en la identificación de componentes celulares que presentaban roles esenciales en la homeostasis de cobre, fueron derivados de estudios en sistemas modelos como son las bacterias y las levaduras. A pesar de que los mecanismos no son completamente conservados entre especies, una observación sorprendente es que las proteínas relacionadas con el transporte del ion cobre comparten lo que puede ser considerado como dominios funcionales modulares. La identificación de proteínas transportadoras de cobre en sistemas modelos ha llevado a descubrir sus homólogos en mamíferos, o bien ha permitido dilucidar el funcionamiento de éstas proteínas en el proceso de transporte de cobre. Estudios en organismos procariontes han entregado información fundamental acerca del transporte vectorial del ion cobre, y han abierto el campo de trabajo para la identificación y entendimiento de los homólogos funcionales en células eucariontes.

En organismos eucariontes, el transporte y la distribución intracelular del ion cobre ha sido ampliamente estudiado en la levadura de la cerveza, *Saccharomyces cerevisiae*, debido a que se conoce la totalidad de su genoma, y debido también a la facilidad con la que se pueden aislar y estudiar mutantes que presenten problemas en el transporte de cobre. La Figura 1 resume el modelo de absorción de cobre en

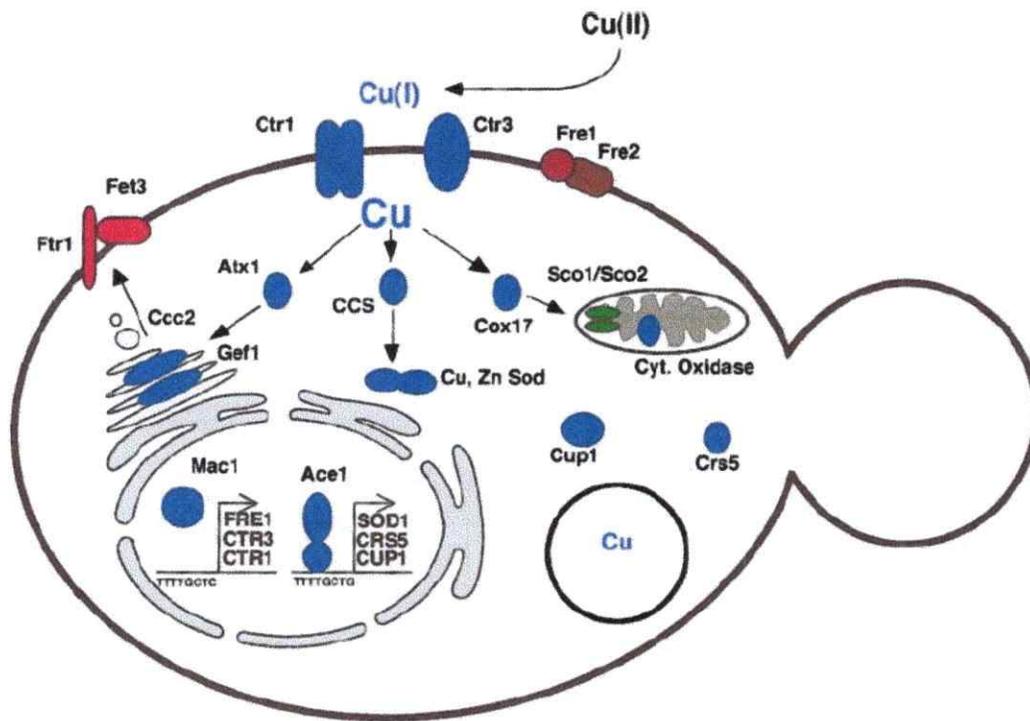


Figura 1 Esquema del transporte y distribución de cobre en *Saccharomyces cerevisiae*. El cobre es reducido de Cu (II) a Cu (I) por las reductasas de membrana Fre1/Fre2 antes de ser internalizado a la célula. La absorción de alta afinidad es llevada a cabo por las proteínas Ctr1 y Ctr3. Una vez dentro de la célula, el cobre es unido a las chaperonas citosólicas Atx1, Cox17 y CCS, las cuales lo entregan a la vía secretoria, a la mitocondria y a la Zn, Cu superoxido dismutasa, respectivamente. La proteína de la vía secretoria Ccc2 acepta cobre de Atx1 y la incorpora a la ferroxidasa multicobre Fet3, la cual forma un complejo con la permeasa de hierro Ftr1, siendo este complejo el responsable de la absorción de alta afinidad de hierro en la membrana plasmática. En la mitocondria los iones cobre entregados por Cox17 son incorporados a este organelo a través de la proteína de membrana Sco2, y luego integrado a la citocromo c oxidasa.

levadura, su distribución y detoxificación. A excepción de los factores de transcripción metaloreguladores Ace1 y Mac1 (Koch y col., 1997, Winge 1998), todos los genes relacionados con la homeostasis de cobre que han sido identificados en levaduras presentan sus homólogos en humano, validando así la importancia de las levaduras como organismo modelo para el entendimiento del metabolismo de cobre y la posible conservación de los mecanismos homeostáticos en eucariontes. Si bien no se han determinado todos los mecanismos de absorción de cobre en levaduras, estudios genéticos han comenzado a entregar importante información acerca de proteínas relacionadas en este proceso. Ya sea antes o durante la absorción de cobre, el Cu (II) es reducido a Cu (I) por una o más reductasas de membrana Fe (III)/Cu (II) codificadas por los genes FRE1 al FRE7. (Georgatsou y col., 1997, Hassett and Kosman 1995) (Fig.1). Cuatro de estos siete genes FRE (FRE2-6) son regulados transcripcionalmente por hierro a través del factor de transcripción Aft1 el cual responde a Fe, mientras que los otros dos (FRE1 y FRE7) son transcripcionalmente regulados por cobre a través del factor de transcripción Mac1 (Martins y col., 1998). Consistente con el rol en la reducción de Cu (II) y Fe (III) y con su requerimiento para la absorción de ambos metales, el gen FRE1 es regulado por ambos factores de transcripción, Mac1 y Aft1, en respuesta a cobre y a hierro, respectivamente.

Ya sea posteriormente o durante la reducción, el Cu (I) es entregado a los transportadores de cobre de alta afinidad asociados a la membrana, codificados por los genes CTR1 y CTR3 (Dancis y col., 1994a, Knight y col., 1996), los cuales ingresan el ion intracelularmente. No está claro si la transferencia del ion Cu (I) ocurre a través de un acoplamiento directo entre las metaloreductasas codificadas por

los genes FRE y los transportadores Ctr1 y Ctr3 en la membrana plasmática, seguido por la entrega del ion al citosol, o bien que existan moléculas intermediarias que sirvan como transportadoras del ion reducido. La absorción de cobre por los transportadores Ctr1 y Ctr3 es específica y es saturable presentando un Km de $1-4 \times 10^{-6}$ M, determinado por estudios realizados con ^{64}Cu en células de levadura (Lin y Kosman, 1990). Las primeras descripciones del transportador de membrana Ctr1 se realizaron en estudios de mutantes de levadura deficientes en el transporte de hierro, lo cual tiene relación con el nexo que existe entre ambos metales (ver reseña Figura 1). Una alteración cromosomal del gen CTR1 de *Saccharomyces cerevisiae* genera variados fenotipos asociados con la pérdida de absorción de cobre como son por ejemplo, disminución del crecimiento en medio pobre en cobre, deficiencia en la cadena respiratoria (debido a la incapacidad de entregar cobre a la citocromo C oxidasa), sensibilidad al estrés oxidativo (debido al déficit de cobre en la superoxido dismutasa), incapacidad de transportar hierro (debido a la inhabilidad de proveer de cobre a la ferroxidasa multicobre Fet3 requerida para la absorción de alta afinidad de hierro), entre otras. La proteína Ctr1 de levadura posee 406 aminoácidos con tres dominios transmembrana, presentando en el dominio N-terminal extracelular variados motivos MXM y MXXM (siendo M metioninas y X cualquier aminoácido). El dominio carboxilo terminal contiene repetidas cisteínas, fenilalaninas y tirosinas, los cuales son potenciales ligandos de metales. Recientemente, fue descrita la importancia de motivos de metioninas conservadas presentes en el dominio N-terminal de la proteína de levadura, proponiendo que juegan un rol importante en la absorción celular de cobre en situaciones limitantes del metal. Un hecho interesante es que a niveles de cobre en el medio que superen la Km de Ctr1, se desencadena

rápida degradación específica del transportador en la membrana plasmática (Ooi y col., 1996). Estudios con líneas mutantes de levaduras que presentan defectos en las vías endocíticas y en degradación vacuolar, sugieren que éste proceso no requiere de la internalización de Ctr1 o de su entrega a las vacuolas, donde ocurre normalmente la degradación proteolítica, si no más bien se habla de una proteasa de membrana, la cual lleva a cabo la degradación de Ctr1 en la misma membrana plasmática. Se ha reportado que a altas concentraciones de cobre extracelular (10 μM), Ctr1 sufre endocitosis estimulada por cobre, lo que podría jugar un importante rol en la absorción del metal, o bien, en la reducción de la cantidad de Ctr1 en la membrana plasmática bajo concentraciones potencialmente tóxicas del ion.

Absorción de cobre en mamíferos.

La complejidad en la absorción de cobre de los sistemas mamíferos se basa en la necesidad de absorber el metal desde la dieta y distribuirlo a través de los diferentes tejidos del cuerpo. La Figura 2 describe de manera resumida el conocimiento que se tiene del proceso de absorción de cobre y de su distribución en humanos a nivel celular. Se estima que en humanos el requerimiento diario de cobre por persona adulta es de 0.6-1.6 mg (Contribución en Chile de cobre en el agua por persona/día: 1-2.5 mg/l), (Peña y col, 1999, Lagos G y col, 2002).

En organismos superiores, el cobre de la dieta es absorbido a través de células de la mucosa del estómago e intestino delgado (Crampton y col. 1965, Van Campen 1965). Los detalles de este proceso no han sido completamente dilucidados, pero se ha propuesto que el cobre difunde a través de la capa de mucosa que cubre la pared intestinal (Linder y col. 1991). Sin embargo, teniendo presente lo refinado del

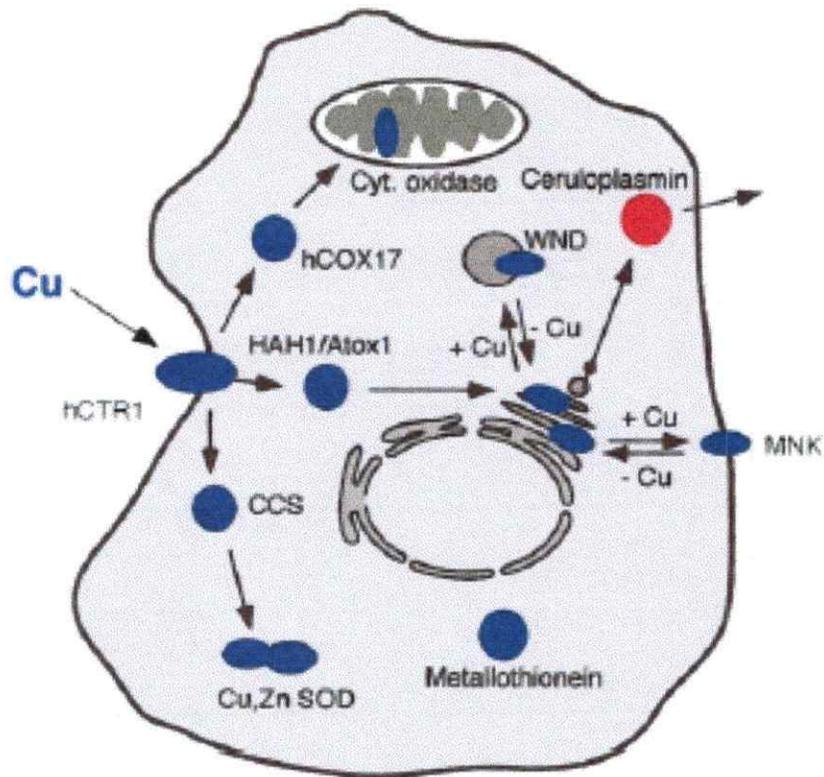


Figura 2 Metabolismo de cobre en humanos. Modelo de absorción y distribución de cobre en humanos a nivel celular. La obtención de cobre por los tejidos es mediada por hCTR1. Una vez internalizado a la célula, el cobre es tomado por las chaperonas citoplasmáticas (CCS, hCOX17, HAH1) las cuales lo distribuyen a las SOD, a la mitocondria y a las vías de secreción, respectivamente, donde es incorporado a las proteínas que lo requieran.

proceso de internalización de cobre en levaduras, es poco probable que solo la difusión cumpla con el proceso completo. En 1997, se identificó una secuencia humana de DNA (cDNA) homóloga al transportador de alta afinidad CTR1 de levaduras, denotado hCTR (Zhou y col, 1997). Este gen se obtuvo a partir de complementación funcional de levaduras defectuosas en la respiración que presentaban deficiencia en el transporte de cobre ya que tenían inactivados genes de los transportadores Ctr1 y Ctr3. hCtr1 es una proteína de 190 aminoácidos la cual presenta una alta homología con Ctr1 y Ctr3 de levadura, lo cual sugiere que los transportadores Ctr de mamíferos pueden haber evolucionado de cualquiera de los dos, Ctr1 o Ctr3. Análisis de RNA blotting han demostrado expresión de hCTR1 en todos los órganos y tejidos examinados, presentando alta expresión en hígado, corazón y páncreas, expresión intermedia en intestino y baja en músculo y cerebro.

El escaso conocimiento que se tiene acerca del funcionamiento preciso de la homeostasis de cobre en vertebrados induce a buscar nuevos modelos de estudio que faciliten el avance en esta área de conocimiento. Por largo tiempo los peces han sido utilizados como organismos experimentales para el estudio de elementos químicos en agua, lo que los hace interesantes modelos para el estudio de la homeostasis de metales. Para el proceso de absorción de cobre, los peces poseen dos órganos que cumplen con esta función: las agallas y el intestino (Bury y col, 2002). La absorción del ion cobre desde el agua ocurre exclusivamente por las agallas donde es finamente regulada. Debido a esto es posible generar condiciones de exceso y deficiencia modificando los niveles de cobre disuelto en el medio y entregado en la dieta. Por otra parte, se han identificado proteínas involucradas en el proceso de regulación de cobre en peces que tienen sus homólogos en mamíferos, los cuales cumplen

funciones equivalentes (Donovan y col. 2002). Particularmente, el pez cebra (*Danio rerio*) es uno de los modelos vertebrados experimentales más poderosos tanto para estudios genéticos como para estudios de desarrollo embrionario. Estos peces son extremadamente fértiles, obteniéndose fácilmente cien a doscientos huevos por cruce, lo que permite realizar experimentos con grandes cantidades de individuos. Ya al quinto día post fertilización (5 dpf), las larvas han desarrollado todos los órganos y poseen casi todas las propiedades fisiológicas de un pez adulto. Debido a que los embriones son translúcidos, es posible observar el desarrollo por medio de una lupa simple. Son fáciles de mantener y hasta el día 10 post fertilización no requieren ser alimentados, lo que es importante cuando se quiere tener control de las cantidades de cobre u otros elementos disponibles en el momento de analizar, por ejemplo, parámetros en respuesta a diferentes concentraciones de cobre. Otra gran ventaja del pez cebra es la reciente secuenciación casi completa de su genoma, lo cual facilita de gran manera el análisis genético.

La presente tesis contiene dos partes; la primera consistente en el análisis de los efectos directos que tiene el ion cobre sobre embriones de pez cebra y de que manera el metal influye en su normal desarrollo. La segunda parte consiste en un trabajo molecular enfocado al clonamiento y a la caracterización funcional del transportador de alta afinidad Ctr1 (Copper Transporter 1) de pez cebra. Ambos objetivos generales tiene como finalidad aumentar el conocimiento de la regulación homeostática del ion cobre en éste y otros organismos.

Hipótesis: Existe un transportador de cobre en el pez cebra el cual es esencial y homólogo al gen *ctr1* de alta afinidad descrito en mamíferos. Debido a la importante función que tiene este transportador en los diferentes organismos, una alteración en la expresión o funcionamiento del gen sería letal para embriones o larvas del pez cebra.

Objetivos específicos:

- Análisis de los efectos directos que tiene el ion cobre sobre embriones de pez cebra.
- Clonamiento del transportador Ctr1 de pez cebra.
- Determinación de la estructura genómica del gen *ctr1* y su ubicación en el genoma del pez.
- Expresión espacio-temporal del gen *ctr1* de pez cebra.
- Análisis de los efectos que genera una disminución o pérdida de la expresión del gen *ctr1* en embriones de pez cebra.

2.1 MATERIALES

2.1.1 Material biológico

Para realizar los experimentos descritos en esta tesis se utilizaron embriones de pez cebra (*Danio rerio*, Telostei, Cyprinidae), obtenidos de forma natural, realizando cruces de peces adultos. Los peces se mantienen en acuarios con circulación constante de agua y aire a una temperatura de 28°C con un ciclo de 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad. Son alimentados tres veces al día y monitoreadas sus condiciones de temperatura y pH. Para realizar cruces, se deben separar los machos de las hembras una noche antes y juntarlos la mañana siguiente en el momento en que la luz del vivero se enciende a las 9:00 am. De esta manera, es posible controlar el momento de la fertilización. La edad de los embriones es expresada en horas post-fertilización (hpf) y días post fertilización (dpf). Los peces se colocan en estanques pequeños provistos de una rejilla que impida el acceso de los peces adultos a sus huevos para evitar así que se los coman. Los embriones se mantienen en incubadores a 28°C y en medio E3 1X el cual evita el crecimiento de hongos debido a que contiene azul de metileno.

2.1.2 Reactivos para Biología Molecular

- Acetato de Sodio 3 M pH 5.2, Winkler Ltda., Chile.
- Agarosa, Winkler Ltda., Chile.
- Agua sin nucleasas, Winkler Ltda., Chile.
- Blocking reagent (BMB), Roche, Alemania.

- Cloroformo: Alcohol iso-amílico 24:1, Winkler Ltda., Chile.
- Cloruro de cobalto, Winkler Ltda., Chile.
- dGTP Ext. Mix, Amersham Pharmacia Biotech, Inglaterra.
- Dicromato de sodio y de potasio, Merck, Alemania.
- Dig-HighPrime, Roche, Alemania.
- DNAsa, Boehringer, Mannheim, Alemania.
- DTT 0.1 M, Amersham Pharmacia Biotech, Inglaterra.
- EDTA 0.5 M pH 8, Winkler Ltda., Chile.
- Enzimas de restricción: SacI, SacII y sus tampones respectivos pertenecen a MBI Fermentas.
- Enzimas polimerasas T7, T3, Sp6, MBI, Fermentas.
- *Escherichia coli* DH5 α competentes (stock de laboratorio).
- Etanol, Merck, Alemania.
- Fenol: Cloroformo básico, Winkler Ltda., Chile.
- Isopropanol, Merck, Alemania.
- LiCl 10 M, Winkler Ltda., Chile.
- MgCl₂ 50 mM, New England Biolabs, Estados Unidos .
- Naranja de acridina, Merck, Alemania.
- NTPs, MBI Fermentas, Lituania.
- Plasmidio pGEM-T 3Kb, Promega, USA.
- Plasmido pSC2+MT. Turner, D.L y Weintraub, H(1994).
- Partidores:

T7:5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'

F1:5'-ACCATGTCGAGGAGACAACCAT-3'

F3:5'-GGCCACGGAGATCACATGATG-3'

F0:5'-TGCACATTTCTGTGGTTGAACAG-3'

R1:5'-ACCACTTGGATGATGTGAAGAAG-3'

R3:5'-GTTAATGACAGTGTCTGTAATATC-3'

R4:5'-AACATGGATGGCTTCTGAACAAG-3', (genómico)

βacF0: 5'-GTCCCTGTACGCCTCTGGTCG-3' (β-actina)

βacR0: 5'-GCCGGACTCATCGTACTCCTG-3' (β-actina)

- RNAsa (libre de DNAsa), Roche, Alemania.

- RNAsin (inhibidor de RNAsas), Roche, Alemania.

- Silica, Winkler Ltda., Chile.

- Solución de Sulfato de cobre, Merck, Alemania (2, 4, 6, 8, 10, 20, 50, 100, 150 μM).

- Suero de oveja, Gibco, BRL.

- Tampón T4 DNA Ligasa 10x y T4 DNA Ligasa, Biolabs, New England.

- Tampón transcriptasa reversa.

-Tampón de reacción de PCR 10x sin Mg, 50 mM Cloruro de Magnesio, Taq polimerasa y Deoxinucleósidos de trifosfato para PCR, dTTP, dATP, dCTP, dGTP, GibcoBRL, Inglaterra.

- Transcriptasa reversa SUPERScript II.

- Trizol (Total RNA Isolation Reagent), DTT 0.1 M, tampon RT 5X, cloruro de magnesio 25 mM y Superscript II, GibcoBRL, Inglaterra.

- X-gal, Winkler Ltda., Chile.

Reactivos para Hibridación *in situ*

- Anticuerpo Anti-Digoxigenina y NBT/BCIP (Nitro blue tetrazolium chloride/5-bromo-4 -chloro-3-indolphosphate), Roche Diagnostics GMBH, Mannheim, Alemania.
- Formamida, Merck, Alemania.
- Metanol, Merck, Alemania.
- Peróxido de hidrógeno, Merck, Alemania.
- Proteinasa K, Merck, Alemania.
- NBT/BCIP, Boehringer Mannheim, Alemania.
- PFA 4%, J.T. Baker, Phillipsburg, USA.
- SALT (50 ml SALT: NaCl 11.4 g, Tris HCl 14.04 g, 50 ml formamida y 900ml de agua).

Reactivos de Inmunocitoquímica

- Acetona, Merck, Alemania.
- Anticuerpo anti-myc, Santa Cruz Biotechnology, EEUU.
- DAB (30 mg en 100 ml PBS, 0.03 % w/v), Sigma, Saint Louis, EEUU.
- Ig anti-ratón, Amersham, Life Science.
- Solución de bloqueo (20 % suero de bovino, 1% DMSO, 0.3 % Tween-20 en PBS, 0.5% tritón).

Reactivos para inyección

- Rojo de fenol, SIGMA, EEUU.
- Morfolino, antisense oligo *zctr1*, 300nM classic, Gene Tools, LLC; EEUU.

-Danieiu (NaCl 58 mM, KCl 0.7 mM, MgSO₄ 0.4 mM, Ca(NO₃), HEPES pH 7.6 50 mM).

2.1.6 Soluciones

- Acetona, Merk, Alemania.
- EDTA 0.2 M Winkler Ltda, Chile.
- MAB (Acido Maleico 0.1 M; NaCl 0.15 M; pH 7.5).
- MABT (MAB+Tween-20 0.1%).
- Solución blanqueo (5.95 ml de agua destilada, 0.25 ml de SSC20X, 0.5 ml de formamida, 3.3 ml de peróxido de hidrógeno al 30% para 10 ml totales).
- Solución de Hibridación *in situ* (SSC 5X; Heparina 50 µg/mL; RNA de Tórula 500 µg/mL; Tween-20 0.1%).
- PBS (Winkler Ltda, Chile).
- PBST (PBS+Tween-20 0.1%).
- Solución AP (MgCl₂ 50 mM; NaCl 100 mM; Tris 100 mM; Triton-X100 0.2 %; Tween-20 0.2 %; pH 9.5).
- Solución E3 1X (NaCl 5 mM; KCl 0.17 mM; CaCl₂ 0.13 mM; MgSO₄ 0.33 mM; Azul de Metileno 10-5 %).
- Solución Paraformaldehido 4% en PBS.
- SSC 20X (175 g de NaCl, 88.5 g de citrato de sodio, pH 7, para un volumen final de 1l).
- Solución denaturante (Southern blot, 0.5 M NaOH, 1.5M NaCl).
- Solución neutralizante (Southern blot, 0.5 M tris, 1.5 M NaCl, PH 7).

- Tampón de Hibridación 50% formamida (Southern Blot) (12.5 ml SSC 20x, 10 ml de blocking stock solution 10%, 0.5 ml N-laurilsarcosina 10%, 0.1 ml SDS 10%, 6.9 ml de agua destilada y 20 ml de formamida para un volumen final de 1 l).
- Solución de lavado 1 (Southern blot) (SSC 2x, 0.1% SDS); 2 (SSC 0.1x, 0.1% SDS).
- Tampón de lisis (100 mM Tris pH 8, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA y 0.2 % SDS).
- Solución de corrida TAE 50X (242 g de tris base, 57.1 ml de ácido acético glacial y 100 ml de EDTA 0.5 M pH 8 para un volumen final de 1 l).

2.1.7 Otros

- Sistema comercial "Concert Rapid Gel Extraction System", GibcoBRL, Reino Unido.
- Sistema comercial "Concert Rapid PCR Purification Protocol", GibcoBRL, Reino Unido.
- Sistema comercial "Kit 3' RACE" GibcoBRL, Reino Unido.

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Análisis de parámetros morfológicos: embriones de pez cebra expuestos a distintas concentraciones de sulfato de cobre.

Para estudiar el efecto directo que causa un exceso de cobre en el desarrollo de embriones de pez cebra se preparó un stock de 20 mM de CuSO_4 en medio E3, con el cual se hicieron las diferentes diluciones utilizadas en los experimentos. Se obtuvieron huevos recién fertilizados los cuales fueron descorionados manualmente bajo lupa con la ayuda de dos pinzas de disección. Los embriones se dejaron crecer en medio con 2, 4, 8 y 20 μM de CuSO_4 en incubadoras a 28°C, y se observaron durante los primeros 10 días post fertilización, tiempo durante el cual no fueron alimentados con el fin de no introducir variaciones en la concentración de cobre a la cual se encontraba expuesto el embrión. (El tiempo máximo que pueden pasar los embriones sin ser alimentados son 10 dpf. El vitelo les provee los nutrientes hasta el día 5 post fertilización). Se evaluó el desarrollo de vejigas natatorias y alteraciones morfológicas en general.

2.2.2 Detección de necrosis en embriones expuestos a sulfato de cobre

Con el fin de analizar muerte celular en embriones de pez cebra expuestos a diferentes concentraciones de cobre, se crecieron huevos recién fertilizados y previamente descorionados, en medio E3 1X con 2, 4, y 100 μM de sulfato de cobre. Se crecieron aproximadamente 50 embriones en 2 y 4 μM hasta 6 dpf, y otros cincuenta embriones se dejaron crecer hasta 3 dpf en medio sin sulfato de cobre, para

luego exponerlos a 100 μM durante cuatro horas. Luego se les agregó 1 μl de naranja de acridina a 10 ml de medio E3, en el cual permanecieron una hora. Posteriormente se lavaron 3 veces durante 5 minutos cada vez con medio limpio y se fotografiaron los resultados bajo un microscopio estereoscópico de fluorescencia. El naranja de acridina es un compuesto hidrosoluble que se intercala en el DNA de las células muertas, lo cual permite visualizar necrosis en embriones y larvas bajo la luz UV.

2.2.3 Estudios de inducción por cobre de la proteína fluorescente verde bajo el promotor de estrés térmico *hsp70*.

Utilizando la línea transgénica de peces que expresan la proteína fluorescente verde (GFP) bajo el promotor de estrés térmico *hsp70* (Halloran y col., 2000) disponibles en el laboratorio, se expusieron embriones transgénicos a diferentes concentraciones de sulfato de cobre disuelto en el medio con el fin de evaluar efectos del ion relacionados con estrés celular, reflejados por la expresión de la proteína reportera GFP. Embriones de 3.5 dpf permanecieron en medio con 100 μM de cobre durante dos horas a 28°C y luego fueron observados en el microscopio estereoscópico de fluorescencia. Como control negativo se expusieron embriones transgénicos por el mismo período de tiempo a medio libre de sulfato de cobre.

2.2.4 Clonamiento del gen *ctrl* de pez cebra mediante 3'RACE

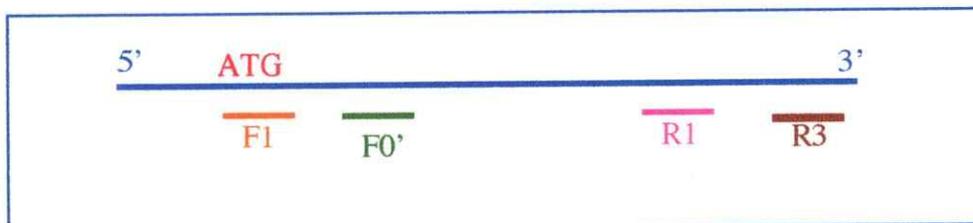
Para realizar el clonamiento de gen *ctrl* de pez cebra se extrajo RNA total de embriones de 48 hpf. Para homogenizar 50 embriones se agregaron 200 μL de trizol. A continuación el homogenizado se incubó durante 5 minutos a 25°C para permitir la completa disociación de los complejos núcleo-proteicos. Para separar las fases se

agregaron 40 μL de cloroformo por cada 200 μL de trizol y se agitó manualmente durante 15 segundos. Luego se incubó a 25°C durante 3 minutos y se centrifugó a 12000 g durante 15 minutos a 4°C. Para la precipitación del RNA se extrajo la fase acuosa y se agregó 0,5 mL de isopropanol por cada 1 mL de trizol y se incubó durante 10 minutos a 25°C. Luego se centrifugó a 12000 g durante 10 minutos a 4°C. Para el lavado del RNA, se eliminó el sobrenadante y se lavó el precipitado con un mínimo de 1ml de etanol al 75 % por cada 1 ml de trizol, se agitó vigorosamente y se centrifugó a 7500 g durante 5 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se mantuvo a temperatura ambiente hasta que el etanol remanente se volatilizó. Finalmente el precipitado de RNA se resuspendió en 20 μL de agua libre de nucleasas. Luego se realizó la medición por espectrofotometría de la cantidad de RNA total extraído. Para esto se utilizaron 2 μl de RNA obtenido en el paso descrito anteriormente y se diluyó en 200 μl de agua sin nucleasas. Se consideró que 1 DO 260nm equivale a 40 μg RNA/ ml. Se realizaron mediciones a 260nm (absorción de ácidos nucleicos) y a 280 nm (absorción de proteínas), para luego obtener un índice de pureza calculado por medio de un cuociente entre los valores de absorbancias obtenidas en ambas longitudes de onda. Se consideró 1.6 como valor aceptable.

Para realizar la transcripción reversa se utilizaron 2 μg de RNA, 2 μL de partidores aleatorios a una concentración de 50 ng/ μL (random primers: partidores de 6 nucleótidos que amplifican fragmentos de DNA de distintos tamaños), 1 μL de dNTPs 10 mM y agua sin nucleasas hasta completar 8 μL . La mezcla se incubó durante 5 minutos a 65°C, luego en hielo durante 1 min., y se agregaron 4 μL de tampón para transcriptasa reversa 5X, 4 μL de cloruro de magnesio 25 mM, 2 μL de DTT 0,1 M y 1 μL de RNAsin. Esta mezcla de reacción se incubó durante 2 minutos

a 25°C, luego se agregó 1 µL de la transcriptasa reversa SUPERSRIPT II y se incubó la reacción de transcripción reversa durante 10 minutos a 25°C, luego a 42°C durante 50 minutos y finalmente a 70°C durante 15 minutos. El volumen final obtenido fue de 20µl. Posteriormente, se llevó a cabo el protocolo de 3`RACE GIBCO para la amplificación de cDNA realizándose PCR anidado doble utilizando los partidores F1 y F3 y el partidador de amplificación universal UAP presente en el kit de RACE. Los partidores F1 y F3 fueron diseñados a partir de una secuencia EST (expressed sequence tag) de pez cebra altamente similar al gen al gen *ctrl* de humano (número de acceso genbank BF717529) presente en la base de datos en Internet (www.ncbi.nlm.nih.org). El producto de PCR, se visualizó en un gel de agarosa al 1 %. Se obtuvo un fragmento de aproximadamente 533 pb el cual fue purificado del gel por medio del kit Concert Rapid Gel Extraction System. Debido a que los productos PCR contienen adeninas en sus extremos, fue posible clonar el producto amplificado utilizando el sistema de TA-Clona en el plasmidio pGem 3Kb (Fig.3a). Luego se transformaron bacterias competentes DH5α y se purificó DNA plasmidial de 6 colonias diferentes por medio de Miniprep. El plasmidio pGEM-T 3Kb contiene el gen de la β galactosidasa, el cual es interrumpido por el fragmento de interés al realizar la ligación, por lo tanto, al crecer las bacterias en presencia de β-galactósido (sustrato de la enzima β galactosidasa), se pueden seleccionar las colonias que integraron el plasmido con el inserto, distinguiéndolas entre colonias blancas (no expresan β galactosidasa por lo tanto presentan el inserto), y las colonias azules que expresan la enzima normalmente. Para confirmar si alguna de las colonias contenía el inserto correcto, se realizó PCR con el partidador T7 del plasmido y R1 presente en el inserto (ver materiales). Se obtuvo una banda de tamaño esperado,

533 pb, en 5 de las 6 colonias. Al DNA de tres de éstas 5 colonias positivas se les realizó extracción fenólica y se mandó a secuenciar automáticamente al Instituto de Tecnología de Massachusetts (MIT) en Estados Unidos. Los resultados de la secuenciación revelaron la secuencia de 533pb la cual presentaba 69 % de identidad con *ctr1* de rata y 70 % con *ctr1* de humano a nivel aminoacídico. El análisis del marco de lectura abierto determinó la ausencia de un segmento en el extremo 5' que incluye la metionina inicial. Para obtener el cDNA completo se diseñaron los partidores F0' y R3'. El partidor F0' fue diseñado según la secuencia de EST mencionada anteriormente y el R3' a partir de la secuencia obtenida en clonamiento aquí descrito. El siguiente mapa muestra las ubicaciones de los partidores utilizados en el clonamiento:



Se repitió el procedimiento de purificación, ligación y transformación de bacterias competentes DH5 α de las cuales se escogieron 10 colonias blancas. Luego de obtener el DNA plasmidial de cada colonia por medio de Miniprep, se realizó doble digestión con las enzimas *SacI* y *SacII*, de manera de sacar el fragmento de tamaño conocido del plasmidio y comprobar que se encontraba en las colonias escogidas (Fig.3a). Una vez comprobado por digestión doble que el inserto de aproximadamente 600 pb se encontraba en el plasmidio, se realizó un Southern Blot con el fin de confirmar con más certeza que el producto obtenido hibridaba con una sonda de la secuencia de 533 pb clonada anteriormente. Una vez obtenido un

resultado positivo del Southern Blot (Fig.3b), se realizó una miniprep, se limpió el DNA por medio de extracción fenólica y se enviaron a secuenciar las colonias 1, 7 y 10 al MIT.

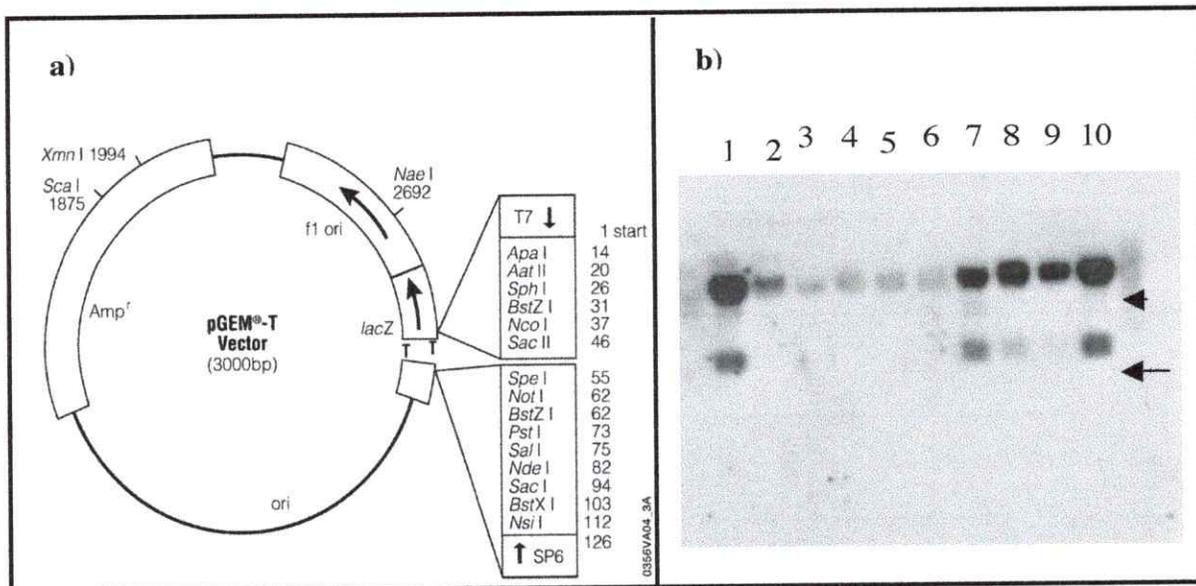


Figura 3 Clonamiento del gen *ctr1* de pez cebra

a) Plásmido pGEM 3000pb en el cual se clonó el gen *ctr1* de pez cebra. Se detalla la zona polilinker en la cual se encuentran los sitios de corte utilizados en el clonamiento. **b)** Fotografía del Southern Blot realizado para confirmar la existencia del inserto de aproximadamente 600pb en el plásmido pGEM. Los números indican las colonias, la cabeza de flecha muestra el plasmido más el inserto y la flecha negra indica el inserto.

2.2.5 Southern Blot

La síntesis de la sonda para realizar el Southern Blot se realizó a partir del fragmento de 533 pb del gen *ctr1* de pez cebra clonado y descrito anteriormente. Se denaturó 1.0 μ g del DNA a 100°C durante 10 minutos. Se enfrió rápidamente en hielo y se agregaron 4 μ l de DIG-High prime, Roche (Tampón de reacción 5X, Glicerol 50%, enzima Klenow 1 unidad/ μ l, mezcla de partidores random 5X, dATP, dCTP, dGTP,

dTTP 1 mM c/u, Dig-dUTP 0,35 mM). Se incubó por 1 hr a 37 °C, y luego se agregaron 5 μ l a 10 ml de tampón de hibridación. Antes de utilizar la sonda, ésta fue denaturada por 10 minutos a 100°C. El protocolo de Southern Blot que se siguió fue el descrito por Sambrook y col., (1987).

2.2.6 Mapeo del gen *ctr1* de pez cebra

Con el fin de determinar la estructura genómica y el cromosoma en el cual se encuentra el gen *ctr1* de pez cebra, se realizó el mapeo con la técnica de paneles híbridos. Estos paneles contienen una colección redundante de fragmentos del genoma del pez cebra. Los fragmentos cromosómicos se obtienen después de irradiar células de pez cebra y fusionarlas con células de hamster. En la colección se encuentran híbridos estables en los cuales está representado el genoma completo del pez cebra (Kwok y col, 1998). Se realizó PCR de 96 muestras de los diferentes fragmentos de DNA genómico del panel, utilizando los partidores F0' y R4. Este último partidor fue diseñado a partir de la secuencia genómica correspondiente al gen *ctr1* descrito recientemente por el proyecto genoma (se escogió un área intrónica de manera de evitar posibles contaminaciones con cDNA obteniendo amplificaciones erradas). Los resultados obtenidos del PCR se analizaron en un gel de agarosa al 2 %, registrándose las bandas que presentaban el tamaño esperado. De esta manera se generó un código binario final donde el 1 representa un resultado positivo (banda de tamaño esperado) y el 0 negativo (ausencia de bandas). De esta manera se obtuvo un número de 96 cifras, el cual se mandó a la base de datos presente en la página www.zfrhmaps.tch.harvard.edu. Automáticamente el programa compara el código ingresado con los códigos de los diferentes marcadores conocidos presentes en la

base de datos. Los resultados obtenidos detallaban específicamente en que cromosoma se encontraba el gen *ctrl* y a que distancia de los marcadores identificados con un valor estadístico (LOD) el cual permite un grado de certeza suficiente si es mayor a 6 (ver recuadro siguiente). La identificación de los intrones y exones se realizó mediante la comparación de la secuencia de cDNA obtenida del clonamiento descrito anteriormente y las secuencias genómicas de pez cebra depositadas en el Instituto Sanger del Reino Unido en la página www.ensembl.org. El proyecto genoma del pez cebra comenzó en Febrero del año 2001, y posee la descripción completa del genoma del pez.

2.2.7 RT-PCR

La extracción de RNA total se realizó a partir de embriones en distintos estadios de desarrollo y de distintos órganos de pez adulto (1 año aproximadamente) los cuales fueron extraídos con bisturí de un pez recién sacrificado. Los órganos utilizados en el experimento fueron agallas, cabeza, ovarios y vísceras. La síntesis del cDNA se llevó a cabo de la manera descrita anteriormente en el clonamiento del gen *ctrl*, con la diferencia de que para 50-100 mg de tejido se utilizó 1 ml de Trizol®.

Reacciones de PCR: Para la amplificación de un fragmento de aproximadamente 600 pb se realizó la siguiente reacción: 79.4 µl de agua libre de nucleasas, 2,5 µl de partidor F0` 10 mM, 2,5 µl partidor R3` 10 mM, 10 µL de tampón 10X de PCR, 3µL de cloruro de magnesio 50 mM, 6 µL de dNTPs 10 mM, 0.5 µL de Taq DNA polimerasa (500u). La reacción se realizó en un volumen final de 100µL. Esta mezcla se separó en tubos de PCR y se agregó 1µl de diferentes templados consistentes en cDNA extraído de embriones de 0, 5, 12, 24, 48 hpf, 2, 5 y 6 dpf, adulto (3 meses), y órganos disectados como branquias, cabeza, ovario e intestino. Se utilizó el siguiente programa en el termociclador de 30 ciclos:

94°C: 2 minutos

92°C: 30 segundos

65°C: 30 segundos

72°C: 1,5 minutos

72°C: 7 minutos

4°C: ∞

Los resultados fueron visualizados en un gel de agarosa al 1% y se tomaron fotos digitales.

Con el fin de comparar de manera simple las intensidades de expresión de *ctrl1* en los diferentes órganos y estadios a partir de este RT-PCR, se amplificó β actina de pez cebra como control de expresión en los diferentes órganos y estadios analizados. La proteína β actina se expresa de manera constante en los diferentes tejidos del embrión. Los partidores utilizados para amplificar β -actina de pez cebra fueron β acF0 y β acR0 (Chen y col, 2002).

2.2.8 Preparación de sonda de RNA para hibridación *in situ*

La sonda de RNA se preparó a partir del gen *ctrl1* correspondiente al fragmento completo de 655 pares de bases clonado y descrito anteriormente. Se linearizó el plasmidio pGEM-T 3.0Kb (Fig 3a) con las enzimas *PstI* y *SacII* para obtener la hebra sentido y antisentido del gen, respectivamente, y se verificó la presencia del DNA digerido mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1 %. Al DNA recién linearizado se le realizó una extracción fenólica para eliminar las proteínas contaminantes. A continuación se procedió a la transcripción *in vitro* de la sonda de RNA marcada con digoxigenina a partir de aproximadamente 1.5 μ g de DNA linearizado, 10 μ L de NTP mix-digoxigenina, 5 μ L de tampón de transcripción 10x, 1 μ L de RNAsin y 90 unidades de la RNA polimerasa T7 ó SP6 según el sentido de la transcripción (se utilizó T7 para hacer la sonda sentido y SP6 para la sonda antisentido). Esta mezcla se incubó durante dos horas a 37°C. Luego se agregaron 5 μ L de DNasa I 10 mg/mL durante 5 minutos y se incubó a 37°C para degradar el resto de DNA que quedó sin transcribir. Se detuvo la reacción agregando 5 μ L de EDTA 0,2M y se precipitó el RNA con 2 μ L de LiCl 10 M y 200 μ L de etanol absoluto durante toda la noche a 20°C. A continuación se recuperó el RNA

centrifugando a 14000 g durante 30 minutos, se eliminó el sobrenadante, se lavó el precipitado con etanol al 70 % y se dejó secar a temperatura ambiente. El precipitado de RNA se resuspendió en 1 mL de tampón de hibridación *in situ*. Las sondas recién sintetizadas se analizaron en un gel de agarosa al 1 % para verificar la presencia del RNA.

2.2.9 Hibridación *in situ*

Los embriones se fijaron en los estadíos de 16 hpf, 24 hpf, 48 hpf, y 3.5 dpf en PFA al 4 % (en PBS) a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente se eliminó el corion manualmente utilizando pinzas de disección. Posteriormente, los embriones se deshidrataron en metanol 100 % durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se realizó un cambio de metanol 100 % y se incubaron a -20°C durante al menos 1 hora (los embriones se pueden almacenar en esta etapa a -20 °C hasta 6 meses). Luego se rehidrataron durante 5 minutos en 75 % metanol/ 25 % PBS, 5 minutos en 50 % metanol/50 % PBS, 5 minutos en 25 % metanol/ 75 % PBS y 4 veces durante 5 minutos en PBS-T. Con el objetivo de eliminar los pigmentos se realizó el blanqueo de los embriones de más de 48 hpf con una solución que contiene 5,95 ml de agua destilada, 0,25 ml de SSC 20x, 0,50 ml de formamida y 3,30 ml de peróxido de hidrógeno al 30 %. Los embriones se incubaron en esta solución 10 minutos expuestos a un tubo fluorescente de luz, la cual permite una reacción de oxidación de los pigmentos por parte del peróxido de hidrógeno. Luego se realizaron tres lavados con PBS-T durante 5 minutos cada uno.

Para digerir las proteínas asociadas al mRNA, los embriones de más de 48 hpf se trataron durante 10 minutos a temperatura ambiente con 25 µg/mL de proteinasa K

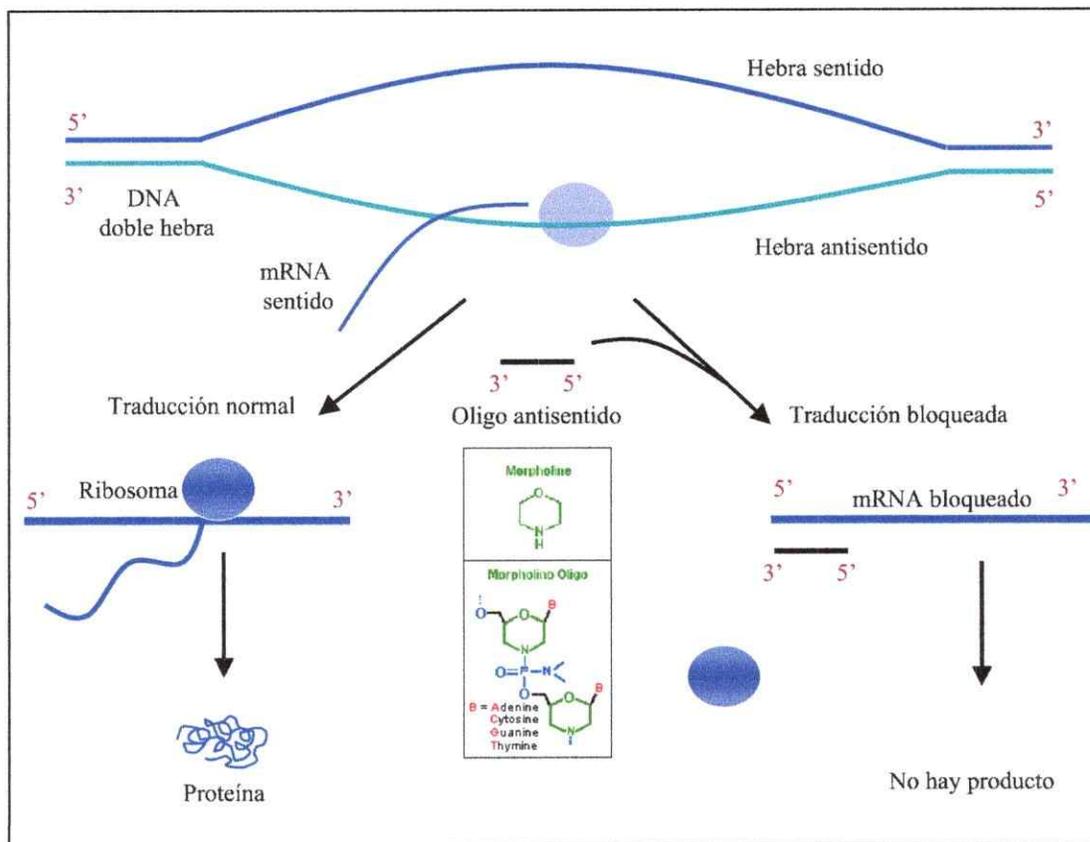
en PBS. Para los embriones entre 24 y 48 hpf se utilizó una concentración de proteinasa K de $10 \mu\text{g/ml}$. Después se realizaron 2 lavados de 5 minutos con PBS-T para detener la digestión. Para volver a fijar los tejidos, los embriones se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente en PFA al 4 % en PBS y luego se lavaron 5 veces durante 5 minutos cada una en PBS-T. A continuación los embriones se incubaron con tampón de hibridación a 65°C durante 10 minutos y luego de hacer un recambio de la solución, se incubó toda la noche. Las ribosondas-DIG fueron previamente denaturadas durante 5 minutos a 65°C para luego incubar los embriones con las sondas toda la noche a 65°C .

Para el lavado de las sondas todas las soluciones se precalentaron a 65°C y luego se incubaron los embriones 10 minutos en formamida/SSC 2X al 75 %, luego durante 10 minutos en formamida/SSC 2X al 50 % y 10 minutos en formamida/SSC 2X al 25 %, 10 minutos en SSC 2X y finalmente 2 veces durante 30 minutos en SSC 0,2X. Con el objetivo de bloquear los sitios inespecíficos, los embriones se incubaron durante 5 minutos en MAB-T, por 1 hora en MAB+BMB+LS a temperatura ambiente y luego de un recambio de la solución se dejaron toda la noche a 4°C . En forma independiente, el anticuerpo anti-digoxigenina (dilución 1:200 en tampón de hibridación) debe guardarse a 4°C mientras los embriones se están bloqueando a 4°C , para luego incubar los embriones durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo anti-digoxigenina. El lavado del anticuerpo se realizó 5 veces durante 20 minutos cada una con MAB-T y 3 veces durante 5 minutos cada una en tampón AP. Finalmente, la tinción de los embriones se realizó con el sustrato de la fosfatasa alcalina NBT/BCIP BM *Purple AP Substrate* en oscuridad y durante el tiempo necesario para que apareciera la tonalidad púrpura esperada en la zona de expresión

del mRNA. Finalmente, se eliminó el exceso de tinción lavando los embriones 3 veces durante 5 minutos en PBS-T.

2.2.10 Morfolinos antisentido del gen *ctrl* de pez cebra

Una vez clonada la secuencia completa del gen *ctrl* de la manera descrita anteriormente, se diseñó un óligo antisentido con el fin de disminuir la expresión del gen a nivel traduccional. Este oligo fue sintetizado por la empresa Gene Tools, LLC, presenta la secuencia: 5'-GGTGATGTGAATGTGACGAATCCAT-3' y en el siguiente esquema se resume su funcionamiento:



Se preparó un stock 10X con 300 nM del oligo en 300 μ l de DANIEAU 1X y 10% de rojo de fenol. El rojo de fenol es un compuesto inerte que permite visualizar la

entrada de la mezcla al ser inyectada directamente al huevo. Se hicieron diluciones 9X, 5X y 1X para encontrar la concentración indicada y evitar efectos inespecíficos. Las inyecciones con morfolidos 9X fueron tóxicas para los embriones y por el contrario, las 1X no generaron efecto detectable. Al inyectar morfolino 5X del gen *ctrl1*, se observaron efectos reproducibles y distinguibles de los controles escogidos, los cuales consistían en embriones no inyectados y embriones a los cuales se les inyectó un oligo control. El morfolino se inyectó directamente en el huevo recién fertilizado en el estadio de una célula. Las inyecciones se realizaron con un microinyector provisto de un micromanipulador.

2.2.11 Síntesis de RNA *ctrl1*-myc de pez cebra

Para realizar la síntesis de RNA sentido de la unión de *ctrl1*-myc se tomaron 2 μ g de DNA del constructo pCS2+MT *ctrl1*-myc y se agregaron: 5 μ l de buffer de transcripción, 5 μ l de RNA Cap, 2,5 μ l de mix de rNTPs 25 mM c/u, 1 μ l inhibidor de RNAasa, 2,5 μ l de DTT 0.1 M y 1 μ l de polimerasa SP6. Luego se incubó la mezcla durante 20 minutos a 37 °C y luego se le agregó 1 μ l de GTP 25 mM y se dejó 100 minutos más a 37 °C. Una vez sintetizado el RNA se corrió 1 μ l de la mezcla en un gel de agarosa 1 % con el fin de verificar la existencia del RNA. Luego se agregó 1 μ l de DNAsa y se incubó a 37°C durante 15 minutos. Luego se precipitó el RNA con 2 μ l de LiCl 5 M más 200 μ l de EtOH durante toda la noche a -20 °C. Se guardó a -80 °C hasta que se utilizó, cuando fue centrifugado a 14000 rpm y resuspendido en 10 μ l de agua sin nucleasas.

2.2.12 Inhibición de la expresión de la proteína Ctr1: MOctr1

Debido a que no hay anticuerpos disponibles contra la proteína Ctr1, se realizó un constructo uniendo la secuencia codificante de *ctr1* de pez cebra a 6 secuencias repetidas myc (codifican para pequeños péptidos de 6 aminoácidos), presentes en el plasmidio pCS2+MT (Fig. 4) las cuales funcionaron como epitopes para el anticuerpo anti-myc. Las enzimas que se utilizaron para el subclonamiento de *ctr1* fueron *BamHI* en el extremo 5' y *Clal* en el 3'. El plasmido fue linearizado con *XbaI* y el RNA sintetizado con polimerasa SP6. Se inyectaron aproximadamente 30 embriones en estadio de una célula con RNA *ctr1-myc* de pez cebra. Otros 30 embriones fueron coinyectados con morfolino 5X y RNA *ctr1-myc*. Se dejaron crecer hasta las 20 hpf en medio E3 en incubadoras a 28 °C y luego fueron descorionados manualmente. Se traspasaron a viales estériles y fueron fijados durante 3 horas en PFA 4% a temperatura ambiente y en agitación. Luego se lavaron en PBS dos veces por 5 minutos, más 5 minutos en agua destilada y 7 minutos en acetona previamente enfriada a -20°C, luego se lavaron 5 minutos en agua destilada, 5 minutos en PBS y 30 minutos en solución de bloqueo. Luego se agregó una dilución de 1/200 del anticuerpo anti-myc de ratón en solución de bloqueo y se incubó durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente se lavó en solución de bloqueo, ocho veces durante una hora cada una. Luego se agregó una dilución de 1/200 del segundo anticuerpo, anti-Ig de ratón. Se incubó durante toda la noche y se lavaron durante todo el día siguiente en solución de bloqueo por una hora cada vez. Para el revelado se preincubó durante 10 minutos en DAB y luego en 200 µl de DAB con 0.05 % de H₂O₂ durante aproximadamente 15 minutos o hasta cuando los embriones se marcaran claramente.

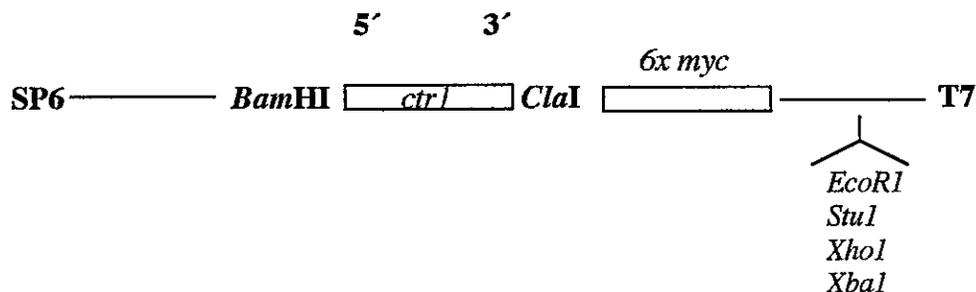


Figura 4 Plásmido pCS2+MT con el inserto de *ctrl* de pez cebra unido a las 6 copias del epítopo *myc*.

2.2.13 Necrosis en embriones tratados con Morpholinos antisentidos

Se realizaron análisis de células necróticas en embriones de 3 dpf previamente inyectados con morfolino *ctrl* con el fin de detectar las áreas del pez más dañadas por el efecto del oligo. La detección se realizó exponiendo a los embriones a 1 μ l de naranja de acridina en 10 ml de medio E3 durante una hora. Luego se lavaron 3 veces por 5 minutos con medio limpio y se fotografiaron bajo lupa de luz UV.

3. RESULTADOS

3.1 Toxicidad de cobre: efectos en el desarrollo embrionario y larval

Los embriones crecidos en medio con diferentes concentraciones de sulfato de cobre fueron analizados durante los primeros 10 días de vida, tiempo durante el cual no fueron alimentados con el fin de no introducir una variable adicional. Los embriones de pez cebra se desarrollan dentro de una membrana proteica llamada corion la cual les sirve de protección. Normalmente, los embriones eclosionan del corion al día 2 post fertilización. Se observó que al exponerlos a concentraciones de cobre en un rango de 2 μM hasta 100 μM desde el momento de ser fertilizados, el 100% de los embriones era incapaz de eclosionar del corion (Fig. 5a). Por lo tanto, en todos los experimentos subsecuentes se realizó decorionación manual de los embriones. El corion es una capa proteica que protege a los embriones de condiciones adversas en los primeros estadios del desarrollo. El hecho de ser decorionados antes de las 48 hpf no presentó ningun efecto dañino aparente para los embriones controles que no fueron expuestos a cobre, por lo que se puede asegurar que no es un parámetro que pueda estar afectando los resultados obtenidos con los embriones expuestos a cobre. Se observaron los embriones bajo la lupa de disección para determinar la presencia de alteraciones morfológicas o conductuales. En general se pudieron detectar múltiples defectos a las concentraciones más altas de cobre (10 μM a 100 μM) mientras que las concentraciones menores (2 μM a 4 μM) los defectos fueron más sutiles, muchos embriones parecen desarrollarse normalmente hasta el día 10. En las concentraciones menores se observó una marcada variabilidad individual en los efectos. Posiblemente esto es debido a una heterogeneidad genética la cual se traduce

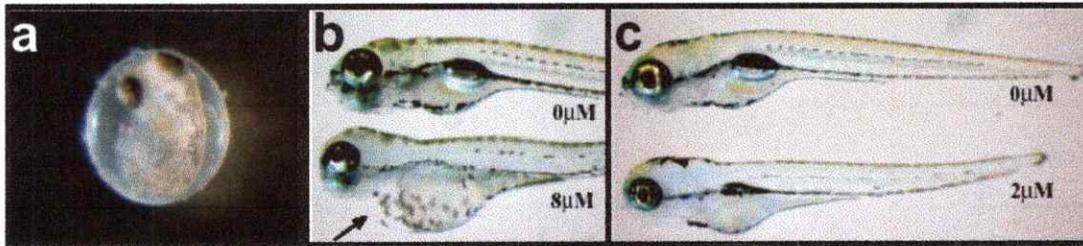


Figura 5 Efectos morfológicos de CuSO_4 sobre embriones de pez cebra
 a). Embrión de 48 hpf en medio E3 1X y $2\mu\text{M}$ de CuSO_4 atrapado dentro del corion,
 b). Embrión crecido en medio E3 con $8\mu\text{M}$ de CuSO_4 (inferior en el panel) y embrión control (superior en el panel). La flecha muestra el edema pericárdico característico de los embriones expuestos a CuSO_4
 c). Disminución en el tamaño corporal y atraso en el desarrollo en peces expuestos a CuSO_4 (en este ejemplo $2\mu\text{M}$) y necrosis evidenciada por las zonas opacas, principalmente en el área cerebral.

en una susceptibilidad diferencial al metal. Uno de los defectos más recurrentes observados en embriones expuestos a las concentraciones más altas de cobre fueron edemas pericárdicos (flecha en Fig.5b). Los edemas se producen secundariamente como consecuencia de un defecto en la circulación sanguínea, lo cual termina por ser fatal para el embrión en un corto plazo. También se observó disminución en el tamaño corporal de los embriones, necrosis generalizada, problemas en motilidad y reacción frente a estímulos (Fig.5c).

La vejiga natatoria es un órgano que en los peces permite mantener una correcta línea de flotación. En el pez cebra, se forma al día 5 post fertilización. Cualquier perturbación en el desarrollo del embrión impide la formación o el inflado de la vejiga natatoria, lo cual puede ser utilizado como el parámetro de mayor sensibilidad para detectar defectos en el desarrollo. Debido a que la presencia de vejigas natatorias constituye la característica más adecuada para definir un embrión sano, se usó este parámetro para medir cuantitativamente el efecto del cobre en el desarrollo. Se evaluó la presencia de vejigas natatorias normales en embriones de 5 dpf

expuestos a diferentes concentraciones de CuSO_4 . Todos los experimentos se repitieron tres veces con aproximadamente 80 embriones para cada ensayo, de manera de obtener diferencias estadísticamente significativas. Se cuantificó la presencia de vejigas normales para cada concentración del metal, incluyendo como control embriones del mismo cruce crecidos en medio sin sulfato de cobre. Se calculó un promedio del número de vejigas normales obtenidas para cada concentración el cual se graficó expresando % de vejigas normales v/s concentración de cobre (Fig.6). También se calculó el error estándar de los valores obtenidos según la formula $Er = \pm \sigma/\sqrt{n}$. Los resultados indican que al aumentar la concentración de sulfato de cobre en el medio, el porcentaje de embriones con vejigas natatorias normales disminuye. A partir de los datos obtenidos, se puede concluir que a concentraciones de cobre mayores a $10 \mu\text{M}$, la sobrevivencia de los embriones de pez cebra es cero.

Tabla 2 Valores % vejigas normales v/s CuSO_4 [μM]

CuSO_4 [μM]	% vejigas normales				
	X	Y^1	Y^2	Y^3	Promedio
0		84	87	85	85.33
2		40	29	27	32
4		23	11	28	20.66
8		18	3	19	13.33
20		0	0	0	0

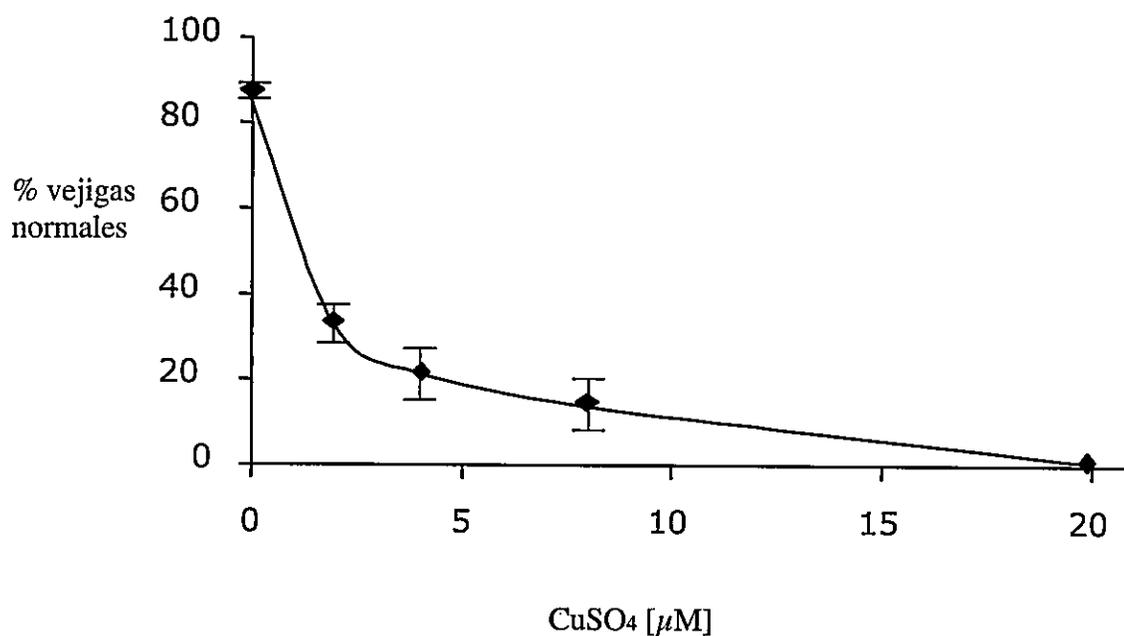


Figura 6 Gráfico concentración de CuSO_4 v/s porcentaje de vejigas normales. Los embriones fueron expuestos a las diferentes concentraciones de CuSO_4 (tabla 2). El gráfico presenta el porcentaje de embriones con desarrollo normal de vejigas natatorias en las diferentes concentraciones de cobre. Existe una relación inversamente proporcional entre el aumento de la concentración de CuSO_4 y el porcentaje de vejigas normales.

3.2 Respuesta a estrés inducida por cobre en embriones de pez cebra.

Para determinar si el cobre presente en el medio extraembrionario tiene acceso a los distintos órganos y es capaz de aumentar la concentración de cobre intracelularmente, se hicieron experimentos con la línea transgénica *hsp70-gfp*.

Existen antecedentes que uno de los grupos de proteínas que se expresan como respuesta a estrés por varios metales son las proteínas Hsp (Boeck y col, 2003).

Se expusieron embriones transgénicos *hsp70-gfp* a 100 μM de CuSO_4 durante 2 horas a 28°C y se comprobó que el CuSO_4 disuelto en el medio de incubación genera un efecto directo sobre la expresión génica en los embriones de pez cebra tratados. Los embriones que se crecieron en presencia del metal presentaron una alta expresión de GFP comparado con animales controles (Fig.7). Estos resultados indican una respuesta de estrés de las larvas frente a la presencia de CuSO_4 evidenciada por la activación del promotor *hsp70* y la consecuente expresión de la proteína fluorescente verde. La expresión de la proteína se distribuyó principalmente en los somitos y en los ojos. Los embriones controles fueron crecidos en medio E3 1X sin CuSO_4 , observándose expresión basal GFP en el cuerpo del embrión.

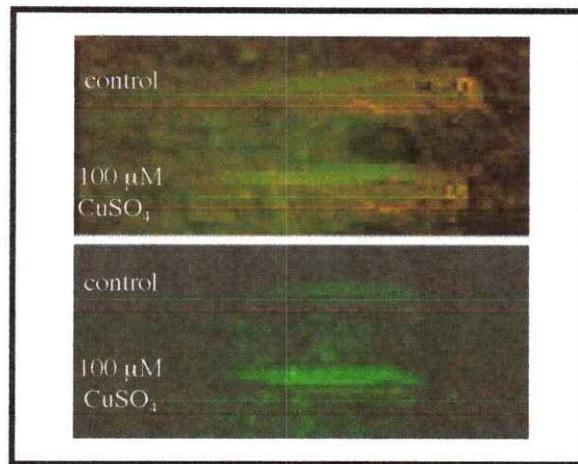


Figura 7 Larvas transgénicas *hsp70-gfp* de 3.5 dpf expuestas a 100 μM de CuSO_4 . En panel superior se ven las larvas controles (arriba) y las expuestas a CuSO_4 (abajo) con algo de luz para dar la referencia del cuerpo. La cabeza está hacia la derecha. El panel inferior muestra las mismas larvas en oscuridad bajo luz UV.

3.3 Necrosis en embriones de pez cebra: naranjo de acridina (NA)

Debido a que en concentraciones altas de cobre se observa opacidad en los embriones tratados y aparente necrosis, se realizaron observaciones de embriones tratados con NA la cual permite visualizar células necróticas.

Se realizaron tres experimentos donde se expusieron huevos recién fertilizados a diferentes concentraciones de sulfato de cobre. Un grupo fue incubado durante 6 días en medio con 2 μM de CuSO_4 , otro durante 6 días en 4 μM y un tercer grupo durante cuatro horas a 100 μM en estadio 5 dpf. Luego se expusieron a medio con naranjo acridina durante 1 hora y se analizaron bajo microscopio de luz UV. Los embriones expuestos a 2 μM de CuSO_4 presentaron fluorescencia en el área intestinal

y en la mandíbula inferior. Los embriones que crecieron en $4 \mu\text{M}$ de CuSO_4 presentaron mayor intensidad de fluorescencia que las observadas con $2 \mu\text{M}$ de CuSO_4 , siempre en las mismas regiones de la larva (Fig. 8). Las larvas que permanecieron cuatro horas en $100 \mu\text{M}$ de CuSO presentaron fuerte fluorescencia en la zona intestinal, en la mandíbula inferior y en los músculos. La intensidad de fluorescencia de las larvas en este último experimento es notoriamente mayor que los observados con 2 y $4 \mu\text{M}$ de CuSO . De este experimento se puede deducir una directa relación entre el aumento de la necrosis de las larvas con respecto al aumento de la concentración de CuSO a la cual se encontraron expuestos.

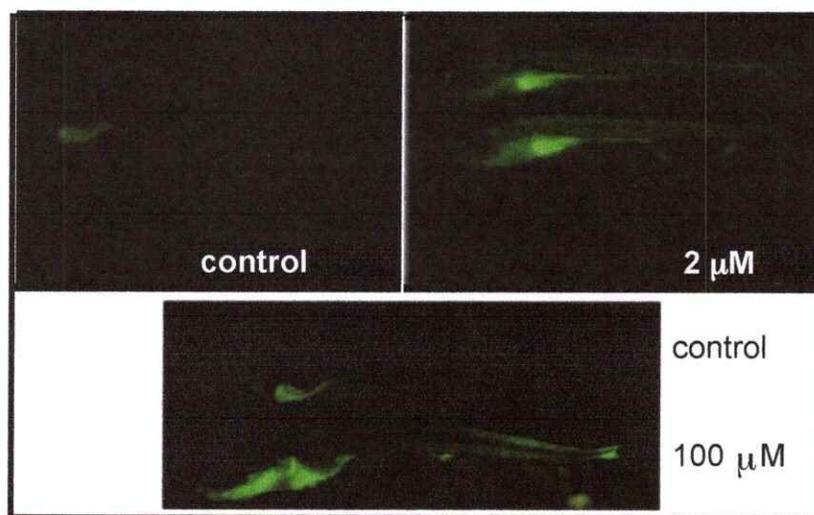


Figura 8 Necrosis en embriones expuestos a diferentes concentraciones de CuSO_4 visualizada con naranja de acridina. En el panel superior se muestran dos embriones controles no expuestos a CuSO_4 y dos embriones expuestos a $2 \mu\text{M}$ del metal. Nótese la diferencia en intensidad de fluorescencia en los embriones tratados en comparación con los controles. El mismo efecto se puede ver de manera más evidente en el panel inferior donde se muestra un embrión expuesto a una mayor concentración de CuSO_4 comparado con uno control.

3.4 Clonamiento del gen *ctr1* de pez cebra

Con el fin de realizar estudios genéticos utilizando el transportador de alta afinidad *ctr1* de pez cebra, se clonó su secuencia completa descrita anteriormente solo de manera parcial en éste organismo. Para esto se sintetizó cDNA a partir de RNA extraído de embriones de 48 hpf. Se realizó PCR anidado con el cual se obtuvo un producto de aproximadamente 650 pb, el cual fue purificado y subclonado en un vector pGEM-T. Luego de confirmar por medio de PCR y Southern Blot la presencia del inserto en el DNA de las colonias positivas, los clones se secuenciaron automáticamente. El producto clonado corresponde a un fragmento de 655 pb el cual codificó para una proteína putativa de 188 aminoácidos (número de acceso Genbank AY077715), que presenta una identidad de 69% y 70% con *ctr1* de rata y *ctr1* de humano respectivamente. El análisis de estructura de la proteína se realizó con el programa Toppred prediction (<http://bioweb.pasteur.fr>). Los resultados indicaron que la proteína Ctr1 de pez cebra presenta tres dominios transmembrana (DTM) de 21 aminoácidos cada uno. Estos resultados coinciden con las regiones predichas para las proteínas homologas descritas previamente de levadura, ratón y humano. (Puig y col., 2002, Lee y col., 2000, Moller y col., 2000). La región amino terminal presenta 64 aminoácidos y la cola carboxilo terminal solo 4 aminoácidos (Fig.9).

3.5 Identificación del locus genómico y de la estructura genómica del gen *ctr1* de pez cebra

Con el fin de conocer la estructura genómica del gen *ctr1* de pez cebra se realizaron experimentos que permitieron identificar en que cromosoma se encuentra ubicado el

```

zCtr1  --MDSSSHSHHHVEETTTPSPASGDHGGHLTTTGNGHG----DHMMMMQMTFYFGYKNVEL  54
hCtr1  ----MDHSHHMGSYMSDNSSTMQPSHHHPPTSASHSHGGDSSMMMMPMTFYFGFKNVEL  56
rCtr1  MRMNHMEMHHMGMNHTDDNITMPP-HQHPTTSASHSH-----EMMMPMTFYFGFKNVDL  53
      **                *  *                ***  *  *  *  *  *  *  *  *

zCtr1  LFAGLVINTPGEMAGACIGVFLAVLYEGLKIGREVLRLRNQVNVRYNSMPVPGSDGTVL  114
hCtr1  LFSGLVINTAGEMAGAFVAVFLLAMFYEGLKIARESLLRKSQVSI RYNSMPVPGPNGTIL  116
rCtr1  LFSSLVINTPGEMAGAFVAVFLLAMFYEGLKIAREGLLRKSQVSI RYNSMPVPGPNGTIL  113
      **  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *
                    DTM 1

zCtr1  METHKTVGQRMLSMAHFLQTLLHI IQVVVSYFLMLVFMTYNGYLCIAVAAGAGLGYFLFS  174
hCtr1  METHKTVGQQMLSFPHLLQTVLHI IQVVISYFLMLIFMTYNGYLCIAVAAGAGTGYFLFS  176
rCtr1  METHKTVGQQMLSFPHLLQTVLHI IQVVISYFLMLIFMTYNGYLCIAVAAGAGTGYFLFS  173
      *****  *  *  *****  *****  *****  *****  *****
                    DTM 2                                DTM 3

zCtr1  WKKAVVVDITEHCH  188
hCtr1  WKKAVVVDITEHCH  190
rCtr1  WKKAVVVDITEHCH  187
      *****

```

rCtr1/zCtr1

Identidad 130/188=69%

hCtr1/zCtr1

Identidad 132/188=70%

Figura 9 Secuencia proteica deducida del gen *ctrl* de pez cebra (zCtr1) alineado con los ortólogos de rata (rCtr1) y humano (hCtr1). Los asteriscos muestran identidad entre las secuencias y en rojo metioninas conservadas entre las especies que tienen importancia funcional. En azul se muestran los dominios transmembrana (DTM). En la parte inferior de la figura se encuentran indicados los porcentajes de identidad de las secuencias.

gen y su estructura genómica. Para esto y utilizando la técnica de paneles híbridos se determinó el locus genómico del gen *ctrl* de pez cebra. El gen se encuentra en el brazo largo q del cromosoma 5 entre los marcadores 'z5538' y 'fa12a02.s1' (Fig.10c) (LOD score promedio 11.23). Se obtuvo también la secuencia genómica completa de *ctrl* a partir de las secuencias depositadas en el sitio www.ensembl.org. El procedimiento fue introducir la secuencia codificante del gen *ctrl* de pez cebra a la base de datos, la cual arrojó cuatro clones genómicos (números de acceso z06s063909, z06s000695, z06s010442, z06s050234) que presentaron identidad con la secuencia del cDNA clonada. Mediante la comparación directa de las secuencias

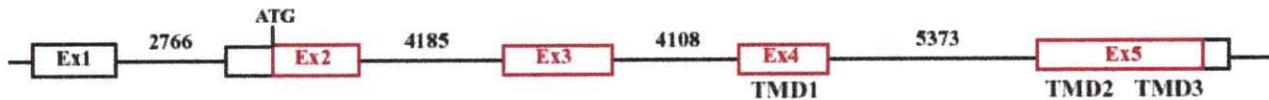
se determinó que el gen *ctrl* de pez cebra contiene cuatro intrones y cinco exones. Estos últimos de un tamaño de 164 pb, 140 pb, 73 pb, 130 pb, y 241 pb respectivamente (Fig.10 a,b). Cada clon genómico contenía un exon diferente, a excepción del segundo clon descrito el cual contiene los exones 2 y 3. El codón que codifica para la metionina inicial se encuentra en el exón 2 ya que el exon 1 no posee secuencia codificante. El primer dominio transmembrana de la proteína está codificado en el exon 4, y los dominios dos y tres en el exon 5. El análisis de las secuencias intrónicas demostró que se cumple invariablemente la regla GT-AG de los dadores y aceptores de empalme, como se puede ver en la figura 10 b. En la figura 11 se comparan las asecuencias genómicas del gen *ctrl* pez cebra con la obtenida del gen *ctrl* de humano.

3.6 Expresión del gen *ctrl* de pez cebra detectada por RT-PCR

Con en fin de analizar expresión temporal del transportador *ctrl* en embriones de pez cebra y saber en que órganos se encuentra en adultos, se realizaron estudios de RT-PCR.

Los resultados obtenidos de la amplificación del gen *ctrl* en diferentes estadios embrionarios muestran que el gen se expresa desde el comienzo del desarrollo, desde 0 hpf (huevos recién fertilizados), indicando una contribución materna de mRNA de *ctrl* al cigoto. Se observa una expresión continua en el tiempo pasando por los estadios de 5 hpf, 12 hpf, 24 hpf y 48 hpf, y pez adulto (Fig.12a). Se analizó también la presencia de mRNA del gen en diferentes órganos de pez adulto. Para esto se realizó un RT-PCR con RNA de branquias, cabeza, ovario y vísceras, extraídos de

a)



b)

Exon1...TGGgtga...Intron1...taagCAT....Exon2
 Exon2...ATGgtga...Intron2...gcagCAA...Exon3
 Exon3...GAGgtga...Intron3...gtagAGA...Exon4
 Exon4...CGGgtca...Intron4...ccagCCA....Exon5

c)

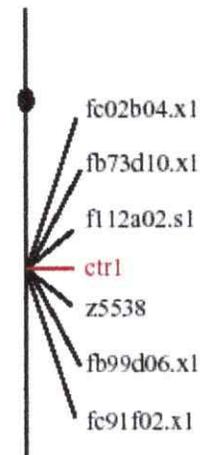


Figura 10 Estructura genómica y ubicación genómica del gen *ctr1* de pez cebra. a) Las secuencias genómicas obtenidas de la base de datos se alinearon con la secuencia del cDNA clonado para la deducción de la estructura exónica e intrónica del gen. El ATG inicial de la traducción se encuentra en el segundo exon; la secuencia codificante se encuentra en rojo. El dominio transmembrana 1 (DTM1) se encuentra codificado en el exon 4 y los dominios 2 y 3 (DTM 2,3) en el exón 5. Los números indican el tamaño de los intrones en pb. b) Secuencias de unión entre exones e intrones. Las letras mayúsculas en rojo corresponden a secuencias exónicas y las minúsculas negras a secuencias intrónicas. Las secuencias dadoras de splicing se encuentran subrayadas. c) El gen *ctr1* de pez cebra se encuentra ubicado en el cromosoma 5. En la figura se detallan los marcadores que rodean al gen.

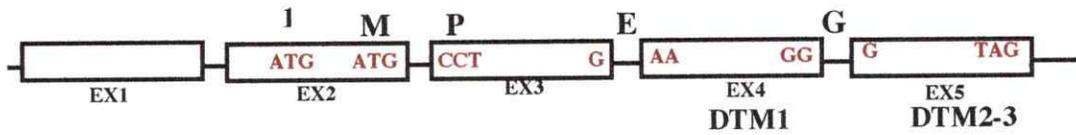
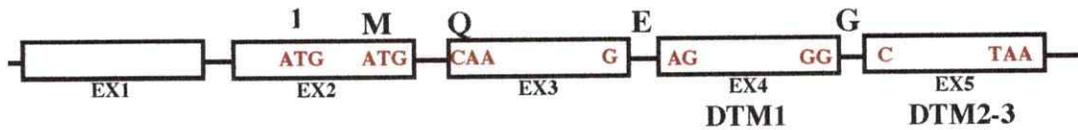
ctrl humano*ctrl* pez cebra

Figura 11 Comparación de las secuencias genómicas del gen *ctrl* de pez cebra con el humano. Se muestra el ATG del inicio de la transcripción indicado por un 1, los codones que codifican para los aminoácidos que flanquean los exones, los aminoácidos correspondientes y los dominios transmembrana. EX: exon, M: metionina, Q: glutamina, P: prolina, E: ácido glutámico, G: glicina. DTM: dominio transmembrana.

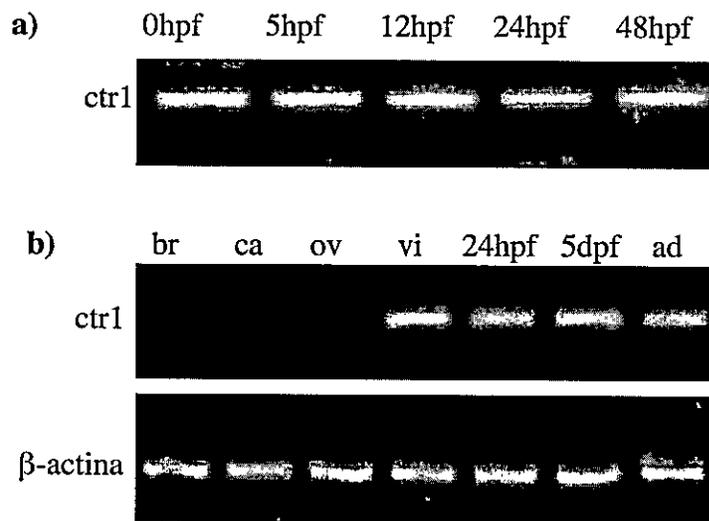


Figura 12 Expresión del gen *ctrl* de pez cebra durante el desarrollo determinado por RT-PCR. a) Expresión de *ctrl* en diferentes estadios del desarrollo analizados por medio de la técnica de RT-PCR. Se extrajo RNA total de embriones en los estadios indicados. Se obtuvo la banda de tamaño esperado en todos los estadios analizados. b) Expresión del gen *ctrl* en diferentes tejidos de adulto. Se preparó RNA total de los tejidos analizados, de embriones de 24 hpf y 5dpf, y de adulto (ad) para realizar el RT-PCR (panel superior). Se analizaron las mismas muestras para RNA de β -actina como control de expresión (panel inferior). hpf: horas post fertilización, dpf: días post fertilización. (br: branquias, ca: cabeza, ov: ovarios, vi: víseras).

una hembra de 1 año de edad (Fig.12b). Los resultados muestran presencia del gen en todos los órganos analizados, pero con una clara diferencia de intensidad en la expresión. Para poder interpretar mejor estos resultados, se realizó paralelamente un RT-PCR amplificando el gen de β -actina de los mismos RNAs analizados anteriormente (Fig.12b). Este mensajero es constante en todo el organismo (Chen y col, 2002) lo cual permite determinar si las diferencias de intensidad en la expresión del gen *ctrl* se puede atribuir específicamente a la cantidad de RNA del gen presente en el órgano analizado y no a artefactos de la técnica de extracción. Como era de

esperar, la cantidad de RNA de β -actina en los diferentes órganos estudiados fue constante a diferencia de los resultados observados para el gen del transportador, lo cual sugiere que existe mayor cantidad de RNA de *ctrl* en el hígado e intestino del pez adulto en comparación con la cantidad detectada en branquias, ovarios y cabeza. En estos órganos se observa intensidad de banda relativamente similar entre ellos. (Fig.12b)

3.7 Expresión del gen *ctrl* en embriones de pez cebra detectada por hibridación *in situ*

Para determinar la distribución espacial del mRNA de *ctrl* en embriones y larvas de pez cebra se realizaron experimentos de hibridación *in situ* en diferentes estadios del desarrollo. Los experimentos se realizaron con embriones fijados en 5 hpf, 14 hpf, 24 hpf, 48 hpf y 3.5 dpf. La concentración de la sonda antisentido utilizada fue de 1,0 μ g/ml. En embriones de 16 hpf (Fig. 13 a) la marca fue ubicua, revelándose rápidamente y de forma homogénea en todo el embrión. En embriones de 24hpf (Fig.13b-g) se observó una marca localizada en la región ventral adyacente al vitelo y en la cabeza del embrión, observándose una tinción cada vez más débil hacia la región dorsal. La Figura 13c muestra un embrión de 24 hpf, vista frontal, en el cual se puede ver con claridad la marca situada principalmente en el territorio anterior del cerebro. Con el propósito de analizar con detalle la expresión de *ctrl*, se realizaron cortes transversales de los embriones hibridados. Como se puede ver en la figura 13 d-f, el color azul característico de la marca de hibridación marcó de manera más intensa en el área ventral del embrión, la cual dará origen al sistema digestivo. En la figura 13g se observó marca principalmente en el cerebro anterior. En embriones de

48 hpf (Fig.13h,i) se observó expresión leve en la cabeza del embrión y fuerte en el área ventral, siendo más marcada en la zona vecina al vitelo, disminuyendo hacia la región dorsal del embrión, en un patrón similar al obtenido en embriones de 24 hpf. Cortes longitudinales de embriones mostraron expresión de *ctr1* en el límite ventral del embrión, en contacto con el vitelo así como en la región anterior de la cabeza (Fig.13i).

Embriones de 3,5 dpf presentaron una fuerte marca localizada en el área de las vísceras (Fig.13j) la cual puede observarse claramente en cortes transversales de embriones de este estadio (Fig.13k,l). El área marcada revela una tinción más fuerte al lado izquierdo del embrión, lo que podría corresponder al intestino. La marca fue débil en los somitos, disminuyendo hacia la cola. La cabeza presentó expresión de *ctr1* en el área cerebral, pero débil en comparación con la observada en los experimentos anteriores. Se detectó tinción leve a lo largo de toda la notocorda, lo que también se confirmó en los cortes transversales (Fig.13k-l). Los resultados obtenidos con la sonda control fueron negativos, no observándose marcas en el embrión.

3.8 Interferencia de la función de *ctr1* mediante oligonucleótidos

Antisentido (MO*ctr1*).

Con el fin de comprobar que el oligonucleótido antisentido para *ctr1* (MO*ctr1*) de pez cebra inhibe la expresión de la proteína en los experimentos de análisis de función descritos en el punto 2.2.12, se realizaron experimentos de inmunomarcaje de la proteína en presencia y en ausencia de MO*ctr1* en embriones de 24 hpf. Para

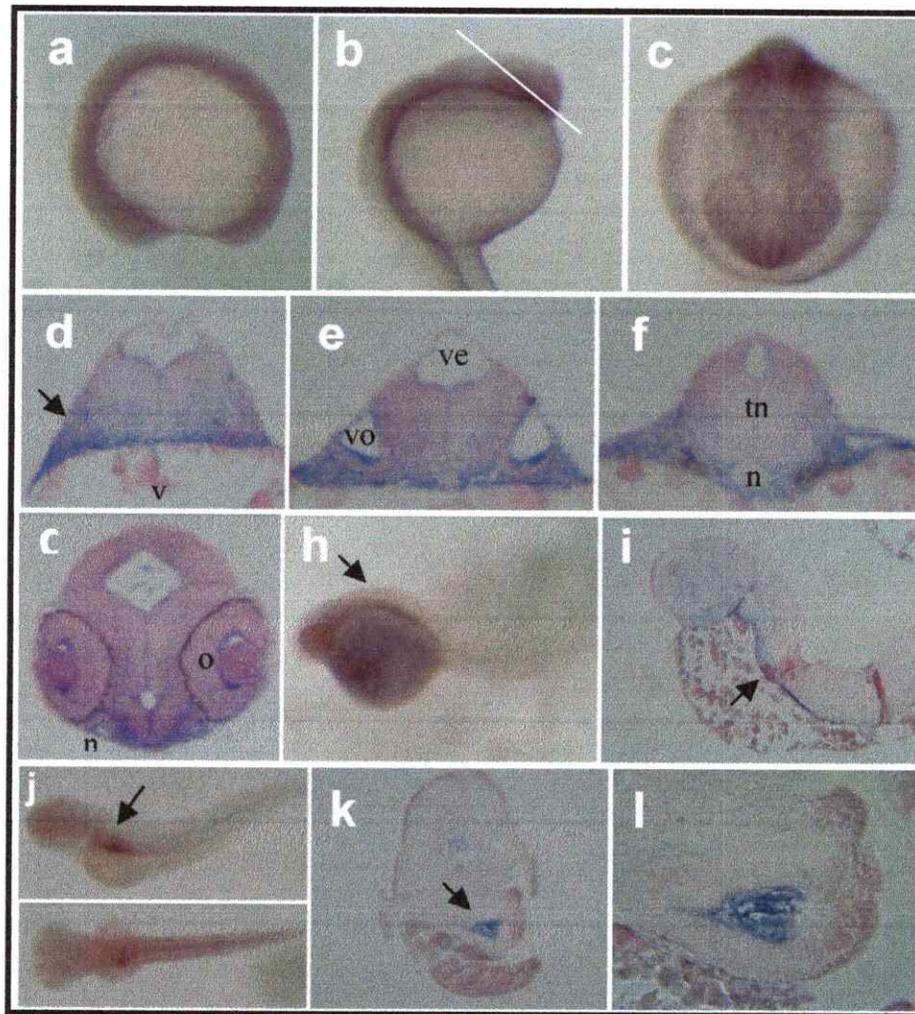


Figura 13 Hibridación *in situ* de *ctr1* de pez cebra. Se analizó la distribución del mensajero de *ctr1* en diferentes estadios embrionarios. **a)** 16 hpf; **b-g)** 24 hpf; **h)** 40 hpf; **i-l)** 3,5 dpf. En estadios tempranos la expresión de *ctr1* es ubicua (a) ventralizándose en embriogénesis tardía (b-g). **d-f)** Cortes transversales a 24 hpf presentando fuerte tinción cerca del vitelo (flecha en d), alrededor de la notocorda en f, g) corte oblicuo (representado por la línea blanca en b) de la cabeza de un embrión de 24 hpf presentando expresión en el cerebro anterior y en el área nasal, o: ojo, na: nariz. La expresión ventral permanece hasta las 40 hpf (flecha en h). Los embriones de 3.5 dpf muestran expresión restringida en el intestino, vista lateral (j, panel superior) y vista dorsal (j, panel inferior). Esta expresión también se puede ver en cortes longitudinal (flecha en i) y transversal (flecha en k; mayor amplificación en l) v: vitelo, ve: ventrículo, vo: vesícula ótica, n: notocorda, tn: tubo neural.

esto se generó un constructo que contiene el gen *ctrl* fusionado en el mismo marco de lectura con seis copias del péptido Myc humano, reconocible por el anticuerpo anti-myc. Se utilizan seis copias ya que está estandarizado que así es suficiente y segura la detección por medio del anticuerpo. Se transcribió RNA *in vitro* de este constructo. Se inyectaron 50 embriones en estadio de una célula con RNA *ctrl-myc* y 50 fueron coinyectados con RNA *ctrl-myc* junto con el MO*ctrl* de pez cebra. Los embriones se dejaron crecer hasta 20 hpf y se fijaron durante dos horas en PFA 4% para luego realizar inmunomarcaje. Los resultados mostraron una clara inhibición de la expresión del gen *ctrl* por parte del MO*ctrl*. Los embriones que fueron inyectados con RNA *ctrl-myc* revelaron marcas características del reconocimiento del anticuerpo con su epítopo Myc (Fig 14 a,b). Estos resultados indican que el RNA *ctrl-myc* fue traducido de manera correcta generando epítopos reconocibles por el anticuerpo. Como era de esperar, los embriones que fueron coinyectados con RNA *ctrl-myc* y MO*ctrl* no presentaron marca comparable (Fig 14 c,d), indicando una inhibición a nivel traduccional por parte del morfolino.

3.9 Falta de función del gen *ctrl* de pez cebra: análisis fenotípico.

Con el fin de estudiar los efectos de la ausencia del gen *ctrl* de pez cebra en el desarrollo de embriones y larvas de pez cebra, se realizaron experimentos de falta de función con morfolinis antisentido. Para esto se inyectaron huevos recién fertilizados en estadio de una célula con el morfolino *ctrl* de pez cebra a una concentración de 0.5 mM utilizando un microinyector. Se inyectaron aproximadamente 10 nanolitros por huevo, 5 picomoles por embrión. Los embriones tratados presentaron un desarrollo normal hasta 24 hpf. Pasado este período comenzaron a presentar necrosis

Ctrl-Myc

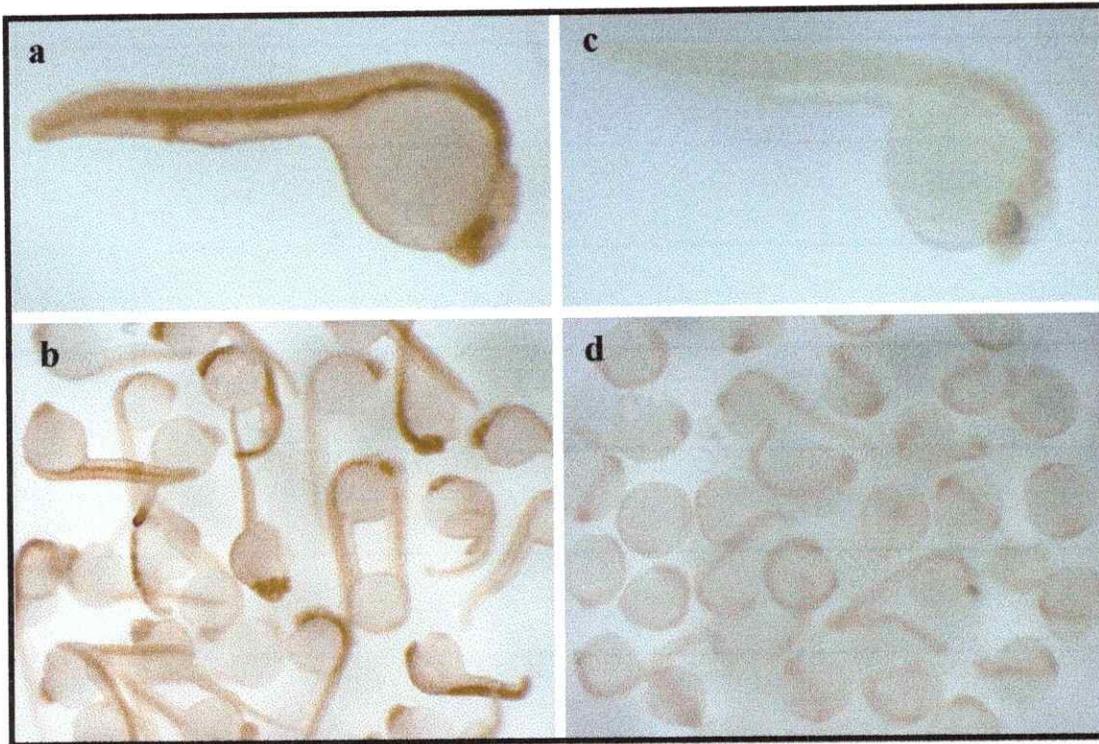
Ctrl-Myc + MO *ctrl*

Figura 14 Bloqueo específico de la síntesis de proteína *Ctrl* de pez cebra por el morfolino anti-*ctrl*. Los embriones fueron inyectados con RNA codificante del gen *ctrl* fusionado al epítopo myc (a y b) o con este RNA y el MO*ctrl* (c y d). Fueron fijados y marcados con el anticuerpo contra la proteína myc a 24hpf. **a)** y **c)** embriones representativos a mayor aumento. **b)** y **d)** Imagen de ambos grupos de embriones tratados. Nótese la ausencia de tinción en los embriones coinyectados.

principalmente en la cabeza, observándose también disminución del tamaño de los ojos y atraso generalizado en el desarrollo en comparación con embriones normales. Embriones de 3 dpf presentaron un fenotipo anormal observándose curvamiento ventral de la cola, dificultad en motilidad y necrosis generalizada, lo cual terminó siendo fatal para el embrión a los 3 y 4 dpf (Figs.15 y 16).

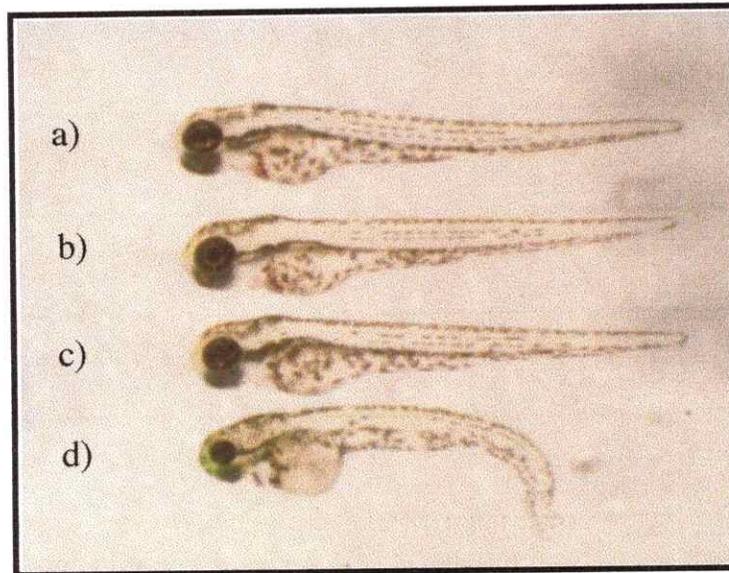


Figura 15 Inyección de morfolinós en estadio 3 dpf. a) Control, no inyectado, **b)** embrión inyectado con el colorante rojo de fenol como segundo control, **c)** MO control, embrión inyectado con morfolino antisense control, **d)** MO *ctrl1*: embrión inyectado con morfolino *ctrl1* de pez cebra

3.10 Muerte celular en embriones morfantes

Debido a la opacidad observada en los embriones inyectados con MO*ctrl1* se realizaron estudios de necrosis exponiendo a los morfantes al reactivo naranjo de acridino.

Por medio de esta tinción se analizó la muerte celular en embriones vivos de 3 dpf que presentaban el fenotipo morfante característico. Los embriones presentaron muerte celular generalizada, observándose una mayor intensidad en la cabeza y en el tubo neural (Fig. 16).

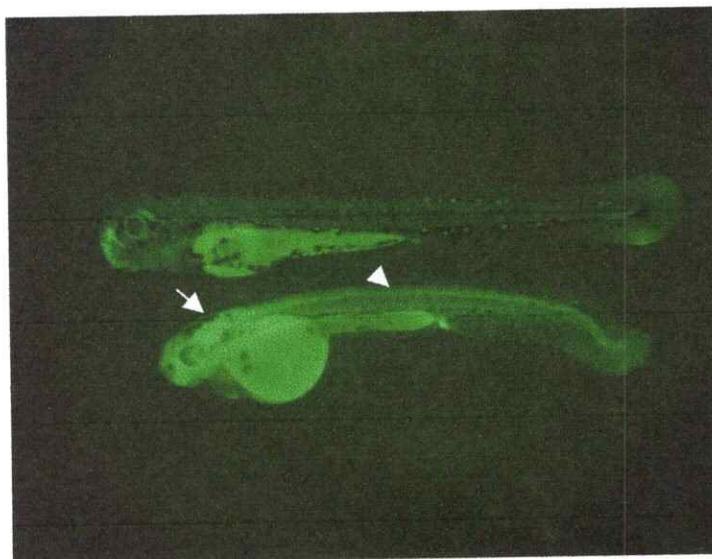


Figura 16 Embrión control y morfante de 3 dpf teñidos con naranja de acridina. Embrión control (superior en el recuadro) y morfante (inferior en el recuadro). La fluorescencia verde muestra la existencia de necrosis celular detectada por el reactivo. Nótese la diferencia de intensidad del morfante respecto al control principalmente en el área del cerebro indicado por la flecha blanca y en el tubo neural indicado con la cabeza de flecha.

4. DISCUSIÓN

La adquisición de cobre proveniente de la dieta y su subsecuente distribución hacia órganos y tejidos es un punto crítico para proveer la cantidad necesaria del metal a una importante gama de enzimas dependientes de cobre. Investigaciones recientes han descrito mecanismos relacionados con la distribución, compartimentalización y eliminación de cobre en levadura y mamíferos, sin embargo se sabe muy poco acerca de la absorción de cobre en los organismos. En la presente tesis se ha demostrado que el gen del transportador de alta afinidad *Ctr1*, candidato a ser el principal responsable en la absorción de cobre celular, tiene un ortólogo en el pez cebra. A pesar de que hasta el momento no se han asociado deficiencias o enfermedades con mutaciones en el gen *ctr1*, el clonamiento e identificación de la secuencia genómica del gen en el pez cebra puede facilitar en gran manera estudios relacionados con posibles mutaciones en el transportador. Sin embargo, el hecho de que los embriones que sufren la pérdida completa del gen no son viables explicaría porque no existen hasta hoy posibles enfermedades atribuibles a mutaciones en *ctr1*. Por otra parte, validar al pez cebra como un modelo para estudios relacionados con el ion cobre permite obtener una poderosa herramienta para avanzar en el conocimiento de la homeostasis de éste y otros metales.

4.1 Efectos morfológicos y moleculares en embriones expuestos a CuSO_4

La adquisición de cobre a través de la membrana plasmática y su posterior distribución subcelular son procesos críticos para proveer el metal a las diferentes enzimas y proteínas que lo requieren para su normal funcionamiento. Es sabido que

altas concentraciones de cobre intracelular causan daños al metabolismo dado el alto poder oxidativo de este metal. Sin embargo, es menos conocido el efecto que tiene este ion cuando se encuentra presente fuera del organismo durante la embriogénesis. Como primera aproximación a este problema, se evaluó el efecto de diversas concentraciones de CuSO_4 en el medio de cultivo sobre el desarrollo de embriones y larvas de pez cebra. Analizando parámetros morfológicos como indicadores de daños generados por el sulfato de cobre en los embriones, se observó que las concentraciones de cobre desde $10 \mu\text{M}$ en el medio afectan el desarrollo normal de los embriones, generándose edemas pericárdicos, problemas de motilidad y disminución en la capacidad de reacción frente a estímulos externos. A concentraciones más bajas, $2-4 \mu\text{M}$, se pudieron observar efectos en el desarrollo tardío, como incapacidad de eclosionar y una frecuencia mayor a la normal de ausencia de vejiga natatoria. Este defecto aumenta consistentemente en frecuencia al aumentar progresivamente la concentración de cobre en el medio. Al no inflarse la vejiga natatoria, los embriones no son capaces de mantener una correcta línea de flotación y mueren antes de los 10 días post fertilización. Presumiblemente estos embriones son incapaces de conseguir alimento una vez que el vitelo deja de proveerles los nutrientes. Los efectos descritos en este trabajo de animales expuestos a excesos de cobre pueden deberse a diversas alteraciones como por ejemplo la liberación de radicales libres en tejidos donde se acumula el metal, la inhibición de enzimas digestivas y la reducción en la motilidad de las vísceras, todos efectos descritos previamente (Woodward y col, 1995). Se ha descrito también que altas concentraciones intracelulares del ion en peces puede afectar la acción de las branquias generando una perturbación en la homeostasis de sodio (Laurén and

McDonald, 1985), lo que podría traducirse en los problemas de motilidad que observamos en los peces tratados. Por otra parte, se observó que los embriones no pueden eclosionar al ser expuestos a diferentes concentraciones del metal incluyendo la más baja utilizada. Esto indica que todas las concentraciones utilizadas en los experimentos aquí descritos son, en la práctica, letales para los embriones ya que al no poder salir del corion no son capaces de sobrevivir. En general, los niveles de cobre subletales utilizados en estos estudios (embriones descorionados) son comparables a concentraciones reportadas en otros estudios de peces expuestos a cobre (De Boeck y col, 2002). En cuanto a las concentraciones utilizadas en nuestros experimentos con larvas de peces cebra y comparando con trabajos realizados en otros organismos, se puede concluir que las concentraciones de cobre utilizadas en otros modelos han sido mucho más elevadas para poder obtener un efecto tóxico. Se ha descrito que el LC50 del sulfato de cobre para los caracoles de agua es de 0,39 mg/Lt, es decir 1,56 mM. Estudios indican que trabajos en cultivos celulares requieren más de 800 μ M de CuSO_4 para observar efectos tóxicos, de la misma manera, estudios en animales superiores como el ratón utilizan concentraciones letales tan elevadas como 472 mg/Kg, describiéndose también propiedades carcinogénicas de CuSO_4 en pollo a concentraciones de 10 mg/Kg/día (ace.ace.orst.edu/info/extoxnet/pips/coppersu.htm). Si comparamos estos datos con las condiciones de trabajo descritas en la presente tesis se puede concluir que los peces son animales altamente sensibles a la exposición del metal en comparación con otros organismos, situando al pez cebra como un excelente modelo para estudios de toxicidad de cobre y como un posible biosensor de alta efectividad.

Con el fin de realizar estudios que permitieran identificar los efectos a nivel de la expresión génica generados por un exceso de cobre en el medio sobre embriones y larvas de pez cebra, se realizaron estudios con la línea transgénica *hsp70-gfp*. Estos animales llevan codificado en su genoma la proteína fluorescente verde (GFP) río abajo del promotor de la proteína de estrés térmico Hsp70. Los resultados obtenidos con los embriones *hsp70-gfp* indican que al ser expuestos a altas concentraciones de sulfato de cobre (100 μ M) se activa el promotor de estrés observándose expresión de la proteína reportera en los animales transgénicos. Esto muestra que los embriones y larvas son capaces de sentir a nivel intracelular el cobre externo, indicando que el exceso del metal presente en el medio ingresa a las células de las larvas. El ingreso de cobre, por mecanismos de transporte activo o pasivo, genera estrés intracelular, tal vez por la acumulación del metal y su fuerte capacidad oxidativa. Como es bien sabido, el cobre posee fuertes propiedades redox lo cual lo hacen altamente tóxico y puede llegar a ser letal en exceso dentro de la célula. El estrés celular que observamos, reflejado por la activación de la proteína fluorescente verde, podría deberse a esta capacidad oxidativa que posee el metal lo que podría estar generando liberación de radicales hidroxilo que dañan componentes celulares como son los ácidos nucleicos. Por otra parte, el cobre posee una alta afinidad por proteínas ricas en histidina, metionina y cisteína, por lo que al encontrarse en exceso podría estar uniéndose a ellas alterando su normal funcionamiento. Este aumento en la expresión de la proteína Gfp generada por un exceso de cobre concuerda con los resultados obtenidos en experimentos realizados en carpa, *Cyprinus carpio* (De Boeck y col, 2002). Se ha descrito también que en peces los niveles constitutivos de las proteínas Hsp son bastante elevados, lo cual podría deberse a fluctuaciones normales del

ambiente al que se ven expuestos (Fader y col, 1994, Misra y col, 1989). Por otra parte, se ha descrito también en cultivos celulares de peces que existe un aumento substancial de la proteína Hsp inducida por contaminantes ambientales (Iwama y col, 1998). El hecho de que las larvas de pez cebra puedan captar a nivel génico el exceso de cobre externo hace del modelo una herramienta poderosa para estudios de toxicidad no solo a nivel celular si no también a nivel subcelular o molecular.

Detección de necrosis en embriones expuestos a cobre.

Para determinar si hay muerte celular como consecuencia de la exposición a CuSO_4 en los embriones de pez cebra se realizaron experimentos de tinción con naranja de acridino (NA). El NA (N,N,N',N'-Tetramethyl-3,6-acridinediamine) se intercala en el DNA de simple hebra y fluoresce al ser expuesto a la luz ultravioleta. El NA de carga positiva interactúa con el ácido nucleico y neutraliza al DNA generando un complejo hidrofóbico el cual precipita. Los resultados indican que hay un aumento consistente de la fluorescencia acorde al aumento de concentración de sulfato de cobre a la cual se ven expuestos los embriones. Esto demuestra que desde las concentraciones más bajas analizadas ($2 \mu\text{M}$) el embrión sufre daño celular en tejidos y estructuras específicas como son el intestino y la mandíbula. Exposición a $100 \mu\text{M}$ de CuSO_4 de larvas por un período corto de tiempo (2-4 hrs) es suficiente para inducir una fuerte respuesta de necrosis en los animales tratados, observándose necrosis en mayor grado en músculo, en la parte inferior de la cabeza, la zona ventral del embrión y la cola. Estos resultados indican que el daño observado a bajas concentraciones de CuSO_4 se expande por el organismo a medida que aumenta la concentración del ion a la cual se ven expuestos los animales. Los resultados

obtenidos en estos experimentos concuerdan con los descritos en el pez tropical *Prochilodus scrofa*, los cuales al ser expuestos a 0.12 μM de cobre presentaron degeneración celular producida por necrosis y apoptosis (Mazon y col, 2002).

4.3 Clonamiento y caracterización génica del transportador Ctr1 de pez cebra.

El gen del transportador Ctr1 ha sido descrito y clonado en diversos organismos como son la levadura, el ratón y el humano. El gen ha sido caracterizado y utilizado para realizar estudios de función a nivel celular y genético debido a que los mecanismos moleculares responsables de la absorción de cobre son bastantes desconocidos, a diferencia de los mecanismos relacionados con la exportación de cobre de la célula, de lo cual se tiene un mayor conocimiento (Vulpe y col., 1993, Mercer y col., 1993). Recientemente, el pez cebra ha surgido como un excelente modelo de investigación principalmente por su fácil manipulación y por la secuenciación completa de su genoma, transformándose en un modelo interesante para la realización de estudios de homeostasis de metales. Teniendo esto en consideración, los trabajos moleculares de la presente tesis se centraron en el clonamiento y caracterización del gen *ctr1* de pez cebra, de manera de obtener una herramienta genética para los futuros estudios de efectos del cobre en el desarrollo de embriones y larvas de pez cebra. Para esto, lo primero que se hizo fue clonar la secuencia nucleotídica del gen, y luego de obtenida esta se obtuvo la secuencia proteica deducida. Al comparar las secuencias proteicas del transportador Ctr1 de humano, rata y la obtenida en este trabajo, se observó que en el extremo amino terminal presentaban gran homología (80,9 % de identidad), al igual que los dominios transmembrana 2 y 3 los cuales presentaron valores de 85,7 % y 95,2 % de

identidad respectivamente. Estos resultados concuerdan con la comparación de secuencias del gen *ctr1* de levadura, ratón, *Arabidopsis thaliana* y humano, las cuales describen una región amino terminal variable incluyendo el primer dominio transmembrana y dos regiones restantes altamente conservadas, incluyendo los dos últimos dominios transmembrana (Puig y col., 2002). Por otra parte, se han descrito tres metioninas conservadas en todas las proteínas de la familia *ctr* conocidas hasta ahora, las cuales parecen cumplir una función importante para el normal funcionamiento del transportador (Puig y col., 2002).

Gracias a la reciente secuenciación completa del genoma de pez cebra fue posible obtener la estructura genómica y la ubicación del locus genético del transportador *Ctr1* de manera de realizar una completa caracterización génica de *ctr1*. Al comparar la secuencia de cDNA de *ctr1* de pez cebra clonada y descrita en este trabajo con secuencias genómicas del pez cebra, se identificó solamente un gen con secuencia homóloga al transportador de cobre. No se identificaron más genes pertenecientes a la familia *ctr* como los descritos en humano (*ctr2*) y en levadura (*ctr2* y *ctr3*). El gen *ctr1* de pez cebra posee cinco exones, encontrándose el inicio de la transcripción en el segundo exón, lo cual concuerda con los resultados descritos por Lee y col. (2000) donde se menciona a lo menos un exon en el extremo 5' no codificante en ratón (*mctr1*). Al igual que *ctr1* de pez cebra y *ctr1* de ratón, logramos determinar que *ctr1* de humano también posee un primer exon no codificante (datos no publicados). Por otra parte, si se comparan las estructuras genómicas de *ctr1* de pez cebra con la secuencia genómica humana (Fig. 11) se observan grandes similitudes tanto en la cantidad de exones e intrones, como en la distribución de los dominios transmembrana y los aminoácidos que se encuentran en los puntos de quiebre entre

exones. Analizando en detalle este último punto, existe entre ambas secuencias solo un aminoácido diferente de los que flanquean los exones, una prolina en el exon 3 de humano a diferencia de una glutamina al comienzo del exon 3 de pez cebra. En la figura 11 se pueden ver también los codones que codifican para los aminoácidos que flanquean los exones, la metionina inicial en ambos casos en el exon 2 y los tres dominios transmembrana. Todos estos resultados indican que la similitud de las secuencias del gen *ctr1* de pez y humano no solo se observa en sus cDNAs, si no también en las estructuras génicas de ambas especies, lo que permite asegurar que el gen clonado en este trabajo corresponde al transportador de alta afinidad Ctr1. Búsquedas adicionales en la base de datos no encontraron más homólogos de *ctr1* en pez cebra. Estos resultados también remarcan el alto grado de conservación de las proteínas de los diferentes organismos, lo cual se transforma en una importante herramienta para futuros estudios ya sea comparativos o bien con fines terapéuticos. Por medio de la técnica de paneles híbridos fue posible determinar que el gen *ctr1* se encuentra codificado en el cromosoma 5 de pez cebra; el transportador humano se ubica en el cromosoma 9 (Zhou y col., 1997) y el de ratón, se encuentra en el cromosoma 4 (Lee y col., 2000). Es posible que existan regiones sinténicas (regiones conservadas entre cromosomas diferentes) entre estos cromosomas las cuales podrían generar información importante acerca de la organización genética en las diferentes especies analizadas y de la relación que puede existir entre ellas con relación a los genes *ctr* y la regulación de su expresión.

4.4 Análisis de expresión espacio-temporal del gen *ctr1* de pez cebra.

Por medio de los experimentos de hibridación *in situ* fue posible analizar la expresión espacial del gen *ctr1* en embriones de pez cebra. Como se muestra en la figura 13, la expresión varía a lo largo del desarrollo, siendo ubicua y homogénea en el primer estadio analizado (16 hpf) debiéndose probablemente a la herencia del mensajero materno, restringiéndose progresivamente a la región ventral del embrión, terminando predominantemente en la región intestinal en larvas de 3.5 dpf. Con las marcas restringidas al área ventral obtenidas en las larvas de 3.5 dpf no se puede afirmar que el transportador se expresa exclusivamente en ese tejido ya que la técnica de hibridación *in situ* en larvas de más de dos días es difícil de lograr. Esto se debe a que el cuerpo se hace cada vez menos permeable a la entrada de la sonda de RNA y del anticuerpo, por lo que podría estar marcándose solo la región que expresan el gen con mayor intensidad. Por otra parte, el hecho de que la expresión de *ctr1* en los primeros estadios sea ubicua no significa necesariamente que el gen sea esencial en todas las regiones embrionarias. El intestino del pez cebra continúa expresando fuertemente el mensajero de *ctr1* hasta la edad adulta, como puede verse en los resultados obtenidos en los RT-PCR. Los resultados de las hibridaciones *in situ* concuerdan con los obtenidos en hibridaciones de *ctr1* realizadas en ratón (Kuo y col., 2001), resultados que describen expresión difusa y ubicua en los estadios tempranos, restringiéndose cada vez más en tejidos específicos desde el estadio E16.5, incluyendo intestino, hígado, somitos y el plexo corioide. Ya en E18.5 describen expresión específica en intestino y riñón. La similitud en las expresiones de ambos organismos podría indicar que tal vez en un principio Ctr1 es requerido en altos niveles en todas las células, pero que después de la organogénesis las funciones

más importantes de absorción de cobre se localizan en las víseras y órganos asociados. Estudios previos en teleósteos, especialmente en trucha, han indicado que la absorción de cobre ocurre vía branquias en el caso de cobre disuelto en el medio (Grosell y Wood, 2002), o bien vía intestino en el caso del cobre proveniente de la dieta (Clearwater y col, 2000). A niveles normales de cobre en el agua y en la dieta la vía predominante de absorción parece ser el intestino (Kamunde y col, 2002b). Sin embargo, en caso de alteraciones existen mecanismos compensatorios que regulan la absorción de cobre en ambos tejidos, particularmente en las branquias, existiendo interacción entre ambos sistemas (Kamunde y col, 2002 a y b). Existen también estudios que se refieren a los mecanismos de transporte existentes en el intestino de los peces. La absorción de cobre a través de la membrana apical de los enterocitos puede ser por medio de difusión simple, pero la transferencia del metal a través de la membrana basolateral hacia la sangre es un mecanismo altamente regulado (Clearwater y col, 2000). El hecho de que los resultados aquí descritos demuestren que el intestino posee la mayor expresión de *ctr1* en estadios larvales, sugiere que el transporte de cobre proveniente de la dieta podría ser mediado por la proteína Ctr1. En el caso de las agallas, Grosell y Wood (2002) proponen que parte del cobre que entra a la circulación proveniente desde el medio es transportado a través de una vía apical de canales de sodio. Sus estudios muestran que el transporte de cobre es competitivamente inhibido por sodio y por bloqueadores de éstos canales. Sin embargo, también existe en las branquias transporte de cobre independiente de sodio, y la proteína Ctr1 ha sido propuesta como un posible mecanismo responsable (Grosell y Wood, 2002). Los resultados obtenidos en este trabajo con los experimentos de RT-PCR muestran presencia de mRNA de *ctr1* en branquias, sin

embargo experimentos fisiológicos y de análisis de proteína son requeridos para identificar el rol exacto que juega Ctr1 en este proceso. Los resultados obtenidos con el pez cebra son consistentes también con la función que hasta ahora se le conoce al transportador Ctr1 en humano (Peña y col., 1999). En humano, el transportador juega un rol fundamental en la internalización de cobre proveniente de la dieta hacia las células intestinales, expresándose también en riñón e hígado, donde estaría cumpliendo funciones que aun no están claramente definidas.

El análisis de expresión temporal del gen *ctr1* fue realizado a través de la técnica de RT-PCR, con la cual fue posible corroborar algunos resultados obtenidos en la hibridación *in situ*. Por medio de ambas técnicas se pudo observar la presencia del gen desde estadios tempranos a diferencia de la expresión descrita en ratón, la cual comienza a ser evidente desde E12.5 (Kuo y col., 2001), equivalente a 48 horas post fertilización en el pez cebra. Los resultados del RT-PCR revelan presencia de RNA del gen *ctr1* en embriones desde 0 hpf, indicando existencia de RNA materno. Con los resultados obtenidos en el resto de los estadios analizados se puede concluir que el RNA del gen está presente en las larvas a lo largo de todo el desarrollo hasta la edad adulta, y que se expresa a lo menos en ovarios, cabeza, vísceras y branquias. Estos resultados concuerdan con los análisis de expresión del gen realizados en diferentes órganos y tejidos en embriones de ratón (Lee y col., 2000), los cuales indican presencia del transportador a niveles 20 veces más elevados en hígado y riñón. De manera similar, los resultados del análisis temporal en larvas de pez cebra indican una clara diferencia en la intensidad de expresión del gen en los diferentes tejidos, obteniéndose mayor expresión en las vísceras de las larvas. Para poder interpretar las intensidades de expresión obtenida en los diferentes órganos se realizó

un RT-PCR con la proteína β -actina, la cual presenta una expresión constante en todos los tejidos (Chen y col., 2002). Estos experimentos no permiten hacer un análisis cuantitativo de la expresión de *ctr1*, sin embargo, los resultados de los RT-PCR fueron consistentes en tres experimentos independientes, por lo que es posible considerar que existe expresión diferencial del gen en los órganos analizados. Estos resultados se ven apoyados en los resultados obtenidos en la hibridación *in situ* descrita anteriormente. Es probable que *Ctrl* se encuentre en todas las células de los organismos debido a la necesidad de incorporar un nutriente tan esencial como es el cobre, pero tal vez la absorción del metal proveniente de la dieta requiere mayores niveles de transcripción del transportador en el intestino la cual asegure el correcto funcionamiento del mecanismo homeostático.

4.5 Pérdida de función del gen *ctr1*.

Los morfolinós (MOs) son oligos antisentido de DNA los cuales al hibridar con el RNA del gen blanco, forman una doble hebra. El mRNA complementario al MO, no puede ser traducido a proteína por la maquinaria celular, si el oligo está dirigido contra la metionina inicial. De esta manera es posible hacer estudios de falta de función y analizar la importancia que tiene el gen de interés en el desarrollo embrionario. Es importante aclarar que esta técnica no necesariamente asegura eliminar por completo la existencia de la proteína en la célula. El efecto puede depender de la dosis de morfolino administrada y la correcta distribución de éste en las células. Una alta concentración del oligo podría generar efectos inespecíficos los cuales deben ser controlados de manera de evitar resultados que no reflejen la pérdida de función del gen en estudio. En los peces morfantes para *ctr1*, las estructuras más evidentemente afectadas son la cabeza, los ojos y el sistema

nervioso, todos probablemente debido a muerte celular en estos tejidos, evidenciado por las tinciones con NA. Estos tejidos coinciden con los que presentan mayores niveles de expresión del mensajero de *ctrl*.

En estudios iniciales en que se describen las proteínas Ctr se demostró *in vitro* y en cultivos celulares que éstas pueden funcionar como transportadores de cobre aunque no se ha comprobado que presenten esta función *in vivo*. Kuo y col, (2001) y Lee y col, (2001) realizaron estudios de falta de función dirigidos hacia *ctrl* murino por medio de la técnica de knock out (KO). Analizando los heterocigotos *ctrl*^{+/-} se observó que los niveles de cobre en hígado y cerebro eran la mitad de lo normal, lo cual concuerda con la función de Ctr1 de permitir la incorporación de cobre en dichos órganos. Fenotípicamente, y en condiciones de niveles de cobre normales en la dieta, los heterocigotos son indistinguibles de los ratones controles. Sin embargo, los homocigotos (*ctrl*^{-/-}) no son viables y mueren *in útero*. El tiempo de vida del embrión mutante en gestación varía entre el día 9.5-10.5 y en todos los casos los embriones presentan serias anormalidades en el desarrollo y un severo retardo en el crecimiento desde el día 6.5. Estos resultados demuestran un rol esencial de Ctr1 en las etapas tempranas del desarrollo embrionario. Con estos resultados se puede concluir que el cobre es un elemento limitante para funciones tempranas en el desarrollo. A pesar de que las enzimas que contienen cobre son altamente especializadas y esenciales, ninguna de ellas ha demostrado ser responsable directa de la letalidad embrionaria observada en los ratones KO. Se ha mencionado que la lisil oxidasa podría tener una función importante en la formación de las estructuras embrionarias, y que debido a su mal funcionamiento los embriones homocigotos no son capaces de gastrular (Kuo y col, 2001).

Existen dos hipótesis alternativas con respecto a los resultados de los experimentos con KO. Ambos grupos modificaron el locus *ctr1* murino reemplazando el gen con una nueva unidad transcripcional. Es posible que la letalidad embrionaria no sea efecto de la pérdida de *ctr1*, si no más bien de la alteración en la expresión de algún otro gen próximo a *ctr1*. En uno de los trabajos publicados (Lee y col., 2001) se menciona que se rescataron los animales KO a través de la expresión transgénica de *ctr1*, sin embargo los resultados no han sido publicados.

A pesar de que *ctr1* murino funciona como transportador de cobre, es posible que también funcione como transportador de otros metales como níquel o zinc (se sabe que el cobre compite con el zinc en la absorción intestinal, Bury y col, 2002). No se tiene claro si el níquel es necesario para el metabolismo de mamíferos, pero sin duda requieren zinc y se sabe muy poco de como entra en las células. Podría ser que el zinc sea esencial en etapas embrionarias tempranas cuando el único medio de transporte disponible es Ctr1. Si la letalidad embrionaria temprana está realmente relacionada con deficiencia en cobre, es razonable concluir que Ctr1 es el transportador responsable para la absorción de cobre en mamíferos, al menos, en la embriogénesis temprana. Refiriéndose a la esencialidad del transportador se puede decir que los resultados obtenidos por los laboratorios que realizaron el ratón KO indican que los embriones que no presentan *ctr1* mueren muy tempranamente, pero sin embargo, los cultivos celulares homocigotos demuestran que a pesar de la carencia del transportador, son capaces de ingresar cobre y de mantener una baja actividad en las enzimas que requieren del metal para su normal funcionamiento. Esto podría deberse a la existencia de un sistema de transporte independiente de Ctr1. (Lee y col., 2002)

En comparación con las interpretaciones de los resultados obtenidos en los experimentos con ratones KO, los resultados obtenidos en el pez cebra utilizando la técnica de morfolinos presentan diferencias evidentes. Los embriones inyectados con el antisense son capaces de desarrollarse normalmente hasta las 24 hpf (organogénesis), por lo que el proceso temprano de desarrollo no se ve afectado con la disminución o pérdida total en la cantidad de transportador celular. Sin embargo, pasadas las 24 hpf el embrión comienza a presentar defectos evidentes los cuales terminan por ser fatales a los 3 dpf. De esta manera se puede decir que, según los resultados expuestos en este trabajo, *ctrl* es esencial para el normal desarrollo de embriones de pez cebra posterior a las 24 hpf. El hecho de que los embriones inyectados no mueran durante las etapas tempranas de desarrollo como ocurre con los ratones podría deberse a que existe RNA de *ctrl* materno, aportando una cantidad de proteína suficiente para llevar al embrión hasta las 24 hpf, decayendo luego en estadios más tardíos al no haber síntesis *de novo*. Una hipótesis alternativa podría ser la existencia de un reservorio de cobre materno en el vitelo o intracelular que permita un normal desarrollo embrionario hasta las 24 hpf. También es probable que existan mecanismos alternativos de absorción de cobre independientes de Ctr1 (ver por ejemplo Lee y col, 2002). Por otra parte, es posible que los embriones de peces cebra sean más tolerantes a las irregularidades homeostáticas en comparación con los embriones de rata, particularmente si consideramos que los peces crecen y se desarrollan en medios más adversos, variables y desprotegidos que los embriones de mamíferos. También puede deberse simplemente a que los requerimientos de cobre de los peces sea menor. Estudios más detallados acerca del requerimiento del metal en peces ayudarían a aclarar este punto.

5. Conclusiones

- Se describieron los efectos observados en larvas de pez cebra generados por diferentes concentraciones de CuSO_4 disueltas en el medio de crecimiento. Se observó una directa relación entre el efecto morfológico y daño celular en las larvas frente a un aumento en las concentraciones utilizadas. Por otro lado también se demostró que las larvas expuestas a CuSO_4 son capaces de captar a nivel génico el exceso del ion, evidenciado en este trabajo por la activación del promotor *hsp70*.
- El transportador de alta afinidad Ctr1 presenta un homólogo en el pez cebra, el cual tiene una secuencia, estructura génica, expresión temporal y espacial conservada comparable a las descritas en modelos mamíferos.
- La falta de expresión de la proteína Ctr1 de pez cebra demostró que el transportador es esencial para la sobrevivencia de los embriones después de las 24 hpf, corroborando así su esencialidad en el desarrollo.
- Los trabajos a futuro se enfocarán en demostrar directamente la participación activa del gen *ctr1* de pez cebra aquí descrito en el transporte de cobre y la regulación de su expresión. Además se estudiará si es que existe regulación a nivel transcripcional o bien a nivel de localización subcelular de la proteína para así poder especificar el rol fisiológico de Ctr1 en la homeostasis de cobre en peces. Por otra parte, experimentos para identificar la proporción de cobre que ingresa al medio intracelular ya han comenzado a ser realizados de manera preliminar. Estos incluyen la medición de cobre intracelular en embriones expuestos a diferentes concentraciones del metal.

- Estudios de largo plazo de exposición crónica a cobre pueden llevarse a cabo en el futuro de manera de utilizar el pez cebra no solo como modelo embrionario, si no también aprovechar sus ventajas como un modelo vertebrado adulto. Sería interesante complementar el conocimiento aquí expuesto con experimentos enfocados a los efectos de déficit de cobre tanto en embriones como en peces adultos. Esta condición puede ser generada con quelantes específicos aplicados ya sea al medio de crecimiento o bien inyectándolos directamente en los embriones.
- La caracterización y alteración del gen *ctrl* es un ejemplo de lo que se puede lograr a niveles genéticos utilizando al pez cebra como modelo de estudio. Debido a su fácil manipulación a nivel molecular, a la disponibilidad del genoma completamente secuenciado y a la posibilidad de acceso a diversos mutantes, es posible ampliar el manejo del modelo a otras proteínas y abarcar así, un mayor campo de investigación, tanto a nivel genético como celular. Por tanto, en este trabajo se demuestra que el pez cebra es un excelente modelo animal para el estudio de la homeostasis de metales.

6. Bibliografia

- Andrews N. (2001) Mining copper transport genes. Proc. Natl. Acad. Sci. 98:6543-6545.
- Askwith C. and Kaplan J. (1998) Iron and copper transport in yeast and its relevance to human disease. Trends Biochem Sci. 23:135-138.
- Bury N., Walker P. and Glover C. (2002) Nutritive metal uptake in teleost fish. J. exp. Biol. 206:11-23.
- Clearwater S., Baskin S., Wood C. and McDonald D. (2000) Gastrointestinal uptake and distribution of copper in rainbow trout. J. Exp. Biol. 203:2455-66
- Chen W. (2002) Molecular cloning and developmental expression of zinc finger transcription factor MTF-1 gene in zebrafish. Biochem Biophys Res Comm. 291:798-805.
- Crampton R.F., Matthews D.M. and Poisner R. (1965) Observations on the mechanism of absorption of copper by the small intestine. J. Physiol. 178:111-126.
- Dancis A., Yuan D., Haile D., Askwith C., Elde D., Moehle C., Kaplan J. and Klausner R.D. (1994a) Molecular characterization of a copper transport protein in *Saccharomyces cerevisiae* : an unexpected role of copper in iron transport. Cell 76:393-402.
- Dancis A., Haile D., Yuan D. and Klausner R. (1994b) The *Saccharomyces cerevisiae* copper transport protein (CTR1p). 41:25660-25667.
- De Boeck G., Wacheter B., Vlaeminck A. and Blust R. (2003) Effect of cortisol treatment and/or sublethal copper exposure on copper uptake and heat shock protein levels in common carp, *Cyprinus Carpio*. Environ. Toxicol. and Chem. 22:1122-1126.
- Dethloff G.M., Schlenk D., Hamm J.T. and Bailey H.C. (1999) Alterations in physiological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with exposure to copper and copper/zinc mixtures. Ecotoxicol. Environ. Safety. 42:253-264.
- Donovan A., Brownlie A., Dorschner M., Zhou Y., Pratt S., Paw B., Phillips R., Thisse C., Thisse B. and Zon L. (2002) The zebrafish mutant *chardonnay* (*cdy*) encodes divalent metal transporter 1 (DMT1) Blood, 13:4655-4659

- Eide D.J. (1998) The molecular biology of metal ion transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu.Rev.Nutr.*,18:441-469.
- Fader S., Yu Z. and Spotila J. 1994 Seasonal variation in heat shock protein (Hsp70) in stream fish under natural conditions. *J. Therm. Biol.* 19:335-341.
- Georgatsou E., Mavrogiannis L.A., Fragiadakis G.S. and Alexandraki D. (1997) The yeast Fre1p/Fre2p cupric reductases facilitate copper uptake and are regulated by the copper/modulator Mac1p activator. *J. Biol. Chem.* 272:13786-13792.
- Grosell, M. And Wood C. 2002 Copper uptake across rainbow trout gills: mechanism of apical entry. *J. Exp. Biol.* 205:1179-1188.
- Halloran MC., Sato-Maeda M., Warren JT., Su F., Lele Z., Krone PH., Kuwada JY. and Shoji W. (2000) Laser induced gene expression in specific cells of transgenic zebrafish. *Development.* 127:1953-60.
- Harris E. (2000) Cellular copper transport and metabolism. *Annu.Rev.Nutr.* 20:291-310.
- Hassett R. and Kosman D.J. (1995) Evidence for Cu(II) reduction as a component of copper uptake by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol.Chem.* 270:128-134.
- Heideger M.A. (1997) Membrane permeability. The diversity of transmembrane transport processes. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 9:543-546.
- Heredia, J.,Crooks,M.,Zhu,Z. (2001) Phosphorylation and Cu⁺ coordination-dependant DNA binding of the transcription factor Mac1p in the regulation of copper transport. *J.Biol.Chem.* 276:8793-8797.
- Huffman D.L. and O'Halloran T.V. (2001) Function, structure and mechanism of intracellular copper trafficking proteins. *Annu.Rev.Biochem.* 70:677-701.
- Iwama G., Vijayan M., Forsyth R. and Ackerman P. (1999) Heat shock proteins and physiological stress in fish. *Am. Zool.* 39:901-909.
- Kamunde C., Grosell M. and Wood C. (2002a) Copper metabolism in actively growing rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): interactions between dietary and waterborne copper uptake. *J Exp. Biol.* 2002;205:279-90.
- Kamunde C., Clayton C. and Wood C. (2002b) Waterborne v/s dietary copper uptake in rainbow trout and the effects of previous waterborne copper exposure. *Am. J. Physiol. Reg. Integrative Comp. Physiol.* 283: R69-R78

- Knighth S.A.B., Labbé S., Kwon L.F., Kosman D.J. and Thiele, D.J. (1996) A widespread transposable element masks expression of a yeast copper transport gene. *Genes Dev.* 10:1917-1929.
- Koch K.A., Pena M. and Thiele D.J. (1997) Copper-binding motifs in catalysis, transport, detoxification and signaling. *Chem. Biol.* 4: 549-560.
- Kuo Y., Zhou B., Cosco D. and Gitschier J. (2001) The copper transporter *Ctr1* provides an essential function in mammalian embryonic development. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98: 6836-6841.
- Labbé S., Zhu Z. and Thiele D.J. (1997) Copper-specific transcriptional repression of yeast genes encoding critical components in the copper transport pathway. *J. Biol. Chem.* 272:17711-17718.
- Lagos G. (2002) Estimación de la exposición humana al cobre en el agua potable. Seminario: Nuevas iniciativas en el sector minero. Sheraton, Stgo, Chile
- Lee J., Prohaska J.R., Dagenais S.L., Glover T.W. and Thiele D. (2000) Isolation of a murine copper transporter gene, tissue specific expression and functional complementation of a yeast copper transport mutant. *Gene* 254:87-96.
- Lee J., Prohaska J.R. and Thiele D. (2001) Essential role for mammalian copper transporter *Ctr1* in copper homeostasis and embryonic development. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98:6843-6847.
- Lee J., Petris M. and Thiele D. (2002) Characterization of mouse embryonic cells deficient in the *ctr1* high affinity copper transporter: identification of a *Ctr1*-independent copper transport system. *J. Biol. Chem.* 277:40253-9.
- Laurén D. and McDonald D. (1985) Effects of copper on branchial ionoregulation in the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson modulation by water hardness and pH. *J. Comp. Physiol.* 155: 635-644
- Lin C. and Kosman, D.J. (1990) Copper uptake in wild type and copper metallothionein-deficient *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 265:9194-9200
- Linder M.C., Wooten L., Cerveza P., Cotton S., Shulze R. and Lomeli, N. (1998) Copper transport. *Am. J. Clin. Nutr.* 67:965s-971s.
- Linder, M.C. (1991) *Biochemistry of copper*. Plenum Press, New York.
- Martis L.J., Jensen L.T., Simons J., Keller G.L., Winge D.R. (1998) Metalloregulations of *Fre1* and *Fre2* homologs in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 273:23716-23721

- Mazon F., Cerqueira C. and Fernandes M. (2002) Gill cellular changes induced by copper exposure in the South American tropical freshwater fish *Prochilodus scrofa*. *Environ. Res.* 88:52-63
- Mercer J., Livingstone J., Hall B., Paynter J., Begy C., Chandrasekharappa S., Lockhart P., Grimes A. and Bhawe M. (1993) Isolation of a partial candidate gene for Menkes disease by positional cloning. *Nat. Genet.* 3:20-5
- Misra S., Zafarulla M., Prince-Haughey J., Gedamu L. (1989). Análisis of stress-induced gene expresión in fish cell lines exposed to heavy metals and heat shock. *Biochim Biophys Acta* 1007: 325-333
- Moller L., Petersen C., Lund C. and Horn N. (2000) Characterization of the hCTR1 gene:genomic organization, functional expression, and identification os a high homologous processed gene. *Gene.* 257:13-22.
- Nelson N. (1999) Metal ion transporters and homeostasis. *EMBO Journal*, 28 :4361-4371.
- Ooi C.E., Ravinovich E., Dancis A., Bonifacino J.S. and Klausner R.D. (1996) Copper-dependant degradation of *Saccharomyces cerevisiae* plasma membrane copper transporter Ctr1p in the apparent absence of endocytosis. *EMBO J.* 15:3515-3523.
- Peña M.O. Maria, Lee Jaewon. And Thiele J. (1999) A delicate balance: homeostasis control of copper uptake and distribution. *J. Nutr.*129:1251-1260.
- Puig S., Lee J., Lau M. and Thiele D. (2002) Biochemical and genetic analyses of yeast and human high affinity copper transporters suggest a conserved mechanism for copper uptake. *J. Biol. Chem.* 227:26021-26030.
- Radisky D.C. and Kaplan,J. (1999) Regulation of transition metal transport across the yeast plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 274:4481-4484.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989) *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. Second Edition. Analysis of Genomic DNA by Southern Hybridization. pp9.31-9.58
- Sharp P. (2003). Ctr1 and its role in body copper homeostasis. *IJBCB.* 35: 288-291
- Stern B.R. (2000) International copper association environment program. Workshop on the Research Agenda for the Study of Copper Deficiency and Excess in Humans 1-27.
- Supek F., Supekova L., Nelson N. (1997) Function of metal -ion homeostasis in cell division cycle, mitochondrial protein processing, sensitivity to mycobacterial infection and brain functions. *J. Exp. Biol.* 200,321-330.

- Van Campen D.R., Mitchel, E.A. (1965) Absorption of Cu^{64} , Zn^{65} , Mo^{99} , and Fe^{59} from ligated segments of the rat gastrointestinal tract. *J. Nutr.* 86:120-124.
- Vulpe C., Levinson B., Whitney S., Packeman S. and Gitshier J. (1993) Isolation of a candidate gene for Menkes disease and evidence that it encodes a copper-transporting ATPase. *Nat Genet.* 3:7-13. Erratum in: *Nat. Genet.* 3:273.
- Winge D.R., Jensen L.T. and Srinivasan C. (1998) Metal-ion regulation of gene expression in yeast. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 58:165-195
- Woodward D., Farag A., Bergman H., Delonay A., Little E. and Smith E. (1995) Metals-contaminated benthic invertebrates in the Clark Fork River, Montana: effects on age -0 brown trout and rainbow trout. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 52:1994-2004
- Zhou B. and Gitshier J. (1997) hCTR1: A human gene for copper uptake identified by complementation in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94:7481-7486.

ANEXO 1

**“Cloning, expression pattern and essentiality of the High-Affinity
Copper Transporter 1 (*Ctr1*) gene in zebrafish”**

Trabajo aceptado en la revista Gene, Noviembre 2003.

**Cloning, expression pattern and essentiality of the
High Affinity Copper Transporter 1 (*ctr1*) gene in zebrafish.**

Natalia C. Mackenzie^a, Mónica Brito^a, Ariel E. Reyes^b, and Miguel L. Allende^{a*}

^aMillennium Nucleus in Developmental Biology,

Departamento de Biología

Facultad de Ciencias

Universidad de Chile, Casilla 653

Santiago, Chile

^bUniversidad Diego Portales, Facultad Ciencias de la Salud,

Ejercito 141, Santiago, Chile

*Corresponding author. Tel. (562)678-7390; fax: (562)276-3802; e-mail address:

mallende@machi.med.uchile.cl

Keywords: copper homeostasis, metal transport, morpholino, fish.

Abbreviations: *ctr1*, high affinity copper transporter 1; RT-PCR, reverse transcription polymerase chain reaction; MO, morpholino oligonucleotide; Mtf1, metal transcription factor 1; MRE, metal response element; RACE, rapid identification of cDNA ends; hpf, hours post fertilization; dpf, days post fertilization.

Abstract.

The high affinity copper transporter 1 (Ctr1) is a highly conserved transmembrane protein which mediates the internalization of copper ions from the extracellular medium. In this study, we have isolated the zebrafish *ctr1* gene. The zebrafish *ctr1* cDNA encodes a protein with 69% identity to the human orthologue and shows conservation of specific amino acid residues involved in copper transport. We find only a single *ctr1* gene in the zebrafish genome which maps to linkage group 5. The genomic structure of the zebrafish gene shows that it consists of five exons and that exon-intron boundaries are absolutely conserved with the mammalian *ctr1* genes. Expression in embryos was analyzed by RT-PCR and by in situ hybridization. Zebrafish *ctr1* is maternally loaded and transcripts can be detected throughout development and in adult fish. Distribution of *ctr1* message appears ubiquitous during early stages becoming restricted to the brain and ventral tissues by 24 h post fertilization. Beginning at 3 days post fertilization, expression is found mainly in the developing intestine. Specific knockdown of *ctr1* by antisense morpholino oligonucleotides causes early larval lethality. Defects include cell death in tissues where *ctr1* is most heavily expressed, a finding similar to that described for a mouse knockout of *mCtr1*. Despite the existence of at least one other copper transport mechanism in the fish, our studies show that zebrafish *ctr1* is an essential gene for development.

1. Introduction.

Living organisms require copper for their growth and development. Due to its high redox potential, copper is an essential cofactor for a variety of metabolic proteins while several human diseases are attributed to defects in copper metabolism. While having an essential role, excess copper is at the same time detrimental to cell survival due to its highly reactive nature. Copper acquisition into eukaryotic cells is achieved through a number of transporters. In vertebrates, dietary copper is transported mainly through the high affinity copper transporter 1 (Ctr1) or through the divalent metal transporter (DMT1). While DMT1 has been shown to transport a range of divalent metals, Ctr1 appears to be copper-specific (reviewed by Sharp, 2003). The *Ctr1* gene is highly conserved from yeast to mammals. In yeast, *yCtr1* is finely regulated at the transcriptional and post-transcriptional levels by copper availability. The MAC1 transcription factor can bind to promoter elements in copper transport pathway genes, including *Ctr1*, modulating transcription (Labbé et al., 1997; Yamaguchi-Iwai et al., 1997). *yCtr1* function is also negatively regulated through endocytosis and degradation of MAC1p and of *yCtr1p* itself (Ooi et al., 1996; Zhu et al., 1998; Yonkovitch et al., 2002). In mammals, there is no evidence for transcriptional regulation of *Ctr1* by copper availability (Lee et al., 2000; Tennant et al., 2002). However, Ctr1 protein undergoes changes in subcellular localization and stability in response to copper levels (Petris et al., 2003).

The *Ctr1* gene has been shown to be essential for viability in the mouse (Lee et al., 2001; Kuo et al., 2001). *Ctr1* deficient mice die early in gestation while

heterozygous animals, though viable, show increased sensitivity to low copper levels in the diet and accumulate lower copper levels in some tissues.

Despite these studies, there have been only a limited number of approaches addressing the effects of altered copper metabolism in embryonic development and most of these have focused on acute toxicity and essentiality issues (Brinster and Cross, 1972; Kelly and Palmiter, 1996; Ralph and McArdle, 2001). In mammals copper is absorbed exclusively through the diet facilitating the establishment of experimental conditions, though the analysis of the effects on embryogenesis is particularly complex as the mammalian embryo develops *in utero*.

Fish have been used extensively in aquatic toxicology studies and there is a large body of literature addressing the effect of waterborne metals on fish physiology (Rougier, et al. 1996; Dethloff, et al., 1999; McGeer et al., 2000; Beaumont et al., 2000; Kamunde et al., 2002b; Bury et al., 2002). In particular, studies on copper absorption in fish have revealed that, uniquely among vertebrates, there are two routes through which the metal can become metabolically available: waterborne copper enters through the gills while dietary copper does so through the intestine (Grosell and Wood, 2002; Kamunde et al., 2002a,b). Despite these studies, molecular aspects of copper physiology in fish have been lacking. Moreover, there have been few studies on the effect of metals on embryonic development of fish. We have chosen to use the zebrafish as a model for copper metabolism studies, in particular, to address this problem during embryonic development. Zebrafish embryos are large, transparent and

develop extremely rapidly. A single female can lay ~200 eggs per day and the embryos hatch after 48 hours of external development. At 5 days they have formed all major organs, they begin to feed and become sexually mature at 3 months of age. The zebrafish also offers excellent properties for genetics: mutants, transgenesis, and gene knockdown methods are available while a genome project has recently provided a first draft of the entire genome sequence.

In this work, we have cloned the zebrafish high affinity copper transporter 1 gene (*ctr1*) and we characterize its expression. *Ctr1* is ubiquitously expressed from the beginning stages of embryogenesis becoming restricted to certain tissues as development proceeds. Loss of function of *ctr1* is lethal at early larval stages causing widespread developmental defects and cell death. The high degree of homology of the fish *ctr1* gene with its mammalian counterparts validates using fish as models for understanding the molecular basis for copper ion regulation.

2. Materials and Methods

2.1. Animals and embryo stains.

Fish and embryos were maintained in our own facility according to standard procedures (Westerfield, 1995). Embryos were raised at 28⁰ C and fixed for *in situ* hybridization in 4% paraformaldehyde. Hybridizations were performed as described (Jowett and Lettice, 1994). For immunostaining, we followed the protocol described in Schulte-Merker (2002). The anti-myc antibody (Sigma) was

used at a dilution of 1:200. The secondary antibody is an anti-mouse IgG (Amersham).

Embryos were mounted in glycerol and photographs were taken with a Leica DC300F digital camera on a Leica MZ12.5 Stereo-microscope or on an Olympus CX31 microscope.

2.2. Molecular Methods.

The cloning of zebrafish *ctr1* was done by 3'RACE (Gibco) according to the manufacturers' instructions. The primers used were the universal amplification primer (UAP) and the forward primers F1 5'-ACCATGTCGAGGAGACAACCAT-3'; F2, 5'-CAGCTGCAGATGGGGGTCATTTAACGA-3' and F3, 5'-GGCCACGGAGATCACATGATG-3' which were designed based on an EST sequence (accession number BF717529) present in the database. To amplify the entire gene, RT-PCR was performed using the following primers: F0, 5'-TGACATTTCTGTGGTTGAACAG-3' and R3, 5'-GTTAATGACAGT GTTCTGTAATATC-3'. The amplified fragment was subcloned and sequenced, and the sequence was deposited in the Genbank database under accession number AY077715. For all subsequent RT-PCR experiments we used primers F0 and R3. β -actin primers are identical to those described by Chen et al. (2002): forward 5' GTCCCTGTACGCCTCTGGTCG 3' and reverse 5' GCCGGACTIONCATCGTACTCCTG 3'.

To construct the *ctr1*-myc fusion protein we amplified the coding region of *ctr1* using primers F and R which introduce BamH1 and Cla1 restriction sites.

This fragment was cloned into the appropriate sites in the pCS2+MT vector which fuses 6 myc epitope tags to the C terminus of the translated Ctr1 protein. The recombinant plasmid was linearized with XbaI and *in vitro* transcription was carried out using SP6 RNA Polymerase (Fermentas) and Cap analog (New England Biolabs).

Morpholino oligonucleotides (MOs) were purchased from Gene Tools, Inc. The sequence of the *ctr1* MO used in this study is: 5'-GGTGATGTGAATGTGACGAATCCAT-3', while the negative control MO was provided by the manufacturer.

2.3. Sequence analysis.

Protein sequences were aligned using the CLUSTAL algorithm (Thompson et al., 1994). Prediction of transmembrane domains was done using the TOPPRED program (von Heijne, 1992). Homology searches were carried out using BLAST (Altschul et al., 1990) and zebrafish genomic sequence analysis was obtained from the Sanger Center web site (http://www.sanger.ac.uk/Projects/D_rerio/). All sequences were handled with the EdtiSeq software (DNASTAR, Inc.).

2.4. Microinjection of nucleic acids.

Zebrafish embryos were injected with 5nL of solution at the one cell stage in their chorions using pulled glass microcapillary pipets and a Narshige microinjector. MOs were dissolved in Danieau medium as per the

manufacturers' instructions. Prior to injecting, phenol red was added to 10%. MOs were injected at a concentration of 0.5mM. *In vitro* synthesized mRNA was diluted in water containing 10% phenol red and was injected at a concentration of 100µg/ml. For co-injection experiments, the final concentration of mRNA was 100µg/ml and of MO was 0.5mM. Embryos were raised to the required stage and processed. In all experiments, observed effects were evident in at least 90% of the embryos.

3. Results.

3.1. cDNA cloning and sequence of the zebrafish ctr1 gene

An EST sequence showing high similarity to mammalian *Ctr1* genes was found in the Genbank database (Accession Number BF717529). Based on this partial sequence we designed oligonucleotides for Polymerase Chain Reaction (PCR). The cloning of the zebrafish *ctr1* gene was performed by 3' rapid amplification of cDNA ends (3'RACE) and nested PCR using cDNA prepared from 48 hours post fertilization (hpf) zebrafish embryos. We obtained a 655bp fragment (Genbank Accession Number AY077715) that, when translated, showed 68% identity with rat *Ctr1* (r*Ctr1*) and 69% identity with human *Ctr1* (h*Ctr1*) (Fig. 1a). We analyzed the deduced zebrafish *Ctr1* amino acid sequence to search for hydrophobic stretches which could be transmembrane domains (von Heijne, 1992; <http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/toppred.html>, KD-scale). We find three transmembrane domains located at the same positions as those described in yeast and human (Puig *et al.*, 2002). In addition, four

Methionine residues, shown to be important for Copper binding and uptake in human Ctr1 (Puig et al., 2002), three of which are absolutely conserved in all known Ctr1 proteins, are present in the zebrafish sequence (Fig.1a). A single gene is found when we search the zebrafish genome with this cDNA sequence. These results indicate that the gene we have cloned is the zebrafish ortholog of the high affinity copper transporter 1 (*ctr1*) gene of mammals and yeast.

3.2. Genomic location and structure of zebrafish *ctr1*

To assign the *ctr1* gene to one of the zebrafish linkage groups, we obtained a map location by using a commercially available Radiation Hybrid Panel (Kwok et al., 1998). The PCR data was run through the Instant Mapper software (<http://134.174.23.167/zonrhmapper/instantMapping.htm>). The computer program predicts that the zebrafish *ctr1* gene is located in Linkage Group 5 (LG5), 12cR from marker z5538 (LOD score= 12.913) and 16cR from marker fa12a02 (LOD score= 11.967)(Fig. 1d). We searched the database (http://pre.ensembl.org/Danio_rerio/blastview) using the zebrafish *ctr1* cDNA and we retrieved genomic sequence corresponding to this gene. We compared the *ctr1* genomic structure to the human and mouse *ctr1* genomic sequences. The mammalian *ctr1* genes are split into 5 exons, 4 of which are coding (Moller et al., 2000; Lee et al., 2000), which is identical to the zebrafish structure (Fig. 1b). Likewise, exon borders in the coding region are coincident among *ctr1* genes in all three species; splice junction sequences conform to the consensus (Fig. 1c). We also examined the zebrafish genomic sequence which lies upstream of the

first exon to search for known regulatory elements. We searched for two motifs, MRE and CuRE, which are binding sites for the copper-responsive transcription factors Mtf1 and MAC1, respectively. The CuRE element (TTTGCTC) has been described to be present upstream of the yeast *ctr1* gene (Labbé et al., 1997) while the MRE element (TGCRNC) is found in a number of metal responsive genes such as metallothioneins (Saydam et al., 2002). In a 48 kilobase stretch of 5' sequence we find four CuRE elements (positions -6763, -13632, -19563, -41495) and in a 10kB proximal stretch five MRE sites (positions -434, -2088, -2962, -4064, and -8577). However, we have not been able to show that the zebrafish *ctr1* gene is transcriptionally copper-inducible (NM and MA, unpublished results) and therefore, the biological significance of these elements is uncertain.

3.3. Temporal and spatial expression pattern

We analyzed the temporal and spatial expression of *ctr1* messenger RNA (mRNA) during embryogenesis by performing RT-PCR and *in situ* hybridization. Results of the RT-PCR (Figure 2) show that expression of the gene starts at 0 hours post-fertilization (hpf) indicating that *ctr1* mRNA is maternally inherited. We also tested 5 hpf, 12 hpf, 24 hpf, 48 hpf, 5 days post fertilization (dpf) embryos and adult zebrafish, detecting bands of the predicted size in all of the stages (Fig. 2a and 2b). We determined the expression in adult fish of *ctr1* in gills, head, ovary and gut by RT-PCR (Fig. 2b). Though a strictly quantitative analysis was not

performed, the gut sample consistently appears to have the highest amounts of *ctr1* message compared to the other organs analyzed.

For *in situ* hybridization we used an antisense RNA probe made with the 655bp zebrafish *ctr1* cDNA that we cloned. Control hybridizations with sense probe yield no label in the embryos (not shown). Whole-mounts and sections reveal *ctr1* mRNA in 16 hpf, 24 hpf, 48 hpf and 3.5 dpf embryos (Figure 3). 16hpf embryos show ubiquitous mRNA distribution (Fig. 3a). By 24hpf the expression becomes more restricted to the ventral body and the head (Fig. 3b, c). Transverse sections of 24hpf embryos reveal mRNA in the region next to the yolk, corresponding to endodermal tissue (Fig. 3d-f). Expression also can be observed in the forebrain, in the olfactory bulb region and ganglion cell layer in the eye (Fig.3g, plane of section shown in panel b). In 48hpf embryos the expression is less diffuse (Fig. 3h), becoming more restricted by 3.5dpf, in which *ctr1* mRNA is localized in the developing intestine (Fig. 3j). This is more evident in longitudinal (Fig. 3i) and transverse sections (Fig. 3k, l). These results are consistent with the reported expression of mammalian *ctr1* in rat (Kuo *et al*, 2001). These authors describe diffuse expression of the gene during embryogenesis, becoming enhanced in particular tissues –including the intestine- at advanced embryonic stages.

3.4. Knockdown of *Ctr1* protein

To study the function of the zebrafish *ctr1* gene, we used Morpholino oligonucleotides (MOs) which specifically inhibit translation of targeted mRNAs

(Nasevicius and Ekker, 2000). Injection of 5pg of *ctr1* MO produced severe defects in head development which become apparent at 48 hpf (Figure 4a). To ascertain the specificity of the observed effects we performed experiments with control MOs which did not produce any detrimental effects on embryonic development. Furthermore, to confirm that the *ctr1* MO blocked Ctr1 protein expression, we constructed a fusion gene that contained the *ctr1* gene and the myc epitope coding sequence. Injection of *in vitro* transcribed RNA from this construct produced protein detectable with an anti-myc antibody at 24 hpf (Fig. 4d and f); when this mRNA was co-injected with *ctr1* MO, there was no detectable protein expression in immunostained embryos (Fig. 4c and e). In addition, co-injection of the *ctr1* MO with the *ctr1*-myc RNA, when analyzed after 48 hpf, rescues the effects produced by the MO alone confirming the specificity of the effect (data not shown).

In *ctr1*-MO injected embryos, affected structures corresponded mainly to the head which appears reduced compared to controls. There is also a strong reduction in the size of the eyes in MO-injected embryos. (Fig 4a). At 72hpf, *ctr1*-MO injected embryos are severely retarded and die shortly thereafter. We determined whether particular tissues were undergoing cell death in the injected embryos by using the vital stain acridine orange. Strong fluorescence can be observed after acridine orange staining at 48 hpf in *ctr1*-MO injected embryos compared to controls (Fig. 4b). Staining is strongest in the brain and spinal cord suggesting that neural tissue is the most sensitive to loss of *ctr1* function.

4. Discussion.

We have cloned a zebrafish gene highly homologous to the mammalian High Affinity Copper Transporter 1 which we have named zebrafish *ctr1*. Analysis of the protein sequence shows conservation of functional features such as the three transmembrane domains and critical Methionine residues that are involved in copper binding and transport. Furthermore, the genomic structure of zebrafish *ctr1* is identical to that of the human and murine orthologs as intron-exon boundaries are absolutely conserved, indicating that the gene described in this work is the fish *ctr1* ortholog.

We searched the sequence upstream of the first exon in the zebrafish *ctr1* gene for regulatory elements which are recognized by copper inducible transcription factors. We found a number of putative *cis*-acting elements corresponding to the binding sites for Mtf1, called MRE and for MAC1 called CuRE. In yeast, the 5' regulatory regions of the CTR1, CTR3 and FRE1 genes contain a CuRE element which is essential for transcriptional up-regulation in response to copper starvation and for repression under conditions of copper excess (Labbé et al., 1997). However, in mammals, the *Ctr1* gene does not appear to be regulated by copper availability at the transcriptional level (Lee et al., 2000) but rather through the protein's localization and/or stability (Petris et al., 2003). We find both CuRE and MRE consensus type elements upstream of the zebrafish transcriptional start site but the biological significance, if any, of these sequences awaits functional analysis. Moreover, we have found no evidence that zebrafish *ctr1* is modulated at the transcriptional level by intracellular copper

availability. In zebrafish embryos, high concentrations of copper in the growth medium (100 μ M of CuSO₄) are more than sufficient to induce the expression of metallothionein and stress response genes (Hsp70) and cause the embryos to accumulate the metal endogenously (N.M., A.R. and M.A., manuscript in preparation). Therefore, it is likely that transcription of the zebrafish *ctr1* gene is not inducible or repressible by copper under the conditions tested.

During zebrafish embryonic development, *ctr1* is present at all stages examined by RT-PCR and *in situ* hybridization. In early embryogenesis, expression is homogeneously distributed, which may be due to inheritance of maternal message. After 24 hpf, the distribution of mRNA becomes localized to the ventral body and ends up predominantly in the intestinal region. The intestine continues to strongly express *ctr1* message up to adulthood though other tissues contain levels of message detectable by RT-PCR.

This pattern of expression can be compared to that described for mouse in which m*Ctr1* mRNA is initially distributed in a diffuse and widespread pattern but becomes progressively enriched in the intestine, kidney and choroid plexus (Kuo et al., 2001). The similarity in the expression pattern between both species could indicate that, in early embryos, *ctr1* is required at high levels in all cells and that, after organogenesis, the main copper uptake functions are localized to the gut and associated organs.

Previous studies in teleosts, mainly the trout, have shown that copper uptake occurs both via the gills, in the case of waterborne copper (Grosell and Wood, 2002), and the intestine, in the case of dietary copper (Clearwater et al.,

2000). At normal levels of copper in the water and in the diet, intestinal uptake appears to be the dominant pathway (Kamunde et al, 2002b). However, in the face of disturbance, there are compensatory mechanisms that tightly regulate the intake of copper in both tissues –particularly the gills, less so for the gut- and there are interactions between the two systems (Kamunde et al., 2002a, b). There have been few studies that address the transport mechanisms operating in the fish intestine. Copper uptake through the apical membrane of enterocytes may be through simple diffusion but basolateral membrane transfer of the metal into the circulation is via a regulated transport mechanism (Clearwater et al., 2000). Our finding that the intestine is the major post-embryonic expression site for *ctr1* in zebrafish is suggestive that dietary copper transport could be mediated by the Ctr1 protein.

In the case of the gill, Grosell and Wood (2002) propose that a fraction of the copper that enters the circulation from waterborne sources, is transported via an apical Na channel. Their studies show that copper transport is competitively inhibited by sodium and sodium channel blockers. However, sodium insensitive transport of copper also exists in the gill and *ctr1* has been suggested as the transporter involved (Grosell and Wood, 2002). Our RT-PCR experiments show the presence of zebrafish *ctr1* mRNA in the gills though analysis at the protein level and physiological experiments are required to determine whether it is a key player in this process.

We find that there is a single *ctr1* gene in the zebrafish genome (as sequenced to date) and we show that *ctr1* is essential for zebrafish development

as is the case in mouse (Lee et al., 2001; Kuo et al., 2001). While *ctr1* mutant mice die during gestation, zebrafish *ctr1* knockdown embryos develop normally until the posthatching (organogenesis) stages indicating a late requirement for this gene. As an explanation for this difference, we propose the following possibilities: i) the fish has alternative mechanisms for copper absorption such as other transporters (see for example Lee et al., 2002), ii) there is an intracellular copper store (arising from the yolk) that can supply the needs of the developing fish for several days or iii) the fish embryo has a lesser requirement for copper during early development. Studies addressing the copper requirements of fish embryos may help to clarify this point.

In *ctr1* knockdown fish, the most obviously affected structures are the head, eyes and CNS; these defects could be due mainly to cell death in these tissues as evidenced by staining with acridine orange. These tissues coincide with the highest expression levels observed for the *ctr1* message.

In this work we have described, to our knowledge, the first copper transporter cloned in fish. In *Danio rerio*, an iron transporter (ferroportin) has been identified previously through a mutagenesis screen (Donovan et al., 2000). The ferroportin gene is expressed predominantly in ventral structures such as the yolk syncytial layer and in the brain. The mutant embryos die during the larval stages because of severe anemia caused by the lack of iron transport from the yolk into the circulation. Similarly, *ctr1* deficient embryos could fail to transport copper from yolk stores or the growth medium causing lethality. Future studies will be aimed at determining the extent of the copper deficiency in *ctr1* loss of

function animals. In addition, it will be important to determine if *ctr1* is regulated at the transcriptional, translational or post-translational level and to specify the physiological role of *ctr1* in fish copper homeostasis.

Acknowledgements

We are grateful to Chris Wood and Dennis Thiele for helpful comments on the manuscript. We thank Florencio Espinoza for technical help and Claudia d'Alençon and Carmen G. Feijóo for expert fish care. MA was supported by a grant from the International Copper Association and by the Millennium Scientific Initiative (ICM P99-137-F). AR was supported by a postdoctoral fellowship from Conicyt (3010065).

Legends to the figures

Figure 1.

Deduced protein sequence, genomic structure and mapping of the zebrafish *ctr1* gene. a), Zebrafish copper transporter 1 protein sequence (zctr1) aligned with the rat (rctr1) and human (hctr1) orthologues. Asterisks (*) show identities between the three sequences. Arrowheads indicate the four conserved methionines; the three predicted transmembrane domains (TMD) are outlined by boxes. b), Zebrafish *ctr1* genomic structure. Genomic sequences obtained from the database were aligned with the cDNA sequence to deduce the intron-exon structure. The ATG is in the second exon; the coding region is colored red. Transmembrane domain 1 (TMD1) is encoded in exon 4 and transmembrane

domains 2 and 3 (TMD2 and TMD3) in exon 5. Numbers indicate sizes of introns in bp. c), exon-intron junction sequences. Uppercase letters correspond to exon sequences while lowercase letters correspond to intron sequences. Splice donor and acceptor sites are underlined. d), Genomic mapping of *ctr1* locus. Markers neighboring the *ctr1* locus are shown in a region of chromosome 5.

Figure 2.

Expression of *ctr1* during embryonic development. a), Expression of *ctr1* at different stages of development assayed by RT-PCR from total RNA prepared from the indicated stages. The expected size band appears in all stages analyzed. b), Expression of *ctr1* in different adult tissues. Total RNA was prepared from the indicated tissues, whole embryos (24hpf, 5dpf) or whole adult fish (ad) for RT-PCR (upper panel). As a control, the same samples were assayed for β -actin mRNA expression (lower panel). hpf, hours post-fertilization; dpf, days post-fertilization.

Figure 3.

Whole mount *in situ* hybridization. Distribution of the *ctr1* message was analyzed at different stages. a), 16hpf; b) to g), 24 hpf; h) 40hpf; and i) to l) 3.5 dpf. At early stages expression of *ctr1* is ubiquitous (a), becoming more restricted ventrally by late embryogenesis (b to g). Transverse sections at 24hpf present strong staining close to the yolk (arrow in d) surrounding the notochord (arrow in f). An oblique section (g, represented by the line in b) shows strong expression in

the eyes and nasal area of the brain. Strong ventral expression remains at 40hpf (h, arrow). The 3.5 dpf embryos show restricted expression in the intestine, as seen in dorsal (j lower), and lateral (arrow in j upper) whole mount embryos. This expression can also be seen in longitudinal (arrow in i) and transverse (k, arrow; l, higher magnification) sections.

Figure 4.

Zebrafish *ctr1* loss of function experiments. (a) Control and morpholino (MO)-injected living embryos are shown. Uninjected (U), buffer injected (B), control morpholino injected (C) and *ctr1* morpholino injected (MO) embryos were grown to 3 dpf and analyzed for the presence of morphological defects. Note the abnormal body shape and the small size of the head and eyes in the *ctr1*MO injected embryos compared to controls. (b) Acridine orange stain. Control (upper) and *ctr1*MO injected (lower) live embryos were stained with Acridine Orange to visualize the presence of cell death. Note the heavy fluorescence in *ctr1*MO injected embryos, mostly in the brain (arrow) and spinal cord (arrowhead). (c to f) *ctr1*MO specifically blocks Ctr1 protein translation. Embryos were injected with RNA encoding *ctr1* fused in frame to the myc epitope and were fixed and stained for myc protein at 24hpf. Panels d and f show embryos injected with the *ctr1*-myc RNA alone while panels c and e show embryos coinjected with *ctr1*-myc RNA and *ctr1*MO. Note the absence of myc stain in the coinjected embryos.

References.

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403-410.

Beaumont, M., Butler, P. and Taylor, E. 2000. Exposure of brown trout (*Salmo trutta*) to a sublethal concentration of copper in soft acid water: effects upon muscle metabolism and membrane potential. *Aquat. Toxicol.* 51:259-272.

Brinster, R., and Cross, P. 1972. Effect of copper on the preimplantation mouse embryo. *Nature* 238:398-399.

Bury, N., Walker, P., Glover, C. 2002. Nutritive metal uptake in teleost fish. *J. Exp. Biol.* 206:11-23.

Chen, W., John, J., Lin, C-H., and Chang, C-Y. 2002. Molecular cloning and developmental expression of zinc finger transcription factor MTF-1 gene in zebrafish, *Danio rerio*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 291:798-805.

Clearwater, S.J., Baskin, S.J., Wood, C.M., McDonald, D.G. 2000. Gastrointestinal uptake and distribution of copper in rainbow trout. *J. Exp. Biol.* 203:2455-66.

Dethloff, G., Schlenk, D., Hamm, J., and Bailey, H. 1999. Alterations in physiological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with exposure to copper and copper-zinc mixtures. *Ecotoxicol. Environ. Safety* 42:253-264.

Donovan, A., Brownlie, A., Zhou, Y., Shepard, J., Pratt, S., Moynihan, J., et al. 2000. Positional cloning of zebrafish *ferroportin1* identifies a conserved vertebrate iron exporter. *Nature* 403:776-781.

Grosell, M., and Wood, C. 2002. Copper uptake across rainbow trout gills: mechanisms of apical entry. *J. Exp. Biol.* 205:1179-1188.

Jowett, T., and Lettice, L. 1994. Whole-mount in situ hybridizations on zebrafish embryos using a mixture of digoxigenin- and fluorescein-labelled probes. *Trends Genet.* 10:73-74.

Kamunde, C., Grosell, M., Higgs, D., and Wood, C. 2002a. Copper metabolism in actively growing rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): interactions between dietary and waterborne copper uptake. *J. Exp. Biol.* 205:279-290.

Kamunde, C., Clayton, C., and Wood, C. 2002b. Waterborne vs. dietary copper uptake in rainbow trout and the effects of previous waterborne copper exposure. *Am. J. Physiol. Reg. Integrative Comp. Physiol.* 283:R69-R78.

Kelly, E., and Palmiter, R. 1996. A murine model of Menkes disease reveals a physiological function of metallothionein. *Nature Genet.* 13:219-222.

Kuo, Y-M., Zhou, B., Cosco, D., and Gitschier, J. 2001. The copper transporter CTR1 provides an essential function in mammalian embryonic development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:6836-6841.

Kwok, C., Korn, R.M., Davis, M.E., Burt, D.W., Critcher, R., McCarthy, L., Paw, B.H., Zon, L.I., Goodfellow, P.N., and Schmitt, K. 1998. Characterization of whole genome radiation hybrid mapping resources for non-mammalian vertebrates. *Nuc. Acids Res.* 26:3562-3566.

Labbé, S., Zhu, Z., and Thiele, D. 1997. Copper-specific transcriptional repression of yeast genes encoding critical components in the copper transport pathway. *J. Biol. Chem.* 272:15951-15958.

Lee, J., Prohaska, J., Dagenais, S., Glover, T., Thiele, D.J. 2000. Isolation of a murine copper transporter gene, tissue specific expression and functional complementation of a yeast copper transport mutant. *Gene* 254:87-96.

Lee, J., Prohaska, J., and Thiele, D. 2001. Essential role for mammalian copper transporter Ctr1 in copper homeostasis and embryonic development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:6842-6847.

Lee, J., Petris, M., and Thiele, D. 2002. Characterization of mouse embryonic cells deficient in mouse *ctr1* high affinity copper transporter: identification of a *ctr1*-independent copper transport system. *J. Biol. Chem.* 277:40253-40259.

McGeer, J., Szebedinszki, C., McDonald, D., Wood, C. 2000. Effects of chronic sublethal exposure to waterborne Cu, Cd or Zn in rainbow trout 2: tissue specific metal accumulation. *Aquatic Toxicol.* 50:245-256.

Møller, L.B., Petersen, C., Lund, C., and Horn, N. 2000. Characterization of *hCTR1* gene: Genomic organization, functional expression, and identification of a highly homologous processed gene. *Gene* 257:13-22.

Nasevicius, A., and Ekker, S.C. 2000. Effective targeted gene 'knockdown' in zebrafish. *Nature Genet.* 26:216-20.

Ooi, C.E., Rabinovich, E., Dancis, A., Bonifacino, J.S., and Klausner, R.D. 1996. Copper-dependent degradation of the *Saccharomyces cerevisiae* plasma membrane copper transporter *Ctr1p* in the apparent absence of endocytosis. *EMBO J.* 15:3515-3523.

Petris, M.J., Smith, K., Lee, J., and Thiele, D. 2003. Copper-stimulated endocytosis and degradation of the human copper transporter, *hCtr1*. *J. Biol. Chem.* 278: 9639-9646.

Puig, S., Lee, J., Lau, M., and Thiele, D.J. (2002). Biochemical and genetic analysis of yeast and human high affinity copper transporters suggest a conserved mechanism for copper uptake. *J. Biol. Chem.* 277:26021-26030.

Ralph, A., and McArdle, H. 2001. Copper metabolism and copper requirements in the pregnant mother, her fetus, and children. A critical review. Report edited by the International Copper Association, New York, NY.

Rougier, F., Menudier, A., Bosgiraud, C., and Nicholas, J. 1996. Copper and zinc exposure of zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan): effects in experimental listeria infection. *Ecotoxicol. Environ. Safety* 34:134-140.

Saydam, N., Adams, T.K., Steiner, F., Schaffner, W., and Freedman, J.H. 2002. Regulation of metallothionein transcription by the metal-responsive transcription factor MTF-1. *J. Biol. Chem.* 277:20438-20445.

Sharp, P.A. 2003. Ctr1 and its role in body copper homeostasis. *Int. J. Biochem. & Cell Biol.* 35:288-291.

Schulte-Merker, S. 2002. Looking at Embryos. In: "Zebrafish", Nüsslein-Volhard and Dahm, Editors. Oxford University Press, Inc. New York.

Tennant, J., Stansfield, M., Yamaji, S., Srai, S., and Sharp, P. 2002. Effects of copper on the expression of metal transporters in human intestinal Caco-2 cells. *FEBS Lett.* 527:239-244.

Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nuc. Acids Res.*, 22:4673-4680.

von Heijne, G. 1992. Membrane protein structure prediction: hydrophobicity analysis and the "positive inside" rule. *J. Mol. Biol.* 225:487-494.

Westerfield, M. 1995. *The Zebrafish Book*. University of Oregon Press, Eugene.

Yamaguchi-Iwai, Y., Serpe, M., Haile, D., Yang, W., Kosman, D.J., Klausner, R.D., and Dancis, A. 1997. Homeostatic regulation of copper uptake in yeast via direct binding of MAC1 protein to upstream regulatory sequences of FRE1 and CTR1. *J. Biol. Chem.* 272:17711-17718.

Yonkovich, J., McKendry, R., Shi, X., and Zhu, Z. 2002. Copper ion-sensing transcription factor Mac1p post-translationally controls the degradation of its target gene product Ctr1p. *J. Biol. Chem.* 277:23981-23984.

Zhu, Z., Labbé, S., Peña, M., and Thiele, D. 1998. Copper differentially regulates the activity and degradation of yeast Mac1 transcription factor. *J. Biol. Chem.* 273:1277-1280.

a

```

zctr1  --MDSSSHHHVEETTMPSPASGDHGGHLTTTGNHG----DHMMM▼▼QMTFYFGYKNVEL 54
hctr1  ----MDHSHHMGMSYMDSNSTMQPSHHHPTTSASHSHGGGDSMMMMPMTFYFGFKNVEL 56
rctr1  MRMNHMEMHHMGMNHTDDNITMPP-HQHPTTSASHSH-----EMMMPMTFYFGFKNVDL 53
          **                * **                *** * * * * * * * * *

                                TMD 1
zctr1  LFAGLVINTFGEMAGACIGVFLAVLYEGLKIGREVLLRNQVNVRYNSMPVPGSDGTVL 114
hctr1  LFSGLVINTFGEMAGAFVAVFLLAMFYEGLKIARESLLRKSQVSIRYNSMPVPGPNGTIL 116
rctr1  LFSSLVINTFGEMAGAFVAVFLLAMFYEGLKIAREGLLRKSQVSIRYNSMPVPGPNGTIL 113
          ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

                                TMD 2 ▼ ▼                                TMD 3
zctr1  METHKTVGQRMLSMAHFLQTVLLHI IQVVVSYFLMLVFMTYNGYLCIAVAAGAGLGYFLFS 174
hctr1  METHKTVGQQLSFPHLQTVLHI IQVVISYFLMLIFMTYNGYLCIAVAAGAGTGYFLFS 176
rctr1  METHKTVGQQLSFPHLQTVLHI IQVVISYFLMLIFMTYNGYLCIAVAAGAGTGYFLFS 173
          ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

zctr1  WKKAVVVDITEHCH 188
hctr1  WKKAVVVDITEHCH 190
rctr1  WKKAVVVDITEHCH 187
          *****

```

b

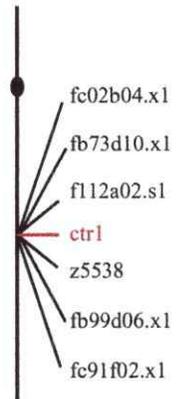


c

Exon1...TGGgtga...Intron1...taagCAT....Exon2
 Exon2...ATGgtga...Intron2...gcagCAA...Exon3
 Exon3...GAGgtga...Intron3...gtagAGA...Exon4
 Exon4...CGGgtca...Intron4...ccagCCA....Exon5

d

CHROMOSOME 5



1 Mockuzie et al.

Fig. 2. Mackenzie et al.

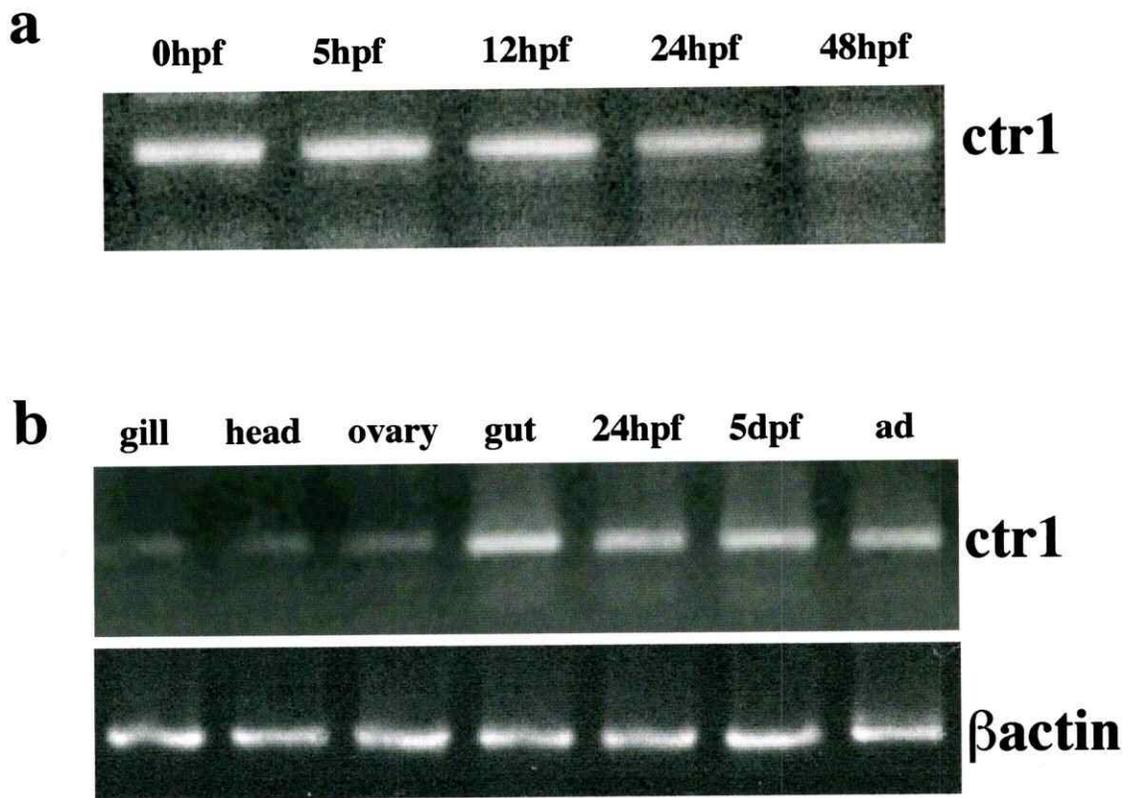


Fig. 4. Mackenzie et al.

