

UCH-FC
Biotecnología
E774
C.1



UNIVERSIDAD DE CHILE FACULTAD DE CIENCIAS ESCUELA DE PREGRADO

“Caracterización del gen *csrnp1a* en el desarrollo embrionario de pez cebra”

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

Jaime Adolfo Espina Hidalgo

Director de Seminario de Título: Dr. Álvaro Glavic

Junio 2010
Santiago - Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el Sr. Jaime Adolfo Espina Hidalgo.

“Caracterización del gen *Danio rerio* similar to *csnp-3* en el desarrollo embrionario de pez cebra”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

Dr. Alvaro Glavic
Director Seminario de Título

Firma manuscrita de Alvaro Glavic en tinta azul sobre una línea horizontal.

Dra. Carmen Feijóo
Co-Directora

Firma manuscrita de Carmen Feijóo en tinta azul sobre una línea horizontal.

Comisión de Evaluación

Dr. Miguel Allende
Presidente Comisión

Firma manuscrita de Miguel Allende en tinta azul sobre una línea horizontal.

Dr. Ariel Reyes
Evaluador

Firma manuscrita de Ariel Reyes en tinta azul sobre una línea horizontal.

Santiago de Chile, agosto de 2010



Oh Musas, con que frase imperecedera debiera comenzar a hablar de tal héroe. Jaime Adolfo Espina Hidalgo, esforzado joven proveniente de la bien edificada Quinta Normal; nacido un 19 de Marzo de 1987; hijo ilustre de Marta Hidalgo Estay, musa entre las mortales, y Jaime Espina Díaz, varón igual a un Dios. ¡Tales padres tuvo!, y ambos, aunque humildes fueron capaces, no sin sacrificio, de dar a Jaime todo cuanto necesitó. Más ea, hablemos de quién hoy nos convoca, puesto que la leyenda que se evoca tiene su comienzo, cuando en su nacimiento, es el mismísimo Apolo quién pone en el alma de Jaime la semilla de la curiosidad, la cuál germinó en los primeros años de su vida, creció en tiempos de su primera instrucción, en las magníficas paredes del colegio Elvira Hurtado de Matte, y floreció cuando el Hado del Destino conmovió su corazón dirigiendo su suerte, en octavo básico, a glorioso curso de biotecnología

generado desde las aulas de la Universidad Vicente Perez Rosales, el cuál a Jaime impactó, como cuentan las epopeyas, marcando el hito que orientase su vocación.

Ya en el cambio de Milenio, es recibido en el imponente Liceo José Victorino Lastarria, recinto donde conoció algunos de sus más caros amigos. Fue aquél místico palacio, al cuál rinde honores hasta el día de hoy, el que avivó su gusto por la Biología Molecular y dióle los elementos que le permitirían, con esfuerzo y ayuda divina, entrar a la Universidad de Chile a estudiar lo que cuatro años antes el Hado había insinuado, pero actualmente Jaime había decidido: Ingeniería en Biotecnología Molecular.

Finalmente, en la sacra facultad de ciencias, encontróse el esforzado héroe junto a mortales que comparten su curiosidad y aún hoy una carísima amistad. Más en semejante ciudadela Jaime no sólo recibió la instrucción practica de futura labor, sino que también aquellas murallas forjaron las herramientas de su pensar, y son las que hoy usa, encomendándose a la veneranda Atenea, para finalizar esta, su Tesis.

*Esta Tesis la dedico a mis
padres por el incondicional
apoyo durante toda mi
existencia. Este es realmente
fruto de su trabajo*

Agradecimientos

La directa realización de este seminario de título fue posible gracias al Dr. Álvaro Glavic y a la Dra. Carmen Gloria Feijoo, los cuales han sido la principal guía durante todo mi tiempo de trabajo; destaco además su confianza y apoyo en especial durante algunos momentos desagradables que he tenido en mi estancia en el laboratorio, sin su ayuda tal vez no estaría en este momento entregando este escrito. Por otra parte agradezco a Consuelo Ibar quien fue la que me “inició” directamente en lo que a actividades de laboratorio se refiere y en ese mismo contexto también agradezco el apoyo general de los tres laboratorios de Biología del Desarrollo del núcleo Milenio, en especial al grupo dirigido por Miguel Allende. Por último agradezco a todos mis compañeros de carrera y amigos de la vida quienes siempre me han acompañado y apoyado.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. RESUMEN.....	1
2. ABSTRACT.....	2
3. INTRODUCCIÓN.....	3
4. OBJETIVOS.....	9
4.1. Objetivo general.....	9
4.2. Objetivos específicos.....	9
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
5.1. Mantenimiento de Peces Cebra y obtención de imágenes.....	10
5.2. Secuencia <i>csrnp1a</i>	10
5.3. Análisis de la Expresión mediante RT-PCR.....	11
5.4. Hibridación <i>in situ</i> en embrión completo de pez cebra.....	11
5.5. <i>Knockdown</i> de la proteína CSRNP1a.....	12
5.6. Inyección en embriones de pez cebra.....	12
5.7. O-Dianosidina.....	13
5.8. Tinción DAB.....	13
6. RESULTADOS.....	14

6.1. Secuencia del gen CSRNP1a.....	14
6.2. Patrón de expresión de <i>csrnp1a</i> mediante RT-PCR.....	14
6.3. Patrón de expresión de <i>csrnp1a</i> mediante hibridación <i>in situ</i>	15
6.4. <i>Knockdown</i> de <i>Csrnp1a</i> mediante morfolidos antisentido.....	17
6.5. MoSp-CSRNP1a tiene la habilidad de inhibir específicamente a CSRNP1a.....	18
6.6. El <i>knockdown</i> de <i>csrnp1a</i> disminuye la cantidad de eritrocitos maduros en la circulación sanguínea.....	19
6.7. El <i>knockdown</i> de <i>csrnp1a</i> afecta la formación de células de línea mieloide.....	20
7. DISCUSIÓN.....	23
7.1. Patrón de expresión de CSRNP1a en el desarrollo embrionario de pez cebra.....	24
7.2. <i>Knockdown</i> del gen <i>csrnp1a</i>	26
7.3. Falta de función de CSRNP1a afecta la formación de células hematopoyéticas.....	27
8. CONCLUSIÓN.....	29
9. BIBLIOGRAFIA.....	30

ÍNCIDE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema simplificado de la vía wnt canónica.....	3
Figura 2. Estructura primaria y alineamiento de proteínas CSRNP de distintas especies.....	6
Figura 3. Expresión del gen <i>axud1</i> en pez cebra mediante hibridación <i>in situ</i>	8
Figura 4. Esquema del gen CSRNP1a.....	14
Figura 5. Expresión del gen <i>csrnp1a</i> mediante RT-PCR durante el desarrollo embrionario de pez cebra.....	15
Figura 6. Patrón de expresión de CSRNP1a obtenido mediante hibridación <i>in situ</i>	16
Figura 7. El MoSp-CSRNP1a es capaz de inhibir la actividad de <i>csrnp1a</i>	19
Figura 8. Disminución del número de eritrocitos maduros en embriones morfantes.....	21

Figura 9. *Knockdown* de CSRNP1a disminuye la cantidad
de células que expresan peroxidasa.....22

LISTA DE ABREVIATURAS

APC: Proteína de adenomatosis poliposa de colon

°C: Grados Celcius

cDNA: ácido desoxirribonucleico codificante

CHT: Tejido caudal hematopoyético

CSRNP: Proteína nuclear ricas en serina y cisteína

DAB: 3,3'-deaminobencidina

DMSO: dimetilsulfóxido

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

EST: Marcador de secuencia expresada

fb: Forebrain. Cerebro anterior

g: Gramos

GSK-3: Proteína quinasa de glicógeno sintasa

hb: Hind Brain. Cerebro Posterior.

hpf: Horas post fertilización

hyp: Hipotálamo

H₂O₂: Peróxido de Hidrógeno

ICM: Masa celular intermedia

ISH: Hibridación in situ

JNK: Quinasas c-Jun N-terminal

kb: Kilo base

L: litro

LiCl: Cloruro de litio

M: Molar

mb: Midbrain. Cerebro medio

MB-HB: Límite entre cerebro medio y cerebro posterior

mg: Miligramos

min: Minutos

mL: Mililitros

mM: Milimolar

MoATG: Morfolino ATG

MoSp: Morfolino splicing

mpo: Mieloperoxidasa

mRNA: Ácido ribonucleico mensajero

nc: Notocorda

ng: Nanogramos

op: Placoda ótica

pb: Pares de bases

PBS: Tampón fosfato salino

PBST: tampón fosfato salino mas tween 0.1%

PFA: Para-formaldehído

pg: Glándula pineal

PM: Peso molecular

RBI: Islas sanguíneas rostrales

RNA: Ácido ribonucleico

RT-PCR: Transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa

seg: Segundos

SELEX: Evolución sistemática de ligando por enriquecimiento exponencial

tc: Tectum

tg: Tegumentum;

μg: Microgramo

UTR: Región no traducida

μL: Microlitro

V: Voltaje

Wt: *wild tipe*. Silvestre

Resumen

La familia de factores de transcripción CSRNP (cystein-serine-rich nuclear protein) está conservada desde *Drosophila* hasta humanos. Estudios funcionales hechos en ratón, mediante *knockout* de cada uno de sus parálogos, han resultado insuficientes para dilucidar una función para esta familia de proteínas en el desarrollo de vertebrados. En nuestro laboratorio, se ha estudiado el ortólogo de pez cebra Axud1, observando su función esencial en la supervivencia y proliferación de progenitores cefálicos. Para obtener más información sobre la familia de proteínas CSRNP en el desarrollo de vertebrados, en este trabajo se ha analizado un segundo ortólogo existente en pez cebra: el gen *csrnp1a*. Análisis de expresión indican que el gen es expresado desde las 18 horas post fertilización (hpf) hasta estadios larvales, concentrando su expresión en territorios anteriores cefálicos, en el tubo neural ventral; y en sitios posteriores, específicamente en la masa celular intermedia (ICM). El *Knockdown* del gen mediante el uso de oligonucleótidos modificados, denominados morfolinós, muestran que la reducción en la expresión del gen *csrnp1a* genera una disminución del tamaño de la cabeza y del número de células observadas en circulación sanguínea. De esta manera nosotros obtuvimos nueva evidencia acerca de la expresión de la familia de proteínas CSRNP en el desarrollo embrionario del pez cebra y de su posible papel en la formación del linaje sanguíneo.

Abstract

The family of transcription factors CSRNP (cystein-serine-rich nuclear protein) is conserved from *Drosophila* to human. Functional studies in mice, through knockout for each of their paralogs have resulted insufficient to elucidate a function of this family of proteins in vertebrate development. In our laboratory, we have studied the zebrafish ortholog Axud1, showing its essential role in the survival and proliferation of cephalic progenitors. In order to make a more extensive characterization of this family of proteins, in this work we have analyzed a second zebrafish ortholog: the *csrnp1a* gene. The expression pattern indicates that this gene is expressed as early as 18 hours post fertilization (hpf) until larval stages, concentrating its expression in anterior cephalic territories, in the ventral neural tube; and posterior sites, specifically in the intermediate cell mass (ICM). Gene Knock-down using antisense oligonucleotides, morpholinos, shows that a reduction in *csrnp1a* expression generates a reduction in head size and a decrease in the number of cells observed in blood circulation. By this way we obtained new evidence for the expression of the CSRNP protein family during embryonic zebrafish development and highlight the potential role of this gene on the formation of the blood lineage.

Introducción

La regulación transcripcional coordinada de los eventos de proliferación, muerte y diferenciación celular es esencial para el desarrollo de todos los organismos. Muchos factores de transcripción tejido específico median roles cruciales en la organogénesis, pero son transcritos únicamente como genes blanco de diversas vías de señalización.

En ese sentido, la organogénesis es controlada por familias de moléculas de señalización como Wnt, Sonic Hedgehog, BMP y FGFs (Hogan, 1996; Cadigan and Nusse, 1997; Martin, 1998)

La vía de señalización Wnt participa en múltiples eventos del desarrollo embrionario de vertebrados e invertebrados (revisado por Croce y McClay, 2006). AXIN1 es un regulador negativo de la vía Wnt. Esta proteína, en ausencia de Wnt, forma un complejo con los factores APC (Kishida y col, 1998) y GSK-3 (Ikeda y col, 1998) que favorece la fosforilación de β -catenina promoviendo su degradación vía proteosoma (Aberle y col, 1997). En presencia de Wnt este complejo regulador negativo es inhibido, consecuentemente estabilizando β -catenina, la cual posteriormente es traslocada al núcleo (Huber y col, 1996), donde actúa como cofactor de factores de transcripción como T-cell factor (TCF)/lymphocyte enhancer binding factor (LEF) (Korinek y col, 1998) activando la expresión de diversos genes fundamentales para el desarrollo (revisado por Logan y Nusse, 2004) (Figura 1).

Mutaciones en el gen *axina1* han sido relacionadas con diversos tipos de cáncer humano

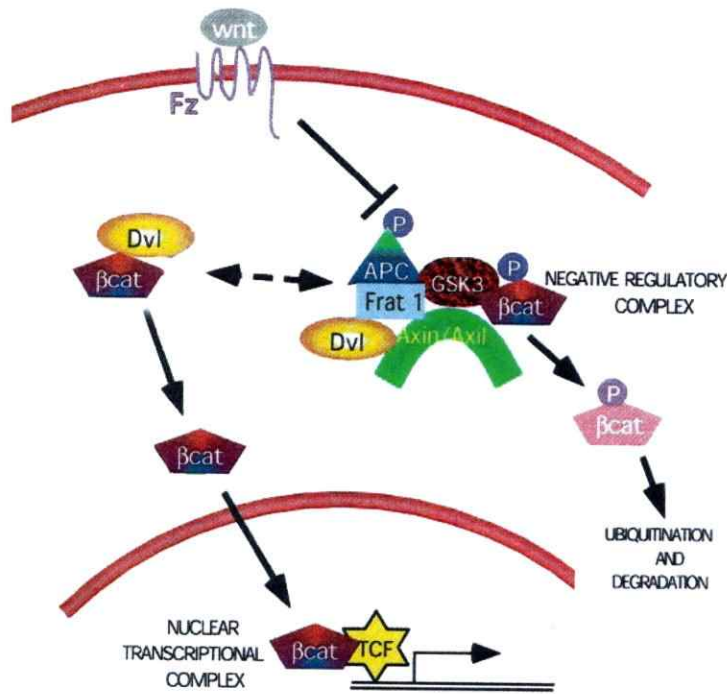


Figura 1. Esquema simplificado de la vía wnt canónica. En ausencia de Wnt el complejo regulador negativo fosforila a β -catenina promoviendo su degradación vía proteosoma; mientras que en presencia de wnt este complejo es inhibido, β -catenina es traslocada al núcleo y se une al factores de transcripción de la familia TCF/LEF. (Modificado de Song 2000)

(revisado por Huang y He, 2008). En contraste, la transfección de AXINA1 en células tumorales que presentan mutaciones en AXINA1, β -catenina o APC, es capaz de suprimir el crecimiento celular e inducir apoptosis (Sato y col, 2000). Ishiguro y col, (2001) mediante microarreglos observaron un gen cuya expresión disminuye en células de cáncer de colon con mutaciones en el gen *axinal* y aumenta al sobreexpresar AXINA1 y no otros componentes del complejo regulador negativo de la vía wnt, o sea es independiente de TCF/LEF. Por esto es llamado Axin Upregulated-1, AXUD1. Además en este trabajo se observó que la expresión este gen está reducida en células tumorales de cáncer de riñón, intestino, pulmón e hígado. Otros estudios advierten que el transcrito *axud1* está sub-representado en colanocarcinomas intrahepáticos (Obama y col, 2005); tumores pancreáticos (Nakamura y col, 2004) y cáncer de mamas (Nishidate y col, 2004). Estos antecedentes sugieren que AXUD1 tiene un rol como factor supresor de tumores. Paralelamente, analizando perfiles transcripcionales en diversas condiciones

celulares, se ha identificado el transcrito *axud1* como un gen asociado a funciones inmunes (Hutton y col, 2004); siendo inducido por el factor de crecimiento derivado de plaquetas en células troncales embrionarias de ratón (PDGF)(Chen y col, 2004); en microglías producto de daño neuronal provocado por dopamina (Thomas y col, 2006) o por el cardiotóxico doxorubicina en cardiomiocitos (Yi, y col, 2006); y por IL-2 en linfocitos (Gingras y col 2007). La amplia gama de reguladores de la expresión de AXUD1 identificados, que por mucho excede las iniciales observaciones de su inducción por AXIN1; sumado a las características de la secuencia proteica predicha para este gen (ver más adelante) es que actualmente se utiliza la nomenclatura CSRNP para referirse a esta familia de proteínas.

La familia de proteínas CSRNP han sido conservadas de *Drosophila* a humanos. Estas proteínas tienen la particularidad que no contienen dominios definidos en su secuencia o motivos que hayan sido anotados anteriormente en alguna base de datos pública. Sin embargo mediante el análisis de la secuencia primaria predicha de los miembros de esta familia se han identificado tres regiones: una región amino-terminal rica en serina; una región de aproximadamente 50 amino ácidos rica en cisteína; y entre las dos regiones anteriores un dominio que contiene preferentemente residuos aminoacídicos básicos (Figura 2A). Análisis de similitud de secuencias muestran que la región amino terminal, que incluye las regiones ricas en serina, cisteína y la región básica, es el dominio más conservado. Dentro de este segmento la mayor homología se presenta en la región rica en cisteína. En particular en 10 residuos posicionalmente conservados en todos los CSRNPs de las distintas especies (Figura 2B) (Gingras y col, 2007).

La localización subcelular del producto de los genes *csrnp*, tanto en los tres parálogos de ratón, CSRNP-1, 2 y 3; como del único ortólogo encontrado en *Drosophila*, DAXUD1, es en el núcleo (Gingras y col, 2007; Glavic y col, 2009). Por otra parte, las proteínas CSRNP de ratón fusionadas al dominio de unión a DNA de Gal4 son capaces de activar significativamente la expresión de luciferasa bajo el promotor *gal4* en células 293T y de levadura. Además, mediante aproximaciones de “unión y amplificación (SELEX)” se ha identificado la secuencia AGAGTG (o el complemento CACTCT) como el sitio de unión al DNA más probable para las proteínas de la familia CSRNP.

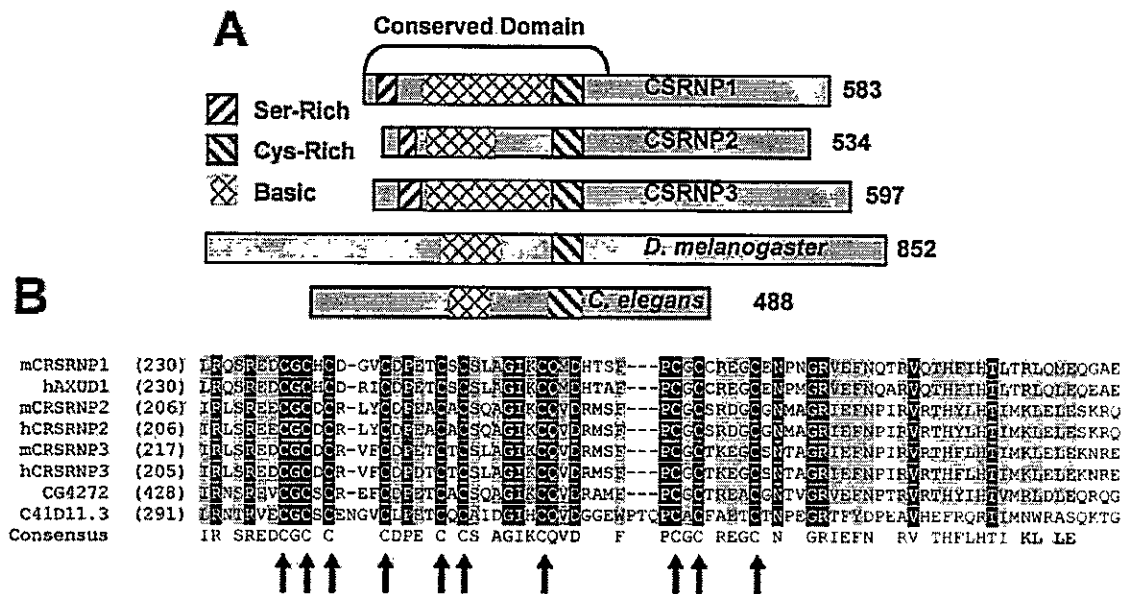


Figura 2. Estructura primaria y alineamiento de proteínas CSRNP de distintas especies. A) Representación esquemática de la estructura primaria de los tres ortólogos de ratón CSRNP-1, 2 y 3 respectivamente y los ortólogos existentes en *Drosophila* y *C. elegans*; identificando principales características. B) Alineamiento múltiple del motivo rico en cisteína indicando las 10 posicionalmente más conservadas (flechas). RefSeq from GenBank are as follow: *M. musculus* (m) CSRNP-1 (NP_695019), *H. sapiens* (h) AXUD1 (NP_149016), mCSRNP-2 (NP_700456), hCSRNP-2 (NP_110436), mCSRNP-3 (NP_700458), hCSRNP-3 (NP_079245), *D. melanogaster* CG4272 (NP_608673) and *C. elegans* C41D11.3 (NP_491368).

La función *in vivo* de estas proteínas fue inicialmente estudiada mediante la obtención de ratones *knockout* de cada uno de los tres parálogos presentes y en animales doble y triple *knockout*. Los ratones observados resultaron indistinguibles de los silvestres, y no presentaron fenotipos evidentes a nivel histológico o sistémico. La tasa de mortalidad no se vio afectada. Y no se pudo evidenciar la actividad supresora de tumores sugerida para esta familia de genes o algún otro papel evidente en el desarrollo embrionario. Sólo en ratones triple *knockout* (CSRNP1-/- CSRNP2-/-/CSRNP3-/-) se pudo observar una mortalidad evidente del 75% de estos ratones neonatos durante las primeras horas de vida. Estos efectos fueron atribuidos a una ausencia de conducta de lactancia, y no a otros motivos que sean atribuibles a la falta de función de estos genes (Gingras y col, 2007).

En *Drosophila* existe un único ortólogo de la familia de factores de transcripción CSRNP, *DAXUD1*. Estudios funcionales mostraron que *DAXUD1* actúa como supresor de tumores. La sobreexpresión de *DAXUD1* produce, a través de una perturbación en la actividad CDK1, un arresto del ciclo celular en fase G2/mitosis, lo que induce posteriormente apoptosis por la activación de la vía JNK. En contraparte, en condiciones *knockdown* para *DAXUD1* se observa un aumento en la proliferación de las células imaginales (Glavic y col, 2009).

Recientemente se identificaron en *Danio rerio* dos secuencias homólogas a *DAXUD1* (Feijóo y col, 2009). Una de estas con 69% de identidad (actualmente *Axud1* de pez cebra) y otra con 63% de homología a nivel de secuencia aminoacídica (actualmente *Csrnp1a*). En este trabajo se analizó el ortólogo más similar al gen *DAXud1* de *Drosophila* presente en pez cebra, *Csrnp1/Axud1*. El patrón de expresión observado de *axud1*

mediante hibridación *in situ* indica que el gen es materno y que se expresa de forma dinámica desde el clivaje hasta estadios larvales preferentemente en zonas neurales (Figura 3). El *knockdown* del gen mediante morfolinolinos antisentido genera un fenotipo de cabeza pequeña el cuál se explica por una disminución en la proliferación y aumento en la muerte de progenitores neurales cefálicos. Cabe destacar que al inyectar altas concentraciones de morfolino *axudl* (sobre los 10ng) también se observa una disminución de la cantidad de células sanguíneas en circulación.

El contexto de este seminario de título es la obtención nuevos datos de expresión y función de la familia CSRNP, extendiendo el análisis al segundo parólogo identificado en pez cebra, el gen *csrnp1a*. Considerando los antecedentes obtenidos respecto al primer miembro de la familia en pez cebra se plantea la hipótesis: **“El gen *csrnp1a* se expresa de manera dinámica en nichos proliferativos durante estadios tempranos del desarrollo embrionario del pez cebra, con una función fundamental en el establecimiento de dichos progenitores”**

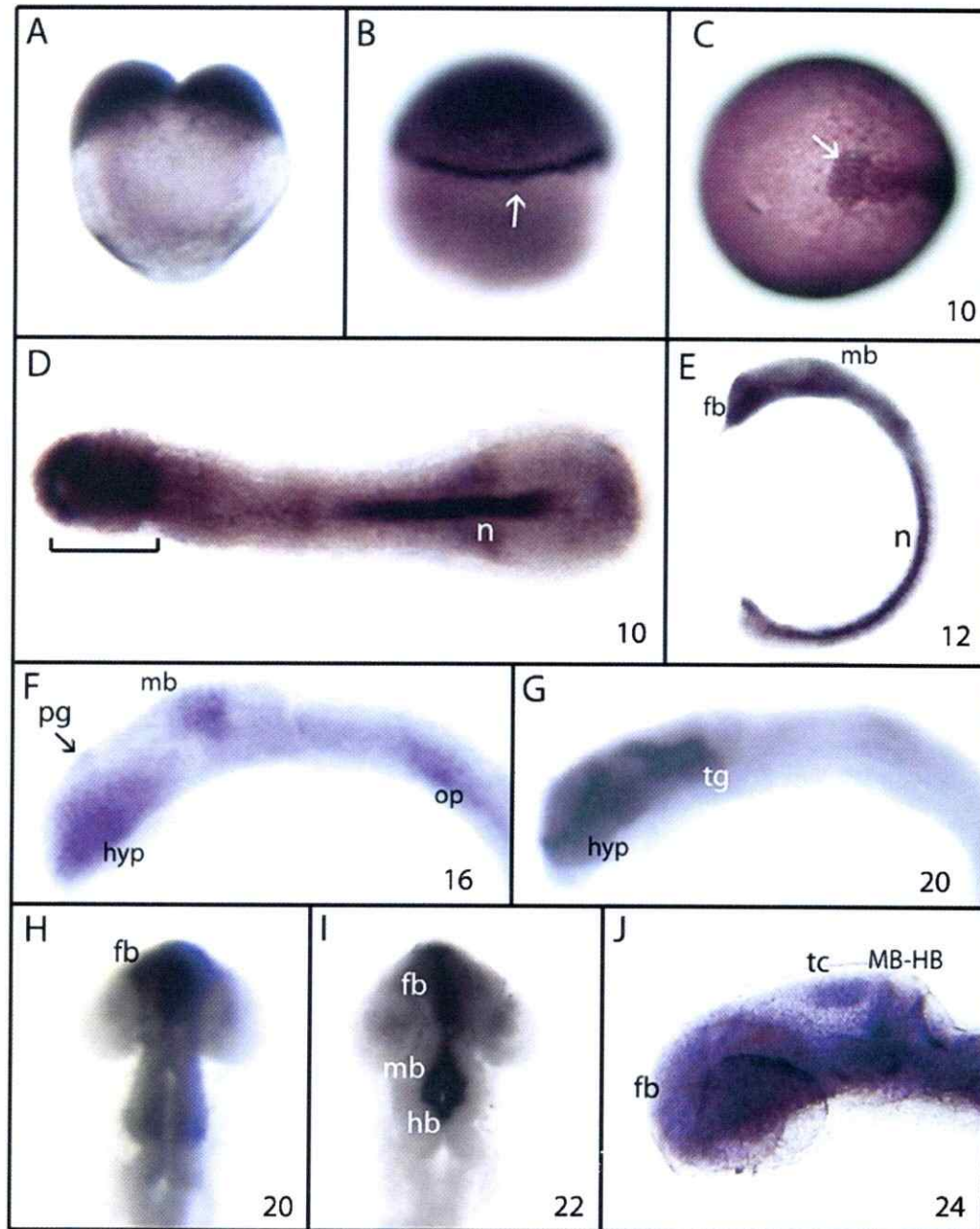


Figura 3. Expresión del gen *axud1* en pez cebra mediante hibridación *in situ*. Estadios varían entre 2 células y 24 hpf. Imágenes A, B, E, F, G y F son vistas laterales; C es una vista dorso anterior; y D, H e I son vistas dorsales. A) Embrión de dos células. B) 30% de epibolia. Expresión ubicua en polo animal y con una concentración en la zona marginal (flecha). C) 10 hpf. Marca en la placa precordal y mesodermo cordal, límite anterior marcado con una flecha. D) Embrión de 10 hpf sin vitelo. Mensajero de *axud1* localizada en cabeza y notocorda. E) 12 hpf. Expresión en cerebro zona anterior del cerebro anterior, en el cerebro medio, en cerebro posterior y notocorda. F) 16 hpf. Marca en hipotálamo, glándula pineal (flecha), cerebro medio dorsal y placoda ótica. A 20 hpf (G y H) y 22 hpf (I). La expresión se restringe al cerebro anterior y a ventrículos del cerebro medio. J) 24 hpf. Marca en cerebro anterior, tectum, límite entre el cerebro medio-posterior y cerebro posterior. fb, cerebro anterior; mb, cerebro medio; hb, cerebro posterior; n, notocorda; tc, tectum; tg, tegmentum; pg, glándula pineal; hyp, hipotálamo; MB-HB, límite entre cerebro medio y cerebro posterior; op, placoda ótica (extraído de Feijóo y col 2009).

Objetivo General.

- Caracterizar el gen *csrnp1a* durante el desarrollo embrionario de pez cebra y analizar su función.

Objetivos específicos.

- Determinar el patrón de expresión temporal de *csrnp1a* entre 0 hpf hasta estadios larvales de pez cebra mediante RT-PCR.
- Determinar el patrón de expresión espacial del gen *csrnp1a* mediante hibridación *in situ* entre las 0 hpf hasta estadios larvales de pez cebra.
- Caracterizar el fenotipo producido por la reducción de CSRNP1a generado mediante la inyección de morfolinolinos antisentido específicos contra este gen.

Materiales y Métodos

Mantenimiento de peces cebra y obtención de imágenes.

Los peces fueron tratados de acuerdo al sistema descrito por Westerfield, 2007. En este trabajo se utilizaron únicamente líneas de pez cebra silvestres (wt) del laboratorio de Dr. Miguel Allende, los cuales se cruzaron de manera natural para la obtención de los embriones. Los embriones obtenidos de esta manera fueron incubados a 28,5 °C en placas Petri con medio E3 con azul de metileno y fijados en PFA 4% toda la noche, en el estadio apropiado. Los tiempos de desarrollo están expresados en horas post fertilización (hpf). Las fotografías fueron tomadas con una lupa de disección Leica MZ12 con una cámara Leica DFC 300FX. Las imágenes fueron procesadas con Photoshop CS3. Para todos los experimentos descritos las imágenes mostradas son representativas del efecto observado y cuando este efecto está presente en cualitativamente la mayoría de los individuos (sobre un 70% de los individuos observados), con un mínimo de 50 embriones por experimento. Todos los experimentos fueron repetidos al menos tres veces.

Secuencia *csrnp1a*.

La secuencia analizada en este trabajo es la encontrada previamente por Feijóo y col, 2009, que posee un 63% de homología en la secuencia aminoacídica con el gen *daxud1* de *Drosophila* (número de acceso Gene Bank: BX649335). A partir de esta secuencia fueron diseñados los partidores para RT-PCR, y los morfolinós ATG y de *splicing* del gen.

Análisis de la expresión mediante RT-PCR.

Para realizar el RT-PCR se extrajo el RNA total de embriones de pez cebra silvestres de 0, 6, 10, 18, 24, 36 y 48 horas post fertilización. Luego mediante el kit ImProm-II™ Reverse Transcription System Promega, y utilizando partidores poli-A se obtuvo el cDNA total. Este fue sometido luego a un PCR utilizando como partidor directo: axud1F: 5'-CTCTGATGAAGACAGTCCACAAAG-3' y como partidor reverso axud1R: 5'-TCAGAGTCCGAAGACAGACTGAG-3'. Dichas secuencia se encuentran posicionadas en el exón 2 y en el 4 respectivamente y generan un amplicón de 1,2 kb. Además se amplificó el RNA extraído para verificar una posible contaminación con DNA geonómico. Como control de cDNA se utilizaron primers de β -actina: directo, 5'-TGTCTTCCCATCCATCGTG-3 y reverso, 5'-AGGTCACGGCCAGCCAAG-3', que generan un amplicón de aproximadamente 700 pb.

Hibridación *in situ* en embrión completo de pez cebra.

Para la síntesis de la sonda antisentido del gen *csrnpla* se utilizo el EST: AGENCOURT_22438433 (Open Biosystems). Éste fue linearizado con la enzima de restricción EcoRV. 1 μ g de DNA lineal se transcribió *in vitro* utilizando la enzima T7 durante 4 horas a 37°C. El RNA obtenido fue precipitado con LiCl 4M y etanol 100%. Finalmente se resuspendió en 11 μ L de agua RNAsa free, de los cuáles se usó 1 μ L para observar la concentración de la sonda en un gel de agarosa al 2% en corridas de 5 minutos a 150V. De acuerdo a la cantidad observada de sonda, esta fue re suspendida en un volumen de Buffer de Hibridación de *in situ*.

Embriones silvestres entre 0 y 48 hpf, se fijaron con paraformaldehído 4%/PBS toda la

noche a 4 °C o 2h a temperatura ambiente. Posteriormente se realizó el protocolo de hibridación *in situ* (Thisse, 2008).

Knockdown de la proteína CSRNP1a.

Para generar la falta de función de CSRNP1a se realizó el *knockdown* mediante la inyección de morfolinos (oligonucleótidos antisentido modificados químicamente (revisado por Lieschke y Currie, 2007)). Se utilizaron dos tipos de morfolinos: MoATG-CSRNP1a (secuencia 5'-ACTGACGAGCACAACACTCAACAACAG-3') diseñado para unirse a una región del AUG del mRNA de *csrnp1a*. Y MoSp-CSRNP1a, (secuencia 5'-TATCATGAGTGACTTACTTGGCATG -3') el cual se une al sitio de splicing entre el exon3/intron3 del mRNA primario de *csrnp1a*. Se utilizaron como control peces wt sin inyección. Los morfolinos fueron obtenidos de la empresa Gene-Tool, LLC (USA).

Microinyección en embriones de pez cebra.

Los embriones fueron microinyectados en estadios de una a dos células, con corion. Posterior a su inyección, los embriones se lavaron en medio E3 sin azul de metileno y se incubaron a 28,5 °C en placas de Petri. Ya después de la gastrulación se cambió el medio a E3 con azul de metileno y se dejaron incubados a 28.5°C hasta que alcanzaran los distintos estadios de análisis, según lo descrito por Kimmel y col, 1995. La cantidad inyectada de cualquiera de los morfolinos fue determinada empíricamente para cada uno de ellos. Esto por que la inyección en bajas concentraciones no produce fenotipo, mientras que a alta concentración el morfolino es tóxico *per se*, y los fenotipos observados no son necesariamente producto de su actividad específica. El criterio

utilizado para elegir la cantidad óptima de morfolino a inyectar fue que la tasa de mortalidad a las primeras horas sea la mínima pero para la cual sea posible ver un fenotipo reproducible, que esté presente en la mayoría de los embriones y no pueda ser, a priori, atribuible a toxicidad espontánea del morfolino.

O-Dianosidina.

Se realizó una tinción O-Dianosidina (3,3' dimetoxibenzidina) la cuál marca eritrocitos maduros. Este compuesto reacciona con la hemoglobina de los glóbulos rojos, en presencia de peróxido, generando un producto oxidado de color naranja (Wei y col, 2005). Se prepara una solución de O-Dianosidina que contiene: 0.06 mg/mL de O-Dianosidina; Acetato de sodio 0.01M; H₂O₂ 0.65% y etanol 40%. Embriones vivos fueron lavados con esta solución de 5 a 10 minutos y posteriormente fijados con PFA 4%-PBS (Iuchi y Yamamoto, 1983).

Tinción DAB

Se realizó una tinción DAB (3,3'-deaminobencidina) la cual reacciona y marca preferentemente células que contienen peroxidasa. Se utiliza DAB 0.07 mM el cuál se disuelve en 300µL de DMSO, 533µL de etanol 100%, se agregan 450µL de PBS y finalmente 50µL de H₂O₂. Esto se alícuota y guarda a -20°C. Para el uso de esta tinción se fijan embriones durante 2 horas en PFA 4%-PBS, se lava 5 minutos con H₂O; se lava 3 veces por 5 min. en PBST; se lava una vez más por 5 min en PBS y finalmente se lava con la mezcla DAB. La reacción del DAB catalizada por la peroxidasa se desarrolla por al menos 3 horas y hasta que se observa tinción en los embriones.

Resultados

Secuencia del gen CSRNP1a.

El gen *csrnp1a* está mapeado en el cromosoma 2 en el locus BX649335 de pez cebra. La secuencia genómica tiene aproximadamente 12,8 Kb, y está compuesta por 4 exónes que generan un mensajero predicho de 1559 pares de bases. En la figura 4 se observa un esquema del gen *csrnp1a*, donde además se especifican los sitios de alineamiento de los partidores utilizados para el RT-PCR; la región del gen que es hibridada por la sonda antisentido para la hibridación *in situ*; y la secuencia de unión de los morfolidos antisentido.

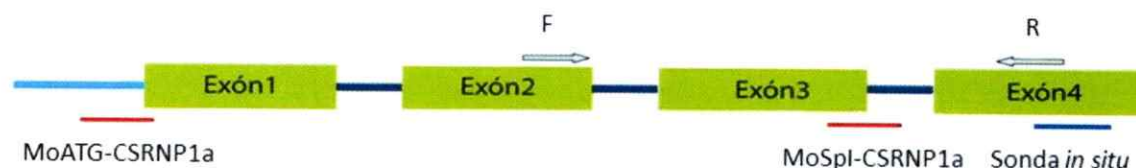


Figura 4. Esquema del gen CSRNP1a. Se esquematizan los exónes en cuadros verdes unidos por intrones mostrados como líneas azul oscuro. Las flechas celestes representan los partidores directo (F) y reverso (R). Los morfolidos y la sonda se muestran en rojo y azul respectivamente.

Patrón de expresión de *csrnp1a* mediante RT-PCR.

Para analizar el patrón de expresión temporal del gen *csrnp1a* durante el desarrollo embrionario de pez cebra, se realizó un RT-PCR utilizando como templado cDNA obtenido de embriones de 0, 6, 10, 18, 24, 30, y 48 horas post fertilización, con partidores específicos para el gen que amplifican una región 1.2 kb entre el exón 2 y 4. Con esta metodología es posible apreciar la falta de expresión del gen a 0 hpf lo que indica que, a diferencia de su parálogo *axud1* (Figura 3), este transcrito no es de aporte materno. A las 6 horas post fertilización, cuando ha comenzado la expresión zigótica en

el embrión y a las 10 hpf, fue posible encontrar transcrito, pero en cantidades muy bajas. Posteriormente fue posible observar un aumento en la expresión génica entre los estadios de 18, 24 y 36 hpf y que disminuye nuevamente a las 48 hpf (Figura 5).

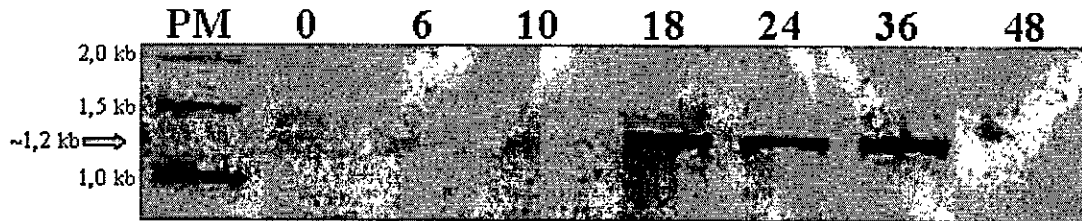


Figura 5. Expresión del gen *csrnpla* mediante RT-PCR durante el desarrollo embrionario de pez cebra. En la parte superior del gel, en el carril 1 se indica el estándar de peso molecular, mientras que en el resto de los carriles se indica el estadio en horas post fertilización utilizado para la realización de este ensayo. En el borde izquierdo del gel se muestra el tamaño de los carriles del estándar de peso molecular y con una flecha roja se identifica el producto de PCR correspondiente al gen *csrnpla* con un tamaño obtenido de aproximadamente 1.2 kb.

Patrón de expresión de *csrnpla* mediante hibridación *in situ*.

El siguiente paso en la caracterización de *csrnpla* fue la obtención del patrón espacio-temporal de expresión de este gen. Esto se realizó mediante hibridación *in situ* (ISH) en embriones de estadios previamente determinados por la observación positiva de expresión del gen mediante RT-PCR. En los estadios mas tempranos de expresión, entre 6 y 18 hpf, no se logró observar presencia de mensajero en algún tejido del embrión el pez cebra mediante hibridación *in situ* (no se muestra el dato). A las 26 horas post fecundación, es posible evidenciar claramente expresión de *csrnpla* concentrada en territorios anteriores, en el tubo neural ventral; y en la masa celular intermedia, a lo largo de la extensión del vitelo (ICM). (Figura 6).

Luego, desde las 34 hpf hasta los siguientes estadios analizados, la marca cefálica anterior comienza a volverse ubicua, mientras que la expresión posterior, en la masa celular intermedia se mantiene.

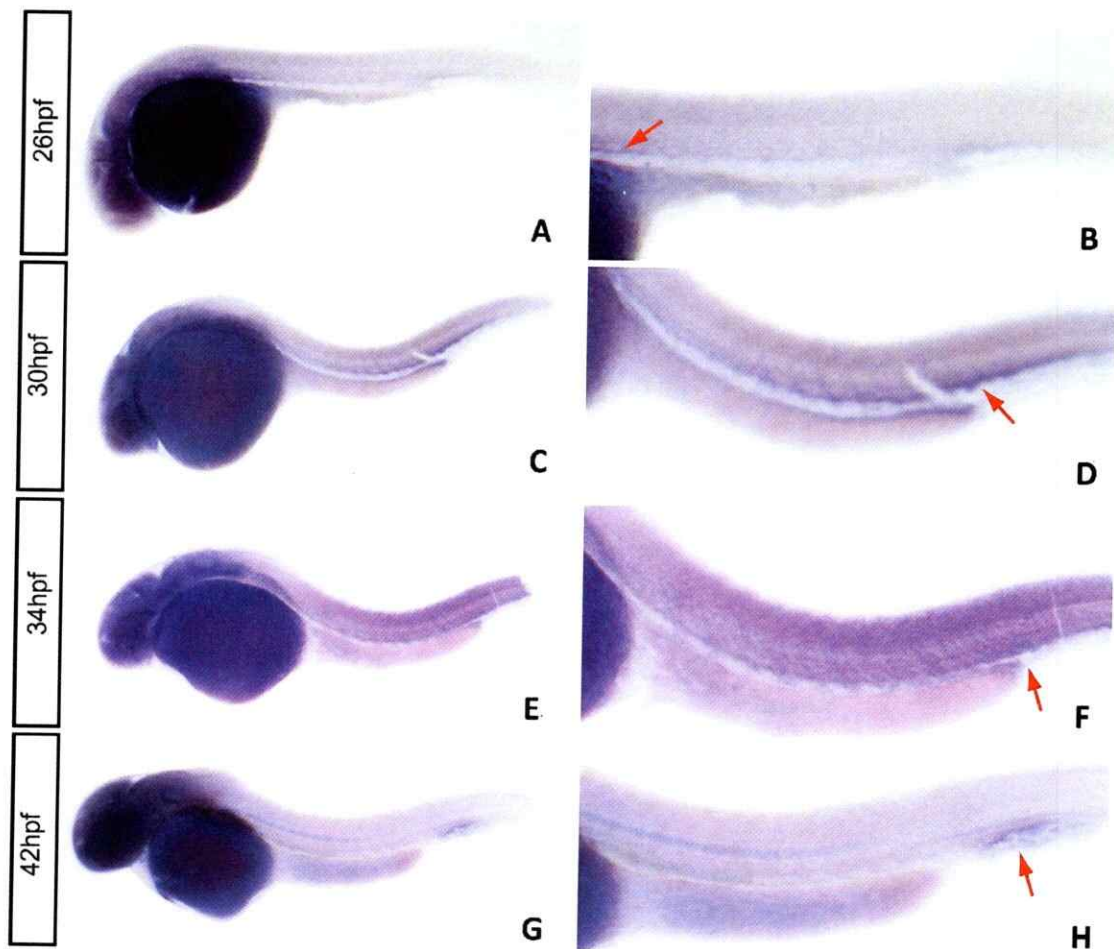


Figura 6. Patrón de expresión de CSRNP1a obtenido mediante hibridación *in situ*. A la izquierda se muestran embriones completos y a la derecha se observa una ampliación de la cola enfocándose en la expresión en la masa celular intermedia (flechas rojas). Todos los embriones en esta y posteriores figuras están mostrados en vistas laterales orientados con anterior y dorsal hacia la izquierda y arriba de la figura respectivamente. A y B, embrión de 26 hpf se observa expresión generalizada en el tubo neural ventral, y en la masa celular intermedia (ICM) (flecha roja). C y D, embrión de 30 hpf, continúa expresión en el tubo neural ventral y a lo largo de la ICM. E y F, embrión de 34 hpf, expresión en el tubo neural ventral, y a lo largo de la masa celular intermedia. G y H embrión de 42 hpf. Expresión cefálica se vuelve ubicua, se ve marca en notocorda (flecha negra) y la señal a lo largo de la masa celular intermedia se restringe hacia sitios caudales hematopoyéticos (CHT).

A las 42 hpf la señal en anterior es generalizada en el cerebro, aparece además expresión en la notocorda, y la tinción detectada a lo largo de la masa celular intermedia se restringe a un tejido más caudal llamado sitio caudal hematopoyético (CHT). La similitud en la expresión anterior de *csrnp1a* y *axud1* sugiere que estos genes tendrían

sugiere que estos genes tendrían funciones redundantes en este territorio. La ICM es un sitio de proliferación y diferenciación de células hematopoyéticas (revisado por Davison y Zong, 2004), de manera que la expresión de *csrnpla* en este tejido sugiere un rol hematopoyético para este gen.

***Knockdown* de *Csrnp1a* mediante morfolinis antisentido.**

Para analizar la función de *Csrnp1a* en el desarrollo embrionario, se diseñaron dos morfolinis antisentido MoATG y MoSp que complementan con diferentes regiones del mensajero de *csrnpla* y que actúan en diferentes etapas de la maduración del transcrito (revisado por Lieschke y Currie, 2007) (ver Materiales y Métodos) (Figura 4). Se inyectaron embriones silvestres con diversas cantidades de ambos morfolinis, entre 2,5 y 10ng y se observó el fenotipo de los embriones entre las 24 y 48 hpf. La inyección de diferentes cantidades de morfolinis generó una gama de embriones con diversas fallas que pueden ser agrupadas de la siguiente manera: Un grupo inyectado con bajas cantidades de morfolino (MoATG: 2,5ng; MoSp: 5ng) no presentó fenotipo, es decir, no presenta perturbaciones claras evidenciables mediante la observación bajo lupa, o un aumento de la mortalidad respecto a los embriones silvestres. Un segundo grupo inyectado con concentraciones intermedias de morfolino (MoATG: 5ng; MoSp: 7,5ng), presentan fenotipos intermedios. En estos embriones se observó una disminución ligera en el tamaño de la cabeza, reducción en la cantidad de células sanguíneas en circulación, una mortalidad de aproximadamente el 30% con respecto a los embriones silvestres y un ligero atraso en el estadio embrionario de los individuos observados. Finalmente en el tercer grupo, inyectado con altas concentraciones de morfolino

(MoATG: 7,5ng MoSp: 10ng), se observó fenotipo intenso, en el cuál la cabeza está muy disminuida en tamaño, somitos mal formados, y fallas que pueden atribuirse a una perturbación general en el mesodermo, una alta mortalidad (entre 50 y 80% de los embriones antes de las 24 hpf), y embriones atrasados en su desarrollo. El primer grupo de individuos fue excluido puesto que la cantidad de morfolino no fue suficiente para lograr un fenotipo apreciable; el tercer grupo también fue descartado debido a que el fenotipo observado es muy probablemente consecuencia de la toxicidad del morfolino. De acuerdo con lo anterior, el fenotipo considerado como producto de la actividad específica de morfolino, y por tanto informativo respecto de la función de *csrnp1a*, fue el de embriones con la cabeza ligeramente más pequeña y falta notable de células circulando pasadas las 24hpf, estos fueron seleccionados para los experimentos posteriores. La cantidad óptima que permite replicar las condiciones mencionadas para el MoATG-CSRNP1a fue de 2.5ng por embrión, mientras que para el MoSp-CSRNP1a fue de 5ng por embrión. El hecho que mediante la inyección de dos morfolinos se obtenga un mismo fenotipo sugiere que ambos son específicos y eficientes en disminuir los niveles de CSRNP1a, sin embargo es preciso probar que los morfolinos son específicos mediante un experimento de rescate de función.

MoSp-CSRNP1a tiene la habilidad de inhibir específicamente a *csrnp1a*.

El morfolino de splicing inhibe la maduración del RNA primario de *csrnp1a*. Sabiendo esto, se evaluó la habilidad de este morfolino de inhibir específicamente el procesamiento del transcrito de *csrnp1a*. Se obtuvo el cDNA de embriones de 24 hpf silvestres y morfantes, y se realizó un PCR con los partidores específicos del gen (ver

Figura 4), observando la ausencia del amplicón en la muestra morfante debido a que el mRNA no maduro incorpora dos intrones, resultando en un amplicón de 8700pb, el cual es mayor para ser amplificado por un PCR de las condiciones descritas previamente (Figura 7). De esta manera observamos que el MoSp-CSRNP1a afecta el procesamiento del transcrito y en consecuencia la expresión de la proteína.

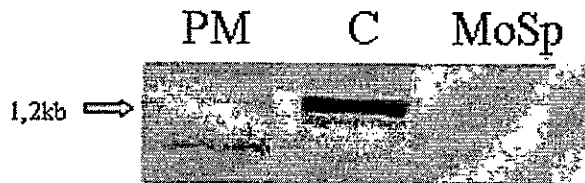


Figura 7. El MoSp-CSRNP1a es capaz de inhibir la actividad de *csrnp1a*. RT-PCR mostrando la ausencia de amplificado en cDNA extraído en embriones morfantes (MoSp) y embriones silvestres (C). Se indica el peso molecular de la banda en el borde izquierdo.

Los datos de la expresión de *csrnp1a* sugieren una función redundante con su parálogo *axud1*, mientras que la expresión en la ICM sería indicativa de una función específica de este gen en el desarrollo de células hematopoyéticas. En este escenario es importante destacar que el *knockdown* del gen genera una disminución cualitativa en las células sanguíneas en circulación. Con todos estos antecedentes, decidimos continuar la investigación de este gen para generar respuestas que nos permitan explicar los fenómenos observados sobre el número de células sanguíneas en circulación.

El *knockdown* de *csrnp1a* disminuye la cantidad de eritrocitos maduros en la circulación sanguínea.

Considerando que los glóbulos rojos son las células hematopoyéticas presentes en mayor proporción en la sangre, es posible considerar que el menor número de células en circulación presente en los embriones morfantes sea debido a una baja significativa en la cantidad de eritrocitos circulantes. Para determinar la presencia de este tipo celular se

realizó una tinción de O-Dianosidina. Este es un ensayo histoquímico que permite observar las células en circulación que contienen hemoglobina, o sea eritrocitos maduros. La circulación sanguínea en pez cebra comienza entre las 23 y 24 horas y las células en circulación son principalmente de linaje eritroide que expresan hemoglobina. En este experimento se incubaron embriones de 36hpf, morfantes y silvestres en dicha tinción (Figura 8). La morfología del embrión morfante observado indica que su estadio no es de 36 hpf, pero por la presencia de pigmentos y por el ángulo de la cabeza, deducimos que es un embrión de aproximadamente 30 hpf, que es un estadio adecuado para realizar el experimento. Es posible observar con este experimento una clara disminución de la señal de O-Dianosidina, evidenciada especialmente en los ductos de Cuvier (flecha roja en el vitelo), que indica que efectivamente el *knockdown* de CSRNP1a afecta la cantidad de eritrocitos maduros en circulación.

El *knockdown* de *csrnp1a* afecta la formación de células de línea mieloide.

La tinción DAB es un ensayo histoquímico con el cuál es posible observar la presencia de peroxidasa en una célula. En pez cebra las células que poseen peroxidasa pertenecen a la línea mieloide, específicamente granulocitos neutrófilos que expresan el gen de mieloperoxidasa *mpo* (Bennet y col, 2001) y células epiteliales de vasos sanguíneos. Este ensayo se utilizó para marcar de manera generalizada células granulocíticas en circulación, y en la masa celular intermedia (ICM) en embriones silvestres y morfantes

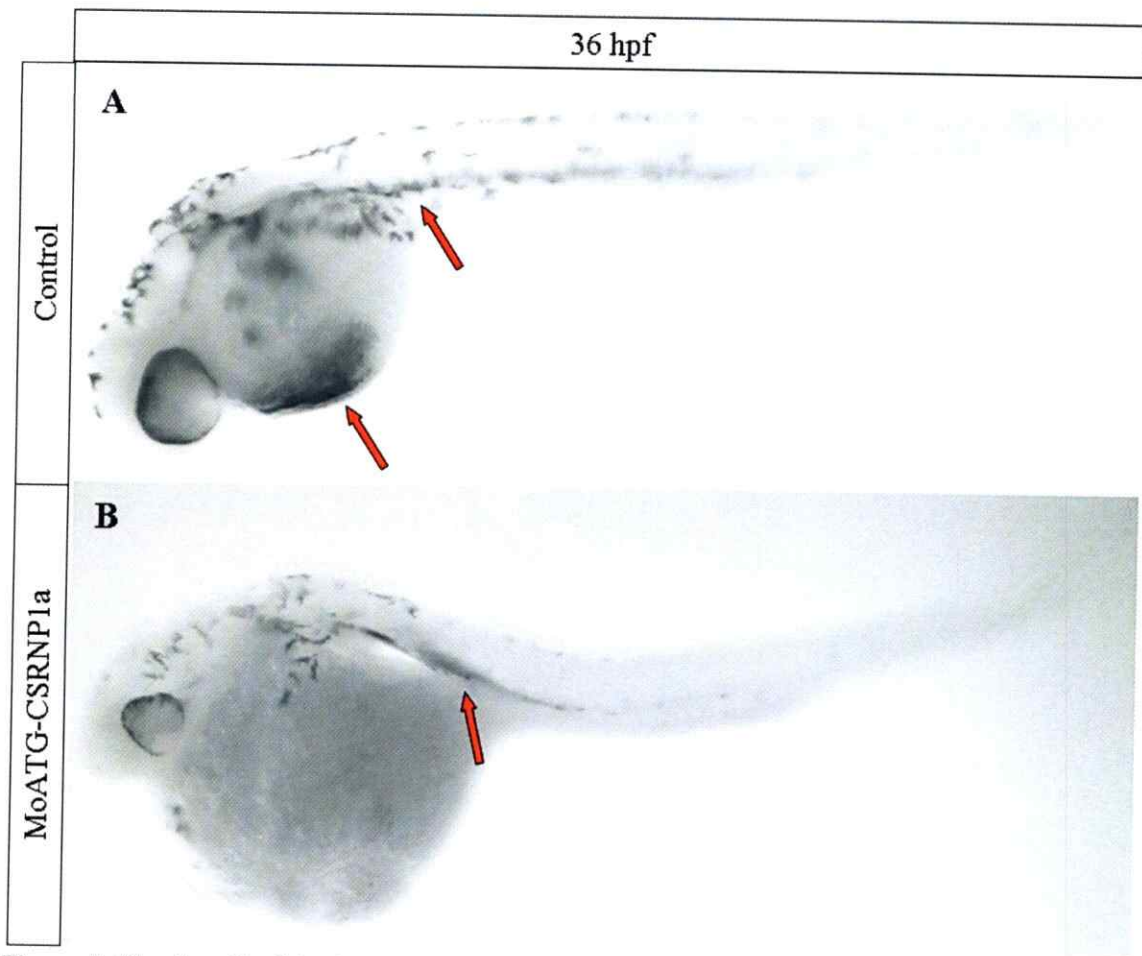


Figura 8. Disminución del número de eritrocitos maduros en embriones morfantes. Se utilizaron embriones de 36 hpf silvestres sin inyectar (A) y morfantes (B). La marca de O-Dianosidina se observa principalmente en los ductos de Cuvier en el vitelo y en la vena caudal (flechas rojas).

de 36 hpf (Figura 9). Los resultados obtenidos mostraron una disminución significativa en el número de células granulocíticas en los embriones morfantes. Como se ha dicho, la masa celular intermedia es un tejido de desarrollo de células hematopoyéticas, por lo que este resultado es indicativo sobre la de función de CSRNP1a en la formación de granulocitos en dicho territorio.

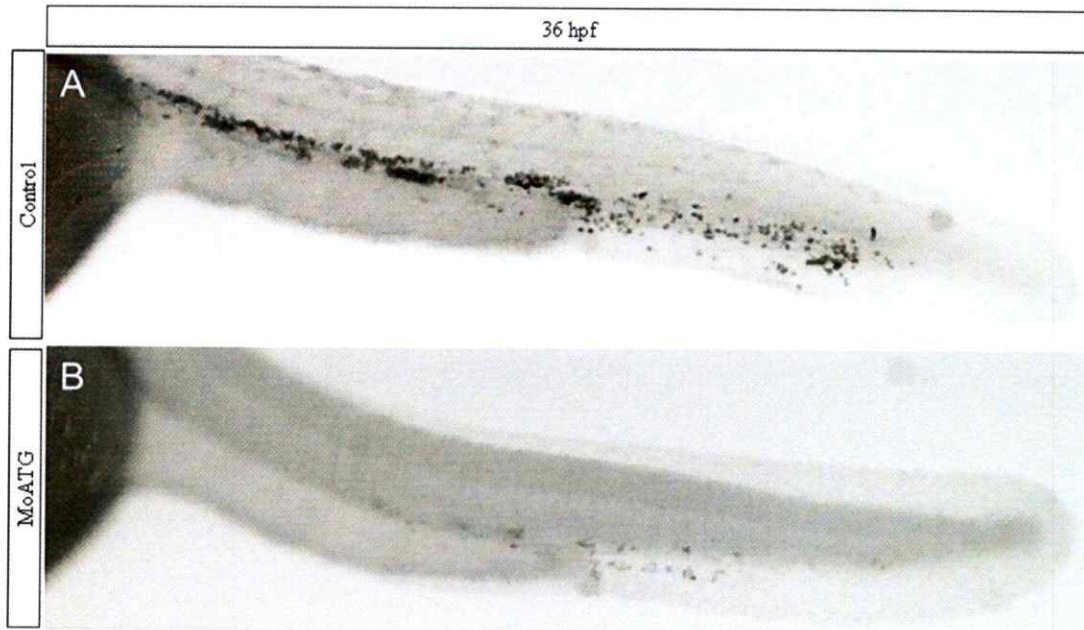


Figura 9. Knockdown de CSRNP1a disminuye la cantidad de células que expresan peroxidasa. Se utilizaron embriones de 36hpf silvestres sin inyectar (A) y morfantes (B). En embriones silvestres el ensayo DAB genera una marca café granulada a lo largo de la masa celular intermedia dramáticamente disminuida en embriones morfantes.

Discusión

Análisis de microarreglos han sido ampliamente utilizados para descubrir nuevos genes con funciones potenciales en diversas respuestas celulares. Es así como varios trabajos han identificado el transcrito AXUD1/CSRNP1 como diferencialmente regulado en una variedad de condiciones. Inducido especialmente por la sobreexpresión de AXIN1, y por tanto potencialmente relacionado con la vía wnt. Y sub-representado en varios tipos de cáncer.

La familia de proteínas CSRNP son proteínas nucleares, potencialmente factores de transcripción, cuya secuencia aminoacídica revela una ausencia de similitud con cualquier dominio proteico previamente descrito. Y con tres regiones conservadas: un territorio rico en serinas, otro rico en cisteínas y un dominio básico.

Estudios funcionales realizados mediante ratones Knockout de cada uno de sus 3 parálogos presentes (CSRNP1, 2 y 3 respectivamente y las combinaciones correspondientes), no han generado resultados evidentes sobre la función de esta familia de genes en el desarrollo de vertebrados (Gingras y col, 2007). En nuestro laboratorio, en trabajos hechos sobre el único ortólogo de esta familia de proteínas presente en *Drosophila*, DAXUD1, han confirmado su rol como supresor de tumores identificando su función en el control del ciclo celular y actividad pro-apoptótica ligada a la vía de señalización JNK (Glavic y col, 2009). Además estudios realizados avocados a la caracterizar el ortólogo de pez cebra CSRNP1/AXUD1, muestran que este gen es esencial para la proliferación y supervivencia de progenitores neurales cefálicos en el desarrollo embrionario de *Danio rerio* (Feijóo y col, 2009).

En este trabajo se caracteriza un segundo ortólogo presente en pez cebra de esta familia de genes, *csrnp1a*. Se obtuvo el patrón de expresión en el desarrollo de pez cebra y se realizó una aproximación funcional del gen mediante el uso de morfolidos antisentido.

Patrón de expresión de CSRNP1a en el desarrollo embrionario de pez cebra.

Pudimos observar que el gen *csrnp1a* presenta un patrón de expresión dinámico espacial y temporalmente. La primera observación que se puede hacer en este contexto es que la ausencia del transcrito en embriones recién fertilizados, 0hpf, lo que indica que *csrnp1a* no es de aporte materno, ya desde las 6 horas post fertilización (inicio de la gastrulación) y cuando la transcripción zigótica en el embrión de pez cebra ya ha comenzado, el transcrito puede ser observado, aunque en bajas concentraciones. Luego es posible observar un aumento en la expresión génica entre las 18 y 36 hpf para luego disminuir aproximadamente a las 48 hpf. El patrón de expresión mostró que este gen se expresa de manera acotada en el desarrollo embrionario de pez cebra, lo que sugiere que CSRNP1a es probablemente necesario en eventos celulares específicos de los procesos que ocurren durante dichos procesos del desarrollo embrionario.

Mediante hibridación *in situ* sólo fue posible obtener resultados de la expresión de *csrnp1a* en algún tejido de embrión completo pasadas las 20 hpf. Esto puede ser explicado porque el RT-PCR es una técnica más sensible que la ISH y la cantidad de expresión del gen en estadios embrionarios tempranos, posiblemente es más baja que el umbral capaz de ser detectado mediante ISH por nosotros. Sin embargo, tampoco fue posible obtener resultados a 18 hpf en donde la cantidad de transcrito observado es comparable al obtenido a 36 y 48 hpf. Esta situación puede ser explicada mediante una

posible falla en la manipulación en los embriones durante la realización del protocolo e hibridación *in situ*. En estadios embrionarios más tardíos observamos que, si bien la expresión de ambos parálogos de CSRNP no es igual, si es bastante similar en las regiones anteriores del sistema nervioso, pero *csrnp1a* presenta una expresión no observada en *axud1* situada en la masa celular intermedia. Este último es un tejido reconocido como sitio de proliferación y diferenciación de células hematopoyéticas.

En todos los vertebrados, al igual que en el pez cebra, la hematopoyesis presenta dos olas (revisado por Jill y Zon, 2005). La más temprana, hematopoyesis primitiva o embrionaria, que genera principalmente eritrocitos, macrófagos primitivos y algunos granulocitos. Marcadores de esta ola pueden verse en estadios tan tempranos como la gastrulación y hasta aproximadamente las 48 hpf donde comienza la hematopoyesis definitiva. La hematopoyesis primitiva ocurre en dos territorios distintos del pez cebra:

- 1.- En una región anterior al vitelo llamado: islas sanguíneas rostrales (RBI), y donde se diferencian únicamente células de línea mieloide, macrófagos primitivos y granulocitos neutrófilos;
- 2.- Una segunda zona, correspondiente a la masa celular intermedia (ICM) localizada en el sector segmentado del pez cebra, ventral a la notocorda. Este tejido genera principalmente células de línea eritroide, y menor proporción células mieloides (Al-Ahmi y Kunz, 1977) (Rhodes y col, 2005). Con estos antecedentes, la expresión de *csrnp1a* en la masa celular intermedia, sugiere un papel de este gen en la ola hematopoyesis primitiva en el embrión de pez cebra.

Knockdown del gen *csrnp1a*.

El fenotipo observado pasadas las 24hpf y considerado como morfante, fue de embriones con cabezas más pequeñas y una disminución significativa en la cantidad de células sanguíneas en circulación, pero además estos presentan de un ligero atraso en el estadio de los embriones. La circulación sanguínea comienza entre las 23 y 24 hpf, o sea antes de esa hora es posible evidenciar únicamente la disminución en el tamaño de la cabeza. Si bien, la disminución en la cantidad de células sanguíneas circulando puede ser explicada por perturbaciones en el proceso de hematopoyesis primitiva de los embriones de pez cebra, es decir que se ve afectada la formación, mantención o proliferación de progenitores hematopoyéticos, esta no es la única explicación posible para este fenómeno. Otra opción es que el gen *csrnp1a* está afectando la formación del mesodermo, ya que la ICM es formada a partir de este tejido, específicamente a partir del mesodermo lateral posterior, de manera que nuestros resultados pueden ser causa de un efecto indirecto. Una tercera opción para explicar la disminución en la cantidad de células en circulación puede ser circunscrita a la atrofia de los vasos sanguíneos, es decir que no se observa sangre por que los vasos están afectados de manera tal que no permiten circulación, o simplemente están ausentes con lo que resultaría imposible apreciar la circulación sanguínea. Además se ha descrito que el flujo sanguíneo afecta la cantidad de células sanguíneas en circulación; un régimen de menor flujo, genera una menor cantidad de glóbulos rojos en circulación y afecta al desarrollo de células troncales hematopoyéticas (células capaces de generar todos los linajes hematopoyéticos) (North y col 2009). En este contexto CSRNP1a podría afectar el latido cardíaco o el calibre de los vasos sanguíneos, los cuáles tienen directa relación

con la velocidad del flujo sanguíneo. Sin embargo considerando antecedentes de la expresión del gen en el tejido de proliferación y diferenciación de células hematopoyéticas, la masa celular intermedia, la hipótesis que nos parece más probable es que el gen *csrnp1a* tiene un rol en la formación, diferenciación o proliferación de progenitores hematopoyéticos.

Falta de función de CSRNP1a afecta la formación de células hematopoyéticas.

Teniendo en cuenta que el gen *csrnp1a* puede afectar el desarrollo de algún linaje hematopoyético en particular es que se observó cuáles son los linajes específicamente afectados por la falta de función de este gen. Para esto hicimos dos ensayos histoquímicos: O-Dianosidina y DAB. La O-Dianosidina (3,3'-Dimetoxibenzidina) es una molécula utilizada para detectar células que contienen hemoglobina, es decir, glóbulos rojos maduros en pez cebra. Esta se ve como una señal anaranjada evidenciada principalmente en los tubos de Cuvier ubicados sobre el vitelo. En el experimento mostrado de O-Dianosidina, el embrión mostrado no tiene una morfología típica de un individuo de 36 hpf según lo descrito por Kimmel y col, 1995. Deducimos que por su pigmentación y ángulo de la cabeza, el embrión morfológicamente tiene aproximadamente 30 hpf. Teniendo en cuenta que la circulación ya se ha formado desde las 24 hpf, entonces en este embrión si es posible evidenciar la disminución de eritrocitos maduros.

Por otro lado el ensayo DAB (3,3'-diaminobencidina) es utilizado para detectar la presencia de peroxidasa, células de línea mieloide en pez cebra, específicamente granulocitos neutrófilos. Esta tinción se observa como una marca marrón granulada a lo

largo de la masa celular intermedia. Considerando que las células sanguíneas en circulación están formadas principalmente por glóbulos rojos, es posible pensar que una disminución aparente en la cantidad de células en circulación se deba principalmente a una baja en el número de eritrocitos, y efectivamente esto es lo que ocurre en embriones *knockdown* para el gen *csrnp1a*.

Las células de la línea mieloide generalmente son células residentes del tejido en el vitelo y la masa celular intermedia, y sólo una pequeña proporción está en circulación. Para observar si la formación de este linaje se ve afectado es que realizamos el ensayo DAB. Pudimos observar nuevamente que una disminución en la función de CSRNP1a afecta la formación de las células de la línea mieloide como son los granulocitos.

Con estas dos tinciones tenemos representados los dos tipos de linajes celulares generados en la hematopoyesis primitiva del pez cebra. Nuestros resultados indican que ambos linajes disminuyen de forma consistente en embriones morfantes para CSRNP1a. Entonces, sobre la base de que el gen tendría un rol en la hematopoyesis primitiva, y sumado a los resultados de las tinciones DAB y O-Dianosidina, que muestran que ambos linajes eritroides y mieloides se reducen por una baja en CSRNP1a, podemos sugerir dos respuestas sobre la función de *csrnp1a*: una es que CSRNP1a es esencial las primeras etapas del proceso de diferenciación de células hematopoyéticas, en momentos tempranos del desarrollo embrionario de pez cebra, en los cuáles aún no existe compromiso de células mesodérmicas por alguno de estos linajes. La otra posible explicación puede ser dada por que el gen actúa en etapas posteriores de diferenciación, paralelamente en ambos linajes, siendo fundamental para la consecución de los destinos de diferenciación eritroide y mieloide analizados.

Conclusión

Este trabajo entrega nuevos datos sobre la familia de proteínas CSRNP mediante la investigación del ortólogo de pez cebra de esta familia de genes, *csrnp1a*. En el presente seminario de título se ha caracterizado por primera vez este gen, obteniendo datos substantivos sobre su función durante el desarrollo de pez cebra. Además hemos establecido un nuevo posible rol, para la familia de factores de transcripción CSRNP en la hematopoyesis primitiva, el cuál que no había sido descrito en estudios anteriores. Cabe destacar que los resultados expuestos aquí son claramente preliminares, y únicamente nos han permitido realizar las primeras aproximaciones sobre la función de este gen, pero asimismo abre las posibilidades a nuevas investigaciones orientadas a dilucidar de manera más específica la participación de *csrnp1a* en el desarrollo hematopoyético de pez cebra.

Bibliografia

1. Aberle, H., Bauer, A., Stappert, J., Kispert, A., and Kemler, R. 1997. B-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J.* **16**: 3797-3804.
2. Al-Adhami, M.A., Kunz, Y.W. 1977. Ontogenesis of haematopoietic sites in *Brachydanio rerio*. *Dev. Growth Differ.* **19**: 171-179.
3. Bennet, C. M., Kanki, J.P., Rhodes, J., Liu, T.X., Paw, B.H. 2001. Myelopoiesis in the zebrafish, *Danio rerio*. *Blood.* **98**: 643-651.
4. Cadigan, K.M., and Nusse, R. 1997. Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev.* **10**: 3286-3305.
5. Chen, W.V., Delrow, J., Corrin, P.D., Frazier, J.P., Soriano, P. 2004. Identification and validation of PDGF transcriptional targets by microarray-coupled gene-trap mutagenesis. *Nat Genet.* **36**: 304-312.
6. Croce, J. C. and McClay, D. R. 2006. The canonical Wnt pathway in embryonic axis polarity. *Semin. Cell Dev. Biol.* **17**, 168-174.
7. Davidson, A., and Zon, L. 2004. The 'definitive' (and 'primitive') guide to zebrafish hematopoiesis. *Oncogene.* **23**:7233-7246.
8. Gingras, S., Pelletier, S., Boyd, K., Ihle J.N. 2007. Characterization of a family of novel cysteine-serine-rich nuclear proteins (CSRNP). *PLoS ONE.* **2**:e808.
9. Glavic, A., Molnar, C., Cotoras, D., de Celis, J.F. 2009. Drosophila Axud1 is involved in the control of proliferation and displays proapoptotic activity. *Mech. Dev.* **126**:184-197.
10. Hogan, B.L. 1996. Bone morphogenetic proteins: multifunctional Cell regulators of vertebrate development. *Genes Dev.* **10**, 1580-1594.
11. Huang, H., He, X. 2008. Wnt/ β -catenin signaling: new (and old) players and new insights. *Curr. Opin. Cell Biol.* **20**:119-125.
12. Huber, O., Korn, R., McLaughlin, J., Ohsugi, M., Herrmann, B.G., and Kemler, R., 1996. Nuclear localization of β -catenin by interaction with transcription factor LEF-1. *Mech. Dev.* **59**: 3-10.
13. Hutton, J.J., Jegga, A.G., Kong, S., Gupta, A., Ebert, C. 2004. Microarray and comparative genomics-based identification of genes and gene regulatory regions of the mouse immune system. *BMC Genomics.* **5**: 82.
14. Ikeda, S., Kishida, S., Yamamoto, H., Murai, H., Koyama, S., and Kikuchi, A. 1998. Axin, a negative regulator of the Wnt signaling pathway, forms a complex with GSK-3 β and β -catenin and promotes GSK-3 β -dependent phosphorylation of β -catenin. *EMBO J.* **17**: 1371-1384.
15. Ishiguro, H., Tsunoda, T., Tanaka, T., Fujii, Y., Nakamura Y., and Furukawa, Y. 2001. Identification of AXUD1, a novel human gene induced by AXIN1 and its reduced expression in human carcinomas of the lung, liver, colon and kidney. *Oncogene.* **20**:5062-5066.
16. Iuchi, I., and Yamamoto, M. 1983. Erythropoiesis in the developing rainbow trout, *Salmo gairdneri* deus: histochemical and immunological detection of erythropoietic organs. *J. Exp. Zool.* **226**, 409-417. 3141-3150.
17. Jill, L. O., Zon, L. I. 2005. Use of the Zebrafish System to Study Primitive and Definite Hematopoiesis. *Annu. Rev. Genet.* **39**: 481-501.

18. Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B., Schilling, T. F. 1995. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn.* **203**: 253-310.
19. Kishida, S., Yamamoto, H., Ikeda, S., Kishida, M., Sakamoto, I., Koyama, S., y Kikuchi, A. 1998. Axin, a negative regulator of the wnt signaling pathway, directly interacts with adenomatous polyposis coli and regulates the stabilization of β -catenin. *J. Biol. Chem.* **273**: 10823-10826.
20. Korinek, V., Barker, N., Willert, K., Molenaar, M., Roose, J., Wagenaar, G., Markman, M., Lamers, W., Destree, O., Clevers. 1998. Two members of the Tcf family implicated in Wnt/ β -catenin signaling during embryogenesis in the mouse. *Mol. Cell Biol.* **18**: 1248-1256.
21. Liao, E.C., Trede, N.S., Ransom, D., Zapata, A., Kieran, M., and Zon, L. 2002. Non-cell autonomous requirement for the bloodless gene in primitive hematopoiesis of zebrafish. *Development.* **129**: 649-659.
22. Lieschke, G. J., Currie, P. D. 2007. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nat. Rev. Genet.* **8**: 353-367.
23. Logan, C. Y. and Nusse, R. 2004. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **20**: 781-810.
24. Martin, G.R. 1998. The roles of FGFs in the early development of vertebrate limbs. *Genes Dev.***12**: 1571-1586.
25. Nakamura, T., Furukawa, Y., Nakagawa, H., Tsunoda, T., Ohigashi, H., Murata, K., Ishikawa, O., Ohgaki, K., Kashimura, N., Miyamoto, M., Hirano, S., Kondo, S., Katoh, H., Nakamura, Y., and Katagiri, T. 2004. Genome-wide cDNA microarray analysis of gene expression profiles in pancreatic cancers using populations of tumor cells and normal ductal epithelial cells selected for purity by laser microdissection. *Oncogene* **23**: 2385-2400.
26. Nishidate, T., Katagiri, T., Lin, M.L., Mano, Y., Miki, Y., Kasumi, F., Yoshimoto, M., Tsunoda, T., Hirata, K., Nakamura, Y. 2004. Genome-wide gene-expression profiles of breast-cancer cells purified with laser microbeam microdissection: identification of genes associated with progression and metastasis. *Int J Oncol* **25**: 797-819.
27. North, T. E., Goessling, W., Peeters, M., Li, P., Ceol, C., Lord, A. M., Weber, G. J., Harris, J., Cutting, C. C., Huang, P., Dzierzak, E., and Zon, L. I. 2009. Hematopoietic Stem Cell Development Is Dependent on Blood Flow. *Cell.* **137**: 736-748.
28. Obama, K., Ura, K., Li, M., Katagiri, T., Tsunoda, T., Nombra, A., Satoh, S., Nakamura, Y., Furukawa, Y. 2005. Genome-wide analysis of gene expression in human intrahepatic cholangiocarcinoma. *Hepatology.* **41**: 1339-1348.
29. Rhodes, J., Hagen, A., Hsu K., Deng M., Xi Liu T, Look A.T., and Kanki J.P. 2005. Interplay of Pu.1 and Gata1 Determines Myelo-Erythroid Progenitor Cell Fate in Zebrafish. *Dev. Cel.* **1**: 97-108.
30. Satoh, S., Daigo, Y., Furukawa, Y., Kato, T., Miwa, N., Nishiwaki, T., Kawasoe, T., Ishiguro, H., Fujita, M., Tokino, T., Sasaki, Y., Imaoka, S., Murata, M., Shimano, T., Yamaoka, Y. and Nakamura, Y. 2000. *Nat. Genet.* **24**: 245-250.

31. Song, H.D., Sussmani, D. J., and Seldin D.C. 2000. Endogenous Protein Kinase CK2 Participates in Wnt Signaling in Mammary Epithelial Cells. *J. Biol. Chem.* **31**: 23790-23797.
32. Thisse, C., and Thisse, B. 2008. High-resolution *in situ* hybridization to whole-mount zebrafish embryos. *Nat Prot.* **3**: 59–69
33. Thomas, D.M., Francescutti-Verbeem, D.M., Kuhn, D.M. 2006. Gene expression profile of activated microglia under conditions associated with dopamine neuronal damage. *FASEB J.* **20**: 515–517.
34. Wei, S., Hong, J., and Kui J. 2005. Electrochemical determination of hydrogen peroxide using o-dianisidine as substrate and hemoglobin as catalyst. *J. Chem. Sci.*, Vol. 117, No. 4, July 2005, pp. 317–322.
35. Westerfield, M. 2007. *The Zebrafish Book*. 5th Ed. Eugene, Oregon.
36. Yi, X., Bekeredjian, R., DeFilippis, N.J., Siddiquee, Z., Fernandez, E., 2006. Transcriptional analysis of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Am J Physiol. Heart Circ Physiol.* **290**: H1098–H1102.