



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



ANALISIS DE DOS ISOFORMAS DE LA PROTEINA QUINASA  
CK1 EN EL DESARROLLO EMBRIONARIO DEL PEZ CEBRA  
*(Danio rerio)*

**JOSE MANUEL YAÑEZ LOPEZ**

Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico Veterinario  
Departamento de Ciencias  
Biológicas Animales.

PROFESOR GUIA: Prof. Dr. JUAN MARCELO ANTONELLI ANATIVIA

**SANTIAGO, CHILE**  
**2005**



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
 FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
 ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



ANALISIS DE DOS ISOFORMAS DE LA PROTEINA QUINASA  
 CK1 EN EL DESARROLLO EMBRIONARIO DEL PEZ CEBRA  
*(Danio rerio)*

**JOSE MANUEL YAÑEZ LOPEZ**

Memoria para optar al Título  
 Profesional de Médico Veterinario  
 Departamento de Ciencias  
 Biológicas Animales.

NOTA FINAL: .....

NOTA                      FIRMA

PROFESOR GUIA	: JUAN MARCELO ANTONELLI	.....	.....
PROFESOR CONSEJERO	: EDUARDO KESSI	.....	.....
PROFESOR CONSEJERO	: SOLEDAD FERNANDEZ	.....	.....

**SANTIAGO, CHILE**  
**2005**

Esta tesis fue realizada en el Instituto de Ciencias Biomédicas de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, bajo la dirección del Dr. Marcelo Antonelli Anativia.

La realización de esta tesis fue financiada en parte por el proyecto FONDECYT N° 1020753.

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar deseo expresar mis más sinceros agradecimientos a mi familia, padres y hermana, por su comprensión, paciencia y cariño entregado durante todos estos años.

De la misma manera quisiera agradecer al Dr. Marcelo Antonelli Anativia, director de esta tesis, por su incondicional apoyo y confianza.

Así mismo, hago extensivos estos agradecimientos a todos mis compañeros de laboratorio, los que continúan y los que se han marchado, no solo por los conocimientos y apoyo entregados, sino por toda la alegría y amistad brindada, así también por sus consejos y sugerencias en el día a día.

Finalmente, me gustaría agradecer al Dr. Jorge E. Allende Rivera y a la Dra. Catherine Connelly por la confianza y las facilidades prestadas para la realización de este trabajo.

# INDICE

	<i>Página</i>
<b>RESUMEN</b> .....	viii
<b>SUMMARY</b> .....	x
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....	3
2.1 Desarrollo embrionario temprano en pez cebra .....	3
2.1.1 División celular en los huevos fecundados .....	3
2.1.2 Gastrulación en embriones de pez cebra .....	7
2.1.2.1 Formación de la capa germinal .....	7
2.1.3 Formación de los ejes en embriones de pez .....	11
2.1.3.1 Formación del eje dorso ventral: el escudo embrionario .....	11
2.1.3.2 Formación del eje antero- posterior: dos centros de señales .....	13
2.2 Desarrollo de las extremidades anteriores en pez cebra .....	15
2.3 Proteína quinasa CK1 .....	18
2.4 Función de CK1 en el desarrollo embrionario .....	19
<b>3. HIPÓTESIS</b> .....	25
<b>4. OBJETIVO GENERAL</b> .....	25
<b>5. OBJETIVOS ESPECIFICOS</b> .....	25
<b>6. MATERIALES Y METODOS</b> .....	26
6.1 Animales de experimentación .....	26
6.2 Materiales .....	26
6.3 Preparación de RNA total de embriones de pez cebra .....	27
6.4 Transcripción Reversa Acoplada a PCR (RT-PCR) .....	28
6.5 Síntesis de sondas de RNA para Hibridación <i>in situ</i> .....	29
6.6 Hibridación <i>in situ</i> en embriones totales .....	30
6.7 Síntesis de mRNA para microinyección .....	32

6.8 Microinyección de mRNA .....	33
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>34</b>
5.1 Determinación de niveles relativos de expresión de RNA mensajero de CK1 $\alpha$ y CK1 $\epsilon$ mediante RT-PCR .....	34
5.2 Hibridación <i>in situ</i> sobre embriones de pez cebra .....	37
5.3 Análisis de Función de CK1 $\alpha$ y CK1 $\epsilon$ mediante la inyección de cantidades conocidas de mRNA de estas isoformas y de sus Dominantes Negativas en embriones de pez cebra .....	41
5.3.1 Inyección de mRNA codificante para la isoforma CK1 $\alpha$ .....	41
5.3.2 Inyección de mRNA codificante para la isoforma CK1 $\epsilon$ .....	42
5.3.3 Inyección de mRNA codificante para la Dominante Negativa de la isoforma CK1 $\alpha$ .....	43
5.3.4 Inyección de mRNA codificante para la Dominante Negativa de la isoforma CK1 $\epsilon$ .....	44
5.3.5 Inyección de mRNA control y embriones sin inyectar .....	44
5.4 Bloqueo de Función de CK1 $\alpha$ mediante la inyección de Morfolino Oligo Antisentido en embriones de pez cebra .....	49
5.4.1 Inyección de 5 $\eta$ g del Morfolino Anti CK1 $\alpha$ .....	50
5.4.2 Inyección de 10 $\eta$ g del Morfolino Anti CK1 $\alpha$ .....	51
5.5 Análisis del bloqueo de función de CK1 $\alpha$ producido por el Morfolino Oligo Antisentido mediante el uso de marcadores genéticos en embriones de pez cebra .....	55
5.5.1 Análisis del patrón de expresión de Goosecoid en embriones inyectados con el Morfolino Anti CK1 $\alpha$ .....	55
5.5.2 Análisis del patrón de expresión de Pax2.1 y Six3 en embriones inyectados con el Morfolino Anti CK1 $\alpha$ .....	56

5.5.3 Análisis del patrón de expresión de Papc en embriones inyectados con el Morfolino Anti CK1 $\alpha$ .....	57
<b>6. DISCUSIÓN</b> .....	62
6.1 Estudios de expresión de CK1 $\alpha$ y CK1 $\epsilon$ en desarrollo embrionario .....	62
6.2 Estudios de función de CK1 $\alpha$ y CK1 $\epsilon$ en desarrollo embrionario.	65
6.3 Análisis de marcadores genéticos en embriones inyectados con el Morfolino Anti CK1 $\alpha$ .....	69
<b>7. CONCLUSIONES</b> .....	72
<b>8. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	74

## RESUMEN

La proteína quinasa CK1 es una familia de proteínas a la que recientemente se la ha relacionado con el desarrollo embrionario. De esta familia se han clonado al menos siete isoformas ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$ -1,  $\gamma$ -2 y  $\gamma$ -3).

En esta Memoria de Título se realizaron estudios de expresión y función de las isoformas CK1 $\alpha$  y CK1 $\epsilon$  en el desarrollo embrionario del pez cebra (*Danio rerio*). Para ello, hemos analizado los patrones de expresión de estos genes mediante hibridización *in situ* y RT-PCR. Los resultados indican que estas isoformas se expresan de manera diferencial temporal y espacialmente durante el desarrollo embrionario. CK1 $\alpha$  se detecta desde la primera hora post fertilización y presenta un patrón de expresión ubicuo en los primeros estadios para luego restringirse a la región cefálica y a las aletas pectorales, mientras que CK1 $\epsilon$  no presenta un componente materno y el mRNA cigótico es detectado después de las 12 horas post fertilización con un patrón de expresión restringido exclusivamente al cerebro.

Para analizar la función de ambas isoformas se realizaron estudios de sobreexpresión mediante la inyección del mRNA codificante para CK1 $\alpha$  y CK1 $\epsilon$  y ensayos de bloqueo de función mediante la inyección de las dominantes negativas de cada isoforma. Para CK1 $\alpha$  también se utilizó la inyección del morfolino oligo antientido que silencia específicamente la actividad de éste gen. Estos experimentos anteriormente mencionados se realizaron utilizando la técnica de microinyección en embriones en estadio de una célula. Posteriormente los embriones fueron incubados y observados en distintos estadios bajo lupa estereoscópica, y clasificados según su fenotipo. Además, se procedió a analizar el patrón de expresión de algunos genes marcadores en embriones inyectados con

el Morfolino Anti CK1 $\alpha$ , con el fin de establecer con mayor precisión los procesos y vías en los que podría estar involucrada esta última isoforma.

Los resultados obtenidos con los experimentos anteriores indican que CK1 $\alpha$ , a diferencia de CK1 $\epsilon$ , está involucrada en los procesos que regulan la formación de los ejes embrionarios en el desarrollo temprano del pez cebra y además en la formación de estructuras del sistema nervioso central, específicamente en las que se encuentran ubicadas en el límite entre cerebro medio y posterior (cerebelo y cuarto ventrículo). En cambio, CK1 $\epsilon$  solo tendría participación en la formación de estructuras cerebrales sin afectar la formación de los ejes en el embrión en desarrollo.

## SUMMARY

The protein kinase CK1 is a family of proteins which has recently been implicated in embryonic development. At least seven isoforms of this family have been cloned ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$ -1,  $\gamma$ -2 y  $\gamma$ -3).

In this thesis, studies of expression and function of both CK1 $\alpha$  and CK1 $\epsilon$  were performed during embryonic development of zebrafish (*Danio rerio*). We analyzed the expression pattern of these genes by *in situ* hybridization and RT-PCR. The results indicate that these isoforms have different expression patterns both, temporally and spatially, during embryonic development. CK1 $\alpha$  is detected from the first hour postfertilization and displays a ubiquitous expression pattern in the first stages. Later, this expression is restricted to the cephalic region and to the pectoral fins, CK1 $\epsilon$  does not display a maternal component and its zygotic mRNA is detected after the 12 hours postfertilization with an expression pattern restricted exclusively to the brain.

In order to analyze the function of both isoforms, overexpression studies were performed by injecting mRNA for both CK1 $\alpha$  and CK1 $\epsilon$ , as well as for “blockade of function” assays by injecting the dominant negative mRNA of each isoform. For CK1 $\alpha$ , the injection of a morpholino antisense oligo that specifically silences the activity of this one gene also was used. These experiments were carried out using the microinjection technique in embryos at the one-cell stage. The embryos were then incubated and observed in different stages using a stereoscopic microscope, and classified according to their phenotype. In addition, we analyzed the expression pattern of some marker genes in embryos injected with the morpholino anti CK1 $\alpha$  oligonucleotide in order to establish with a greater precision the processes and pathways in which this isoform could be involved.

The results obtained with the experiments described here indicate that CK1 $\alpha$ , unlike CK1 $\epsilon$ , is involved in the processes that regulate the axis formation of the embryos during early development of the zebrafish as well as in the formation of structures of the central nervous system, specifically those define in the midbrain-hindbrain boundary (cerebellum and fourth ventricle). This is in contrast to the participation of CK1 $\epsilon$  that is involved only in the formation of cerebral structures without affecting the formation of the axis in the developing embryo.

## 1. INTRODUCCIÓN

El desarrollo embrionario de los vertebrados ha sido estudiado en un reducido número de sistemas vivientes, que nos han permitido comprender como los genes se organizan en su patrón de expresión para poder generar un organismo vivo pluricelular a partir de una sola célula.

Dentro de estos sistemas se encuentra el pez cebra, que brinda ciertas ventajas para este propósito: sus embriones son transparentes durante todo el desarrollo temprano, lo que permite una fácil visualización de eventos claves para el embrión. Otra ventaja es que el desarrollo del embrión es muy rápido: la organogénesis, por ejemplo, se completa al día cinco posterior a la fertilización.

Las primeras etapas del desarrollo embrionario han sido estudiadas en varios modelos animales simultáneamente, y aunque el proceso puede variar en el detalle, la batería de genes involucrada en la generación de un nuevo individuo es bastante similar entre las diferentes especies.

La Proteína Quinasa CK1 es una enzima fundamental en la integración de diversos procesos celulares, formando complejos multiproteicos que resultan en la fosforilación de variadas proteínas sustratos. En la actualidad se han identificado siete genes distintos que codifican para las diferentes isoformas de CK1, y estas son: CK1 $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  (1-3),  $\delta$  y  $\epsilon$ .

La existencia de una línea de pez cebra mutante para la isoforma CK1 $\alpha$ , que presenta un fenotipo con defectos en el desarrollo de las aletas pectorales y recientes estudios que relacionan ésta y otras isoformas de esta quinasa con dos

vías reguladoras del desarrollo embrionario en vertebrados (vía Wnt y Sonic Hedgehog), entregan contundentes evidencias de que isoformas de CK1 pueden estar involucradas en los procesos regulatorios que controlan el desarrollo embrionario en los vertebrados.

En esta memoria de título proponemos estudiar la expresión y función de dos isoformas de CK1 en relación a eventos del desarrollo temprano en el embrión de pez cebra.

## **2. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA**

### **2.1 Desarrollo embrionario temprano en pez cebra**

En los últimos años, el teleosteo *Danio rerio*, conocido como pez cebra, se ha convertido en el organismo favorito para aquellos que desean estudiar el desarrollo embrionario de los vertebrados. Entre las ventajas de esta especie se encuentran: que puede tener un gran número de crías durante todo el año, son fáciles de mantener, sus embriones son transparentes y se desarrollan fuera de la madre. Además de esto, se desarrollan muy rápido: a las 24 horas post fertilización (h.p.f) han formado la mayoría de sus tejidos y órganos primordiales (Langeland y Kimmel, 1997).

#### **2.1.1 División celular en los huevos fecundados.**

Posterior a la fecundación, la división celular ocurre sólo en el polo animal del huevo, en una zona conocida como el blastodisco, que es una región delgada de citoplasma libre de vitelo (Figura 1). El tipo de segmentación es meroblástico ya que las divisiones celulares no dividen completamente el huevo, y discoidal ya que solamente el citoplasma del blastodisco va a dar origen al embrión (Gilbert, 2000). Las ondas de calcio que se inician en la fertilización estimulan la contracción del citoesqueleto de actina para restringir el citoplasma al polo animal del huevo. Esto convierte el huevo esférico en un huevo piriforme con un blastodisco apical (Leung *et al.*, 1998).

Las divisiones son rápidas, de unos 15 minutos cada una y las doce primeras ocurren en forma sincronizada, originando un montículo de células que se sitúa en el polo animal del huevo. Este grupo de células constituyen el blastodermo, y en un comienzo mantienen una conexión abierta entre ellas, permitiendo que moléculas de tamaño moderado (17 kDa) puedan pasar libres desde un blastómero al otro (Kimmel y Law, 1985).

Aproximadamente a la décima división comienza la transcripción de los genes cigóticos, las divisiones se enlentecen y el movimiento celular se hace evidente (Kane y Kimmel, 1993). Acá se pueden distinguir tres tipos celulares (Figura 2):

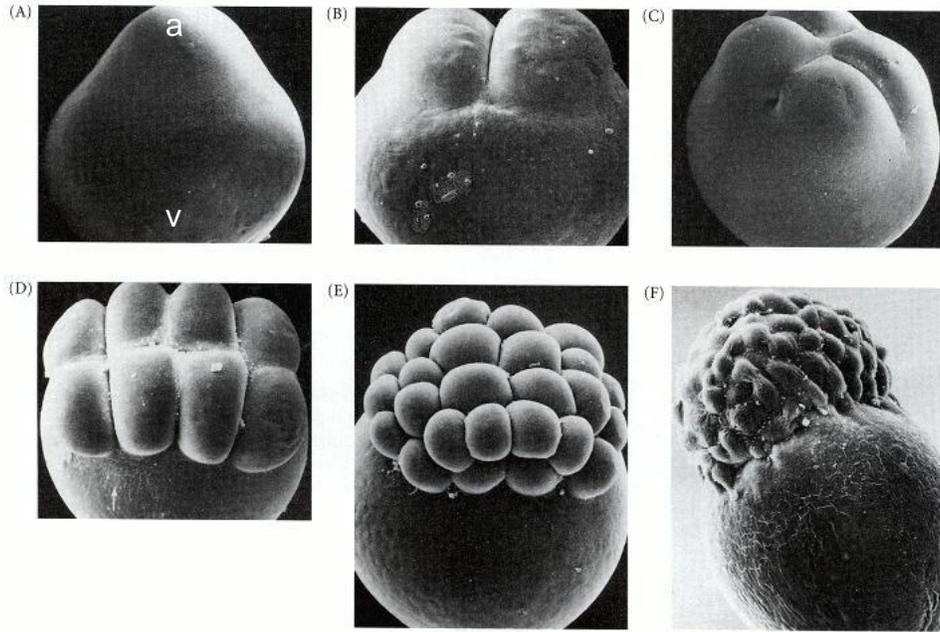
El primero es el de la **Capa Sincicial del Vitelo o Yolk Syncytial Layer (YSL)**, que se forma cuando las células del polo vegetal del blastodermo se fusionan con el vitelo subyacente. Esta fusión produce un anillo de núcleos que se sitúan en el vitelo, justo debajo del blastodermo. Más tarde, mientras el blastodermo se expande en territorio vegetal rodeando el vitelo, parte de los núcleos se moverá debajo del blastodermo para formar el YSL interno, y otros se situarán en el vitelo, justo bajo el margen blastodermal para formar el YSL externo. El YSL será importante para dirigir algunos de los movimientos de gastrulación (Gilbert, 2000).

El segundo tipo de células que se distingue en la transición de la blástula media es el que forma parte de la **capa envolvente o Enveloping Layer (EVL)**, formada por las células más superficiales del blastodermo, que forman una gruesa capa epitelial. El EVL eventualmente formará el peridermo, una cubierta protectora extraembrionaria que es eliminada durante el desarrollo tardío.

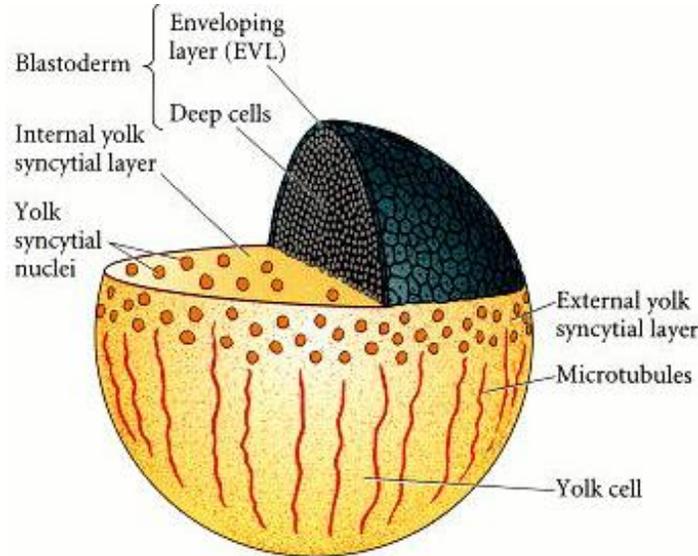
Entre el EVL y el YSL están las **células profundas o Deep Cells**, que forman parte del tercer grupo celular y son las que darán origen al embrión.

Los destinos de las células del blastodermo temprano no han sido determinados, cualquiera de estas células pueden dar origen a una variedad no predecible de tejidos.

El destino de éstas parece ser establecido poco después del inicio de la gastrulación, donde células en ubicaciones específicas dentro del embrión dan origen a tejidos con una alta predecibilidad (Kimmel *et al.*, 1990).



**Figura 1:** *División meroblástica discoidal en un huevo de pez cebra.* (A) embrión en estadio de una célula donde se distingue el blastodisco y el vitelo en la región superior e inferior respectivamente. Embrión en estadio de 2 (B), 4 (C), 8 (D), 32 (E) y 64 (F) células. a: polo animal; v: polo vegetal.



**Figura 2:** *Estructura de la blástula en el huevo de pez cebra.* Antes de la gastrulación, las células profundas están rodeadas por la EVL. La superficie animal del vitelo contiene los núcleos del YSL. Los microtúbulos se extienden a través del vitelo y en la región externa del YSL.

## 2.1.2 Gastrulación en embriones de pez cebra.

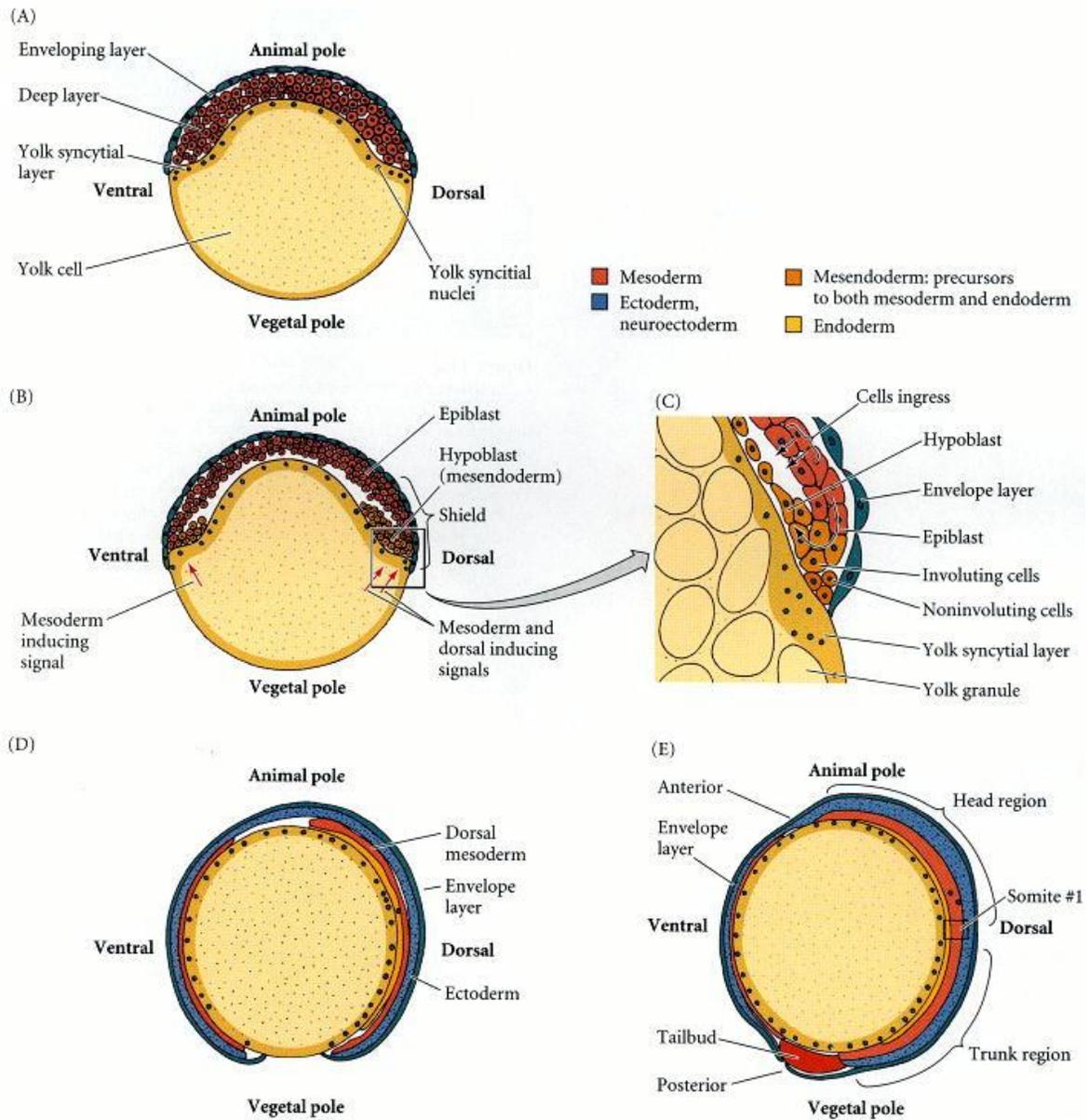
El primer movimiento celular en la gastrulación del pez es la epibolía de las células del blastodermo sobre el vitelo. En esta etapa, las células profundas del blastodermo se mueven sobre la superficie del vitelo para envolverlo completamente (Figura 3). Sin embargo, este movimiento es proveído por la expansión autónoma del YSL hacia el polo animal del vitelo y no por la migración de los blastómeros. La EVL, que está muy unida al YSL, es arrastrada junto a él y las células profundas rellenan el espacio entre estas dos capas. La expansión del YSL depende de una red de microtúbulos, y se ha visto que la radiación o drogas que bloquean la polimerización de la tubulina inhiben la epibolía (Strahle y Jesuthasan, 1993).

Durante la migración, en un lado del blastodermo se distingue una zona evidentemente más gruesa que la otra. Experimentos de marcaje celular, indican que esta región es la futura superficie dorsal del embrión (Schmidt y Campos-Ortega, 1995).

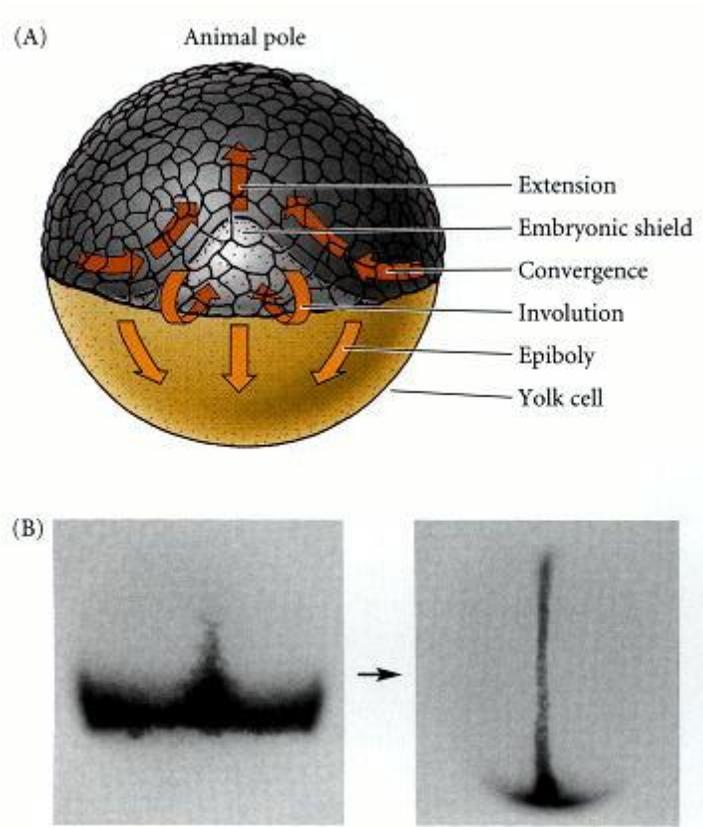
### 2.1.2.1 *Formación de la capa germinal.*

Después que las células han cubierto la mitad del vitelo, aparece un engrosamiento en todo el margen del blastodermo, llamado **anillo germinal**, que está compuesto por **epiblasto** (capa superficial) e **hipoblasto** (capa interna). El hipoblasto es formado por la invaginación de las células superficiales por debajo del margen de su migración hacia el polo animal (Figura 3C.) Esta involución ocurre en todo el margen del embrión, pero comienza en la futura región dorsal, formando un engrosamiento localizado llamado **escudo embrionario** (Figura 4), que es funcionalmente equivalente al labio dorsal del blastoporo de los anfibios, ya que puede generar un doble eje embrionario cuando es trasplantado a un

embrión receptor, es decir, genera dos embriones compartiendo un vitelo común (Gilbert, 2000). Así, a medida que las células sufren la epibolía alrededor del vitelo, también están involucionando en los márgenes y convergiendo anterior y dorsalmente hacia el Escudo Embrionario (Trinkaus, 1992). Las células del hipoblasto del escudo embrionario convergen y se extienden anteriormente, estrechándose a lo largo de la línea media dorsal. Estos movimientos forman los precursores de la **notocorda** y las **células mesodermales paraxiales** adyacentes son las precursoras de los somitos mesodérmicos. La convergencia y extensión concomitantes en el epiblasto originan las células neurales presuntivas hacia la línea media dorsal, donde formarán la cresta neural. El resto del epiblasto dará origen a la piel del pez (Gilbert, 2000).



**Figura 3:** *Movimientos celulares durante la gastrulación del pez cebra.* (A) Blastodermo en estadio de 30% de epibolía (alrededor de 4.7 h.p.f.). (B) formación del hipoblasto, por involución de las células en el margen del blastodermo o por delaminación de las células desde el epiblasto (6 h.p.f.). (C) acercamiento a la región marginal. (D) a 90% de epibolía (9 h.p.f.) se puede apreciar al mesodermo rodeando el vitelo, entre el endodermo y el ectodermo. (E) gastrulación completa (10.3 h.p.f.)



**Figura 4:** *Movimientos de convergencia y extensión durante la gastrula del pez cebra.* (A) Vista dorsal de los movimientos de convergencia y extensión durante la gastrulación del pez cebra. Durante la epibolía el blastodermo va cubriendo el vitelo, la involución de estas células genera el hipoblasto; la convergencia y extensión traen a las células del hipoblasto y epiblasto a la región dorsal para formar el escudo embrionario. Dentro del escudo, el acumulo de células hace extender el cordamesodermo hacia el polo animal. (B) muestra la convergencia y extensión de las células del cordamesodermo, que están marcadas mediante hibridación *in situ* del gen *no tail*, expresado en la notocorda del embrión.

### 2.1.3 Formación de los ejes en embriones de pez

#### 2.1.3.1 Formación del eje dorso ventral: el escudo embrionario.

El escudo embrionario es crítico en el establecimiento del eje dorso-ventral en peces. Puede inducir al mesodermo lateral y ventral (precursores de sangre y tejidos conectivos) a mesodermo dorsal (notocorda y somitos), y es el responsable de que el ectodermo se convierta en tejido neural y no epidermal. Si se transplanta el escudo de un embrión en el lado ventral de otro se genera un doble eje embrionario, es decir, dos embriones compartiendo un vitelo común. Aunque la placa precordial y la notocorda se originan del escudo del donador, los otros órganos del eje secundario derivan de los tejidos del embrión original que forman las estructuras ventrales. El nuevo eje es inducido por las células donadoras y en el embrión que ha sido removido el escudo no se forman estructuras dorsales y carece de sistema nervioso (Gilbert, 2000).

Al igual que el labio dorsal del blastoporo del anfibio, el escudo embrionario forma la placa precordial y la notocorda. Los precursores de estas dos regiones inducen al ectodermo para ser ectodermo neural.

Tanto en peces como en anfibios, los factores paracrinos de la familia BMP (Bone Morphogenetic Protein) sintetizados en las regiones ventrales y laterales del embrión, inducen a que el ectodermo de origen a la epidermis. La notocorda de peces y anfibios secreta factores que bloquean esta inducción y así permiten que el ectodermo forme tejido neural. En peces, el BMP involucrado es BMP2B y la proteína secretada por la notocorda que se une e inactiva BMP2B es

un factor llamado Cordino (Figura 5). Si el gen Cordino es mutado, el tubo neural no se forma correctamente.

Por lo tanto, es un gradiente de concentración de BMP2B el que da origen a las regiones laterales y ventrales de ectodermo y mesodermo del pez cebra, y la proporción entre Cordino y BMP2B especificarían las posiciones a lo largo del eje dorso-ventral (Nguyen *et al.*, 1998). Sin embargo en peces, la notocorda no es la única estructura capaz de producir las proteínas que bloquean BMP2B. Si la notocorda falla en su formación (como en las líneas mutantes de *floating head* o *no tail*), el tubo neural es igualmente producido, ya que es posible que las células precursoras de la notocorda (que igual están presentes en estas mutaciones) son capaces de inducir el tubo neural o que la porción dorsal de los precursores de los somitos puede compensar la falta de notocorda (Hammerschmidt *et al.*, 1996).

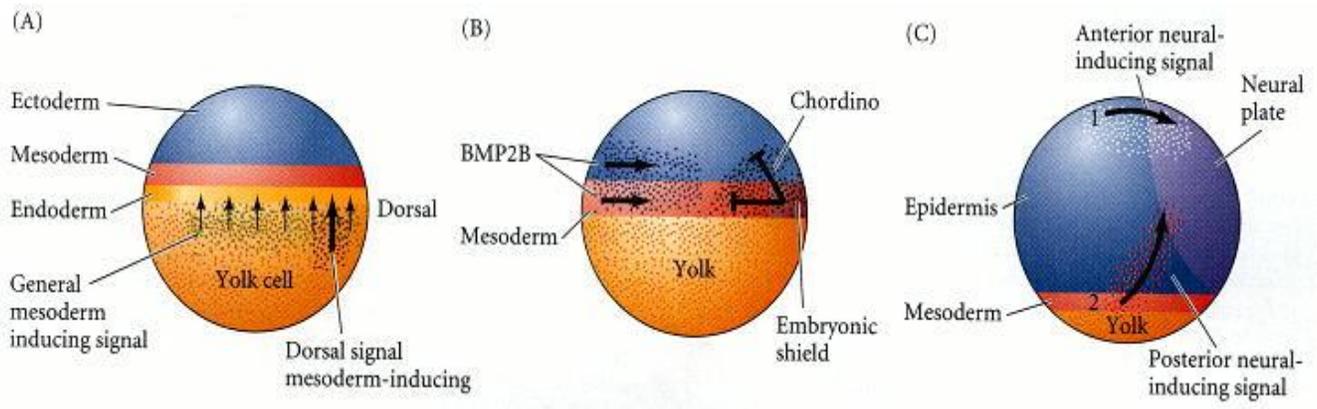
El escudo embrionario tiene la misma habilidad organizativa que el labio dorsal del blastoporo en anfibios, donde las células del endodermo justo debajo de él (Centro de Nieuwkoop) acumulan  $\beta$ -catenina. Esta proteína es fundamental para que el endodermo induzca a las células que están arriba del Centro de Nieuwkoop para que formen el **Organizador Dorsal (Dorsal Organizer)** en el labio del blastoporo.

En pez cebra, los núcleos del YSL que se ubican en esa región, justo debajo de las células que formarán el escudo embrionario también acumulan  $\beta$ -catenina. Por lo tanto, esta proteína permite distinguir la región dorsal del YSL, de la región lateral y ventral (Gilbert, 2000). La inducción de acumulación de  $\beta$ -catenina en la región ventral del huevo origina dorsalización del embrión (predominio de formación de estructuras dorsales en desmedro de tejidos y órganos ventrales) y un eje embrionario secundario (Kelly *et al.* 1995). Además justo antes de la gastrulación, las células del margen dorsal del blastoporo

sintetizan y secretan proteínas relacionadas con Nodal. Éstas inducen a los precursores de la notocorda y de la placa precordial para activar *Gooseoid* y otros genes con actividad dorsalizante. Así el Escudo embrionario del pez cebra es considerado equivalente al Organizador Dorsal de los anfibios y la región subyacente a él es similar al Centro Nieuwkoop de *Xenopus laevis* (Gilbert, 2000).

#### 2.1.3.2 Formación del eje antero-posterior: dos centros de señales

Cuando se induce experimentalmente un segundo eje dorso-ventral en embriones de pez cebra, ambos ejes, el normal y el inducido, tienen igual polaridad antero posterior. Ambas cabezas están en el antiguo polo animal, y ambas colas ubicadas vegetalmente. De hecho, el eje antero-posterior es especificado durante la oogénesis, donde el polo animal marca la región anterior del embrión. Este eje se estabiliza durante la gastrulación a través de dos centros de señales distintos: El primero, un pequeño grupo de células neurales anteriores en el límite entre la superficie neural y el ectodermo (región que dará origen a la glándula pituitaria, placa nasal y cerebro anterior) se secretan componentes que originan el desarrollo anterior. Si estas células neurales anteriores son movidas en forma experimental más posteriormente en el embrión, harán que las células neurales cercanas asuman las características de las neuronas de cerebro anterior. El segundo centro se encuentra en la región posterior del embrión y consta de células precursoras de mesodermo lateral que producen componentes caudalizantes, semejantes a proteínas relacionadas con Nodal y Activina. Si se transplantan al ectodermo neural anterior, este tejido transformará el presuntivo cerebro anterior en estructuras similares a cerebro posterior (Gilbert, 2000).



**Figura 5:** *Formación de ejes en el embrión de pez cebra.* (A) Antes de la gastrulación el blastodermo se organiza con el ectodermo cerca del polo animal, el mesodermo presuntivo bajo el ectodermo, y el endodermo justo por encima del vitelo. El YSL, y probablemente el endodermo, envía dos señales al mesodermo. La primera señal (flechas delgadas) induce al mesodermo, mientras una segunda señal (flecha ancha) induce específicamente un área del mesodermo que formará parte del mesodermo dorsal (escudo embrionario). (B) Formación del eje dorso-ventral. Durante la gastrulación, el mesodermo ventral secreta BMP2B (flechas) para inducir la diferenciación mesodermal ventrolateral y epidermal. El mesodermo dorsal secreta factores (como Chordino) que bloquean BMP2B y dorsalizan el mesodermo y ectodermo, convirtiéndolo más tarde en tejido neural. (C) Se han identificado dos centros de señales para establecer la polaridad antero-posterior, una (1) en el límite del ectodermo neural y no neural, que induce células neurales anteriores, y el otro (2) en el margen lateral, que genera una señal posteriorizante.

## **2.2 Desarrollo de las extremidades anteriores en pez cebra.**

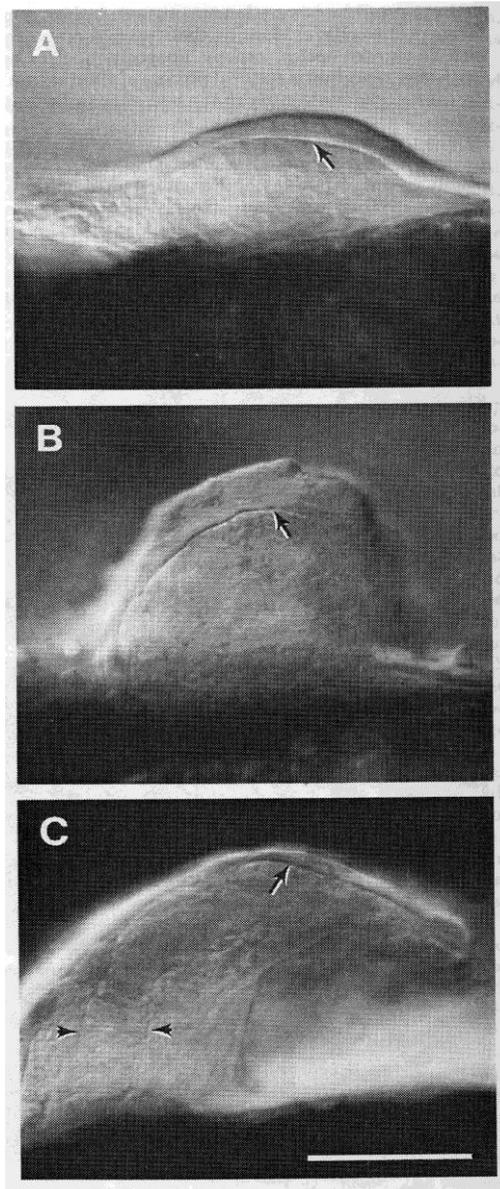
El desarrollo de las extremidades anteriores en vertebrados ha sido analizado simultáneamente en ratón, pollo y pez cebra, y aunque el proceso puede diferir en el detalle, la batería de genes involucradas en la formación de estas estructuras está bastante conservada en la evolución (Gilbert, 2000).

La formación de las extremidades anteriores en el pez cebra (aletas pectorales) es similar a la formación de las extremidades anteriores (y posteriores) en otros vertebrados. Éstas se originan a partir de una doble contribución del mesodermo de la placa lateral y del mesodermo somítico (Gilbert, 2000). Este proceso involucra una proliferación diferencial a través de la cual regiones específicas de la placa lateral forman una protuberancia (bud) a nivel del territorio presuntivo donde posteriormente se formarán los miembros anteriores (Gilbert, 2000).

Todas las estructuras cartilagosas de las extremidades anteriores en vertebrados se forman a partir de la migración de las células del mesodermo de la placa lateral dentro de esta protuberancia. La protuberancia formada es rodeada por una cubierta de tejido ectodermal cuyo punto más distal forma una estructura epitelial especializada, el pliegue ectodermal apical (apical ectodermal ridge ó AER). Al corto tiempo de la formación de esta estructura, las células mesenquimales se agregan para formar elementos de cartílago que prefiguran los componentes del esqueleto de los miembros anteriores (Gilbert, 2000). El músculo esquelético de estas estructuras es formado a partir de células derivadas de los somitos presentes a nivel de las protuberancias. Se ha postulado que las células mesenquimales de las extremidades en formación son portadoras de

información posicional para que las células precursoras del músculo migren desde los somitos (Buckingham *et al*, 2003). El resultado neto de este proceso es la formación progresiva del miembro anterior del vertebrado.

La estructura del primordio de la aleta pectoral del pez cebra es homólogo al primordio de las extremidades delanteras de los vertebrados terrestres. A las 26 horas post-fertilización (h.p.f.) se forma un pequeño primordio (pectoral fin bud). A las 36 h.p.f. la epidermis que cubre este primordio se engruesa en su extremo más distal formando una estructura análoga al AER descrita en otros vertebrados: el pliegue apical. Después de las 48 h.p.f., el pliegue apical se expande y es invadido por mesenquima, dando origen al pliegue de la aleta, que se convertirá eventualmente en la aleta del pez adulto (Grandel y Schulte-Merker, 1998). Ver Figura 6.



**Figura 6:** *Desarrollo de la aleta pectoral del pez cebra.* (A) Primordio de la aleta (pectoral fin bud) a las 28 h.p.f. La flecha indica el límite entre el mesenquima y el ectodermo. (B) 36 h.p.f. La flecha indica la diferenciación del pliegue ectodermal apical. (C) 48 h.p.f. La flecha indica la formación del pliegue de la aleta.

### 2.3 Proteína quinasa CK1

La proteína quinasa CK1 es una familia de enzimas monoméricas relacionadas estructuralmente, ubicuas en eucariontes y cuyas masas moleculares oscilan entre los 38 y 55 kDa (Tuazon y Traugh, 1991).

Hasta el momento se han identificado siete genes que dan origen a siete isoformas distintas, CK1 $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ (1-3),  $\delta$  y  $\epsilon$  (Tapia *et al.*, 1994). Las diferentes isoformas de CK1 fosforilan serina (Ser) y treonina (Thr), aunque algunas variantes purificadas de levadura y de *Xenopus laevis* pueden fosforilar tirosina, pero con una menor eficiencia (Knippschild *et al.*, 2005). Un gran número de proteínas pueden ser fosforiladas por CK1 *in vitro*, entre las que se encuentran: p53, el receptor de insulina, el receptor del factor de necrosis tumoral, la glicógeno sintetasa, el receptor muscarínico m3 y el antígeno T grande de la proteína SV40 (Knippschild *et al.*, 2005). Durante los últimos años se ha comunicado la participación de CK1 en varios procesos claves como: la regulación del ritmo circadiano, la reparación de DNA, la activación de células T y la regulación del tráfico vesicular (Knippschild *et al.*, 2005). Sin embargo, su papel preciso a nivel molecular en estos procesos celulares y la regulación de CK1 y sus isoformas han permanecido relativamente oscuros.

Fue sugerido inicialmente que la proteína quinasa CK1 fosforilaba residuos de serina y treonina en secuencias **Sp/Tp-X-X-S/T** donde S y T representan el aminoácido fosforilado por la CK1, X cualquier aminoácido y Sp y Tp representan residuos de serina y treonina previamente fosforilados (en la posición n-3). Sin embargo estudios posteriores han revelado que el aminoácido fosforilado puede ser reemplazado por una agrupación de aminoácidos ácidos

(poliaspártico y poliglutámico) hacia el extremo amino terminal del aminoácido fosforilable por CK1 (Knippschild *et al.*, 2005). Recientemente se ha visto que secuencias no canónicas pueden ser fosforiladas por CK1 en algunas proteínas, como  $\beta$ -catenina (Marin *et al.*, 2003).

La abundancia relativa de las diferentes isoformas en diferentes células y en diferentes tejidos es desconocida. Sin embargo, la enzima purificada bioquímicamente, desde numerosos tejidos y caracterizada en estudios anteriores corresponde probablemente en la mayoría de los casos a la isoforma CK1 $\alpha$  (Knippschild *et al.*, 2005). En el caso de esta última isoforma, se han encontrado cuatro distintas variantes resultantes de un procesamiento alternativo del mRNA en pollo, mamífero y pez cebra:  $\alpha$ ,  $\alpha$ S,  $\alpha$ L y  $\alpha$ LS (Burzio *et al.*, 2002). La función fisiológica de cada una de estas cuatro variantes, si es diferente o no, no ha sido claramente establecida.

## **2.4 Función de CK1 en el desarrollo embrionario**

Utilizando una técnica que consiste en mutagenizar el genoma del pez cebra mediante secuencias de DNA retrovirales con la finalidad de interrumpir genes y producir un fenotipo anormal observable, se han identificado varios genes importantes para el desarrollo (Golling *et al.*, 2002).

Esta tecnología permite identificar el gen responsable de un determinado fenotipo, debido a que la secuencia exógena de DNA insertada (o retrovirus) en el genoma del pez cebra, presenta la ventaja de permitir la rápida identificación molecular del gen mutado. Utilizando esta técnica se han identificado hasta este momento alrededor de 100 genes importantes para el desarrollo del pez cebra

(Golling *et al.*, 2002). Estos comprometen la formación de diversas estructuras como corazón, hígado, cerebro, oído, mandíbula, etc.

Entre las mutantes obtenidas con la técnica anterior, se aisló una que presentó malformaciones que afectaban el desarrollo de las aletas pectorales y en menor grado a la mandíbula. Análisis de PCR y secuenciación del DNA que rodea el segmento retroviral insertado en el genoma, mostraron que esta inserción producía una interrupción dentro de un intrón en el gen codificante de la Proteína Quinasa CK1 $\alpha$  (Golling *et al.*, 2002). El fenotipo mutante se observa a partir del día 3 del desarrollo del embrión, cuando la somitogénesis ha sido completada y la organogénesis se encuentra en pleno desarrollo. Finalmente los embriones mueren alrededor del día 9.

Las estructuras que dan origen a la aleta pectoral se empiezan a desarrollar alrededor del segundo día de vida del embrión y están completamente formadas para el día 5 del desarrollo (Detrich *et al.*, 1999).

Por otra parte, existe evidencia que relaciona a las isoformas CK1 $\epsilon$ , CK1 $\delta$  y CK1 $\alpha$  con la vía de Wnt (Sakanaka *et al.*, 2000). En *Xenopus laevis* y pez cebra, esta vía regula la formación del eje dorso-ventral (Kelly *et al.*, 2000). La sobre expresión en oocitos de *Xenopus laevis* de las isoformas CK1 $\epsilon$ , CK1 $\delta$ , y CK1 $\alpha$  inducen la formación de un doble eje dorsal. Este efecto es sinérgico con la co-expresión de Wnt (McKay *et al.*, 2001). Los genes de la familia de Wnt codifican para glicoproteínas secretables que actúan como ligandos de receptores de membrana pertenecientes a la familia de Frizzled. Se han descrito varios componentes río abajo de la vía de Wnt, entre ellos están las proteínas APC (polipósis adenomatosa coli), Dishevelled (Dvl), Axina (ó su homólogo

conductina), Frat,  $\beta$ -catenina y recientemente algunas isoformas de CK1 (Hino *et al.*, 2003, Vielhaber y Virshup, 2001).

Wnt regula la estabilidad de  $\beta$ -catenina mediante una cascada de eventos que involucra fosforilaciones mediadas por glicógeno sintetasa quinasa-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) y algunas isoformas de CK1 (Figura 7). El mecanismo molecular de estos eventos es pobremente entendido (Hino *et al.*, 2003, Vielhaber y Virshup, 2001). En ausencia de la señal de Wnt, la  $\beta$ -catenina citoplasmática es desestabilizada por un complejo que contiene Axina, GSK-3 $\beta$  y APC (Hino *et al.*, 2003). La interacción de GSK-3 $\beta$  con Axina en el complejo facilita la eficiente fosforilación de  $\beta$ -catenina por GSK-3 $\beta$ . Esta fosforilación media la degradación de  $\beta$ -catenina por el sistema de la ubiquitina (Vielhaber y Virshup, 2001). Por el contrario, cuando Wnt se une al receptor Frizzled en la superficie de la célula, la proteína citoplasmática Dvl, antagoniza la fosforilación dependiente de GSK-3 $\beta$  de  $\beta$ -catenina. Una vez que la fosforilación de  $\beta$ -catenina es reducida, ésta se disocia del complejo de axina y se estabiliza, acumulándose en el citoplasma (Vielhaber y Virshup, 2001).  $\beta$ -catenina puede entonces migrar al núcleo donde se asocia con factores de transcripción de la familia de Lef y Tcf (Vielhaber y Virshup, 2001). En este esquema, Dvl parece unirse a Axina e inhibir la fosforilación de  $\beta$ -catenina por GSK-3 $\beta$  (Kishida *et al.*, 2001). Se ha descrito que CK1 $\epsilon$  (y probablemente CK1  $\delta$ ) forma un complejo con Dvl y Axina. La interacción de CK1 $\epsilon$  con Dvl parece activar cooperativamente la formación del complejo  $\beta$ -catenina/Lef (Kishida *et al.*, 2001; Hino *et al.*, 2003). Estos resultados indican que estas isoformas de CK1 regulan esta vía en forma positiva.

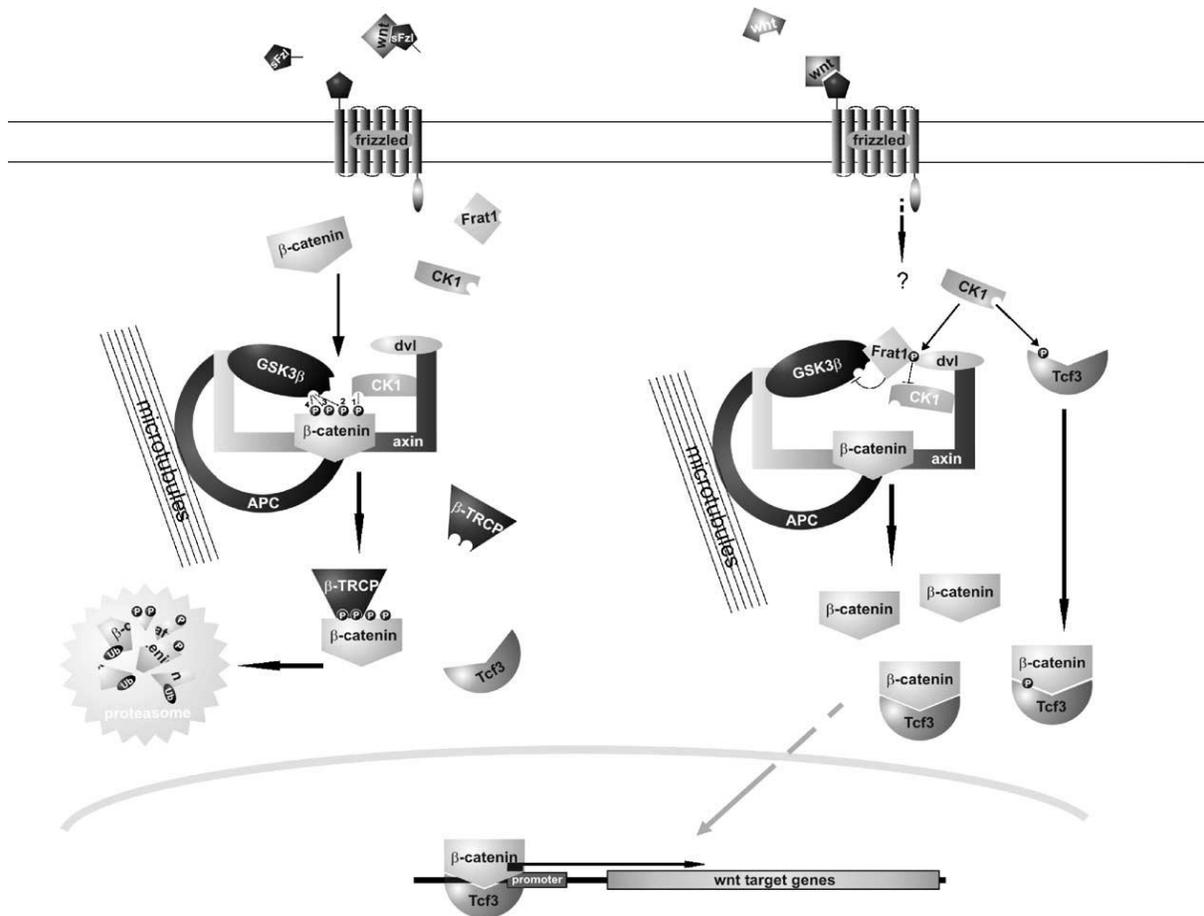
Sin embargo la función de las isoformas de CK1 en la vía de Wnt ha resultado controvertida. Varios grupos han reportado que CK1 $\alpha$  y CK1 $\epsilon$  desactivan esta vía mediante la directa fosforilación de  $\beta$ -catenina en un sitio no canónico (ser45). Esta fosforilación crearía un sitio de consenso para el reconocimiento y fosforilación de  $\beta$ -catenina por GSK-3 $\beta$ , lo que llevaría finalmente a su degradación con la consiguiente desactivación de la vía (Marin *et al.*, 2003; Knippschild *et al.*, 2005 ).

Otro papel para CK1 en desarrollo es el relacionado con la vía de Sonic Hedgehog (Shh). Estas proteínas son moléculas secretables que participan en la formación de muchos tejidos y órganos en vertebrados e invertebrados (Ingham y McMahon, 2001). El mecanismo de transducción de señales de Shh ha sido principalmente estudiado en *Drosophila*, donde participa por ejemplo en la formación de las alas de la mosca (Domínguez *et al.*, 1996). La acción de Shh involucra su unión con una proteína receptora Patched (Ptc) con la consecuente activación de transcripción de varios genes blanco mediada por un activador transcripcional denominado Cubitus interruptus (Ingham y McMahon, 2001). De manera análoga a lo descrito para  $\beta$ -catenina, la fosforilación de Cubitus interruptus (Ci) por PKA es esencial para su proteólisis de una forma activadora a una forma represora de la transcripción. Esta fosforilación por PKA crea en Ci sitios de reconocimiento y fosforilación para GSK-3 $\beta$  y para las isoformas CK1 $\epsilon$  y CK1 $\delta$ . Se ha visto que la fosforilación de Ci por GSK-3 $\beta$  y CK1 es esencial para la desactivación de esta vía en ausencia de estimulación por Shh (Price y Kalderon, 2002).

La evidencia presentada con anterioridad indica claramente que algunas de las isoformas de la proteína quinasa CK1 están involucradas en procesos

relacionados con el desarrollo embrionario. Los procesos descritos en la literatura le asignan un papel importante las isoformas  $\alpha$  y  $\varepsilon$  de CK1 en la regulación de las vías de Wnt y Shh, relacionadas con el desarrollo de vertebrados e invertebrados (generación de eje dorso ventral en *Xenopus* y pez cebra y en la formación de las alas en *Drosophila*).

En esta Memoria de Título se pretende determinar el patrón de expresión de RNA mensajero de CK1 $\alpha$  y CK1 $\varepsilon$ , y dilucidar en parte el papel de éstas proteínas en el desarrollo embrionario de los vertebrados utilizando como modelo el pez cebra.



**Figura 7:** *Funciones positivas y negativas de CK1 en la vía de señalización Wnt.* En ausencia de señalización Wnt, CK1 y GSK3β fosforilan los aminoácidos del N-terminal de β-catenina creando el sitio de reconocimiento para β-TRCP, un componente de una ubiquitina ligasa, marcando β-catenina para la consecuente degradación por parte del proteosoma. Las proteínas Wnt secretadas inician la cascada de señalización mediante la unión a los receptores de membrana Frizzled. Después de la activación del receptor, un mecanismo desconocido conduce a la fosforilación de dishevelled. La asociación de esta proteína fosforilada con axina y Frat1 previenen la fosforilación de importantes sustratos de GSK-3β. APC y axina actúan como proteínas de andamiaje, reclutando a β-catenina, GSK-3β, CK1 y Dishevelled, en el complejo de degradación de β-catenina. Bajo la señal de Wnt, la fosforilación de β-catenina es inhibida y ésta se acumula en el núcleo donde se asocia con cofactores como Tcf y LEF, y activa la transcripción de genes blanco de Wnt.

### **3. HIPÓTESIS**

Las isoformas específicas CK1 $\alpha$  y CK1 $\epsilon$  de la Proteína Quinasa CK1 están involucradas en la regulación de ciertos procesos que controlan el desarrollo embrionario de los vertebrados.

### **4. OBJETIVO GENERAL**

Analizar la expresión y función de las isoformas específicas CK1 $\alpha$  y CK1 $\epsilon$  en el desarrollo embrionario de los vertebrados, utilizando como modelo experimental el pez cebra.

### **5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Analizar el patrón de expresión a nivel de mRNA de las isoformas CK1 $\alpha$  y CK1 $\epsilon$  mediante las técnicas de RT-PCR e hibridación *in situ*.
2. Determinar la participación de CK1 $\alpha$  y CK1 $\epsilon$  en el desarrollo embrionario del pez cebra, mediante ensayos de bloqueo de expresión a nivel de proteína a través de la inyección de Dominantes Negativas y Morfolino Oligo Antisentido.
3. Determinar el efecto de la microinyección de cantidades conocidas del mRNA codificante para las isoformas CK1 $\alpha$  y CK1 $\epsilon$  en el desarrollo embrionario del pez cebra.
4. Analizar el efecto del bloqueo de expresión producido por el Morfolino Oligo Antisentido de CK1 $\alpha$ , mediante marcadores genéticos en el desarrollo embrionario temprano del pez cebra.

## **6. MATERIALES Y MÉTODOS**

El estudio se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular del Desarrollo del Programa de Biología Celular y Molecular (ICBM) de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, durante el transcurso del año 2004 y parte del 2005.

### **6.1 Animales de experimentación**

Se utilizaron ejemplares de pez cebra (*Danio rerio*) disponibles en acuarios manejados por el laboratorio. Los embriones utilizados para cumplir con los objetivos de este estudio se obtuvieron cruzando cuatro hembras y dos machos en tanques de 4 litros por 10 a 15 minutos. Una vez fecundados los huevos (inyectados o no) se incubaron a 28°C para permitir su normal desarrollo embrionario.

### **6.2 Materiales**

La región codificante de las isoformas CK1 $\alpha$  y CK1 $\epsilon$  clonadas previamente en el laboratorio (Burzio *et al.*, 2002), necesarias para generar el mRNA utilizado en la microinyección de los embriones fueron subclonadas en el plasmidio PCS2.

Para generar las dominantes negativas de CK1 $\alpha$  y CK1 $\epsilon$  (mutantes que generan proteínas sin actividad quinasa) los cDNA codificantes para cada isoforma fueron mutagenizados por PCR y subclonados en el plasmidio PCS2.

En ambas se modificó la actividad catalítica mediante la sustitución de un ácido aspártico por una arginina en el sitio catalítico.

Las regiones 3' no codificantes de los genes de CK1 $\alpha$  y CK1 $\epsilon$  necesarias para la obtención de las sondas antisentido utilizadas en la hibridación *in situ*, fueron subclonadas en el plasmidio Bluescript KS+.

Los Morfolinos Oligonucleotidos de CK1 $\alpha$  y el control fueron diseñados y obtenidos de Gene Tools LLC (Eugene, Oregon). La secuencia del Morfolino anti CK1 $\alpha$  va desde los nucleótidos -19 hasta el +6 (5'-ggccatgtcctaaaatccgagaagt-3') y la del Morfolino control es la siguiente: 5'-aaaccgggtttacg-3'. Estos fueron solubilizados en 1x de solución de Danieau para su posterior inyección en embriones en estadio de una célula.

### **6.3 Preparación de RNA total de embriones de pez cebra**

El RT-PCR pertinente al objetivo número uno se llevó a cabo preparando RNA de la siguiente manera: En tubos Eppendorf se homogenizaron, por separado, aproximadamente 100 embriones de cada estadio del desarrollo a analizar (1 h.p.f., 3 h.p.f., 50% epibolía, 80% epibolía, 12 h.p.f., 24 h.p.f., 48 h.p.f., 72 h.p.f. y 5-6 días post fertilización ) en 1ml de reactivo TRIZOL<sup>®</sup> (GIBCO-BRL).

Los homogenizados fueron incubados por 15 minutos a temperatura ambiente, luego de lo cual se adicionó 0,2 ml de cloroformo. Los tubos se centrifugaron a 12000 rpm por 15 minutos a 4°C en microfuga Eppendorf. Se recuperó la fase acuosa y el RNA total se precipitó con 0,5 ml de isopropanol. Se incubó 10 minutos a temperatura ambiente y luego se centrifugó a 12000 rpm por 10 minutos a 4°C en microfuga Eppendorf. El precipitado de RNA fue

lavado con etanol al 80% y recentrifugado. Finalmente el RNA fue secado parcialmente al aire y resuspendido en 50  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O DEPC. El RNA fue cuantificado por absorbancia a 260/280 nm y mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5%.

#### **6.4 Transcripción Reversa Acoplada a PCR (RT-PCR)**

El cDNA codificante para las isoformas CK1 $\alpha$  y CK1 $\epsilon$ , utilizado para realizar el RT-PCR del objetivo específico número uno, se preparó sintetizando la primera hebra de cDNA (a partir de iguales cantidades de RNA total de los embriones homogenizados en los distintos estadios durante el paso anterior) con Transcriptasa Reversa Superscript<sup>®</sup> utilizando oligo dT como partidor. La mezcla de reacción contenía 50mM Tris-HCl pH 8,3, 75 mM KCl, 3mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 0,5 mM de cada dNTP, 25  $\mu$ g/ml oligo(dT), 1  $\mu$ g RNA total obtenido en el paso anterior y 10 U/ml de Transcriptasa Reversa Superscript<sup>®</sup>. La incubación se realizó durante 1 hora a 42 °C, luego de lo cual las muestras fueron tratadas con RNasa H durante 30 minutos a 37°C para eliminar la hebra de mRNA. Finalmente, se inactivó la enzima incubando a 70°C durante 15 minutos. Para estudiar la expresión relativa del mRNA de las isoformas de CK1 en los distintos estadios embrionarios seleccionados se amplificó 1  $\mu$ l de cDNA de la mezcla anterior con DNA Polimerasa Taq y en presencia de dos partidores específicos para CK1 $\alpha$  y CK1 $\epsilon$ , en un volumen total de 10 $\mu$ l, que permitieron amplificar un fragmento del tamaño adecuado para cada isoforma, los que se analizaron mediante geles de agarosa al 1%. Como control de expresión se utilizaron partidores de  $\beta$ -actina de pez cebra. La amplificación se realizó siguiendo un

programa que consistía de una denaturación a 95°C por 5 minutos y 30 ciclos de 95°C por 1 minuto, 50°C por 1 minuto y 72°C por 1 minuto con 15 segundos, finalizando con un ciclo de extensión a 72°C por 10 minutos.

### **6.5 Síntesis de sondas de RNA para Hibridación *in situ***

Se digirieron 10 µg de cada clon de las regiones 3' no codificantes de CK1α y CK1ε en el plasmidio Bluescript con la endonucleasa de restricción Not I, para la obtención de las sondas antisentido, durante 2 horas a 37°C. Luego de la digestión, los DNA plasmidiales linearizados fueron purificados mediante columnas (Jet Quick gel extraction spin kit/50, GENOMED®) y cada uno fue resuspendido en 50 µl de H<sub>2</sub>O DEPC. Las sondas de RNA de cada isoforma fueron transcritas *in vitro* en presencia de digoxigenina-11-UTP, utilizando la RNA polimerasa T3 en ambos casos. Cada reacción se realizó en una mezcla que contenía: 2 µg de cada DNA linearizado, 1 mM ATP, 1 mM CTP, 1 mM GTP, 0,7 mM UTP, 0,3 mM digoxigenin-11-UTP, 1X Transcription Buffer, 40 unidades de RNA Polimerasa T3, 50 unidades de inhibidor de RNasa y 2 µl de H<sub>2</sub>O DEPC. La polimerización se llevó a cabo durante 2 horas a 37°C, luego de lo cual se adicionó 5 µl DNasa I libre de RNasa y se incubó por 20 minutos más. Posteriormente se detuvo la reacción a 4°C y se procedió a la purificación de los RNA mediante columnas de Sephadex G-50 (RNA Quick Spin Columns, Boehringer Mannheim®), y finalmente ambos fueron resuspendidos en 50 µl H<sub>2</sub>O DEPC cada uno. Los productos de la transcripción fueron posteriormente precipitados agregando 40 µl de acetato de amonio y 1 ml de etanol al 100%, en ambos tubos. Después de incubar a -20°C durante toda la noche, los RNA

precipitados fueron centrifugados a 12000 rpm a 4°C en microfuga Eppendorf. Los sedimentos fueron lavados con etanol al 80%, luego de lo cual fueron recentrifugados y finalmente resuspendidos en 50 µl H<sub>2</sub>O DEPC cada uno. Luego, las cantidades de RNA fueron estimadas por electroforesis en geles de agarosa al 1,5% y cuantificados por absorbancia a 260/280 nm. Finalmente, se realizaron diluciones 1:100 de ambos RNA purificados (CK1α y CK1ε) en Solución de Hibridación para su posterior utilización.

## 6.6 Hibridación *in situ* en embriones totales

La hibridación *in situ*, requerida para cumplir con el objetivo específico número uno, se realizó como está descrita a continuación (Detrich *et al.*, 1999). Se fijaron embriones en cinco diferentes estadios del desarrollo (8, 24, 30, 38 y 48 h.p.f.) en 4% paraformaldehído (PFA) en tampón fosfato salino (PBS) a 4°C toda la noche. Posteriormente, a los embriones se les removió su membrana coriónica manualmente con pinzas de relojero, y se deshidrataron gradualmente en soluciones con concentraciones crecientes de metanol (25%, 50%, 75% y 100%) en PBS y se guardaron a -20°C. Los embriones fueron luego rehidratados en forma gradual a través de lavados sucesivos, de 5 minutos cada uno, con las mismas soluciones anteriores pero en orden inverso. El último lavado se realizó con PBST (PBS + 0,1% Tween 20) y se digirieron con proteinasa K 10 µg/ml, durante distintos lapsos de tiempo dependiendo del estadio (los de 8 h.p.f. no se trataron, los de 24 h.p.f. se trataron 10 minutos, los de 30 h.p.f. 20 minutos, los de 38 h.p.f. 45 minutos y los de 48 h.p.f. 1 hora). Posteriormente, los embriones fueron refijados en PFA 4% en PBS por 20 minutos, lavados 5 veces por 5 minutos en PBST a temperatura ambiente y prehibridados en Solución de

Hibridización (50% formamida, 5X SSC, 50 µg/ml heparina, 500 µg/ml tRNA de levadura *Thorula*, 0,1% Tween-20 y 84 mM ácido cítrico pH 6,0) por 3 horas a 65 °C. Luego, la solución fue reemplazada por una que contenía las sondas de RNA antisentido correspondientes a la región 3' no codificante de CK1α y CK1ε marcadas con digoxigenina-11-UTP en una dilución de 1:100 en Solución de Hibridación (generadas en el sistema de transcripción "in vitro" del paso anterior). La hibridación se realizó durante toda la noche a 65°C. Los embriones fueron posteriormente sometidos a lavados, a 65°C durante 15 minutos cada uno, en: Solución de Hibridación, 2X SSC, para finalizar con 3 lavados en 0,2X SSC a 65°C por 30 minutos cada uno. Se procedió enseguida al bloqueo incubando los embriones a temperatura ambiente durante 5 minutos en solución MAB (100 mM ácido maleico, 150 mM NaCl y 0,1% Tween-20) y por 3 horas en MAB/BMB (MAB + 2% Boehringer-Mannheim Blocking Reagent), para proseguir con la incubación de los embriones a 4°C durante toda la noche en el anticuerpo anti-digoxigenina conjugado a fosfatasa alcalina, el que fue diluido en la misma solución MAB/BMB, en una relación de 1:5000. Luego se realizaron 8 lavados de 15 minutos cada uno, con MAB y, posteriormente 3 lavados de 5 minutos cada uno con solución BCL (100 mM Tris-HCl pH 9,5, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl y 0,2% Tween-20). Para el revelado, los embriones fueron incubados en el sustrato comercial para fosfatasa alcalina, BM purple (Boehringer-Mannheim) durante 5 horas aproximadamente a temperatura ambiente. Cuando el nivel de tinción llegó a ser adecuado, los embriones se lavaron en 3 veces por 5 minutos en PBST, se refijaron por 2 horas en PFA 4%, se lavaron nuevamente en PBST y se aclararon en glicerol 90%. Finalmente los embriones se montaron sobre portaobjeto y se observaron en el microscopio.

## 6.7 Síntesis de mRNA para microinyección

La transcripción *in vitro* se realizó como está descrito en Detrich *et al.*, 1999. Para la síntesis de cada uno de los mRNAs utilizados en la microinyección, se digirieron 20 µg de cada clon de la región codificante de las isoformas CK1α y CK1ε, y también de las dominantes negativas de ambas (CK1α DN y CK1ε DN) en el plasmidio PCS2 con la endonucleasa de restricción Not I, durante 2 horas a 37°C. Luego de la digestión, los DNA plasmidiales linearizados fueron purificados mediante columnas (Jet Quick gel extraction spin kit/50, GENOMED®) y cada uno fue resuspendido en 50 µl de H<sub>2</sub>O DEPC. Las sondas de RNA de cada isoforma y de las dominantes negativas fueron transcritas *in vitro* con RNA polimerasa de SP6 y en presencia de CAP (7mG), para proteger la hebra de la degradación dentro de la célula inyectada. Cada reacción se realizó en una mezcla que contenía: 5 µg de cada DNA linearizado, 8 mM MgCl<sub>2</sub>, 2,5 mM ATP, 2,5 mM CTP, 2,5 mM UTP, 0,25 mM GTP, 0,25 mM 7mG (CAP), 1X Transcription Buffer, 40 unidades de RNA Polimerasa SP6, 50 unidades de inhibidor de RNasa y 28 µl de H<sub>2</sub>O DEPC. El inicio de la reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente por 10 minutos, luego de lo cual se agregó a cada tubo 1 µl de 100 mM GTP, para posteriormente continuar la polimerización a 37°C durante 2 horas. Después de ésto, se adicionó 5 µl DNasa I libre de RNasa y se incubó por 20 minutos más. Posteriormente se detuvo la reacción a 4°C y se procedió a la purificación de los RNA mediante columnas de Sephadex G-50 (RNA Quick Spin Columns, Boehringer Mannheim®). Finalmente los mRNAs fueron resuspendidos en 50 µl H<sub>2</sub>O DEPC. Los productos de la transcripción fueron posteriormente precipitados agregando 40

$\mu$ l de acetato de amonio y 1 ml de etanol al 100% a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante toda la noche. Los RNAs precipitados fueron posteriormente centrifugados a 12000 rpm a  $4^{\circ}\text{C}$  en microfuga Eppendorf. Los sedimentos fueron lavados con etanol al 80%, luego de lo cual fueron recentrifugados y finalmente resuspendidos en 50  $\mu$ l  $\text{H}_2\text{O}$  DEPC. Las cantidades de RNA fueron estimadas por electroforesis en geles de agarosa al 1,5% y cuantificados por densidad óptica a 260/280  $\eta\text{m}$ . Finalmente, se realizaron diluciones de todos los mRNA purificados (CK1 $\alpha$ , CK1 $\epsilon$ , CK1 $\alpha$  DN y CK1 $\epsilon$  DN) en  $\text{H}_2\text{O}$  DEPC con Rojo Fenol para su posterior utilización en la microinyección de embriones en estadio de una célula.

## 6.8 Microinyección de mRNA

La inyección de mRNA y Morfolino se realizó en embriones en estadio de una célula como está descrito en Detrich *et al.*, 1999. Los volúmenes de inyección oscilaron entre 5 y 10  $\eta$ l por embrión, donde el tamaño de la gota no excedió un tercio del volumen total del vitelo. Las concentraciones de mRNA y Morfolino inyectadas fueron determinadas después de ensayos de prueba con dosis mínimas y máximas propuestas en la literatura (Detrich *et al.*, 1999). De esta manera se estableció un efecto a 350pg para la inyección con mRNA y entre 5 y 10  $\eta$ g para el caso del Morfolino Anti CK1 $\alpha$ . Los embriones inyectados, fueron incubados a  $28^{\circ}\text{C}$  y observados al microscopio para determinar las alteraciones en el desarrollo embrionario.

## 5. RESULTADOS

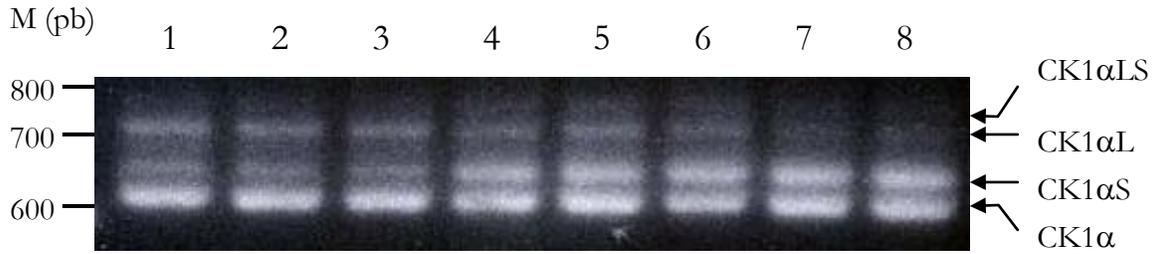
### 5.1 Determinación de niveles relativos de expresión de RNA mensajero de CK1 $\alpha$ y CK1 $\epsilon$ mediante RT-PCR

Los patrones de expresión de los RNA mensajeros de CK1 $\alpha$  y CK1 $\epsilon$  durante el desarrollo de pez cebra, fueron determinados por la técnica de RT-PCR semi cuantitativo. Para ello se preparó RNA total de embriones en diferentes estadios de desarrollo como se describe en Materiales y Métodos. Para la síntesis de los respectivos cDNA, se utilizó Oligo dT como partidor en la transcripción inversa y partidores específicos para cada isoforma en el PCR subsiguiente. En el caso de CK1 $\alpha$  se utilizó un partidor que híbrida río abajo del inserto S y otro que lo hace río arriba del inserto L, permitiendo la amplificación de las cuatro variantes de procesamiento alternativo de CK1 $\alpha$  ( $\alpha$ ,  $\alpha$ L,  $\alpha$ S y  $\alpha$ LS) (ver figura 8). Como se aprecia en la figura 8, la variante  $\alpha$  se observa como la más abundante entre los estadios de 1-2 células y 50% de epibolía. Le sigue en abundancia la  $\alpha$ L, la  $\alpha$ S y finalmente la  $\alpha$ LS cuya expresión es muy baja. A partir del estadio de 80% epibolía, la proporción relativa de  $\alpha$ S parece ser equivalente a la de  $\alpha$ . Entre las 22 y las 31 h.p.f., la abundancia relativa de la variante  $\alpha$ L sufre una caída, observándose en muy baja proporción a los 4 -5 días. En todos los estadios la variante  $\alpha$ LS es la menos abundante, aunque parece ocurrir un leve aumento en su abundancia relativa entre las 8 y las 35 h.p.f. El patrón de expresión observado en pez cebra adulto es similar a la de los embriones de 1-2 células hasta las 5 h.p.f (50% epibolía). La expresión temprana de los mensajeros de las variantes de CK1 $\alpha$  (1-2 células), nos indica que la expresión de este gen tiene un componente maternal y cigótico, debido a que la expresión cigótica de

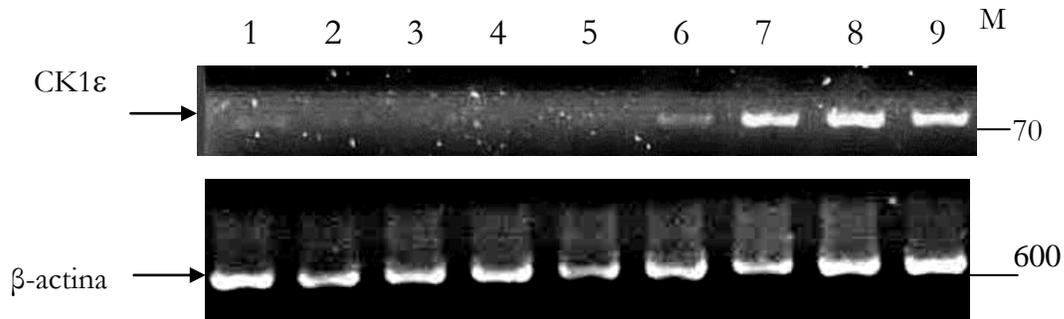
genes en pez cebra empieza alrededor de las 3 h.p.f (transición de blástula media). Toda expresión detectada antes de este tiempo es maternal.

A diferencia de CK1 $\alpha$  (figura 9), en el caso de CK1 $\epsilon$  se puede observar que en estadios tempranos del desarrollo, es decir, entre 1 célula y 12 horas post fertilización, no existe expresión de mRNA de esta isoforma, sin embargo, alrededor de las 24 h.p.f. se aprecia una leve aparición de mensajero, la que aumenta a las 48 h.p.f. y se mantiene con similar abundancia relativa hasta los 5 días. Esto indica que, a diferencia de lo que ocurre con CK1 $\alpha$ , no existe presencia de un componente maternal en la expresión del mensajero de CK1 $\epsilon$  expresado en el desarrollo temprano.

Como control de expresión se utilizaron partidores que amplifican  $\beta$ -actina, que se expresa en cantidades constantes desde los primeros estadios del desarrollo (ver figura 9).



**Figura 8:** Amplificación de mRNA de variantes de CK1 $\alpha$  mediante RT-PCR de embriones de pez cebra. Se muestra el resultado donde se analizó RNA de embriones de 1-2 células (1), 3 h.p.f. (2), 50% epibolía (3), 80% epibolía (4), 11-12 h.p.f. (5), 22-24 h.p.f. (6), 31-35 h.p.f. (7) y 4-5 días (8). Se indica la posición de migración de los fragmentos de amplificación obtenidos de los clones de CK1 $\alpha$ , CK1 $\alpha$ S, CK1 $\alpha$ L y CK1 $\alpha$ LS. M indica la posición de los estándares de tamaño molecular.



**Figura 9:** Amplificación de mRNA de la isoforma CK1 $\epsilon$  y del control de  $\beta$ -actina mediante RT-PCR de embriones de pez cebra. Arriba se muestra el resultado donde se analizó el RNA de CK1 $\epsilon$  en embriones de 1-2 células (1), 3 h.p.f. (2), 50% epibolía (3), 80% epibolía (4), 11-12 h.p.f. (5), 22-24 h.p.f. (6), 48 h.p.f. (7), 72 h.p.f. (8) y 5-6 días (9). Abajo se muestra el resultado del análisis del control de  $\beta$ -actina. M indica la posición de los estándares de tamaño molecular. Se indica la posición de migración del fragmento de amplificación.

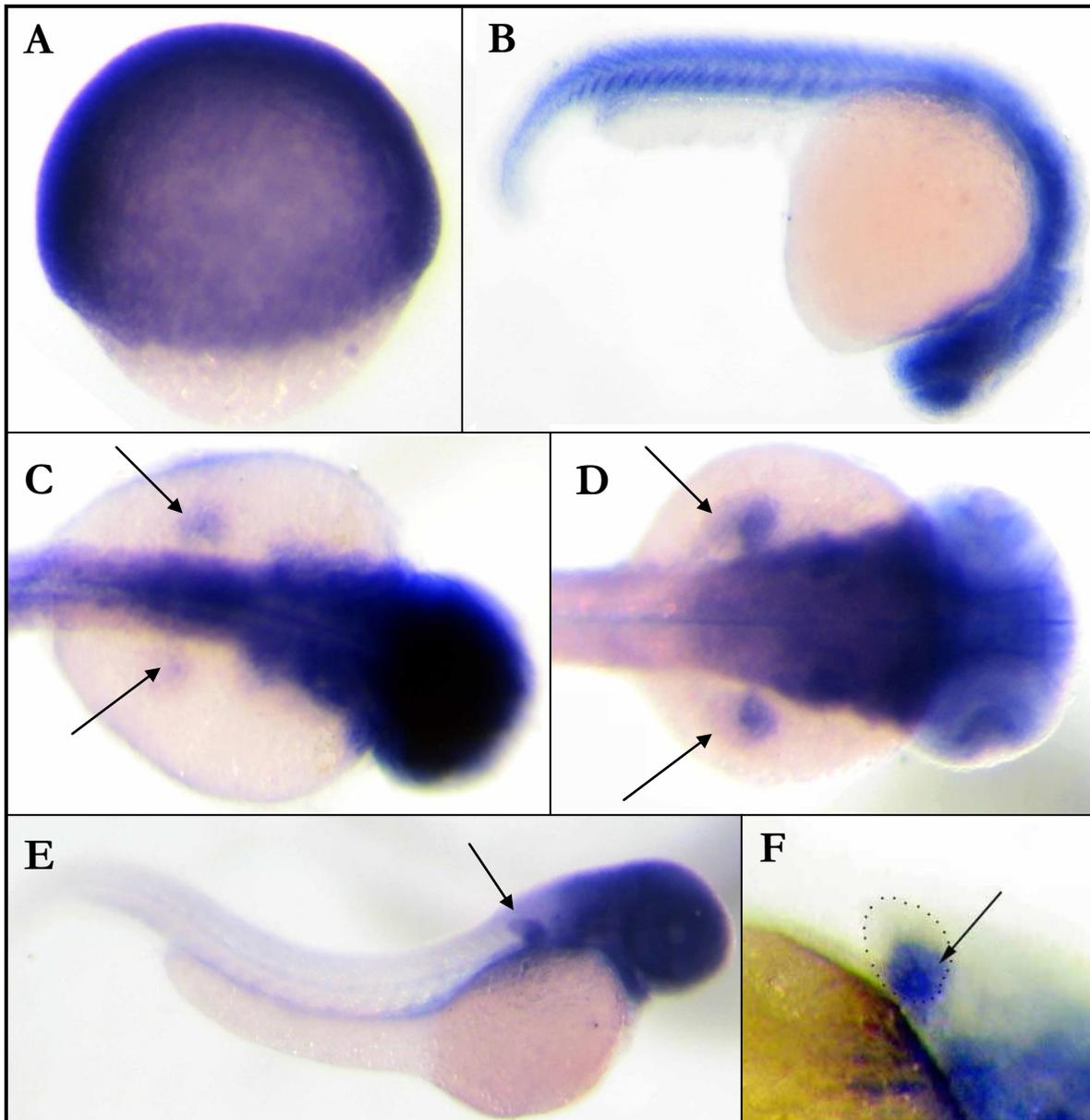
## 5.2 Hibridación *in situ* sobre embriones de pez cebra

Para determinar el patrón de expresión de CK1 $\alpha$  y CK1 $\epsilon$  durante el desarrollo embrionario del pez cebra, se realizó hibridación *in situ* sobre embriones completos fijados a diferentes estadios de desarrollo, utilizando para ello sondas de RNA transcritas *in vitro* y marcadas con digoxigenina-11-UTP. Las sondas son posteriormente detectadas con un anticuerpo específico contra dicho compuesto. Las sondas derivaron de las secuencias correspondientes a las regiones 3' no codificante (3' UTR) de ambas isoformas, por lo cual, en el caso de CK1 $\alpha$  se detectan los transcritos de las cuatro variantes de procesamiento alternativo.

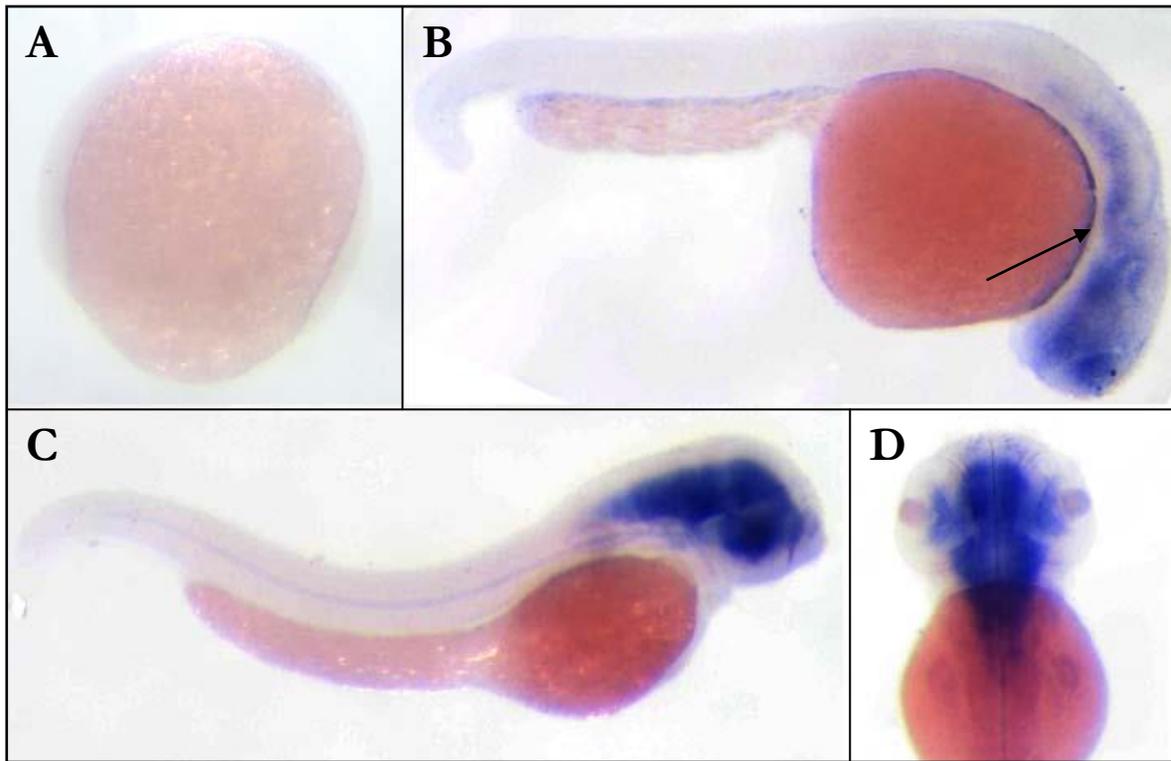
En la figura 10 se muestra la expresión del mRNA de CK1 $\alpha$ . Se observa una expresión ubicua y muy marcada en todas las células del embrión en estadio de 80% de epibolía. Lo mismo ocurre a las 24 horas de desarrollo, donde la expresión también es generalizada. Sin embargo, existe una leve diferencia en la tinción entre la región anterior y posterior del embrión, apreciándose una expresión más fuerte en la región cefálica con respecto a la región caudal. A las 30 h.p.f. la expresión comienza a restringirse a la región anterior del embrión, desapareciendo la tinción en las estructuras más caudales de éste. Además, en este estadio comienza a aparecer una leve tinción en el primordio de las aletas pectorales. A las 48 h.p.f el mensajero de CK1 $\alpha$  se encuentra a localizado de manera más específica en la zona anterior del embrión, donde se ve una mayor concentración restringida en la cabeza y en el primordio de las aletas pectorales. Estos datos sugieren que la expresión de CK1 $\alpha$  se encontraría sometida a un grado de regulación temporal y espacial durante el desarrollo embrionario del pez cebra, aunque dada la naturaleza de la sonda utilizada, no se puede predecir la expresión espacial de cada variante de procesamiento en forma específica.

En relación a la expresión del mRNA de CK1 $\epsilon$  (figura 11), no se observa expresión de mensajero de ésta isoforma en estadio de 80% de epibolía, dato que confirma lo mostrado anteriormente en el estudio de expresión de mRNA mediante RT-PCR. A las 24 horas de desarrollo aparece una expresión muy delimitada en la región anterior del embrión a nivel de la cabeza, específicamente en cerebro anterior, cerebro medio y rombencéfalo. Lo mismo ocurre a las 48 h.p.f. donde la expresión se restringe exclusivamente a las regiones del sistema nervioso central antes mencionadas (cerebro anterior, cerebro medio y rombencéfalo).

Los datos mostrados sugieren que en la expresión del mensajero de CK1 $\epsilon$ , a diferencia de CK1 $\alpha$ , no existe un componente materno que este actuando en los estadios más tempranos del desarrollo del pez, y que el mRNA es de origen exclusivamente cigótico para esta isoforma.



**Figura 10:** Hibridación “*in situ*” de CK1 $\alpha$  sobre embriones de pez cebra. Los embriones de distintos estadios fueron incubados con la sonda antisentido de CK1 $\alpha$  transcrita *in vitro*, en presencia de digoxigenina-11-UTP. En estadio de 80% epibolía se visualiza una expresión muy abundante y ubicua de esta isoforma en todas las células del embrión (A). A las 24 h.p.f. se mantiene la expresión en la totalidad del embrión (B). A las 30 h.p.f (C) comienza a aparecer una leve tinción en el primordio de las aletas pectorales (flechas), y a las 48 h.p.f. la expresión se restringe a la región cefálica y aletas pectorales (D y E). En F se muestra un detalle de la expresión de esta isoforma en la aleta pectoral, la flecha indica la tinción del mesenquima de esta estructura.



**Figura 11:** Hibridación “*in situ*” de *CK1ε* sobre embriones de pez cebra. Los embriones de distintos estadios fueron incubados con la sonda antisentido de *CK1ε* transcrita *in vitro*, en presencia de digoxigenina-11-UTP. En estadio de 80% epibolía no se visualiza expresión de esta isoforma (A), a las 24 h.p.f. hay una expresión restringida en la región anterior del embrión (B), específicamente en cerebro anterior, medio y también en rombencéfalo (flecha), y a las 48 h.p.f. la expresión continúa restringida a cerebro anterior, medio, y rombencéfalo (C y D).

### **5.3 Análisis de Función de CK1 $\alpha$ y CK1 $\epsilon$ mediante la inyección de cantidades conocidas de mRNA de estas isoformas y de sus Dominantes Negativas en embriones de pez cebra.**

Para determinar, en parte, la función de ambas isoformas en el desarrollo embrionario del pez cebra, se procedió a inyectar cantidades conocidas de mRNA codificante para CK1 $\alpha$  y CK1 $\epsilon$ , sintetizado *in vitro* y protegido con Cap (7mG) para evitar su degradación dentro del embrión y permitir su posterior traducción a proteína.

Además, se procedió a inyectar los mensajeros codificantes para las Dominantes Negativas de ambas isoformas, que generan proteínas sin actividad catalítica las que desplazan a la proteína endógena e inhiben su función en el embrión. Todos los embriones fueron inyectados con un volumen de gota de 5 $\mu$ l, en estadio de una célula, en el polo animal del vitelo.

Los efectos de las distintas condiciones de inyección fueron estudiados a través de un análisis morfológico de los embriones bajo una lupa estereoscópica, realizado durante los primeros cuatro días post-fertilización..

Los resultados de estos experimentos son analizados en detalle a continuación, y además son graficados en la figura 12.

#### **5.3.1 Inyección de mRNA codificante para la isoforma CK1 $\alpha$ .**

Se procedió a inyectar el RNA mensajero de la isoforma CK1 $\alpha$ , para así poder analizar el efecto de una expresión superior al nivel normal, de ésta proteína en el desarrollo embrionario del pez cebra.

Para esta condición, de un 100% de embriones inyectados (60-80 embriones como promedio por experimento) con 350pg del mRNA codificante

para la isoforma CK1 $\alpha$ , se observó una sobrevivencia promedio de un 80 a 90% a las 24 h.p.f. por experimento (eliminando los no fertilizados y muertos en estadíos tempranos). De los embriones sobrevivientes a las 24 h.p.f, un 96% presentó un fenotipo anómalo a las 24 h.p.f. donde se pudo observar menor desarrollo encefálico, con ausencia de segmentación entre cerebro medio y posterior, indiferenciación morfológica de estructuras tales como cuarto ventrículo, cerebelo y mesencéfalo, y acortamiento del eje Antero-Posterior, característica morfológica propia de embriones dorsalizados (Figura 13). De estos embriones, un 30% presentó ciclopía, un 9% ausencia de ojos y el resto presentó ojos más pequeños y asimétricos en tamaño.

Sólo un 4% los embriones contabilizados a las 24 h.p.f. se observó aparentemente normal al examen morfológico bajo la lupa.

### **5.3.2 Inyección de mRNA codificante para la isoforma CK1 $\epsilon$ .**

Se procedió a inyectar el RNA mensajero de la isoforma CK1 $\epsilon$ , para así poder analizar el efecto de una expresión superior al nivel normal, de ésta proteína en el desarrollo embrionario del pez cebra.

Para esta condición, de un 100% de embriones inyectados con 350pg del mRNA codificante para la isoforma CK1 $\epsilon$ , se observó una sobrevivencia promedio de un 80 a 90% a las 24 h.p.f. por experimento. De los embriones sobrevivientes a las 24 h.p.f, un 32% presentó menor desarrollo encefálico, con ausencia de segmentación entre cerebro medio y posterior, indiferenciación morfológica de estructuras tales como cuarto ventrículo, cerebelo y mesencéfalo (Figura 14). Además se observó ojos pequeños y asimétricos en tamaño, pero a diferencia de lo que ocurrió al inyectar el mensajero de CK1 $\alpha$ , sólo un 4%

presentó anomalía en la formación del eje Antero-Posterior y un 2% presentó ciclopía.

Al parecer, el efecto de la inyección del mRNA de CK1 $\alpha$  fue mucho más nociva y determinante en el desarrollo embrionario temprano, que en el caso de la inyección con CK1 $\epsilon$ .

El 66% restante de embriones se observó aparentemente normal al examen morfológico bajo la lupa, excepto un 2% completamente anómalo (amorfo), donde no se pudo distinguir estructura alguna.

### **5.3.3 Inyección de mRNA codificante para la Dominante Negativa de la isoforma CK1 $\alpha$ .**

Se procedió a bloquear la función de CK1 $\alpha$  en el desarrollo embrionario del pez cebra, mediante la inyección del RNA mensajero codificante para la Dominante Negativa de esta isoforma.

La secuencia de CK1 $\alpha$  fue mutagenizada mediante PCR para permitir la síntesis de una proteína similar a la endógena, pero con modificación del sitio catalítico, y por lo tanto, sin actividad quinasa. Esta proteína mutante, en el embrión compite por la unión al sustrato con la proteína endógena e inhibe en parte su función.

Para esta condición, de un 100% de embriones inyectados con 350pg del mRNA codificante para la Dominante Negativa de la isoforma CK1 $\alpha$ , se observó una sobrevivencia promedio de un 80 a 90% a las 24 h.p.f. por experimento. De los embriones sobrevivientes a las 24 h.p.f, un 53% presentó menor desarrollo encefálico, con ausencia de segmentación entre cerebro medio y posterior, indiferenciación morfológica de estructuras tales como cuarto ventrículo, cerebelo y mesencéfalo (ver figura 15). Además, un 12% presentó

estas mismas características sumadas a un acortamiento del eje Antero-Posterior. El 35% restante de embriones, se observó aparentemente normal al examen morfológico bajo la lupa.

#### **5.3.4 Inyección de mRNA codificante para la Dominante Negativa de la isoforma CK1 $\epsilon$ .**

Se procedió a bloquear la función de CK1 $\epsilon$  en el desarrollo embrionario del pez cebra mediante la inyección del RNA mensajero codificante para la Dominante Negativa de esta isoforma.

Para esta condición, de un 100% de embriones inyectados con 350pg del mRNA codificante para la Dominante Negativa de la isoforma CK1 $\epsilon$ , se observó una sobrevivencia promedio de un 80 a 90% a las 24 h.p.f. por experimento. De los embriones sobrevivientes a las 24 h.p.f, un 8% presentó menor desarrollo encefálico, con ausencia de segmentación entre cerebro medio y posterior. El 92% restante de embriones se observó aparentemente normal al examen morfológico bajo la lupa.

#### **5.3.5 Inyección de mRNA control y embriones sin inyectar.**

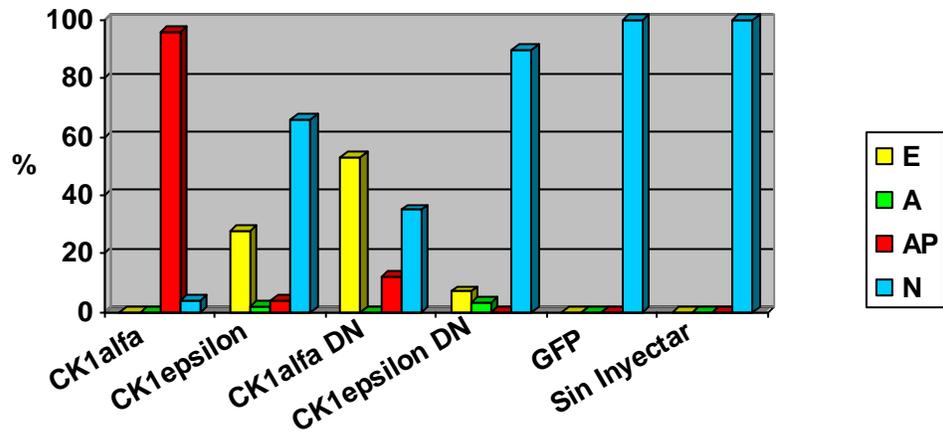
Como controles de los experimentos anteriores se utilizaron dos condiciones para descartar los efectos físicos y mecánicos inespecíficos producidos por la inyección del RNA y las posibles anomalías presentes en embriones defectuosos o enfermos.

Una de las condiciones se llevó a cabo inyectando de 100 a 500pg de un RNA mensajero control, que codifica para una proteína verde fluorescente (Green Fluorescent Protein o GFP) que permite ver como el embrión se torna de

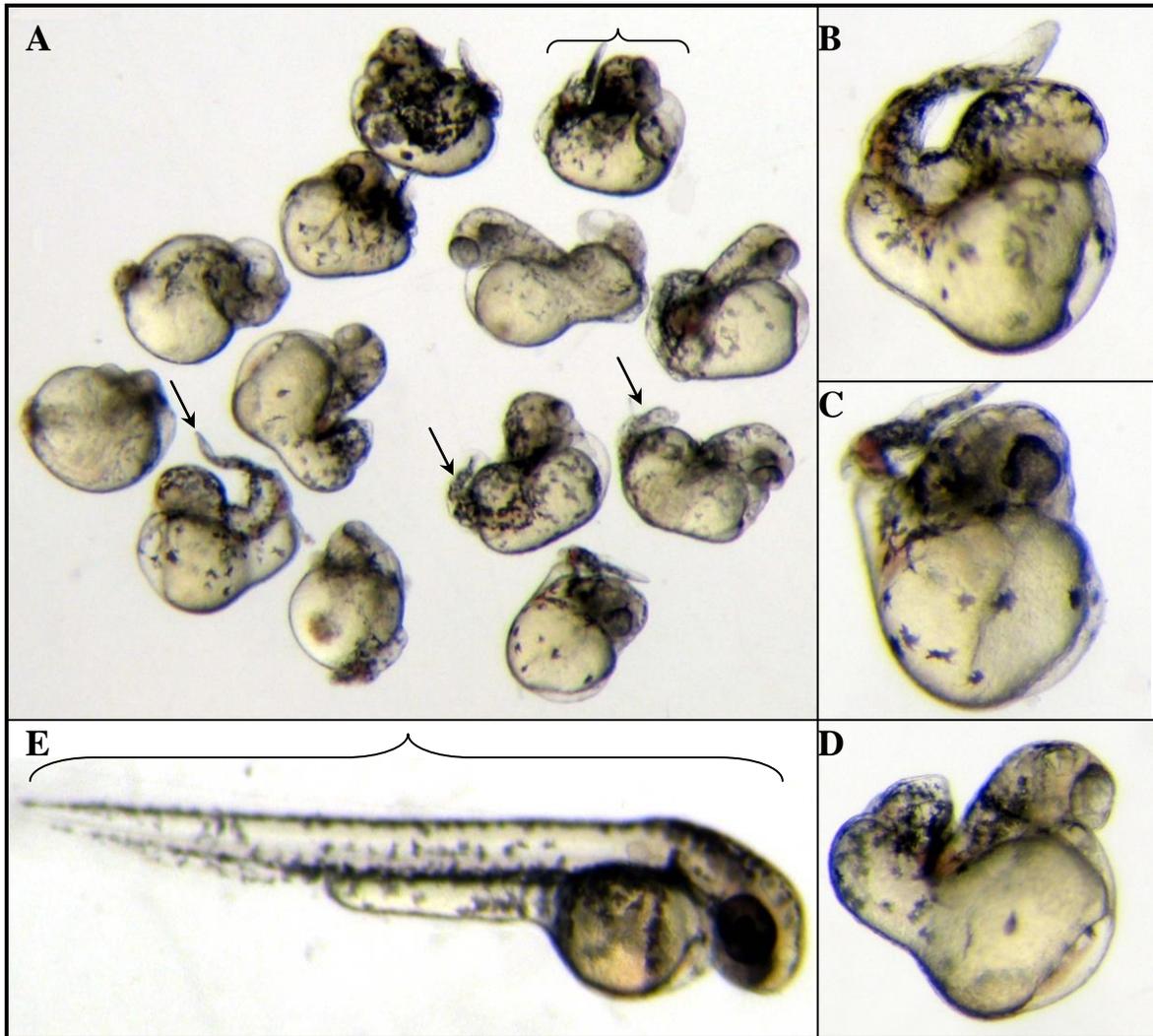
una coloración verde al ser observado bajo una lupa con sistema de fluorescencia, esto debido a la expresión de esta proteína en todas sus células. Además, al ser inyectado a estas concentraciones es inocuo para el embrión en desarrollo.

Para esta condición, de un 100% de embriones inyectados, se observó una sobrevivencia promedio de un 80 a 90% a las 24 h.p.f. por experimento. De los embriones sobrevivientes a las 24 h.p.f, un 100% no presentó anomalías aparentes al examen morfológico bajo la lupa.

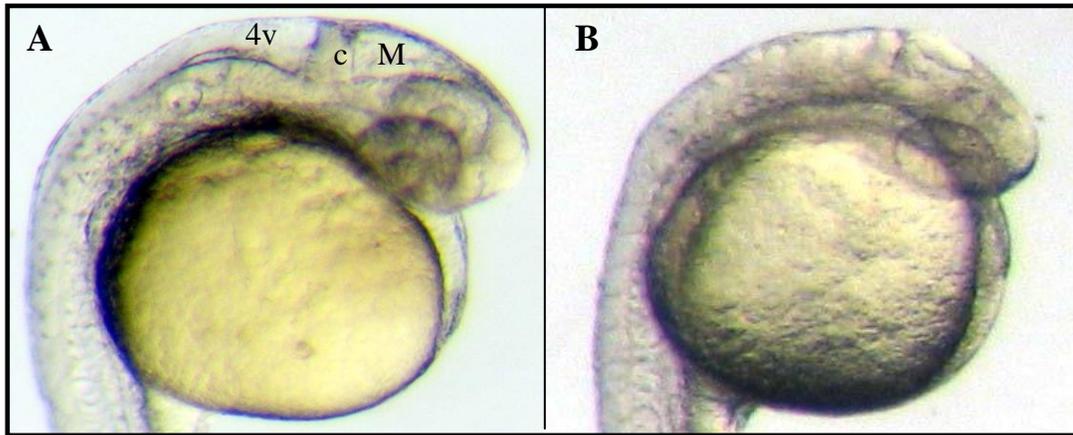
En la otra condición control, se dejaron embriones sin inyectar, en los que se observó una sobrevivencia promedio de un 90 a 95% a las 24 h.p.f. por experimento. De los embriones sobrevivientes a las 24 h.p.f, un 100% no presentó anomalías aparentes al examen morfológico bajo la lupa.



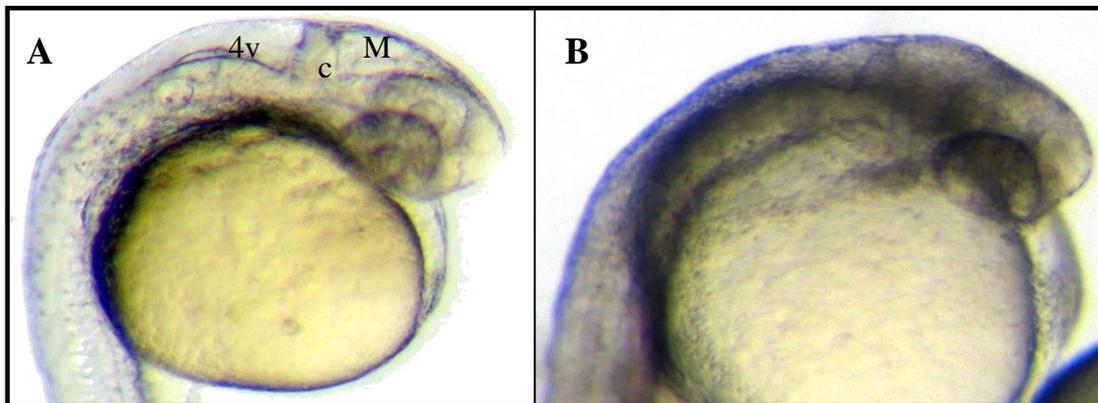
**Figura 12:** Gráfico del resultado de las inyecciones de los RNA mensajeros de  $CK1\alpha$ ,  $CK1\epsilon$ , sus Dominantes Negativas y las condiciones control (GFP y Sin inyectar). Se muestra el porcentaje de los fenotipos obtenidos con las distintas condiciones de inyección. E: Embriones con menor desarrollo encefálico; A: Embriones amorfos (sin estructuras reconocibles al análisis morfológico); AP: Embriones con eje Antero-Posterior acortado; N: embriones normales al examen morfológico. En todas las condiciones se tomó como 100% al total de los embriones contabilizados a las 24 h.p.f.



**Figura 13:** Fenotipos resultantes de la inyección del mRNA codificante para la isoforma *CK1 $\alpha$* . En A se muestra un grupo de embriones inyectados con 350pg del mRNA de *CK1 $\alpha$*  donde se puede apreciar en todos ellos un acortamiento del eje Antero-Posterior (llave), curvatura y malformación de las colas (flechas). Un 96% de los embriones contabilizados a las 24 h.p.f. presentó estas características morfológicas. En algunos de ellos se puede observar ciclopía (C), asimetría en tamaño de los ojos e incluso ausencia de estos últimos (B). En (E) se muestra un individuo normal inyectado con el mRNA control (GFP), la llave indica el correcto desarrollo de un eje Antero-posterior.



**Figura 14:** Fenotipo resultante de la inyección del mRNA codificante para la isoforma *CK1ε*. En (A) se muestra un detalle del encéfalo de un embrión control normal donde se pueden distinguir claramente algunas estructuras de esta región (4v: cuarto ventrículo, c: Cerebelo, M: mesencéfalo). En (B) se muestra un embrión inyectado con *CK1ε*, en el que no se pueden diferenciar claramente las estructuras anteriormente mencionadas. El 28% de los embriones inyectados que fueron contabilizados a las 24 h.p.f. presentó estas características morfológicas.



**Figura 15:** Fenotipo resultante de la inyección del mRNA codificante para la Dominante Negativa de la isoforma *CK1α*. En (A) se muestra un detalle del encéfalo de un embrión control normal donde se pueden distinguir claramente algunas estructuras de esta región (4v: cuarto ventrículo, c: Cerebelo, M: mesencefalo). En (B) se muestra un embrión inyectado con la Dominante Negativa de *CK1α*, en el que no se pueden diferenciar claramente las estructuras anteriormente mencionadas. El 53% de los embriones inyectados que fueron contabilizados a las 24 h.p.f. presentó estas características morfológicas.

#### **5.4 Bloqueo de Función de CK1 $\alpha$ mediante la inyección de Morfolino Oligo Antisentido en embriones de pez cebra.**

Otra técnica utilizada para bloquear la función de genes en el desarrollo embrionario es la inyección de Morfolinos Oligos Antisentido. Como su nombre lo señala, estas moléculas son oligonucleótidos antisentido diseñados para hibridar con una región específica del RNA mensajero del gen en estudio, lo que permite el bloqueo de la función de éste, mediante la inhibición de su traducción a proteína.

Para bloquear la función de CK1 $\alpha$  en el desarrollo embrionario del pez cebra se procedió a inyectar el Morfolino Oligo Antisentido, que hibrida con una región específica del mRNA de esta isoforma e impide su traducción a proteína.

En este caso, el morfolino Anti CK1 $\alpha$  (MO CK1 $\alpha$ ) diseñado por Gene Tools LLC (Eugene, Oregon) es un oligo de 25 nucleótidos que hibrida sólo con 6 nucleótidos de la región codificante y los 19 restantes hibridan con los primeros nucleótidos de la región 3' no codificante, por lo tanto, éste Morfolino Anti CK1 $\alpha$  bloquea sin discriminar, la traducción de las cuatro variantes de procesamiento alternativo de CK1 $\alpha$  ( $\alpha$ ,  $\alpha$ S,  $\alpha$ L y  $\alpha$ LS).

Se procedió a inyectar embriones en estadio de una célula con un volumen total de 5 $\eta$ l y las condiciones utilizadas fueron las siguientes: un grupo de embriones fue inyectado con 5 $\eta$ g del Morfolino Anti CK1 $\alpha$  y otro con 10 $\eta$ g del mismo. Como controles de los experimentos anteriores se utilizaron dos condiciones para descartar los efectos físicos y mecánicos inespecíficos producidos por la inyección del Morfolino y las posibles anomalías presentes en embriones defectuosos o enfermos:

a) 10  $\eta$ g de un Morfolino Control que no hibrida con ningún mRNA conocido, por lo tanto no debe producir efecto al ser inyectado.

b) Un grupo de embriones se dejó sin inyectar para controlar posibles anomalías de los embriones fertilizados.

#### **5.4.1 Inyección de 5 $\eta$ g del Morfolino Anti CK1 $\alpha$ .**

Como se muestra en la Figura 16, de un 100% de embriones inyectados con 5  $\eta$ g del Morfolino Anti CK1 $\alpha$  (90-100 embriones como promedio por experimento), se observó una sobrevivencia promedio de un 80 a 90% a las 24 h.p.f. De los embriones sobrevivientes a las 24 h.p.f, un 22% presentó un fenotipo anómalo a las 24 h.p.f. donde se pudo observar la ausencia de segmentación entre el cerebro medio y cerebro posterior, indiferenciación morfológica de estructuras encefálicas tales como: cuarto ventrículo, cerebelo y mesencéfalo, y regiones aparentemente necróticas y de menor desarrollo en estas estructuras. Además, éstos presentaban curvaturas tanto dorso-ventral como ventro-dorsal y latero-lateral de la cola y en algunos casos un leve acortamiento del eje Antero-Posterior. Para facilitar la descripción, a los embriones con estas características morfológicas se les incluyó dentro de un grupo denominado: Fenotipo 1 (ver figura 17).

En los embriones anteriormente descritos, a las 48 h.p.f. aparece un aumento de volumen a nivel de cerebro posterior, específicamente en cuarto ventrículo y rombencéfalo y una depresión en cerebelo. Además, se mantienen las curvaturas de las colas y algunos embriones se observan completamente curvos en dirección ventral a lo largo de su eje Antero-Posterior.

Un segundo grupo de embriones, equivalentes al 39% del total, presentaron un fenotipo similar al anterior, pero más leve en su presentación, al que se le denominó Fenotipo 2 y que se reconocía por las alteraciones

morfológicas encefálicas vistas anteriormente a 24 h.p.f., las que se manifiestan con la ausencia de segmentación entre el cerebro medio y cerebro posterior, indiferenciación morfológica de estructuras encefálicas tales como: cuarto ventrículo, cerebelo y mesencéfalo, y regiones aparentemente necróticas y de menor desarrollo en estas estructuras. Los embriones clasificados dentro de este grupo no presentaban anomalías a nivel de cola ni en el desarrollo normal de su eje Antero-Posterior, además la mayoría de ellos no presentaba anomalías morfológicas visibles en encéfalo a las 48 h.p.f., y en los que se apreciaba alguna alteración, era un aumento de volumen en estructuras del cerebro posterior, pero de menor grado que en los anteriormente descritos pertenecientes al grupo del fenotipo 1.

Finalmente, un 39% de embriones inyectados en esta condición se observaron aparentemente normales al análisis morfológico bajo la lupa.

#### **5.4.2 Inyección de 10 $\eta$ g del Morfolino Anti CK1 $\alpha$ .**

Otra condición analizada fue la que se obtuvo inyectando 10 $\eta$ g del Morfolino Anti CK1 $\alpha$ . De el 100% de embriones inyectados (70 a 100 embriones por experimento) sobrevivieron entre un 80% a 90% hasta las 24 h.p.f. (eliminando los no fertilizados y muertos en estadios tempranos). De los embriones sobrevivientes contabilizados como el 100%, un 52% presentó características morfológicas similares a las descritas anteriormente para los embriones del Fenotipo 1, es decir, mostraron las mismas alteraciones a nivel de encéfalo y cola.

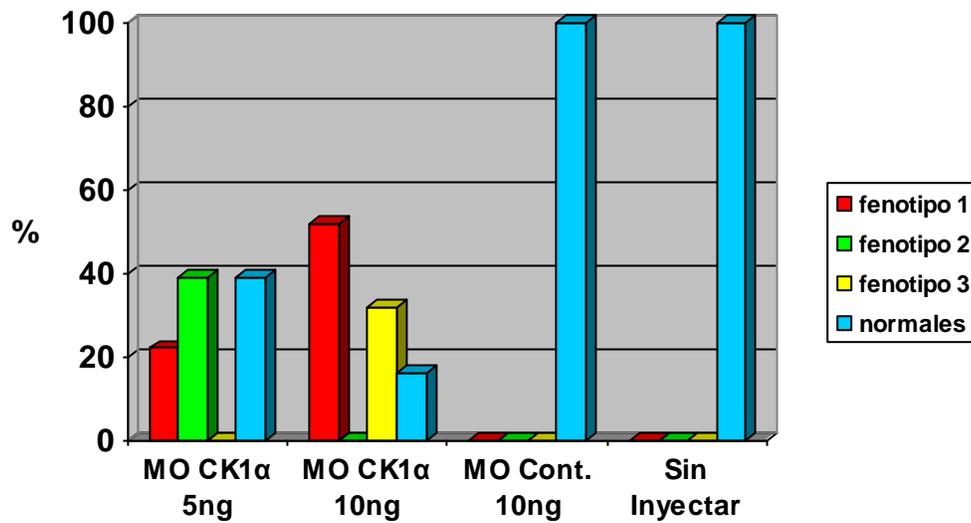
Dentro de esta misma condición de inyección se observó otro grupo embriones que representa el 32% del total de los embriones inyectados al que se le denominó Fenotipo 3, cuyas características morfológicas eran las siguientes: la

mayoría presentó alteraciones encefálicas y caudales similares a las encontradas en los embriones del Fenotipo 1, pero éstas eran más notorias y marcadas, y además, la totalidad de estos embriones mostraba un acortamiento a nivel del eje Antero-Posterior, característica morfológica propia de embriones dorsalizados (ver figura 17).

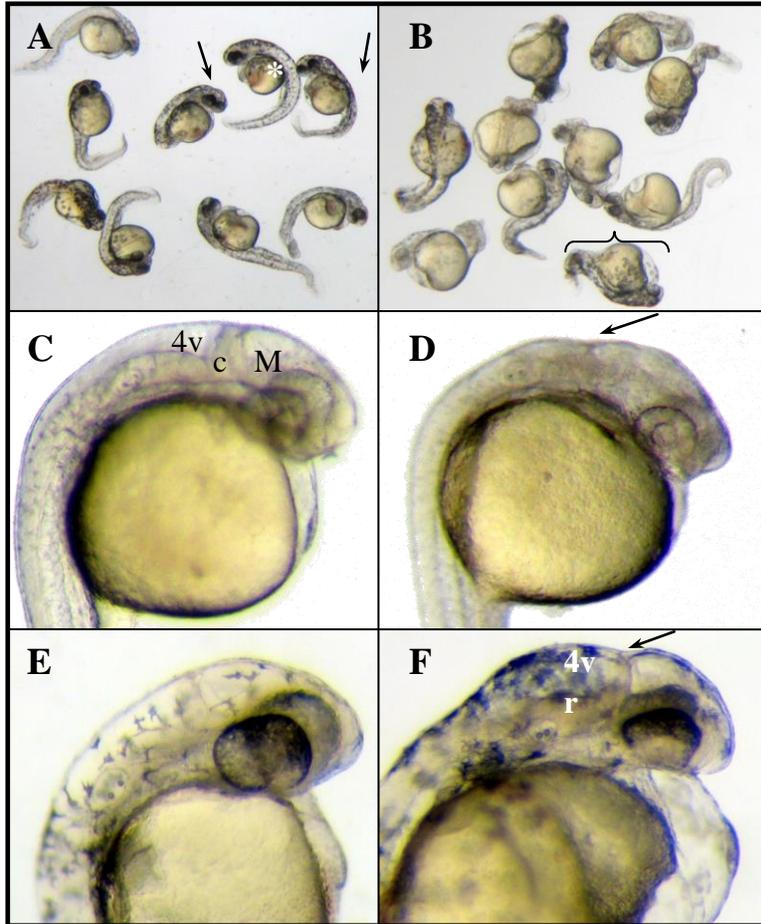
Finalmente, el 16% restante de embriones se observó aparentemente normal al análisis morfológico bajo la lupa.

Por otra parte, del 100% (60-100 embriones) de los embriones inyectados con 10  $\mu$ g del Morfolino control, un 90% sobrevivió hasta las 24 h.p.f. (eliminando los no fertilizados y los muertos en estadíos tempranos). La totalidad de éstos se observaron aparentemente normales al análisis morfológico bajo la lupa.

Lo mismo ocurrió con la condición control de embriones sin inyectar, donde no se apreciaron anomalías morfológicas en los embriones analizados.



**Figura 16:** Gráfico del resultado de la inyección del Morfolino Anti CK1 $\alpha$  y las condiciones controles. Se muestra el porcentaje de los fenotipos obtenidos con las distintas condiciones de inyección. En todas las condiciones se tomó como 100% a los embriones contabilizados a las 24 h.p.f.



**Figura 17:** Fenotipos obtenidos con la inyección del Morfolino anti CK1 $\alpha$ . En A se muestra el fenotipo 1 descrito para la inyección con 5 y 10 $\eta$ g, donde se pueden observar embriones con alteraciones en encéfalo en diferentes niveles (flechas), curvatura de colas en distintas direcciones y embriones curvos a lo largo de su eje Antero-Posterior (\*). En B se muestra el fenotipo 3 descrito solamente para la inyección con 10 $\eta$ g, donde se pueden observar embriones con alteraciones en encéfalo, curvaturas más marcadas de las colas y leve acortamiento del eje Antero-Posterior (llave). En C se muestra el detalle del encéfalo de un embrión control a las 30 h.p.f. Comparado con D, donde se muestra el de un embrión inyectado con 5 $\eta$ g del MO CK1 $\alpha$ , en el que no se pueden reconocer ciertas estructuras presentes en el desarrollo normal del sistema nervioso central en este estadio como: cuarto ventrículo (4v); Cerebelo (c) y Mesencéfalo (M), y además se puede apreciar una leve depresión en la región donde normalmente se debe encontrar el cerebelo (flecha). En E se muestra el detalle del encéfalo de un embrión control a las 50 h.p.f. Comparado con F, donde se muestra el de un embrión inyectado con 10 $\eta$ g del MO CK1 $\alpha$ , en el que se observa una depresión a nivel cerebelar (flecha) y un aumento de volumen de la región correspondiente al cuarto ventrículo (4v) y rombencéfalo (r).

## **5.5 Análisis del bloqueo de función de CK1 $\alpha$ producido por el Morfolino Oligo Antisentido mediante el uso de marcadores genéticos en embriones de pez cebra.**

Para obtener una idea general de los eventos y vías en que estaría participando CK1 $\alpha$  en el desarrollo embrionario del pez cebra, se procedió a analizar el patrón de expresión una serie de genes marcadores que están involucrados en distintos procesos en el desarrollo embrionario temprano.

Para esto, se procedió a bloquear la función de esta isoforma mediante la inyección con 10 $\eta$ g del Morfolino Anti CK1 $\alpha$ , en embriones en estadio de una célula, los que posteriormente fueron fijados con PFA 4% en estadios de 60 y 80% de epibolía y Tailbud (5, 8 y 10 h.p.f. respectivamente).

Finalmente, estos embriones fueron sometidos a hibridación *in situ* con las sondas de RNA marcadas con digoxigenina-11-UTP, de los distintos genes marcadores. Para cada marcador fueron analizados 10 embriones. Como controles se utilizaron embriones inyectados con 10 $\eta$ g del Morfolino Control y otro grupo sin inyectar. Los marcadores genéticos utilizados fueron: Goosecoid, pax2.1, papc y six3.

### **5.5.1 Análisis del patrón de expresión de Goosecoid en embriones inyectados con el Morfolino Anti CK1 $\alpha$ .**

Se realizó hibridación *in situ* con la sonda del gen marcador de territorio dorsal Goosecoid (*gsc*) sobre un grupo de embriones inyectados con 10 $\eta$ g del Morfolino Anti CK1 $\alpha$  fijados en estadio de 60% de epibolía, y sobre otro grupo inyectado con 10 $\eta$ g del Morfolino Control.

En los embriones inyectados con el Morfolino Anti CK1 $\alpha$  se pudo observar una notable modificación en el patrón de expresión de este marcador dorsal, respecto a los embriones inyectados con el Morfolino Control. Como se puede apreciar en la figura 18, en el embrión inyectado con el Morfolino Control en estadio de 60% de epibolía, *gsc* tiene una expresión restringida al escudo embrionario, territorio donde se encuentra el organizador dorsal. En el embrión inyectado con el Morfolino Anti CK1 $\alpha$  se pudo observar un leve ensanchamiento lateral en la tinción, lo que puede estar dando cuenta de una expresión ectópica de este gen regulador o una mal formación del organizador dorsal. Esto puede estar explicando en parte, la presencia de embriones acortados en su eje Antero-Posterior, debido a una falla en la formación del organizador dorsal en embriones inyectados con el Morfolino Anti CK1 $\alpha$ , lo que se traduce en un aumento en la proporción de células especificadas en territorio dorsal en desmedro de las ventrales, hecho que da como resultado un embrión acortado craneo-caudalmente en distintos grados, dependiendo de la magnitud de la modificación en los destinos celulares normales.

### **5.5.2 Análisis del patrón de expresión de Pax2.1 y Six3 en embriones inyectados con el Morfolino Anti CK1 $\alpha$ .**

Se realizó una doble hibridación *in situ* con las sondas de los genes marcadores de placa neural Pax2.1 y Six3, que se expresan en lo que será el límite entre cerebro medio y posterior (Midbrain-Hindbrain Boundary o MHB) y en placa neural anterior respectivamente, sobre un grupo de embriones inyectados con 10 $\eta$ g del Morfolino Anti CK1 $\alpha$ , fijados en estadio de Tailbud, y sobre otro grupo inyectado con 10 $\eta$ g del Morfolino Control. Como se puede apreciar en la figura 16, existe una clara diferencia entre los embriones inyectados con el

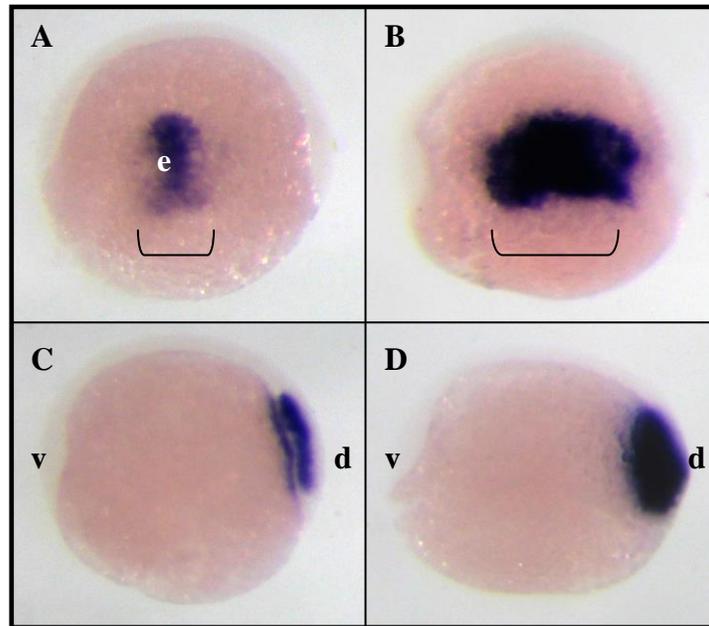
Morfolino Anti CK1 $\alpha$  y los controles. En primer lugar, la expresión de Pax2.1 en el límite entre lo que será el cerebro medio y posterior (MHB), se hace mucho más tenue, llegando casi a desaparecer (flecha), resultado que concuerda con las alteraciones morfológicas observadas en los embriones inyectados con el Morfolino Anti CK1 $\alpha$ , donde se aprecia pérdida en la segmentación entre cerebro medio y posterior e indiferenciación morfológica de estructuras presentes en esta región, especialmente cerebelo. Por otra parte, el patrón de expresión de Six3 parece estar levemente alterado en su región más posterior, lo que hace que adopte una forma distinta a la del control en su margen caudal. A pesar de que esta diferencia es más leve y menos notoria que la observada para Pax2.1, también puede estar dando cuenta de una alteración en la formación de la placa neural media, no así en la región más anterior de ésta.

Ambos resultados pueden estar explicando en parte las alteraciones morfológicas observadas en los embriones inyectados con el Morfolino Anti CK1 $\alpha$ , donde son visibles las malformaciones a nivel cerebral, especialmente en el MHB, ya que, tanto Pax2.1 como Six3 son necesarios para el normal desarrollo de las estructuras originadas de la placa neural, tanto medias como anteriores respectivamente.

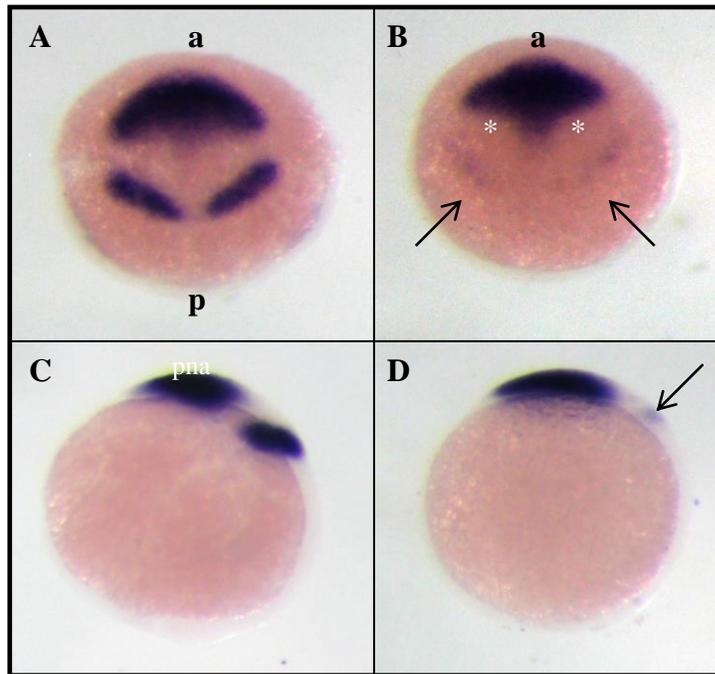
### **5.5.3 Análisis del patrón de expresión de Papc en embriones inyectados con el Morfolino Anti CK1 $\alpha$ .**

Se realizó hibridación *in situ* sobre un grupo de embriones inyectados con 10 $\eta$ g del Morfolino Anti CK1 $\alpha$ , fijados en estadio de Tailbud, y sobre otro grupo inyectado con 10 $\eta$ g del Morfolino Control, con la sonda del gen marcador de mesodermo presomítico Papc, que se expresa en células mesodermales del futuro tronco del embrión que están sufriendo movimientos morfogenéticos durante la

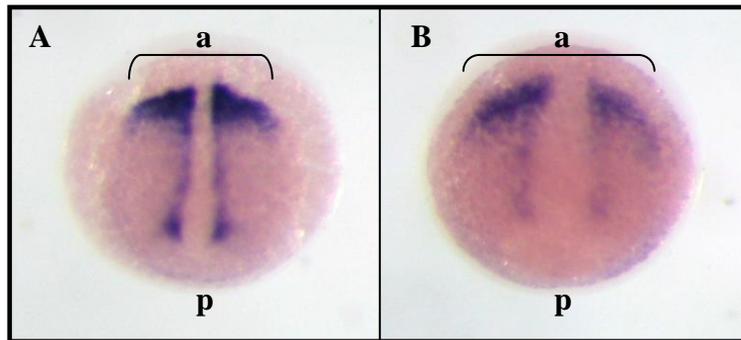
gastrulación. Como se puede apreciar en la figura 17, existe una clara diferencia entre los embriones inyectados con el Morfolino Anti CK1 $\alpha$ , y los controles. En este caso se puede observar un ensanchamiento en el patrón de expresión de Papc y de la línea media donde se encuentra la notocorda. Este resultado puede estar dando cuenta de una alteración en los movimientos morfogénéticos durante la gastrulación, específicamente en los de convergencia y extensión en los que se ha documentado la participación de Papc en conjunto con una señalización de Wnt no canónica. Esto podría estar explicando en parte la presencia de embriones curvos en los fenotipos observados en la inyección con el morfolino Anti CK1 $\alpha$ , en los que deberían estar fallando al realizar los movimientos morfogénéticos tempranos durante, especialmente los relacionados con la convergencia y extensión de las células en relación al vitelo.



**Figura 18:** *Análisis del patrón de expresión de Goosecoid (gsc) en embriones inyectados con el Morfolino Anti CK1 $\alpha$  y controles.* En A y B se muestra una vista dorsal de embriones inyectados con el MO control (A) y con el MO CK1 $\alpha$  (B) en estadio de 60% de epibolía, donde se puede apreciar un ensanchamiento lateral del patrón de expresión de *gsc* (llaves), que normalmente se expresa en el escudo del embrión (e) como se aprecia en el control. En C (control) y D (MO CK1 $\alpha$ ) se muestra una vista lateral de de los mismos embriones, donde se observa una mayor intensidad en la señal de *gsc* en el lado dorsal (d), específicamente en el escudo embrionario. (e: escudo; d: dorsal; v: ventral).



**Figura 19:** *Análisis del patrón de expresión de Pax2.1 y Six3 en embriones inyectados con el Morfolino Anti CK1 $\alpha$  y controles. En A y B se muestra una vista dorsal de embriones inyectados con el MO control (A) y con el MO CK1 $\alpha$  (B) en estadio de Tailbud, donde se puede apreciar una pérdida en la señal de Pax2.1 (flechas) y una leve modificación en el patrón de expresión de Six3 (\*) en el embrión inyectado con el MO CK1 $\alpha$ . En C (control) y D (MO CK1 $\alpha$ ) se muestra una vista lateral de ambos embriones donde se puede apreciar la menor tinción de pax2.1 en el embrión inyectado con el MO CK1 $\alpha$ , territorio que posteriormente dará origen al límite entre cerebro medio y posterior (flecha). En cambio, en esta misma vista lateral, no se aprecia mayor diferencia en la señal de Six3 en la región de la Placa Neural Anterior (pna) en ambos embriones. (a: anterior; p: posterior; pna: Placa Neural Anterior).*



**Figura 20:** *Análisis del patrón de expresión de Papc en embriones inyectados con el Morfolino Anti CK1 $\alpha$  y controles.* En A y B se muestra una vista dorsal de embriones inyectados con el MO control (A) y con el MO CK1 $\alpha$  (B) en estadio de Tailbud, donde se puede apreciar un evidente ensanchamiento en el patrón de expresión de Papc (llaves) en el embrión inyectado con el MO CK1 $\alpha$  comparado con el control. (a: anterior; p: posterior).

## 6. DISCUSIÓN

### 6.1 Estudios de expresión de CK1 $\alpha$ y CK1 $\epsilon$ en desarrollo embrionario

Mediante experimentos de RT-PCR se logró la amplificación de fragmentos provenientes de los transcritos de las cuatro subisoformas de CK1 $\alpha$  y de la isoforma CK1 $\epsilon$  a lo largo de diferentes estadios del desarrollo embrionario de pez cebra (Figura 8 y 9). Aunque estos resultados no son cuantitativos, sin embargo y dado que en todos los casos comparamos con  $\beta$ -actina como control, estos resultados nos sirven para comparar los niveles de expresión de las distintas isoformas durante el desarrollo.

En la figura 8 se observa que ocurren cambios en la relación de los mensajeros de las variantes de CK1 $\alpha$  a lo largo del desarrollo embrionario del pez cebra. Lo que resulta interesante de este resultado es la diferencia observada en los niveles de expresión de las isoformas  $\alpha$ S y  $\alpha$ L. La primera sufre un aumento en su abundancia relativa desde las 8 h.p.f., mientras que el nivel de CK1 $\alpha$ L decae entre las 23 y 33 h.p.f. En estos estadios observamos una abundancia aparentemente similar de CK1 $\alpha$  y CK1 $\alpha$ S, mientras que CK1 $\alpha$ L se encuentra presente en muy baja proporción comparada con las dos primeras. La proporción de los cuatro transcritos en 5 días post fertilización es distinta a la observada entre 1 y 3 h.p.f. La presencia de estos transcritos durante las tres primeras horas de vida del embrión señalan una procedencia maternal de estos transcritos. CK1 $\alpha$ LS parece expresarse a muy bajo nivel con respecto a las anteriores, mostrando un pico de expresión alrededor de las 23 h.p.f. Esto implica que el procesamiento alternativo de CK1 $\alpha$  estaría regulado diferencialmente durante el desarrollo.

De esta manera, se concluye que la expresión de CK1 $\alpha$  se mantiene constante durante el desarrollo embrionario. Por otra parte, la expresión de las isoformas  $\alpha$ S y  $\alpha$ L, pueden estar diferencialmente reguladas durante el desarrollo embrionario. Los niveles relativos de mensajero no reflejan necesariamente la proporción de las proteínas correspondientes. Es posible que existan diferencias en la estabilidad de los transcritos o de las proteínas traducidas.

En el caso de CK1 $\epsilon$  (figura 9), no se observa expresión de este gen en los estadios tempranos de desarrollo (entre 0 y 12 horas) lo que indica la ausencia de un componente materno y cigótico temprano en la expresión del mRNA de esta isoforma. A las 24 h.p.f. se detecta una débil expresión, la que se intensifica a partir de las 48 h.p.f. Esto indica que en el lapso comprendido entre 12 y 24 h.p.f. el embrión comienza a transcribir el mensajero cigótico de CK1 $\epsilon$ , el que aumenta hasta llegar a un nivel constante, por lo menos hasta el día 6 post fertilización.

Se puede concluir entonces, que la expresión de CK1 $\epsilon$  está diferencialmente regulada durante el desarrollo embrionario y que el mensajero de esta isoforma corresponde sólo a transcrito cigótico, sin la presencia de un componente maternal.

Por otra parte, la hibridación *in situ* sobre embriones enteros con la sonda de CK1 $\alpha$  muestra una expresión generalizada e intensa en embriones en estadio de 80% de epibolía (figura 10). A las 24 h.p.f. se puede apreciar una expresión muy intensa en todo el embrión, especialmente en la región cefálica. A las 38 horas comienza a aparecer una leve señal en el primordio de las aletas pectorales. A partir de las 48 h.p.f. se observa una localización restringida en la cabeza, los primordios de las aletas pectorales y en la mandíbula con pérdida de señal en las

estructuras más caudales del embrión. La expresión en las aletas pectorales se corresponde con el reciente aislamiento de una línea mutante de pez cebra, para la isoforma CK1 $\alpha$ , que presenta defectos en la condrogénesis, lo que resulta en anomalías morfológicas en la formación de los arcos branquiales, la mandíbula y las aletas pectorales (Golling *et al.*, 2002).

Por otra parte, en el caso de los embriones sometidos a hibridación *in situ* con la sonda de CK1 $\epsilon$ , se corroboró la ausencia del mensajero en estadios tempranos del desarrollo, observada en los ensayos de RT-PCR. Como se puede apreciar en la figura 11, en estadio de 80% de epibolia el embrión no muestra señal alguna. Sin embargo, a las 24 horas de desarrollo aparece una tinción en distintas estructuras del sistema nervioso central (cerebro anterior, medio, posterior y rombencéfalo), señal que es más tenue y más delimitada que la observada en el caso de CK1 $\alpha$ . A las 48 h.p.f. se mantiene la expresión específica de CK1 $\epsilon$  en las estructuras encefálicas anteriormente mencionadas.

De estos experimentos es interesante destacar las diferencias espaciales y temporales de los patrones de expresión del mensajero de ambas isoformas, entre las que podemos destacar:

El mensajero de la isoforma CK1 $\alpha$  se expresa de manera muy generalizada a partir de los primeros estadios del desarrollo, a diferencia de CK1 $\epsilon$  que da una señal muy específica y tenue en ciertas estructuras encefálicas, y sólo a partir de estadios más tardíos (24 h.p.f.).

En estadios más avanzados del desarrollo embrionario (48 h.p.f.), el mensajero de ambas isoformas se expresa principalmente en la región cefálica, pero con algunas diferencias, como por ejemplo, CK1 $\alpha$  es observada en la totalidad de la región cefálica, en cambio CK1 $\epsilon$  se restringe solo a algunas

estructuras encefálicas (cerebro anterior, medio, posterior y rombencéfalo), y además sólo CK1 $\alpha$  se expresa en el primordio de las aletas pectorales.

Estos experimentos fueron realizados utilizando como sonda la región 3' no codificante de estas isoformas, ambas clonadas en el vector pBluescript. Por ello, en el caso de CK1 $\alpha$ , lo más probable es que se estén detectando las cuatro subisoformas ( $\alpha$ ,  $\alpha$ S,  $\alpha$ L y  $\alpha$ LS).

## 6.2 Estudios de función de CK1 $\alpha$ y CK1 $\epsilon$ en desarrollo embrionario

Antes de proceder a discutir los resultados obtenidos en los experimentos de inyección, cabe destacar que la diferencia entre el número total de embriones inyectados en las distintas condiciones experimentales fue una variable difícil de controlar debido a que esto depende exclusivamente de la producción de embriones fertilizados, los que varían de pareja en pareja según los peces cruzados.

Mediante estos experimentos de inyección de RNA mensajero codificante para CK1 $\alpha$ , CK1 $\epsilon$  y sus respectivas Dominantes Negativas, además del Morfolino Anti CK1 $\alpha$ , se pudo obtener datos importantes en cuanto a la función de ambas isoformas en el desarrollo embrionario del pez cebra.

Entre estos datos, uno de los más llamativos es el que dice relación con las alteraciones morfológicas a nivel de encéfalo, específicamente en las estructuras delimitadas entre el cerebro medio y posterior, obtenido con la inyección del RNA de CK1 $\alpha$  y CK1 $\epsilon$  (96% y 32% de embriones respectivamente). Este hecho coincide con el patrón de expresión del mensajero de ambas isoformas, visualizado en los experimentos de hibridación *in situ*, restringido a estructuras encefálicas en estadios avanzados del desarrollo embrionario (entre 24 y 48 h.p.f.). Además, estos resultados se asemejan a los obtenidos con la

sobreexpresión del mRNA codificante para la proteína Wnt-8, donde se observan embriones con un fenotipo muy similar a los inyectados con las isoformas CK1 $\alpha$  y CK1 $\epsilon$ . Estos embriones presentan una indiferenciación morfológica de estructuras del Sistema Nervioso Central, especialmente en la segmentación entre cerebro medio y posterior, con extensiva apoptosis observada en cerebro medio y cerebelo (Kelly, *et al.*, 1995). Otra característica en común observada entre los embriones inyectados con el mRNA de Wnt-8 y CK1 $\alpha$ , es la presencia de alteraciones en la formación del globo ocular (ciclopía y ausencia total de ambos ojos) (Kelly *et al.*, 1995).

Es interesante destacar también, que en el caso del bloqueo de función de CK1 $\alpha$ , ya sea mediante la inyección de la Dominante Negativa o el Morfolino Oligo Antisentido se obtuvo un resultado similar al observado con la inyección de los mensajeros codificantes para las isoformas normales en relación a las alteraciones morfológicas observadas a nivel encefálico (perdida de la segmentación entre cerebro medio y posterior). Además en ambos casos, con la Dominante Negativa y Morfolino, se obtuvo un porcentaje de embriones con acortamiento del eje Antero-Posterior, pero este fue significativamente menor al obtenido mediante la inyección del mensajero codificante para CK1 $\alpha$ , donde casi la totalidad de los embriones (96%) presentó esta alteración. Esto hace pensar que, además de la participación que puede tener CK1 $\alpha$  en el desarrollo de estructuras del Sistema Nervioso Central, esta isoforma puede cumplir un rol importante en el desarrollo temprano, específicamente en los procesos que tienen que ver con la formación y establecimiento de los ejes embrionarios durante la gastrulación.

Por el contrario, el bloqueo de función de CK1 $\epsilon$  mediante la inyección de su Dominante Negativa no produjo efectos tan notables en cuanto a porcentaje de embriones afectados, donde solo un 8% presentó las alteraciones encefálicas

descritas anteriormente. Esto puede estar siendo explicado por el patrón de expresión temporal del mensajero de esta isoforma, que, como se mostró en los resultados del RT-PCR e hibridación *in situ*, se comienza a visualizar a partir de las 24 horas de desarrollo aproximadamente. Por lo tanto, el RNA que codifica para la Dominante Negativa de CK1 $\epsilon$  y que da origen a una proteína catalíticamente inactiva en el embrión, no puede competir con la quinasa endógena en estadios tempranos, simplemente por que esta última no está presente. Sólo el remanente de proteína mutante que permanece estable en estadios más avanzados alcanzaría a desplazar la CK1 $\epsilon$  endógena que se podría comenzar a traducir más tardíamente en el desarrollo embrionario.

Lo anterior y otras evidencias que relacionan directamente a ambas isoformas, CK1 $\alpha$  y CK1 $\epsilon$ , con la vía de señalización de Wnt (Sakanaka *et al.*, 2000), nos permiten postular que estas quinasas pueden estar actuando en los procesos que regulan la formación y establecimiento de los ejes en el desarrollo embrionario temprano y la formación de estructuras del Sistema Nervioso Central, mediadas por las vías de señalización relacionadas con las proteínas Wnt. Un aspecto un tanto oscuro en estas especulaciones se refiere al hecho de que se ha relacionado CK1 $\alpha$  y CK1 $\epsilon$  con la desactivación de la vía canónica de Wnt. La evidencia indica que ambas isoformas de CK1 fosforilan de  $\beta$ -catenina en la serina 45 (Schwarz-Romond *et al.*, 2002; Marin *et al.*, 2003), lo que permite luego, la fosforilación de esta proteína por parte de GSK3- $\beta$ , que proporciona los sitios de reconocimiento para su posterior ubiquitinación y degradación en el proteosoma, impidiendo la consecuente transcripción de los genes blanco. Sin embargo, y contraponiéndose en parte a lo anterior, se ha descrito que la sobre-expresión de CK1 $\alpha$  y CK1 $\epsilon$  produce los mismos efectos que la sobre-expresión de Wnt en embriones de *Xenopus laevis* (McKay *et al.*, 2001), lo que se opone al rol desactivador de la vía canónica de Wnt propuesto para estas quinasas en estudios

realizados *in vitro* e *in vivo*. Esto puede ser explicado por la acción de ambas isoformas, CK1 $\alpha$  y CK1 $\epsilon$ , en distintos niveles de la vía de señalización canónica de Wnt, interactuando no sólo con  $\beta$ -catenina, sino que también con otras proteínas presentes en la cascada: dishevelled (Sakanaka *et al.*, 1999). Esto podría explicar los efectos paradójales observados al sobreactivar o desactivar la vía Wnt, permitiendo así visualizar los mismos efectos a nivel de alteraciones morfológicas en el desarrollo embrionario en condiciones de bloqueo de función o sobreexpresión, situación que no es poco común en estudios de este tipo.

Otra posibilidad para la explicación de los resultados similares obtenidos con la sobre-expresión y la pérdida de función de estas isoformas, es la participación de estas quinasas, CK1 $\alpha$  y CK1 $\epsilon$ , en vías de señalización mediadas por proteínas Wnt, que no dependen necesariamente de  $\beta$ -catenina (vías no canónicas) y que aún permanecen pobremente entendidas en su totalidad. Se ha documentado la participación de estas quinasas en vías de señalización no canónicas mediadas por Wnt (McKay *et al.*, 2001), y además se ha postulado que proteínas Wnt que señalizan mediante estas vías, pueden antagonizar las vías de Wnt canónicas mediadas por  $\beta$ -catenina, como es el caso de Wnt-5 que bloquea la acumulación normal de esta proteína en el organizador dorsal del embrión de pez cebra. Lo que conduce, al bloquear la función de Wnt-5, a obtener una mayor proporción de células con especificación dorsal en desmedro de las ventrales (Weidinger y Moon, 2003).

Para tener una idea más clara de estos fenómenos, sería necesario realizar una serie de experimentos en los que se analicen genes marcadores que se encuentren río abajo de estas vías de señalización, canónicas y no canónicas, en el desarrollo de embriones inyectados con ambas isoformas.

Por otra parte, es notable la diferencia fenotípica que existe entre los embriones inyectados con el mRNA de CK1 $\alpha$  y los inyectados con el mRNA de

CK1 $\epsilon$ . Aquellos embriones inyectados con la isoforma CK1 $\alpha$  presentaron mayor porcentaje de fenotipos afectados en cuanto a la formación de su eje Antero-Posterior: 96% de los embriones acortados con CK1 $\alpha$ , contra un 4% de los inyectados con CK1 $\epsilon$ . Este fenómeno también ha sido descrito en experimentos de inyecciones del mRNA de Wnt-8 (Kelly *et al.*, 1995). Al inyectar altas concentraciones de este mensajero, se obtienen más de la mitad de los embriones acortados en su eje Antero-Posterior y curvados en torno al vitelo, muy similares a los observados en la inyección con 350pg de la isoforma CK1 $\alpha$ , hecho explicado en parte por cambios sustanciales en el patrón expresión del gen marcador dorsal *gsc* en los embriones inyectados con wnt-8 (Kelly *et al.*, 1995).

Finalmente, es necesario y fundamental analizar el efecto de estas quinasas sobre marcadores directos de las vías de señalización Wnt canónicas y no canónicas en el desarrollo embrionario del pez cebra, y además, complementar lo anterior con nuevas evidencias que surjan en torno a estas complejas cascadas de eventos, para así, poder sacar una conclusión consistente del papel de CK1 en los procesos relacionados con el desarrollo embrionario de vertebrados, utilizando como modelo el pez cebra.

### **6.3 Análisis de marcadores genéticos en embriones inyectados con el Morfolino Anti CK1 $\alpha$ .**

De los resultados obtenidos con los experimentos de bloqueo de función de CK1 $\alpha$  mediante la inyección del morfolino para esta isoforma y el posterior análisis de marcadores genéticos, se obtuvieron datos importantes que sirven como punto de partida para un estudio más profundo a realizar posteriormente en el laboratorio.

Uno de estos resultados dice relación con la modificación en el patrón de expresión del gen marcador dorsal Goosecoid (*gsc*), que normalmente es expresado en el escudo embrionario y que está involucrado en la regulación de los destinos dorsales de las células de esa región (Schulte-Merker *et al.*, 1994). Se ha descrito que la inducción de este factor transcripcional es dependiente de la acumulación de  $\beta$ -catenina en la región que posteriormente formará parte del organizador dorsal del embrión (Kelly *et al.*, 2000). Se ha postulado que esta acumulación temprana de  $\beta$ -catenina podría ser el resultado de una señalización dependiente de Wnt (Weidinger y Moon, 2003). Por lo tanto, la modificación del patrón de expresión de *gsc* en embriones inyectados con el Morfolino Anti CK1 $\alpha$  puede estar indicando que esta quinasa está actuando en los procesos que intervienen en la formación de los ejes en el desarrollo embrionario temprano, puntualmente en la especificación del eje Dorso-Ventral. Nosotros creemos que CK1 $\alpha$  está actuando en etapas muy tempranas, incluso antes de la gastrulación, participando en la regulación de la estabilidad de  $\beta$ -catenina en la región dorsal del embrión, necesaria para la formación del organizador. Como dato anexo, se ha documentado la participación de la GSK3- $\beta$  en la regulación de los niveles de  $\beta$ -catenina en la región dorsal del embrión (Fekany *et al.*, 1999). Cabe destacar que en estudios realizados *in vitro* se ha demostrado que CK1 al fosforilar  $\beta$ -catenina en la serina 45 crearía el sitio de consenso necesario para el posterior reconocimiento y fosforilación de esta proteína por parte de la GSK3- $\beta$  (Marin *et al.*, 2003; Knippschild *et al.*, 2005 ). El resultado anterior, nos permite postular que CK1 estaría actuando a este nivel.

Por otra parte, la modificación en el patrón de expresión de Pax2.1, y en menor grado de Six3, observado en los embriones inyectados con el Morfolino Anti CK1 $\alpha$ , coincide con las anomalías fenotípicas encontradas en el desarrollo de estructuras cerebrales en embriones inyectados con este Morfolino,

especialmente entre el cerebro medio y posterior. Esto sugiere que CK1 $\alpha$  estaría también involucrada en los procesos que regulan el normal desarrollo de algunas estructuras del Sistema Nervioso Central en el pez cebra, donde también se ha descrito un papel fundamental de las vías de señalización Wnt. Estas incluyen la inducción de la polaridad Antero-Posterior del tubo neural (Kudoh *et al.*, 2002), y la formación de estructuras específicas en esta región debido a su función en el crecimiento y diferenciación celular (Weidinger y Moon, 2003). Lo anterior sumado a evidencias presentes en la literatura, sugiere que CK1 $\alpha$  podría estar involucrada en la regulación de las de señalización Wnt, canónicas o no canónicas, regulando de esta manera, los distintos y complejos procesos por los que se llegan a desarrollar las estructuras del cerebro.

Por otro lado, se sabe que *Papc* se expresa en el territorio mesodérmico paraxial y está involucrada en movimientos morfogenéticos de convergencia y extensión de la de las células sobre el vitelo (Yamamoto *et al.*, 1998). Este gen coordina la polaridad celular a través de su interacción con otras moléculas dentro de una vía de Wnt no canónica (Unterseher *et al.*, 2004). En cuanto a los resultados obtenidos con la sonda del gen marcador *Papc*, se puede sugerir que CK1 $\alpha$  podría estar involucrada en la o las vías de señalización que regulan este tipo de movimientos celulares durante la gastrulación.

Finalmente, cabe destacar que estos resultados son sólo preliminares y se necesitan más experimentos para poder aclarar con mayor precisión el papel que juega CK1 $\alpha$  en los procesos involucrados en el desarrollo embrionario de vertebrados.

## 7. CONCLUSIONES

1. CK1 $\alpha$  presenta una expresión ubicua a nivel de mRNA en estadíos tempranos del desarrollo del pez cebra. En estadíos más avanzados se expresa en la aleta pectoral y en la región cefálica. En cambio CK1 $\epsilon$ , no se expresa en estadíos tempranos y muestra una expresión más restringida en el cerebro. Estos resultados indican que los mRNAs codificantes para CK1 $\alpha$  y CK1 $\epsilon$  presentan una expresión diferencial a nivel temporal y espacial en el desarrollo embrionario del pez cebra.

2. La sobre-expresión de CK1 $\alpha$  produce embriones con eje antero-posterior acortado y anomalías en el desarrollo de estructuras encefálicas. Por el contrario CK1 $\epsilon$  produce sólo alteraciones en el desarrollo de estructuras encefálicas.

3. La inyección del mRNA de la forma Dominante Negativa de CK1 $\alpha$  en embriones de pez cebra produce defectos en el desarrollo del cerebro a diferencia de la forma Dominante Negativa de CK1 $\epsilon$ , que no produce efectos significativos.

4. El bloqueo de función de CK1 $\alpha$  mediante la inyección de un Morfolino antisentido específico en embriones de pez cebra produce alteraciones a nivel del desarrollo del cerebro, embriones curvados y eje Antero-Posterior acortado.

5. La inyección del Morfolino antisentido para CK1 $\alpha$  produce extensión en el patrón de expresión de goosecoide, una leve reducción de la expresión de six3, una reducción significativa en la expresión de pax2.1 y un ensanchamiento de la expresión de papc. En su conjunto estos resultados indican que CK1 $\alpha$  podría

estar regulando diversos procesos durante el desarrollo temprano del pez cebra, como: Establecimiento del eje dorso-ventral, formación de estructuras del sistema nervioso central y participación en los movimientos de convergencia y extensión de las células sobre el vitelo.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

**BUCKINGHAM, M.; BAJARD, L.; CHANG, T.; DAUBAS, P.; HADCHOUËL, J.; MEILHAC, S.; MONTARRAS, D.; ROCANCOURT, D.; RELAIX, F.** 2003. The formation of skeletal muscle: from somite to limb. *J Anat.* 202(1):59-68.

**BUCKLES, G.R.; THORPE, C.J.; RAMEL, M.C.; LEKVEN, A.C.** 2004. Combinatorial Wnt control of zebrafish midbrain-hindbrain boundary formation. *Mech Dev.* 121(5):437-47.

**BURZIO, V.; ANTONELLI, M.; ALLENDE, C.C.; ALLENDE, J.E.** 2002. Biochemical and cellular characteristics of the four splice variants of protein kinase CK1alpha from zebrafish (*Danio rerio*). *J Cell Biochem.* 86(4):805-14.

**CARREIRA-BARBOSA, F.; CONCHA, M.L.; TAKEUCHI, M.; UENO, N.; WILSON, S.W.; TADA, M.** 2003. Prickle 1 regulates cell movements during gastrulation and neuronal migration in zebrafish. *Development.* 130(17):4037-46.

**DETRICH, H.W.; WESTERFIELD, M.; ZON, L.I.** 1999. *The zebrafish: Biology.* Academic Press. California, USA.

**DOMINGUEZ, M.; BRUNNER, M.; HAFEN, E.; BASLER, K.** 1996. Sending and receiving the hedgehog signal: control by the *Drosophila* Gli protein *Cubitus interruptus*. *Science.* 14;272(5268):1621-5.

**FEKANY, K.; YAMANAKA, Y.; LEUNG, T.; SIROTKIN, H.I.; TOPCZEWSKI, J.; GATES, M.A.; HIBI, M.; RENUCCI, A.; STEMPLE, D.; RADBILL, A.; SCHIER, A.F.; DRIEVER, W.; HIRANO, T.; TALBOT, W.S.; SOLNICA-KREZEL, L.** 1999. The zebrafish *bozozok* locus encodes Dharma, a homeodomain protein essential for induction of gastrula organizer and dorsoanterior embryonic structures. *Development.* 126(7):1427-38.

**GILBERT, S.F.** 2000. *Developmental Biology.* 6th Edition. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Sunderland, Massachusetts, USA.

**GOLLING, G.; AMSTERDAM, A.; SUN, Z.; ANTONELLI, M.; MALDONADO, E.; CHEN, W.; BURGESS, S.; HALDI, M.; ARTZT, K.**

**FARRINGTON, S.; LIN, S.Y.; NISSEN, R.M.; HOPKINS, N.** 2002. Insertional mutagenesis in zebrafish rapidly identifies genes essential for early vertebrate development. *Nat Genet.* 31(2):135-140.

**GRANDEL, H.; DRAPER, B.W.; SCHULTE-MERKER, S.** 2000. Dackel acts in the ectoderm of the zebrafish pectoral fin bud to maintain AER signaling. *Development.* 127(19):4169-4178.

**GRANDEL, H.; SCHULTE-MERKER, S.** 1998. The development of the paired fins in the zebrafish (*Danio rerio*). *Mech Dev.* 79(1-2):99-120.

**HAMMERSCHMIDT, M.; PELEGRI, F.; MULLINS, M.C.; KANE, D.A.; VAN EEDEN, F.J.; GRANATO, M.; BRAND, M.; FURUTANI-SEIKI, M.; HAFFTER, P.; HEISENBERG, C.P.; JIANG, Y.J.; KELSH, R.N.; ODENTHAL, J.; WARGA, R.M.; NUSSLEIN-VOLHARD, C.** 1996. *dino* and *mercedes*, two genes regulating dorsal development in the zebrafish embryo. *Development.* 123: 95-102.

**HINO, S.; MICHIEUE, T.; ASASHIMA, M.; KIKUCHI, A.** 2003. Casein kinase I epsilon enhances the binding of Dvl-1 to Frat-1 and is essential for Wnt-3a-induced accumulation of beta-catenin. *J Biol Chem.* 278(16):14066-14073.

**INGHAM, P.W.; MCMAHON, A.P.** 2001. Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev.* 15(23):3059-3087.

**ITOH, M.; KUDOH, T.; DEDEKIAN, M.; KIM, C.H.; CHITNIS, A.B.** 2002. A role for *iro1* and *iro7* in the establishment of an anteroposterior compartment of the ectoderm adjacent to the midbrain-hindbrain boundary. *Development.* 129(10):2317-27.

**JOORE, J.; FASCIANA, C.; SPEKSNIJDER, J.E.; KRUIJER, W.; DESTREE, O.H.; VAN DEN EIJNDEN-VAN RAAIJ, A.J.; DE LAAT, S.W.; ZIVKOVIC, D.** 1996. Regulation of the zebrafish goosecooid promoter by mesoderm inducing factors and Xwnt1. *Mech Dev.* 55(1):3-18.

**KANE, D.A.; KIMMEL, C.B.** 1993. The zebrafish midblastula transition. *Development.* 119: 447-456.

**KELLY, G.M.; EREZYILMAZ, D.F.; MOON, R.T.** 1995. Induction of a secondary embryonic axis in zebrafish occurs following the overexpression of beta-catenin. *Mech. Dev.* 53: 261-273.

**KELLY, G.M.; GREENSTEIN, P.; EREZYILMAZ, D.F.; MOON, R.T.** 1995. Zebrafish wnt8 and wnt8b share a common activity but are involved in distinct developmental pathways. *Development*. 121(6):1787-99.

**KIMMEL, C.B.; LAW, R.D.** 1985. Cell lineage of zebrafish blastomeres. II. Formation of the yolk syncytial layer. *Dev. Biol.* 108: 86-93.

**KIMMEL, C.B.; WARGA, R.M.; SCHILLING T.F.** 1990. Origin and organization of the zebrafish fate map. *Development*. 108: 581-594.

**KISHIDA, M.; HINO, S.I.; MICHIUE, T.; YAMAMOTO, H.; KISHIDA, S.; FUKUI, A.; ASASHIMA, M.; KIKUCHI, A.** 2001. Synergistic activation of the Wnt signaling pathway by Dvl and casein kinase Iepsilon. *J Biol Chem*. 31;276(35):33147-55.

**KNIPPSCHILD, U.; GOCHT, A.; WOLFF, S.; HUBER, N.; LOHLER, J.; STOTER, M.** 2005. The casein kinase 1 family: participation in multiple cellular processes in eukaryotes. *Cell Signal*. 17(6):675-89.

**KUDOHO, T.; WILSON, S.W.; DAWID, I.B.** 2002. Distinct roles for Fgf, Wnt and retinoic acid in posteriorizing the neural ectoderm. *Development*. 129(18):4335-46.

**LANGELAND, J.; KIMMEL, C. B.** 1997. The embryology of fish. In S. F. Gilbert and A. M. Raunio (eds.), *Embryology: Constructing the Organism*. Sinauer Associates, Sunderland, MA, pp. 383 -407.

**LEUNG, C.; WEBB, S.E.; MILLER, A.** 1998. Calcium transients accompany ooplasmic segregation in zebrafish embryos. *Dev. Growth Differ.* 40: 313-326.

**LITTLE, S.C.; MULLINS, M.C.** 2004. Twisted gastrulation promotes BMP signaling in zebrafish dorsal-ventral axial patterning. *Development*. 131(23):5825-35.

**LOOMIS, C.A.; HARRIS, E.; MICHAUD, J.; WURST, W.; HANKS, M.; JOYNER, A.L.** 1996. The mouse Engrailed-1 gene and ventral limb patterning. *Nature*. 382(6589):360-363.

**MARIN, O.; BUSTOS, V.H.; CESARO, L.; MEGGIO, F.; PAGANO, M.A.; ANTONELLI, M.; ALLENDE, C.C.; PINNA, L.A.; ALLENDE,**

**J.E.** 2003. A noncanonical sequence phosphorylated by casein kinase 1 in beta-catenin may play a role in casein kinase 1 targeting of important signaling proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*. 100(18):10193-10200.

**MCKAY, R.M.; PETERS, J.M.; GRAFF, J.M.** 2001. The casein kinase I family in Wnt signaling. *Dev Biol*. 235(2):388-396.

**MCKAY, R.M.; PETERS, J.M.; GRAFF, J.M.** 2001. The casein kinase I family: roles in morphogenesis. *Dev Biol*. 15;235(2):378-87.

**NGUYEN, V.H.; SCHMID, B.; TROUT, J.; CONNORS, S.A.; EKKER, M.; MULLINS, M.C.** 1998. Ventral and lateral regions of the zebrafish gastrula, including the neural crest progenitors, are established by a *bmp2b/swirl* pathway of genes. *Dev. Biol*. 199: 93-110.

**NOJIMA, H.; SHIMIZU, T.; KIM, C.H.; YABE, T.; BAE, Y.K.; MURAOKA, O.; HIRATA, T.; CHITNIS, A.; HIRANO, T.; HIBI, M.** 2004. Genetic evidence for involvement of maternally derived Wnt canonical signaling in dorsal determination in zebrafish. *Mech Dev*. 121(4):371-86.

**PETERS, J.M.; MCKAY, R.M.; MCKAY, J.P.; GRAFF, J.M.** 1999. Casein kinase I transduces Wnt signals. *Nature*. 23;401(6751):345-50.

**PRICE, M.A.; KALDERON, D.** 2002. Proteolysis of the Hedgehog signaling effector Cubitus interruptus requires phosphorylation by Glycogen Synthase Kinase 3 and Casein Kinase 1. *Cell*. 108(6):823-835.

**SAKANAKA, C.; SUN, T.Q.; WILLIAMS, L.T.** 2000. New steps in the Wnt/beta-catenin signal transduction pathway. *Recent Prog Horm Res*. 55:225-236.

**SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T.** 1989. *Molecular Cloning*. Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, USA.

**SAUDE, L.; WOOLLEY, K.; MARTIN, P.; DRIEVER, W.; STEMPLE, D.L.** 2000. Axis-inducing activities and cell fates of the zebrafish organizer. *Development*. 127(16):3407-17.

**SCHMIDT, B.; CAMPOS-ORTEGA, J.** 1994. Dorsoventral polarity of the zebrafish embryo is distinguishable prior to the onset of gastrulation. *Wilhelm Roux Arch. Dev. Biol*. 203: 374-380.

**SCHULTE-MERKER, S.; HAMMERSCHMIDT, M.; BEUCHLE, D.; CHO, K.W.; DE ROBERTIS, E.M.; NUSSLEIN-VOLHARD, C.** 1994. Expression of zebrafish goosecoid and no tail gene products in wild-type and mutant no tail embryos. *Development*. 120(4):843-52.

**SCHULTE-MERKER, S.; LEE, K.J.; MCMAHON, A.P.; HAMMERSCHMIDT, M.** 1997. The zebrafish organizer requires chordino. *Nature*. 387(6636):862-3.

**SCHWARZ-ROMOND, T.; ASBRAND, C.; BAKKERS, J.; KUHL, M.; SCHAEFFER, H.J.; HUELSKEN, J.; BEHRENS, J.; HAMMERSCHMIDT, M.; BIRCHMEIER, W.** 2002. The ankyrin repeat protein Diversin recruits Casein kinase Iepsilon to the beta-catenin degradation complex and acts in both canonical Wnt and Wnt/JNK signaling. *Genes Dev*. 16(16):2073-84.

**SHIMIZU, T.; YAMANAKA, Y.; RYU, S.L.; HASHIMOTO, H.; YABE, T.; HIRATA, T.; BAE, Y.K.; HIBI, M. HIRANO, T.** 2000. Cooperative roles of Bozozok/Dharma and Nodal-related proteins in the formation of the dorsal organizer in zebrafish. *Mech Dev*. 91(1-2):293-303.

**STRAHLE, U; JESUTHASAN, S.** 1993. Ultraviolet irradiation impairs epiboly in zebrafish embryos: Evidence for a microtubule-dependent mechanism of epiboly. *Development*. 119: 451-453.

**TADA, M.; CONCHA, M.L.; HEISENBERG, C.P.** 2002. Non-canonical Wnt signalling and regulation of gastrulation movements. *Semin Cell Dev Biol*. (3):251-60.

**TAPIA, C.; FEATHERSTONE, T.; GOMEZ, C.; TAILLON-MILLER, P.; ALLENDE, C.C.; ALLENDE, J.E.** 1994. Cloning and chromosomal localization of the gene coding for human protein kinase CK1. *FEBS Lett*. 349(2):307-312.

**TRINKAUS; J.P.** 1992. The midblastula transition, the YSL transition, and the onset of gastrulation. *Fundulus Dev. Suppl.* 1992. : 75-80.

**TUAZON, P.T.; TRAUGH, J.A.** 1991. Casein kinase I and II--multipotential serine protein kinases: structure, function, and regulation. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res*. 23:123-164.

**UNTERSEHER, F.; HEFELE, J.A.; GIEHL, K.; DE ROBERTIS, E.M.; WEDLICH, D.; SCHAMBONY, A.** 2004. Paraxial protocadherin coordinates cell polarity during convergent extension via Rho A and JNK. *EMBO J.* 23(16):3259-69. Epub 2004 Aug 5.

**VIELHABER, E.; VIRSHUP, D.M.** 2001. Casein kinase I: from obscurity to center stage. *IUBMB Life.* 51(2):73-78.

**WEIDINGER, G.; MOON, R.T.** 2003. When Wnts antagonize Wnts. *J Cell Biol.* 162(5):753-5.

**YAMAMOTO, A.; AMACHER, S.L.; KIM, S.H.; GEISSERT, D.; KIMMEL, C.B.; DE ROBERTIS, E.M.** 1998. Zebrafish paraxial protocadherin is a downstream target of spadetail involved in morphogenesis of gastrula mesoderm. *Development.* 125(17):3389-97.