



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



ESTUDIOS DE LA EXPRESIÓN Y FUNCIÓN DE LAS PROTEÍNAS
Wnt3a y *CK1γ2* EN EL DESARROLLO EMBRIONARIO DEL PEZ
CEBRA (*Danio rerio*)

CELESTE ROSA AGUIRRE GUTIÉRREZ

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

PROFESOR GUIA: Prof. Dr. JUAN MARCELO ANTONELLI ANATIVIA

SANTIAGO, CHILE

2007



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



ESTUDIOS DE LA EXPRESIÓN Y FUNCIÓN DE LAS PROTEÍNAS
Wnt3a y *CK1γ2* EN EL DESARROLLO EMBRIONARIO DEL PEZ
CEBRA (*Danio rerio*)

CELESTE ROSA AGUIRRE GUTIÉRREZ

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

2007

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 Memoria fue financiada por el proyecto FONDECYT N° 1040697 y Millenium Nucleus In Development Biology ICM-P02-05-0T

ÍNDICE

	<i>página</i>
RESUMEN	1
SUMMARY	3
1. INTRODUCCIÓN	4
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
2.1 Desarrollo embrionario temprano en pez cebra	5
2.1.1 División celular	5
2.1.2 Gastrulación en embriones de pez cebra	8
2.1.2.1 <i>Formación de las capas germinales</i>	9
2.1.3 Formación de los ejes en embriones de pez cebra.....	11
2.1.3.1 <i>Formación del eje dorso ventral: el escudo embrionario</i>	11
2.1.3.2 <i>Formación del eje antero- posterior: dos centros de señales</i>	13
2.2 Segmentación en embriones de pez cebra	14
2.3 Familia de genes Wnt en el desarrollo	17
2.4 Proteína quinasa <i>CK1</i>	18
2.5 Función de <i>CK1</i> y <i>Wnt3a</i> en el desarrollo embrionario	19
3. HIPÓTESIS	22
4. OBJETIVO GENERAL	22
5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
6. MATERIALES Y METODOS	23
6.1 Animales de experimentación	23
6.2 Materiales	23
6.2.1 <i>Preparación de RNA total de embriones de pez cebra</i>	24

6.2.2 Transcripción Reversa Acoplada a PCR (RT-PCR)	24
6.2.3 Síntesis de RNA mensajero para microinyección	25
6.2.4 Síntesis de Sondas de RNA para hibridación <i>in situ</i>	26
6.3 Métodos	27
6.3.1 Hibridación <i>in situ</i> en embriones totales y en cortes histológico	27
6.3.2 Microinyección de mRNA	28
7. RESULTADOS	29
7.1 Determinación de niveles relativos de expresión de RNA mensajero de <i>CK1γ2</i> mediante RT-PCR	29
7.2 Hibridación <i>in situ</i> sobre embriones de pez cebra	30
7.3 Análisis de Función de <i>Wnt3a</i> y <i>CK1γ2</i> mediante la inyección de cantidades conocidas del RNA mensajero de estas isoformas ..	33
7.3.1 Inyección de mRNA codificante para la isoforma <i>Wnt3a</i>	33
7.3.2 Inyección de mRNA codificante para la isoforma <i>CK1γ2</i>	34
7.3.3 Inyección de mRNA control y embriones sin inyectar	37
7.4 Bloqueo de Función de <i>Wnt3a</i> mediante la inyección de Morfolino Oligo Antisentido en embriones de pez cebra	40
7.4.1 Inyección de Oligo-Morfolinos antisentido de <i>Wnt3a</i>	40
7.5 Análisis de la sobre expresión de <i>CK1γ2</i> y <i>Wnt3a</i> mediante el uso de marcadores genéticos en embriones de pez cebra	44
7.5.1 Análisis del patrón de expresión de Chordin y Gooseoid en embriones inyectados con el mRNA codificante de <i>CK1γ2</i>	44
7.5.2 Análisis del patrón de expresión de <i>Dlx3</i> en embriones inyectados con el mRNA codificante de <i>Wnt3a</i>	46
7.5.3 Análisis del patrón de expresión de <i>Rx3</i> y Sonic Hedgehog en embriones inyectados con el mRNA codificante de <i>Wnt3a</i>	46
7.5.4 Análisis del patrón de expresión de <i>Pax2.1</i> y <i>Six3</i> en embriones inyectados con el mRNA codificante de <i>Wnt3a</i>	47

8. DISCUSIÓN	49
8.1 Estudios de expresión de <i>CK1γ2</i> y <i>Wnt3a</i> en el desarrollo embrionario	50
8.2 Estudios de función de <i>Wnt3a</i> y <i>CK1γ2</i> en desarrollo embrionario	52
8.3 Análisis de marcadores genéticos en embriones inyectados con el mRNA codificante para <i>Wnt3a</i> y <i>CK1γ2</i>	57
9. CONCLUSIONES	60
10. BIBLIOGRAFÍA	61

RESUMEN

La vía de señalización del gen Wnt cumple importantes roles en el desarrollo y oncogénesis, es transducido por al menos dos vías: la vía canónica β -catenina dependiente y la cascada no canónica, independiente de β -catenina. La caseína quinasa *CK1* es una familia de proteínas a la que recientemente se le ha relacionado con el desarrollo embrionario. De esta familia se han clonado al menos 7 isoformas, de las cuales *CK1 α* , *CK1 δ* , *CK1 ϵ* Y *CK1 γ* han sido relacionadas con la vía canónica de Wnt.

En esta Memoria de Título se realizaron estudios de expresión y función de *CK1 γ* y *wnt3a* en el desarrollo embrionario del pez zebra (*Danio rerio*). Para ello, hemos analizado los patrones de expresión de estos genes mediante *hibridación in situ* y RT-PCR. Los resultados indican que estos genes se expresan de manera diferencial temporal y espacialmente durante el desarrollo embrionario. *CK1 γ* presenta una expresión ubicua en los primeros estadios. La expresión de *wnt3a* es evidente desde las 12 horas post fecundación, de forma débil. En estadios más avanzados, ambos genes se expresan fuertemente en la región cefálica y en el primordio de las aletas pectorales. *CK1 γ* además se expresa débilmente en el resto del embrión.

Para analizar la función de ambos genes se realizaron estudios de sobreexpresión mediante la inyección del mRNA codificante para *CK1 γ* y *wnt3a* y ensayos de bloqueo de función para *wnt3a* mediante la inyección del morfolino oligo antisentido, que silencia específicamente la actividad de este 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.

Los resultados obtenidos con los experimentos anteriores indican que *CK1 γ* y *wnt3a* están involucrados en el desarrollo ocular. *CK1 γ* además, en los procesos que regulan la formación del eje dorso-ventral y los movimientos de convergencia y extensión embrionarios en el desarrollo temprano del pez cebra. *wnt3a* también

participa en la formación de estructuras cefálicas y del eje antero-posterior, específicamente en el desarrollo de la cola.

SUMMARY

Wnt signals play important roles in development and oncogenesis and are transduced through at least two pathways: a canonical β -catenin-dependent and a β -catenin-independent cascade. The casein kinase 1 (CK1) is a family of proteins which has recently been implicated in embryonic development. At least seven isoforms of this family have been clone, of which *CK1 α* , *CK1 δ* , *CK1 ϵ* Y *CK1 γ* have been related to transduce canonical Wnt signals.

In this thesis, studies of expression and function of both *CK1 γ* and *wnt3a* 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 γ* displays a ubiquitous expression pattern in the first stages. The expression of *wnt3a* is evident from 12 hours post fertilization, of weak form. Later, both genes express strongly in the cephalic region and in the pectoral fins bud. *CK1 γ* , in addition, is expressed weakly in the rest of the embryo. In order to analyze the function of both genes, overexpression studies were performed by injecting mRNA for both *CK1 γ* and *wnt3a*, as well as for blockade of function assays for *wnt3a* by injecting of a morpholino antisense oligo that specifically silences the activity of this one gene. 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.

The results obtained with the previous experiments indicate that *CK1 γ* and *wnt3a* are both involved in the ocular development. *CK1 γ* , in addition, in the processes that regulate the dorso-ventral axis formation and the embryonic movements of convergence-extension in the early development of the zebrafish. *Wnt3a* also is involved in the formation of cephalic structures and in the antero-posterior axis, specifically in the tail development.

INTRODUCCIÓN

El estudio del desarrollo embrionario en un reducido número de modelos animales, nos ha permitido entender cómo a partir de una única célula indiferenciada se obtiene un organismo pluricelular adulto, con un patrón tridimensional bien organizado y mediado por genes que controlan el desarrollo embrionario, los cuales, activándose en diferentes lugares del embrión y a momentos distintos, controlan el desarrollo y la formación del organismo.

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

Dentro de estos sistemas se encuentra el pez cebra, que posee características deseables para este propósito, ya que la fecundación es externa, y sus embriones transparentes nos permiten una fácil visualización de eventos claves en el desarrollo temprano, tiene una organogénesis completa en el día cinco posterior a la fertilización, además de una gran prolificidad y facilidad de mantención.

La familia de genes Wnt codifica para proteínas que juegan roles importantes en numerosos procesos del desarrollo. Estas proteínas corresponden a moléculas de naturaleza difusible que generan gradientes morfogenéticos en su lugar de acción. Interactúan con receptores de membrana, desencadenando respuestas de tipo intracelular a nivel transcripcional. En vertebrados se han identificado 16 miembros de la familia de Wnt en *Xenopus*, 11 miembros en pollos y 12 en pez cebra, sin conocer a cabalidad la función que cumpliría cada uno de estos miembros.

La proteína Caseína Quinasa 1 (*CKI*) 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 *CKI*, estas son: *CKI α* , *β* , *γ* (1-3), *δ* y *ϵ* , de las cuales aún permanecen oscuras los roles que cumplirían algunas de sus isoformas.

En esta Memoria de Título proponemos estudiar la expresión y función de *wnt3a* y *CKI γ 2* en relación a eventos del desarrollo temprano en el embrión de pez cebra.

2. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

2.1 Desarrollo embrionario temprano en pez cebra

El teleósteo *Danio rerio*, conocido como pez cebra, es un organismo modelo ideal para estudiar la genética y el desarrollo en organismos vertebrados, ya que posee numerosas características deseables para la investigación, como por ejemplo que la embriogénesis ocurre externamente y sus embriones son transparentes, lo que permite observar mediante lupa estereoscópica todos los estadios de su desarrollo, además el desarrollo de este organismo es rápido y a las 24 horas ya se aprecia la segmentación del cerebro y se han formado estructuras como el tubo neural, la notocorda y los somitos.

Para los cinco días de desarrollo se han formado órganos sensoriales como los ojos y los oídos. Asimismo, han aparecido el corazón, el hígado, los riñones y el páncreas, además de que los sistemas circulatorio, digestivo y nervioso son perfectamente funcionales.

Los análisis genéticos y la disponibilidad de material biológico se facilitan por la alta cantidad de embriones que una sola pareja de peces puede producir cada semana.

2.1.1 División celular

El embrión se forma a partir de una célula única llamada cigoto, resultado de la fecundación de dos células altamente especializadas (gametos).

Las organizadas y complejas divisiones consecutivas de este cigoto en el proceso llamado segmentación, dan como resultado la formación del embrión (Figura 1) En esta etapa el embrión recibe el nombre de blástula y las células que los constituyen se llaman blastómeros. El tipo de segmentación que aquí observamos es meroblástico, en que las divisiones afectan únicamente al polo animal (donde está el núcleo y ocurre la actividad metabólica) del cigoto, mientras que el polo vegetal (donde se sitúa el vitelo), permanece prácticamente intacto; y discoidal, ya que solamente el citoplasma del blastodisco va a dar origen al embrión.

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).

La distribución de los blastómeros, por movimientos y mecanismos determinados, da lugar a una reorganización de las células de la blástula que se disponen en distintas capas que más tarde se diferenciarán para dar lugar a distintas partes del animal.

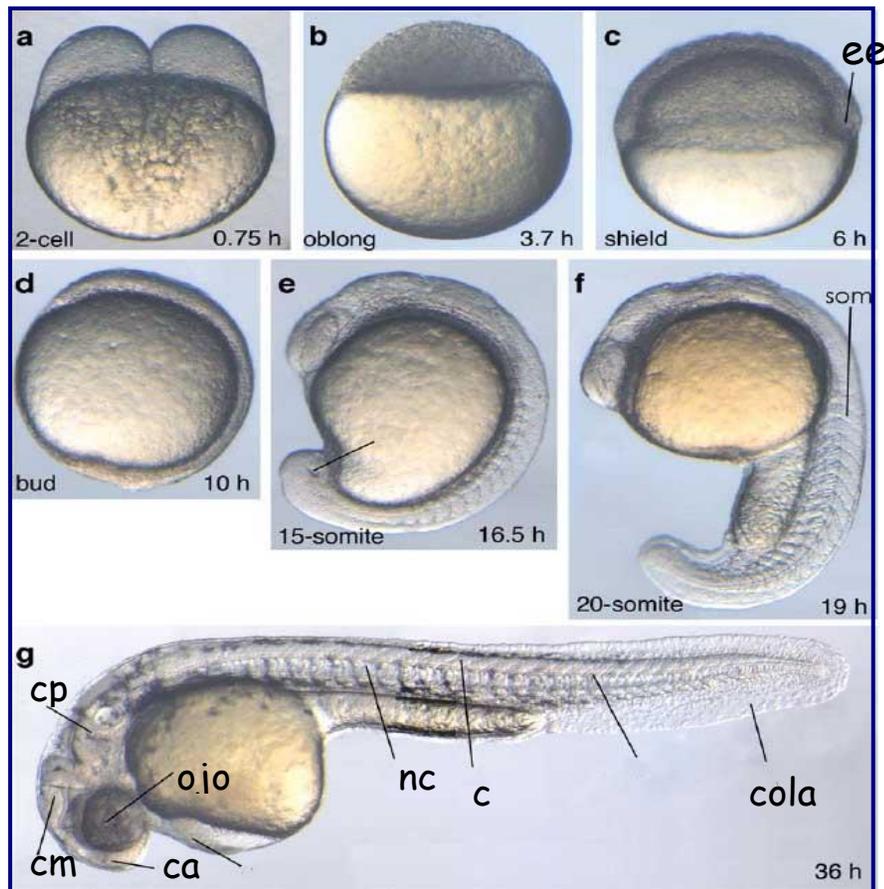


Figura 1 : Estadios del desarrollo en Pez cebra (*Danio rerio*).**

Se presentan las primeras 36 horas del desarrollo. La primera división celular ocurre 45 minutos después de la fertilización y las siguientes divisiones cada 15 minutos. Los distintos estadios de desarrollo son mostrados como horas post fertilización (h). Los embriones están orientados con el polo animal hacia arriba (a-c) y dorsal hacia la derecha (c), anterior hacia arriba y dorsal hacia la derecha (d-f), y anterior hacia la izquierda y dorsal hacia arriba (g). Abreviaciones: **ee**, escudo embrionario; **som**, somito; **ca**, cerebro anterior; **cm**, cerebro medio; **cp** cerebro posterior; **nc**, notocorda; **ce**, cordón espinal.

** Imagen: Zebrafish Information Network (ZFIN), URL: <http://zfin.org>

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).

En este momento, en la blástula, 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 moverán 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 Envoltente 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 eliminado 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 altamente predecibles (Kimmel *et al.*, 1990).

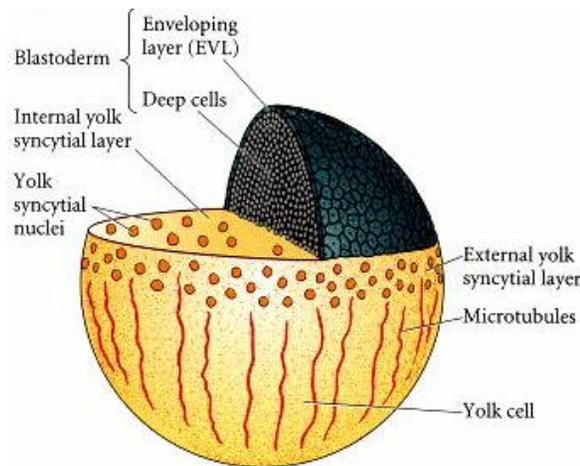


Figura 2^{††}: Estructura de la blástula en el huevo de pez cebra.

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.

Mientras ocurren estos movimientos celulares, en el interior del embrión comienza a tener lugar la gastrulación. El primer movimiento celular que se observa 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). Este movimiento es originado por la expansión autónoma del YSL hacia el polo animal del vitelo, la cual arrastra a la EVL, que está muy unida al YSL, 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).

^{††} Imagen: Department of Biology in the College of Science, University of Utah
URL: www.biology.utah.edu/

2.1.2.1 Formación de las capas germinales.

Luego de que las células han cubierto la mitad del vitelo, se observa el **anillo germinal**, que es un engrosamiento en todo el margen del blastodermo. Este anillo germinal está compuesto por **epiblasto** (capa superficial) e **hipoblasto** (capa interna). Este último está formado por la invaginación de las células superficiales por debajo de su margen de 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). De esta manera, 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 mesodermes 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 formaran la cresta neural. El resto del epiblasto dará origen a la piel del pez (Gilbert, 2000).

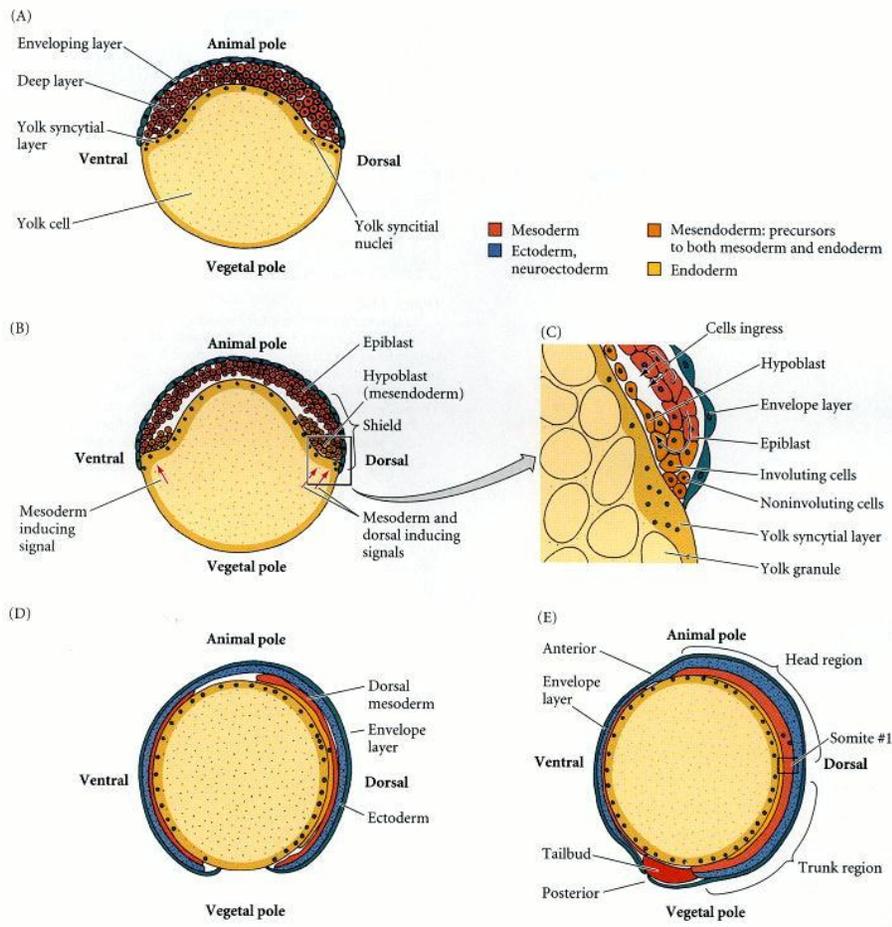


Figura 3^{††}: Movimientos celulares durante la gastrulación del pez cebra.

(A) Blastodermo en estadio de 30% de epibolía (alrededor de 4 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.)

^{††} Imagen: Department of Biology in the College of Science, University of Utah
 URL: www.biology.utah.edu/

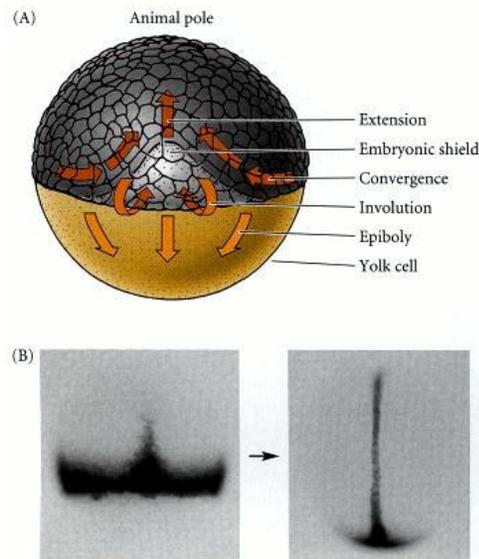


Figura 4: Movimientos de convergencia y extensión durante la gastrulación del pez cebra.

(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 establecimiento del eje dorso-ventral en peces es promovido por el escudo embrionario, el cual induce 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. Al transplantar experimentalmente el escudo de un embrión en el lado ventral de otro se genera un doble eje embrionario, es decir, dos embriones compartiendo el mismo vitelo. 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. 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. (Gilbert, 2000).

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 Chordin (Figura 5). Si el gen Chordin es inhibido, el tubo neural no se forma correctamente, por lo que la proporción entre Chordin y BMP2B especificaría las posiciones a lo largo del eje dorso-ventral. Es, por lo tanto, una gradiente de concentración de BMP2b la que da origen a las regiones laterales y ventrales de ectodermo y mesodermo del pez cebra (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 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 llamado Centro de Nieuwkoop, acumulan β -catenina. Esta proteína es fundamental para que el endodermo induzca a las células que están arriba del Centro de Nieuwkoop a formar 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 β -catenina. Por lo tanto, esta proteína permite distinguir la región dorsal del YSL, de la región lateral y ventral (Gilbert, 2000). La acumulación de β -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(a)). 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

Al inducir experimentalmente un segundo eje dorso-ventral en embriones de pez cebra, ambos ejes, el normal y el inducido, tienen igual polaridad antero posterior, es decir, ambas cabezas están en el antiguo polo animal y ambas colas en el polo vegetal. 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).

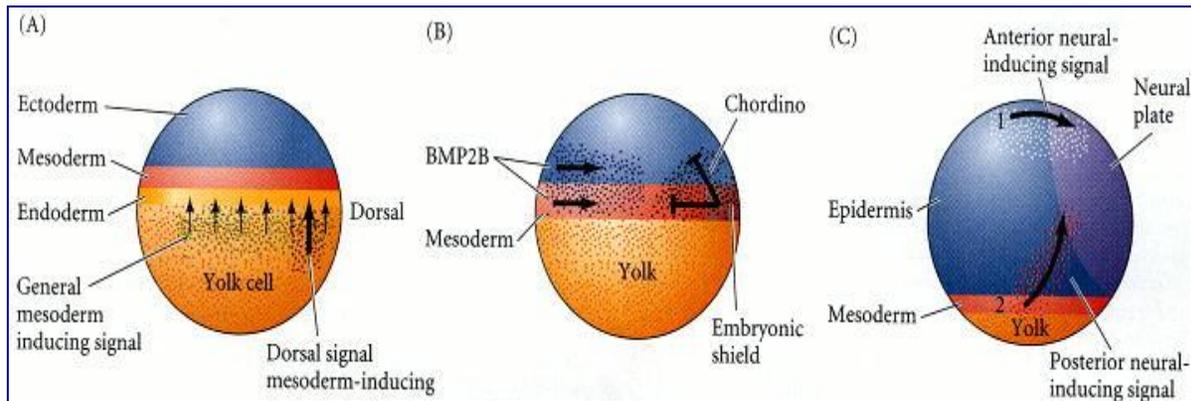


Figura 5^{§§}: Formación de ejes en el embrión de pez cebra.

(A) Previo a la gastrulación el blastodermo se organiza con el ectodermo cercano al 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 Chordin) 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 Segmentación en embriones de pez cebra.

Ya establecidas las tres capas germinales, a partir del mesoderma se origina la notocorda. La interacción entre el ectodermo y la notocorda subyacente dará origen al tubo neural, comenzando así el proceso llamado neurulación. El mesodermo del embrión en estadio de neurulación puede ser dividido en cinco regiones:

La primera región es el cordamesodermo, que dará origen a la notocorda, un órgano trascendente cuya mayor función incluye la inducción del tubo neural y el establecimiento del eje antero-posterior del cuerpo.

^{§§} Imagen: Department of Biology in the College of Science, University of Utah
URL: www.biology.utah.edu/

La segunda región es el mesodermo paraxial o mesodermo somítico dorsal. El término dorsal, se refiere a que los tejidos que se desarrollarán a partir de esta región estarán en el tronco del embrión, a lo largo de la espina. Las células de esta región formarán los somitos, que son bloques de células mesodermales en ambos lados del tubo neural que producirá la mayoría de los tejidos conectivos del tronco (hueso, músculo, cartílago y dermis).

La tercera región el mesodermo intermedio, forma el sistema uro-genital.

Alejado de la notocorda, el plato mesodermal lateral dará origen a corazón, venas y las células sanguíneas del sistema circulatorio. Finalmente el mesénquima de la cabeza formará el tejido conectivo y musculatura de la cara (Gilbert, 2000).

Al término de la epibolía, con la formación del “tailbud”, se forma el primer surco somítico. Este surco marca el límite entre los que serán el primer y segundo somito. Este evento determina el inicio de la etapa de segmentación, que va desde las 10 horas hasta las 24 horas post fecundación, que se caracteriza por la subdivisión de los planos del cuerpo, formando los somitos y la cabeza (Kimmel *et al.*, 1995).

Mediante disección podemos ver otros procesos que ocurren en el embrión en este período, como es la aparición del primordio del ojo y del oído. Además el neuroectodermo se engruesa y al estadio de 18 somitos la segmentación del cerebro es evidente, tanto en una subdivisión amplia como en la apreciación de cerebro anterior (telencéfalo, diencefalo), cerebro medio y cerebro posterior, como en subdivisiones más finas como el de los rombómeros del cerebro posterior (figura 6B). Las células de la notocorda comienzan a expandirse y ordenarse hacia la cola del embrión (Detrich *et al.*, 1999).

En el estadio de los 20 a 25 somitos, el cerebro comienza a ser una estructura ahuecada, con ventrículos presentes por todo su largo. Además se empieza a reconocer el cerebelo rudimentario. Aproximadamente a los 26 somitos, se ve un primordio de cerebelo prominente y uno puede reconocer los rudimentos de la epífisis e hipotálamo en el diencefalo (Kimmel *et al.*, 1995). A partir de las 24 horas post fecundación el embrión posee la estructura de un vertebrado clásico. Éste se ve como una criatura organizada bilateralmente, con una notocorda bien desarrollada y con una batería completa de somitos que se extienden hacia el final de la larga cola, en un número variable de 30 a 34 pares. El sistema nervioso está ahuecado y expandido anteriormente. (Kimmel *et al.*, 1995).

La diferenciación del tubo neural comienza con la dilatación de tres vesículas: Prosencéfalo, Mesencéfalo y Romboencéfalo, que luego al dividirse formarán:

Prosencéfalo: telencéfalo (hemisferios cerebrales) y diencéfalo (epitálamo, tálamo, hipotálamo y retina)

Mesencéfalo (lumen del acueducto cerebral)

Romboencéfalo: metencéfalo (cerebelo y puente) y mielencéfalos (bulbo raquídeo) (figura 6C; figura 7)

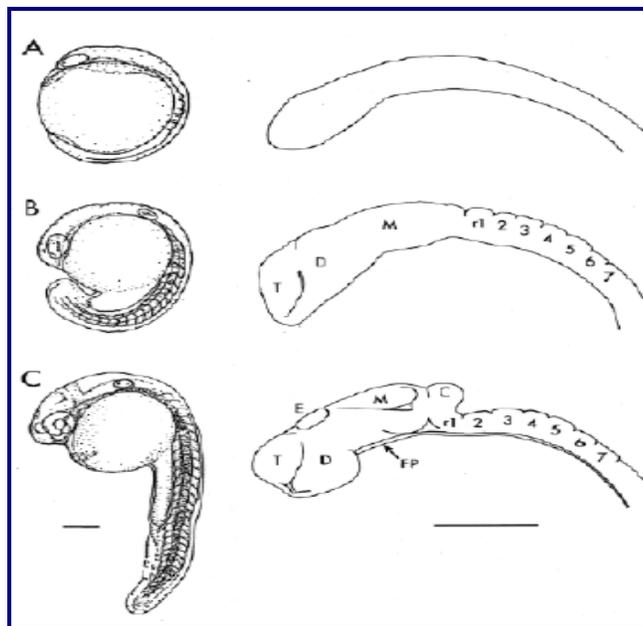


Figura 6^{*} : Cerebro rudimentario durante el período de Segmentación.**

A: No vemos subdivisiones morfológicas en el período de 6 somitos (12h). **B:** Para el estadio de 18 somitos (18h) se han desarrollado 10 neurómeros, el telencéfalo (T), diencéfalo (D), mesencéfalo (M) y alrededor de 7 rombómeros. **C:** A las 24 horas, está presente la epífisis (E) en la línea media del techo del diencéfalo. El cerebelo (C) es evidente en la región de unión del cerebro posterior y medio (Kimmel *et al.*, 1995).

*** Imagen: Zebrafish Information Network (ZFIN), URL: <http://zfin.org>

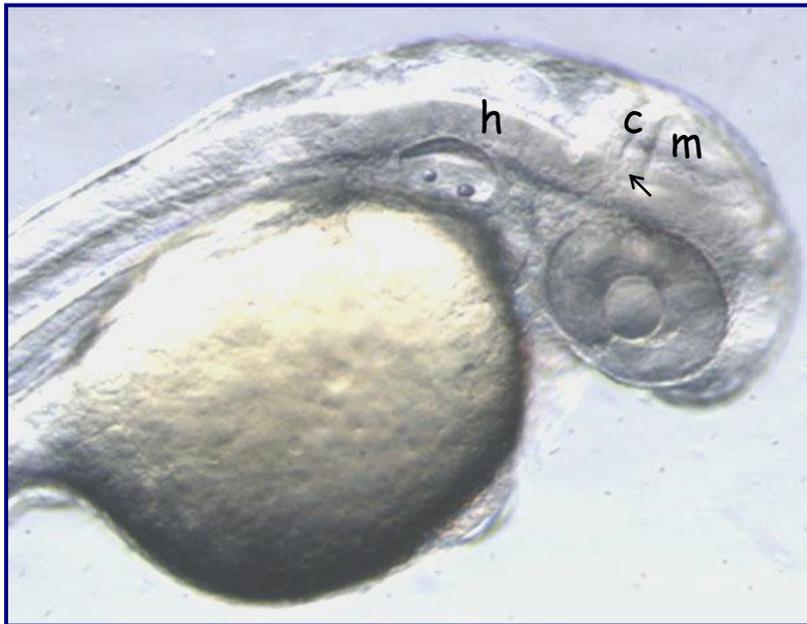


Figura 7: Estructuras neurales predominantes en cabeza a las 29 horas post fecundación. Subdivisión transversal de cerebro en el primordio cerebelar (c), muestra la separación de cerebro medio (m) y posterior (h). En el cerebro medio se puede observar un surco horizontal distintivo (flecha), que separa el tectum óptico (dorsal al surco) del tectum (ventral al surco). Se puede observar muy bien el ojo, con la retina alrededor del lente.

2.3 Familia de genes Wnt en desarrollo

Los genes Wnt codifican para una familia de proteínas que cumplen roles en numerosos procesos del desarrollo temprano, gobernando los destinos celulares en su proliferación, migración, polaridad y muerte. Está descrito que estos genes participan en la formación del eje dorso-ventral, formación del eje antero-posterior en anfibio y pez cebra (Buckles *et al.*, 2004), además de la formación de estructuras más tardías como las extremidades anteriores en ratón y pollo. En adultos los genes Wnts cumplen funciones en homeostasis, y una inapropiada activación de sus vías de señalización estaría implicada en distintos tipos de cáncer. La expresión de estos genes corresponde a moléculas de naturaleza difusible que generan gradientes morfogénicos en su lugar de acción. Interactúan con receptores de membrana, desencadenando respuestas de tipo intracelular a nivel transcripcional.

Las señales mediadas por ligandos Wnts se clasifican en 4 vías intracelulares:

1) La vía canónica emplea β -catenina/tcf como factores de transcripción para activar genes blanco importantes en desarrollo embrionario y tumorigénesis.

2) La vía Jun-quinasa (JNK o planar cell polarity) que controla la reorganización del citoesqueleto.

3) La vía Wnt/ Ca^{2+} controla las proteínas quinasas C (PKC) y Ca^{2+} /calmodulina dependientes (CamKII) y regula la adhesión y motilidad celular.

4) Existe una última, no bien caracterizada, vía que regula el eje de orientación y división celular asimétrica.

2.4 Proteína quinasa *CKI*

La proteína Caseína Quinasa 1 (*CKI*) 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).

Comprende una familia de varias isoformas, las que se encuentran conformadas por un dominio catalítico central conservado, flanqueado en los extremos C- y N-terminal por extensiones de longitud y composición variable. Hasta el momento se han identificado siete genes que dan origen a siete isoformas distintas, *CKI* α , β , γ (1-3), δ y ϵ (Tapia *et al.*, 1994). Las diferentes isoformas de *CKI* 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 *CKI 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 *CKI* 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 *CKI* y sus isoformas han permanecido parcialmente desconocidos.

Se estipulaba inicialmente que la proteína quinasa *CKI* fosforilaba residuos de serina y treonina en secuencias **Sp/Tp-X-X-S/T** donde S y T representan el aminoácido fosforilado por *CKI*, 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 *CKI* (Knippschild *et al.*, 2005). Recientemente se ha visto que secuencias no canónicas pueden ser fosforiladas por *CKI* en algunas proteínas, como β -catenina (Marin *et al.*, 2003).

2.5 Función de *CKI* y *Wnt3a* en el desarrollo embrionario

Las señales de Wnt juegan un importante rol en el desarrollo y oncogénesis y son traducidas a través de al menos dos vías: una canónica dependiente de B-catenina y una cascada independiente de B-catenina. Está descrito en vertebrados e invertebrados la participación de caseínas quinanas en la vía de Wnt canónica, mediante evidencia que relaciona a las isoformas *CKI α* , *CKI δ* , *CKI ϵ* y *CKI γ* con esta vía de Wnt (Sakanaka *et al.*, 2000, Knippschild *et al.*, 2005; Zeng *et al.*, 2005, Schwarz-Romond *et al.*, 2002). 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 *CKI ϵ* , *CKI δ* , y *CKI α* inducen la formación de un doble eje dorsal. Este efecto es sinérgico con la co-expresión de Wnt (McKay *et al.*, 2001(a)). 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 (poliposis adenomatosa coli), Dishevelled (*Dvl*), Axina (o su homólogo conductina), Frat, β -catenina y recientemente algunas isoformas de *CKI* (Hino *et al.*, 2003; Vielhaber y Virshup, 2001).

Wnt regula la estabilidad de β -catenina mediante una cascada de eventos que involucra fosforilaciones mediadas por glicógeno sintetasa quinasa-3 β (GSK-3 β) y algunas isoformas de *CKI* (Figura 8). 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 β -

catenina citoplasmática es desestabilizada por un complejo que contiene Axina, GSK-3 β y APC (Hino *et al.*, 2003). La interacción de GSK-3 β con Axina en el complejo facilita la eficiente fosforilación de β -catenina por GSK-3 β . Esta fosforilación media la degradación de β -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 β de β -catenina. Una vez que la fosforilación de β -catenina es reducida, ésta se disocia del complejo de axina y se estabiliza, acumulándose en el citoplasma (Vielhaber y Virshup, 2001). β -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 β -catenina por GSK-3 β (Kishida *et al.*, 2001). Se ha descrito que *CKI ϵ* (y probablemente *CKI δ*) forma un complejo con *Dvl* y Axina. La interacción de *CKI ϵ* con *Dvl* parece activar cooperativamente la formación del complejo β -catenina/Lef (Kishida *et al.*, 2001; Hino *et al.*, 2003). Estos resultados indican que estas isoformas de *CKI* regulan esta vía en forma positiva. Sin embargo la función de las isoformas de *CKI* en la vía de Wnt ha resultado controvertida, ya que también se ha reportado que *CKI α* y *CKI ϵ* desactivan esta vía mediante la directa fosforilación de β -catenina en un sitio no canónico (ser45). Esta fosforilación crearía un sitio de consenso para el reconocimiento y fosforilación de β -catenina por GSK-3 β , lo que llevaría finalmente a su degradación con la consiguiente desactivación de la vía (Marin *et al.*, 2003; Knippschild *et al.*, 2005).

La evidencia presentada con anterioridad indica claramente que algunas de las isoformas de la proteína quinasa *CKI* están involucradas en procesos relacionados con el desarrollo embrionario. Los procesos descritos en la literatura le asignan un papel importante a algunas isoformas de *CKI*, manteniendo relativamente oscura la función de otras isoformas, desconociendo su participación en la regulación de vías como Wnt o *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*).

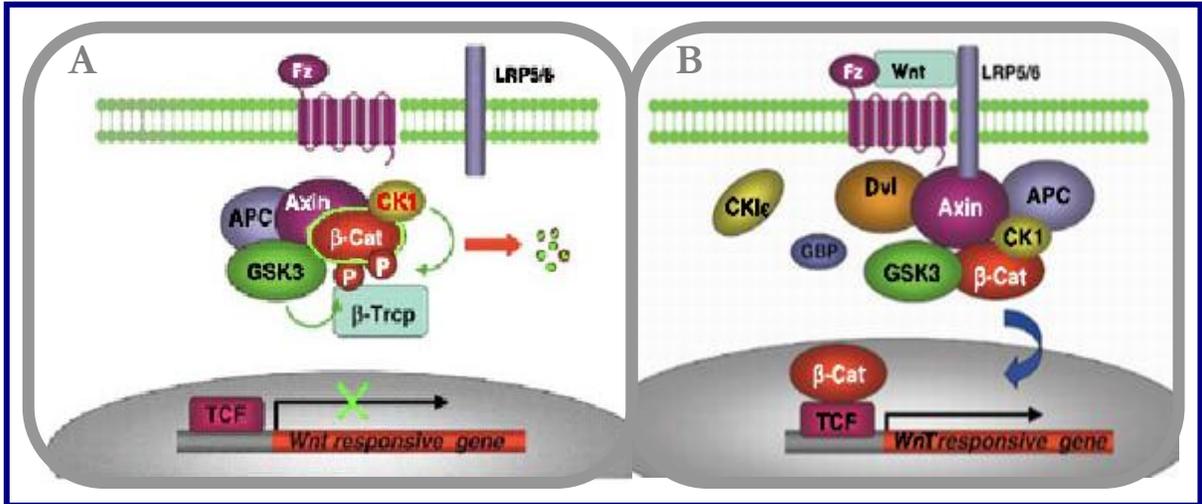


Figura 8: Funciones positivas y negativas de CK1 en la vía de señalización Wnt.

A: En ausencia de señalización Wnt, CK1 y GSK3 β 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.

B: Las proteínas Wnt secretadas inician la cascada de señalización mediante la unión a los receptores de membrana *Frizzled/LRP*. Después de la activación del receptor, un mecanismo desconocido conduce a la fosforilación de *dishevelled*. La asociación de esta proteína fosforilada con *axina* y *CK1* previene la fosforilación de importantes sustratos de *GSK-3 β* . *APC* y *axina* actúan como proteínas de andamiaje, reclutando a β -catenina, *GSK-3 β* , *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.

En esta Memoria de Título se pretende determinar el patrón de expresión del RNA mensajero de *CK1 γ 2* y *Wnt3a* y dilucidar en parte el papel de estas proteínas en el desarrollo embrionario de los vertebrados utilizando como modelo el pez cebra.

3. HIPÓTESIS

Los genes codificantes para *CK1γ2* y *Wnt3a* están involucrados en diferentes etapas del desarrollo embrionario del pez cebra y colaboran entre sí en diferentes procesos durante el desarrollo.

4. OBJETIVO GENERAL

Realizar un análisis de la expresión y función de *CK1γ2* y *Wnt3a* en el desarrollo embrionario del pez cebra.

5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Conocer el patrón de expresión a nivel de mRNA de *CK1γ2* y *Wnt3a* mediante RT-PCR e hibridación *in situ* en embriones completos de pez cebra
- 2.- Conocer la funcionalidad de *Wnt3a* a nivel de proteína mediante ensayos de bloqueo de función.
- 3.- Determinar el efecto de la sobre expresión de *CK1γ2* y *Wnt3a* a través de la microinyección de cantidades conocidas de los mRNA codificantes para ambos genes en embriones de pez cebra.
- 4.- Analizar el efecto de la inyección de mRNA codificante para *CK1γ2* y *Wnt3a*, mediante marcadores genéticos en el desarrollo embrionario temprano del pez cebra.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

Este estudio fue realizado 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 de los años 2005 y 2006.

6.1 Animales de experimentación

Como modelo animal se utilizaron ejemplares de pez cebra (*Danio rerio*) disponibles para su uso en acuarios manejados por el laboratorio. Los embriones utilizados para cumplir con los objetivos de este estudio se obtuvieron cruzando una hembra y un macho en tanques de 2 litros, por 10 a 15 min. Una vez fecundados los huevos, se incubaron a 28°C hasta obtener el estadio requerido.

6.2 Materiales

La región codificante de las isoformas *CKIγ2* y *Wnt3a*, clonadas previamente en el laboratorio, necesarias para generar el mRNA utilizado en la microinyección de los embriones fueron subclonadas en el plasmidio PCS2.

Los Morfolinos Oligonucleótidos, para bloquear la función de *Wnt3a*, y el control fueron diseñados y obtenidos de Gene Tools LLC (Eugene, Oregon). La secuencia del Morfolino Oligo anti *Wnt3a* es 5'-tccaaccaggtacaaatccatgagg-3'; la del Morfolino Control es la siguiente: 5'-tcgaacgaggtagaaatgcatgacg-3'. Estos fueron solubilizados en 1x de solución de Danieau para su posterior inyección en embriones en estadio de una célula.

6.2.1 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 (3 h.p.f., 4 h.p.f., 60% epibolía, 90% epibolía, 12 h.p.f., 24 h.p.f., 48 h.p.f., 72 h.p.f. y 6 días post fecundación) en 1ml de reactivo TRIZOL[®] (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 µl de H₂O DEPC. El RNA fue cuantificado por absorbancia a 260/280 nm y mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5%

6.2.2 Transcripción Reversa Acoplada a PCR (RT-PCR)

El cDNA codificante para *CK1γ2* y *Wnt3a*, 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[®] utilizando oligo dT como partidor. La mezcla de reacción contenía 50mM Tris-HCl pH 8,3, 75 mM KCl, 3mM MgCl₂, 10 mM DTT, 0,5 mM de cada dNTP, 25 µg/ml oligo(dT), 1 µg RNA total obtenido en el paso anterior y 10 U/ml de Transcriptasa Reversa Superscript[®]. 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 ambos genes, en los distintos estadios embrionarios seleccionados, se amplificó 1 µl de cDNA de la mezcla anterior con DNA Polimerasa Taq y en presencia de dos partidores específicos para *CK1γ2* y *Wnt3a*, en un volumen total de 10µl, que permitieron amplificar un fragmento del

tamaño adecuado para cada proteína, los que se analizaron mediante geles de agarosa al 1%. Como control de expresión se utilizaron partidores de β -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.

6.2.3 Síntesis de RNA mensajero para microinyección

Para la síntesis de mRNA para microinyección se realizó una transcripción *in vitro*, como está descrito en Detrich *et al.*, 1999. Para la síntesis de cada uno de los mRNAs utilizados en la microinyección, se digirieron 20 μ g de cada clon de la región codificante de las isoformas *CK1 γ 2* y *Wnt3a* 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 μ l de H₂O DEPC. Las sondas de RNA de cada isoforma fueron obtenidas mediante transcripción *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 μ g de cada DNA linearizado, 8 mM MgCl₂, 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 μ l de H₂O 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 μ l de 100mM GTP, para posteriormente continuar la polimerización a 37°C durante 2 horas. Después de esto, se adicionó 5 μ l 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 μ l H₂O DEPC. Los productos de la transcripción fueron posteriormente precipitados agregando 40 μ l de acetato de amonio y 1 ml de etanol al 100% a -20°C durante toda la noche. Los RNAs precipitados fueron posteriormente centrifugados a 12000 rpm a 4°C en microfuga Eppendorf. Los sedimentos fueron lavados con

etanol al 80%, luego de lo cual fueron nuevamente centrifugados y finalmente resuspendidos en 50 μ l H₂O DEPC. Las cantidades de RNA fueron estimadas por electroforesis en geles de agarosa al 1,5% y cuantificados por densidad óptica a 260/280 nm. Finalmente, se realizaron diluciones de los mRNA purificados en H₂O DEPC con Rojo Fenol para su posterior utilización en la microinyección de embriones en estadio de una célula.

6.2.4 Síntesis de Sondas para hibridación *in situ*

Las regiones 3' no codificantes de los genes de *CKI γ 2* y *Wnt3a* necesarias para la obtención de las sondas antisentido utilizadas en la hibridación *in situ*, fueron subclonadas en el plasmidio Bluescript KS+.

Para la síntesis de las sondas antisentido se digirieron 10 μ g de cada clon de las regiones 3' no codificantes de *CKI γ 2* y *Wnt3a* en el plasmidio Bluescript con la endonucleasa de restricción Not I y Sal I, respectivamente, 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 μ l de H₂O 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 μ g 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 μ l de H₂O DEPC. La polimerización se llevó a cabo durante 2 horas a 37°C, luego de lo cual se adicionó 5 μ l 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 μ l H₂O DEPC cada uno. Los productos de la transcripción fueron posteriormente precipitados agregando 40 μ l 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 H₂O 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 (*CK1γ2* y *Wnt3a*) en Solución de Hibridación para su posterior utilización.

6.3 Métodos

6.3.1 Hibridación *in situ* en embriones totales.

La hibridación *in situ*, requerida para cumplir con el objetivo específico número 1, se realizó como está descrito en Detrich *et al.*, 1999. Los embriones se fijaron en 4% de paraformaldehído (PFA) en tampón fosfato salino (PBS) a 4°C toda la noche. Posteriormente se les removió su membrana coriónica con pinzas 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 rehidratados gradualmente 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 los embriones con estadios iguales o superiores a 24 hrs. fueron digeridos con proteinasa K 10 µg/ml, durante distintos lapsos de tiempo (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 *CK1γ2* y *Wnt3a* marcadas con digoxigenina-11-UTP (digoxigenin-11-UTP Roche ®) 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 MgCl₂, 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 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 la lupa.

6.3.2 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 1 y 3nl por embrión, donde el tamaño de la gota no excedió un décimo 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). Los embriones inyectados, fueron incubados a 28°C y observados al microscopio para determinar las alteraciones en el desarrollo embrionario.

7. RESULTADOS

7.1 Determinación de niveles relativos de expresión de RNA mensajero de *CKI γ -2* mediante RT-PCR

Se determinó el patrón de expresión del RNA mensajero de *CKI γ 2* y *Wnt3a*, mediante la técnica de RT-PCR. Para este objetivo se preparó RNA total de embriones, como se describe en Materiales y Métodos. Para la síntesis del cDNA se utilizó Oligo dT como partidor para la transcripción inversa y partidores específicos de *CKI γ 2* y *Wnt3a* en el PCR de amplificación.

Como se observa en la figura 9 el mRNA de *Wnt3a* se detecta desde las 12 h.p.f. hasta los 6 días post fecundación. A las 48 h.p.f se observa una fuerte intensificación en la expresión del gen, decayendo en los estadios siguientes del desarrollo. Estos resultados nos indican que *Wnt3a* presenta una expresión cigótica, relativamente tardía y no presenta ningún componente materno en su expresión.

Por otro lado, se observa una expresión continua de *CKI γ 2* a nivel de mRNA durante todos los estadios del desarrollo estudiados (Fig. 9). A diferencia de *Wnt3a*, *CKI γ 2* muestra un componente de expresión materna y cigótica. Este último se mantiene hasta el día 6 post fecundación. La expresión cigótica de genes en pez cebra empieza alrededor de las 3 h.p.f (transición de blástula media). Toda expresión detectada antes e incluso pasado este tiempo es maternal.

Como control de expresión, se utilizaron partidores que amplifican β -actina, que se expresa en forma constitutiva y constante desde los primeros estadios del desarrollo embrionario.

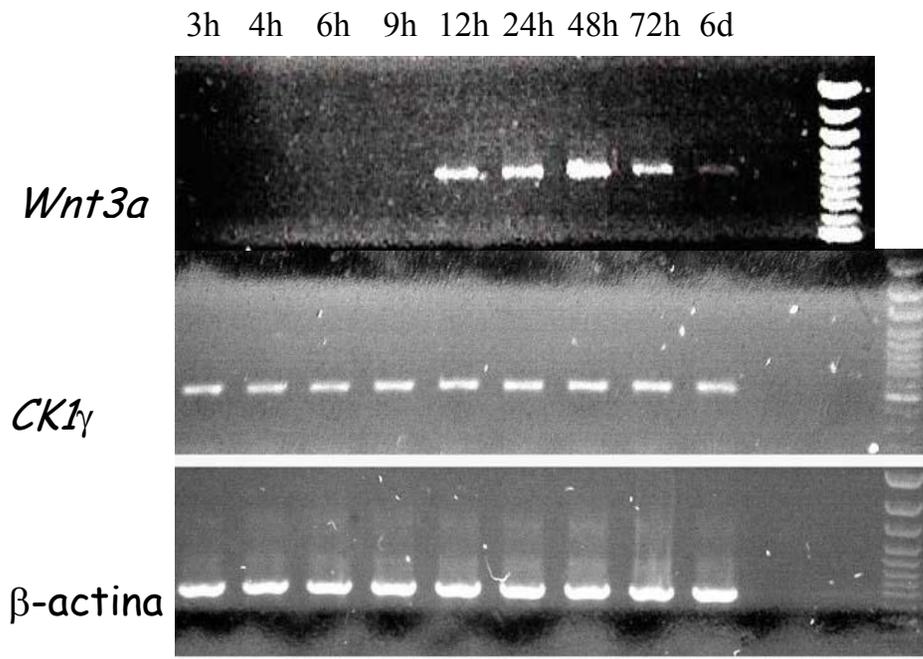


Figura 9: Amplificación del mRNA de *Wnt3a*, *CK1 γ* y del control de β -actina mediante RT-PCR de embriones de pez cebra.

Se muestra la expresión de *Wnt3a*, *CK1 γ* y del control de β -actina en diferentes etapas del desarrollo embrionario: 3h (3 h.p.f), 4h (4 h.p.f), 6h (60% epibolía), 9h (90% epibolía), 12h (12 h.p.f), 24h. (24 h.p.f), 48h (2 días post fecundación), 72h (3 días post fecundación) y 6d (6 días post fecundación).

7.2 Hibridación *in situ* sobre embriones de pez cebra

Para estudiar la localización del mRNA codificante para *CK1 γ* y *Wnt3a* durante el desarrollo embrionario del pez cebra, se realizaron experimentos de hibridación *in situ*, como está descrito en Materiales y Métodos. Los embriones completos fueron fijados en diferentes estadios de desarrollo y posteriormente hibridados contra sondas de RNA antisentido transcrita *in vitro* y marcadas con digoxigenina-11-UTP. La sonda antisentido puede hibridar específicamente con el mRNA de los genes en estudio localizados en los embriones de pez cebra. La digoxigenina es posteriormente detectada con un anticuerpo específico conjugado con fosfatasa alcalina. Esta enzima cataliza la hidrólisis de un sustrato incoloro que al ser convertido a producto genera un color azul intenso. La zona coloreada indica entonces donde se encuentra localizado en el embrión el mRNA mensajero. Las sondas antisentido fueron derivadas de las secuencias correspondientes a las regiones 3' no codificante (3' UTR) de los mRNA de los dos genes en estudio.

En la figura 10 se muestra la expresión del mRNA de *Wnt3a*. Se observa la expresión de este gen a partir de las 17 horas, la cual es ubicua en el embrión, restringiéndose posteriormente hacia la zona anterior (Fig.10 E). A las 48 h.p.f. su expresión queda limitada a la región cefálica y al primordio de las aletas pectorales. No existe un componente materno en la expresión de este gen, lo que se evidencia al no encontrar expresión en los estadios más tempranos (Fig.10A, B, C Y D) lo que es corroborado con el RT-PCR, en el que tampoco encontramos expresión en estadios más tempranos.

Con respecto al patrón de expresión de *CKI γ 2* se confirma la expresión materna y cigótica descrita anteriormente, ya que encontramos una marcada expresión en todas las células del embrión en estadios de 3, 5, 6 y 10 horas post fecundación (h.p.f.) (Fig. 11 A, A'; B, B'; C, C' y D respectivamente). La expresión continúa siendo ubicua a las 17 h.p.f. y 24 h.p.f. (Fig. 11 E) A las 48 h.p.f. encontramos una expresión mas restringida, del mRNA de *CKI γ 2*. Ésta se localiza hacia la zona anterior del embrión, observándose una expresión limitada a la región cefálica y al primordio de las aletas pectorales (Fig.11 G y G'). Estos datos corroboran los encontrados mediante RT-PCR y coinciden en que el mRNA de *CKI γ 2* se encuentra presente desde antes del período de la blástula media y se continúa expresando durante todo el desarrollo embrionario temprano y posterior organogénesis.

Los resultados de expresión mostrados para ambos genes sugieren que en la expresión del mensajero de *Wnt3a*, a diferencia de *CKI γ 2*, no existe un componente materno que esté actuando en los estadios más tempranos del desarrollo del pez, y que el mRNA es de origen exclusivamente cigótico. Además existe una superposición en la expresión de ambos genes a las 48 h.p.f. la que se restringe hacia la zona cefálica y primordio de aletas pectorales.

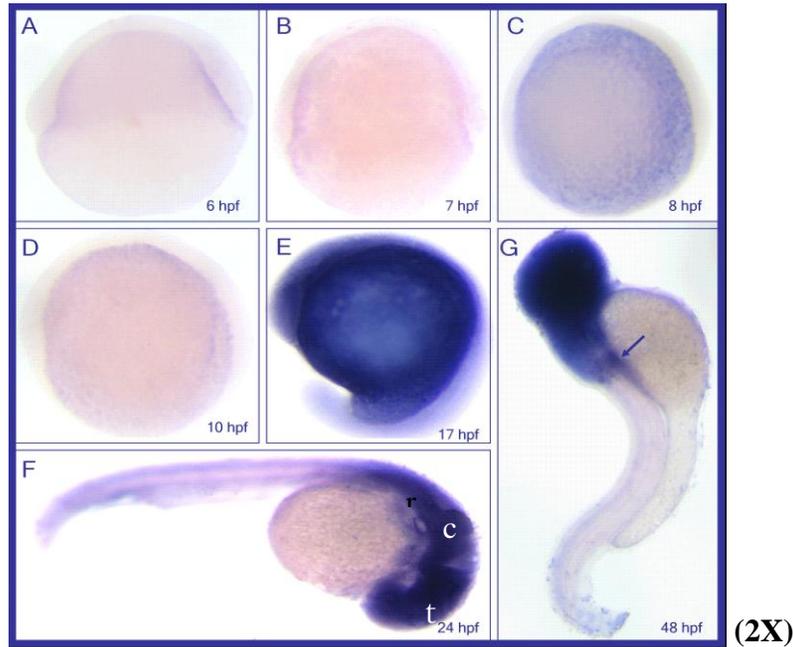


Figura 10: Patrón de expresión de *Wnt3a*

No existe expresión del mRNA de *Wnt3a* en estadios tempranos (A, B, C y D) Visualizando una expresión débil y ubicua desde las 17 h.p.f. (E) que luego se restringe al cerebro (F) en rombómeros (r), cerebelo (c) y tegmentum (t) y primordio de las aletas pectorales (G flecha).

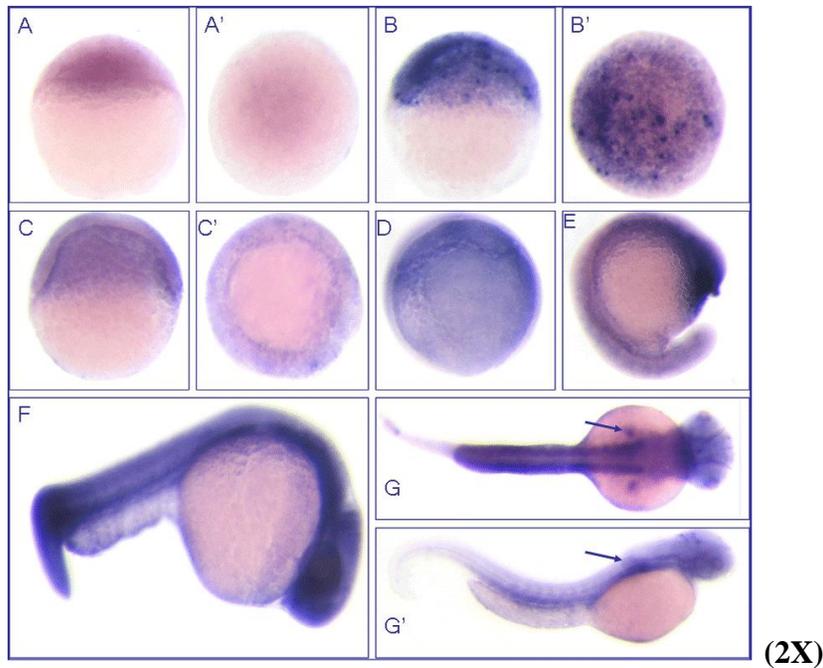


Figura 11: Patrón de expresión de *CK1γ2*

La expresión es ubicua en embriones de 3, 5 y 6 horas post fecundación (h.p.f.) (A y A', B y B', C y C' respectivamente), al igual que a las 10 h.p.f. Esto se mantiene a las 17 y 24 h.p.f. (E). Se observa la expresión a las 48 h.p.f. (G y G') más concentrada en la zona anterior y región cefálica, y en el primordio de las aletas pectorales (flecha)
 Vista lateral (A, B, C, D, E, F y G'), desde el polo animal (A', B', C') y vista dorsal (G)

7.3 Análisis de Función de *Wnt3a* y *CKIγ2* mediante la inyección de cantidades conocidas del RNA mensajero de estas isoformas

Para determinar parte de la función de ambos genes en el desarrollo embrionario del pez cebra, se procedió a inyectar diferentes concentraciones del mRNA codificante para *Wnt3a* y *CKIγ2*, sintetizado *in vitro* en presencia de CAP (7mG) para aumentar su estabilidad dentro del embrión incrementando su eficiente traducción a proteína.

Los embriones fueron inyectados con un volumen de gota que varió entre 1 y 5nl, en estadio de una célula, en el polo animal del embrión, específicamente en la célula.

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 7 días post fecundación.

Los resultados de estos experimentos son analizados en detalle a continuación.

7.3.1 Inyección de mRNA control y embriones sin inyectar.

Como control 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 anormalidades presentes en embriones defectuosos o enfermos.

Una de las condiciones se llevó a cabo inyectando de 100 a 350 µg de un RNA mensajero control, el cual codifica para una proteína verde fluorescente (Green Fluorescent Protein (GFP)) que al expresarse en todas sus células, le da una coloración verde al embrión al ser observado bajo una lupa con sistema de fluorescencia. Además, el GFP expresado en las cantidades descritas con anterioridad es inocuo para el embrión en desarrollo. En esta condición, de un 100% de embriones inyectados, se observó una sobrevivencia promedio superior al 90%, a las 24 h.p.f., por experimento.

De los embriones sobrevivientes a las 24 h.p.f, un 100% no presentó anormalidades aparentes al examen morfológico bajo la lupa.

En la otra condición control se dejaron embriones sin inyectar, por cada experimento, en los que se observó una sobrevivencia de un 90 a 98% a las 24 h.p.f. De los embriones sobrevivientes a las 24 h.p.f, un 100% no presentó anomalías aparentes al examen morfológico bajo la lupa.

Todos los embriones control fueron mantenidos bajo las mismas condiciones experimentales que los embriones inyectados: fueron incubados a 28°C, se eliminaron los embriones muertos y no fecundados, el medio de cultivo fue renovado diariamente y su desarrollo fue observado bajo la lupa.

7.3.2 Inyección de mRNA codificante para la isoforma *Wnt3a*

Se inyectó el mRNA codificante para la isoforma *Wnt3a*, con la finalidad de analizar el efecto de una expresión superior al nivel normal de esta proteína en el desarrollo embrionario del pez cebra.

En este experimento se utilizaron aproximadamente 650 embriones. Éstos fueron inyectados en estadio de una célula (descrito en Materiales y Métodos) con concentraciones que oscilaron entre 60 y 180 µg del mRNA codificante para *Wnt3a*. Al inyectar el mRNA de este gen, se observó una sobrevivencia promedio de un 90% a las 24 h.p.f., por experimento (eliminando los no fecundados y/o muertos en estadios tempranos). La sobre expresión de *wnt3a* produjo los fenotipos detallados en la figura 12, en la que observamos distintas alteraciones relacionadas con la formación de los ojos, pigmentación, hipertrofia mandibular, alteración y/o disminución del eje antero-posterior y menor desarrollo del cerebro anterior. Estos efectos fenotípicos observados, los cuales son dependientes de la dosis de inyección, son graficados en la figura 13.

De los embriones sobrevivientes a las 24 h.p.f, un porcentaje que varió con la dosis de inyección (40% a 85%), presentó un fenotipo anómalo en comparación a los controles sin inyectar o a los inyectados con un mRNA inocuo (Figura 14).

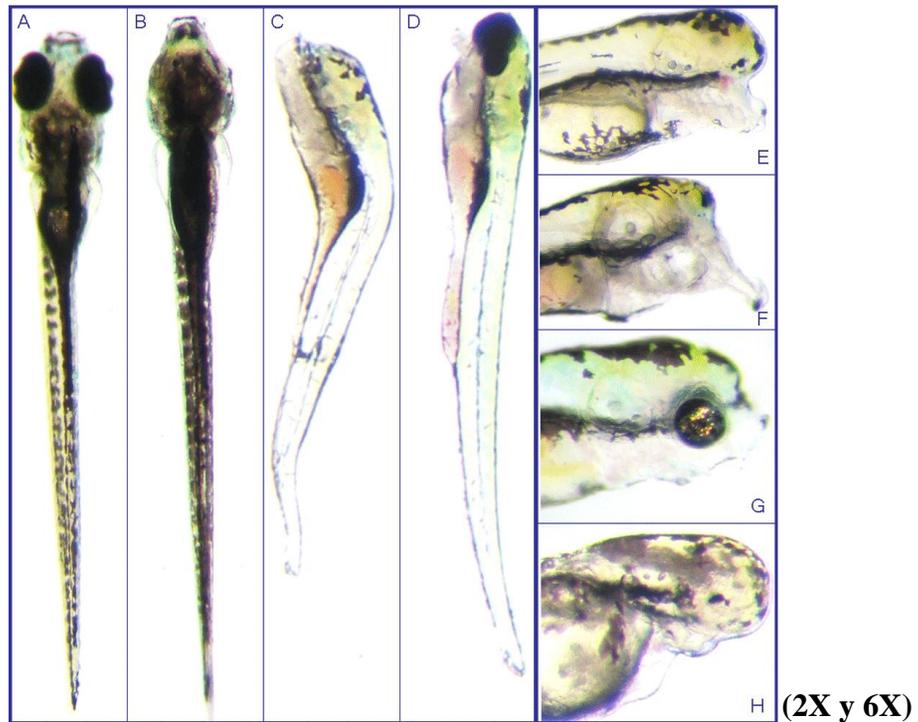
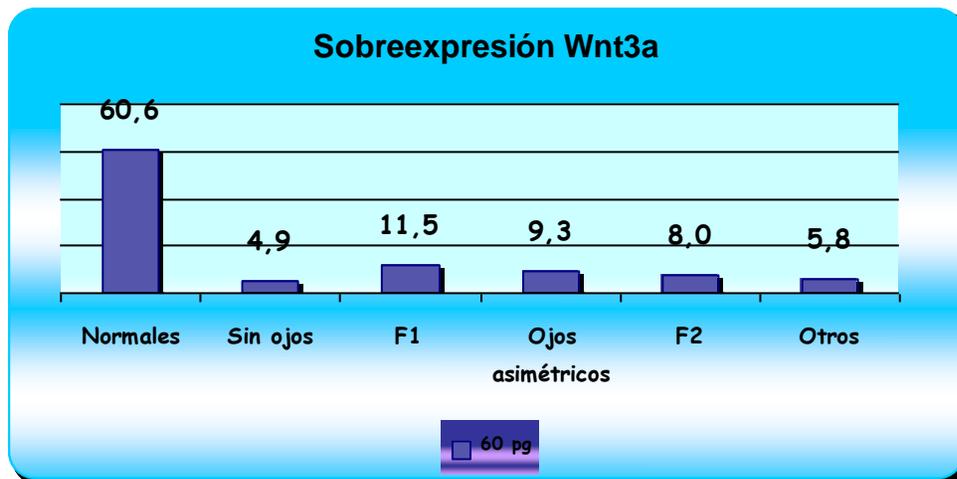


Figura 12: Fenotipos obtenidos al sobre-expresar *Wnt3a*

Los fenotipos obtenidos al inyectar el mRNA de *Wnt3a* presentan alteraciones como ciclopía (D), asimetría en tamaño de ojos (G) e incluso ausencia de estos (B, E, F y H). Presentan además distintos grados de hipertrofia mandibular y/o disminución del cerebro anterior (D, E, F y G), acortamiento y alteración del eje Antero-posterior (C) y distintos grados de despigmentación (C, D, E, F y G). Embrión normal (A) inyectado con el mRNA control (GFP). Vista dorsal de embriones (A y B). Vista lateral (C, D, E, F, G y H)

A



B

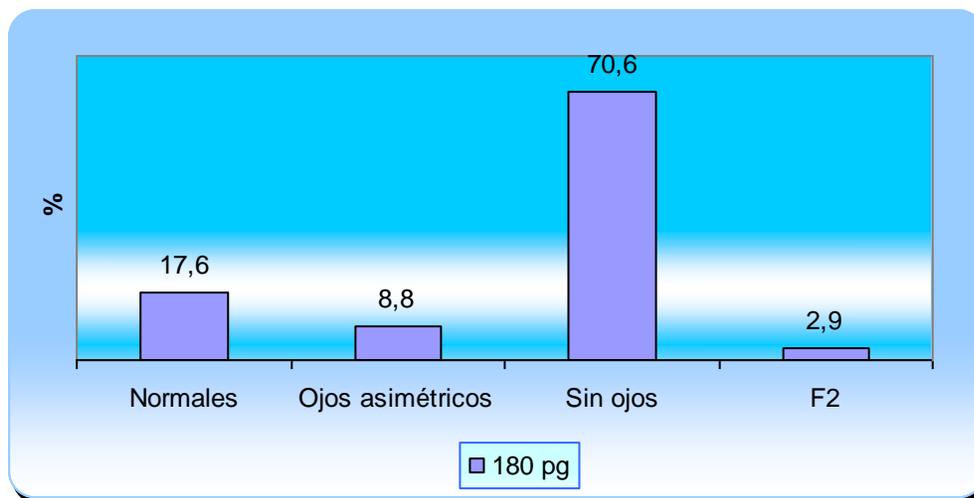


Figura 13: Porcentajes obtenidos de los fenotipos observados al inyectar 80pg (A) y 180pg (B) de mRNA de Wnt3a.

A: Los fenotipos que sólo presentaban alteraciones oculares fueron los más numerosos con un 14,2%. El fenotipo 1 (F1) es el que presenta hipertrofia mandibular y/o disminución del cerebro anterior, despigmentación y ausencia de ojos (Fig. 3C, E y F) y representa el 11,5% de los embriones analizados. El fenotipo 2 (F2) es el que presenta acortamiento y alteración del eje Antero-posterior y leve alteración ocular. Los embriones que presentaban leves alteraciones (oculares, despigmentación, eje A-P) fueron agrupados como “Otros” y representan un 5,8%

B: El fenotipo observado en mayor porcentaje fue el de embriones sin ojos, sobrepasando el 70%; los embriones normales alcanzan un 17,6% y otras alteraciones (ojos asimétricos y alteración ocular con acortamiento y alteración del eje A-P (F2)) representan el 11,7%

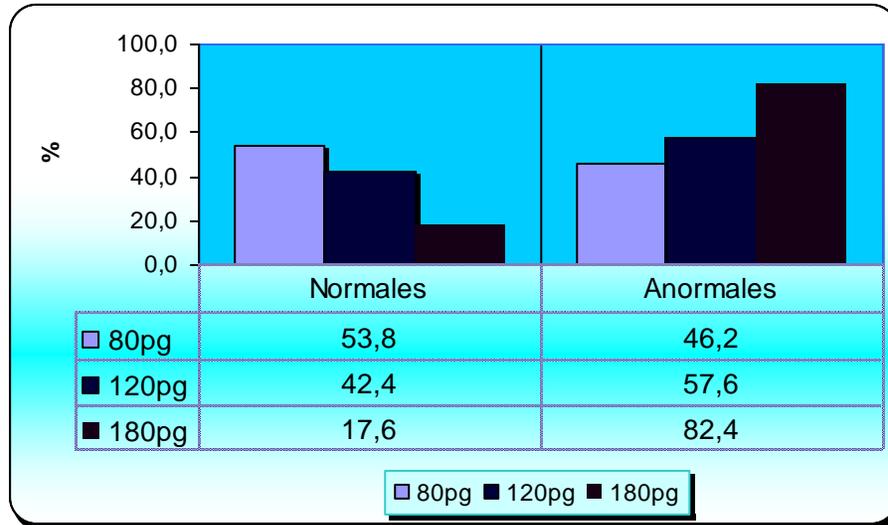


Figura 14: Porcentajes de embriones Normales y Anormales obtenidos al inyectar concentraciones crecientes de mRNA de *Wnt3a*.

En este gráfico se muestra el efecto dosis dependiente que se obtiene al inyectar el mRNA de *Wnt3a*, ya que al aumentar la dosis en un 100% y 200% los porcentajes de anormalidad en los fenotipos obtenidos aumenta en, aproximadamente, en 10 y 25 puntos porcentuales, respectivamente.

7.3.3 Inyección de mRNA para la isoforma *CKIγ2*.

Se inyectó el mRNA codificante para la isoforma *CKIγ2* en aproximadamente 350 embriones de pez cebra de una sola célula, directamente en la célula, para analizar el efecto de una expresión superior al nivel normal del gen en el desarrollo embrionario del pez. Las cantidades de mRNA de *CKIγ2* inyectados oscilaron entre 80 y 200 μ g (figura 15).

Como resultado de estos experimentos, se observó una alta tasa de mortalidad (en relación directamente proporcional a la dosis (figura 16). La sobrevivencia promedio medida a las 24 h.p.f. fue de un 60% con 80 μ g del mRNA inyectado y de 30% con 200 μ g del mRNA inyectado (eliminando los no fecundados y/o muertos en estadios tempranos). De los embriones sobrevivientes a las 24 h.p.f, inyectados con 80 y 200pg del mRNA, un 79% y 82% respectivamente, presentó un fenotipo anómalo en comparación a los controles sin inyectar o a los inyectados con un mRNA inocuo (GFP), los cuales no presentaron alteraciones. La principal anomalía encontrada está relacionada con la aparición de un fenotipo descrito en la literatura como **dorsalizante** del embrión, el cual presenta reducción de los tipos celulares ventrales de

origen blastodermico, y una expansión de los tejidos derivados dorsalmente (somitos anteriores y notocorda) (Mullins *et al.*, 1996). Este fenotipo se caracteriza por el aumento de las estructuras dorsales en desmedro de las ventrales, con la aparición de un embrión acortado y alteraciones en la formación del eje anteroposterior. Además los embriones presentaron alteraciones oculares.

En los experimentos realizados caracterizamos tres tipos de fenotipos dorsalizantes: de los embriones inyectados con 200 μ g del mRNA, un 50% presentó un alto grado de dorsalización, al que llamamos fenotipo F1 (Figura 17, B3). Aproximadamente un 22% presentó un tipo de dorsalización más débil, con alteraciones en el eje antero-posterior y anomalía de ojos y/o cola (fenotipo F3, Fig. 18C). Un 12% de los embriones presentó un fenotipo dorsalizado más leve que el observado en F1, pero más fuerte que el observado en F3, denominado F2 (Figura 17, B1). Finalmente, un 20% de los embriones contabilizados a las 24 h.p.f. se observaron aparentemente normales al examen morfológico bajo la lupa.

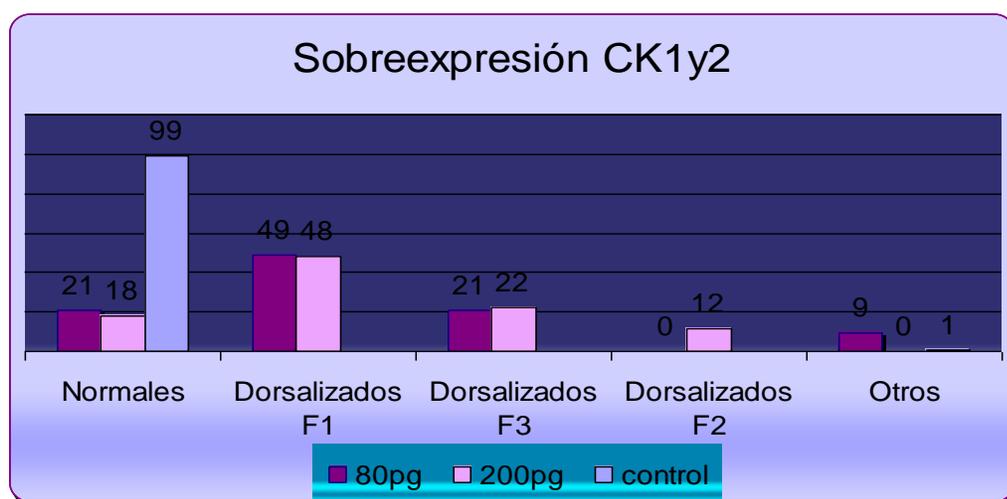


Figura 15: Gráfico del resultado de la inyección del mRNA de CK1y2

Se muestra el porcentaje de los fenotipos obtenidos con dos concentraciones distintas de inyección. En todas las condiciones se tomo como 100% al total de los embriones contabilizados a las 24 h.p.f. y corroborados a 48 y 72 h.p.f.

Dorsalizados F1: Embriones con alto grado de dorsalización y alteraciones oculares (Fig. 18, B3)

Dorsalizados F2: Embriones con dorsalización leve más alteración de cola (Fig. 18, B1)

Dorsalizados F3: Alteraciones de: eje antero-posterior, cola y ojos (Fig. 18C)

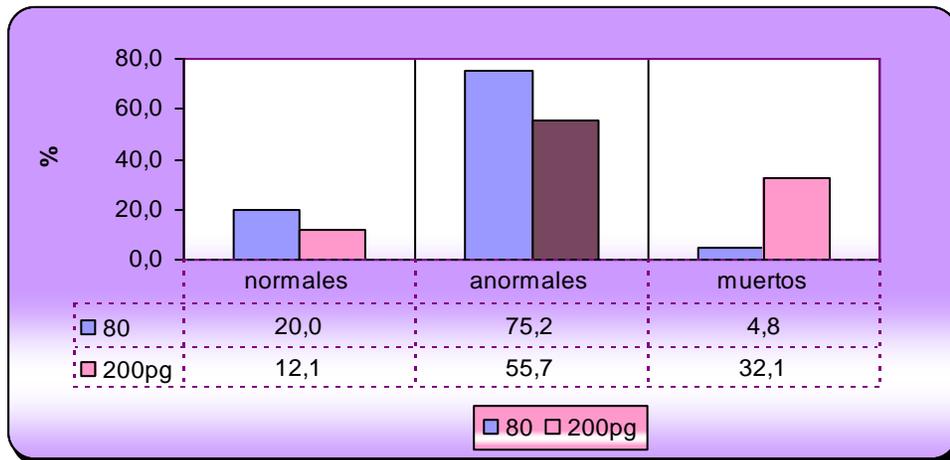


Figura 16: Gráfico del resultado de la inyección del mRNA de *CK1γ2*

Acá se evidencia que al aumentar en más del doble la dosis de inyección, el porcentaje de embriones fenotípicamente alterados no aumenta considerablemente, sin embargo la mortalidad aumenta de forma importante.

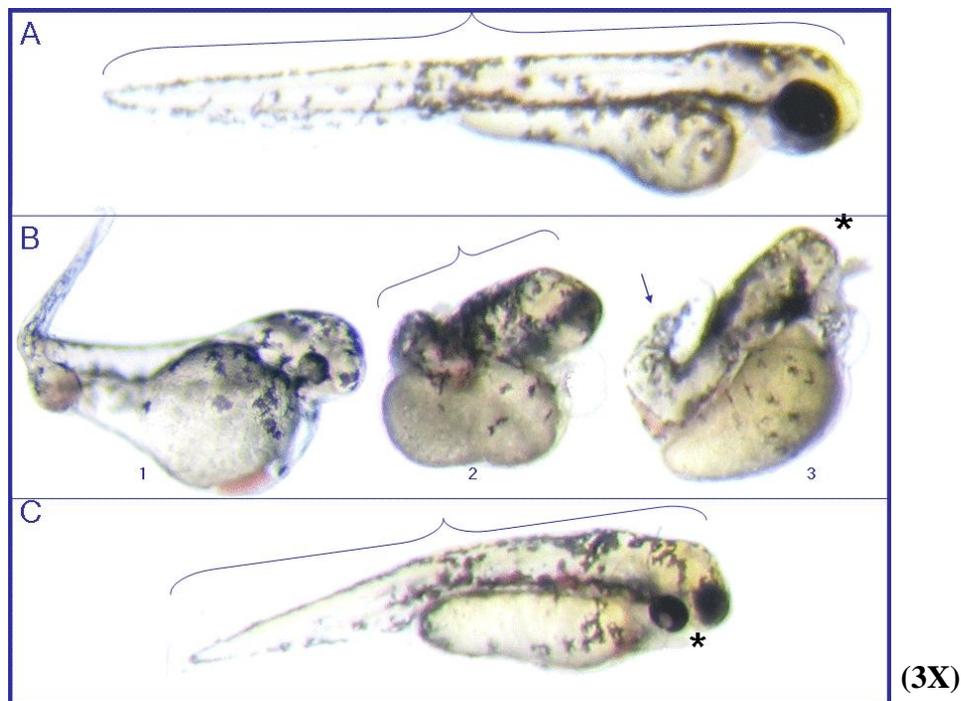


Figura 17: Fenotipos obtenidos al sobre-expresar *CK1γ2*

Vista lateral y en la misma escala de embriones de 48 h.p.f. (A, B y C)

A: Embrión normal inyectado con el mRNA control (GFP), la llave indica el correcto desarrollo del eje Antero-posterior (A-P).

El fenotipo obtenido al inyectar desde 70 hasta 200pg del mRNA de *CK1γ2*, corresponde en su mayoría a distintos grados de dorsalización existiendo: acortamiento del eje A-P (llave) (B y C), curvatura y malformación de las colas (flecha) (B). Existen además alteraciones oculares como ciclopía, asimetría en tamaño de ojos e incluso ausencia de estos últimos (*) (B y C).

7.4 Bloqueo de Función de *Wnt3a* mediante la inyección de Oligo-Morfolinos antisentido en embriones de pez cebra.

Una técnica utilizada para bloquear la función de genes en el desarrollo embrionario es la inyección de oligo-morfolinos antisentido. Estas moléculas son oligonucleótidos antisentido diseñados para hibridar con la región del inicio de la traducción en el mRNA del gen en estudio. Esta hibridación produce un bloqueo de la síntesis de la proteína del gen.

Para bloquear la función de *Wnt3a* en el desarrollo embrionario del pez cebra, se procedió a inyectar grupos de embriones (n=470) con cantidades crecientes del morfolino (de 1 a 10 η g) en estadio de una célula, directamente en la célula, en un volumen de 5 η l.

Como controles de los experimentos anteriores se inyectaron 10 η g de un morfolino que no hibrida con ningún mRNA conocido (morfolino control), por lo que no produce ningún efecto al ser inyectado en el embrión. El segundo control consiste en dejar por cada grupo experimental utilizado embriones sin inyectar para controlar posibles anomalías de los embriones fecundados.

7.4.1 Inyección de Oligo-Morfolinos antisentido de *Wnt3a*.

Al inyectar bajas concentraciones (1 y 2 η g) de Oligo-Morfolinos antisentido en embriones de una célula y con un tamaño de gota que no superó los 5 η l, no se observó alteración en el desarrollo de los embriones, en comparación al grupo control sin inyección. La sobrevivencia de los embriones fecundados e inyectados fue cercana al 70%.

Al aumentar la dosis de inyección (4 y 8 η g) se observan anomalías en los embriones, obteniendo fenotipos con distintas alteraciones. Aquellos embriones que presentan un marcado retraso en el desarrollo y acortamiento del eje anteroposterior fueron clasificados como Fenotipo 1 (**F1**) (Figura 18A); los embriones que además de las alteraciones recién descritas, presentan necrosis cerebral, se denominaron Fenotipo 2 (**F2**) (Figuras 18 B y 19 A y B). Finalmente aquellos embriones que tenían alteraciones inespecíficas en distintos grados, como acortamiento y/o curvatura del eje anteroposterior, acortamiento y/o malformación de

cola, alteraciones oculares (supernumerarios) y otras, fueron agrupadas en el Fenotipo 3 (F3) (Figura 19 C, D y D'). Los porcentajes de los fenotipos obtenidos al inyectar distintas concentraciones y el total de anomalía y mortalidad obtenidos al inyectar Oligo-Morfolinos antisentido anti *Wnt3a* se grafican en las figuras 20 y 21, respectivamente.

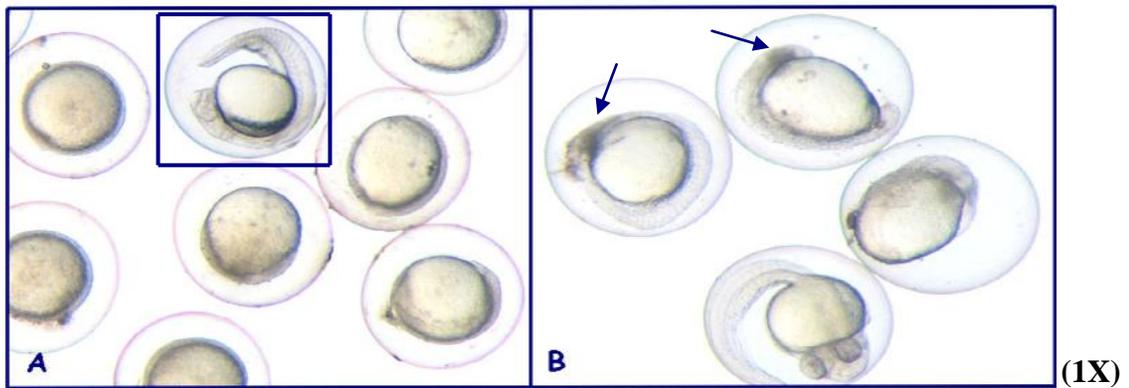


Figura 18: Fenotipos obtenidos al bloquear la función de *Wnt3a* mediante la inyección de Oligo-Morfolinos antisentido

A: Se muestra el fenotipo obtenido a las 24 h.p.f de embriones inyectados con 4 a 8 η g de Oligo-Morfolinos antisentido, los cuales presentan un notorio retraso en el desarrollo, en comparación al control (recuadro)

B: Embriones de 48 h.p.f inyectados con Oligo-Morfolinos antisentido que presentan retraso en el desarrollo y necrosis cerebral (flechas)

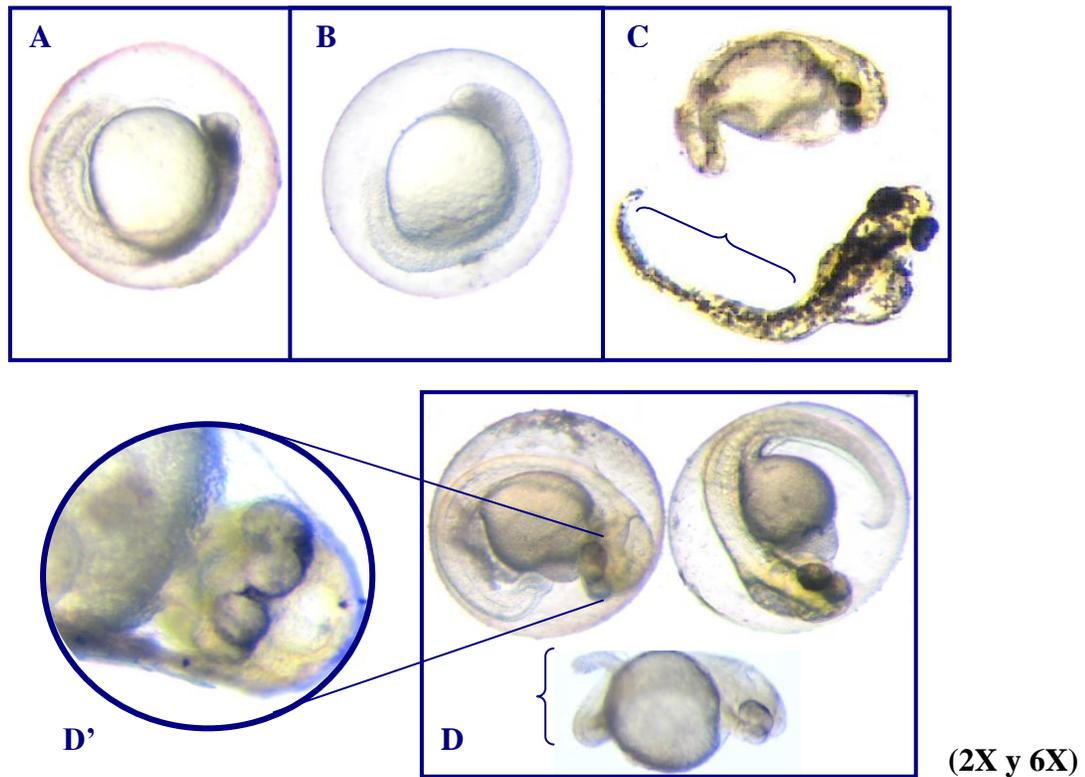


Figura 19: Fenotipos obtenidos al bloquear la función de *Wnt3a* mediante la inyección de *Oligo-Morfolinos antisentido*

Embriones de 48 h.p.f. que presentan necrosis cerebral (A y B) y acortamiento del eje anteroposterior (B). En C y D se muestran embriones de 48 h.p.f. cuyos fenotipos presentan alteraciones menos específicas, encontradas en bajos porcentajes, tales como acortamiento y/o curvatura del eje anteroposterior en distintos grados (llaves) y alteraciones oculares (D')

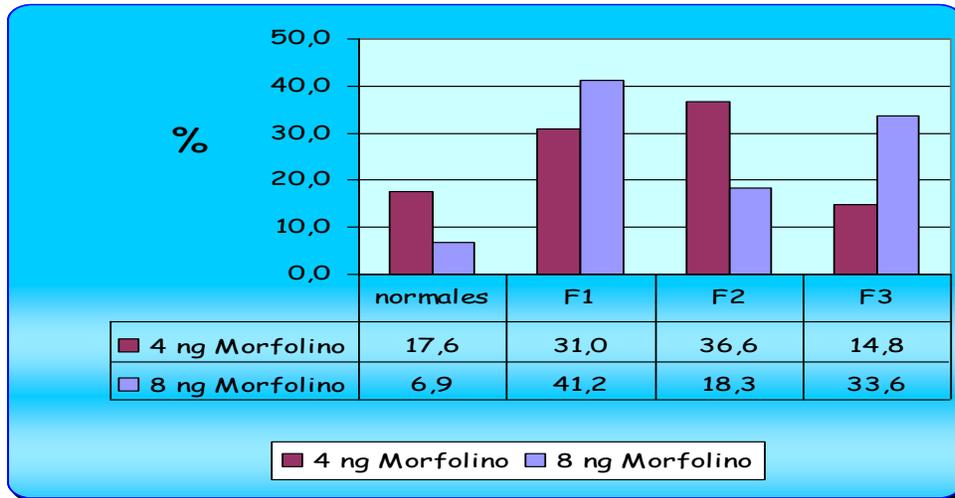


Figura 20: Gráfico de los resultados obtenidos al bloquear la función de *Wnt3a* mediante la inyección de 4 y 8 ng de Oligo-Morfolinos antisentido

En este gráfico podemos ver que al aumentar la dosis de inyección de 4 a 8 ng aumentan los fenotipos anormales, siendo F1 y F3 los que se incrementan en mayor porcentaje. Se describe como F1 al fenotipo de los embriones con marcado retraso en el desarrollo y acortamiento del eje anteroposterior; F2 a los embriones que además de las alteraciones de F1, presentan necrosis del cerebro anterior; y F3 a aquellos que presentan alteraciones inespecíficas como acortamiento y/o curvatura del eje anteroposterior, acortamiento y/o malformación de cola, alteraciones oculares (supernumerarios) y otras.

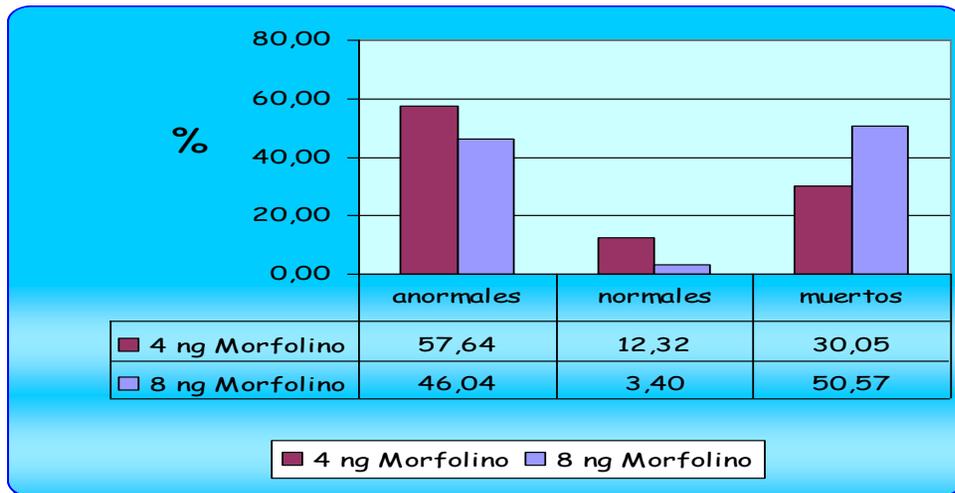


Figura 21: Gráfico del resultado de la inyección de Oligo-Morfolinos antisentido de *Wnt3a*

Se grafica que al inyectar 4 ng de morfolino se obtiene mayor cantidad de fenotipos anormales (11,6% sobre la inyección con 8 ng), pero al aumentar al doble la dosis de inyección, el porcentaje de embriones normales disminuye considerablemente (8,9%) y se incrementa en más de 20% el porcentaje de mortalidad, siendo la inyección con dosis superior la que resulta más nociva para el embrión, generando fenotipos anormales e inviábiles para la vida.

7.5 Análisis de la sobre expresión de *CKIγ2* y *Wnt3a* mediante el uso de marcadores genéticos en embriones de pez cebra.

Con el fin de dilucidar la función de *CKIγ2* y *wnt3a* en vías de señalización claves para el desarrollo embrionario del pez cebra, se analizó el patrón de expresión de una serie de genes marcadores que están involucrados en distintos procesos del desarrollo embrionario temprano.

Para esto, se procedió a sobre expresar estos genes mediante la inyección de 100 μ g del mRNA codificante para *CKIγ2* y de 200 μ g del mRNA para *wnt3a* en embriones de estadio de una célula. Estos fueron posteriormente fijados con PFA 4% en los estadios de 70% epibolía, 90% epibolía y/o “tail bud” (100% epibolía) según el marcador genético utilizado. Posteriormente estos embriones fueron sometidos a hibridación *in situ* con las sondas de RNA marcadas con digoxigenina-11-UTP (como está descrito en Materiales y Métodos), de los distintos genes marcadores. Para cada marcador fueron analizados entre 50 y 100 embriones para cada condición. En los experimentos controles se utilizaron embriones inyectados con 200 μ g del mRNA de GFP, el cual es inocuo para el desarrollo de los embriones y no afecta el patrón de expresión de los genes marcadores estudiados. Los marcadores utilizados fueron Goosecoid (*Gsc*), Chordin (*Chd*), *Pax2.1*, *Six3*, *Wnt8*, *Dlx3*, *Rx3* y Sonic Hedgehog (*Shh*).

7.5.1 Análisis del patrón de expresión de Chordin y Goosecoid en embriones inyectados con el mRNA codificante de *CKIγ2*.

Se realizó una hibridación *in situ* con las sondas de los genes marcadores del territorio dorsal Chordin (*Chd*) y Goosecoid (*Gsc*) sobre un grupo de embriones inyectados con 100 μ g del mRNA codificante para *CKIγ2* y sobre otro grupo de embriones inyectado con 200 μ g del control GFP, fijados en 70% de epibolía (7 h.p.f).

Se produce una notoria modificación en el patrón de expresión de estos dos marcadores en los embriones inyectados con el mRNA codificante para *CKIγ2*, como con respecto a los controles inyectados con GFP (figura 22: A, B, C y D).

En estadios tempranos (60% de epibolía), *Chd* marca territorio dorsal, mientras *Gsc* marca el escudo embrionario, precursor de las futuras estructuras dorsales. Posteriormente en el estado de “tail bud” (10 h.p.f.), *Gsc* se expresa en cerebro anterior en la placa precordal, diencéfalo y telencéfalo presuntivo.

En los embriones inyectados con *CK1γ2* se observa una marcada expansión de *Gsc* y *Chd* hacia ventral, lo que puede explicar el fenotipo de los embriones inyectados con esta isoformas de *CK1*, que muestran embriones altamente dorsalizados en desmedro de la formación de sus estructuras ventrales. Los controles fueron inyectados con mRNA inocuo para el embrión (GFP), fijados y manipulados en los mismos estadios y bajo las mismas condiciones experimentales.

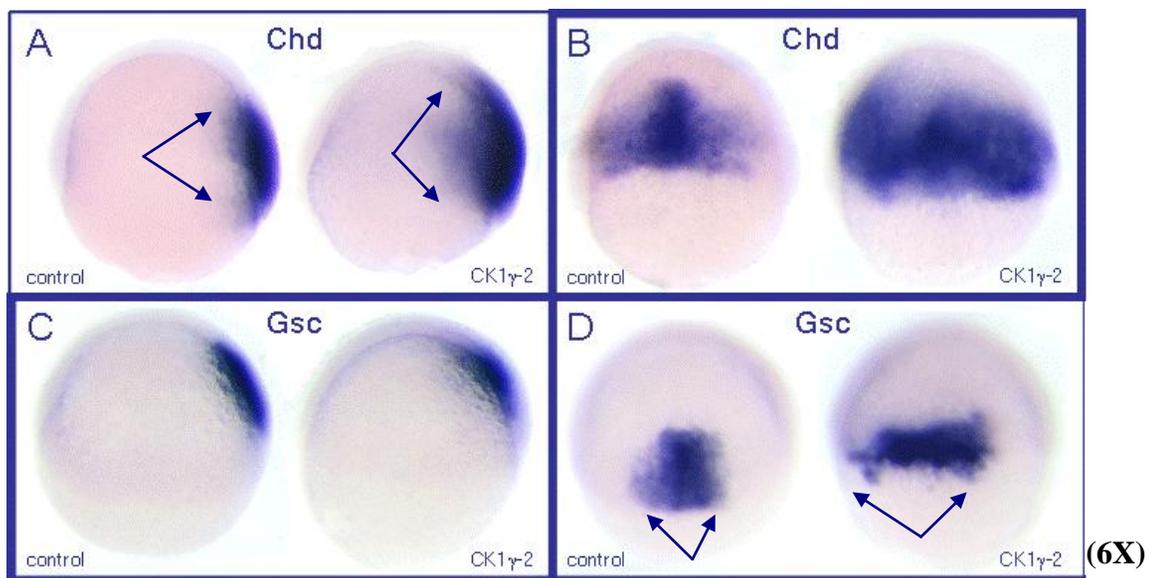


Figura 22: Análisis de marcadores genéticos en embriones inyectados con el mRNA codificante para *CK1γ2*

Se analizó el patrón de expresión mediante hibridación *in situ* de los genes marcadores de territorio dorsal Chordine (A y B), Goosecoid (C y D) donde observamos un ensanchamiento hacia ventral de la expresión de estos marcadores (flechas). El control inyectado fue mRNA codificante para GFP.

7.5.2 Análisis del patrón de expresión de *Dlx3* en embriones inyectados con el mRNA

codificante de *Wnt3a*.

Se realizó hibridación *in situ* con la sonda del gen marcador de epidermis *Dlx3*, sobre un grupo de embriones inyectados con 200 μ g del mRNA codificante de *Wnt3a*, y sobre otro grupo inyectado con 200 μ g de GFP, que posteriormente fueron fijados en el estadio de “tail bud” (10 h.p.f.). Se puede apreciar una expansión de *Dlx3* hacia dorsal, en comparación con el control GFP (Fig. 23 A y B). Esto explicaría un mayor desarrollo del ectodermo no neural, formador de epidermis, en desmedro del neuroectodermo, manifestándose en un menor desarrollo de estructuras cerebrales y neurales.

7.5.3 Análisis del patrón de expresión de *Rx3* y Sonic Hedgehog en embriones inyectados con el mRNA codificante de *Wnt3a*.

Se analizó el patrón de expresión, mediante hibridación *in situ*, con las sondas de los genes marcadores *Rx3* y Sonic Hedgehog (*Shh*), sobre un grupo de embriones inyectados con 200 μ g de *Wnt3a* y otro grupo inyectado con 200 μ g de GFP, como control. Estos embriones fueron fijados en el estadio de “tail bud” (10 h.p.f.).

Rx3 es requerida para la morfogénesis del ojo y por lo tanto su expresión se restringe a los territorios presuntivos donde éstos se forman. Por su parte *Shh* se expresa en regiones cerebelares y de la notocorda. Como se observa en la Figura 23 (C y D) la expresión de *Rx3* en embriones inyectados con *Wnt3a* es mínima o nula en comparación a los controles inyectados con GFP. Esto puede estar explicando la gran cantidad de embriones que presentan alteraciones en el desarrollo de los ojos al sobre-expresar este gen. Así mismo, existe una disminución en el patrón de expresión de *Shh*, el cual podría explicar las alteraciones fenotípicas relacionadas con la formación de estructuras anteriores derivadas de la notocorda y estructuras neurales como la retina y otras estructuras oculares y las células pigmentarias.

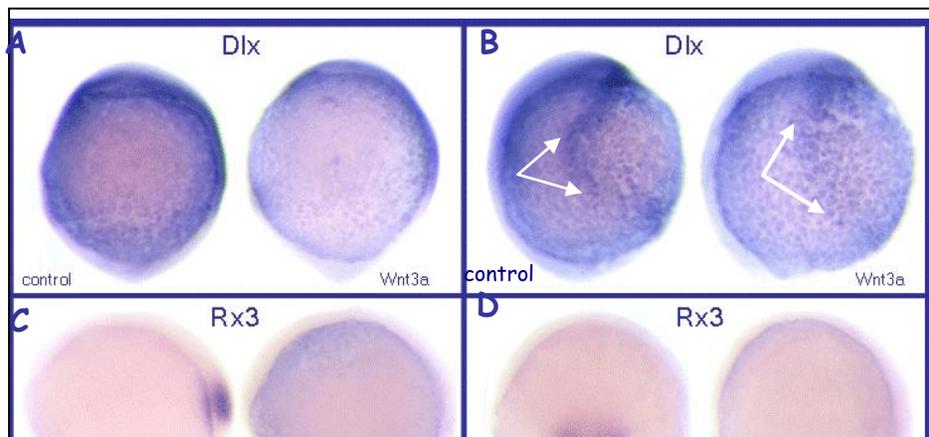
7.5.4 Análisis del patrón de expresión de *Pax2.1* y *Six3* en embriones inyectados con el mRNA codificante de *Wnt3a*

Un grupo de embriones inyectados con 100 μ g del mRNA codificante de *Wnt3a*, fueron fijados en estadio de “tail bud”, y posteriormente sometidos a una doble hibridación *in situ* con las sondas de los genes marcadores de la placa neural *Pax2.1* y *Six3*.

Pax2.1 se expresa en el límite presuntivo entre cerebro medio y posterior (“Midbrain-Hindbrain Boundary” o MHB) y *Six3* en la placa neural anterior.

Como control, otro grupo de embriones fue inyectado con 200 μ g de GFP, fijados en el mismo estadio e hibridados con las mismas sondas.

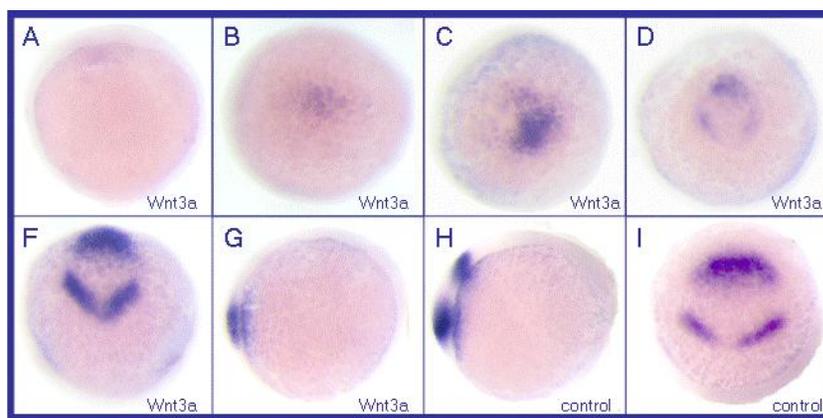
Encontramos diferencias importantes en la expresión de ambos genes en los embriones inyectados con *wnt3a* comparados con los controles. Como se puede apreciar en la Figura 24, los embriones inyectados con el mRNA codificante para *wnt3a* muestran notables alteraciones en la expresión de *Pax2.1* y *Six3*, las cuales variaron desde una disminución en la expresión de estos genes hasta la completa ausencia de uno o ambos marcadores. Además los embriones mostraron alteraciones en la distribución de la expresión de *Pax2.1* y *Six3*. Este resultado pueden dar cuenta del fenotipo encontrado al sobre expresar *wnt3a* (falta de cerebro anterior y alteraciones y/o ausencia de ojos). Al analizar los marcadores de forma individual, observamos en la expresión de *Pax2.1* una disminución (Fig. 24 B y D) o extensión (Fig. 24 F) de ésta. Por su parte, *Six3* se presenta con una notable disminución en su expresión, o la encontramos de forma difusa o ausente (Fig. 24 D, B y A respectivamente).



(6X)

Figura 23: Análisis de los marcadores genéticos *Dlx3*, *Rx3* y *Shh* en embriones inyectados con el mRNA codificante para *Wnt3a*

Se analizó el patrón de expresión mediante hibridación *in situ* del gen marcador de epidermis *Dlx3* (A y B), el cual presenta una expansión en su patrón de expresión. Como marcadores del territorio ocular presuntivo y de estructuras encefálicas se utilizaron *Rx3* y *Shh*. Las figuras C y D nos muestran la ausencia de *Rx3* y en E y F vemos una disminución en su expresión comparado con los controles inyectados con mRNA codificante para GFP



(6X)

Figura 24: Análisis de los marcadores genéticos *Pax2.1* y *Six3* en embriones inyectados con el mRNA codificante para *Wnt3a*

Se analizó el patrón de expresión mediante hibridación *in situ* de los genes marcadores del límite entre cerebro medio y posterior y de placa neural anterior *Pax2.1* y *Six3* respectivamente. Evidenciamos la ausencia total de ambos genes (A) o de uno de éstos (G), encontrando leves expresiones en B, C y D. En la figura F vemos una expansión de *Pax2.1*. El control inyectado fue mRNA codificante para GFP

8. DISCUSIÓN

Durante el desarrollo de vertebrados e invertebrados, la vía de Wnt cumple diversos roles en gobernar los destinos celulares, proliferación, migración, polaridad y muerte. En adultos participa en la homeostasis, y una inapropiada activación de la vía de Wnt esta implicada en variados cánceres humanos (Miller Jeffrey, 2001). La señalización de Wnt realiza sus funciones a través de dos cascadas distintas de señalización: la vía canónica y la vía no-canónica (Huelsenken and Birchmeier, 2001; Shimizu *et al.*, 2004) La vía canónica de Wnt induce la acumulación de β -catenina y activan la transcripción a través de un complejo de β -catenina y la transcripción de factores como Tcf y Lef (Shimizu *et al.*, 2005), por su parte, la vía no-canónica es independiente de β -catenina.

Ambas vías de señalización han sido relacionadas con las isoformas *CK1 ϵ* , *CK1 δ* , *CK1 α* y *CK1 γ* , las cuales regularían estas vías de forma positiva o negativa (Zeng *et al.*, 2005). Además cada una de estas isoformas cumpliría distintos y/o redundantes roles en el desarrollo embrionario. Estas funciones se han empezado a dilucidar recientemente (Davidson *et al.*, 2005; Takada *et al.*, 2005; Swiatek *et al.*, 2004).

En esta Memoria de Título se realizaron estudios de expresión y función de *Wnt3a* y de la isoforma *CK1 γ 2* en el desarrollo embrionario del pez cebra (*Danio rerio*). Para ello, se analizaron los patrones de expresión de estos genes mediante hibridización *in situ* y RT-PCR para *CK1 γ 2* y *Wnt3a*.

Para analizar la función de ambas proteínas se realizaron estudios de sobreexpresión mediante la inyección del mRNA codificante para *CK1 γ 2* y *wnt3a*, además de analizar marcadores genéticos en embriones sobreexpresados y ensayos de bloqueo de función mediante la inyección del Morfolino Oligo Antisentido de *wnt3a*.

Cabe aclarar que mientras trabajábamos en el desarrollo de esta Memoria de Título, se reportó el clonamiento y caracterización de un gen *wnt3a* homólogo al nuestro (Buckles *et al.*, 2004) en pez cebra. Este gen, aunque similar, es diferente al clonado por nuestro laboratorio. Algunos estudios de función realizados con este segundo gen indican que existiría en parte un grado de superposición funcional con la forma de *wnt3a* clonada por nosotros. Sin embargo resultados obtenidos en nuestro laboratorio y mostrados en esta tesis, como los patrones de expresión del gen y los experimentos de bloqueo de función con morfolinis antisentido, indican que ambos genes podrían regular procesos distintos durante el desarrollo del pez cebra. La

existencia de dos formas diferentes de un mismo gen en pez cebra es un fenómeno comúnmente observado en este sistema y se explica por la duplicación que experimentó el genoma de los peces teleósteos hace 300.000 millones de años.

8.1 Estudios de expresión de *CKIγ2* y *Wnt3a* en el desarrollo embrionario.

Mediante experimentos de RT-PCR se logró la amplificación de fragmentos provenientes de los transcritos de la isoforma *CKIγ2* y de *Wnt3a*, a lo largo de diferentes estadios del desarrollo embrionario del pez cebra. Aunque estos datos no son cuantitativos, nos sirven para comparar los niveles de expresión de ambos genes durante el desarrollo con respecto a un mRNA control: β -actina.

Como se observa en la Figura 9, el mRNA de *CKIγ2* se expresa durante todos los estadios del desarrollo embrionario estudiados (desde las 3 horas hasta los 6 días post fecundación). Este resultado indica que este gen se expresa de manera constante durante el desarrollo embrionario.

Al analizar los resultados de la expresión de *CKIγ2* mediante hibridación *in situ* (Fig.12), se confirman los resultados obtenidos mediante RT-PCR. *CKIγ2* se expresa de forma ubicua durante todo el desarrollo temprano (de 3 a 24 h.p.f). A las 48 h.p.f. se localiza de manera específica en la zona anterior del embrión, expresándose fuertemente en la región cefálica y en el primordio de las aletas pectorales. Estos resultados indican que *CKIγ2* se expresa de manera constante y ubicua durante todo el desarrollo temprano, restringiéndose posteriormente en su expresión hacia la cabeza del embrión en desarrollo. Este gen presenta un componente de expresión maternal y cigótico.

A diferencia de *CKIγ2*, la expresión del mRNA de *Wnt3a* (Fig. 11) sólo es evidente desde, aproximadamente, las 17 h.p.f. No se encuentra expresión de este gen en los primeros estadios del desarrollo (entre 0 y 10 horas (Fig. 11A, B y C)). Esto nos indica la ausencia de un componente materno y cigótico temprano en la expresión del mRNA de esta isoforma. Esto se complementa con los resultados del RT-PCR en que tampoco encontramos el mRNA en estadios inferiores a 12 h.p.f. La expresión del mRNA de *Wnt3a* a las 17 h.p.f. es ubicua en el embrión,

restringiéndose hacia la zona anterior a las 24 h.p.f. Esta expresión queda limitada a la región cefálica (rombómeros, cerebelo y tegmentum) y al primordio de las aletas pectorales a 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 *Wnt3a*, el que posteriormente aumenta hasta llegar a un nivel constante. Podemos aseverar entonces, que la expresión de *Wnt3a* 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.

De estos experimentos es interesante destacar las similitudes y diferencias espaciales y temporales de los patrones de expresión del mensajero de ambos genes, ya que al comparar la expresión de *CKIγ2* y *Wnt3a*, previo a las 12 h.p.f. sólo encontramos la expresión de la quinasa, siendo ésta constante y ubicua. Posterior a las 24 h.p.f. la expresión de ambos genes se restringe al sistema nervioso central y en el caso de *Wnt3a*, al primordio de las aletas pectorales. Esta observación sería acorde a los fenotipos observados en los experimentos de función, en que observamos una alteración en el desarrollo del sistema nervioso, del desarrollo dorsal y anterior del embrión, en la formación de los ojos y otras estructuras anteriores.

Además es interesante destacar que a pesar de la gran diferencia observada en los fenotipos obtenidos en los experimentos de sobre expresión, ambas presentan patrones de expresión similares posterior a las 36 hrs. de vida: *Wnt3a* se expresa fuertemente y de forma restringida en cerebro y aletas pectorales y *CKIγ2* se superpone a este patrón de expresión, encontrándose también en el resto del embrión, pero con una expresión más leve.

8.2 Estudios de función de *Wnt3a* y *CKIγ2* en desarrollo embrionario

Mediante los experimentos de inyección de RNA mensajero codificante para *Wnt3a* y

CK1γ2 y del Morfolino Anti *Wnt3a*, obtuvimos importantes antecedentes en cuanto a la función de ambos genes en el desarrollo embrionario del pez cebra. De los resultados, se destacan los relacionados con los fenotipos más severos obtenidos al sobreexpresar ambos genes. El más llamativo, producto de la inyección del mRNA de *Wnt3a* (60 a 180 µg), es el que dice relación con la alteración en la formación de los ojos (embriones sin ojos, ciclópicos y/o con asimetrías). Este hecho coincide con el patrón de expresión del mensajero de este gen, visualizado en los experimentos de hibridación *in situ*, restringido a estructuras cefálicas anteriores (entre 24 y 48 h.p.f.), derivadas del **Diencefalo** el cual, en el desarrollo embrionario, inducirá la formación de las Placodas del Cristalino, del cual derivarán la retina, cristalino y otras estructuras oculares. Dentro de los fenotipos obtenidos con la inyección de mRNA de *Wnt3a*, las alteraciones oculares fueron las presentadas en mayor porcentaje, encontrando un 33,7% y 79,4% al inyectar 60 y 180 µg, respectivamente. Estos fenotipos pueden presentar además distintos grados de hipertrofia mandibular y/o bajo desarrollo del cerebro anterior, acortamiento y alteración del eje Antero-posterior y distintos grados de despigmentación. Todas estas alteraciones están asociadas al anormal o menor desarrollo de la región cefálica, siendo la mandíbula una estructura derivada del Primer Arco Branquial ubicado en esta región; las células pigmentarias derivadas de las Crestas Neurales (originadas de los Pliegues Neurales luego de la formación del Tubo Neural) y, como ya se mencionó, las estructuras derivadas del Diencefalo.

En su conjunto, estos resultados se parecen a los obtenidos con la sobre expresión del mRNA codificante de *Wnt8*. 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, además se observan embriones sin ojos, ciclópicos y con otras alteraciones del globo ocular (Kelly *et al.*, 1995(b)). La supresión de la señalización de Wnt, es necesaria para la inducción de la formación de cerebro anterior y sus estructuras asociadas en vertebrados (Heisenberg *et al.*, 2001).

Se ha observado que al sobre activar la señal de Wnt (por ejemplo, en mutantes de pez cebra para la proteína Axina (*mbl-*) o en mutantes donde se inhibe la actividad represora de Tcf-3 (*hdl*)), aparecen embriones con un fenotipo donde los ojos y telencéfalo están reducidos o ausentes (Heisenberg *et al.*, 2001).

La formación de los ejes embrionarios requiere la señalización de una vía de Wnt en

dos momentos: después de la fertilización para establecer un centro de señales dorsales, y durante la gastrulación para especificar los destinos ventrales. Aunque la señal canónica Wnt/ β -catenina está envuelta en ambos procesos, se desencadenan de manera diferente en cada caso. La especificación del centro de señal dorsal parece ser un mecanismo independiente de ligandos, envuelto en la acumulación de β -catenina, el efector nuclear de la señal de Wnt, en los núcleos dorsales. La acumulación de β -catenina nuclear induce la formación del escudo embrionario en el pez cebra. Después del establecimiento del eje dorso ventral, la actividad de Wnt/ β -catenina, estimulada por el ligando *Wnt8*, es requerida para antagonizar el Escudo embrionario y por ende la formación de las estructuras de la cabeza (Ramel y Lekvel, 2004).

Por otra parte, el experimento de bloqueo de función de *Wnt3a* mediante la inyección de un Morfolino Oligo antisentido *Antiwnt3a* produjo fenotipos anormales a bajas dosis (4 a 8 μ g) (Fig. 21) con altas tasas de mortalidad al segundo día post inyección. Los efectos observados fueron un marcado retraso en el desarrollo (Fig. 19) que derivaban en un embrión con fenotipo acortado en su eje anteroposterior, el cual presentaba pérdida de la cola, somitos y estructuras posteriores, además de necrosis de la cabeza.

Se describe que en ratón, *wnt3a* juega un rol esencial en la formación de las estructuras posteriores del cuerpo (Takada *et al.*, 1994). Experimentos en embriones de ratón *wnt3a*-deficientes, muestran una severa reducción o pérdida de somitos y otras estructuras posteriores (Takada *et al.*, 1994) Si el bloqueo de *wnt3a*, en embriones de ratón, se realiza en conjunto con el bloqueo de *wnt1* se observa una dramática disminución en el número de células progenitoras de crestas neurales, normalmente derivadas del tubo neural (Ikeya *et al.*, 1997).

Mientras *wnt3a* en ratón y *wnt8* en pez cebra actúan claramente en los estadios tempranos de la inducción y/o patrón mesodérmico que subsecuentemente afecta el desarrollo de la cola, es desconocido hasta ahora si otros Wnts actúan durante el desarrollo más tardío de esta estructura, pero se sugiere que pueden existir adicionales Wnts expresados en el primordio de la cola que pueden actuar redundantemente con *wnt3a* en la formación de la cola (Thorpe *et al.*, 2005). Es poco lo que se conoce sobre la identidad de efectores río abajo de la vía de señalización de Wnt/ β -catenina en el desarrollo de la cola en diferentes especie. (Thorpe *et al.*, 2005) Se han realizado algunos estudios sobre *wnt3a* y su rol en el patrón neural en pez cebra, el cual develó que al reducir la función de *wnt3a* mediante morfolinos oligonucleótidos

antisentido, existe un leve acortamiento de la cola (Buckles *et al.*, 2004) lo que sugiere una función de *wnt3a* en el desarrollo de la cola. Otro estudio realizado en pez cebra no describe ninguna anomalía significativa en la embriogénesis temprana al inhibir *wnt3a* mediante morfolinós (Shimizu *et al.*, 2005), pero al co-inyectar los morfolinós anti *wnt8* y anti *wnt3a* se obtiene un fenotipo con alargamiento de la cabeza y cuerpo posterior reducido o trunco, estos efectos son más severos que los producidos por la inyección del morfolino anti *wnt8* solo (Shimizu *et al.*, 2005). Se postuló que *Wnt3a* y *Wnt8* funcionan redundantemente en la restricción del dominio del organizador dorsal y en la formación corporal posterior en pez cebra. Ambas isoformas de Wnt restringen el dominio del organizador dorsal mediante la regulación de los genes homeobox expresados ventralmente y ellos controlan la formación de estructuras posteriores a través de la regulación de genes caudales (Shimizu *et al.*, 2005).

Con estos antecedentes podemos decir que el fenotipo encontrado en nuestros experimentos de bloqueo de función de *wnt3a* concuerda con los obtenidos por otros investigadores, al presentar alteraciones en el eje anteroposterior y acortamiento de las estructuras posteriores y/o pérdida de estas.

Sin embargo nuestro fenotipo además presenta alteraciones en la región cefálica (Fig. 20) Se le ha atribuido a *Wnt3a* un importante rol en la formación del cerebro medio y posterior (Buckles *et al.*, 2004), en el hipocampo de mamíferos (Lee *et al.*, 2000) expansión de las crestas neurales y progenitoras del Sistema Nervioso Central (Ikeya *et al.*, 1997) Esto sumado a las alteraciones cefálicas encontradas en nuestro ensayo de bloqueo de función, se relaciona positivamente a nuestros experimentos de expresión, al observar su expresión ubicua y luego delimitada a la región anterior (Fig. 11) y al estudio de función, ya que la sobre expresión del gen evidenció anomalías en la formación de estructuras cefálicas (Fig. 13)

Por su parte, el fenotipo encontrado al inyectar mRNA codificante para la isoforma *CK1γ2* (independiente de la dosis inyectada) fue de embriones acortados en su eje anteroposterior, con la obtención de un fenotipo dorsalizado con alteraciones oculares, todo esto en distintos grados (Fig. 18), clasificando los fenotipos en 3 grandes grupos dependiendo de la gravedad, siendo F1 el fenotipo más severo. Es importante considerar la elevada toxicidad producida por la inyección de esta isoforma ya que, independiente de la concentración utilizada, (desde 80 a 200 µg) alrededor de un 70% de los embriones inyectados no sobrevivió a las 24

h.p.f., siendo el 30% de los embriones sobrevivientes los utilizados para este análisis. Así mismo, en todo el rango de concentraciones del mRNA de *CKI γ 2* estudiado se obtuvo el mismo fenotipo dorsalizado, el cual se incrementaba al duplicar la dosis de inyección.

Podríamos explicar esta alteración en el desarrollo basándonos en evidencias que relacionan a isoformas de *CKI* con la vía de señalización de Wnt (Sakanaka *et al.*, 2000), lo que 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. Se ha descrito que las isoformas de *CKI* no solo juegan un rol en la vía canónica de Wnt, sino que también cumplirían un importante rol en los movimientos de convergencia-extensión durante la embriogénesis de *Xenopus*, sugiriendo su participación en la vía no canónica de Wnt o “JNK” (McKay *et al.*, 2001(b))

La recepción y transducción de las señales de Wnt involucran la unión de los miembros de Wnt a dos familias distintas de receptores ubicados en la superficie celular: miembros de la familia de genes Frizzled (Fzd) y miembros de LDL-receptor-related (LRP) (Miller, 2001) Dos miembros de la familia LRP pueden unir Wnt y formar un complejo ternario con un Wnt y un Fzd. Experimentos de sobreexpresión de LRP en *Xenopus* pueden activar la vía de Wnt (Tamai *et al.*, 2000) Aunque el mecanismo de la señalización de LRP es aún poco clara, evidencias recientes sugieren que la unión del dominio citoplasmático de LRP a Axin (antagonista de Wnt) puede jugar un rol en la activación de la vía de Wnt. (Mao *et al.*, 2001).

Experimentos de ganancia y pérdida de función muestran que *CKI γ* es necesaria y suficiente para traducir la señalización de LRP en vertebrados y células de *Drosophila*. En embriones de *Xenopus laevis*, *CKI γ* es requerida durante la formación del patrón antero-posterior para promover la posteriorización de la señalización de Wnt/ β -catenina (Davidson *et al.*, 2005).

La función que cumplirían las distintas isoformas de *CKI* en la vía canónica de Wnt aún no está completamente esclarecida, sin embargo se describe que *CKI α* desactiva esta vía de Wnt; *CKI δ* , *CKI γ 1* y *CKI γ 2* tendrían una función activadora de la vía; *CKI γ 3* tendría un leve efecto activador (Knippschild *et al.*, 2005; Zeng *et al.*, 2005) y a *CKI ϵ* se le describe un rol activador (Zeng *et al.*, 2005, Kishida *et al.*, 2001; Hino *et al.*, 2003) y desactivador de la vía de Wnt (Schwarz-Romond *et al.*, 2002)

Está descrito que la sobreexpresión de *CKI γ* en *Xenopus laevis* mediante la inyección del RNA mensajero produce embriones sin cabeza, mientras que la inyección de un Morfolino anti *CKI γ* o el mRNA dominante negativo de *CKI γ* reducen las estructuras del tronco y de la cola e induce un alargamiento de la cabeza (Davidson *et al.*, 2005). Esto difiere a los resultados observados en nuestros experimentos, ya que encontramos aumento de las estructuras dorsales en la sobreexpresión de *CKI γ* , específicamente de la isoforma *CKI γ 2*. Por su parte, la sobreexpresión de *CKI α* y *CKI ϵ* produce los mismos efectos que la sobreexpresión de Wnt en embriones de *Xenopus laevis* (McKay *et al.*, 2001(a)), 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*. Estos resultados paradójales de las distintas isoformas de *CKI*, puede ser explicado por la acción de estas isoformas en distintos niveles de la vía de señalización canónica de Wnt, interactuando no sólo con β -catenina, sino que también con otras proteínas presentes en la cascada: dishevelled (Sakanaka *et al.*, 1999) o LRP (Davidson *et al.*, 2005) Otra posibilidad es que la función de las diferentes isoformas de la familia de *CKI* no estén exclusivamente restringida a la vía canónica de Wnt. Es posible que estas proteínas participen el desarrollo de los vertebrados asociadas por ejemplo, a las vía no canónica de Wnt (independientes de β -catenina). Se ha postulado que proteínas Wnt que señalizan en la vía no canónica, pueden antagonizar las vías de Wnt canónicas mediadas por β -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. Esto implica que al bloquear la función de Wnt-5 se obtenga una mayor proporción de células con especificación dorsal en desmedro de las ventrales (Weidinger y Moon, 2003). Esto podría explicar los efectos contradictorios 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.

Para intentar dilucidar estos fenómenos, será 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 esta isoforma y así encontrar alteraciones en los miembros conocidos de estas vías de señalización 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 *CKI* en los procesos relacionados con el desarrollo embrionario de vertebrados, utilizando como modelo el pez cebra.

8.3 Análisis de marcadores genéticos en embriones inyectados con el mRNA codificante para *Wnt3a* y *CKIγ2*

De los resultados obtenidos con los experimentos de sobre expresión de *Wnt3a* y *CKIγ2* mediante la inyección de los mRNA codificantes para cada gen y el posterior análisis de marcadores genéticos, mediante hibridación *in situ*, 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 de los genes marcadores de territorio dorsal *Gooseoid* y *Chordin*, los cuales se encontraban expandidos al sobre expresar *CKIγ2*. *Gooseoid* es normalmente expresado en el escudo embrionario y 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 β -catenina en la región que posteriormente formará parte del organizador dorsal del embrión (Kelly *et al.*, 2000). Se ha postulado que la acumulación temprana de β -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 mRNA de *CKIγ2* 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. La dorsalización de los embriones se relaciona a un aumento de los niveles de β -catenina en el lado dorsal del embrión, lo que se correlaciona con la inducción de genes dorsales específicos (Larabell *et al.*, 1997), provocando la formación de un escudo embrionario expandido.

Postulamos que los experimentos de sobre expresión de *CKIγ2* produciría una estabilización de la β -catenina debido a la falta de fosforilación de ésta, en que *CKIγ2* estaría

actuando en etapas muy tempranas, incluso antes de la gastrulación, participando en la regulación de la estabilidad de β -catenina en la región dorsal del embrión, necesaria para la formación del organizador. Por tanto la función de este gen podría ser la de controlar positivamente la vía de Wnt canónica en el desarrollo temprano.

Por otra parte, la modificación en el patrón de expresión de *Six3* en aquellos embriones inyectados con *Wnt3a*, coincide con las anomalías fenotípicas relacionadas con la formación de ojos y estructuras derivadas del cerebro anterior, ya que es un regulador crucial en el desarrollo de estas estructuras. Además actúa en desarrollo temprano en la especificación del plato neural anterior y participa en la inhibición de BMP (Gestri *et al.*, 2005). La posteriorización de *Six3* y el aumento de la expresión con expansión hacia dorsal de *Pax2.1*, gen regulador del desarrollo de cerebro medio y MHB (Scholpp y Brand, 2003), se pueden explicar por un cambio en los destinos cerebrales, desde cerebro anterior a cerebro medio. Esto quiere decir que existe una expansión de mesencéfalo en desmedro de cerebro anterior y ojos. Esto puede deberse a una sobre activación de la señal de Wnt, ya que mutaciones en *Axina* producen fenotipos similares (Heisenberg *et al.*, 2001)

Rx3, es un gen que actúa específicamente en el desarrollo del primordio óptico (Loosli *et al.*, 2003). Una mutación en *Rx3* induce la formación de ojos pequeños, maduración incompleta del ojo y aumento en la apoptosis de los precursores de los ojos (Kennedy *et al.*, 2004), además de un fenotipo carente de ojos en estadio muy temprano en el desarrollo (Loosli *et al.*, 2003). Estudios demuestran que la falta de ojos, en esta mutante, se debe a un bloqueo de la evaginación de las vesículas ópticas y de la diferenciación neuronal (Loosli *et al.*, 2003). La modificación y/o ausencia en el patrón de expresión de *Rx3* en aquellos embriones inyectados con el mRNA de *Wnt3a*, concuerda con el fenotipo encontrado, donde existían distintas alteraciones o ausencia de los ojos. La falta de expresión de *Rx3* en embriones inyectados con *Wnt3a*, puede ser explicada por el efecto negativo que este gen produce en la formación de las estructuras precursoras de los ojos en los embriones de pez cebra sobre-expresados con este gen. Este tipo de fenotipos está normalmente asociado a una disfunción de una vía de Wnt (Loosli *et al.*, 2003). El efecto posteriorizante de una señal ectópica de Wnt, resulta en la pérdida de los ojos (Kelly *et al.*, 1995(a); Heisenberg *et al.*, 2001; van de Water *et al.*, 2001). La formación de los ojos de los vertebrados se inicia por la protrusión de las vesículas ópticas del tejido neural

anterior. Las vesículas ópticas se desarrollan a cúpulas ópticas, que darán origen a la retina, mientras se inducen los lentes en el ectodermo opuesto. Como consecuencia de la señal ectópica de Wnt, no se forman ni las vesículas ópticas ni los lentes, presumiblemente porque el tejido neural anterior es transferido hacia posterior y pierde sus propiedades morfogenéticas (van de Water *et al.*, 2001).

Por otro lado, se sabe que el gen marcador *Dlx3* se expresa en las células del ectodermo y es a su vez, un activador transcripcional, que regula positivamente la formación del ectodermo no neural. Además, *Dlx3* regula negativamente la expresión de genes marcadores del Sistema Nervioso Central en epidermis y placa neural anterior (Beanan y Sargent, 2000). La expresión temprana de este gen “anti- neural”, se produce de manera independiente al Escudo u organizador dorsal, y es regulado por una señal dependiente de β -catenina (Beanan *et al.*, 2000). La expansión de *Dlx3* observada con la sobreexpresión de *Wnt3a*, podría deberse a una expansión del tejido epidérmico en desmedro de ectodermo neural, lo que podría sugerir que este gen actuaría produciendo una señal posteriorizante en el embrión similar a la reportada con *Wnt8* y en concordancia a los resultados que le atribuyen funciones redundantes a estos miembros de la familia de Wnt. Por lo tanto, esta señal posteriorizante, produciría la pérdida de masa cefálica y de ojos en los embriones inyectados.

9. CONCLUSIONES

1) *CK1 γ 2* presenta una expresión ubicua en desarrollo embrionario temprano. La expresión de *Wnt3a* es evidente desde las 17 h.p.f. de forma débil. En estadios más avanzados ambos genes se

expresan fuertemente en la región cefálica y en el primordio de las aletas pectorales. *CKIγ2* además, se expresa débilmente en el resto del embrión.

2) La sobreexpresión mediante inyección del mRNA codificante para *CKIγ2* y *Wnt3a* produce alteraciones en el desarrollo ocular. *CKIγ2* además presenta alteración en la formación del eje dorso ventral y de los movimientos de convergencia y extensión de las células sobre el vitelo. *Wnt3a* presenta alteraciones derivadas de malformaciones de estructuras cefálicas. La proporción de los fenotipos observados y la concentración de mRNA inyectado difiere entre ambos genes.

3) El bloqueo de función mediante Morfolino Oligo Antisentido anti*wnt3a* produce un marcado retraso en el desarrollo, alteración en el desarrollo del cerebro, acortamiento y/o curvatura del eje Antero-posterior con pérdida y/o malformación de cola y estructuras somáticas caudales.

4) La inyección del mRNA codificante para *CKIγ2* produce un patrón de expresión expandido de *Gsc* y *Chd*, y la inyección del mRNA para *Wnt3a* produce una disminución en el patrón de expresión de *Rx3*, *Six3* y *Shh*, y una expansión hacia dorsal de *Pax2.1* y *Dlx3*. En su conjunto estos resultados indican que *CKIγ2* y *Wnt3a*, podrían estar regulando la formación de estructuras del Sistema Nervioso Central, mediante la activación de genes ventralizantes o la regulación positiva de vías ventralizantes.

10. BIBLIOGRAFÍA

BEANAN M.J.; FELEDY J.A; SARGENT T.D. 2000. Regulation of early expression of *Dlx3*, a *Xenopus* anti- neural factor, by beta- catenin signaling. *Mechanisms of Development* 91 (1-2): 227-35.

BEANAN M.J.; SARGENT T.D. 2000. Regulation and function of *Dlx3* in vertebrate development. *Developmental Dynamics* 218(4): 545-553.

BUCKLES, G.R.; THORPE, C.J.; RAMEL, M.C.; LEKVEN, A.C. 2004. Combinatorial Wnt control of zebrafish midbrain-hindbrain boundary formation. *Mechanisms of Development* 121(5): 437-447

DAVIDSON, G.; WU, W.; SHEN, J.; BILIC, J. ; FENGER, U.; STANNEK, P.; GLINKA, A.; NIEHRS, C. 2005. Casein Kinase 1 gamma couples wnt receptor activation to cytoplasmic signal transduction. [Nature](#) 438: 867-872

DETRICH, H.W.; WESTERFIELD, M.; ZON, L.I. 1999. *Methods in Cell Biology*, vol.59. The zebrafish: Biology. Academic Press California, USA.

GESTRI G.; CARL M.; APOLLONNI I.; WILSON S.W.; BARSACCHI G.; ANDREAZZOLI M. 2005. *Six3* functions in anterior neural plate specification by promoting cell proliferation and inhibiting BMP4 expression. *Development* 132 (10): 2401-13.

GILBERT, S.F. 2000. *Developmental Biology*. 6th Edition. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Sunderland, Massachusetts, USA: 305-491

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.

HEISENBERG, C.; HOUART, C.; TAKE-UCHI, M.; RAUCH, G.; YOUNG, N.; COUTINHO, P.; MASAI, I.; CANEPARO, L.; CONCHA, M.L.; GEISLER, R.; DALE, T.C.; WILSON, S.W.; STEMPLE, D. 2001. A mutation in the Gsk3-binding domain of zebrafish Masterblind/Axin1 leads to a fate transformation of the telencephalon and eyes to diencephalon. *Genes and Development* 15: 1427-1434.

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. *The Journal of Biological Chemistry* 278(16):14066-14073.

HUELSKEN J, BIRCHMEIER W. 2001. New aspects of Wnt signalling pathways in higher vertebrates. *Current Opinion in Genetics and Development* 11:547-553

[IKEYA, M.](#); [LEE, SM.](#); [JOHNSON, JE.](#); [MCMAHON, AP.](#); [TAKADA, S.](#) 1997. Wnt signalling required for expansion of neural crest and CNS progenitors. [Nature](#) 30; 389(6654):966-70

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(a). Induction of a secondary embryonic axis in zebrafish occurs following the overexpression of beta-catenin. *Mechanisms of Development* 53: 261-273.

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

KELLY, C.; CHIN A.J.; LEATHERMAN J.L.; KOZLOWSKI D.J.; WEINBERG E.S.

2000. Maternally controlled (beta)-catenin-mediated signaling is required for organizer formation in the zebrafish. *Development* 127 (18): 3899- 911.

KENNEDY B.N.; STEARNS G.W.; SMITH V.A.; RAMAMURTHY V.; VAN EEDEN F.; ANKOUDINOVA I.; RAIBLE D.; HURLEY J.B.; BROCKERHOFF S.E. 2004. Zebrafish *rx3* and *mab2112* are required during eye morphogenesis. *Developmental Biology* 270 (2): 336-49.

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

KIMMEL, C.B.; BALLARD, W.W.; KIMMEL, S.R.; ULLMANN, B.; SCHILLING, T.F. 1995. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics* 203: 253-310.

KISHIDA, M.; HINO, S.I.; MICHIEUE, T.; YAMAMOTO, H.; KISHIDA, S.; FUKUI, A.; ASASHIMA, M.; KIKUCHI, A. 2001. Synergistic activation of the Wnt signaling pathway by *Dvl* and casein kinase I epsilon. *The Journal of Biological Chemistry* 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. *Cellular Signaling* 17(6):675-89.

LARABELL, C.A.; TORRES M.; ROWNING B.A.; YOST C.; MILLER J.R.; WU M.; KIMELMAN D.; MOON R.T. 1997. Establishment of the dorsal -ventral axis in *Xenopus* embryos is presaged by early asymmetries in beta-catenin that are modulated by the Wnt signaling pathway. *The Journal of Cell Biology* 136 (5): 1123- 36.

LEE, SM.; TOLE, S.; GROVE, E.; McMAHON, AP. 2000. A local Wnt-3a signal is required for development of the mammalian hippocampus. *Development* 127: 457-467

LOOSLI F.; STAUB W.; FINGER-BAIER K.C.; OBER E.A.; VERKADE H.; WITTBRODT J.; BAIER H. 2003. Loss of eyes in zebrafish caused by mutation of *chokh/rx3*. *EMBO Reports* 4 (9): 894-9.

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

MAO, J.; WANG, J.; LIU, B.; PAN, W.; FARR, G.H.; FLYNN, C.; YUAN, H.; TAKADA, S.; KIMELMAN, D.; LI, L.; WU, D. 2001. Low-density lipoprotein receptor-related protein-5 binds to Axin and regulates the canonical Wnt signalling pathway. *Molecular Cell* 7: 801-809

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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(18):10193-10200.

MCKAY, RM.; PETERS, J.M.; GRAFF, J.M. 2001(a). The casein kinase I family in Wnt signaling. *Developmental Biology* 235(2):388-396.

MCKAY, RM.; PETERS, J.M.; GRAFF, J.M. 2001(b). The casein kinase I family: roles in morphogenesis. *Developmental Biology* 15;235(2):378-87.

MILLER JEFFREY. 2001. The Wnts. *Biology* 3(1):reviews3001

MULLINS, M. C.; HAMMERSCHMIDT, M.; KANE, D. A.; ODENTHAL, J.; BRAND, M.; VAN EEDEN, F. J. M.; FURUTANI-SEIKI, M.; GRANATO, M.; HAFFTER, P.; HEISENBERG, C.-P., *et al.* 1996. Genes establishing dorsoventral pattern formation in the

zebrafish embryo: the ventral specifying genes. *Development* 123, 81-93.

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. *Developmental Biology* 199: 93-110.

RAMEL, M.C.; LEKVEN, A.C. 2004. Repression of the vertebrate organizer by *Wnt8* is mediated by *Vent* and *Vox*. *Development* 131(16): 3991-4000

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

SHIMIZU, T.; BAE, Y.K.; MURAOKA, O.; HIBI, M. 2005. Interaction of Wnt and caudal-related genes in zebrafish posterior body formation. *Developmental Biology* 279(1): 125-141

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

SCHOLPP S.; BRAND M. 2003. Integrity of the midbrain region is required to maintain the diencephalic- mesencephalic boundary in zebrafish *no isthmus/ pax2.1* mutants. *Developmental Dynamics*. 228 (3): 313-22.

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.

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 I epsilon to the beta-catenin degradation complex and acts in both canonical Wnt and Wnt/JNK signaling. *Genes and Development* 16(16):2073-84.

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

SWIATEK, W.; TSAI, I.; KLIMOWSKI, L.; PEPLER, A.; BARNETTE, J.; YOST, H.J.; VIRSHUP, D.M. 2004. Regulation of Casein Kinase 1 epsilon activity by wnt signaling. *Journal of Biological Chemistry* 279: 13011-13017

TAKADA, R.; HIJIKATA, H.; KONDOH, H.; TAKADA, S. 2005. Analysis of combinatorial effects of Wnts and Frizzleds on beta-catenin/armadillo stabilization and dishevelled phosphorylation. *Genes Cells* volume 10; 919-928

TAKADA, S.; STARK, K.L.; SHEA, M.J.; VASSILEVA, G.; MCMAHON J.A.; MCMAHON, A.P. 1994. Wnt-3a regulates somite and tailbud formation in the mouse embryo. *Genes and Development* 8:174–189

TAMAI, K.; SEMENOV, M.; KATO, Y.; SPOKONY, R.; LIU, C.; KATSUYAMA, Y.; HESS, F.; SAINT-JEANNET, J.P.; AND HE, X. 2000. LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction. *Nature* 407:530-5.

THORPE, C.J.; WEIDINGER, G.; MOON, R.T. 2005. Wnt/ β -catenin regulation of the Sp1-related transcription factor sp51 promotes tail development in zebrafish. *Development* 132(8): 1763-1772

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 *CKI*. *FEBS Letters* 349(2):307-312.

TRINKAUS, J.P. 1992. The midblastula transition, the YSL transition, and the onset of gastrulation *Fundulus*. *Development (Cambridge, England) Supplement* 1992: 75-80.

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

VAN DE WATER S.; VAN DE WETERING M.; JOORE J.; ESSELING J.; BINK R.; CLEVERS H.; ZIVKOVIC D. 2001. Ectopic Wnt signal determines the eyeless phenotype of zebrafish *masterblind* mutant. *Development* 128: 3877-88.

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

WEIDINGER, G. AND MOON, R.T. 2003. When Wnts antagonize Wnts. *The Journal of Cell Biology*. 162(5): 753-756

ZENG, X.; TAMAI, K.; DOBLE, B.; LI, S.; HUANG, H.; HABAS, R.; OKAMURA, H.; WOODGETT, J.; HE, X. 2005. A dual-kinase mechanism for Wnt co-receptor phosphorylation and activation. *Nature* 438, 873-877