



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



ANÁLISIS DE LAS ISOFORMAS $\delta 1$ Y $\delta 2$ DE LA PROTEÍNA
 QUINASA CK1 EN EVENTOS RELACIONADOS CON EL
 DESARROLLO EMBRIONARIO DEL PEZ CEBRA (*Danio rerio*)

CLAUDIA FOERSTER GUZMÁN

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

NOTA FINAL:

NOTA	FIRMA
------	-------

PROFESOR GUÍA	: JUAN MARCELO ANTONELLI
PROFESOR CONSEJERO	: SOLEDAD FERNANDEZ
PROFESOR CONSEJERO	: EDUARDO KESSI

SANTIAGO, CHILE
2006



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



ANÁLISIS DE LAS ISOFORMAS $\delta 1$ Y $\delta 2$ DE LA PROTEÍNA
QUINASA CK1 EN EVENTOS RELACIONADOS CON EL
DESARROLLO EMBRIONARIO DEL PEZ CEBRA (*Danio rerio*)

CLAUDIA FOERSTER GUZMÁN

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

PROFESOR GUÍA: Prof. Dr. JUAN MARCELO ANTONELLI ANATIVIA

SANTIAGO, CHILE
2006

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

La realización de esta tesis fue financiada en parte por el proyecto FONDECYT N° 1020753 y por Millenium Nucleus in Developmental Biology.

AGRADECIMIENTOS

A mi Mamá, Papá, Martín, Eduardo, Amigos: les agradezco su cariño, apoyo y paciencia.

Al Dr. Marcelo Antonelli, mi profesor guía, le doy las gracias por la oportunidad de realizar esta tesis, además de la confianza y el aprendizaje brindado.

A mis compañeros de laboratorio les agradezco todo lo que me enseñaron de biología molecular, de trabajo en equipo, y sobre todo, su amistad. En especial a Melina, Celeste y José Manuel que fueron el apoyo directo para la realización de esta tesis.

Al Dr. Jorge Allende y a la Dra. Catherine Connelly, mis más sinceros agradecimientos por la facilidades entregadas, sus historias y todo lo que aprendí de ellos.

ÍNDICE

	<i>Página</i>
RESUMEN	viii
SUMMARY	x
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Desarrollo embrionario temprano en pez cebra	3
2.1.1 División celular en los huevos fecundados	3
2.1.2 Gastrulación en embriones de pez cebra	6
2.1.2.1 Formación de la capa germinal	7
2.1.3 Formación de los ejes en embriones de pez	11
2.1.3.1 Formación del eje dorso ventral: el escudo embrionario	11
2.1.3.2 Formación del eje antero- posterior: dos centros de señales	13
2.1.4 Periodo de Segmentación	14
2.2 Proteína quinasa CK1	19
2.3 Función de CK1 en el desarrollo embrionario	20
3. HIPÓTESIS	24
4. OBJETIVO GENERAL	24
5. OBJETIVOS ESPECIFICOS	24
6. MATERIALES Y METODOS	25
6.1 Animales de experimentación	25
6.2 Materiales	25
6.3 Preparación de RNA total de embriones de pez cebra	26
6.4 Transcripción Reversa Acoplada a PCR (RT-PCR)	27
6.5 Síntesis de sondas de RNA para Hibridación <i>in situ</i>	28
6.6 Hibridación <i>in situ</i> en embriones totales	29
6.7 Síntesis de mRNA para microinyección	31

6.8 Microinyección de mRNA	32
7. RESULTADOS	34
7.1 Determinación de niveles relativos de expresión de RNA mensajero de CK1δ1 y CK1δ2 mediante RT-PCR	34
7.2 Hibridación <i>in situ</i> sobre embriones de pez cebra	35
7.3 Análisis de Función de CK1δ1 y CK1δ2 mediante la inyección de cantidades conocidas de mRNA de estas isoformas y de sus Dominantes Negativas en embriones de pez cebra	39
7.3.1 Inyección de mRNA codificante para la isoforma CK1δ1	39
7.3.2 Inyección de mRNA codificante para la isoforma CK1δ2 ...	45
7.4 Inyección del mRNA codificante para las Dominantes Negativas de CK1δ1 y CK1δ2 en embriones de pez cebra.....	49
7.4.1 Inyección de mRNA codificante para la Dominante Negativa de la isoforma CK1δ1	50
7.4.2 Inyección de mRNA codificante para la Dominante Negativa de la isoforma CK1δ2.....	52
7.5 Análisis de la sobre expresión de CK1δ1 y CK1δ2 producido por la inyección del mRNA codificante para cada isoforma, mediante el uso de marcadores genéticos en embriones de pez cebra	55
7.5.1 Análisis del patrón de expresión de Goosecoid en embriones inyectado con el mRNA codificante de CK1δ1 y CK1δ2	55
7.5.2 Análisis del patrón de expresión de Pax2.1 y Six3 en embriones inyectados con el mRNA codificante de CK1δ1 y CK1δ2	56
7.5.3 Análisis del patrón de expresión de Vox en embriones inyectados con el mRNA codificante de CK1δ1 y CK1δ2.....	57

7.5.4	Análisis del patrón de expresión de Rx3 en embriones inyectados con el mRNA codificante de CK1δ1 y CK1δ2	58
7.5.5	Análisis del patrón de expresión de Dlx3 en embriones inyectados con el mRNA codificante de CK1δ1 y CK1δ2	59
8.	DISCUSIÓN	65
8.1	Estudios de expresión de CK1δ1 y CK1δ2 en desarrollo embrionario	65
8.2	Estudios de función de CK1δ1 y CK1δ2 en desarrollo embrionario.	67
8.3	Análisis de marcadores genéticos en embriones inyectados con el mRNA codificante de CK1δ1 y CK1δ2	71
9.	CONCLUSIONES	76
10.	BIBLIOGRAFÍA	77

RESUMEN

La proteína CK1 es una familia de proteínas quinasa a la que recientemente se la ha relacionado con el desarrollo embrionario. De esta familia se han clonado al menos siete isoformas: CK1 α , CK1 β , CK1 γ 1, CK1 γ 2, CK1 γ 3, CK1 δ y CK1 ϵ .

En esta Memoria de Título se realizaron estudios de expresión y función de las isoformas CK1 δ 1 y CK1 δ 2 en el desarrollo embrionario del pez cebra (*Danio rerio*). Para esto, analizamos los patrones de expresión de estos genes mediante RT-PCR e hibridización *in situ*. Los resultados indican que estas isoformas se expresan de manera similar en cuanto a su temporalidad, ya que ambas se detectan desde la primera hora post fecundación (h.p.f). CK1 δ 1 presenta un patrón ubicuo hasta las 8 h.p.f y limitándose después al sistema nervioso central. Por su parte, la expresión de CK1 δ 2 presenta ubicuidad hasta las 24 h.p.f, restringiéndose posteriormente a la zona cefálica y al primordio de las aletas pectorales.

Para analizar la función de ambas isoformas se efectuaron estudios de sobre expresión, mediante la inyección en embriones de pez cebra de los mRNAs codificante para CK1 δ 1 y CK1 δ 2, y ensayos de bloqueo de función mediante la inyección en embriones de los mRNA de las formas Dominantes Negativas de cada uno de los genes estudiados. Estos experimentos se realizaron utilizando la técnica de microinyección en embriones en estadio de una célula y posteriormente incubados y observados en distintos estadios bajo lupa estereoscópica, y clasificados según su fenotipo. Además, se procedió a analizar el patrón de expresión de algunos genes marcadores específicos de desarrollo embrionario, en embriones inyectados con una cantidad conocida de mRNA de

CK1 δ 1 y CK1 δ 2, con el fin de establecer con mayor precisión los procesos y vías en los que podrían estar involucradas estas isoformas.

Los resultados obtenidos con los experimentos anteriores indican que la sobre expresión de ambas isoformas, CK1 δ 1 y CK1 δ 2, inducen distintos grados de malformación en cerebro anterior y ojos, siendo el fenotipo principal observado con la inyección de CK1 δ 1 los embriones sin ojos. El bloqueo de función mediante Dominantes Negativos indujo, en ambas isoformas, embriones dorsalizados y ciclópicos. Se puede concluir, que las isoformas CK1 δ 1 y CK1 δ 2 están participando en la formación de los ejes embrionarios en el desarrollo temprano del pez cebra y además en la formación de estructuras del sistema nervioso central, específicamente cerebro anterior y ojos.

SUMMARY

The protein CK1 is a family of kinase proteins which has recently been implicated in embryonic development. At least seven isoforms of this family have been cloned: CK1 α , CK1 β , CK1 γ 1, CK1 γ 2, CK1 γ 3, CK1 δ y CK1 ϵ .

In this thesis, expression and function studies of both genes CK1 δ 1 y CK1 δ 2 were performed during embryonic zebrafish development (*Danio rerio*). For this, we analyzed the expression pattern of these genes by *in situ* hybridization and RT-PCR. Those results indicate that both isoforms have a similar early expression pattern. Both genes express ubiquously since the first hour post fecundation (h.p.f) until 8 h.p.f. From this moment, CK1 δ 1 restricts its expression to Central Nervous System. CK1 δ 2 is ubiquously express until 24 h.p.f. After, it restricts its expression to the cephalic region and pectoral fins.

In order to analyze the function of both isoforms, overexpression studies were performed by CK1 δ 1 and CK1 δ 2 mRNA injection. We also made “blockade of function” assays by injecting mRNA in zebrafish embryos of the dominant negative mRNA of each isoform. These experiments were carried out by microinjection techniques in embryos at the one-cell stage. After injection, the embryos were incubated and observed in different stages using a stereoscopic microscope, and classified according to their phenotype. In addition, we analyzed the expression pattern of some gene markers in embryos injected with knowing amounts of CK1 δ 1 y CK1 δ 2, to have a better idea of the processes and pathways in which this isoform could be involved.

The results obtained with the experiments described here, indicated that the overexpression studies of both isoforms, CK1 δ 1 y CK1 δ 2, induced forehead and eyes abnormalities, being the “no eyes” embryo the main fenotype observed with the CK1 δ 1 injection. The “blockade of function” experiments, by dominants negative CK1 isoform injection, induced in both isoforms, dorsalized and cyclops embryos. In conclusion, we propose that CK1 δ 1 and CK1 δ 2 are involved in the processes that regulate the axis formation of the embryos during early development of the zebrafish, as well as in the formation of structures of the central nervous system, specially forehead and eyes.

1. INTRODUCCIÓN

El establecimiento del desarrollo embrionario de los vertebrados involucra la señal de numerosas moléculas, cuyas interacciones permiten los diferentes procesos que formarán un organismo vivo a partir de una sola célula indiferenciada. Esto ha sido entendido a partir de un pequeño grupo de sistemas vivientes, que nos han permitido utilizar una batería de técnicas moleculares, bioquímicas y genéticas. El sistema del pez cebra ofrece muchas ventajas sobre otros sistemas clásicos de desarrollo debido a que cada pareja puede generar un gran número de embriones por cada cruce durante todo el año, los embriones son transparentes por lo que permite una fácil observación de eventos claves del desarrollo temprano y su organogénesis se completa a los cinco días post fecundación.

La proteína CK1 es una enzima serina/treonina quinasa, que ha sido identificada en el citoplasma celular, membrana plasmática y en el núcleo. Se le ha asociado con múltiples funciones dentro de los seres vivos, como procesos de transporte a través de membranas, ritmo circadiano, regulación del desarrollo de neoplasias, división celular, apoptosis y enfermedades neurodegenerativas. Además se le ha relacionado al desarrollo embrionario, mediante la regulación de la vía wingless (Wnt). La proteína quinasa CK1 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 7 genes distintos, CK1 α , CK1 β , CK1 γ 1, CK1 γ 2, CK1 γ 3, CK1 δ y CK1 ϵ .

La vía Wnt es crucial para muchos aspectos del desarrollo embrionario en vertebrados e invertebrados, incluyendo la formación del eje dorsal, establecimiento de la polaridad celular, formación de la cabeza y movimientos de los tejidos en formación. Numerosas publicaciones han asociado la vía Wnt – β catenina con las diferentes isoformas de la familia CK1 en procesos del desarrollo embrionario. Por ejemplo, se demostró recientemente que CK1 ϵ induce un eje secundario en *Xenopus laevis* estimulando la señalización de una vía Wnt a través de β -catenina. Por otro lado, CK1 α actuaría de manera contraria promoviendo la desestabilización de β catenina mediante la fosforilación directa y posterior degradación de ésta. Esto entrega la evidencia para estudiar la expresión y función de otras isoformas de la enzima CK1 en el desarrollo embrionario.

En esta memoria de título proponemos estudiar la expresión y función de CK1 δ 1 y CK1 δ 2 en eventos relacionados con el desarrollo embrionario de los vertebrados, usando como modelo el pez cebra.

2. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

2.1 Desarrollo embrionario temprano en pez cebra

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

2.1.1 División celular en los huevos fecundados.

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

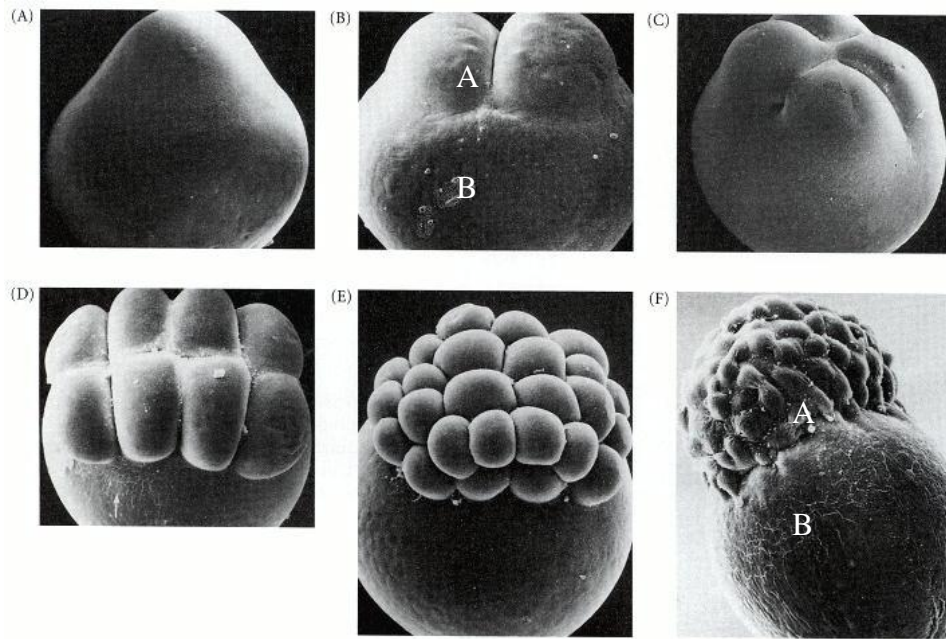


Figura 1: *División meroblástica discoidal en un huevo de pez cebra.* (A) embrión en estadio de una célula donde se distingue el blastodisco y el vitelo en la región superior e inferior respectivamente. Embrión en estadio de 2 (B), 4 (C), 8 (D), 32 (E) y 64 (F) células. A: polo animal; B: polo vegetal (Gilbert, 2000).

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

Aproximadamente a la décima división comienza la transcripción de los genes cigóticos, las divisiones se enlentecen y el movimiento celular se hace evidente (Kane y Kimmel, 1993).

En el estado de blástula (figura 2) se pueden distinguir tres tipos celulares:

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

El segundo tipo de células que se distingue en la transición de la blástula media es el que forma parte de la **Capa Envolvente** o **“Enveloping Layer” (EVL)**, formada por las células más superficiales del blastodermo, que forman una gruesa capa epitelial. El EVL eventualmente formará el peridermo, una cubierta protectora extraembrionaria que es eliminada durante el desarrollo tardío (Gilbert, 2000).

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 (Gilbert, 2000).

Los destinos de las células del blastodermo temprano, aún no han sido determinados, cualquiera de estas células pueden dar origen a una variedad no predecible de tejidos. El destino de éstas parece ser establecido poco después del inicio de la gastrulación, donde células en ubicaciones específicas dentro del embrión, dan origen a tejidos con una alta predicibilidad (Kimmel *et al.*, 1990).

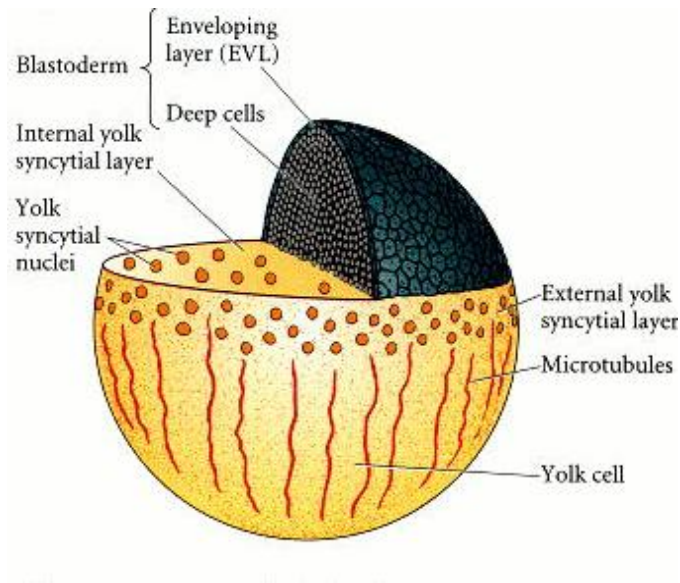


Figura 2: Estructura de la blástula en el huevo de pez cebra. Antes de la gastrulación, las células profundas están rodeadas por la EVL. La superficie animal del vitelo contiene los núcleos del YSL. Los microtúbulos se extienden a través del vitelo y en la región externa del YSL (Gilbert, 2000).

2.1.2 Gastrulación en embriones de pez cebra.

El primer movimiento celular en la gastrulación del pez, es la epibolia de las células del blastodermo sobre el vitelo. En esta etapa, las células profundas del blastodermo se mueven sobre la superficie del vitelo para envolverlo

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

Durante la migración, en un lado del blastodermo se distingue una zona evidentemente más gruesa que la otra. Experimentos de marcaje celular, indican que esta región es la futura superficie dorsal del embrión (Schmidt y Campos-Ortega, 1994).

2.1.2.1 Formación de las capas germinales.

Después que las células han cubierto la mitad del vitelo, aparece un engrosamiento en todo el margen del blastodermo, llamado **anillo germinal**, que está compuesto por **epiblasto** (capa superficial) e **hipoblasto** (capa interna). El hipoblasto es formado por la invaginación de las células superficiales por debajo del margen de migración hacia el polo animal (Figura 3C.) Esta involución ocurre en todo el margen del embrión, pero comienza en la futura región dorsal, formando un engrosamiento localizado llamado **Escudo Embrionario** (Figura 4), que es funcionalmente equivalente al labio dorsal del blastoporo de los anfibios, ya que puede generar un doble eje embrionario cuando es trasplantado a un embrión receptor, es decir, genera dos embriones compartiendo un vitelo común (Gilbert, 2000). Así, a medida que las células experimentan 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, formando los precursores de la notocorda. Las células mesodermales paraxiales adyacentes son las precursoras de los somitos mesodérmicos. La convergencia y extensión concomitantes en el epiblasto originan las células neurales presuntivas hacia la línea media dorsal, donde formarán la quilla neural. El resto del epiblasto dará origen a la piel del pez (Gilbert, 2000).

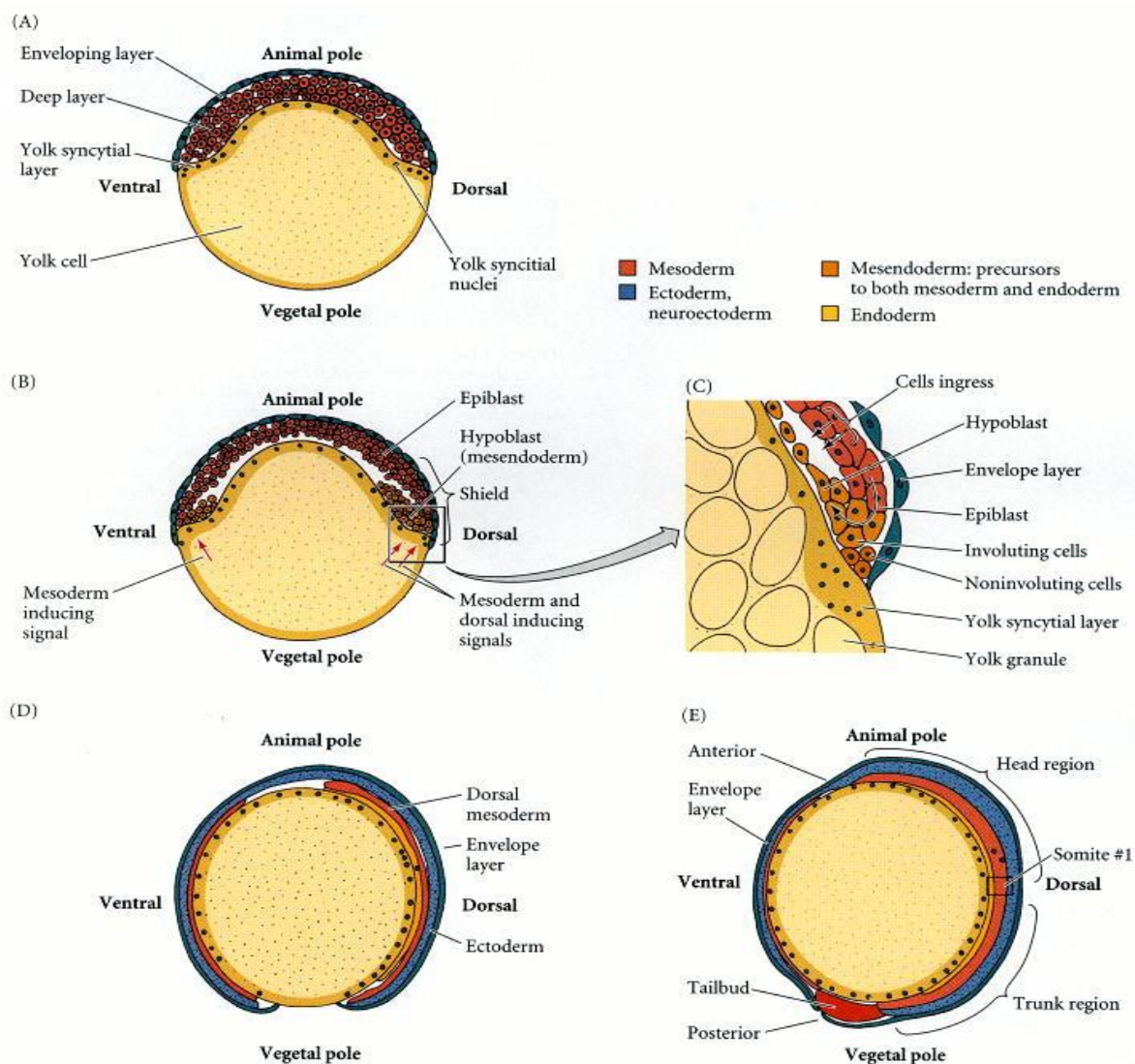


Figura 3: *Movimientos celulares durante la gastrulación del pez cebra.* (A) Blastodermo en estadio de 30% de epibolía (alrededor de 4.7 h.p.f.). (B) formación del hipoblasto, por involución de las células en el margen del blastodermo o por delaminación de las células desde el epiblasto (6 h.p.f.). (C) acercamiento a la región marginal. (D) a 90% de epibolía (9 h.p.f.) se puede apreciar al mesodermo rodeando el vitelo, entre el endodermo y el ectodermo. (E) gastrulación completa (10.3 h.p.f.) (Gilbert, 2000).

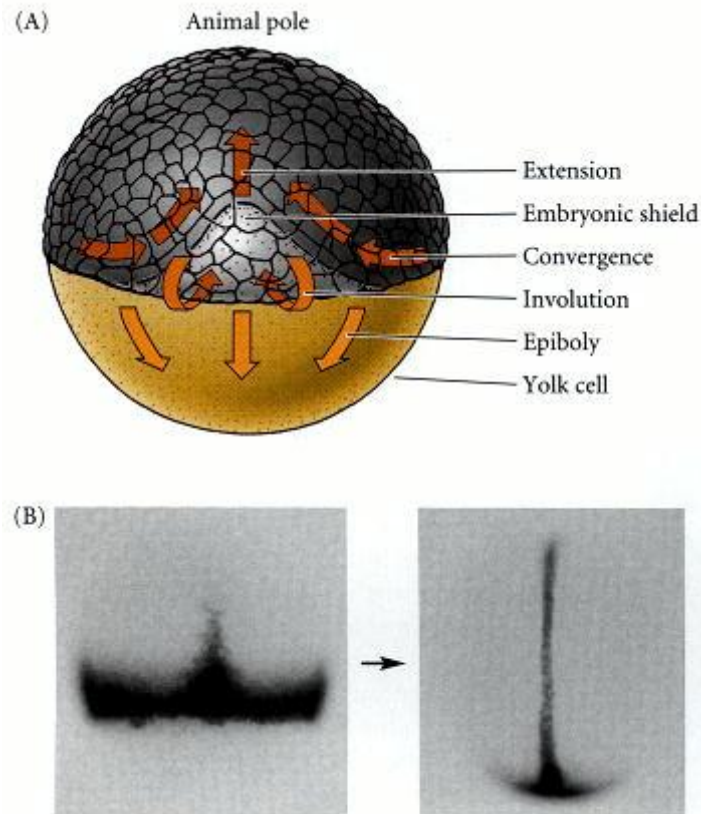


Figura 4: *Movimientos de convergencia y extensión durante la gástrula del pez cebra.* (A) Vista dorsal de los movimientos de convergencia y extensión durante la gastrulación del pez cebra. Durante la epibolía el blastodermo va cubriendo el vitelo, la involución de estas células genera el hipoblasto; 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 acúmulo 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 (Gilbert, 2000).

2.1.3 Formación de los ejes en embriones de pez

2.1.3.1 Formación del eje dorso ventral: el escudo embrionario.

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

Al igual que el labio dorsal del blastoporo del anfibio, el escudo embrionario forma la placa precordial y la notocorda. Los precursores de estas dos regiones inducen al ectodermo para ser ectodermo neural (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 Cordino (Figura 5). Si el gen Cordino es mutado, el tubo neural no se forma correctamente. Por lo tanto, es una gradiente de concentración de BMP2b el que da origen a las regiones laterales y ventrales de ectodermo y

mesodermo del pez cebra, y la proporción entre *Cordino* y *BMP2B* especificarían las posiciones a lo largo del eje dorso-ventral (Nguyen *et al.*, 1998). Sin embargo en peces, la notocorda no es la única estructura capaz de producir las proteínas que bloquean *BMP2b*. Si la notocorda falla en su formación (como en las líneas mutantes de *floating head* o *no tail*), el tubo neural es igualmente producido, ya que es posible que las células precursoras de la notocorda (que igual están presentes en estas mutaciones) sean capaces de inducir el tubo neural o que la porción dorsal de los precursores de los somitos puedan 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 crítica en anfibios para que el Centro de Nieuwkoop induzca el Organizador Dorsal, en el labio dorsal 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 inducción de la acumulación de β -catenina en la región ventral del huevo origina la dorsalización del embrión, es decir, predominio de la formación de estructuras dorsales en desmedro de tejidos y órganos ventrales, y un eje embrionario secundario (Kelly¹ *et al.* 1995). Además de esto, 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 el equivalente al Organizador Dorsal de los anfibios y la región subyacente a él (la

parte dorsal del vitelo) es similar al Centro Nieuwkoop de *Xenopus laevis* (Gilbert, 2000).

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

Cuando se induce experimentalmente un segundo eje dorso-ventral en embriones de pez cebra, ambos ejes, el normal y el inducido, tienen igual polaridad antero posterior. Ambas cabezas están en el antiguo polo animal, y ambas colas ubicadas vegetalmente. De hecho, el eje antero-posterior es especificado durante la oogénesis, donde el polo animal marca la región anterior del embrión. Este eje se estabiliza durante la gastrulación a través de dos centros de señales distintos. El primero, un pequeño grupo de células neurales anteriores en el límite entre la superficie neural y el ectodermo (región que dará origen a la glándula pituitaria, placa nasal y cerebro anterior) se secretan componentes que originan el desarrollo anterior. Si estas células neurales anteriores son movidas en forma experimental más posteriormente en el embrión, harán que las células neurales cercanas asuman las características de las neuronas de cerebro anterior. El segundo centro se encuentra en la región posterior del embrión y consta de células precursoras de mesodermo lateral que producen componentes caudalizantes, semejantes a proteínas relacionadas con Nodal y Activina (figura 5C). Si se transplantan al ectodermo neural anterior, este tejido transformará el presuntivo cerebro anterior en estructuras similares a cerebro posterior (Gilbert, 2000).

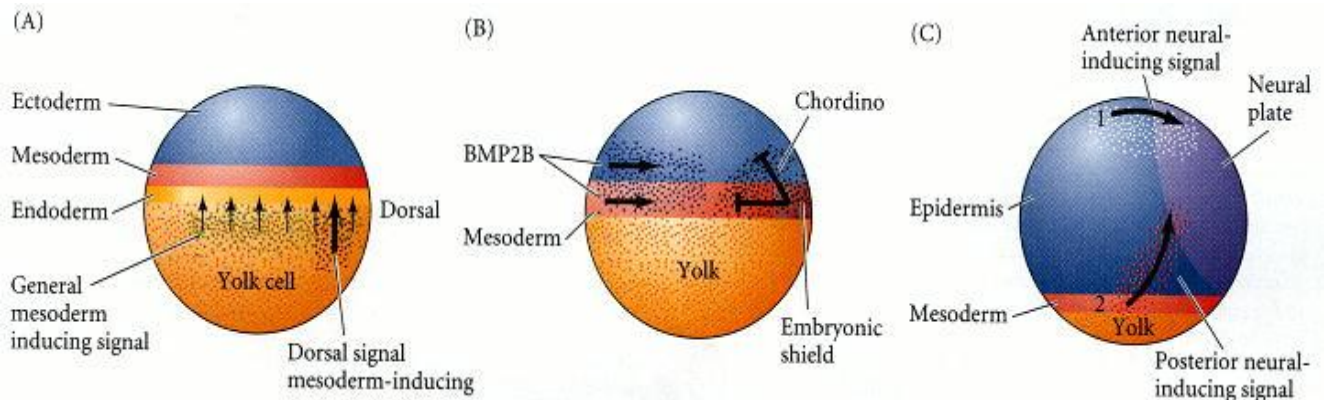


Figura 5: *Formación de ejes en el embrión de pez cebra.* (A) Antes de la gastrulación el blastodermo se organiza con el ectodermo cerca del polo animal, el mesodermo presuntivo bajo el ectodermo, y el endodermo justo por encima del vitelo. El YSL, y probablemente el endodermo, envía dos señales al mesodermo. La primera señal (flechas delgadas) induce al mesodermo, mientras una segunda señal (flecha ancha) induce específicamente un área del mesodermo que formará parte del mesodermo dorsal (escudo embrionario). (B) Formación del eje dorso-ventral. Durante la gastrulación, el mesodermo ventral secreta BMP2B (flechas) para inducir la diferenciación mesodermal ventrolateral y epidermal. El mesodermo dorsal secreta factores (como Chordino) que bloquean BMP2B y dorsalizan el mesodermo y ectodermo, convirtiéndolo más tarde en tejido neural. (C) Se han identificado dos centros de señales para establecer la polaridad antero-posterior, una (1) en el límite del ectodermo neural y no neural, que induce células neurales anteriores, y el otro (2) en el margen lateral, que genera una señal posteriorizante (Gilbert, 2000).

2.1.4 Período de Segmentación.

Posterior a la epibolía del embrión, comienza la neurulación, es decir, la formación del tubo neural. 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. 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 urogenital. 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” (figura 6; 3E), 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 7B). 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 (Kimmel *et al.*, 1995).

A las 22 horas post fecundación, cuando el embrión consta de más o menos 26 somitos, se ve un primordio de cerebelo prominente y uno puede reconocer los rudimentos de la epífisis e hipotálamo en el diencéfalo (Kimmel *et al.*, 1995).

A partir de las 24 horas post fecundación el embrión posee la estructura de un vertebrado clásico. El embrión se ve como una criatura organizada bilateralmente, con una notocorda bien desarrollada y con un set completo 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. Con la rápida morfogénesis cerebelar, el cerebro se compone de cinco lóbulos: telencéfalo, diencéfalo, mesencéfalo, cerebelo y romboencéfalo (rombómeros) (figura 7C; figura 8). (Kimmel *et al.*, 1995).

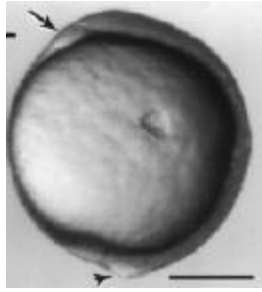


Figura 6: *Embrión de pez cebra en estado de “tail bud”*. En la figura se muestra un embrión de pez cebra que ha completado su epibolía, a las 10 h.p.f. aproximadamente. La flecha indica la futura cabeza del embrión, mientras que la cabeza de flecha indica el “tail bud” o primordio de la cola (Kimmel *et al.*, 1995).

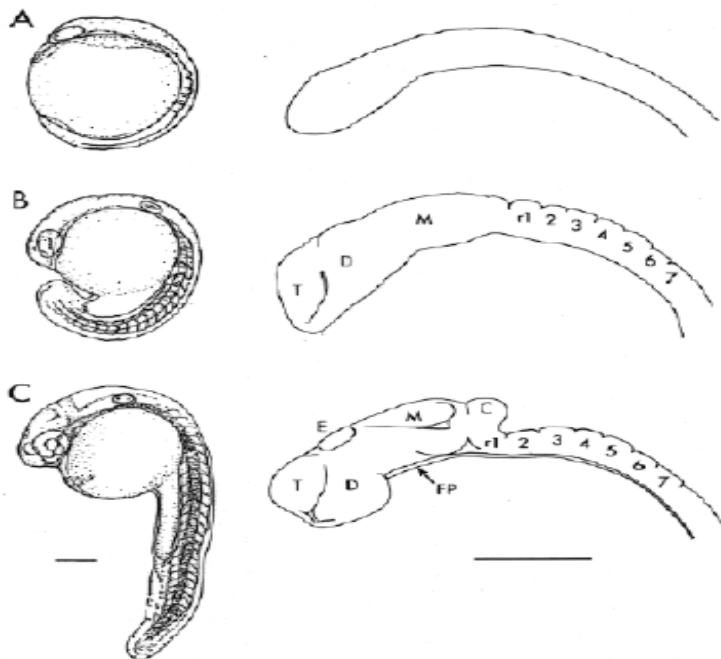


Figura 7: *Cerebro rudimentario durante el período de Segmentación*. **A** No vemos subdivisiones morfológicas en el período de 6 somitos (12h). **B:** Para el estadio de 18 somitos (18h) se han desarrollado 10 neurómeros, el telencéfalo (T), diencéfalo (D), mesencéfalo (M) y alrededor de 7 rombómeros. **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).

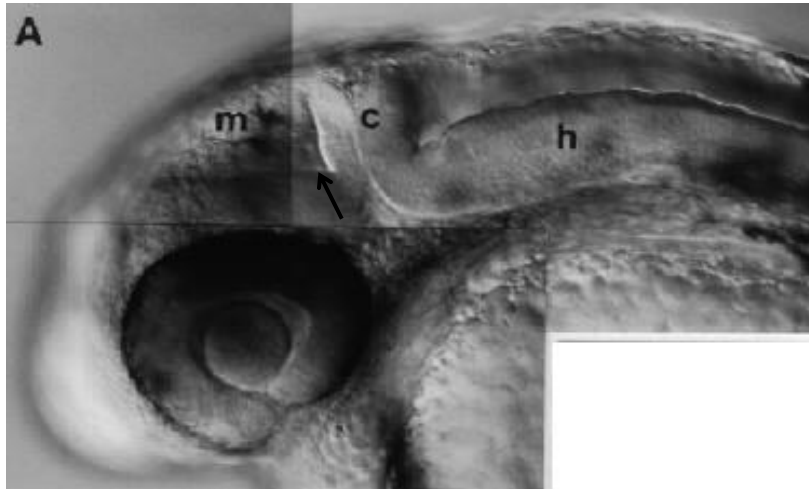


Figura 8: *Estructuras neurales predominantes en cabeza a las 29 horas post fecundación.* Subdivisión transversal de cerebro en el primordio cerebelar (c), muestra la separación de cerebro medio (m) y posterior (h). En el cerebro medio se puede observar un surco horizontal distintivo (flecha), que separa el tectum óptico (dorsal al surco) del tegmentum (ventral al surco). Se puede observar muy bien el ojo, con la retina alrededor del lente (Kimmel *et al.*, 1995).

2.2 Proteína quinasa CK1

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

Hasta el momento se han identificado siete genes que dan origen a siete isoformas distintas, CK1 α , CK1 β , CK1 γ 1, CK1 γ 2, CK1 γ 3, CK1 δ y CK1 ϵ (Tapia *et al.*, 1994). Las diferentes isoformas de CK1 fosforilan serina (Ser) y treonina (Thr), aunque algunas variantes purificadas de levadura y de *Xenopus laevis* pueden fosforilar tirosina, pero con una menor eficiencia (Knippschild *et al.*, 2005). Un gran número de proteínas pueden ser fosforiladas por CK1 *in vitro*, entre las que se encuentran: p53, el receptor de insulina, el receptor del factor de necrosis tumoral, la glicógeno sintetasa, el receptor muscarínico m3 y el antígeno T grande de la proteína SV40 (Knippschild *et al.*, 2005). Durante los últimos años se ha comunicado la participación de CK1 en varios procesos claves como la regulación del ritmo circadiano, la reparación de DNA, la activación de células T y la regulación del tráfico vesicular (Knippschild *et al.*, 2005). Sin embargo, su papel preciso a nivel molecular en estos procesos celulares y la regulación de CK1 y sus isoformas han permanecido relativamente oscuros.

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

fosforilado puede ser reemplazado por una agrupación de aminoácidos ácidos (poliaspártico y poliglutámico) hacia el extremo amino terminal del aminoácido fosforilable por CK1 (Knippschild *et al.*, 2005). Recientemente se ha visto que secuencias no canónicas pueden ser fosforiladas por CK1 en algunas proteínas, como β -catenina (Marín *et al.*, 2003).

La abundancia relativa de las diferentes isoformas en diferentes células y en diferentes tejidos es desconocida. Sin embargo, la enzima purificada bioquímicamente, desde numerosos tejidos y caracterizada en estudios anteriores corresponde probablemente en la mayoría de los casos a la isoforma CK1 α (Knippschild *et al.*, 2005).

2.3 Función de CK1 en el desarrollo embrionario

Existe evidencia que relaciona a las isoformas CK1 ϵ , CK1 δ y CK1 α con la vía de Wnt (Sakanaka *et al.*, 2000). En *Xenopus laevis* y pez cebra, esta vía regula la formación del eje dorso-ventral (Kelly *et al.*, 2000) y la formación de la cabeza (Heisenberg *et al.*, 2001). La sobre expresión en oocitos de *Xenopus laevis* de las isoformas CK1 ϵ , CK1 δ , y CK1 α inducen la formación de un doble eje dorsal. Este efecto es sinérgico con la co-expresión de Wnt (McKay *et al.*, 2001). Los genes de la familia de Wnt codifican para glicoproteínas secretables que actúan como ligandos de receptores de membrana pertenecientes a la familia de Frizzled. Se han descrito varios componentes río abajo de la vía de Wnt, entre ellos están las proteínas APC (polipósis adenomatosa coli), Dishevelled (Dvl), Axina (ó su homólogo conductina), Frat, β -catenina y recientemente algunas isoformas de CK1 (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 CK1 (Figura 9). 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 CK1 ϵ , y probablemente CK1 δ , forma un complejo con Dvl y Axina. La interacción de CK1 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 CK1 regulan esta vía en forma positiva. Sin embargo, la función de las isoformas de CK1 en la vía de Wnt ha resultado controvertida. Varios grupos han reportado que CK1 α y CK1 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).

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

La evidencia presentada con anterioridad indica que algunas de las isoformas de la proteína quinasa CK1 están involucradas en procesos relacionados con el desarrollo embrionario.

En esta Memoria de Título se pretende determinar el patrón de expresión y dilucidar la función de CK1 δ 1 y CK1 δ 2, en eventos relacionados con el desarrollo embrionario, usando como modelo el pez cebra.

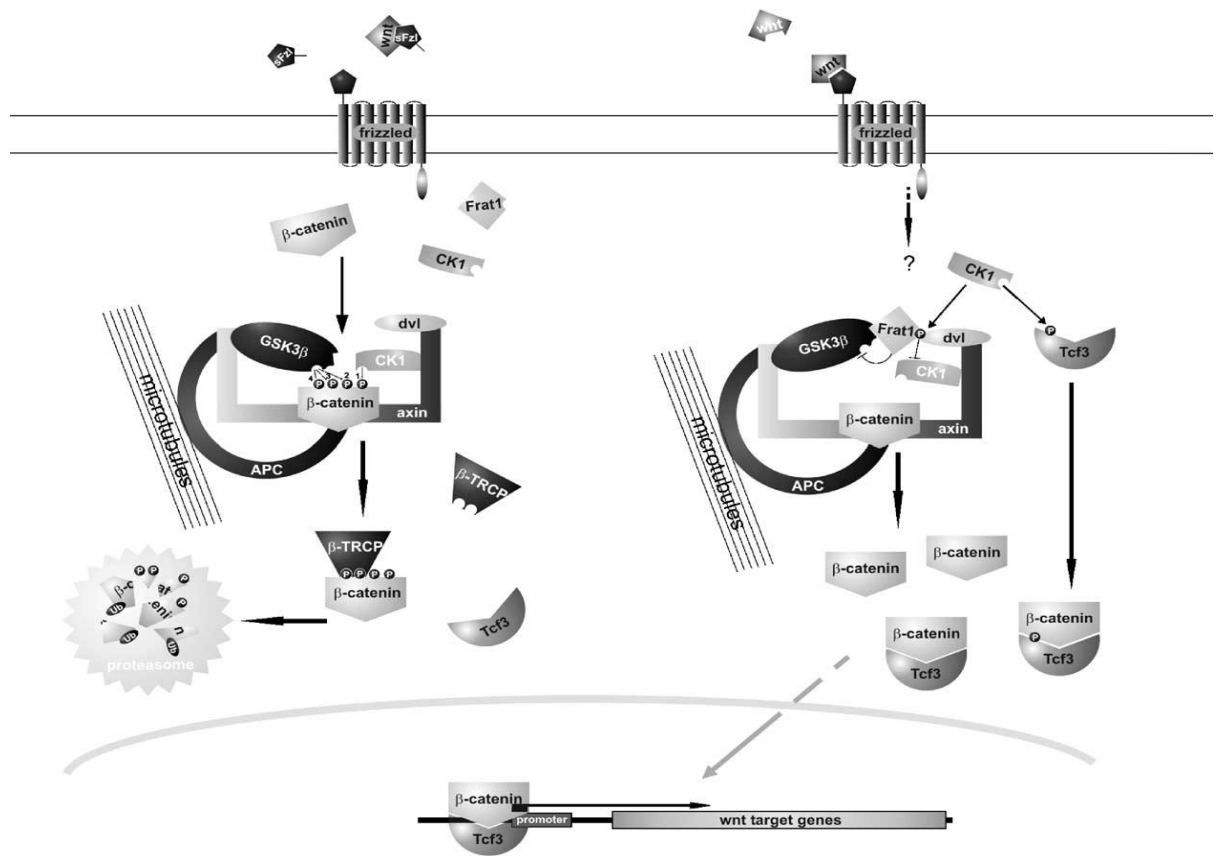


Figura 9: *Funciones positivas y negativas de CK1 en la vía de señalización Wnt.* En ausencia de señalización Wnt, CK1 y GSK3 β fosforilan los aminoácidos del N-terminal de β -catenina creando el sitio de reconocimiento para β -TRCP, un componente de una ubiquitina ligasa, marcando β -catenina para la consecuente degradación por parte del proteosoma. Las proteínas Wnt secretadas inician la cascada de señalización mediante la unión a los receptores de membrana Frizzled. Después de la activación del receptor, un mecanismo desconocido conduce a la fosforilación de dishevelled. La asociación de esta proteína fosforilada con axina y Frat1 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 (Knippschild *et al.*, 2005).

3. HIPÓTESIS

Las isoformas CK1 δ 1 y CK1 δ 2 están involucradas en la regulación de ciertos eventos del desarrollo embrionario de los vertebrados.

4. OBJETIVO GENERAL

Analizar la expresión y función de las isoformas CK1 δ 1 y CK1 δ 2 en el desarrollo embrionario de los vertebrados, usando como modelo el pez cebra.

5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Estudiar el patrón de expresión a nivel de mRNA de las isoformas CK1 δ 1 y CK1 δ 2 mediante las técnicas de RT-PCR e hibridación *in situ*.
- 2) Estudiar la funcionalidad de CK1 δ 1 y CK1 δ 2 en el desarrollo embrionario del pez cebra, mediante ensayos de bloqueo de función a nivel de proteína a través de la microinyección de Dominantes Negativas.
- 3) Determinar el efecto de la sobre expresión de la isoformas CK1 δ 1 y CK1 δ 2 en el desarrollo embrionario del pez cebra, a través de la microinyección de cantidades conocidas del mRNA codificante.
- 4) Analizar el efecto de sobre expresión producido por la microinyección de cantidades conocidas del mRNA codificante de CK1 δ 1 y CK1 δ 2, mediante marcadores genéticos del desarrollo embrionario del pez cebra.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular del Desarrollo del Programa de Biología Celular y Molecular (ICBM) de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, durante el transcurso del año 2005 y parte del 2006.

6.1 Animales de experimentación

Se utilizaron ejemplares de pez cebra (*Danio rerio*) disponibles en acuarios manejados por el laboratorio. Los embriones utilizados para cumplir con los objetivos de este estudio se obtuvieron cruzando una hembra y un macho en tanques de 2 litros por 10 a 15 minutos. Una vez fecundados los huevos (inyectados o no), se incubaron a 28°C para permitir su normal desarrollo embrionario.

6.2 Materiales

La región codificante de las isoformas CK1δ1 y CK1δ2 clonadas previamente en el laboratorio (Burzio *et al.*, 2002) necesarias para generar el mRNA utilizado en la microinyección de los embriones, fueron subclonadas en el plasmidio PCS2.

Para generar las dominantes negativas de CK1δ1 y CK1δ2 (mutantes que generan proteínas sin actividad quinasa) los cDNA codificantes para cada

isoforma fueron mutagenizados por PCR y subclonados en el plasmidio PCS2. En ambas se modificó la actividad catalítica mediante la sustitución de un ácido aspártico (Asp) por una asparragina (Asn) en el sitio catalítico.

Las regiones 3' no codificantes de los genes de CK181 y CK182 necesarias para la obtención de las sondas antisentido utilizadas en la hibridación *in situ*, fueron subclonadas en el plasmidio Bluescript KS+.

6.3 Preparación de RNA total de embriones de pez cebra

El RT-PCR pertinente al objetivo número uno se llevó a cabo preparando RNA de la siguiente manera: En tubos Eppendorf se homogenizaron, por separado, aproximadamente 100 embriones de cada estadio del desarrollo a analizar (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%

6.4 Transcripción Reversa Acoplada a PCR (RT-PCR)

El cDNA codificante para las isoformas CK1 δ 1 y CK1 δ 2, 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 las isoformas de CK1 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 CK1 δ 1 y CK1 δ 2, en un volumen total de 10µl, que permitieron amplificar un fragmento del tamaño adecuado para cada isoforma, los que se analizaron mediante geles de agarosa al 1%. Como control de expresión se utilizaron partidores de 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.

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

Se digirieron 10 µg de cada clon de las regiones 3' no codificantes de CK181 y CK182 en el plasmidio Bluescript con la endonucleasa de restricción Not I, para la obtención de las sondas antisentido, durante 2 horas a 37°C. Luego de la digestión, los DNA plasmidiales linearizados fueron purificados mediante columnas (Jet Quick gel extraction spin kit/50, GENOMED®) y cada uno fue resuspendido en 50 µl de 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 µg de cada DNA linearizado, 1 mM ATP, 1 mM CTP, 1 mM GTP, 0,7 mM UTP, 0,3 mM digoxigenin-11-UTP, 1X Transcription Buffer, 40 unidades de RNA Polimerasa T3, 50 unidades de inhibidor de RNasa y 2 µl de H₂O DEPC. La polimerización se llevó a cabo durante 2 horas a 37°C, luego de lo cual se adicionó 5 µl DNasa I libre de RNasa y se incubó por 20 minutos más. Posteriormente se detuvo la reacción a 4°C y se procedió a la purificación de los RNA mediante columnas de Sephadex G-50 (RNA Quick Spin Columns, Boehringer Mannheim®), y finalmente ambos fueron resuspendidos en 50 µl H₂O DEPC cada uno. Los productos de la transcripción fueron posteriormente precipitados agregando 40 µl de acetato de amonio y 1 ml de etanol al 100%, en ambos tubos. Después de incubar a -20°C durante toda la noche, los RNA precipitados fueron centrifugados a 12000 rpm a 4°C en microfuga Eppendorf. Los sedimentos fueron lavados con etanol al 80%, luego de lo cual fueron recentrifugados y finalmente resuspendidos en 50 µl 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 (CK181 y CK182) en Solución de Hibridación para su posterior utilización.

6.6 Hibridación *in situ* en embriones totales

La hibridación *in situ*, requerida para cumplir con el objetivo específico número uno, se realizó como está descrita a continuación (Detrich *et al.*, 1999). Se fijaron embriones en diferentes estadios del desarrollo (3, 5, 8, 10, 17, 24, 30, 38 y 48 h.p.f.) en 4% paraformaldehído (PFA) en tampón fosfato salino (PBS) a 4°C toda la noche. Posteriormente, a los embriones se les removió su membrana coriónica manualmente con pinzas de relojero, y se deshidrataron gradualmente en soluciones con concentraciones crecientes de metanol (25%, 50%, 75% y 100%) en PBS y se guardaron a -20°C. Los embriones fueron luego rehidratados en forma gradual a través de lavados sucesivos, de 5 minutos cada uno, con las mismas soluciones anteriores pero en orden inverso. El último lavado se realizó con PBST (PBS + 0,1% Tween 20) y los embriones mayores de 24 horas post fecundación, se digirieron con proteinasa K 10 µg/ml, durante distintos lapsos de tiempo dependiendo del estadio: los de 24 h.p.f. se trataron 6 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 y lavados 5 veces por 5 minutos en PBST a temperatura ambiente. Luego todos los estadios fueron prehibridados en Solución de Hibridación (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. Después de este tiempo, la solución fue reemplazada por una que contenía las sondas de RNA antisentido correspondientes a la región 3' no codificante de

CK181 y CK182 marcadas con digoxigenina-11-UTP en una dilución de 1:100 en Solución de Hibridación (generadas en el sistema de transcripción “in vitro” del paso anterior). La hibridación se realizó durante toda la noche a 65°C. Los embriones fueron posteriormente sometidos a lavados, a 65°C durante 15 minutos cada uno, en: Solución de Hibridación, 2X SSC, para finalizar con 3 lavados en 0,2X SSC a 65°C por 30 minutos cada uno. Se procedió enseguida al bloqueo de sitios inespecíficos 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 con 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 24 horas aproximadamente a temperatura ambiente. Cuando el nivel de tinción llegó a ser adecuado, los embriones se lavaron en 3 veces por 5 minutos en PBST, se refijaron por 2 horas en PFA 4%, se lavaron nuevamente en PBST y se aclararon en glicerol 90%. Finalmente los embriones se montaron sobre portaobjeto y se observaron en la lupa.

6.7 Síntesis de mRNA para microinyección

La transcripción *in vitro* se realizó como está descrito en Detrich *et al.*, 1999. Para la síntesis de cada uno de los mRNAs utilizados en la microinyección, se digirieron 20 µg de cada clon de la región codificante de las isoformas CK181 y CK182, y también de las dominantes negativas de ambas (CK181DN y CK182DN) en el plasmidio PCS2 con la endonucleasa de restricción Not I, durante 2 horas a 37°C. Luego de la digestión, los DNA plasmidiales linearizados fueron purificados mediante columnas (Jet Quick gel extraction spin kit/50, GENOMED®) y cada uno fue resuspendido en 50 µl de H₂O DEPC. Las sondas de RNA de cada isoforma y de las dominantes negativas fueron transcritas *in vitro* con RNA polimerasa de SP6 y en presencia de CAP (7mG), para proteger la hebra de la degradación dentro de la célula inyectada. Cada reacción se realizó en una mezcla que contenía: 5 µg de cada DNA linearizado, 8 mM 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 µl 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 µl de 100 mM GTP, para posteriormente continuar la polimerización a 37°C durante 2 horas. Después de esto, se adicionó 5 µl DNasa I libre de RNasa y se incubó por 20 minutos más. Posteriormente se detuvo la reacción a 4°C y se procedió a la purificación de los RNA mediante columnas de Sephadex G-50 (RNA Quick Spin Columns, Boehringer Mannheim®). Finalmente los mRNAs fueron resuspendidos en 50 µl H₂O DEPC. Los productos de la transcripción fueron posteriormente precipitados agregando 40 µl 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 70%, luego de lo cual fueron recentrifugados y finalmente resuspendidos en 50 µl 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 todos los mRNA purificados (CK1δ1, CK1δ2, CK1δ1DN y CK1δ2DN) en H₂O DEPC con Rojo Fenol para su posterior utilización en la microinyección de embriones en estadio de una célula.

6.8 Microinyección de mRNA

La inyección del mRNA se realizó en embriones en estadio de una célula como está descrito en Detrich *et al.*, 1999. El volumen de inyección fue de 5 nl por embrión, donde el tamaño de la gota no excedió un tercio del volumen total del vitelo. Las concentraciones de mRNA inyectadas fueron determinadas después de ensayos de prueba con dosis mínimas y máximas propuestas en la literatura (Detrich *et al.*, 1999). De esta manera se estableció que la dosis óptima de inyección de los mRNAs de CK1δ1 y CK1δ2 era de 250 pg, y de 500 pg en el caso de la inyección de Dominantes Negativos de las respectivas isoformas. Los embriones inyectados, fueron incubados a 28°C y observados al microscopio para determinar las alteraciones en el desarrollo embrionario.

Como control se utilizaron dos condiciones para descartar los efectos físicos y mecánicos producidos por la inyección y las posibles anomalías presentes en embriones defectuosos o enfermos. Para descartar embriones anormales, se dejaron embriones sin inyectar de las mismas parejas utilizadas para

la inyección, observando la sobrevivencia y fenotipo. La otra condición control se llevó a cabo inyectando de 100 a 500 pg de un RNA mensajero control, que codifica para una proteína verde fluorescente (“Green Fluorescent Protein” o GFP) que permite ver como el embrión se torna de una coloración verde al ser observado bajo una lupa con sistema de fluorescencia, debido a la expresión de esta proteína en todas sus células. Esta proteína es inocua a esas concentraciones y no produce cambios fenotípicos, descartándose los efectos físicos de la microinyección.

7. RESULTADOS

7.1 Determinación de niveles relativos de expresión de RNA mensajero de CK1δ1 y CK1δ2 mediante RT-PCR.

Se determinaron los patrones de expresión de los RNA mensajeros de CK1δ1 y CK1δ2, mediante la técnica de RT-PCR. Para esto se preparó RNA total de embriones como se describe en Material y Métodos. Para la síntesis del cDNA se utilizó Oligo dT como partidador para la transcripción inversa y partidores específicos para CK1δ1 y CK1δ2 en el PCR de amplificación. Como se observa en la figura 8 existe expresión de ambas isoformas desde las 3 horas post fecundación (h.p.f), lo que nos indica un componente materno, además del componente cigótico que comienza a partir de las 3 h.p.f (en la transición de la blástula media).

Como control de expresión, se utilizaron partidores que amplifican β-actina, que se expresa en cantidad constante desde los primeros estadios del desarrollo embrionario (ver figura 10).

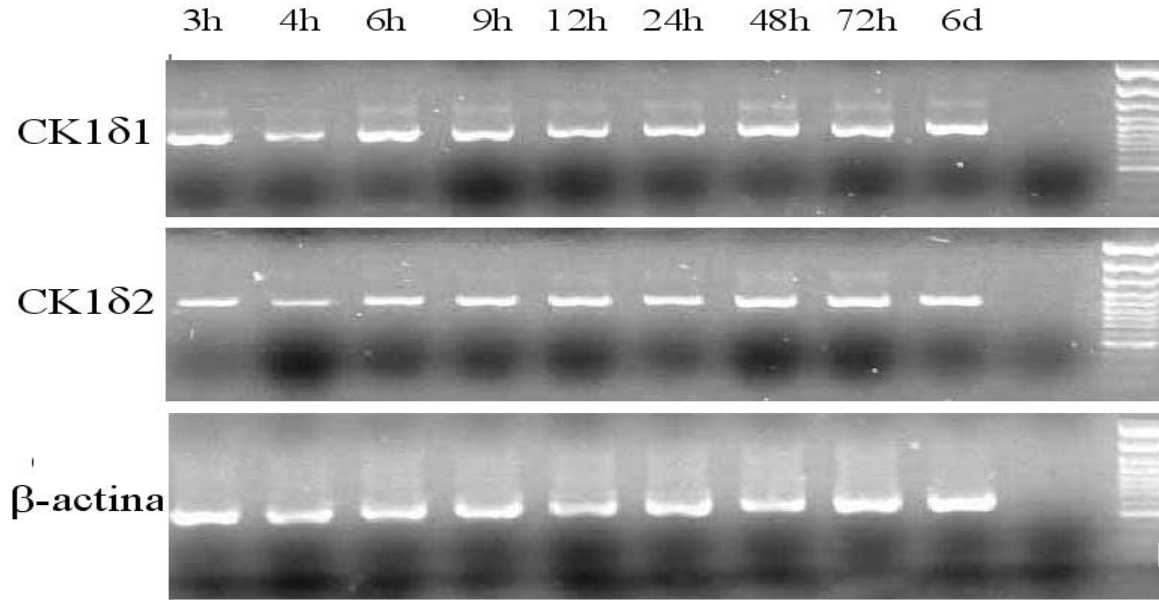


Figura 10: Amplificación del mRNA de CK1δ1, CK1δ2 y del control de β-actina mediante RT-PCR de embriones de pez cebra. Se muestra la expresión de CK1δ1, CK1δ2 y del control de β-actina en diferentes etapas del desarrollo embrionario: 3h (3 h.p.f), 4h (4 h.p.f), 6h (60% epibolía), 9h (90% epibolía), 12h (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.

Se procedió a realizar hibridación *in situ* para determinar el patrón de expresión de CK1δ1 y CK1δ2 en el desarrollo embrionario del pez cebra. Para esto se utilizaron sondas de RNA transcritas *in vitro* y marcadas con digoxigenina-11-UTP. Las sondas fueron incubadas con un anticuerpo anti-digoxigenina conjugado a fosfatasa alcalina que es finalmente detectado por su sustrato, dando una coloración morada en aquellas partes donde se detecta el mRNA. Las sondas se derivaron de las secuencias correspondientes a las regiones 3' no

codificante (3' UTR), que son únicas para cada mRNA y por lo tanto altamente específicas.

En el caso de CK1 δ 1, los estadios de 3 a 8 h.p.f (80% epibolía), presentan una expresión ubicua (figura 11A-C). Sin embargo a las 8 h.p.f aparece una fuerte expresión restringida a la placa neural (región dorsal del embrión, figura 11C), como lo indica la co-expresión con BMP2b (figura 11D), marcador de la zona ventral y lateral del embrión. La figura 11E muestra, como control, la expresión de BMP2b en un embrión de 80% de epibolía. En estadios posteriores (10, 17, 24 y 48 h.p.f.) la expresión se restringe al cerebro (figura 11F-L). La tinción del embrión en 24 h.p.f. (figura 11H) indica que la expresión es fundamentalmente cefálica (telencéfalo, diencefalo, mesencéfalo, cerebelo, romboencéfalo) aunque es posible detectar un bajo nivel de tinción hacia caudal. A las 30 h.p.f. (figura 11I, J), la expresión de CK1 δ 1 está ubicada en diencefalo, mesencéfalo, cerebro y rombómeros. A las 48 h.p.f. la expresión se restringe al tegmentum del cerebro, cerebelo, retina y romboencéfalo (ver figura 11K y L).

La isoforma CK1 δ 2 muestra ubicuidad en su expresión entre los estadios 3 a 24 h.p.f. (figura 12 A-F). En el estadio de 24 h.p.f. se puede ver la diferencia de expresión entre la región cefálica (telencéfalo, diencefalo, mesencéfalo, romboencéfalo) donde es más fuerte, con respecto a la región caudal. A las 30 h.p.f. la expresión se restringe a la región anterior: telencéfalo, diencefalo, mesencéfalo y rombómeros (ver figura 12 G), al igual que a las 38 h.p.f., donde la expresión es eminentemente cefálica (figura 12H). A las 48 h.p.f. el RNA mensajero de CK1 δ 2 se encuentra en el tegmentum del cerebro, cerebelo, romboencéfalo, retina y levemente en el primordio de las aletas pectorales, como se puede observar en la figura 12 J e I.

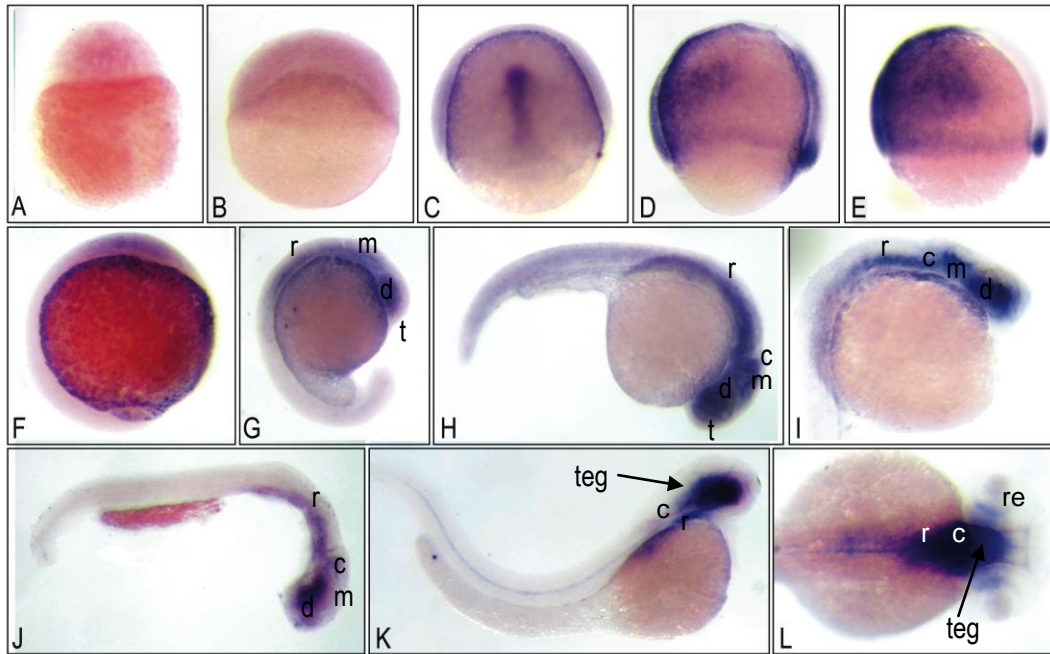


Figura 11: Hibridación “*in situ*” de $CK1\delta1$ de embriones de pez cebra. Los embriones de distintos estadios fueron incubados con la sonda antisentido de $CK1\delta1$ transcrita *in vitro*, en presencia de digoxigenina-11-UTP. (A) 3 h.p.f. (B) 4 h.p.f. (C) 8 h.p.f. (vista dorsal) (D) 8 h.p.f. coexpresión de $CK1\delta1$ y BMP2b (vista lateral, dorsal a la derecha), (E) 8 h.p.f. expresión de BMP2b, (F) 10 h.p.f. (vista lateral), (G) 17 h.p.f. (vista lateral), (H) 24 h.p.f. (vista lateral), (I) 30 h.p.f. (detalle cerebro, vista lateral), (J) 30 h.p.f. (vista lateral de embrión completo), (K) 48 h.p.f. (vista lateral) y (L) 48 h.p.f. (vista superior). La nomenclatura utilizada es la siguiente: t (telencéfalo), d (diencéfalo), c (cerebelo), m (mesencéfalo), r (rombómeros), re (retina) y teg (tegmentum).

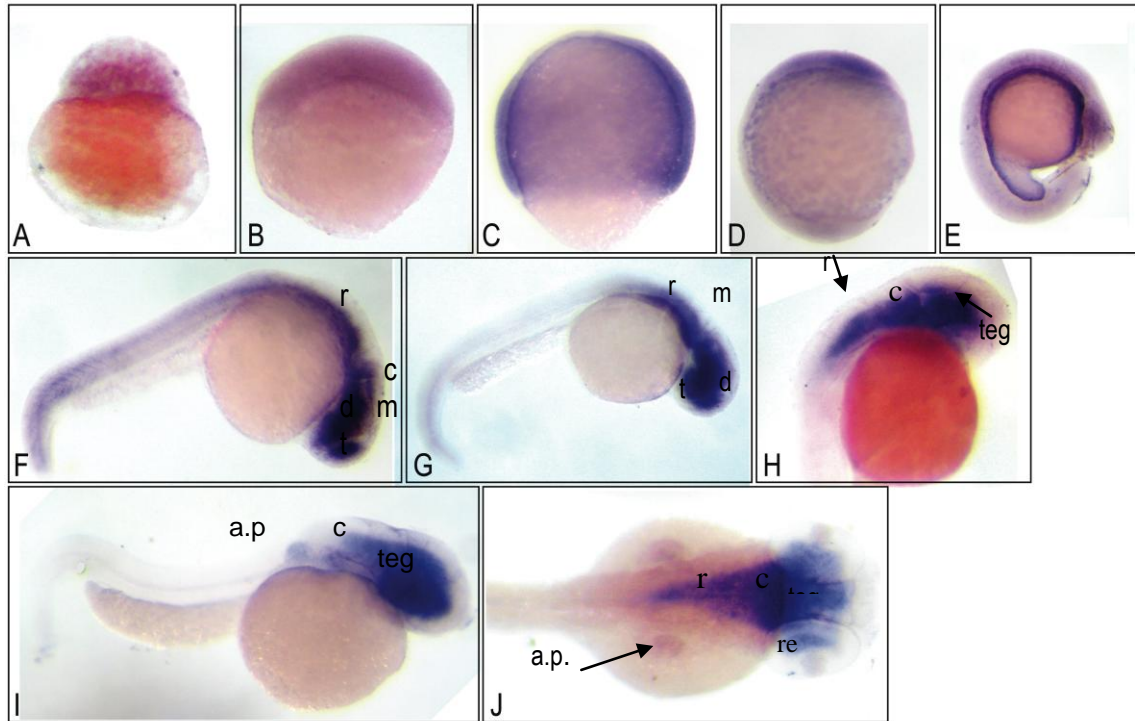


Figura 12: Hibridación *in situ* de $CK1\delta 2$ de embriones de pez cebra. Los embriones de distintos estadios fueron incubados con la sonda antisentido de $CK1\delta 2$ transcrita *in vitro*, en presencia de digoxigenina-11-UTP. (A) 3 h.p.f. (B) 4 h.p.f. (C) 8 h.p.f. (80% epibolia), (D) 10 h.p.f. (vista lateral), (E) 17 h.p.f. (vista lateral), (F) 24 h.p.f. (vista lateral), (G) 30 h.p.f. (vista lateral), (H) 38 h.p.f. (detalle cerebro, vista lateral) (I) 48 h.p.f. (vista lateral) y (J) 48 h.p.f. (vista superior). La nomenclatura utilizada es la siguiente: t (telencéfalo), d (diencéfalo), c (cerebelo), m (mesencéfalo), r (rombómeros), a.p (aletas pectorales), teg (tegmentum) y retina (re).

7.3 Análisis de Función de CK1δ1 y CK1δ2 mediante la inyección de cantidades conocidas del mRNA de estas isoformas.

Se procedió a microinyectar diferentes concentraciones del mRNA codificante para CK1δ1 y CK1δ2 protegido con Cap para evitar su degradación dentro del embrión. Este ensayo se utiliza para estudiar la función de ambas isoformas en el desarrollo embrionario del pez cebra.

En los siguientes experimentos, los embriones fueron inyectados con un volumen de gota de 5nl en estadio de una célula, en el límite entre el vitelo y el polo animal (YSL). El número de embriones inyectados fue mayor a 50 y los controles, tanto los inyectados con GFP (mRNA que produce fluorescencia, pero ninguna modificación fenotípica) como el control sin inyectar, fueron fenotípicamente normales. Además, la cantidad de embriones muertos nunca sobrepasó el 10% del total de embriones. Los fenotipos producidos fueron estudiados a las 48 horas post fecundación y son descritos a continuación.

7.3.1 Inyección de mRNA codificante para la isoforma CK1δ1.

Se procedió a inyectar el mRNA de la isoforma CK1δ1 para poder analizar el efecto de la sobre expresión en el desarrollo embrionario del pez cebra. Se inyectaron diferentes concentraciones del RNA mensajero de la isoforma CK1δ1, obteniendo un fenotipo dosis dependiente. Al inyectar 100 pg del mRNA casi no se obtuvo efecto, ya que más del 90% de los embriones tuvieron fenotipo normal, pero se vislumbraron algunos fenotipos que tenían que ver con

anormalidades en el desarrollo de cabeza y ojos (embriones sin ojos, ojos con un tamaño menor al normal) que llegó al 5% (figura 13).

Cuando incrementamos la concentración del mRNA inyectado a 250 pg, aumentan considerablemente el número de embriones anormales, llegando al 65%, donde los fenotipos que predominan son los embriones sin ojos con un 34% (ver figura 16) y los embriones con ojos más pequeños de lo normal, con un 28%. Además, se contabilizó un bajo porcentaje de embriones ciclóticos y sin forma (1%). Aquellos embriones con alteración visible en la formación de los ojos, también manifestaron un menor desarrollo de cerebro anterior. Los embriones con un fenotipo aparentemente normal, alcanzaron un 35% (figura 14).

Al aumentar aún más la concentración del mRNA de CK1δ1 inyectado (350 pg), nos encontramos con un alto porcentaje de embriones sin ojos, que llegó al 57% (figura 15). Otras alteraciones de la formación de los ojos vistas en los embriones inyectados se describen a continuación: asimetría en ambos ojos (siendo ambos más pequeños de lo normal, pero de diferente tamaño o un ojo normal y el otro pequeño; ver figura 18), ambos ojos pequeños de igual tamaño, o un ojo normal y carencia del otro, o un ojo pequeño y carencia del otro (ver figura 17). Estas alteraciones se produjeron en el 22% de los embriones inyectados. Además se observaron embriones curvos que llegaron al 26% del total inyectado, siendo solo un 12% de los embriones contabilizados, aparentemente normales (figura 15).

Analizamos el progreso de los embriones inyectados con 250 y 350 pg del mRNA codificante de CK1δ1, para analizar su viabilidad en el tiempo y evaluar

los fenotipos. A los 5 días post fecundación, aquellos embriones que manifestaron alteraciones en la formación de ojos, desarrollaron una mandíbula anormal en forma de “trompa”, la cual podría explicarse por el menor desarrollo de cerebro anterior (figura 19).

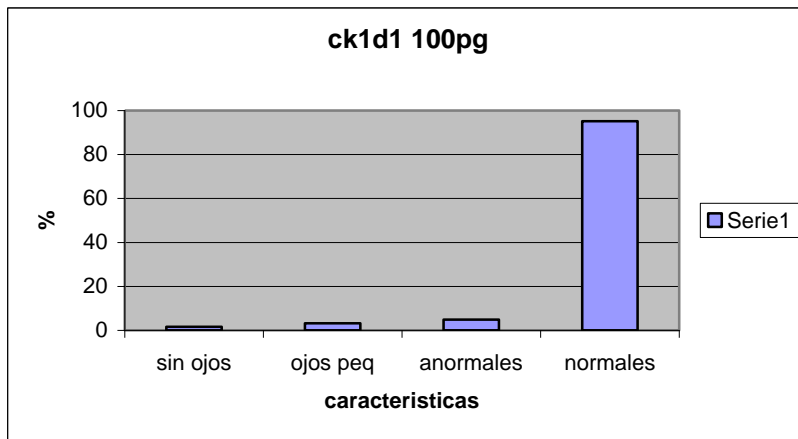


Figura 13: *Inyección de 100 pg del mRNA de CK1δ1.* Existe un 95% de embriones normales del total inyectado, y el 5% restante corresponde a embriones sin ojos o con ojos más pequeños de lo normal.

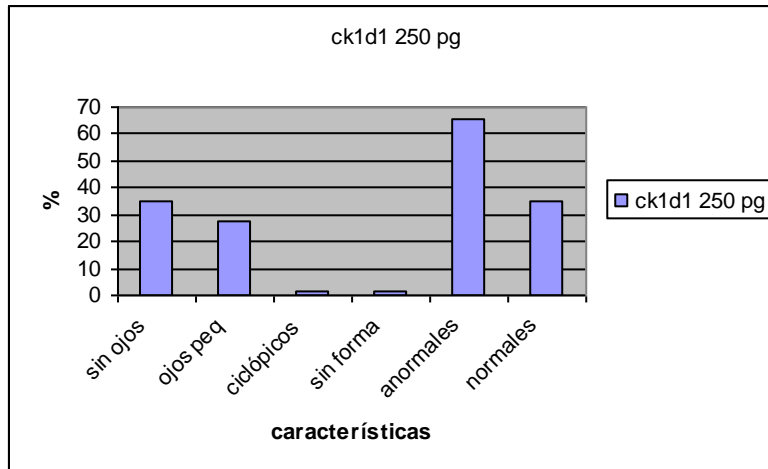


Figura 14: Fenotipos de embriones de pez cebra (48 h.p.f) inyectados con 250 pg del mRNA codificante de CK1δ1. Se observa un porcentaje alto de embriones anormales (65%), siendo el fenotipo predominante los embriones sin ambos ojos (34%) y embriones con ojos pequeños y/o asimétricos (28%).

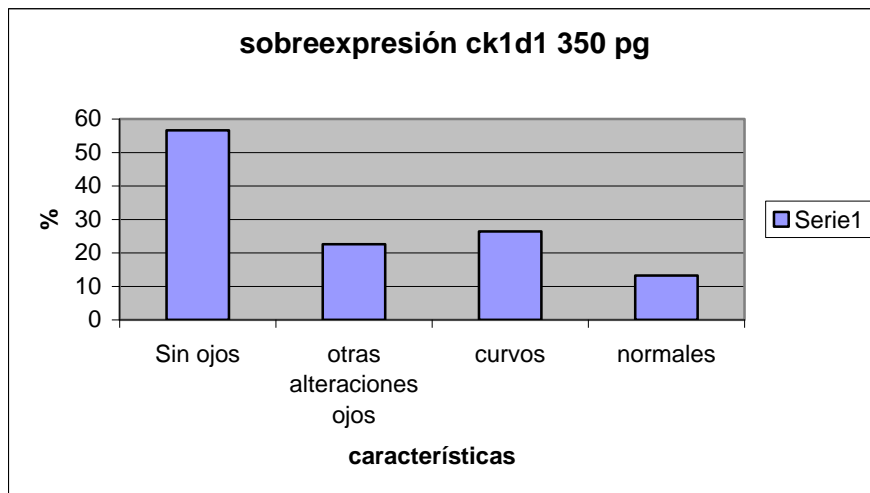


Figura 15: Resultados de los fenotipos a las 48h.p.f, de embriones inyectados con 350 pg del mRNA de CK1δ1. Se muestra el porcentaje de embriones sin ojos que llegan al 57% y el porcentaje de embriones curvos que llegan al 26%. Otras alteraciones en los ojos se refieren a embriones con un solo ojo normal, ojos asimétricos u ojos pequeños, que llega al 22%. Los embriones inyectados que no muestran fenotipo llegan al 12%.

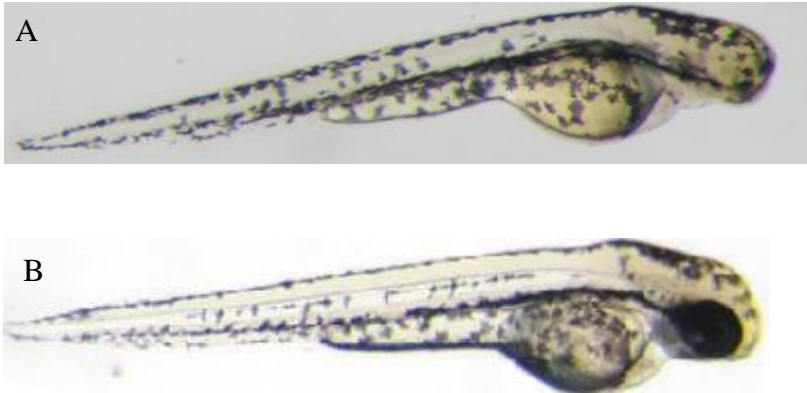


Figura 16: *Embriones de 48 horas, vista lateral.* (A) Embrión inyectado con 250 pg de CK1 δ 1, se puede observar la pérdida de ambos ojos y de parte de su masa cefálica. (B) Embrión control con GFP, con fenotipo normal.

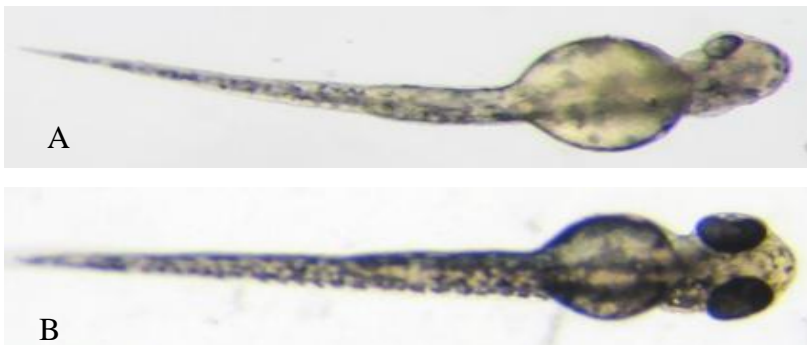


Figura 17: *Embriones de 48 horas, vista ventral.* (A) embrión inyectado con 350 pg de CK1 δ 1, donde se puede observar que el embrión carece del ojo izquierdo, mientras que el derecho, no se desarrolló en forma normal. (B) Embrión control inyectado con GFP.



Figura 18: *Embriones de 48 horas, vista dorsal.* (A) Embrión inyectado con 350 pg del mRNA codificante de CK1 δ 1, donde se aprecia malformaciones en la cabeza y mal desarrollo de ambos ojos, mostrando un fenotipo de ojos asimétricos. (B) Embrión control, inyectado con GFP.

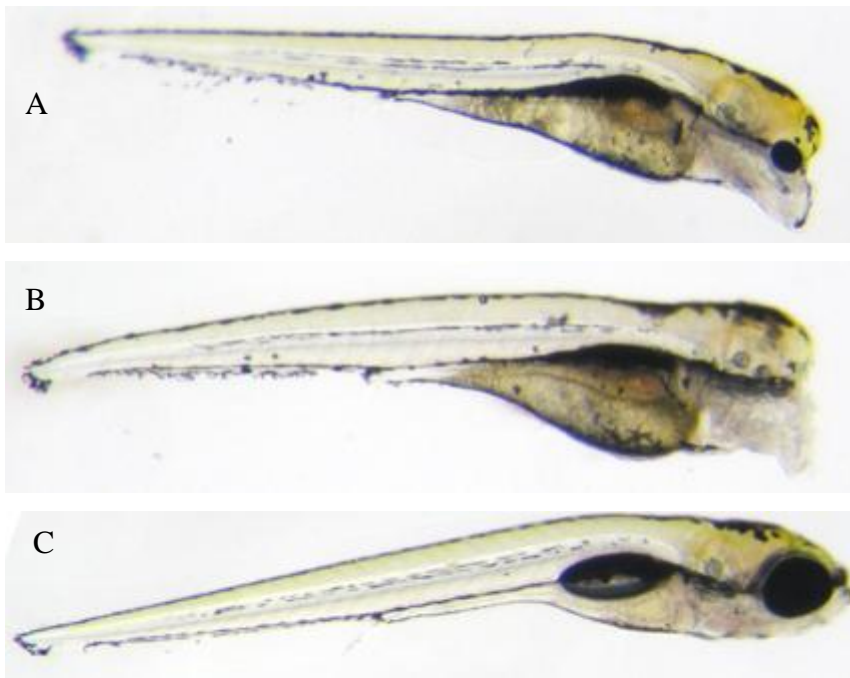


Figura 19: *Embriones de 5 días post fecundación, vista lateral.* En (A) y en (B) se pueden observar diferentes grados de malformación de cabeza y de ojos en embriones inyectados con 250 pg de CK1 δ 1. La “trompa” que se observa en ambos embriones correspondería a un crecimiento anormal de la mandíbula por el crecimiento insuficiente del cerebro anterior. En (C) se observa el fenotipo normal de un embrión de 5 días perteneciente al control inyectado con GFP.

7.3.2 Inyección de mRNA codificante para la isoforma CK1δ2

Se procedió a inyectar el mRNA de la isoforma CK1δ2 para poder analizar el efecto de la sobre expresión en el desarrollo embrionario del pez cebra. Al igual que en lo descrito en la isoforma CK1δ1, se utilizaron diferentes concentraciones del RNA mensajero, obteniendo fenotipos similares, aunque más dispersos que en el caso de la isoforma CK1δ1. Cuando inyectamos 100 pg del mRNA, no hubo efecto, ya que casi la totalidad de embriones inyectados obtuvieron un fenotipo aparentemente normal.

Al inyectar 250 pg, el fenotipo normal se redujo al 59%, mientras que los embriones que presentaban alguna alteración, se repartieron en 5 fenotipos diferentes, que involucraban alteración en el desarrollo del cerebro anterior y de los ojos. Estos fenotipos fueron: embriones ciclópicos (10% de los fenotipos alterados, ver figura 22A), con un ojo pequeño (10% de los fenotipos), ojos asimétricos (7%, ver figura 22B), un ojo normal (7%) y sin ojos (7%) (figura 20). Con la inyección de 350 pg, se obtuvieron resultados muy similares en cuanto a los fenotipos y sus porcentajes. Según estos resultados la isoforma CK1δ1 tendría mayor efecto en estas concentraciones que la isoforma CK1δ2 (figura 23).

Al tener poco efecto con la concentración anterior, se decidió inyectar 700 pg del mRNA codificante de CK1δ2. Con esa concentración se obtuvo un 60% de embriones alterados en la formación de los ojos, siendo la mitad de éstos ciclópicos. Los demás se repartieron en embriones sin ojos, ojos asimétricos y un ojo (pudiendo ser normal o más pequeño que el normal) con 10% cada uno (figura 21). Los embriones sin ojos encontrados presentaron un eje antero posterior acortado.

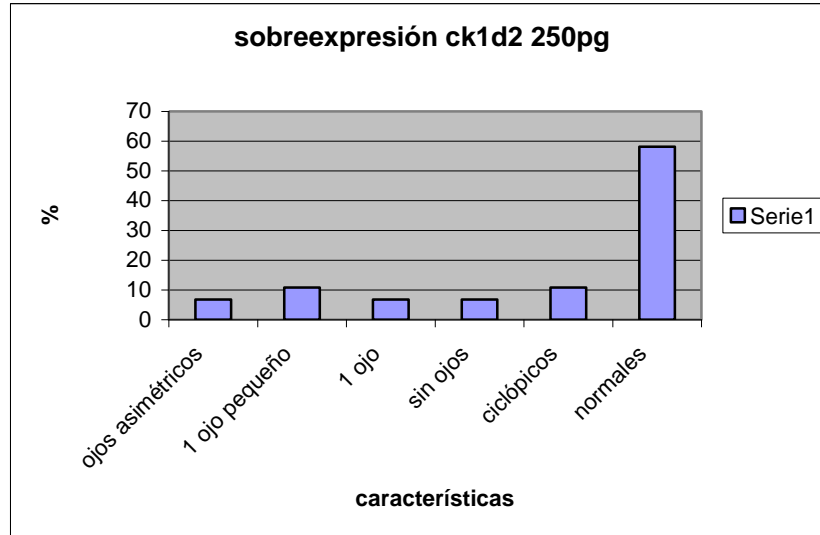


Figura 20: Fenotipos encontrados a las 48 h.p.f, al inyectar 250 pg del RNA codificante para CK1 δ 2. Los resultados obtenidos se relacionan a alteraciones en la formación de ojos, teniendo porcentajes similares de ojos asimétricos, un ojo pequeño, un ojo normal, embriones sin ojos y ciclópicos, con un porcentaje que rodea el 10%. En este caso existen casi un 60% de embriones normales.

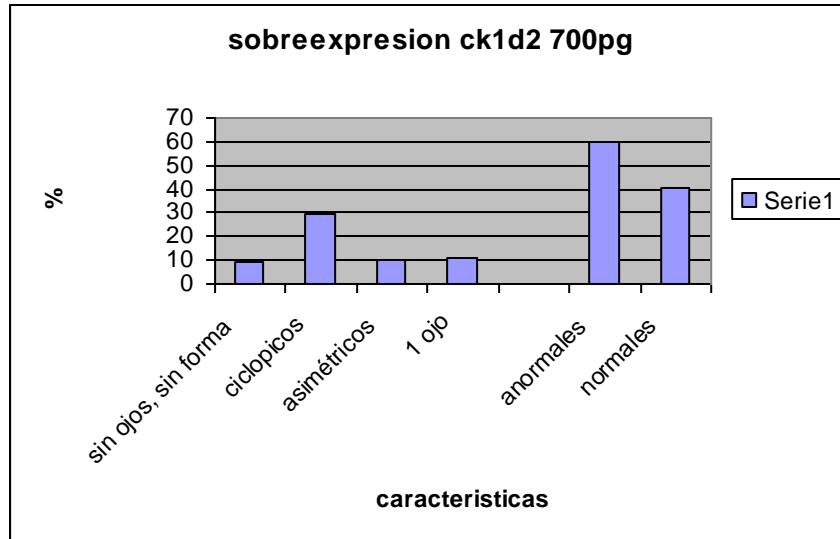


Figura 21: Fenotipos resultantes de la inyección de 700 pg del RNA codificante para *CK1δ2*, en embriones de 48 h.p.f. En los fenotipos obtenidos, que llegan a un 60%, se observan alteraciones en la formación de los ojos, donde la mitad de los embriones anormales muestran distintos grados de ciclopía (alrededor de un 30%), mientras que los restantes muestran ojos asimétricos (10%), un ojo normal (11%) y algunos embriones no poseían una forma definida en su eje antero posterior, además de no poseer ojos (10%).

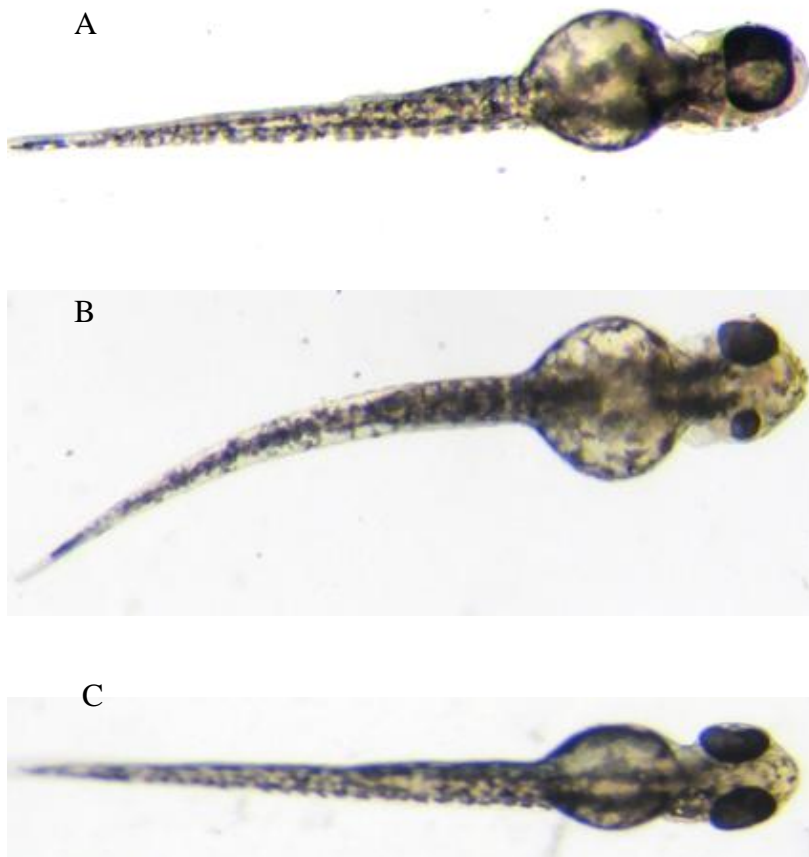


Figura 22: *Embriones de 48 horas post fecundación, vista ventral. (A) y (B) son embriones inyectados con 250 pg del RNA codificante para CK1δ2. En (A) se observa un embrión ciclópico que es el fenotipo más frecuentemente encontrado con la sobre expresión de CK1δ2. En (B) se observa un embrión con ojos asimétricos y con su eje antero-posterior curvado. (C) Embrión inyectado con el control GFP, de fenotipo normal.*

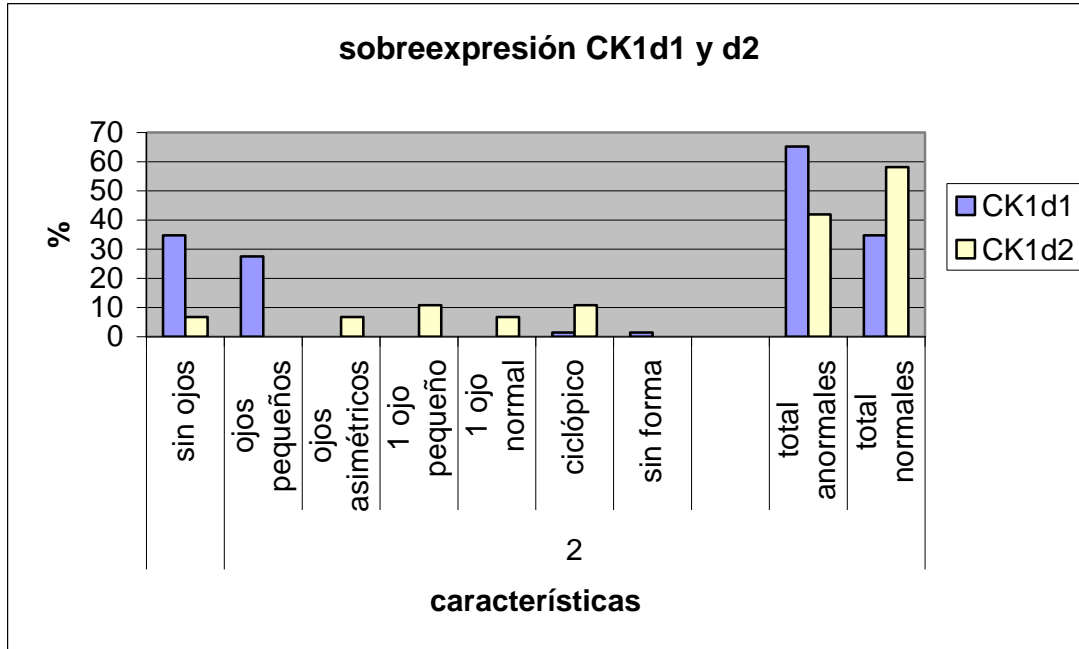


Figura 23: Comparación de los fenotipos encontrados en embriones de 48 h.p.f, con la inyección de CK1δ1 y CK1δ2 con 250 pg del RNA codificante respectivo. Se muestra CK1δ1 de azul y CK1δ2 de amarillo. Se puede observar de los resultados obtenidos, que la cantidad de embriones con alguna alteración llegó al 65% de los embriones inyectados con CK1δ1 y 40% con CK1δ2, de los cuales el fenotipo que más destaca en el caso del primero, son los embriones sin ojos con casi un 35% de los embriones totales, seguido del fenotipo de embriones con ojos pequeños con un 28%. Los fenotipos producidos por CK1δ2, en cambio, tienen porcentajes bajos y similares entre si, destacando el embrión ciclópico y el fenotipo con un ojo pequeño con 10% cada uno, del total de embriones inyectados.

7.4 Inyección del mRNA codificante para las Dominantes Negativas de CK1δ1 y CK1δ2 en embriones de pez cebra.

Para desarrollar el objetivo específico número dos, se procedió a bloquear la función de CK1δ1 y CK1δ2, mediante la inyección del RNA mensajero codificante para la Dominante Negativa respectiva a cada isoforma.

La secuencia de ambas isoformas fueron mutagenizadas mediante PCR para permitir la síntesis de una proteína similar a la endógena, pero con modificación del sitio catalítico, y por lo tanto sin actividad quinasa. Esta proteína mutante compite por la unión al sustrato con la proteína endógena, inhibiendo en parte su función.

Al igual que la inyección del RNA mensajero codificante para CK1δ1 y CK1δ2, en las microinyecciones de las Dominantes Negativas, el total de embriones inyectados fue mayor a 50 y los controles, tanto los inyectados con GFP (mRNA que produce fluorescencia, pero ninguna modificación fenotípica) como el control sin inyectar fueron fenotípicamente normales. Además, la cantidad de muertos nunca sobrepasó el 10% de los embriones inyectados. Los embriones fueron inyectados con 5 nl del mRNA en el límite entre el vitelo y el polo animal (YSL) y fueron estudiados fenotípicamente el día 2 post fecundación.

7.4.1 Inyección de mRNA codificante para la Dominante Negativa de la isoforma CK1δ1.

Se procedió a bloquear la función de CK1δ1 en el desarrollo embrionario del pez cebra, mediante la inyección del mRNA codificante para la dominante negativa de esta isoforma. Primeramente, se inyectó 1 ng del mRNA para ver el efecto de la inhibición competitiva en el fenotipo del pez cebra. El resultado fue que alrededor del 67% de los embriones poseyeron un fenotipo anormal, presentando un 48% un fenotipo dorsalizado y/o acortado, un 47% presentó

ciclopía, y un 45% de los embriones inyectados presentaron un eje antero-posterior curvado (figura 24).

Cuando bajamos la concentración del mRNA inyectado a la mitad (500 pg), los embriones acortados en su eje antero posterior y/o dorsalizados, refiriéndose este término, al aumento de estructuras dorsales en desmedro de las ventrales (se reconoce una cabeza de mayor tamaño de lo normal y una cola corta y disminuida, ver figura 28) disminuyeron a un 19%, mientras que los embriones ciclópicos representaron un 14% de los embriones totales inyectados. Los embriones curvados en su eje antero-posterior llegaron a un 33%, mientras que aquellos embriones fenotípicamente normales llegaron a un 54% (figura 25).

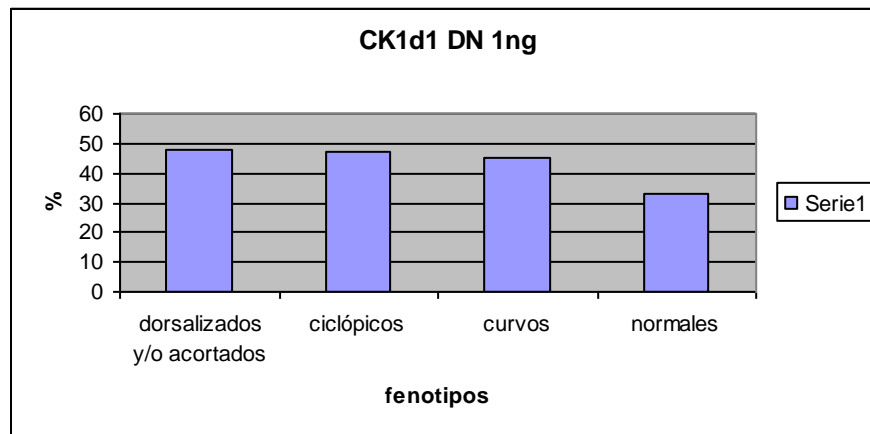


Figura 24: Fenotipos obtenidos en embriones de 48 h.p.f, inyectados con 1 ng del dominante negativo de *CK1δ1*. Se puede observar la gran cantidad de embriones ciclópicos y dorsalizados, los que sobrepasan el 47% y el 48% respectivamente, del total de embriones inyectados. En tanto, los embriones curvados en su eje antero posterior, llegaron al 45%. Los embriones sin alteraciones fenotípicas llegaron al 33%.

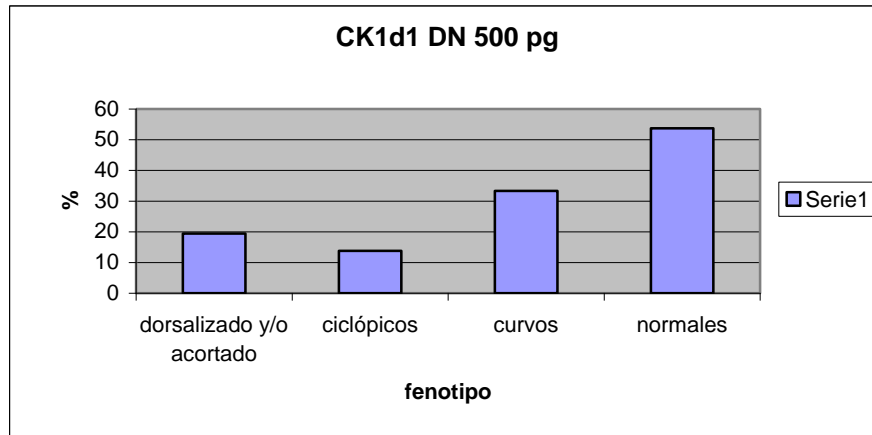


Figura 25: Fenotipos encontrados en embriones de 48 h.p.f inyectados con 500 pg del dominante negativo de CK1 δ 1. En este caso, los embriones que presentaron ciclopía llegaron a un 14%, en cambio, los embriones acortados y/o dorsalizados llegaron a un 19% de los embriones totales inyectados. Los embriones curvos y normales (sin alteración fenotípica) tuvieron un porcentaje de 33% y 54% respectivamente.

7.4.2 Inyección de mRNA codificante para la Dominante Negativa de la isoforma CK1 δ 2.

Se procedió a inyectar el RNA mensajero codificante para la dominante negativa de CK1 δ 2, para bloquear la función de esta isoforma en el desarrollo embrionario del pez cebra. Al igual que lo realizado en la isoforma CK1 δ 1, se inyectó 1 ng del mRNA para observar los fenotipos encontrados. En este caso los embriones normales fenotípicamente solo llegaron al 18%, existiendo una alta cantidad de embriones anormales. La gran mayoría de los embriones inyectados (79%) presentaron un fenotipo de eje antero posterior acortado y/o dorsalizado (ver figura 28B) y un 23% presentó un eje antero posterior curvado. De éstos, la mitad presentó ciclopía (figura 26).

Al bajar la concentración a la mitad (500 pg), se encontraron exactamente los mismos fenotipos, en diferente proporción: 40% de embriones acortados en su eje y/o dorsalizados y 20% de embriones con diferentes grados de curvatura en su eje antero-posterior. El 15% de los fenotipos mencionados presentó ciclopía, mientras que el total de embriones inyectados con fenotipo aparentemente normal llegó al 40% (figura 27).

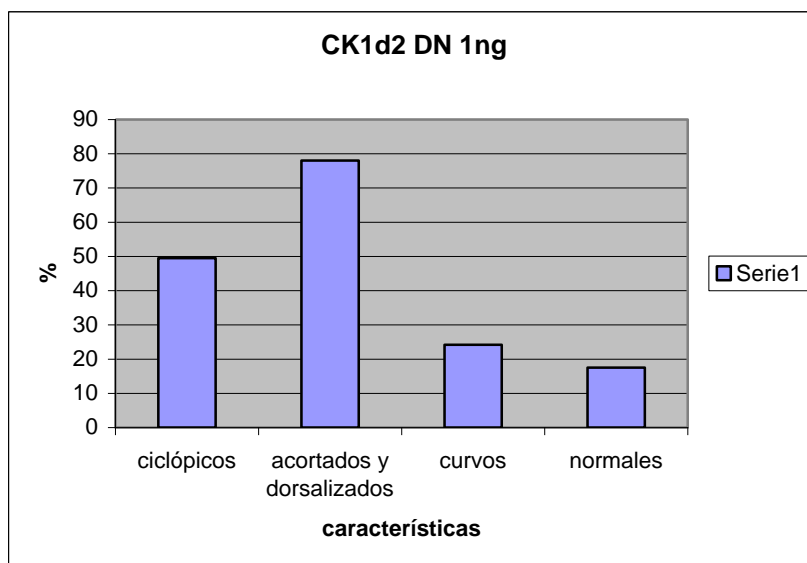


Figura 26: Fenotipo encontrado a las 48 h.p.f, en embriones inyectados con 1 ng del dominante negativo de $CK1\delta 2$. Se observa la gran cantidad de embriones con eje antero- posterior acortado y/o dorsalizados (mayor desarrollo de los órganos anteriores en desmedro de los posteriores), llegando casi al 80% de los embriones inyectados. De éstos, la mitad presentó ciclopía. Casi un 25% de los embriones presentaron algún grado de curvatura en su eje y los embriones sin fenotipo anormal visible, llegó solamente al 18%.

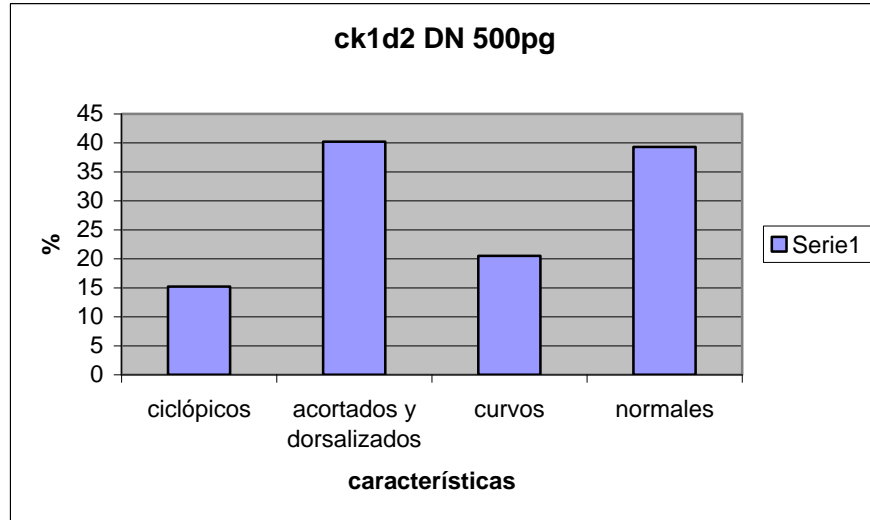


Figura 27: Fenotipos encontrados en embriones de 48 h.p.f. inyectados con 500 pg del dominante negativo de CK1 δ 2. Se observa que el 40% de los embriones inyectados se formaron acortados y/o dorsalizados, porcentaje similar a los embriones con fenotipo normal. Del total, un 15% de los embriones mostró ciclopía y alrededor de un 20% tuvo un eje antero-posterior curvado.

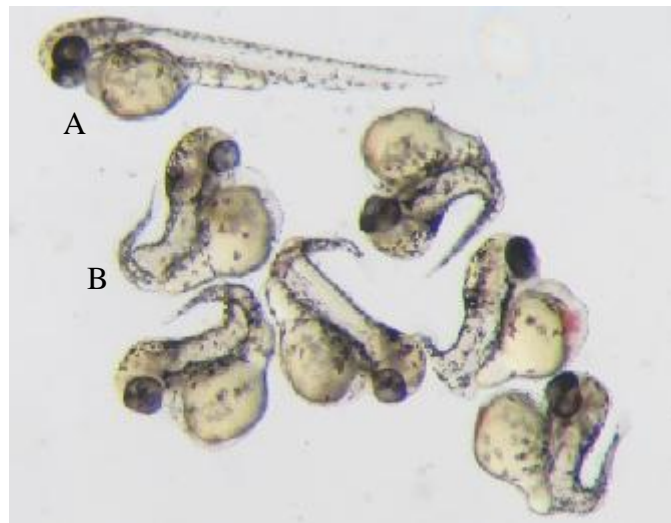


Figura 28: Embriones de 48 h.p.f. inyectados con 1ng del dominante negativo de CK1 δ 2, comparados con un embrión control GFP con fenotipo normal. En la foto se puede observar un embrión de fenotipo normal (A), comparado con embriones acortados en su eje antero posterior, dorsalizados y ciclópicos (B).

7.5 Análisis de la sobreexpresión de CK1δ1 y CK1δ2 producido por la inyección del mRNA codificante respectivo a cada isoforma, mediante el uso de marcadores genéticos en embriones de pez cebra.

Para obtener una idea general de los eventos y vías en que estarían participando las isoformas CK1δ1 y CK1δ2 en el desarrollo embrionario del pez cebra, se procedió a analizar 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 sobreexpresar la función de ambas isoformas mediante la inyección de 350 pg del mRNA codificante de CK1δ1 y CK1δ2 en embriones de estadio de una célula. Éstos fueron posteriormente fijados con PFA 4% en los estadios de 70% epibolía, 90% epibolía o “tail bud” (100% epibolía) según el marcador genético usado.

Finalmente, estos embriones fueron sometidos a hibridación *in situ* con las sondas de RNA marcadas con digoxigenina-11-UTP, de los distintos genes marcadores. Para cada marcador fueron analizados 10 embriones. Como control se utilizaron embriones inyectados con 350 pg de GFP, mRNA inocuo para el embrión. Los marcadores utilizados fueron Goosecoid, Pax2.1, Six3, Vox, Dlx3 y Rx3.

7.5.1 Análisis del patrón de expresión de Goosecoid en embriones inyectados con el mRNA codificante de CK1δ1 y CK1δ2.

Se realizó hibridación *in situ* con la sonda del gen marcador del territorio dorsal Goosecoid (*Gsc*) sobre un grupo de embriones inyectados con 350 pg del

mRNA codificante de CK1 δ 1 y CK1 δ 2 y sobre otro grupo de embriones inyectado con 350 pg del control GFP, fijados en el estadio de “tail bud” (10 h.p.f).

Como se ve en la figura 29, tanto en los embriones inyectados con CK1 δ 1 como los inyectados con CK1 δ 2, se pudo observar una notable modificación en el patrón de expresión de este marcador, respecto al control inyectado con GFP. En estadios tempranos (60% de epibolia), *Gsc* marca el Escudo embrionario, precursor de las futuras estructuras dorsales. Posteriormente en el estado de “tail bud”, se expresa en la placa precordial y en diencéfalo y telencéfalo presuntivo, es decir, en el cerebro anterior. En los embriones inyectados con CK1 δ 1 y CK1 δ 2 se observa una fuerte disminución de la expresión de *Gsc*, lo que puede explicar el fenotipo de los embriones inyectados con estas isoformas de CK1, que muestran embriones con un desarrollo anormal de cerebro anterior y de los ojos, e incluso carencia de éstos.

7.5.2 Análisis del patrón de expresión de Pax2.1 y Six3 en embriones inyectados con el mRNA codificante de CK1 δ 1 y CK1 δ 2

Un grupo de embriones inyectados con 350 pg del mRNA codificante de CK1 δ 1 y CK1 δ 2, 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. Paralelamente y como control, otro grupo de embriones fue inyectado con 350 pg de GFP. Como se puede apreciar en la figura 30, existe una

clara diferencia en la expresión de ambos genes entre los embriones inyectados con CK1 δ 1, CK1 δ 2 y el GFP control. Los embriones inyectados con el mRNA codificante de CK1 δ 1 tienen una notable menor expresión de Six3 (marcador de cerebro anterior). Este resultado concuerda con el fenotipo observado al sobreexpresar este gen (falta de cerebro anterior y ojos). Estos embriones también muestran una expresión de Pax2.1 relativamente normal o expandida (figura 30B). Los embriones inyectados con el mRNA codificante de CK1 δ 2, en cambio, poseen una reducción leve en el patrón de expresión de Six3 (con un aspecto difuso). Algunos de los embriones inyectados, muestran una posteriorización en la expresión de este marcador (figura 30E). Pax2.1, aparece expandido hacia anterior en su expresión (figura 30E). Esto puede explicar una menor alteración del cerebro y ojos en los embriones inyectados con CK1 δ 2 comparado con CK1 δ 1, además de una posible posteriorización de las estructuras cerebrales anteriores.

7.5.3 Análisis de expresión de Vox en embriones inyectados con el mRNA codificante de CK1 δ 1 y CK1 δ 2.

Se realizó hibridación in situ sobre un grupo de embriones inyectados con 350 pg del mRNA codificante de CK1 δ 1 y CK1 δ 2 y sobre otro grupo inyectado con GFP, fijados en el estadio de 70% epibolía (7 h.p.f), con la sonda del gen marcador de territorio ventral Vox. Este gen se expresa en ectodermo y mesodermo ventral, y es regulado por BMP y Wnt. Como se puede apreciar en la figura 31, tanto CK1 δ 1 como CK1 δ 2 presentaron una expansión de la expresión de Vox hacia dorsal, con respecto al control inyectado con GFP. Vox es requerido para la represión de los genes dorsalizantes secretados por el Escudo

embrionario, tales como *goosoid* y *chordine*, en el lado ventral del embrión. Su función evita que en el mesodermo y ectodermo ventral se formen estructuras neurales. El aumento de expresión de *Vox* en los embriones inyectados con CK1 δ 1 y CK1 δ 2, podría explicar en parte la disminución de la expresión de *Gsc* y las anomalías cerebrales presentadas por los embriones.

7.5.4 Análisis del patrón de expresión de Rx3 en embriones inyectados con el mRNA codificante de las isoformas CK1 δ 1 y CK1 δ 2.

Se realizó hibridación *in situ* con la sonda del gen marcador *Rx3*, sobre un grupo de embriones inyectados con 350 pg de CK1 δ 1 y CK1 δ 2, y otro grupo inyectado con 350 pg 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. Como se observa en la figura 32, la expresión de *Rx3* desaparece en los embriones inyectados con CK1 δ 1. Esto puede estar explicando la gran cantidad de embriones sin ojos presenciados al inyectar esta isoforma. En los embriones inyectados con CK1 δ 2, existe una reducción notable de la expresión de *Rx3*, en comparación con el control GFP. Este resultado concuerda con los fenotipos obtenidos con la sobre expresión de esta isoforma, que presentaban anomalías en la formación de los ojos.

7.5.5 Análisis del patrón de expresión de Dlx3 en embriones inyectados con el mRNA codificante de CK1δ1 y CK1δ2.

Se realizó hibridación in situ con la sonda del gen marcador de epidermis Dlx3, sobre un grupo de embriones inyectados con 350 pg del mRNA codificante de CK1δ1 y CK1δ2, y sobre otro grupo inyectado con 350 pg de GFP, que posteriormente fueron fijados a 90% epibolía (9 h.p.f.). Tanto en CK1δ1 como CK1δ2, se pudo observar una expansión de Dlx3 hacia dorsal, en comparación con el control GFP (figura 33). Esto estaría explicando un mayor desarrollo del ectodermo no neural, en desmedro del neuroectodermo, manifestándose en un menor desarrollo de cerebro.

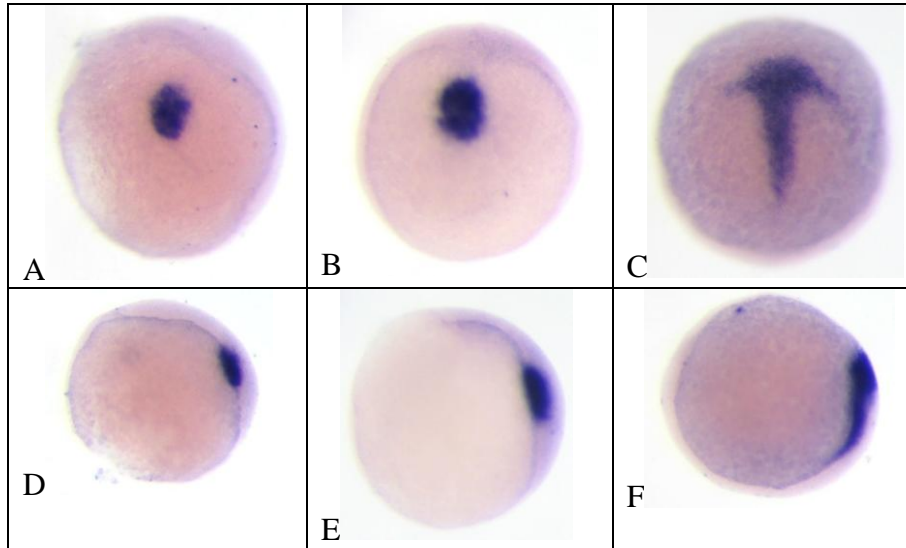


Figura 29: *Análisis del patrón de expresión de Gsc en embriones inyectados con el mRNA codificante de CK1 δ 1, CK1 δ 2 y control GFP. En A, B y C se muestra una vista dorsal de embriones inyectados con CK1 δ 1 (A), CK1 δ 2 (B) y GFP (C), donde se puede observar una notable reducción de la expresión de Gsc en aquellos embriones inyectados con CK1 δ 1 y CK1 δ 2, con respecto al control. D, E y F muestran los mismos embriones en vista lateral, inyectados con CK1 δ 1 (D), CK1 δ 2 (E) y GFP (F), donde el lado dorsal está a la derecha. Se puede observar que la reducción de la expresión se produce hacia anterior.*

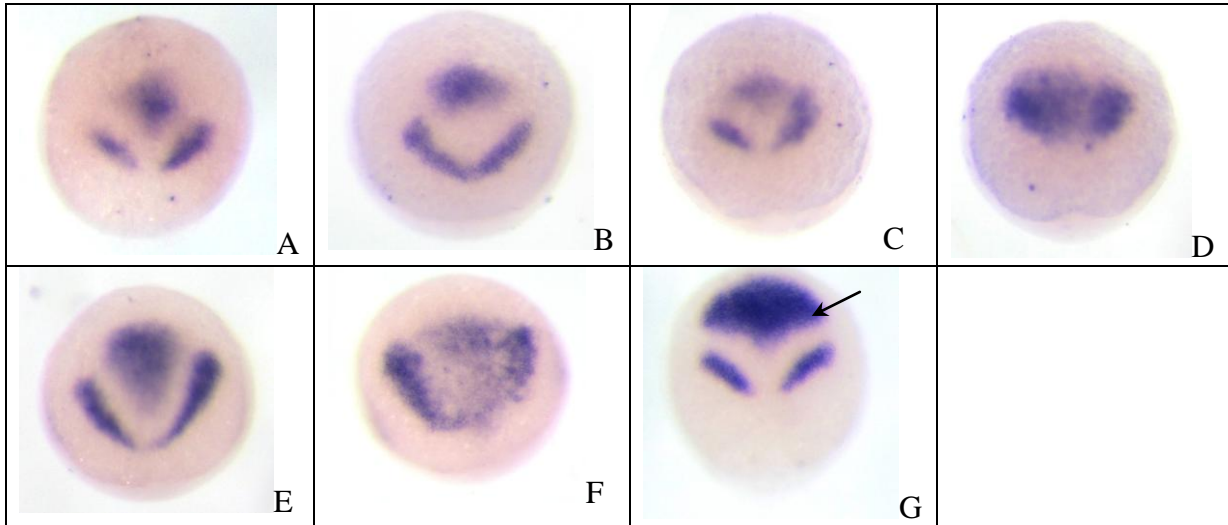


Figura 30: *Análisis del patrón de expresión de Pax2.1 y Six3 en embriones inyectados con el mRNA codificante de CK1δ1, CK1δ2 y control GFP.* Las figuras A-H muestran una vista dorsal, de embriones inyectados con CK1δ1 (A-D), CK1δ2 (E y F) y GFP (G), donde se puede observar la notable reducción de Six3 (marcador de cerebro anterior) y la normalidad o leve aumento (según el embrión observado) de la expresión de Pax2.1 (marcador de MHB) en aquellos embriones inyectados con CK1δ1. En los embriones inyectados con CK1δ2 se observa una expresión de Six3 difusa y/o expandida hacia posterior, mientras que la expresión de Pax2.1 tiende a expandirse hacia anterior, en comparación del control GFP. La flecha indica la expresión normal de Six3 en un embrión inyectado con GFP.

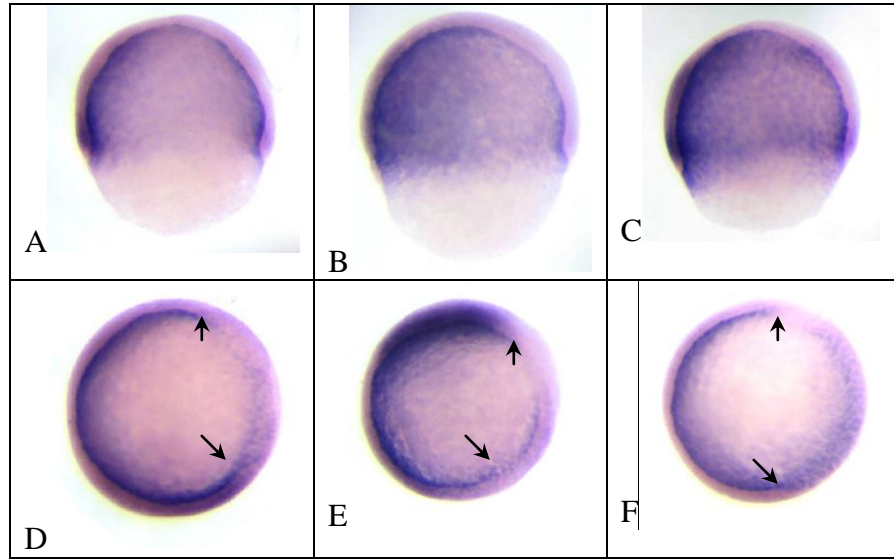


Figura 31: *Análisis del patrón de expresión de Vox en embriones inyectados con el mRNA codificante de CK1δ1, CK1δ2 y control GFP.* Las figuras A, B y C muestran una vista lateral de embriones inyectados con CK1δ1 (A), CK1δ2 (B) y GFP (C), donde no se observan variaciones en la expresión del gen marcador ventral, Vox. D, E y F muestran una vista superior de los mismos embriones, inyectados con CK1δ1 (D), CK1δ2 (E) y GFP (F), donde el lado dorsal está a la derecha. En esta vista, se puede observar una mayor expresión de Vox hacia dorsal en aquellos embriones inyectados con CK1δ1 y CK1δ2, con respecto al control, como lo indican las flechas.

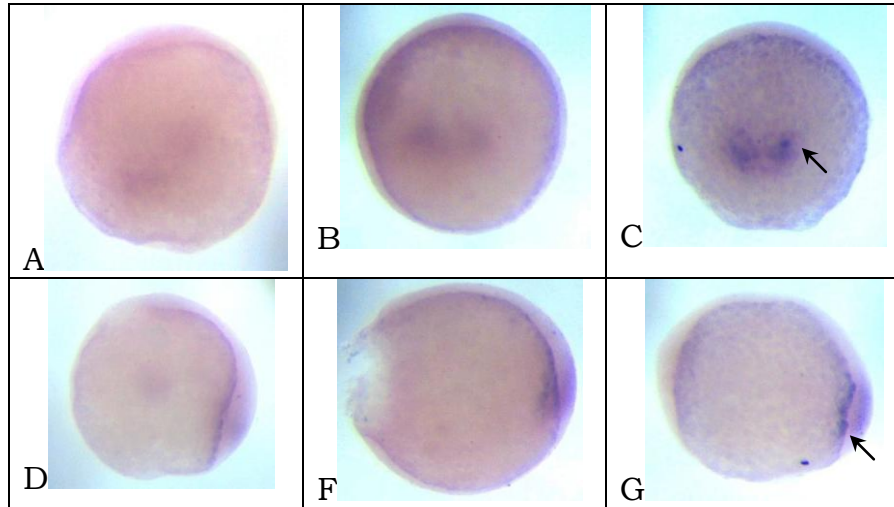


Figura 32: *Análisis del patrón de expresión de Rx3 en embriones inyectados con el mRNA codificante de CK1δ1, CK1δ2 y control GFP.* Las figuras A-C son vistas dorsales de embriones inyectados con CK1δ1 (A), CK1δ2 (B) y GFP (C), donde se observa una pérdida de la señal de Rx3 en el embrión inyectado con CK1δ1, y una reducción notable de la expresión de este marcador en el embrión inyectado con CK1δ2, con respecto al control GFP. Las figuras D-G son los mismos embriones en vista lateral, inyectados con el mRNA codificante de CK1δ1 (D), CK1δ2 (E) y GFP (F), donde el lado dorsal se encuentra a la derecha. La flecha indica la expresión normal de Rx3, que corresponde a los ojos presuntivos.

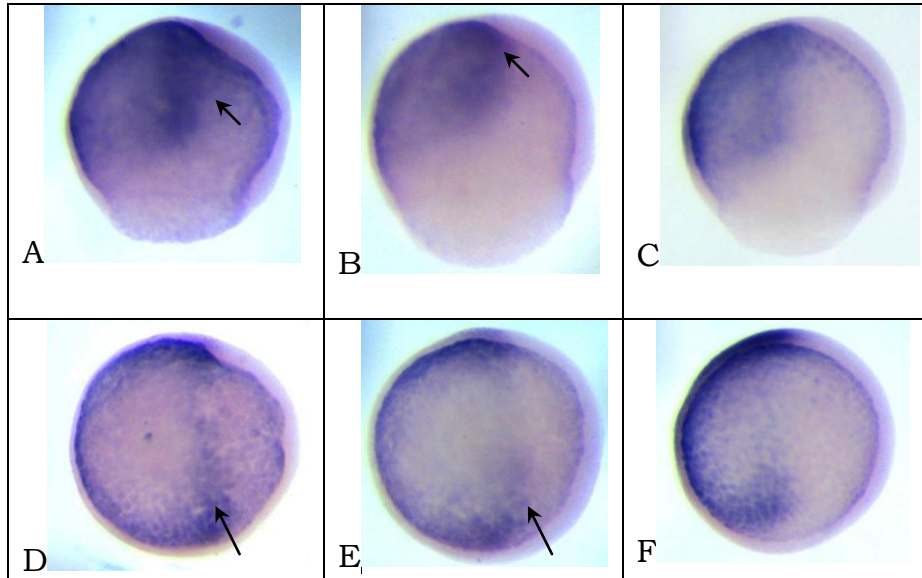


Figura 33: *Análisis del patrón de expresión de Dlx3 en embriones inyectados con el mRNA codificante de CK1 δ 1, CK1 δ 2 y control GFP.* Las figuras A-C son vistas laterales, con el lado dorsal hacia la derecha, de embriones inyectados con CK1 δ 1 (A), CK1 δ 2 (B) y GFP (C), donde se observa un aumento de la expresión del gen marcador de epidermis Dlx3, tanto en CK1 δ 1 como en CK1 δ 2, con respecto al control GFP. Esta expansión también se puede observar en la vista superior de los mismos embriones (figuras D-F) inyectados con CK1 δ 1 (D), CK1 δ 2 (E) y GFP (F). Las flechas indican la mayor expansión del marcador Dlx3 hacia dorsal (derecha del embrión), en aquellos embriones inyectados con CK1 δ 1 y CK1 δ 2, con respecto al control.

8. DISCUSIÓN

8.1 Estudios de expresión de CK1 δ 1 y CK1 δ 2 en el desarrollo embrionario.

Mediante experimentos de RT-PCR se logró la amplificación de fragmentos provenientes de los transcritos de las isoformas CK1 δ 1 y CK1 δ 2, 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 las isoformas durante el desarrollo, con respecto a un mRNA control: β -actina.

Como se observa en la figura 10, los mensajeros de ambas isoformas se expresan durante todos los estadios del desarrollo embrionario estudiados. Estos resultados indican que ambos genes se expresan de manera constante durante el desarrollo embrionario, presentando un componente de expresión materno y cigótico.

Por otra parte, el estudio de expresión de CK1 δ 1 mediante hibridación *in situ*, muestra que este gen presenta una expresión ubicua durante todo el desarrollo temprano (1 a 8 h.p.f). En el estadio de 80% epibolia, se observa una fuerte expresión en el lado dorsal del embrión, lo que es corroborado mediante la co-expresión con BMP2b, marcador de la zona ventral y lateral del embrión. CK1 δ 2 no presenta este patrón de expresión dorsal, mostrando una expresión ubicua desde 1 h.p.f. hasta las 24 h.p.f. Desde las 10 h.p.f en adelante, el RNA mensajero (mRNA) de CK1 δ 1 se localiza en el sistema nervioso central del embrión, limitándose su expresión a medida que progresa el desarrollo. A las 24

h.p.f., la expresión de CK1 δ 1 se observa en telencéfalo, diencéfalo, mesencéfalo, cerebelo y romboencéfalo. A las 48 h.p.f., la expresión se restringe al tegmentum del cerebro, cerebelo, retina y romboencéfalo.

La expresión de CK1 δ 2 es ubicua hasta las 24 h.p.f, aunque en ese estadio ya se puede observar una señal más débil hacia caudal y más fuerte en cerebro, restringiéndose a las 30 h.p.f a telencéfalo, diencéfalo, mesencéfalo, cerebelo y rombómeros. A las 48 h.p.f el RNA mensajero de CK1 δ 2 se ubica en el tegmentum, cerebelo, romboencéfalo, retina y levemente en el primordio de las aletas pectorales.

De estos experimentos podemos concluir que ambas isoformas se expresan en el desarrollo embrionario temprano. Posterior a las 24 h.p.f la expresión de estos genes se restringe al sistema nervioso central. Esta observación concordaría con los fenotipos encontrados en los experimentos de sobre expresión y pérdida de función (alteración en el desarrollo de cerebro anterior y de los ojos). Además, es probable que algunos de los fenotipos producidos por el bloqueo de función de estos genes y que se traducen en embriones curvos y acortados en su eje dorso ventral, puedan ser explicados por alteraciones en los movimientos de convergencia extensión, ocurridos en desarrollo temprano.

Además es interesante destacar que a pesar del alto nivel de homología que tienen las isoformas CK1 δ 1 y CK1 δ 2, ambas presentan patrones de expresión diferentes. CK1 δ 2 es más ubicuo y se expresa a un mayor nivel que CK1 δ 1 dentro de las primeras 24 horas de vida. Posteriormente ambos mRNAs se ubican en cerebro, siendo la expresión a las 48 h.p.f muy restringida en el caso de

CK1 δ 1, expresándose en el tegmentum mesencefálico, cerebelo, retina y en los rombómeros. CK1 δ 2 se superpone a CK1 δ 1 en su patrón de expresión y se expresa además en el primordio de las aletas pectorales.

8.2 Estudios de función de CK1 δ 1 y CK1 δ 2 en el desarrollo embrionario.

Mediante los experimentos de inyección de RNA mensajero codificante para CK1 δ 1 y CK1 δ 2 y sus respectivas Dominantes Negativas, se pudo obtener importantes datos de la función de ambas isoformas en el desarrollo embrionario del pez cebra.

Entre los datos obtenidos, uno de los más llamativos es el que dice relación con la alteración en la formación de los ojos en experimentos de sobre expresión de CK1 δ 1 y CK1 δ 2. En ambos casos se obtienen embriones sin ojos o con ojos más pequeños de lo normal. Aparecen también fenotipos con ojos asimétricos y ciclópicos. Esto concuerda con el patrón de expresión obtenido en la hibridación *in situ*, donde a las 24 y 48 h.p.f el RNA mensajero de ambas isoformas se encuentra restringido a sistema nervioso central. Sin embargo, la sobre expresión de ambas isoformas produce los fenotipos anteriormente descritos en proporciones diferentes. Por ejemplo el porcentaje de embriones sin ojos obtenido al inyectar CK1 δ 1 llegó a un 34%, mientras que al inyectar el mRNA de CK1 δ 2, el fenotipo sin ojos se redujo a un 7% de los embriones totales inyectados. Otro ejemplo es el de los embriones ciclópicos, estos llegan al 10% en los embriones inyectados con el mRNA de CK1 δ 2 y solo al 1% en el caso de los inyectados con el mRNA de CK1 δ 1. En su conjunto, estos resultados se parecen a los obtenidos con la sobre expresión del mRNA codificante de

Wnt8. En este caso también se observa embriones sin ojos, ciclóticos y con otras alteraciones del globo ocular (Kelly² *et al.*, 1995). 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 esta 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).

En cuanto a los experimentos de bloqueo de función mediante la inyección de las Dominantes Negativas de las isoformas CK1δ1 y CK1δ2, se obtuvieron embriones dorsalizados, curvos y ciclóticos en ambas isoformas (con un mayor efecto por parte de CK1δ2). Estos resultados podrían indicar, que además de la participación que pueden tener CK1δ1 y CK1δ2 en el desarrollo de estructuras del sistema nervioso central (embriones ciclóticos), podrían también cumplir una función importante en el desarrollo embrionario temprano, en procesos de movimiento celular y establecimiento de los ejes embrionarios (embriones acortados y curvados en su eje antero-posterior). Estos resultados también concuerdan con experimentos de bloqueo de función de Wnt8, requerida para antagonizar la formación del Escudo embrionario (Ramel y Lekvel, 2004). El Dominante Negativo de Wnt8 produce embriones con organizadores expandidos y con pérdida de tejidos posteriores y ventrales, es decir, embriones dorsalizados (Ramel y Lekvel, 2004), como los encontrados al bloquear la función de CK1δ1 y CK1δ2.

Lo anterior, además de otras evidencias que relacionan directamente a CK1δ1 y CK1δ2 en la vía de señalización de Wnt (Sakanaka *et al.*, 2000), nos

permite postular que estas quinasas pueden estar actuando en procesos que regulan la formación y establecimiento de los ejes embrionarios en la gastrulación del desarrollo embrionario temprano. Además parecen estar involucradas en la formación de estructuras del Sistema Nervioso Central, más específicamente en la formación de los ojos y cerebro anterior, lo que sería mediado por vías de señalización relacionadas con las proteínas Wnt.

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 la 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).

Según lo descrito anteriormente las isoformas $\delta 1$ y $\delta 2$ de la proteína quinasas CK1, tendrían una función activadora de la vía Wnt, específicamente de Wnt8, cuya función es limitar la formación de estructuras dorsales en territorio lateral y ventral en conjunto con BMP2b. Dentro de la vía Wnt, se ha descrito en la literatura, la formación de un complejo entre CK1 y Dvl, cuya interacción parece activar cooperativamente la formación del complejo β -catenina/ Lef (Kishida *et al.*, 2001; Hino *et al.*, 2003). Es probable que las dos isoformas

estudiadas en esta tesis, CK1 δ 1 y CK1 δ 2, actúen regulando la vía de Wnt8 en forma positiva por un mecanismo similar al anteriormente planteado.

Sin embargo, los resultados del bloqueo de función de CK1 δ 1 y CK1 δ 2, también pueden explicarse mediante un rol desactivador de la vía canónica de Wnt, propuesto para estas quinasas. Según estudios, estas isoformas fosforilan la serina 45 de β -catenina (Marin *et al.*, 2002), lo que permite luego, la fosforilación de esta proteína por parte de GSK-3, que proporciona los sitios de reconocimiento para su posterior ubiquitinación y degradación en el protosoma, impidiendo la consecuente transcripción de los genes blanco (Peters *et al.*, 1999). 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. Nosotros postulamos que los experimentos de bloqueo de función de CK1 δ 1 y CK1 δ 2, mediante la sobre expresión de las dominantes negativas de ambas isoformas, produciría una estabilización de la β -catenina debido a la falta de fosforilación de ésta por ambas isoformas. Por tanto la función de ambos genes podría ser la de controlar negativamente esta vía Wnt en el desarrollo temprano.

Es interesante recordar, que el aumento del mRNA codificante de CK1 δ 1 y CK1 δ 2, produjo alteraciones en cerebro anterior y ojos, pero no así en la formación de los ejes embrionarios. Solo en altas concentraciones se pudieron apreciar embriones curvados en su eje antero posterior. En cambio, el bloqueo de función de ambas isoformas, tuvo un claro efecto sobre la formación de los ejes embrionarios, con un alto porcentaje de embriones curvos y acortados. Por esto, se podría pensar, que ambas isoformas son necesarias para la formación de

los ejes embrionarios en etapas más tempranas del desarrollo. En etapas más tardías, tanto un aumento en los niveles de expresión de ambas isoformas de CK1, como un bloqueo de la función de la proteína, produce anormalidades en cerebro, lo que puede ser explicado por las funciones contrapuestas que tendría CK1 en la vía Wnt (Schwarz-Romond, *et al.*, 2002; McKay *et al.*, 2001).

Las diferencias encontradas entre CK1 δ 1 y CK1 δ 2, en cuanto a su expresión, fenotipos obtenidos en la sobre expresión, los diferentes porcentajes obtenidos con la pérdida de función y las diferentes concentraciones necesarias para obtener el mismo porcentaje de un fenotipo, se pueden explicar ya que a pesar de su alto nivel de homología, estas isoformas provienen de genes distintos en pez cebra, y por lo tanto sus promotores son diferentes (Marcelo Antonelli, comunicación personal).

Para tener una idea más clara de estos fenómenos, sería necesario realizar una serie de experimentos en los que se analicen genes marcadores que se encuentren río debajo de la vía Wnt, y complementar lo anterior, con nuevas evidencias que surjan en torno a estas complejas cascadas de eventos, para así poder sacar una conclusión contundente del papel de CK1 en el desarrollo embrionario.

8.3 Análisis de marcadores genéticos en embriones inyectados con el mRNA codificante de CK1 δ 1 y CK1 δ 2

De los resultados obtenidos con los experimentos de sobre expresión de CK1 δ 1 y CK1 δ 2, mediante la inyección del mRNA codificante de estas

isoformas y su posterior análisis con marcadores genéticos, se obtuvieron importantes datos para entender mejor, la función de estas isoformas en el desarrollo embrionario.

Uno de estos resultados dice relación con la notable modificación en el patrón de expresión del gen marcador dorsal Goosecoid (*Gsc*), involucrado con la regulación de los destinos dorsales de las células del escudo embrionario (Schulte-Merker *et al.*, 1994). La formación del sistema nervioso requiere inicialmente de la adquisición de la identidad neural, que es lograda mediante la inhibición de factores epidermizantes. Posteriormente, se da lugar a la formación de patrones regionales en el plato neural, por la actividad de factores caudalizantes. Estos dos procesos son regulados por el organizador dorsal, temprano en el desarrollo. *Gsc* es requerido para la definición de las estructuras neurales anteriores, y su inactivación se asocia a deleciones de estructuras de cerebro anterior, lo que está asociado con un incremento de la actividad de Wnt8 en el margen dorsal de la blástula. De hecho, *Gsc* coopera desde la blástula, en la formación de tejidos neurales mediante la protección de las células neurales anteriores presuntivas de una caudalización irreversible del factor posteriorizante, Wnt8 (Seiliez *et al.*, 2006). Por lo tanto, la marcada reducción del gen marcador *Gsc* en los embriones sobre expresados con CK1δ1 y CK1δ2, podrían estar confirmando el rol de estas isoformas, en la regulación de Wnt8 en forma positiva.

Por otro lado, la modificación en el patrón de expresión de Six3 en aquellos embriones inyectados con CK1δ1, coincide con las anomalías fenotípicas relacionadas con la formación de ojos y 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).

Tal vez, el marcador que cobra mayor interés con respecto a la función de las isoformas CK1δ1 y CK1δ2 en el desarrollo embrionario mediante la vía Wnt, es el gen marcador de la zona ventral del embrión, Vox. Este gen, es un objetivo transcripcional directo de Wnt8/β- catenina hasta el estadio de 70% de epibolía (7 h.p.f). Posteriormente en el desarrollo, este gen pasa a ser controlado por BMP. La función primaria de Vox es de modular los inhibidores de BMP secretados por el escudo, como por ejemplo chordine (*chd*) y goosecoid (*gsc*). Deficiencias cromosomales de Vox, producen una expansión del organizador y defectos severos en el patrón dorso –ventral (Ramel y Lekven, 2004). Con los resultados obtenidos con la sonda del gen marcador Vox, se podría sugerir que la expansión de este gen se debería a que las isoformas CK1δ1 y CK1δ2 estimularían la ventralización del embrión, lo que concuerda con el fenotipo de malformaciones de ojos y cerebro anterior. Vox, es absolutamente esencial para mediar la represión que hace Wnt8 sobre el organizador (Ramel y Lekven, 2004). Estos resultados indican que existe una relación entre la señalización de Wnt8 y la función de CK1δ1 y CK1δ2.

Rx3, es un gen que actúa específicamente en el desarrollo del primordio óptico (Loosli *et al.*, 2003). Una mutación en Rx3 (*cbk*) 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 desde un 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 en el patrón de expresión de Rx3 en aquellos embriones inyectados con CK1δ1 y CK1δ2, concuerda con el fenotipo encontrado, donde existía una alta malformación en los ojos. La falta de expresión de rx3 en embriones inyectados con CK1δ1, puede ser explicada por el efecto negativo que este gen produce en la formación de los ojos de los embriones de pez cebra. 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 (Kelly² *et al.*, 1995; 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, regula negativamente la expresión de genes marcadores de 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 los experimentos de sobre expresión de CK1 δ 1 y CK1 δ 2, podría deberse a una expansión del tejido epidérmico en desmedro de ectodermo neural, lo que podría sugerir que estas isoformas actuarían produciendo una señal posteriorizante en el embrión. Esto produciría la pérdida de masa cefálica y de ojos en los embriones inyectados.

Finalmente, cabe destacar que estos resultados son preliminares y se necesitan más experimentos para poder aclarar con mayor precisión el papel que juegan las isoformas CK1 δ 1 y CK1 δ 2 en el desarrollo embrionario de los vertebrados.

9. CONCLUSIONES

1) CK1 δ 1 presenta una expresión ubicua en desarrollo embrionario temprano hasta las 8 h.p.f, donde se restringe en placa neural. La expresión de CK1 δ 2 es ubicua hasta las 24 h.p.f. En estadios más avanzados ambos se expresan en la región cefálica y CK1 δ 2, además, se expresa en el primordio de la aleta pectoral.

2) La sobre expresión de CK1 δ 1 y CK1 δ 2, producen alteraciones en el desarrollo de cerebro anterior y ojos. Sin embargo, la proporción de los fenotipos observados difiere entre ambas isoformas.

3) El bloqueo de función de ambas isoformas, CK1 δ 1 y CK1 δ 2, producen un fenotipo dorsalizado, acortado y ciclópico.

4) La inyección del mRNA codificante de CK1 δ 1 y CK1 δ 2, produce un patrón de expresión reducido de *Gsc*, *Rx3* y *Six3*, una expansión hacia dorsal de *Pax2.1*, *Vox* y *Dlx3*. En su conjunto estos resultados indican que CK1 δ 1 y CK1 δ 2, podrían estar regulando la formación de estructuras del Sistema Nervioso Central, mediante la activación de genes 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. *Mech Dev.* 91 (1-2): 227-35.

BEANAN M.J.; SARGENT T.D. 2000. Regulation and function of *Dlx3* in vertebrate development. *Dev Dyn.* 218(4): 545-53.

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

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

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

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.

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 Dev.* 15: 1427-1434.

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

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

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

KELLY¹, G.M.; EREZYILMAZ, D.F.; MOON, R.T. 1995. Induction of a secondary embryonic axis in zebrafish occurs following the overexpression of beta-catenin. *Mech Dev.* 53: 261-273.

KELLY², G.M.; GREENSTEIN, P.; EREZYILMAZ, D.F.; MOON, R.T. 1995. Zebrafish wnt8 and wnt8b share a common activity but are involved in distinct developmental pathways. *Development.* 121(6):1787-99.

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 mab21I2 are required during eye morphogenesis. *Dev Biol.* 270 (2): 336-49.

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

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

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

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

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

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

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. *J Cell Biol.* 136 (5): 1123- 36.

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 Rep.* 4 (9): 894-9.

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

MARIN, O.; BUSTOS, V.H.; CESARO, L.; MEGGIO, F.; PAGANO, M.A.; ANTONELLI, M.; ALLENDE, C.C.; PINNA, L.A.; ALLENDE, J.E. 2003. A noncanonical sequence phosphorylated by casein kinase 1 in beta-catenin may play a role in casein kinase 1 targeting of important signaling proteins. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100(18):10193-10200.

MCKAY¹, RM.; PETERS, J.M.; GRAFF, J.M. 2001. The casein kinase I family in Wnt signaling. *Dev Biol.* 235(2):388-396.

MCKAY², RM.; PETERS, J.M.; GRAFF, J.M. 2001. The casein kinase I family: roles in morphogenesis. *Dev Biol.* 15;235(2):378-87.

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

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

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

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 Prog Horm Res.* 55:225-236.

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

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. *Dev Dyn.* 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 Dev.* 16(16):2073-84.

SEILIEZ, I.; THISSE, B.; THISSE, C. 2006. FoxA3 y goosecoïd promote anterior neural fate through inhibition of Wnt8a activity before the onset of gastrulation. *Dev Biol.* 290 (1): 152-63.

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

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

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

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

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.