

VCH-FC
MAG-BMCN
E-114
C.2

Caracterización del Gen *csrnpla* en la Hematopoyesis Primitiva del Pez Cebra

Tesis

**Entregada A La
Universidad De Chile
En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos
Para Optar Al Grado De**

**Magíster en Ciencias Biológicas con Mención en
Biología Molecular, Celular Y Neurociencias**

Por

Jaime Adolfo Espina Hidalgo

**Director de Tesis Dr.: Álvaro Glavic
Co Director: Carmen Feijóo**



FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION

TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magíster presentada por el candidato.

Jaime Adolfo Espina Hidalgo

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias con mención en Biología Molecular Celular y Neurociencias, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 17 de Julio del 2012.

Director de Tesis:

Dr. Alvaro Glavic 

Co-Director de Tesis:

Dr. Carmen Feijóo 

Comisión evaluador de Tesis

Dr. Verónica Palma 

Dr. Miguel Allende 





Agradecimientos

Le agradezco a mis tutores: Alvaro Glavic y Carmen Feijóo por permitirme la realización de esta tesis y ser guías en mi formación; a mi familia y a mis amigos por el apoyo durante todos estos años, de estos quiero destacar a Elías Barriga y Alvaro Pulgar quienes siempre han estado presentes.



ÍNDICE DE MATERIAS

1. RESUMEN.....	1
2. ABSTRACT.....	3
3. INTRODUCCIÓN.....	4
4. OBJETIVOS.....	13
4.1. Objetivo general.....	13
4.2. Objetivos específicos.....	13
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
5.1. Mantenimiento de peces cebrá y obtención de imágenes.....	14
5.2. Microinyección de Embriones e incubación con S-nitroso-N-acetil- Penicilamina (SNAP).....	14
5.3. Hibridación <i>in situ</i> en embrión completo e inmunohistoquímica.....	16
5.4. Tinción O-Dianosidina.....	16
5.5. Tinción Naranja de Acridina.....	17
6. RESULTADOS.....	18

6.1. La disminución de <i>Csrnp1a</i> afecta el número de células sanguíneas en circulación.....	18
6.2. El <i>Knockdown</i> de <i>Csrnp1a</i> no afecta la formación de mesodermo.....	23
6.3. El <i>Knockdown</i> de <i>Csrnp1a</i> no afecta la formación de vasos sanguíneos o el corazón.....	25
6.4. <i>Csrnp1a</i> no participa en la formación de linajes hematopoyéticos más tempranos.....	30
6.5. <i>Csrnp1a</i> es esencial para el desarrollo del linaje eritropoyético.....	32
6.6. <i>Csrnp1a</i> es necesario para la formación del linaje mielóide.....	32
6.7. El <i>Knockdown</i> de <i>Csrnp1a</i> afecta la proliferación celular en territorios mieloides.....	34
7. DISCUSIÓN.....	41
7.1. Patrón de expresión de <i>csrnp1a</i> durante el desarrollo temprano del pez.....	41
7.2. Función de <i>Csrnp1a</i> durante el desarrollo temprano de cebra.....	43
7.3. Función eritropoyética de <i>Csrnp1a</i>	45
7.4. Función mielopoyética de <i>Csrnp1a</i>	47
8. CONCLUSIONES.....	50
9.- PROYECCIONES.....	51
9. BIBLIOGRAFIA.....	52

ÍNCIDE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura primaria y alineamiento de proteínas CSRNP de distintas especies.....	7
Figura 2. Patrón de expresión de CSRNP1a obtenido mediante hibridación <i>in situ</i> y RT-PCR.....	9
Figura 3. Figura 3. Knockdown de <i>csrnp1a</i> disminuye la cantidad de células sanguíneas.....	11
Figura 4. El <i>knockdown</i> de <i>csrnp1a</i> disminuye el número de células sanguíneas en circulación.....	20
Figura 5. Disminución del número de células GFP positivas presentes en embriones morfantos del transgénico <i>Tg(gfi1.1::gfp)^{zfl28}</i>	22
Figura 6. El <i>knockdown</i> de <i>csrnp1a</i> no afecta la especificación del mesodermo.....	24
Figura 7. <i>Csrnp1a</i> no participa en la morfogénesis de los vasos sanguíneos.....	26

Figura 8. El vasodilatador SNAP no revierte el fenotipo <i>knockdown</i> de <i>csrnp1a</i>	28
Figura 9. <i>Knockdown</i> de <i>csrnp1a</i> no afecta al desarrollo y función cardiaca.....	29
Figura 10. La Reducción de <i>Csrnp1a</i> no afecta la especificación del mesodermo hemato-angiogénico.....	31
Figura 11. Precursores Eritroides/ <i>Gata1</i> -positivos se ven afectados por la disminución de <i>Csrnp1a</i>	33
Figura 12. El <i>knockdown</i> de <i>Csrnp1a</i> afecta al establecimiento del linaje mieloide Temprano.....	35
Figura 13. El <i>knockdown</i> de <i>Csrnp1a</i> altera la expresión de <i>spil</i> y genera a una disminución en la cantidad de macrófagos y granulocitos maduros.....	36
Figura 14. Embriones <i>knockdown</i> de <i>Csrnp1a</i> muestran un aumento en la muerte celular debido a la toxicidad del morfolino, efecto no relacionado con la reducción de células sanguíneas en la circulación.....	38
Figura 15. El <i>knockdown</i> de <i>Csrnp1a</i> disminuye la proliferación celular en territorios mieloides y no eritroides.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS

- ALPM: placa del mesodermo lateral anterior
- APC: Proteína de adenomatosis poliposa de colon
- °C: Grados Celcius
- cDNA: ácido desoxirribonucleico codificante
- CSRNP: Proteínas nucleares ricas en serina y cisteína
- DMSO: dimetilsulfóxido
- DNA: Ácido Desoxirribonucleico
- g: Gramos
- GSK-3: Proteína quinasa de glicógeno sintasa
- H₂O₂: Peroxido de Hidrógeno
- H₃-P: Histona tres Fosforilada
- HSC: células troncales hematopoyéticas
- hpf: Horas post fertilización
- ICM: Masa celular intermedia
- ISH: Hibridación *in situ*
- JNK: Quinasas c-Jun N-terminal
- kb: Kilo base
- LPM: placa del mesodermo lateral
- M: Molar

mg: Miligramos

mL: Mililitros

mM: Milimolar

Mocsrnp1a atg: Morfolino atg contra csrnpl1a

Mocsrnp1a spt: Morfolino splicing contra csrnpl1a

mRNA: Ácido ribonucleico mensajero

ng: Nanogramos

NO: Oxido Nitroso

pb: Pares de bases

PBS: Tampón fosfato salino

PBST: tampón fosfato salino mas tween 0.1%

PFA: Para-formaldehído

PLPM: placa del mesodermo lateral posterior

RBI: Islas sanguíneas rostrales

RNA: Ácido ribonucleico

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

seg: Segundos

SNAP: S-nitroso-N-acetil-penicilamina

μg: Microgramo

μL: Microlitro

uM: Micromolar

Wt: *wild tipe*. Silvestre

RESUMEN

La familia de factores de transcripción CSRNP (cystein-serine-rich nuclear protein) está conservada desde *Drosófila* hasta humanos. Estudios funcionales hechos en ratón, mediante *knockout* de cada uno de sus parálogos, han resultado insuficientes para dilucidar su función durante el desarrollo de vertebrados. En nuestro laboratorio, se estudió el ortólogo de pez cebra Axud1, revelando su papel esencial en la supervivencia y proliferación de progenitores cefálicos. Con el objeto de hacer extensiva la caracterización de esta familia de proteínas a otro de sus miembros, en este trabajo se ha analizado un segundo ortólogo existente en pez cebra: el gen *csrnpla*. Para caracterizar la función de este gen hemos utilizado morfolinis antisentido en embriones silvestres y líneas transgénicas relacionadas con la hematopoyesis/angiogénesis, además de hibridaciones *in situ* analizando la expresión de diferentes marcadores de mesodermo y de hematopoyesis primitiva. Nuestros resultados muestran que *csrnpla* se expresa a partir de las 0 hpf, hasta estadios larvarios, en particular en los territorios cefálicos y en la masa celular intermedia (ICM). El *knockdown* de *Csrnp1a* genera una disminución clara de las células de la sangre en circulación. La reducción del número de las células sanguíneas ocurre sin perturbaciones en la especificación del mesodermo, vascularización o desarrollo cardiaco. Esta reducción se produce a nivel de células progenitoras hematopoyéticas, que afecta tanto a los linajes eritroides como mieloides.

En regiones anteriores, además se observa una disminución en la proliferación celular específicamente en dominios de expresión *sp11*. Estas observaciones, en conjunto con los antecedentes previos, sugieren un papel importante de los factores de transcripción CSRNPs en la biología de los progenitores, tanto neuronal como hematopoyético.

ABSTRACT

The CSRNP (cystein-serine-rich nuclear protein) transcription factors are conserved from *Drosophila* to human. Functional studies in mice, through knockout for each of their paralogs have resulted insufficient to elucidate the function of this family of proteins in vertebrate development. Previously, in our laboratory, we described the function of the zebrafish ortholog, *Axud1/CSRNP1*, showing its essential role in cephalic progenitors survival and proliferation. To extend our understanding about this family, we have studied the function of its paralog *csrnp1a*. Using morpholinos in wild type or transgenic lines related with hematopoiesis/angiogenesis we performed its phenotypic characterization. This strategy was combined with in situ hybridizations to analyze the expression of different mesodermal and primitive hematopoiesis markers.

Our results show that *csrnp1a* is expressed from 0hpf, until larval stages, particularly in cephalic territories and in the intermediate cell mass (ICM). *Csrnp1a* knockdown generates a clear depletion of blood cells in circulation. Morphants embryos impair blood formation without disturbing mesoderm specification, angiogenesis or heart development. The reduction of circulating blood cells occurs at hematopoietic progenitor level, affecting erythroid and myeloid lineages; in addition cell proliferation was also altered in anterior sites, specifically in *spil* expression domain. These and previous observations suggest an insightful role of CSRNPs transcription factors in progenitors biology, both neural and hematopoietic.

INTRODUCCION

La vía de señalización Wnt participa en múltiples eventos del desarrollo embrionario de vertebrados e invertebrados (revisado por Croce y McClay, 2006). AXINA1 es uno de los reguladores negativos de la vía de señalización Wnt. Esta proteína, en ausencia de Wnt, forma un complejo con los factores APC (Kishida y col. 1998) y GSK-3 (Ikeda y col. 1998) lo que favorece la fosforilación de β -catenina y promueve su degradación por el proteosoma (Aberle y col. 1997). Por otra parte, en presencia de Wnt este complejo regulador negativo es inhibido, consecuentemente estabilizando β -catenina, la cual posteriormente se trasloca al núcleo (Huber y col, 1996), donde actúa como cofactor de factores de transcripción como T-cell factor (TCF)/*lymphocyte enhancer binding factor* (LEF) (Korinek y col. 1998) activando la expresión de diversos genes fundamentales para el desarrollo (revisado por Logan y Nusse, 2004).

Mutaciones en el gen *axinal* han sido relacionadas con diversos tipos de cáncer humano (revisado por Huang y He, 2008). En contraste, la transfección de AXINA1 en células tumorales que presentan mutaciones en *axinal*, *β -catenina* o *apc*, es capaz de suprimir la proliferación celular e inducir apoptosis (Sato y col. 2000). Ishiguro y col. (2001), mediante microarreglos, observaron un transcrito cuya expresión se encuentra disminuida en células de cáncer de colon con mutaciones en el gen *axinal* y que por el contrario, aumenta al sobreexpresar AXINA1 y no otros componentes del complejo regulador negativo de la vía Wnt. Es decir, este efecto transcripcional es independiente

de TCF/LEF. Debido a lo anterior, este gen fue denominado Axin Upregulated-1, AXUD1. Además en este trabajo se observó que la expresión de este gen se ve disminuida en células tumorales de cáncer de riñón, intestino, pulmón e hígado. Otros estudios mostraron que el transcrito AXUD1 está sub-representado también en colanocarcinomas intrahepáticos (Obama y col. 2005), tumores pancreáticos (Nakamura y col. 2004) y cáncer de mamas (Nishidate y col. 2004). Estos antecedentes sugieren que AXUD1 tiene un rol como factor supresor de tumores. Paralelamente, observando su expresión mediante microarreglos en diversas condiciones celulares, se ha identificado el transcrito *axud1* como un gen asociado a funciones inmunes (Hutton y col. 2004); siendo inducido por el factor de crecimiento derivado de plaquetas en células troncales embrionarias de ratón (PDGF) (Chen y col. 2004); en microglías producto de daño neuronal provocado por dopamina (Thomas y col. 2006); por el cardiotóxico doxorubicina en cardiomiocitos (Yi y col. 2006); y por IL-2 en linfocitos (Gingras y col. 2007). La amplia gama de reguladores de la expresión de AXUD1 identificados, que por mucho excede las observaciones iniciales de su inducción por AXIN1; sumado a las características de la secuencia peptídica predicha para este gen (ver más adelante) es que actualmente se utiliza la nomenclatura CSRNP (Cistein Serine Rich Nuclear Proteins) para referirse a esta familia de proteínas.

La familia de proteínas CSRNP se ha conservado de *Drosófila* a humanos. Estas proteínas no poseen ningún dominio o motivo estructural definido, o que haya sido anotado anteriormente en alguna base de datos. Sin embargo, mediante análisis *in silico* se han identificado tres regiones hacia el extremo amino terminal claramente conservadas en todos los miembros de esta familia: una primera región rica en serina, un

dominio con aminoácidos preferentemente básicos y una región rica en cisteína (Gingras y col. 2007) (Figura 1A). Dentro de este segmento la mayor homología se presenta en la región rica en cisteína, en particular en 10 residuos posicionalmente conservados en todos los CSRNPs de las distintas especies (Figura 1B) (Gingras y col. 2007).

La localización subcelular del producto de los genes *csrnp*, tanto en los tres parálogos de ratón, CSRNP-1, 2 y 3; como del único ortólogo encontrado en *Drosófila*, DAXUD1, es en el núcleo (Gingras y col. 2007; Glavic y col. 2009), lo que junto a ensayos con reporteros transcripcionales sugiere que esta familia de proteínas posee características de factores de transcripción. La función *in vivo* de estas proteínas fue inicialmente estudiada mediante la obtención de ratones *knockout* de cada uno de los tres parálogos presentes y en animales doble y triple *knockout*. Los ratones mutantes resultaron indistinguibles de los silvestres con excepción de la condición triple *knockout* que presentó letalidad perinatal. Con esta metodología y los análisis realizados no fue posible obtener evidencias de la actividad supresora de tumores previamente descrita para esta familia de proteínas, o algún papel evidente en el desarrollo embrionario de los ratones.

Por otra parte, en *Drosófila* existe un único miembro de la familia CSRNP, *Daxud1*. Estudios funcionales han mostrado que DAXUD1 actúa como supresor de tumores. La sobreexpresión de DAXUD1 produce apoptosis mediada por la activación de la vía JNK, situación que es dependiente del arresto del ciclo celular en la transición G2/M de manera Cdk1 dependiente. Mientras que el *knockdown* de DAXUD1 genera un aumento del ritmo de proliferación de las células imaginales (Glavic y col. 2009).

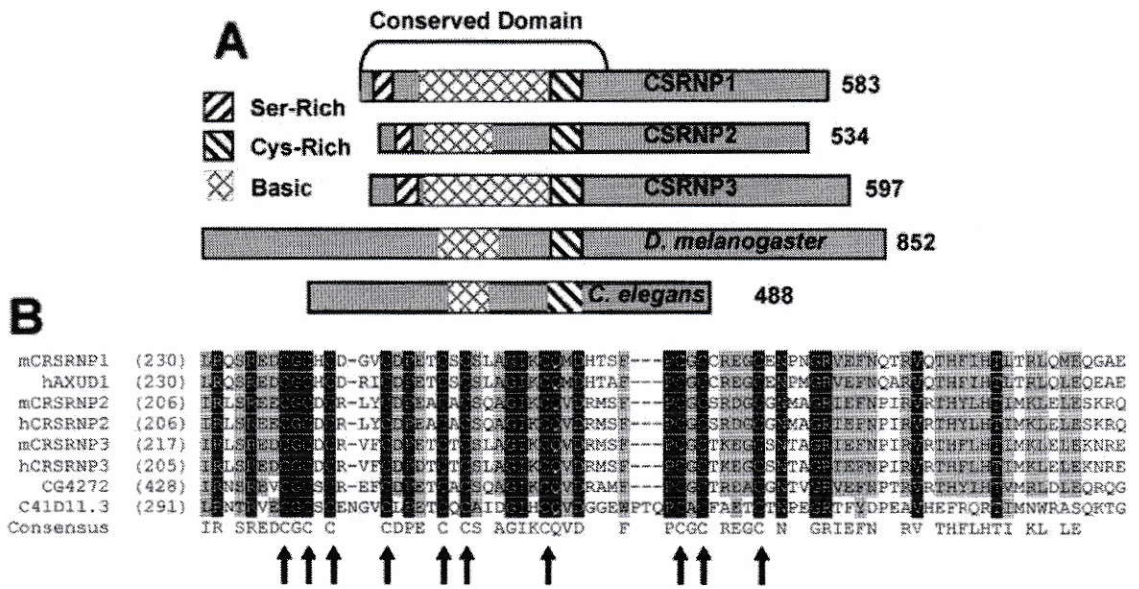


Figura 1. Estructura primaria y alineamiento de proteínas CSRNP de distintas especies (modificado de Gingras et al., 2007).

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

Estudios hechos en nuestro laboratorio, orientados a ampliar la caracterización de los genes *csrnp* en modelos vertebrados, identificaron en *Danio rerio*, dos secuencias proteicas homólogas a DAXUD1; *Csrnp1* con un 69% de homología y *Csrnp1a* con un 63%. Estudios realizados en pez cebra analizando el homólogo más cercano al gen *DAXud1*, *csrnp1/axud1* muestran que este gen es esencial en la proliferación y supervivencia de progenitores neurales cefálicos (Feijóo y cols., 2009). Posteriormente, y como parte del trabajo de la presente tesis, estudiamos el segundo homólogo presente en pez cebra, *csrnp1a*. Estudios no publicados muestran que este gen se expresa de manera materna y que luego de las 19 horas post fertilización su expresión es dinámica, centrándose en sitios anteriores cefálicos y en una región posterior-ventral denominada la masa celular intermedia (ICM), la cuál ha sido descrita como el sitio de proliferación y diferenciación de los progenitores hematopoyéticos (Figura 2).

En estudios preliminares realizados en nuestro laboratorio, que formaron parte del trabajo realizado durante mi tesis de pregrado, se inyectaron oligonucleótidos antisentido, morfolinós (MOs) para suprimir la expresión de *Csrnp1a*. En particular, inyectamos un morfolino diseñado para interactuar específicamente con la región que contiene el ATG (*Mocsrnp1a* ATG), permitiendo inhibir la traducción del mensajero. El fenotipo resultante en estadios posteriores a las 26 hpf, fue una reducción leve en el tamaño de la cabeza y una notable disminución en las células sanguíneas en circulación. La visualización de este fenotipo se realizó mediante dos tinciones diferentes: O-Dianisidina, la cual marca eritrocitos maduros, generando un precipitado naranja (O'brien, 1961) y diaminobencidina (DAB), que detecta inicialmente la actividad de la mieloperoxidasa presente en las células mieloides (Bielek E., 1981), pero que revelada

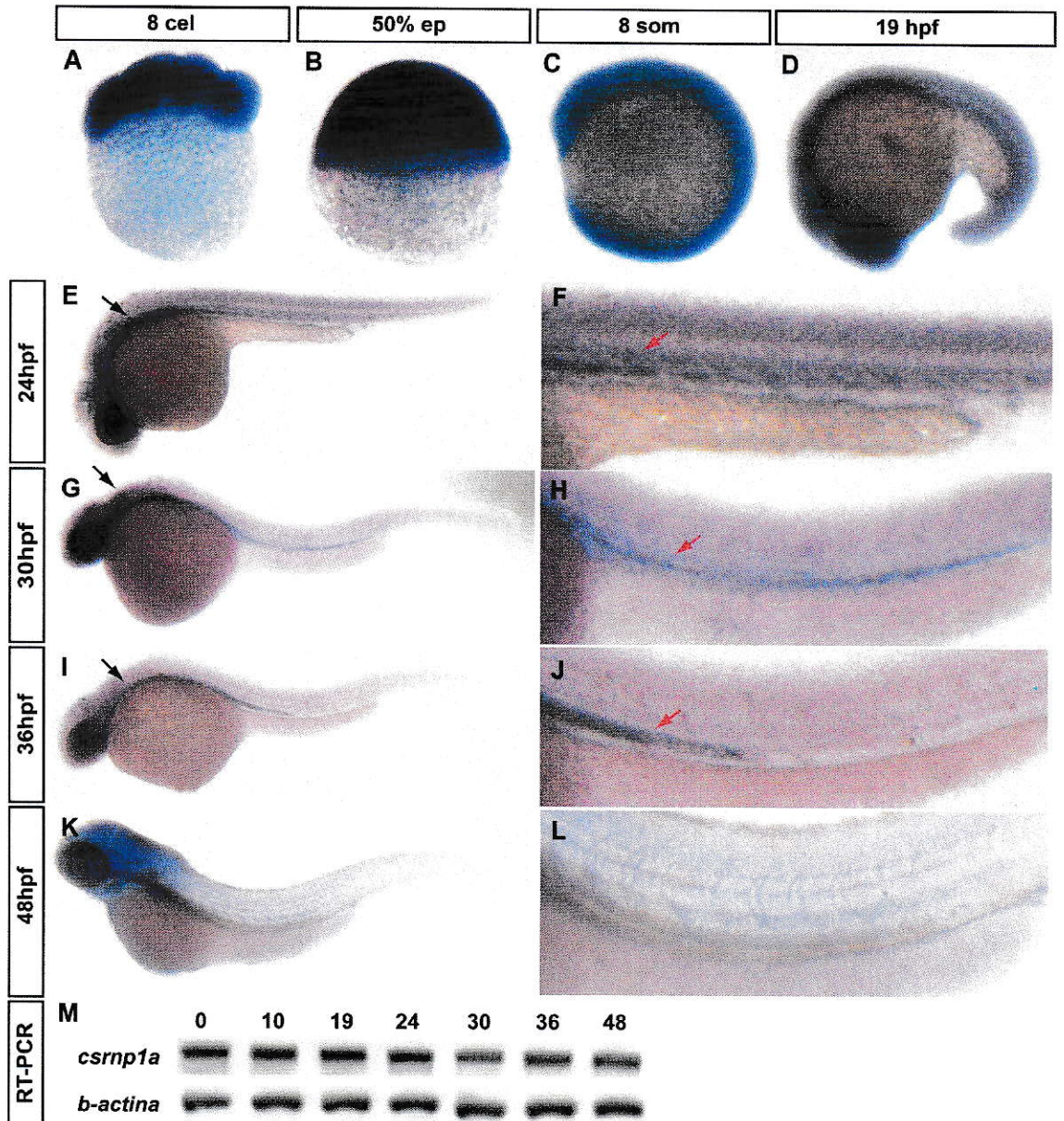


Figura 2. Patrón de expresión de *csrnpl1* obtenido mediante hibridación *in situ* y RT-PCR.

Embriones tempranos muestran una señal ubicua de *csrnpl1* (A a D). Etapas más tardías (E a L) muestran expresión anterior, en la región cefálica (flecha negra) y caudal, localizada en la masa celular intermedia (ICM) (flecha roja) (todos los embriones están laterales; A a C polo animal en la parte superior; D a L anterior a la izquierda). (F, H, J, L) Muestra la expresión de *csrnpl1* en ICM, en la cuál es posible observar una expresión altamente dinámica, con expansión y retracción de la señal a distintos tiempos de desarrollo. (M) RT-PCR para *csrnpl1*, los números sobre del gel corresponden a las etapas de desarrollo analizadas (escritas en horas post fertilización hpf).

por tiempos más prolongados reacciona de manera generalizada con las células de la masa celular intermedia. De esta manera pudimos observar una disminución significativa en ambas tinciones en embriones morfantes comparados con los controles a 33 hpf (Fig. 3A, B, C y D), corroborando de esta manera la observación inicial hecha en *in vivo*. Dado que la sangre corresponde en más de un 90% a células eritroides, nuestros resultados sugieren que al menos este linaje estaría disminuido en la condición de *knockdown* para *Csrnp1a*.

La formación de células sanguíneas en todos los vertebrados, incluyendo teleósteos, ocurre en dos olas de hematopoyesis que se producen de forma secuencial durante el desarrollo. La primera ola es llamada hematopoyesis primitiva o temprana, y produce principalmente eritrocitos y macrófagos primitivos. La segunda ola corresponde a la hematopoyesis definitiva, y genera células madre hematopoyéticas (*Hematopoietic stem cells*, HSC), capaces de auto-renovarse y diferenciarse a todos los linajes hematopoyéticos necesarios en el organismo adulto.

En pez cebra, la hematopoyesis primitiva ocurre en la placa del mesodermo lateral (*lateral plate mesoderm*, LPM), en dos territorios independientes, anterior y posterior, los cuales pueden ser evidenciados por la expresión de marcadores hematopoyéticos tempranos como *tall/scl* (células T leucemia linfocítica aguda 1), *lmo2* o *gata2* (Porcher y col. 1996; Valge-Archer y col. 1994; Wadman y col. 1997). *tall/scl* se observa como dos líneas paralelas a lo largo del LPM, siendo expresado por células indiferenciadas llamadas hemangioblastos, capaces dar origen tanto a linajes hematopoyéticos como vasculares. Las células situadas en la placa del mesodermo lateral anterior (ALPM) darán lugar a las islas sanguíneas rostrales (*rostral blood islands* RBI), mientras que las

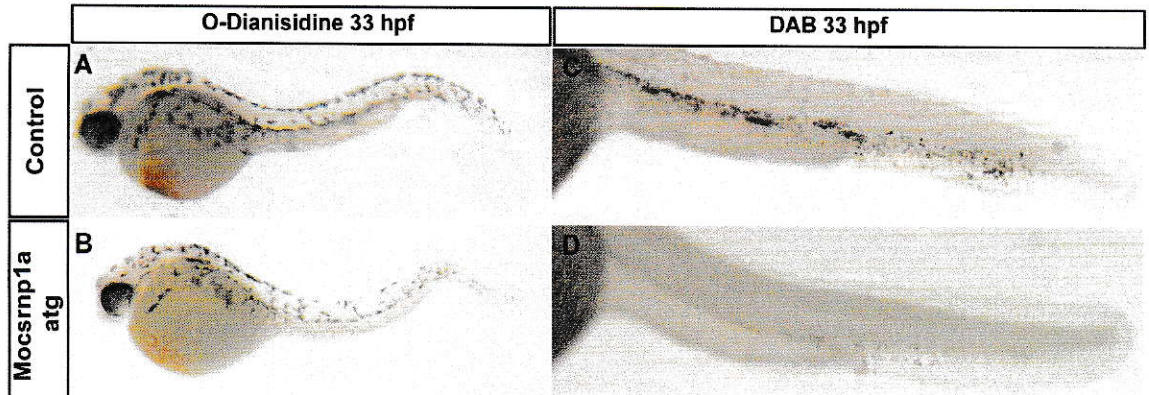


Figura 3. Knockdown de *csrnp1a* disminuye la cantidad de células sanguíneas.

Se utilizaron embriones de 33 hpf silvestres sin inyectar (A y C) y morfantes (B y D). La marca de O-Dianisidina (A y B) se observa principalmente en los ductos de Cuvier sobre el vitelo. Podemos observar en los morfantes (B) la disminución de esta tinción, indicando una reducción de la cantidad de eritrocitos maduros. La tinción DAB (C y D) marca de manera generalizada las células de la masa celular intermedia. En embriones silvestres (C) el ensayo DAB genera una marca café granulada a lo largo de dicho territorio, la que se ve dramáticamente disminuida en embriones morfantes (D).

células hematopoyéticas presentes en posterior (PLPM) migran ventralmente hacia la línea media y se fusionan, formando la masa celular intermedia (*intermediate cell mass*, ICM) (Al-Adhami y col. 1977). Las células en las RBI generan células de linaje mieloide, (principalmente macrófagos) y células endoteliales; mientras que las células de la ICM se diferencian mayoritariamente a células de linaje eritroide (como eritroblastos), células endoteliales de la zona truncada, y en menor medida a neutrófilos. Más específicamente, la población de eritroblastos primitivos surge a partir de un subconjunto de células posteriores, *tall/scl* positivas, que también expresan el factor de transcripción Krüppel-like, Klf4 (Kawahara y col. 2001) y el factor de transcripción dedos de zinc, GATA1 (Detrich y col. 1995). Estas proteínas se expresan de forma bilateral en el LPM posterior y promueven la expresión de genes esenciales para la diferenciación eritroide, tales como el gen *hbae1* (hemoglobina alfa embrionica-1) (Brownlie y col. 2003). Por otro lado, en anterior, el linaje mieloide surge a partir de un subconjunto de células anteriores *tall/scl* positivas, que también expresan *spil*, y que en conjunto dirigen la diferenciación de estas células hacia macrófagos y neutrófilos maduros, los cuáles pueden ser reconocidos por la expresión de marcadores como plastina citosólica de linfocitos-1 (*l-plastin1*, *lcp1*), o el gen de mieloperoxidasa, *mpx*, expresado en neutrófilos (Lieschke, G.J. y cols., 2002).

Considerando la expresión del gen *csrnpla* en la masa celular intermedia, que es el tejido de proliferación y diferenciación de células hematopoyéticas, nos planteamos la siguiente hipótesis de trabajo: **“El gen *csrnpla* es necesario para la formación, diferenciación y/o proliferación de progenitores hematopoyéticos en el proceso de hematopoyesis primitiva del pez cebra”.**



OBJETIVOS

Objetivo General.

- Caracterizar la función de *csrnpl1a* durante la hematopoyesis primitiva del pez cebra.

Objetivos Específicos.

- Determinar si la disminución de la función de *csrnpl1a* afecta el número de células sanguíneas evidenciado por la línea transgénica *Tg(gfil.1:GFP)^{zf128}*
- Analizar mediante hibridación *in situ* (ISH) para genes marcadores específicos (*ntl*, *gata5*, *gsc*), el efecto de la falta de función de *Csrnpl1a* en la generación de los patrones de diferenciación del mesodermo.
- Analizar el efecto de la falta de función de *Csrnpl1a* en el flujo sanguíneo, analizando tanto alteraciones en la estructura global de los vasos sanguíneos como en el desarrollo cardíaco.
- Determinar la etapa de diferenciación durante la hematopoyesis primitiva en la cual *Csrnpl1a* participa, analizando el efecto de su disminución sobre marcadores de las distintas etapas de este proceso: *scl*, *gatal*, *spil*, *mpx*, *lcp1*, *hbael*.
- Analizar los patrones de muerte y proliferación celular, en los estadios en los cuáles se observen las perturbaciones provocadas por la inyección de morfolino.

MATERIALES Y METODOS

Mantenimiento de peces cebra y obtención de imágenes.

Los peces fueron manipulados de acuerdo a lo descrito por Westerfield, 2007. Las líneas de pez cebra utilizadas en esta trabajos fueron las siguientes: Tab5 (silvestres), *Tg(gfi1.1:GFP)^{zf128}* (Wei y col. 2008), *Tg(mpx:GFP)^{il14}* (Renshaw y col. 2006) y *Tg(fli1a:EGFP)^{y1}* (Lawson y col. 2002). Los peces fueron cruzados de manera natural para la obtención de los embriones. Los embriones obtenidos de esta manera fueron incubados a 28,5 °C en placas Petri con medio E3 con azul de metileno y fijados en PFA 4% toda la noche, en el estadio apropiado. Los tiempos de desarrollo están expresados en horas post fertilización (hpf) según Kimmel y col 1995. Las fotografías fueron tomadas con una lupa de disección Leica MZ12 acoplada a una cámara Leica DFC 300FX. Las imágenes fueron procesadas con el programa Photoshop CS3. Para todos los experimentos descritos las imágenes mostradas son representativas del efecto observado y cuando este efecto está presente en cualitativamente la mayoría de los individuos (sobre un 70% de los individuos observados), con un mínimo de 50 embriones por experimento. Todos los experimentos fueron repetidos al menos tres veces. El n mostrado en cada experimento corresponde a la suma de los datos de cada repetición.

Microinyección de Embriones, RT-PCR e incubación con S-nitroso-N-acetilpenicilamina (SNAP).

Para generar la falta de función de *Csrnp1a* se realizó el *knockdown* mediante la inyección de morfolinos (oligonucleótidos antisentido modificados químicamente (revisado por Lieschke y Currie, 2007). Se utilizaron dos tipos de morfolinos: *Mocsrnp1a atg* (secuencia 5'-ACTGACGAGCACAACACTCAACAACAG-3'), diseñado para unirse a la región que contiene el inicio de traducción, AUG, del mRNA de *csrnp1a*. Y *Mocsrnp1a spt*, (secuencia 5'-TATCATGAGTGACTTACTTGGCATG-3'), el cual se une al sitio de *splicing* entre el exon2/intron2 del mRNA primario de *csrnp1a*. Se utilizaron como control peces inyectados con un morfolino control (5'-GTCACAAGTCCACTATCGATTGTG-3'). Para comprobar la dosis dependencia del morfolino, se inyectaron dos concentraciones, 2,5 y 5 ng por embrión del morfolino *Mocsrnp1a spt* y se analizó el nivel de transcrito *csrnp1a* mediante RT-PCR. Los partidores utilizados para esto fueron: partidor directo (Axud1F) 5'-CTCTGATGAAGACAGTCCACAAAG-3' y partidor reverso (axud1R): 5'-TCAGAGTCCGAAGACAGACTGAG-3'. Dichas secuencia se encuentran posicionadas en el exón 2 y 5 respectivamente y generan un amplicón de 1,2 kb. Como control de carga del RT-PCR y de calidad del cDNA se utilizaron partidores de β -actina: directo: 5'-TGTCTTCCCATCCATCGTG-3' y reverso: 5'-AGGTCACGGCCAGCCAAG-3', que generan un amplicón de aproximadamente 600pb. El morfolino de *p53* (5'-GCGCCATTGCTTTGCAAGAAGAATTG-3') fue inyectado a la concentración descrita por Robu y cols. 2007.

Para los ensayos con SNAP, embriones de pez cebra fueron incubados en 10uM del compuesto disuelto en medio E3 con 0,1% de Dimetil sulfóxido (DMSO). Los embriones fueron expuestos a la solución de SNAP entre los 10 somitos y 23 horas post

fertilización y observados a las 32 hpf, luego del comienzo de la circulación sanguínea.

Hibridación *in situ* en embrión completo e inmunohistoquímica

Los experimentos de hibridación *in situ* fueron realizados mediante el método descrito por Thisse y col. 2008. Las sondas antisentido de RNA fueron sintetizadas siguiendo protocolos estándar: cortadas con enzimas de restricción descritas para cada clon y transcritas con las enzimas SP6, T3 o T7 dependiendo del caso. Los siguientes clones fueron amablemente proporcionados como cDNA y utilizadas como templado para generar las sondas de RNA: *ntl* (Schulte-Merker y col. 1992), *gsc* (Stachel y col. 1993), *gata5* (Heicklen-Klein y col. 2004), *tall/scl* (Lieschke y col. 2002), *klf4* (Taneda y col. 2011), *spil/pu.1* (Lieschke y col. 2002), *gatal* (Fu y col. 2009), *hbael* (Hart y col. 2007), *lcp1* (Herbomel y col. 1999), *amhc* (Berdougo y col. 2003) and *vmhc* (Berdougo y col. 2003).

Para los experimentos de inmunohistoquímica, utilizamos un anticuerpo generado en conejo contra phospho-Histona H3 (H3-P, Upstate 07-424). El protocolo fue llevado a cabo acorde al método descrito por Sarrazin y col. 2006. Para definir un área de células H3-P positivas, se realizó inmunohistoquímica contra H3-P en embriones previamente marcados por ISH con sondas de *spil/pu.1* o *scl*. Finalmente el número de células positivas para Histona 3 fosforilada fue cuantificada únicamente dentro del área de *in situ*.

Tinción O-Dianisidina.

Se realizó la tinción O-Dianisidina (3,3' dimetoxibenzidina) que permite identificar eritrocitos maduros (O'brien y col. 1961). Este compuesto reacciona con la hemoglobina de los glóbulos rojos, generando un producto oxidado de color naranja en presencia de peróxido de hidrógeno (Wei y col. 2005). Brevemente, se prepara una solución de O-Dianisidina que contiene: 0.06 mg/mL de O-Dianisidina; Acetato de sodio 0.01M; H₂O₂ 0.65% y etanol 40%. Los embriones vivos se lavan con esta solución de 5 a 10 minutos y luego es posible fijar los embriones teñidos con PFA 4%-PBS (Iuchi y Yamamoto, 1983).

Tinción Naranja de Acridina.

La tinción de naranja de Acridina se realizó acorde al protocolo de Williams y Webb, 2000. Los embriones fueron incubados durante 20 minutos en 5ug/ml de Naranja de Acridina en medio E3, lavados 5 veces por 5 minutos con medio E3 y observados bajo microscopio de fluorescencia.

RESULTADOS

La disminución de *Csrnp1a* afecta el número de células sanguíneas en circulación.

El fenotipo *knockdown* del gen *csrnp1a*, observada a las 32 horas post fertilización (momento en el cuál las células sanguíneas derivan del proceso de hematopoyesis primitiva) es una clara disminución de las células sanguíneas en circulación. Si bien una explicación lógica para justificar el fenotipo de falta de sangre puede surgir de posibles perturbaciones en el proceso de hematopoyesis temprana, es decir, que se vea afectada la formación, mantención o proliferación de progenitores hematopoyéticos en el embrión temprano de pez cebra, esta no es la única opción plausible. Otra posibilidad es que el gen *csrnp1a* esté afectando de manera previa y generalizada la formación del mesodermo. Considerando que la ICM es formada a partir de este tejido, específicamente a partir de las placas del mesodermo lateral (revisado por Davison y Zon, 2004), nuestros resultados de la pérdida de células sanguíneas circulando pueden derivar de un efecto sobre la formación del mesodermo. Una tercera causa para explicar la disminución en la cantidad de células en circulación puede ser circunscrita a la atrofia de los vasos sanguíneos, es decir que no se observa sangre por que los vasos están afectados de manera tal que no permiten circulación, o simplemente están ausentes, con lo que resultaría imposible ver la circulación sanguínea. Por último, se ha descrito que reducciones importantes del flujo sanguíneo afectan la cantidad de células sanguíneas en circulación; un régimen de flujo cercano a cero, genera una disminución significativa en

la cantidad de glóbulos rojos en circulación y afecta además al desarrollo de células troncales hematopoyéticas (HSC, células capaces de generar todos los linajes hematopoyéticos) (North y col. 2009). En este contexto, la ausencia de CSRNP1a podría afectar el latido cardíaco o el calibre de los vasos sanguíneos, los cuales tienen directa relación con la velocidad del flujo sanguíneo.

Con la idea de evaluar cual de las hipótesis anteriormente planteadas se relaciona mejor con la función del gen *csrnp1a* se realizaron ensayos de falta de función utilizando el morfolino ATG antes mencionado. Además, para evitar y reducir efectos inespecíficos, decidimos inyectar un segundo morfolino diseñado para bloquear el correcto corte y empalme (“*splicing*”) del mensajero primario (morfolino de *splicing*: Mocsrnp1a spt). Para confirmar la eficiencia de este último morfolino y para analizar si la inhibición de la función de *csrnp1a* es dosis dependiente, inyectamos el Mocsrnp1a spt en dos concentraciones: 2,5 y 5 ng por embrión. Los resultados obtenidos mostraron una leve reducción en los niveles de transcrito a las 24hpf en el primer caso y su completa ausencia en el segundo (Figura 4F). Además, observamos que el mensajero procesado de *csrnp1a* en embriones de 30 hpf comienza a reaccumularse (Figura 4F), indicando que el morfolino ya no es efectivo en esta etapa del desarrollo.

La concentración de morfolino utilizada para generar los fenotipos observados fue de 2,5 y 5 ng por embrión para el morfolino ATG y morfolino de *splicing* respectivamente. El fenotipo de reducción de células sanguíneas en circulación fue generado por ambos morfolinios en un 34% de los embriones inyectados, lo que sugiere que ambos morfolinios disminuyen la función de *csrnp1a*. Además al inyectar el morfolino de *splicing* a la concentración de 2,5ng por embrión, se obtiene el fenotipo en el 12% de los

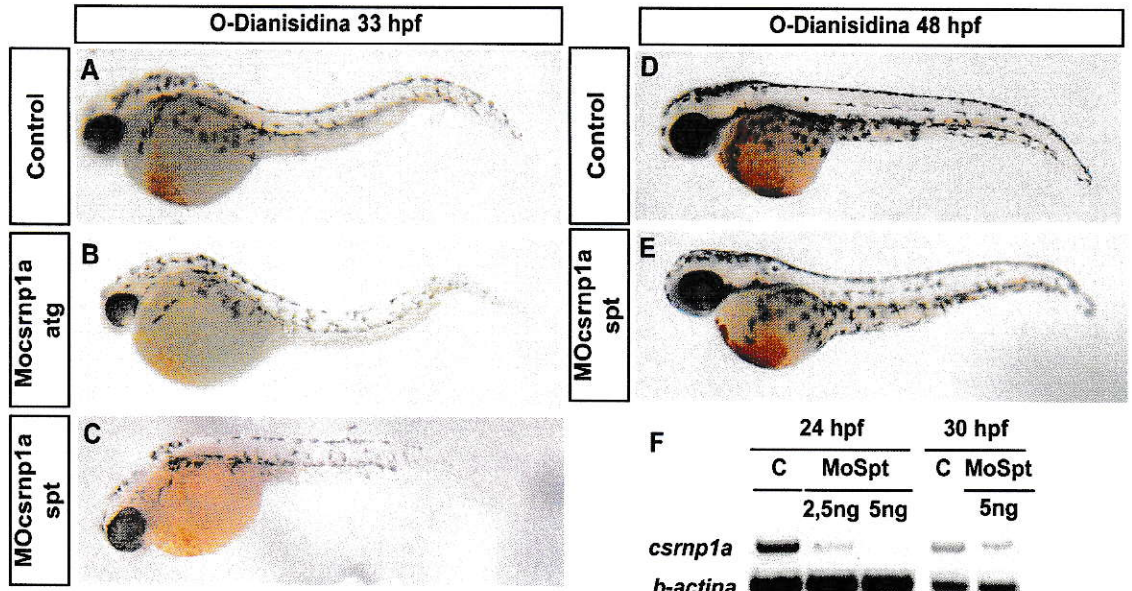


Figura 4. El knockdown de *csrnp1a* disminuye el número de células sanguíneas en circulación. La inyección de morfolino contra *csrnp1a* produce una reducción dramática de la células sanguíneas en un 35,4% de los embriones inyectados (n=46/130) a las 33 hpf (A, B, C) la cual es revertida a las 48 hpf (D, E) (todas las vistas son laterales, anterior a la izquierda). (F) RT-PCR contra *csrnp1a* y *b-actina* de embriones controles de 24 hpf (C) e inyectados con el morfolino de *splicing* (MoSpt) a dos concentraciones: 2,5 y 5 ng por embrión. Se muestra la disminución, dosis dependiente, del mensajero de *csrnp1a* al utilizar el morfolino mencionado. Esta disminución es revertida a las 30 hpf, indicando que el morfolino de *splicing* ya no eficiente a estos estadios.

embriones inyectados, indicando que existe una correlación entre la presencia del fenotipo y el resultado de RT-PCR que indica que a esta concentración hay una mayor cantidad de mensajero de *csrnp1a*.

Mediante la tinción de O-Dianisidina, la cual reacciona con la hemoglobina presente en los eritrocitos generando un precipitado naranja (O'brien, 1961), pudimos observar una disminución significativa en la cantidad de eritrocitos maduros en ambos grupos morfantes (Figura 4A, B, y C). Por el contrario, y de acuerdo con la reducción observada de la eficiencia morfolino a 30 hpf (Figura 4H), detectamos reversión del fenotipo de sangre en 77,27% de los embriones morfantes a las 48hpf (Figura 4D y E). Debido a que ambos morfolinos disminuyen la función de *csrnp1a* y que al usar el morfolino ATG se requiere una menor cantidad, es que decidimos utilizar este morfolino para el resto de los experimentos.

Considerando que el parálogo de *csrnp1a*, *axud1*, tiene expresión cefálica y su morfolino genera disminución del tamaño de la cabeza, creemos que este fenotipo, el cual es observado en menor medida en morfantes de *csrnp1a*, corresponde a posible redundancia funcional de ambos genes sobre estos territorios. Es por esto que decidimos enfocarnos en el fenotipo sanguíneo.

Como una forma independiente de corroborar el fenotipo sanguíneo inyectamos morfolino de *Mocrnp1a atg* en embriones de la línea transgénica *Tg(gfil.1::gfp)^{zfl28}*, la cual transcribe GFP bajo el promotor de *gfil.1*, el cual es expresado de manera generalizada en las células de la masa celular intermedia (Wei y col. 2008), que como se dijo previamente es el sitio de proliferación y diferenciación de progenitores hematopoyéticos, de manera que problemas en este transgénico además de presentarnos

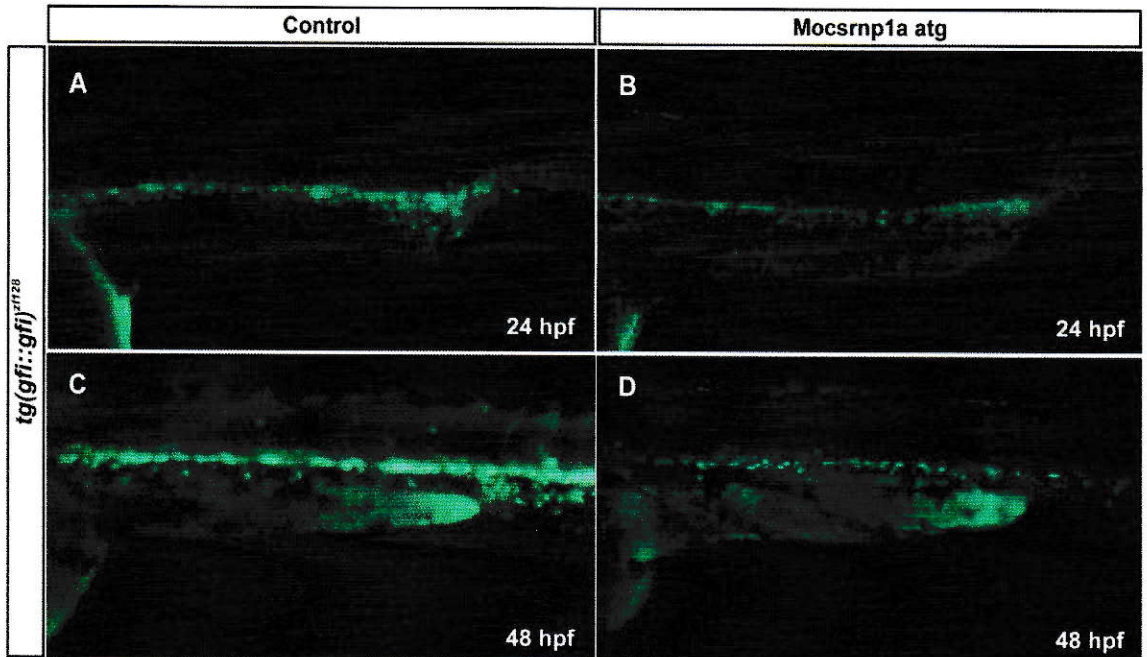


Figura 5. Disminución del número de células GFP positivas presentes en embriones morfantes del transgénico $Tg(gfi.1::gfp)^{128}$.

Se analizaron embriones de 24 (A, B) y 48 hpf (C, D) inyectados con morfolino control (A, C) y morfolino atg (B, D) de la línea transgénica $Tg(gfi::gfp)^{128}$. La señal de GFP se observa disminuida en embriones morfantes en comparación a controles en ambos estadios observados. Cada imagen es representativa del pool observado. (Todas las vistas son laterales, anterior a la izquierda).

una nueva forma de corroborar el fenotipo sanguíneo descrito, permite sugerir que una posibilidad de regulación de *csrnp1a* sea sobre los progenitores hematopoyéticos.

Podemos observar que a las 24 y 48 hpf embriones morfantes *csrnp1a* presentan una clara disminución en la señal de GFP con respecto a embriones control (Figura 5), indicando una disminución del número de células de los linajes hematopoyéticos presentes en el ICM. Los resultados realizados en este transgénicos son preliminares y actualmente no poseemos los peces para repetir y realizar un análisis estadístico detallado de la disminución de la señal *gfp* en el transgénico *Tg(gfi1.1::gfp)^{zj12}*.

El *knockdown* de *Csrnp1a* no afecta la formación del mesodermo.

Para obtener más datos acerca de la posible función específica de *csrnp1a* en hematopoyesis, es que decidimos analizar qué proceso del desarrollo del pez cebra relacionado con la formación de elementos sanguíneos está afectado por la disminución de la función de este gen. Además, considerando que las células en circulación observadas en nuestros experimentos provienen del proceso de hematopoyesis primitiva, y estas células a su vez derivan de un dominio particular del mesodermo lateral, es que primero analizamos si la especificación de este territorio se ve afectado en embriones morfantes para *csrnp1a*. La expresión de marcadores específicos del *patterning* de mesodermo: *gooseoid*, *notail* y *gata5* indicó que no existen diferencias entre embriones morfantes y control (Figura 6), excluyendo la posibilidad de que alteraciones en la especificación del mesodermo fueran responsables del fenotipo sanguíneo descrito.

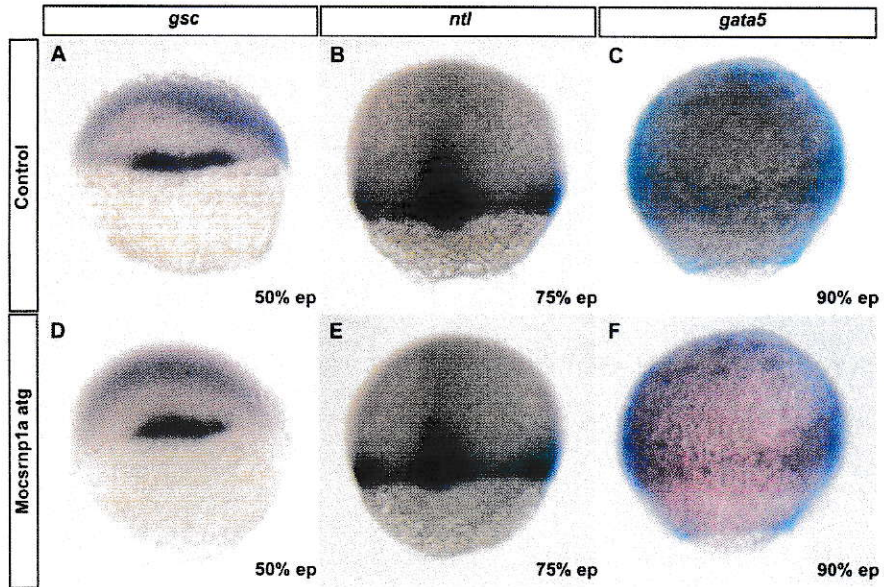


Figura 6. El *knockdown* de *csrnp1a* no afecta la especificación del mesodermo.

Expresión de marcadores *gooseoid* (*gsc*) (A, D), *notail* (*ntl*) (B, E) y *gata5* (C, F) evidenciada mediante ISH en tres estadios de la gastrulación. No se observan diferencias en la expresión de estos genes en embriones morfantes comparados con embriones control (100%, n=124, 131, 116 respectivamente).

El *knockdown* de *Csrnp1a* no afecta la formación de los vasos sanguíneos o el corazón.

Se ha descrito que alteraciones extremas en el flujo sanguíneo, por ejemplo pérdida total del latido cardiaco, generan una disminución de las células sanguíneas en circulación (North y col. 2009). Para excluir esta posibilidad, decidimos analizar en primer término posibles defectos en la formación de los vasos sanguíneos. Para esto, inyectamos el morfolino contra *csrnp1a* en embriones de la línea transgénica *Tg(fli1a:EGFP)^{yl}*, la cual expresa GFP bajo el promotor del gen marcador endotelial *fli1a*. Pudimos observar que los embriones morfantes resultaron indistinguibles de los embriones control (Figura 7A, B, C y D). Además y en el mismo sentido, evaluamos dos propiedades macroscópicas observables en estos embriones: el número de venas radiales totales presentes y calculamos el promedio de ángulos de 5 de estas venas (Figura 7, A y C línea punteada) presentes al comienzo de la extensión del vitelo. Este sector fue seleccionado porque los ángulos son relativamente similares, mientras que hacia posterior la cola se vuelve más estrecha y el valor de los ángulos de las venas radiales va disminuyendo. Pudimos detectar que no existen diferencias significativas respecto a los controles tanto para el número de venas radiales, como en el promedio de los ángulos de las venas seleccionadas (Figura 7E y F). La aproximación anterior nos informa de las alteraciones generales en los vasos sanguíneos, de manera que para evaluar de forma más precisa las alteraciones en el flujo, que depende más específicamente del calibre del vaso, es que incubamos embriones en el dador de óxido nitroso (NO) y conocido vasodilatador S-nitroso-n-acetil-penicilamina (SNAP), con la hipótesis de que si la disminución de las células en circulación es provocada por una disminución en el calibre del vaso, entonces

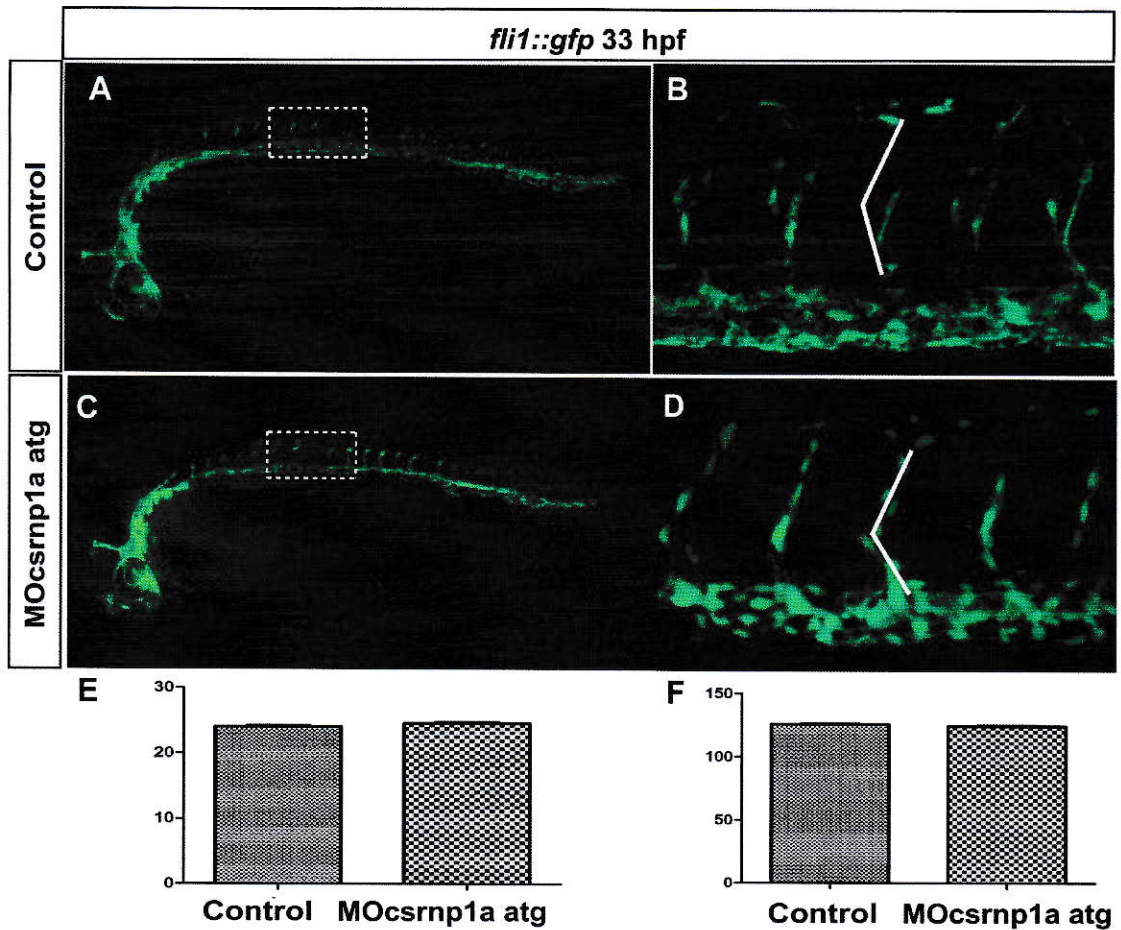


Figura 7. Csrnp1a no participa en la morfogénesis de los vasos sanguíneos.

Embriones control (A, B) y morfantes (C, D) de 33 hpf de la línea transgénica *Tg(fli1a:EGFP)^{yl}* que expresa GFP bajo el promotor endotelial *fli1a* (anterior a la izquierda). A y C corresponden a una vista con lupa de fluorescencia, mientras que B y D corresponde a una imagen de microscopía confocal. No observamos diferencias macroscópicas evidentes de este marcador en los embriones inyectados (todas las vistas son laterales, anterior a la izquierda). E: gráfico del número de venas radiales presentes en embriones control y morfantes (n=58 para cada condición). F: gráfico del promedio de ángulos de 5 venas radiales en la extensión del vitelo (líneas puntuadas en A y C) en embriones control y morfantes (n=63 en ambas condiciones). Para ambos casos se utilizó el test t de student y se obtuvo un $p > 0.05$.

la exposición a un vasodilatador debiera revertir, al menos parcialmente, el fenotipo de células en circulación. La cantidad de células en circulación fue evaluada con la tinción de O-Dianisidina. Podemos observar que los embriones morfantes no revierten el fenotipo hematopoyético al ser incubados en SNAP durante el periodo entre los 10 somitos y las 23 horas de desarrollo, sugiriendo que no existen alteraciones en el calibre de los vasos sanguíneos y que las alteraciones en el flujo derivados de estas no son responsables del fenotipo descrito (Figura 8). Por otro lado, el flujo sanguíneo está intrínsecamente relacionado con la función del corazón. Para evaluar alteraciones en este parámetro analizamos en primer lugar la anatomía cardíaca gruesa mediante hibridación *in situ* contra genes específicos para aurícula (*amhc*, cadena pesada de miosina auricular) y ventrículo (*vmhc*, cadena pesada de miosina ventricular). No encontramos diferencias macroscópicas entre embriones morfantes y controles en ninguno de los marcadores utilizados (Figura 9A a H), indicando que *csrnp1a* no participa en la especificación de estas estructuras. Finalmente, la función cardíaca esta estrechamente relacionada con el ritmo cardíaco, así analizamos el número de latidos cardíacos en la condición *knockdown* de *Csrnp1a*. Los embriones morfantes presentan una ligera pero significativa disminución en el número de latidos cardíacos (Figura 9I). La reducción de células sanguíneas en circulación ha sido observada solamente en ensayos con embriones que carecen completamente de latidos cardíacos (North y col. 2009), en nuestro caso sólo se observa una leve disminución de aproximadamente un latido cada 10 segundos (cerca al 6%), lo que nos lleva a pensar que si bien puede existir una contribución del ritmo cardíaco en el fenotipo sanguíneo observado, definitivamente este aporte no sería

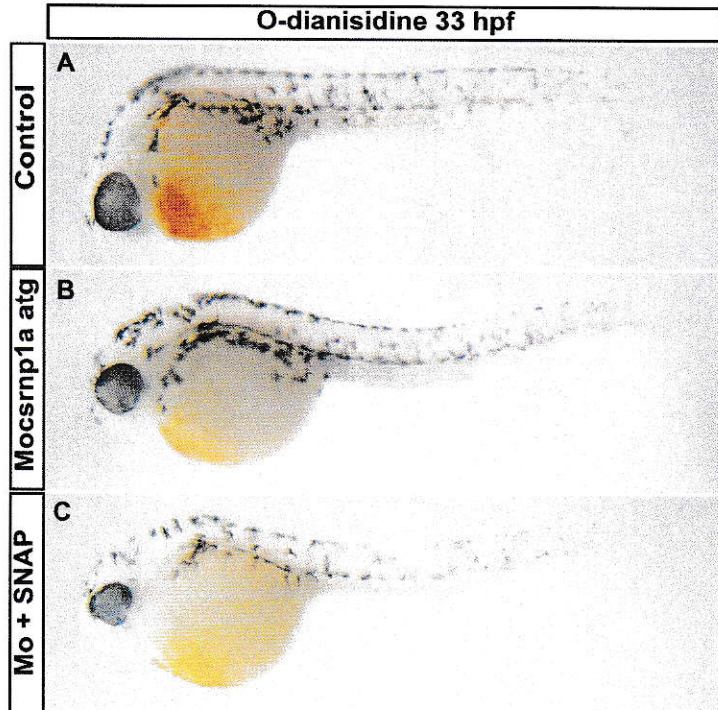


Figura 8. El vasodilatador SNAP no revierte el fenotipo *knockdown* de *csrnp1a*.

Embriones morfantes fueron incubados en el vasodilatador SNAP y fue analizada su habilidad para rescatar la reducción de células en circulación. El fenotipo *knockdown* no fue rescatado por tratamiento con SNAP. (A) Control 100% n=107; (B) Mo *csrnp1a* atg 36,4% n=59/162 de embriones que presentan el fenotipo morfante; (C) El 33,71% de los embriones inyectados con Mocsrnp1a atg e incubados con SNAP (n=59/175) presentan el fenotipo morfante. Todas las vistas son laterales, anterior a la izquierda.

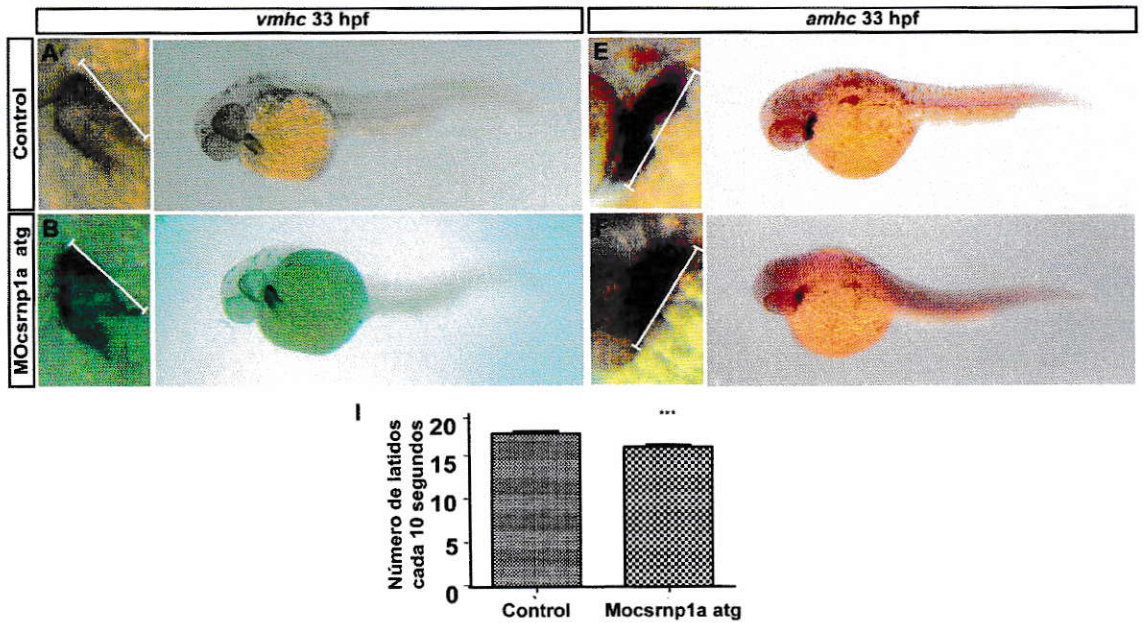


Figura 9. El *knockdown* de *csrnp1a* no afecta al desarrollo y función cardíaca.

La hibridación *in situ* contra el marcador ventricular (*vmhc*) (A a D) y auricular (*amhc*) (E a H) muestra que embriones inyectados presentan un desarrollo cardíaco macroscópico normal. A, B, E y F magnificación digital de C, D, G y H respectivamente. C, y D vistas ventro-lateral, anterior a la izquierda. G y H vista dorso-lateral, anterior a la izquierda. (I) gráfico que representa el número de latidos cardíacos evaluados en un periodo de 10 segundos en embriones control y morfantes (test t de student; $p < 0.0001$).

suficiente para generar el dramático fenotipo observado. Estos experimentos sugieren fuertemente que *csrnp1a* modula la formación de las células sanguíneas en circulación, afectando un proceso que no involucra efectos indirectos sobre el desarrollo de los vasos sanguíneos, el desarrollo cardíaco o efectos sobre el flujo sanguíneo.

Csrnp1a no participa en la formación de los linajes hematopoyéticos más tempranos.

Una vez descartados aquellos procesos por los cuales se puede producir disminución en la cantidad de células sanguíneas circulantes de forma indirecta, nos resta entonces la posibilidad que *Csrnp1a* actúe directamente en el proceso de hematopoyesis primitiva del pez cebra. Analizamos entonces cuál es el momento en el que *csrnp1a* interviene en el proceso de hematopoyesis primitiva. Para esto, examinamos la expresión del marcador más temprano de hematopoyesis observado en el pez cebra, *T-cell acute lymphocytic leukemia, tall/scl*, el cual es expresado en células denominadas hemangioblastos, capaces de generar los linajes hematopoyéticos y vasculares (Liao y col. 1998). En estadio de 8 somitos (13 hpf), aproximadamente 3 horas después de la selección de los hemangioblastos, no se observan diferencias substanciales en la expresión de *tall/scl* entre embriones morfantes y controles (Figura 10), sugiriendo que los progenitores hematopoyéticos tempranos están correctamente especificados. Además, y como vimos anteriormente, las células vasculares provenientes de estos mismos progenitores no se encuentran alteradas (Figura 7), confirmando que *csrnp1a* no participa en la especificación de los progenitores hematopoyéticos tempranos.

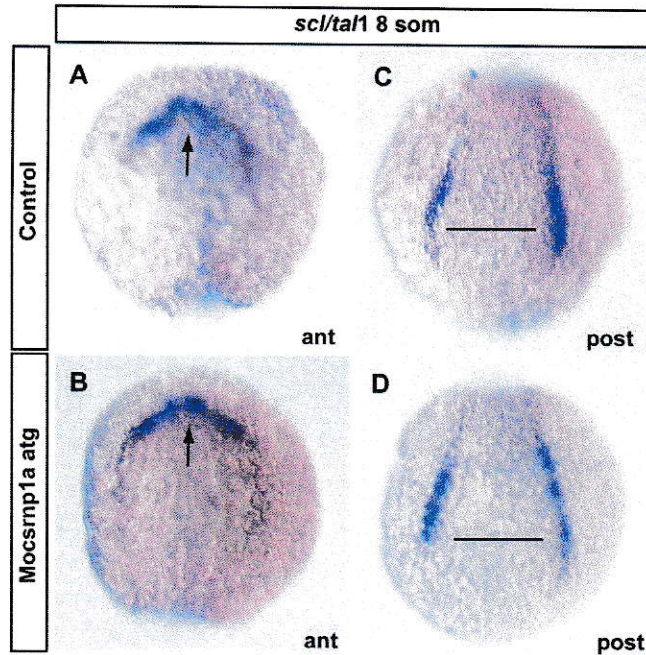


Figura 10. La reducción de *Csrnp1a* no afecta la especificación del mesodermo hemato-angiogénico. Hibridación *in situ* contra el marcador de hemangioblastos, *tal1/scl*, a 8 somitos (A a D) (A, B vista anterior; C, D vista posterior). No se observan diferencias evidentes en el patrón de expresión anterior (flechas en A y B) o la convergencia en la región posterior (barra C y D) entre controles y morfantes. El 100% de los embriones inyectados poseen el fenotipo representado en la imagen, n=200.

Csrnp1a es esencial para el desarrollo del linaje eritropoyético.

Con el fin de establecer si Csrnp1a es necesario para el desarrollo de la rama eritropoyética de la hematopoyesis, se evaluó mediante hibridación *in situ* la expresión de los marcadores específicos de este linaje, *klf4* y *gata1*. Estos factores de transcripción se expresan en la placa del mesodermo lateral posterior (PLPM), a partir de un subconjunto de células *tall* positivas y participan río abajo de este último en la especificación del linaje eritroide. En particular, *klf4* es activado por *tall* en el PLPM y luego, ambos factores actúan conjuntamente activando directamente *gata1* en estos territorios. A los 8 somitos, no hubo diferencias significativas en la expresión de *klf4* entre embriones control y morfantes (Figura 11A y B), lo que sugiere que los precursores eritroides se especifican correctamente en esta etapa en el proceso de diferenciación. Por el contrario, los embriones inyectados mostraron una fuerte reducción en la expresión de *gata1* (Figura 11C y D). Esto indica que Csrnp1a actúa en el desarrollo eritroide regulando la expresión de *gata1*, río abajo *klf4*. Como era de esperar, finalmente observamos que la inhibición de *gata1* es acompañada por una disminución en la cantidad de eritrocitos maduros, verificados por la expresión disminuida de la hemoglobina alfa embrionaria-1, *hbae1* (Figura 11E y F).

Csrnp1a es necesario para la formación del linaje mieloide.

Por último, analizamos si Csrnp1a también es necesario en la diferenciación del linaje mieloide. Para esto examinamos la expresión del factor de transcripción *spi1* el cuál se ha reportado como uno de los factores tempranos claves para el proceso de mielopoyesis primitiva en el pez cebra (Lieschke y col. 2002). Este factor es expresado en la placa del

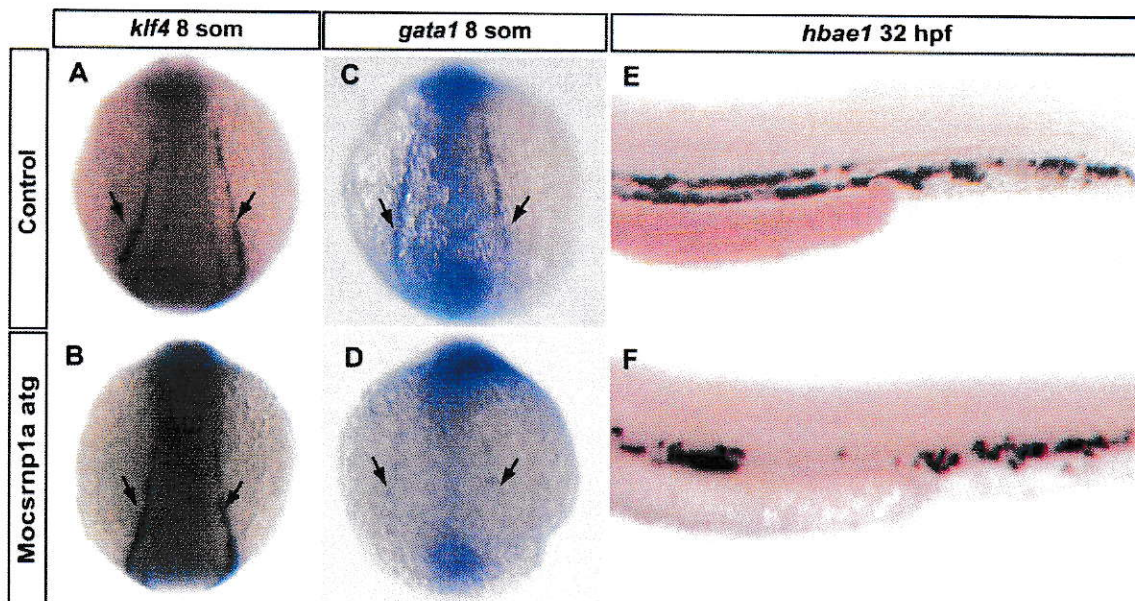


Figura 11. Precursores Eritroides/Gata1-positivos se ven afectados por la disminución de Csrnp1a. (A, C, E) Embriones control y (B, D, F) morfantes. En el estadio de 8 somitos, la expresión del marcador eritroide *klf4* no se ve afectada en embriones morfantes (A, B) (n = 137; 100% de los embriones inyectados se ven como la imagen presentada). Sin embargo, una clara disminución en la expresión de *gata1* se detecta en los embriones *knockdown* de *Csrnp1a* (comparar C con D) (n = 21/77; 27,27%, de los embriones inyectados presentan disminución del marcador). En consecuencia, a las 32 hpf, el marcador de diferenciación terminal eritroide, *hbae1*, se observa reducido en embriones morfantes (E, F) (n = 47/135; 34,81% de los embriones inyectados presentan el fenotipo).

mesodermo lateral anterior (ALPM) a partir de un subconjunto de células *tal1/scl* positivas presentes en este territorio. En ensayos de hibridación *in situ* contra *spil* observamos que la disminución de *Csrnp1a* altera el patrón de expresión de *spil*, no disminuyendo su señal sino que cambiando su distribución espacial (Figura 12A a D). A los 12 somitos, es posible observar una dispersión en el dominio de expresión *spil* en embriones morfantes para *csrnp1a*, mientras que en embriones control la señal es más compacta. Finalmente el efecto sobre los progenitores mieloides fue verificado observando que el número de células mieloides diferenciadas. Pudimos observar que existe una disminución del 63,15% en el número de neutrófilos entre embriones control y morfantes (número de embriones contados para cada condición = 56), evidenciada en embriones transgénicos que expresan GFP bajo el promotor de mieloperoxidasa (*Tg(BACmpx:GFP)^{III4}*) (Figura 13A, B y C). Lo mismo fue evidenciado para el número de macrófagos marcados con la sonda específica *lcpl* en donde la disminución fue de del 34,54% en el número de macrófagos (Figura 13D, E y F) (número de embriones = 61).

El *knockdown* de *Csrnp1a* afecta la proliferación celular en territorios mieloides.

Considerando el papel descrito de *csrnp1/axud1* en la supervivencia de progenitores cefálicos es que decidimos investigar si las alteraciones en la expresión de *gatal* y *spil* y la disminución observada de todos los linajes hematopoyéticos maduros es producto de perturbaciones en la sobrevivencia o en la proliferación de estos linajes. Evaluamos,

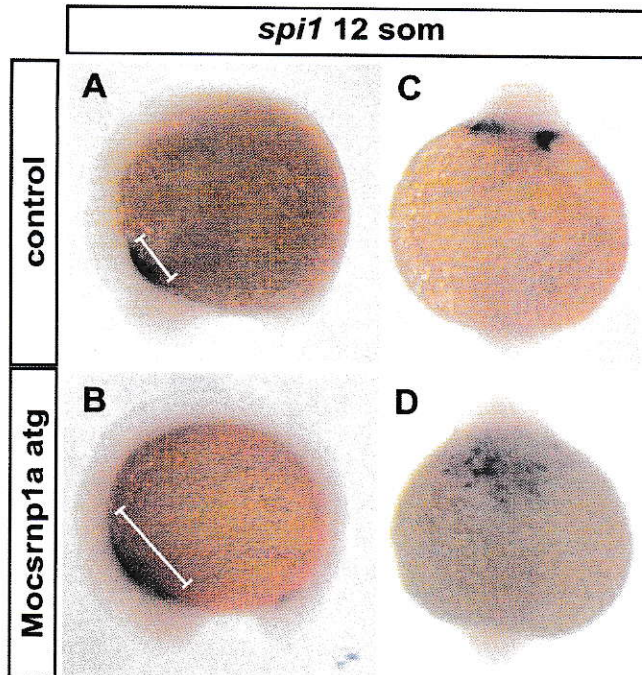


Figura 12. El *knockdown* de *Csrnp1a* afecta al desarrollo del linaje mieloide temprano.

Embriones morfantes muestran una alteración en la señal de *spi1* (A a D; A, B vista lateral, anterior a la izquierda; C, D vistas anteriores). Un 84,3% (n = 86/102) de los embriones control presentan el patrón de expresión normal de *spi1* (A, C); mientras que un 40,78% (n=42/103) de los embriones inyectados presentan el patrón de expresión normal y un 59,22% (n = 61/103) presentan el patrón *spi1* disgregado (B, D).

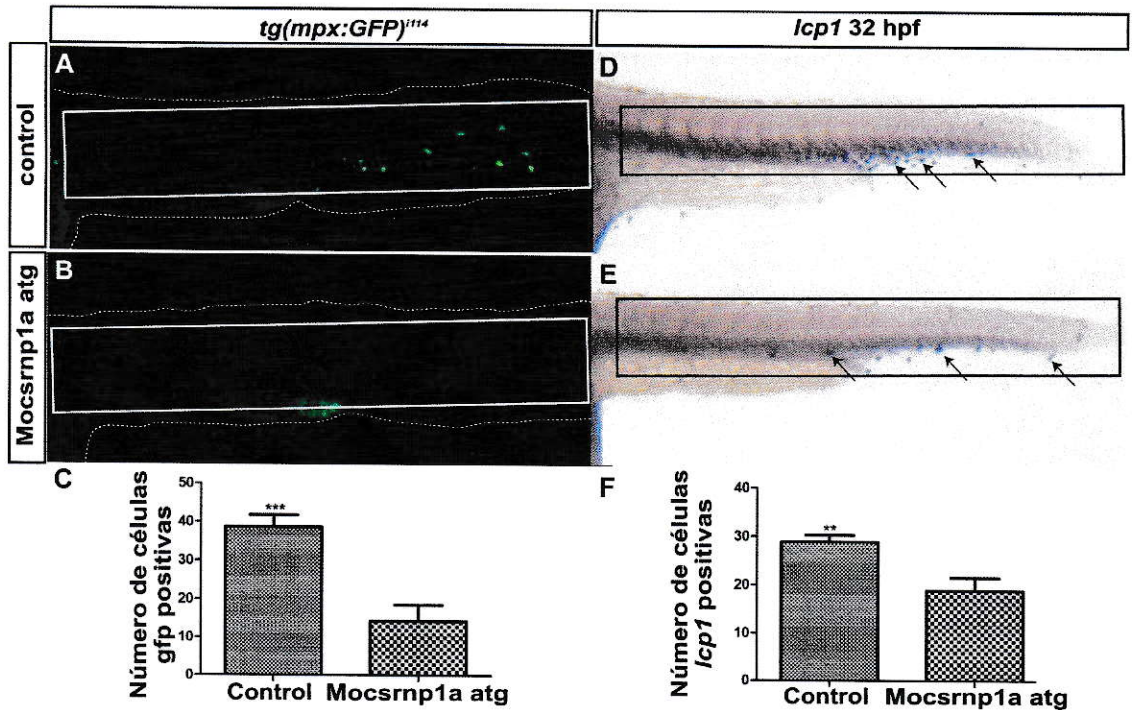


Figura 13. El *knockdown* de *Csrnp1a* altera la expresión de *spi1* y genera a una disminución en la cantidad de macrófagos y granulocitos maduros.

Existe una clara reducción del número de las células GFP positivas (neutrófilos) en embriones morfantes de la línea transgénica *Tg(BACmpx: GFP)¹¹¹⁴*. (A, B). La línea punteada representa el borde del embrión. (C) Para realizar la cuantificación se consideraron las células GFP positivas presentes dentro del recuadro blanco (a lo largo de la cola del embrión) (A y B) en 56 embriones de cada condición. Pudimos observar que la disminución de la señal en embriones morfantes es significativa (test t de student; $p \leq 0,0005$). Por otra parte la disminución en el marcador específico de macrófagos *lcp1* (flechas negras) se pone de manifiesto por ISH en embriones morfantes (D, E). (F) Cuantificación de las células *lcp1* positivas a lo largo de la cola (recuadro negro en D y E) en 61 embriones de cada condición. Podemos observar que la disminución de la señal en embriones morfantes es significativa (test t de student; $p \leq 0,005$). A, B, D y E son vistas laterales, anterior a la izquierda.

mediante la tinción naranja de acridina, la muerte celular de los embriones morfantes *csrnpl1a* a los 8 somitos. Seleccionamos este estadio porque es en este momento donde observamos la disminución de la señal en el factor de transcripción *gata1* mediante ISH. Podemos observar que morfantes de *csrnpl1a* presentan un aumento generalizado de la muerte celular con respecto a embriones control (Figura 14A y G). Previamente se ha reportado que que la inyección de distintos morfolininos aumenta inespecíficamente la muerte celular promoviendo la activación de la vía de señalización de p53 (Robu y cols. 2007). Es por esto que decidimos co-inyectar los morfolininos contra *p53* y *csrnpl1a*, y comparar el número de células marcadas mediante la tinción de muerte, naranja de acridina. A los 8 somitos, la muerte descendió a niveles control en embriones co-inyectados con el morfolino de *p53* (Figura 14G). Es importante destacar que la reducción en la muerte celular producida por la co-inyección de los morfolininos contra *p53* y *csrnpl1a* no modificó la reducción en las células sanguíneas en circulación o la disminución del tamaño de la cabeza generado por el descenso de *Csrnp1a* (Figura 14B, D, F, H). En este mismo escenario también analizamos la proliferación celular mediante técnicas de inmunohistoquímica contra Histona 3 Fosforilada, H3-P, observando específicamente la proliferación en los territorios progenitores de los linajes eritroides y mieloides. No se detectó cambios significativo en la cantidad de células en proliferación en el dominio eritroide, circunscrito mediante ISH contra *klf4* y cuantificado contando los núcleos en mitosis sobre la señal posterior de este gen (Figura 15A, B, C, D e I; 100% embriones observados, n= 55 para las condiciones control y morfante respectivamente). Sin embargo, considerando que en este estadio nos es imposible seleccionar de entre los embriones inyectados aquellos con fenotipo morfante, puede ser

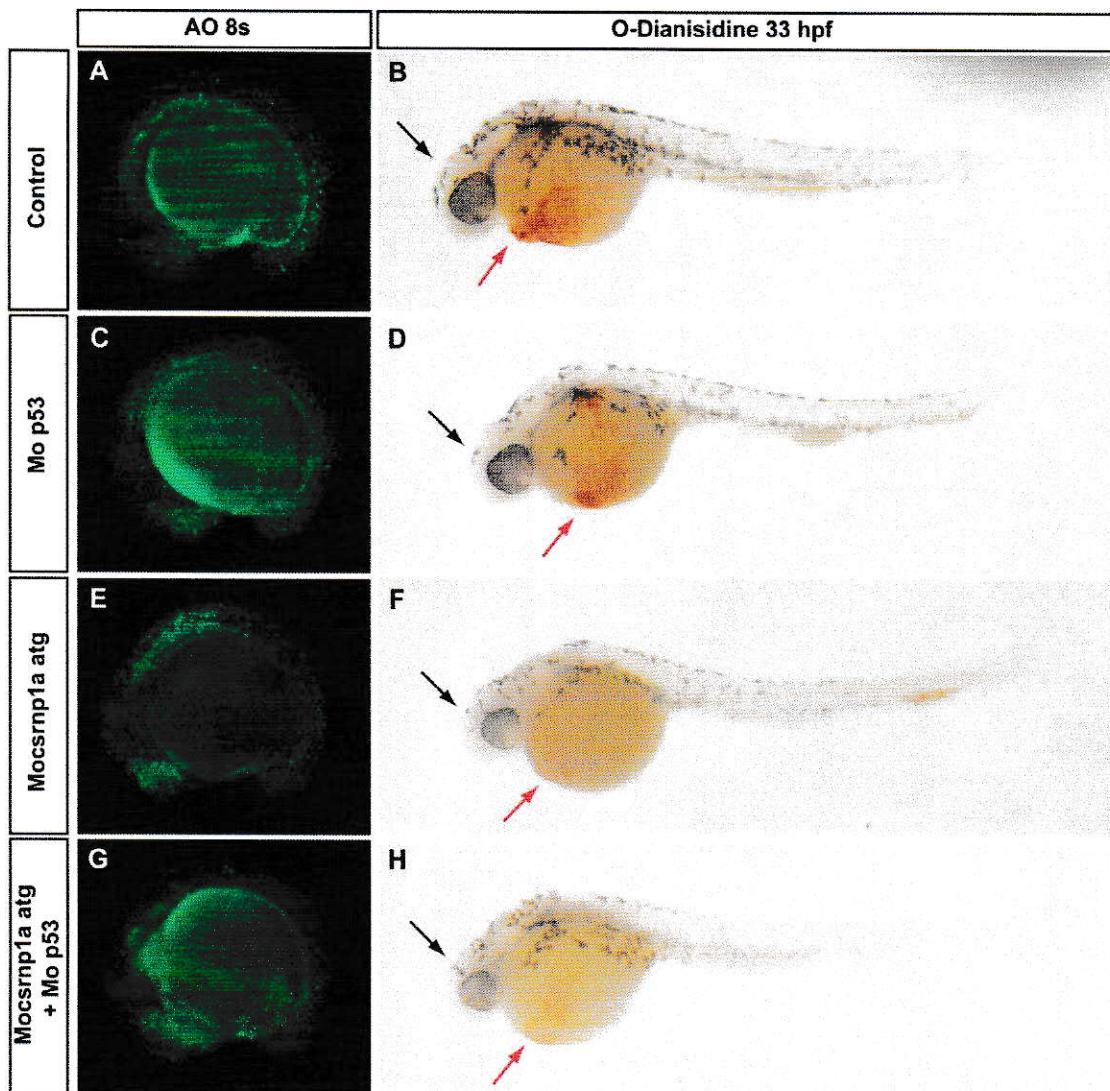


Figura 14. Embriones *knockdown* de *Csrnp1a* muestran un aumento en la muerte celular debido a la toxicidad del morfolino, efecto no relacionado con la reducción de células sanguíneas en la circulación.

Se analizó la muerte celular por naranja de acridina en embriones inyectados con morfolino control (A), con morfolino *csrnp1a* (C), con morfolino *p53* (E), y co-inyectados con morfolino *csrnp1a* y *p53* (G). Un claro aumento en la muerte celular se detecta en embriones morfantes para *csrnp1a* (86,67% de los embriones inyectados, n = 58/67), que se revierte al co-inyectar los morfolinios de *p53* y *csrnp1a* (16,67% de los embriones inyectados, n = 16/96). El fenotipo de las células sanguíneas se observó a las 33 hpf mediante tinción de O-Dianisidina para todos los tratamientos (B, D, F, H). Embriones co-inyectados (H, 36,56% de los embriones inyectados, n = 34/93) presentan el fenotipo sanguíneo, similar a embriones morfantes de *csrnp1a* (F; 35,96% de los embriones inyectados, n = 32/89) (flechas rojas). Vale la pena mencionar que la ligera reducción del tamaño de la cabeza exhibida por embriones morfantes también se detectó en la co-inyección de los morfolinios contra *csrnp1a* y *p53* (flechas negras). (Todas vistas laterales, anterior a la izquierda).

que una posible reducción en la proliferación se diluya al ser promediada con embriones que no presentan el fenotipo, pero que en este momento no podemos identificar. Por otra parte, cuando la proliferación fue examinada en el dominio disperso de *spil*, observamos una disminución significativa en el número de células H3-P positivas en el ALPM (Figura 15E, F, G, H y J; cuantificación realizada en el 59,22% de los embriones que presentan el fenotipo disperso *spil*, n=58 para condición control y morfante). Estos resultados indican que *Csrnp1a* participa en el proceso de mielopoyesis modulando el patrón de proliferación de las células *spil* positivas.

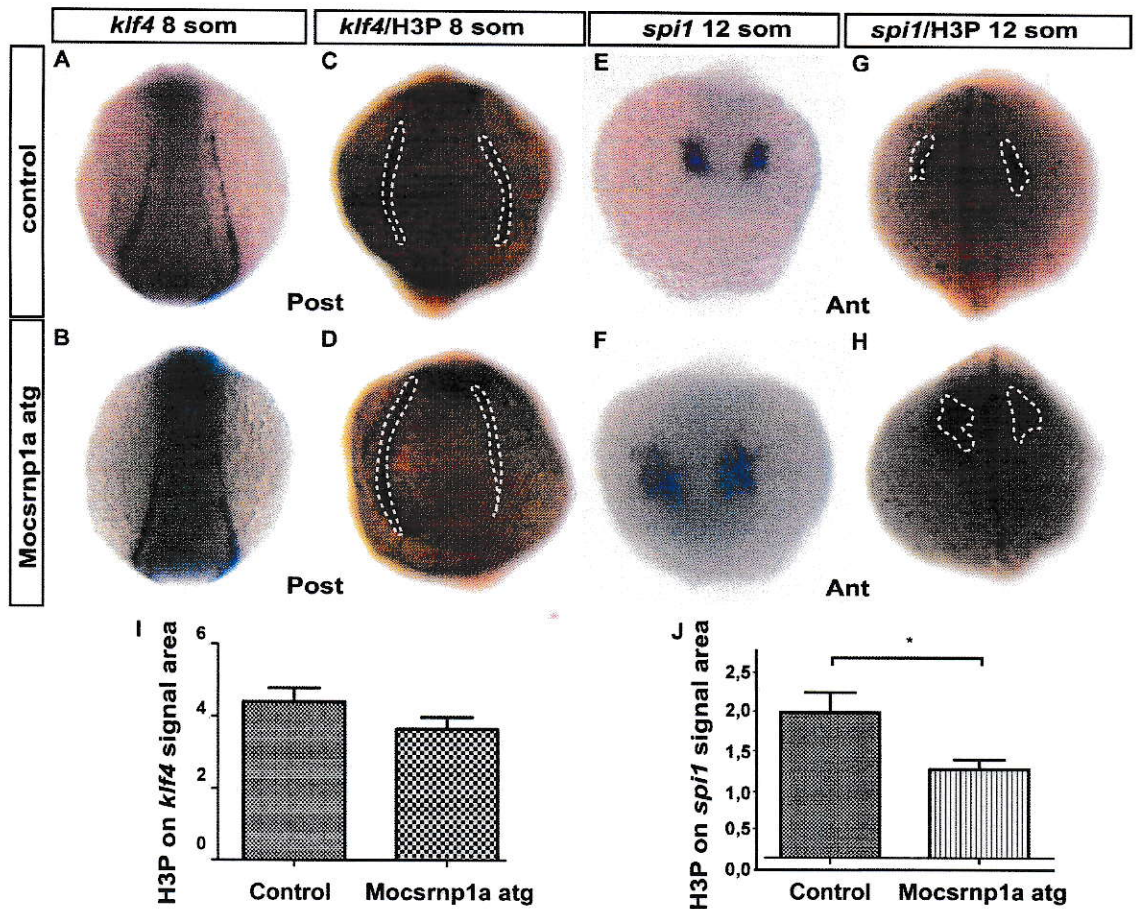


Figura 15. El *knockdown* de *Csrnp1a* disminuye la proliferación celular en territorios mieloides y no eritroides.

(A y B) Expresión de *klf4* revelada mediante ISH en embriones control (A) y morfantes (B) a los 8 somitos. (C y D) Inmunohistoquímica realizada sobre la marca de *klf4* en embriones control (C) y morfantes (D). (E y F) Expresión de *spi1* revelada mediante ISH en embriones control (E) y morfantes (F) a los 12 somitos. (G y H) Inmunohistoquímica realizada sobre la marca de *spi1* en embriones control (G) y morfantes (H). (A, B, C y D: vistas posteriores; E, F, G y H: vistas anteriores). (I) No existe diferencia significativa en la cantidad de núcleos marcados con H3-P en el área de expresión de *klf4* a 8 somitos (número de embriones contados = 55 en cada condición; test t de student $p \geq 0,05$), mientras que los cambios en la expresión de *spi1* (J) están acompañados por una disminución significativa de la proliferación (evidenciado como el número de H3P dentro del área de expresión de *spi1*). (Número de embriones contabilizados = 58 para cada condición; test t de student; $p \leq 0,05$).

DISCUSIÓN

Análisis de microarreglos han sido utilizados ampliamente para descubrir genes con posibles funciones en múltiples condiciones celulares. En este tipo de estudios se ha identificado, en humanos, el gen *axud1/csrnp1* como un elemento diferencialmente expresado en una variedad de condiciones, incluyendo la disminución de su expresión en varios tipos de cáncer y su sobreexpresión mediante la inducción por sobreexpresión de AXINA1. Este último efecto independiente de otros componentes de la vía Wnt canónica (Ishiguro y col. 2001).

A pesar de que las proteínas CSRNP (*cistein serin rich nuclear proteins*) han sido detectadas en varios estudios de microarreglos, poniendo de manifiesto su relación con el cáncer (Obama y col. 2005; Nakamura y col. 2004; Nishidate y col. 2004), estrés celular (Chen y col. 2004; Thomas y col. 2006; Yi y col. 2006), y además se han hecho *knockout* de los tres parálogos de estos genes presentes en ratón, aún es necesario datos adicionales de diferentes modelos para complementar, integrar y, finalmente, determinar el papel específico de esta familia de proteínas en el desarrollo.

Patrón de expresión de *csrnp1a* durante el desarrollo temprano del pez.

El patrón de expresión de *csrnp1a* es altamente dinámico, mostrando una distribución inicial ubicua, que luego se localiza en territorios ventrales del embrión, y con una señal que se expande y retrae a lo largo de la masa celular intermedia (ICM). Cuando se

compara esta expresión con la de su parálogo, descrita previamente por Feijóo y cols. (Feijóo y col. 2009), podemos ver que *csrnp1a* y *csrnp1/axud1*, no se expresan de forma idéntica. Sin embargo, ambos comparten dominios de expresión en las regiones anteriores del tubo neural, lo que sugiere que mecanismos similares, tal vez la señalización de la vía Shh, a similitud al caso de *csrnp1*, operan en este territorio para regular la expresión de *csrnp1a*. Además de esta expresión anterior, *csrnp1a* es expresado en la masa celular intermedia, el cual es un territorio reconocido como sitio de proliferación y diferenciación de células primitivas hematopoyéticas (revisado por Davison y Zon 2004). Es importante destacar la expresión dinámica entre 24 y 48 horas en el ICM, donde se detectó una expansión secuencial y una posterior retracción de la señal de *csrnp1a*. El pez cebra, al igual que todos los vertebrados, tiene dos oleadas de hematopoyesis: primitiva y definitiva. La ola definitiva genera las células capaces de diferenciarse a todos los linajes sanguíneos presentes en el adulto. Se ha demostrado que las células madre hematopoyéticas (*hematopoietic stem cells*, HSC) se originan en el pez cebra durante la ola definitiva, entre las 26 y 36 hpf a partir de células provenientes de la aorta dorsal (Bertrand y col. 2008). Además, se conoce que para producir correctamente estos linajes es requerida la actividad de factores de transcripción como *runx1* y *cmyb*, que se expresan en estos territorios. Interesantemente, estos factores son regulados mediante las vías de señalización Hedgehog (Gering y col. 2005) y Notch (Bertrand y col. 2010). La expresión similar, tanto temporal como espacial de *runx1*, *cmyb* y *csrnp1a* nos permiten especular que quizá *csrnp1a* podría actuar al comienzo de la formación de HSC durante la hematopoyesis definitiva. Por otra parte, considerando que la reducción de las células sanguíneas es observada entre 24 y 36 hpf, o sea en células que derivan

específicamente del proceso de hematopoyesis primitiva, además de la ausencia de herramientas adecuadas para el estudio de la ola definitiva, es que hemos centrado nuestro trabajo en el papel de *csrnp1a* sobre el desarrollo de los precursores hematopoyéticos primitivos. Por último, los dominios de expresión descritos para ambos parálogos apoyan la idea de que la familia CSRNP podría tener un papel elemental y común en la biología de las células progenitoras en el sistema nervioso, así como de los precursores hematopoyéticos. Esta propuesta se ve sustentada por nuestro análisis funcional. Además estas observaciones sugieren que este tipo de progenitores (neural y hematopoyético) comparten un programa genético esencial que estaría siendo regulado por las proteínas CSRNP.

Función de *Csrnp1a* durante el desarrollo temprano del pez cebra.

El análisis funcional de *csrnp1a* mediante la inyección de oligonucleótidos morfolidos mostró que a las 30 horas post fertilización el fenotipo manifiesto es esencialmente una ligera reducción en el tamaño de la cabeza y una disminución severa en las células sanguíneas circulantes. Esta última observación es consistente con la expresión del gen en la ICM. Mediante ensayos de RT-PCR pudimos observar que el mensajero de *csrnp1a* no se encuentra a las 24 hpf en embriones morfantes, pero desde las 30hpf comienza a reacumularse, indicando que el morfolino deja de ser efectivo en estos estadios. Esto puede ocurrir por que el morfolino, el cual es inyectado en el estadio de 1 célula y por tanto se diluye con cada evento de división celular, ya se encuentra demasiado diluido como para inhibir consistentemente el procesamiento del mensajero *csrnp1a*. Por otra parte y consistentemente, el fenotipo de disminución de células

sanguíneas se ve recuperado a tiempos posteriores. Esta situación puede ser explicada de dos formas: 1. La falta de mensajero de *csrnp1a* puede generar un arresto de las células hematopoyéticas en algún estadio temprano de su desarrollo y cuando el mensajero se reacumula las células salen de este arresto y continúan con su desarrollo, saliendo de manera tardía a la circulación. 2. Porque las células con la disminución de *csrnp1a* mueren en estadios posteriores a los 8 somitos, pero cuando el morfolino deja de actuar, células remanentes continúan dividiéndose restableciendo el *pool* de células que normalmente están en circulación. Por último, se evidenció un aumento generalizado en la muerte celular en embriones morfantes para *csrnp1a*, no obstante esto fue considerado en cierta medida no específico, puesto que al co-inyectar el morfolino *csrnp1a* junto con el morfolino de *p53* se produjo una reducción considerable de la muerte celular. Es importante destacar que, al observar estos embriones a las 32 hpf para analizar la reducción en las células sanguíneas en circulación, la proporción de embriones que mostraron el fenotipo de células sanguíneas en circulación fue la misma aún cuando la muerte mediada por *p53* estaba bloqueada. Esto indica que la muerte celular es inespecífica, probablemente consecuencia de la toxicidad intrínseca del morfolino y este fenómeno no tiene impacto sobre los fenotipos descritos. En concordancia con esto, el fenotipo cefálico provocado en la condición *knockdown* de *Csrnp1a*, tampoco depende de la activación inespecífica de *p53*.

En este estudio, se demostró que la disminución de *Csrnp1a* genera una perturbación del desarrollo de los linajes sanguíneos primitivos, tanto de los linajes eritroides como mieloides. De esta forma, la reducción de *Csrnp1a* afecta la expresión de genes hematopoyéticos esenciales, incluyendo una disminución de la expresión en el factor de

transcripción *gata1*, sin perturbación transcripcional de genes río arriba de la vía eritropoyética como *klf4* o *tall*. Por otra parte, la reducción de *Csrnp1a* modifica la distribución de la expresión del factor *spi1* en la cascada de la mielopoyesis, sin observarse tampoco alteraciones en la expresión de *tall* en este territorio. Finalmente, fue posible observar una reducción de la proliferación en el territorio *spi1*, que probablemente explique la disminución de células mielopoyéticas adultas. Mientras que en el territorio eritroide no pudimos observar esta disminución, sin embargo en los estadíos analizados nos es imposible seleccionar los embriones morfantes mediante ISH contra *klf4* por lo que una posible disminución en la proliferación celular queda enmascarada, de manera que nuestros datos nos impiden excluir la posibilidad de una reducción en la proliferación celular en el territorio eritroide.

Función eritropoyética de *Csrnp1a*.

En pez cebra, los primeros progenitores sanguíneos son especificados en el mesodermo durante la gastrulación. Es ampliamente aceptado que la vía de señalización TGF- β , activada por proteínas de la familia BMP, regulan este proceso. BMP4 inicialmente induce el mesodermo ventral-posterior y posteriormente dirige una subpoblación de estas células hacia linajes sanguíneos mediante la activación de *Wnt3a* y aumentando la expresión de genes como *cdx* y *hox* (Lengerke y col. 2008). En conjunto, estas interacciones activan la expresión del primer factor de transcripción identificable hematopoyético, *tall/scl*, que es fundamental para la especificación de los precursores hematopoyéticos.

tal1/scl se expresa en células denominadas hemangioblastos, estas son células indiferenciadas capaces de producir tanto linajes sanguíneos como vasculares (Liao y col. 1998). Este factor de transcripción forma complejos con otros factores esenciales en la hematopoyesis como son LMO2, GATA2 e incluso con GATA1, y de esta manera controla la expresión de una variedad de genes hematopoyéticos (Lecuyer y col. 2004). Río abajo de estos complejos se encuentran los factores de discriminación *gata1* y *spil*, esenciales para el desarrollo de los linajes eritroides y mieloides respectivamente. El factor de transcripción Krüppel-like, *klf4*, es otro factor importante que promueve la activación transcripcional de *gata1* por unión directa a su promotor (Kawahara y col. 2001). Nuestras observaciones indican que a los 8 somitos, embriones morfantes para *csrnpl1a* poseen expresión de *klf4* normal, lo que sugiere que la inhibición de *gata1* observada no es causada por deficiencias en la función este factor de transcripción. Por otra parte, los defectos diferenciales producidos sobre la expresión de *gata1* y *spil* en embriones morfantes entre 8 y 12 somitos, fuertemente sugieren que en este momento del desarrollo *Csrnp1a* podría ser parte del complejo SCL implicado en la diferenciación eritroide, particularmente en la activación transcripcional de *gata1*.

Previamente se ha observado que la expresión de *gata1* es dependiente del factor de elongación de la transcripción DSIF. Análisis del mutante *spt5/Foggy*, componente del complejo DSIF, reveló que este factor es necesario para la transcripción de *gata1* (Taneda y col. 2011). Se ha especulado que DSIF podría reclutar a P-TEFb (*positive transcription elongation factor-b*) para conferir especificidad funcional al complejo SCL. Por otra parte, P-TEFb también interactúa con los factores de transcripción hematopoyéticos Tif1- γ , LDB1 y GATA1, conocidos componentes del complejo SCL

(Taneda y col. 2011). La observación de que *axud1* de *Drosófila* interactúa en un ensayo de doble híbrido (Giot y col. 2003) y genéticamente con *Spt5* (Glavic y col. resultados no publicados) refuerza la idea de que *Csrnp1a* podría ser parte del complejo SCL implicado en la diferenciación eritroide y la expresión de *gata1*. Por último, GATA1 se une a varios promotores eritroides y mieloides, activando y reprimiendo la transcripción respectivamente, y a través de esta función bimodal impulsa la diferenciación celular hacia el linaje eritroide.

Función mielopoyética de *Csrnp1a*.

El factor de transcripción *Spi1* es clave en el compromiso de las células con el linaje mielóide. Nuestros resultados muestran que la disminución de *Csrnp1a* produce una distorsión en su patrón de expresión, que no parece ser debido únicamente a la inhibición de su transcripción. En la placa del mesodermo lateral anterior (ALPM), el complejo de SCL regula la expresión del factor de transcripción mielóide específico *spi1*; aquí la especificación de células *spi1* positivas está sujeta a la vía de señalización BMP. Cuando la señalización de BMP es reprimida por la expresión de un receptor dominante negativo de BMP, las células *spi1* positivas no son detectables, a pesar de la existencia de hemangioblastos (Hogan y col. 2006). Otro factor conocido, que actúa río arriba de *spi1*, es el ácido retinoico. Los embriones expuestos a este compuesto muestran una disminución de expresión de *tall*, *lmo*, *gata2* y *eprs* únicamente en los hemangioblastos anteriores, lo que consecuentemente modifica la expresión de *spi1* (Liang y col. 2012). Finalmente, y de forma análoga a las decisiones del linaje eritroide, estos factores se unen a promotores que impulsan la diferenciación de las células del

ALPM a neutrófilos y macrófagos e inducen la expresión de marcadores como *mpx* o *lcp* (Rhodes y col. 2005).

El modelo actual que da cuenta de las decisiones entre los linajes mieloides y eritroides implica una regulación negativa cruzada entre *spil* y *gatal* (Rhodes y col. 2005). Datos recientes han añadido un elemento adicional a esta regulación, el factor de transcripción *tif1-γ* (*transcription intermediate factor-1γ*). Se ha observado que según el contexto este factor puede reprimir o activar la expresión *spil* y *gatal*. En las primeras etapas del desarrollo de embriones morfantes para *tif1-γ* se observa una disminución en la expresión de ambos genes (Monteiro y col. 2011).

Nuestros resultados indican que *Csrnp1a* regula en diferentes etapas y de forma independiente el desarrollo de los linajes eritroides y mieloides, sin afectar el progenitor común evidenciado por la expresión de *tall*. Una posible explicación para este fenómeno considera los siguientes antecedentes: en el tiempo de desarrollo analizado la falta de función de *tif1-γ* es capaz de disminuir ambos factores: *gatal* y *spil* y *Csrnp1a* podría interactuar con SPT5, miembro del complejo DSIF (Giot y col. 2003; Glavic resultados no publicados). Por otra parte, para ejercer su función, DSIF es capaz de interactuar con factores de elongación positivos (P-TEFb) y negativos (NELF) de la transcripción. Es sabido que P-TEFb es capaz de unirse a TIF1-γ y al complejo SCL para regular el desarrollo eritroide (Bai y col. 2010). Entonces, si bien DSIF no ha sido implicado en el desarrollo mieloide temprano, el conjunto de datos anteriores nos permiten especular que el control que ejerce *Csrnp1a*, y posiblemente TIF1-γ, sobre *spil* surgen de su interacción con el complejo SCL, el cual opera en territorios discretos y en

etapas particulares de la hematopoyesis, reclutando factores como P-TEFb o NELF, y que a su vez estos actúan regulando genes a través del complejo de elongación DSIF.

Como se mencionó antes, la falta de función de *Csrnp1a* no afecta la expresión de *tall/scl*, y en consecuencia no observamos alteraciones en los marcadores endoteliales o en la morfología de los vasos. Además, observamos que disminuyendo *Csrnp1a* no se perturba el desarrollo del corazón como lo demuestran las sondas específicas de tejido de aurícula y ventrículo, sin embargo nos encontramos con una ligera reducción de alrededor del 6% en los latidos del corazón en los embriones morfantes. Consideramos que esta reducción es demasiado pequeña para dar cuenta de la significativa disminución en las células sanguíneas circulantes observada. Esto está apoyado por el hecho de que un conocido vasodilatador, SNAP (un compuesto dador de NO), fue incapaz de rescatar el fenotipo morfante. Y por otra parte, el flujo sanguíneo (número de células en circulación que se mueve a través del campo visual en un período de tiempo) es casi nulo en embriones morfantes, en contraste con la velocidad de circulación de dicha célula, la que al menos no disminuye de la manera que lo hace el flujo de células sanguíneas. Esto indica que el fenotipo no se basa en la reducción de la velocidad del flujo, sino más bien en la cantidad de células en la circulación. En conjunto todos estos datos sugieren que *Csrnp1a* no tiene influencia sobre el flujo sanguíneo, y por tanto la clara reducción de las células sanguíneas circulantes probablemente sea una función específica de *csrnp1a* en la hematopoyesis primitiva.

CONCLUSIONES

- La disminución de *Csrnp1a* afecta el número de células sanguíneas en circulación.
- La disminución de la función de *Csrnp1a* no afecta el *patterning* del mesodermo, la formación de vasos sanguíneos o el desarrollo cardíaco.
- *Csrnp1a* no participa en el establecimiento de los progenitores hematopoyéticos más tempranos.
- *Csrnp1a* es necesario para el desarrollo del linaje eritroide, río abajo de *tall/scl* y *klf4*, regulando particularmente la expresión de *gata1*.
- *Csrnp1a* es necesario para el desarrollo del linaje mielóide modulando la expresión del factor de transcripción *spi1* y la proliferación en éstos territorios.
- La inyección del morfolino contra *csrnp1a* genera muerte celular inespecífica la cuál es revertida por la coinyección con el morfolino de p53, sin embargo el fenotipo de falta de sangre y cefálico no cambian.



PROYECCIONES

En este trabajo se describen nuevos datos sobre la familia de proteínas CSRNP en el desarrollo de vertebrados, específicamente investigando el gen *csrnp1a* presente en pez cebra. Hemos establecido un nuevo rol para esta familia de potenciales factores de transcripción, particularmente identificando el rol de *csrnp1a* en la hematopoyesis primitiva. A pesar de lo anterior, aún son necesarios más estudios para definir con precisión el papel de *csrnp1a* en el desarrollo del pez cebra y la hematopoyesis, y su participación en la red transcripcional que lo controla. Especial atención requiere la relación de *Csrnp1a* con SPT5 y la formación y actividad de los complejos SCL selectivos durante la diferenciación eritroide y mieloide. Este será sin duda el enfoque de nuevas investigaciones.

BIBLIOGRAFIA

1. Aberle, H., Bauer, A., Stappert, J., Kispert, A., and Kemler, R. 1997 .B-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J.* 16: 3797-3804.
2. Al-Adhami M.A., Kunz Y.W. 1977.Ontogenesis of haematopoietic sites in *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan). *Dev. Growth Differ.* 19: 171-179.
3. Bai X., Kim J., Yang Z., Juryneec M. J., Akie T. E., Lee J., LeBlanc J., Sessa A., Jiang H., DiBiase A., Zhou Y., Grunwald D. J., Lin S., Cantor A. B., Orkin S H., Zon, L. I. 2010. TIF1gamma controls erythroid cell fate by regulating transcription elongation. *Cell.* 142: 133–143.
4. Berdugo E., Coleman H, Lee D. H., Stainier Didier Y. R., and Yelon D. 2003. Mutation of weak atrium/atrial myosin heavy chain disrupts atrial function and influences ventricular morphogenesis in zebrafish. *Development.* 130: 6121-6129.
5. Bertrand J.Y., Cisson J.L., Stachura D.L., Traver D. 2010. Notch signaling distinguishes 2 waves of definitive hematopoiesis in the zebrafish embryo. *Blood.* 115(14): 2777-8.
6. Bertrand J.Y., Kim A.D., Teng S., Traver D. 2008. CD41+ cmyb+ precursors colonize the zebrafish pronephros by a novel migration route to initiate adult hematopoiesis. *Development.* 135: 1853-1862.
7. Brownlie A., Hersey C., Oates A.C., Paw B.H., Falick A.M., Witkowskae, H.E., Flintf J., Higgsf D., Jesseng J., Baharya N., Zhua H., Ling S., Zon L. 2003 Characterization of embryonic globin genes of the zebrafish. *Dev. Biol.* 255: 48-61.
8. Chen W.V., Delrow J., Corrin P.D., Frazier J.P., Soriano P. 2004. Identification and validation of PDGF transcriptional targets by microarray-coupled gene-trap mutagenesis. *Nat Genet.* 36: 304-312.
9. Croce J. C. and McClay, D. R. 2006. The canonical Wnt pathway in embryonic axis polarity. *Semin. Cell Dev. Biol.* 17: 168-174.
10. Davison A.J. and Zon L.I. 2004. The definitive (and primitive) guide to zebrafish hematopoiesis. *Oncogene.* 23: 7233-7246.
11. Detrich H.W. 3rd., Kieran M.W., Chan F.Y., Barone L. M., Yee K., Rundstadler J. A., Pratt S., Ransom D., Zon L. I. 1995. Intraembryonic hematopoietic cell migration during vertebrate development. *Proc Natl Acad Sci USA.* 92: 10713-10717.
12. Feijóo C.G., Sarrazin A.F., Allende M.L., Glavic A. 2008. Cystein-serine-rich nuclear protein 1, Axud1/Csrnp1, is essential for cephalic neural progenitor proliferation and survival in zebrafish. *Dev. Dyn.* 238(8): 2034-43.

13. Fu Y.F., Du T.T., Dong M., Zhu K.Y., Jing C.B., Zhang Y., Wang L., Fan H.B., Chen Y., Jin Y., Yue G.P., Chen S.J., Chen Z., Huang Q.H., Jing Q., Deng M, and Liu T.X. 2009. mir-144 selectively regulates embryonic α -hemoglobin synthesis during primitive erythropoiesis. *Blood*. 113: 1340–1349.
14. Gering M., Patient R. 2005. Hedgehog signaling is required for adult blood stem cell formation in zebrafish embryos. *Dev. Cell*. 8: 389-400.
15. Gingras, S., Pelletier, S., Boyd, K., Ihle J.N. 2007. Characterization of a family of novel cysteine-serine-rich nuclear proteins (CSRNP). *PLoS ONE*. 2:e808.
16. Giot L., Bader J.S., Brouwer C., Chaudhuri A., Kuang B., Li Y., Hao Y.L., Ooi C.E., Godwin B., Vitols E., Vijayadamar G., Pochart P., Machineni H., Welsh M., Kong Y, Zerhusen B., Malcolm R., Varrone Z., Collis A., Minto M., Burgess S., McDaniel L., Stimpson E., Spriggs F., Williams J., Neurath K., Ioime N., Agee M., Voss E., Furtak K., Renzulli R., Aanensen N., Carrola S., Bickelhaupt E., Lazovatsky Y., DaSilva A., Zhong J., Stanyon C.A., Finley R.L. Jr., White K.P., Braverman M., Jarvie T., Gold S., Leach M., Knight J., Shimkets R.A., McKenna M.P., Chant J., Rothberg J.M. 2004. A protein interaction map of *Drosophila melanogaster*. *Science*. 302(5651): 1727.
17. Glavic, A., Molnar, C., Cotoras, D., de Celis., J.F 2009. *Drosophila* Axud1 is involved in the control of proliferation and displays proapoptotic activity. *Mech. Dev Dyn*. 126 :184–197.
18. Hart D.O., Raha T., Lawson N.D., Green M.R. 2007. Initiation of zebrafish hematopoiesis by the TATA-box-binding protein-related factor Trf3. *Nature*. 450(7172) :1082-5.
19. Hecklen-Klein A., Evans T. 2004. T-box binding sites are required for activity of a cardiac GATA-4 enhancer. *Dev. Biol.*, 267: 490–504.
20. Herbomel P., Thisse B., Thisse C. 1999. Ontogeny and behavior of early macrophages in the zebrafish embryo. *Development* 126: 3735–3745.
21. Hogan B.M., Layton J.E., Pyati U.J., Nutt S.L., Hayman J.W., Varma S., Heath J.K., Kimelman D., Lieschke G.I. Specification of the primitive myeloid precursor pool requires signaling through Alk8 in zebrafish. *Curr. Biol*. 2006; 16:506-511.
22. Huang, H., He, X. 2008. Wnt/ β -catenin signaling: new (and old) players and new insights. *Curr. Opin. Cell Biol*. 20: 119-125.
23. Hutton, J.J., Jegga, A.G., Kong, S., Gupta, A., Ebert, C. 2004. Microarray and comparative genomics-based identification of genes and gene regulatory regions of the mouse immune system. *BMC Genomics*. 5: 82.
24. Ikeda, S., Kishida, S., Yamamoto, H., Murai, H., Koyama, S., and Kikuchi, A. 1998. Axin, a negative regulator of the Wnt signaling pathway, forms a complex with GSK-3 β and β -catenin and promotes GSK-3 β -dependent phosphorylation of β -catenin. *EMBO J*. 17: 1371-1384.
25. Ishiguro H., Tsunoda T., Tanaka T., Fujii Y., Nakamura Y., Furukawa Y. 2001. Identification of AXUD1, a novel human gene induced by AXIN1 and its reduced expression in human carcinomas of the lung, liver, colon and kidney. *Oncogene*. 20: 5062-5066.

26. Iuchi I., Yamamoto M. 1983. Erythropoiesis in the developing rainbow trout, *Salmo gairdneri* deus: histochemical and immunological detection of erythropoietic organs. *J. Exp. Zool.* 226: 409-417.
27. Kawahara A., Dawid I. 2001. Critical role of *bik1f* in erythroid cell differentiation in zebrafish. *Curr. Biol.* 11: 1353-1357.
28. 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.
29. Kishida, S., Yamamoto, H., Ikeda, S., Kishida, M., Sakamoto, I., Koyama, S., y Kikuchi, A. 1998. Axin, a negative regulator of the wnt signaling pathway, directly interacts with adenomatous polyposis coli and regulates the stabilization of β -catenin. *J. Biol. Chem.* 273: 10823–10826.
30. Korinek, V., Barker, N., Willert, K., Molenaar, M., Roose, J., Wagenaar, G., Markman, M., Lamers, W., Destree, O., Clevers. 1998. Two members of the Tcf family implicated in Wnt/ β -catenin signaling during embryogenesis in the mouse. *Mol. Cell Biol.* 18: 1248–1256.
31. Lawson N.D., Weinstein B.M. *In vivo* imaging of embryonic vascular development using transgenic zebrafish. *Dev. Biol.* 2002; 248:307-318.
32. Lecuyer, E. & Hoang, T. 2004. SCL: from the origin of hematopoiesis to stem cells and leukemia. *Exp. Hematol.* 32: 11–24.
33. Lengerke C., Schmitt S., Bowman T.V., Jang I.H., Maouche-Chretien L., McKinney-Freeman S., Davidson A.J., Hammerschmidt M., Rentzsch F., Green J.B., Zon L., Daley G. Q. 2008. BMP and Wnt specify hematopoietic fate by activation of the Cdx-Hox pathway. *Cell Stem Cell.* pp.72-82.
34. Liang D, Jia W, Li J, Li K, Zhao Q. 2012. Retinoic Acid Signaling Plays a Restrictive Role in Zebrafish Primitive Myelopoiesis. *PLoS ONE* 7(2): e30865.
35. Liao E.C., Paw B.H., Oates A.C., Pratt S.J., Postlethwait J.H., Zon L.I. 1998 SCL/Tal-1 transcription factor acts downstream of cloche to specify hematopoietic and vascular progenitors in zebrafish. *Genes Dev.* 12: 621–26.
36. Lieschke G.J., Oates A.C., Paw B.H., Thompsonc M. A., Halla N. E., Warda A. C., Hob R. K., Zon L. I., Layton J. E. 2002 Zebrafish SPI-1 (PU. 1) marks a site of myeloid development independent of primitive erythropoiesis: implications for axial patterning. *Dev. Biol.* 246:274-295.
37. Lieschke, G. J., Currie, P. D. 2007 Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nat. Rev. Genet.* 8: 353–367.
38. Logan, C. Y. and Nusse, R. 2004. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 20: 781-810.
39. Monteiro R., Pouget C., Patient R. 2011. The *gatal/pu.1* lineage fate paradigm varies between blood populations and is modulated by *tif1 γ* . *The EMBO Journal.* 30: 1093-1103.
40. Nakamura T., Furukawa Y., Nakagawa H., Tsunoda T., Ohigashi H., Murata K., Ishikawa O., Ohgaki K., Kashimura N., Miyamoto M., Hirano S., Kondo S., Katoh H., Nakamura Y., and Katagiri T. 2004. Genome-wide cDNA microarray analysis of gene expression profiles in pancreatic cancers using populations of tumor cells and normal ductal epithelial cells selected for purity by laser microdissection. *Oncogene.* 23: 2385–2400.

41. Nishidate, T., Katagiri, T., Lin, M.L., Mano, Y., Miki, Y., Kasumi, F., Yoshimoto, M., Tsunoda, T., Hirata, K., Nakamura, Y. 2004. Genome-wide gene-expression profiles of breast-cancer cells purified with laser microbeam microdissection: identification of genes associated with progression and metastasis. *Int. J. Oncol.* 25: 797–819.
42. North T. E., Goessling W., Peeters M., Li P., Ceol C., Lord A. M., Weber G. J., Harris J., Cutting C. C., Huang P., Dzierzak E., Zon, L. I. 2009. Hematopoietic Stem Cell Development Is Dependent on Blood Flow. *Cell.* 137:736-748.
43. Obama K., Ura K., Li M., Katagiri T., Tsunoda T., Nombra A., Satoh S., Nakamura Y., Furukawa Y. 2005. Genome-wide analysis of gene expression in human intrahepatic cholangiocarcinoma. *Hepatology.* 41: 1339–1348.
44. O'Brien 1961. Identification of Haemoglobin by its Catalase Reaction with Peroxide and *o*-Dianisidine. *Biotechnic & Histochemistry.* 36(2): 57-61.
45. Porcher C., Swat W., Rockwell K., Fujiwara Y., Alt F.W., Orkin S.H. 1997. The T cell leukemia oncoprotein SCL/TAL-1 is essential for development of all hematopoietic lineages. *Cell.* 86:47-57.
46. Renshaw S. A., Loynes C. A., Trushell D. M. I., Elworthy S., Ingham P. W. and Whyte M. K. B. 2006. A transgenic zebrafish model of neutrophilic inflammation. *Blood-J Hematol.* 108: 3976-3978.
47. Rhodes J., Hagen A., Hsu K., Deng M., Xi T., Look A. T., Kanki J. P. 2005. Interplay of *pu.1* and *gata1* determines myelo-erythroid progenitor cell fate in zebrafish. *Dev Cell.* 8:97-108.
48. Robu M.E., Larson J.D., Nasevicius A., Beiraghi S., Brenner C., Farber S.A., Ekker S.C. 2007. *p53* activation by knockdown technologies. *PLoS Genet.* 3: 788–801.
49. Sarrazin A.F., Villablanca E.J., Nuñez V.A., Sandoval P.C., Ghysen A., Allende M.L. 2006. Proneural gene requirement for hair cell differentiation in the zebrafish lateral line. *Dev. Biol.* 295:534-545.
50. Satoh, S., Daigo, Y., Furukawa, Y., Kato, T., Miwa, N., Nishiwaki, T., Kawasoe, T., Ishiguro, H., Fujita, M., Tokino, T., Sasaki, Y., Imaoka, S., Murata, M., Shimano, T., Yamaoka, Y. and Nakamura, Y. 2000. AXIN1 mutations in hepatocellular carcinomas, and growth suppression in cancer cells by virus-mediated transfer of AXIN1. *Nat. Genet.* 24: 245–250.
51. Schulte-Merker S., Ho R. K., Herrmann B. G. and Nüsslein-Volhard C. 1992. The protein product of the zebrafish homologue of the mouse T gene is expressed in nuclei of the germ ring and the notochord of the early embryo. *Development.* 116: 1021-1032.
52. Stachel S. E., Grunwald D.J., and Myers P. Z. 1993. Lithium perturbation and gooseoid expression identify a dorsal specification pathway in the pregastrula zebrafish *Development.* 117: 1261-1274.
53. Taneda T., Zhu W., Cao Q., Watanabe H., Yamaguchi Y., Handa H., Wada T. 2011. Erythropoiesis is regulated by the transcription elongation factor Foggy/Spt5 through *gata1* gene regulation. *Genes Cells.* 16(2): 231-42.
54. Thisse C., Thisse B. 2008. High-resolution *in situ* hybridization to whole-mount zebrafish embryos. *Nat. Protocols.* 3:59-69.

55. Thomas D.M., Francescutti-Verbeem D.M., Kuhn D.M. 2006. Gene expression profile of activated microglia under conditions associated with dopamine neuronal damage. *FASEB J.* 20: 515–517.
56. Valge-Archer V.E., Osada H., Warren A.J., Forster A., Li J., Baer R. and Rabbitts T.H. 1994. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 8617–8621.
57. Wadman I.A., Osada H., Grutz G.G., Agulnick A.D., Westphal H., Forster A. and Rabbitts T.H. 1997. *EMBO J.*, 16, 3145–3157.
58. Wei S., Hong J., and Kui J. 2005. Electrochemical determination of hydrogen peroxide using o-dianisidine as substrate and hemoglobin as catalyst. *J. Chem. Sci.*, 117, pp: 317–322.
59. Wei W., Wen L., Huang P., Zhang Z., Chen Y., Xiao A., Huang H., Zhu Z., Zhang B., and Lin S. 2008. Gfi1.1 regulates hematopoietic lineage differentiation during zebrafish embryogenesis. *Cell Res.* 18(6): 677-685.
60. Westerfield M. *The Zebrafish Book: A Guide for the Laboratory Use Of the Zebrafish (Danio rerio)*, 2.1 ed. Eugene University of Oregon Press. 1994.
61. Williams R.M., Webb W.W. 2000. Single granule pH cycling in antigen-induced mast cell secretion. *J. Cell. Sci.* 113: 3839-3850.
62. Yi X., Bekeredjian R., DeFilippis N.J., Siddiquee Z., Fernandez E. 2006. Transcriptional analysis of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Am J Physiol. Heart Circ Physiol.* 290: H1098–H1102.