

UCH-FC
Biotecnología
Nº 678
C-1

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE



CARACTERIZACIÓN DE *hif-2 α* DURANTE EL DESARROLLO DEL PEZ CEBRA

Memoria de Título

Entregada a la

Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al Título de

Ingeniero en Biotecnología Molecular



por

Diego Andrés Rojas Soto

Junio, 2008

Santiago - Chile

Director de Memoria de Título: Dr. Ariel E. Reyes
Patrocinante. Dr. Miguel L. Allende



**“CARACTERIZACIÓN DE *hif-2 α* DURANTE EL
DESARROLLO DEL PEZ CEBRA”**

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

DIEGO ANDRÉS ROJAS SOTO

Dr. Ariel E. Reyes
Director Seminario de Título

Ariel Rojas S.

Dr. Miguel L. Allende
Patrocinante

Miguel Allende



Comisión de Evaluación Seminario de Título

Dra. Verónica Palma
Presidente Comisión

Palma

Glavic

Dr. Álvaro Glavic
Corrector

Santiago de Chile, Junio de 2008



Diego Andrés Rojas Soto.

Nací el 17 de Junio de 1982 en la comuna de Santiago. A la edad de 5 años viajamos a San Bernardo, lugar actual de residencia. Los estudios siempre han sido de mi interés y es así como pasé sin muchos percances la enseñanza básica. Mis estudios posteriores los realicé en el Instituto Nacional, donde me gradué el año 1999 de cuarto medio.

Entré a estudiar Ingeniería en Biotecnología Molecular al año siguiente, en la facultad de ciencias de la Universidad de Chile. En este tiempo se terminó de forjar en mí el interés de continuar una carrera de científico, y en espero en un futuro no muy lejano liderar mi propio laboratorio y tener mis propias líneas de investigación.





"A toda mi familia, en especial a mi madre, a mi mujer y a mi padre que estará mirándome dondequiera que esté"



Agradecimientos:

Este trabajo no habría existido sin el apoyo de las personas que estimo, por eso agradezco a toda mi inmensa familia, que siempre estuvieron al tanto de mis logros y mi progreso, gracias por el infinito apoyo que he tenido a lo largo de toda mi vida y en especial durante mi formación académica. Agradezco también el apoyo grandioso de mi pareja, sin el cual creo que no podría haber aterrizado todo lo que siento, es y será mi cable a tierra, gracias por la paciencia y por tus consejos a la hora de proceder durante este trabajo. Por supuesto que también agradezco el apoyo y la formación que me dio mi tutor, sin el cual hoy no estaría donde estoy. Gracias por haberme formado como científico, y gracias además por haberme soportado tanto tiempo. Gracias por la educación que tuve estando en tu laboratorio y espero que siempre estemos en contacto.

1.1 INDICE DE CONTENIDOS



2.1 Introducción	1 - 11
Hipótesis	11
Objetivo General	11
Objetivos Específicos	11
2.2 Materiales y Métodos	12 -24
2.2.1 Material Biológico	12
2.2.2 Clonamiento <i>in silico</i> de <i>hif-2α</i>	12
2.2.3 Extracción de RNA total	13
2.2.4 Síntesis de cDNA y amplificación de <i>hif-2α</i>	14
2.2.5 Clonamiento de <i>hif-2α</i> y análisis de secuencias	15
2.2.6 RT-PCR de estadios y tejidos	17
2.2.7 Síntesis de ribosondas	17
2.2.8 Hibridación <i>in situ</i> de embrión completo	19
2.2.9 Inmunohistoquímica en embrión completo acoplada a hibridación <i>in situ</i> (inmuno-<i>in situ</i>) en embriones transgénicos	21
2.2.10 Cortes histológicos en embriones de pez cebra	22
2.2.11 Microinyección de oligonucleótidos antisentido (morpholinos) en embriones de pez cebra y estudios de falta de función	23

2.3 Resultados	25 – 43
2.3.1 Clonamiento de <i>hif-2α</i> y caracterización de la proteína deducida, a partir de alineamientos de secuencias con proteínas ortólogas	25
2.3.2 Análisis de la expresión de <i>hif-2α</i> por RT-PCR	30
2.3.3 Determinación del patrón de expresión de <i>hif-2α</i> por hibridación <i>in situ</i> de embrión completo	31
2.3.4 Estudios de falta de función por medio de microinyección de morpholino antisentido (MO <i>hif-2α</i>).....	35 - 43
2.3.4.1 Efecto de MO <i>hif-2α</i> en la tasa de sobrevivida	35
2.3.4.2 La inyección de MO <i>hif-2α</i> en embriones de pez cebra afecta la formación de la cola	37
2.3.4.3 La inyección de MO <i>hif-2α</i> en embriones de pez cebra afecta la formación de vasos sanguíneos de la cola en forma dosis dependiente	38
2.3.4.4 La inyección de MO <i>hif-2α</i> en embriones de pez cebra afecta la expresión de marcadores de vasos sanguíneos de la cola	40
2.4 Discusión	44 – 55
2.5 Conclusión	56
2.6 Bibliografía	57 - 62



1.2 INDICE DE TABLAS

<u>Tabla 1</u> Oligonucleótidos usados en el desarrollo de esta Tesis	15
<u>Tabla 2</u> Estructura exónica de <i>hif-2α</i>	26
<u>Tabla 3</u> Conservación de dominios de <i>Hif-2α</i>	28

1.3 INDICE DE FIGURAS

<u>Figura 1</u> Estructura genómica, aminoacídica y regulación por oxígeno de <i>Hif-2α</i>	27
<u>Figura 2</u> Alineamiento de secuencias de <i>Hif-2α</i>	29
<u>Figura 3</u> Árbol filogenético de ortólogos de <i>Hif-1α</i> y <i>Hif-2α</i>	30
<u>Figura 4</u> Expresión de <i>hif-2α</i> analizado por RT-PCR	31
<u>Figura 5</u> Patrón de expresión de <i>hif-2α</i> durante el desarrollo del pez cebra	33
<u>Figura 6</u> Inmuno <i>in situ</i> muestra colocalización de la tinción en vasos sanguíneos	34
<u>Figura 7</u> Efecto de la dosis sobre la tasa de sobrevivencia de embriones inyectados con MO <i>hif-2α</i> a las 24 hpf	36
<u>Figura 8</u> La falta de función de <i>Hif-2α</i> afecta la formación de la cola	37
<u>Figura 9</u> Defectos en la formación de la cola en embriones de 48 hpf microinyectados con 2 ng de morpholino	38
<u>Figura 10</u> Falta de función de <i>hif-2α</i> afecta el desarrollo de vasos sanguíneos de manera dosis dependiente	39

Figura 11 Inmunohistoquímica en embrión completo en embriones *tg(fli:egfp^{y1})* 40

Figura 12 La falta de función de *hif-2α* afecta la expresión de genes marcadores de vasos sanguíneos 41

Figura 13 La falta de función de *hif-2α* afecta la expresión de *vegf* 43



1.4 LISTA DE ABREVIATURAS

- bHLH:** Basic helix-loop-helix
- CV:** Vena caudal
- EGFP:** Enhanced green fluorescent protein
- EMSA:** Electrophoretic mobility shift assay
- Flk1:** Fetal liver kinase 1
- Flt4:** fms-related tyrosine kinase 4
- HIF:** Hypoxia induced factor
- Hpf:** Horas post fertilización
- Hpi:** Horas post inyección
- HRE:** Hypoxia-response element
- KO:** *Knockout*
- MOhif-2 α /control:** Morpholino hif-2 α /control
- ODDD:** Oxygen-dependent degradation domain
- PAS:** Per/Arnt/Sim
- pVHL:** Proteína Von Hippel Lindau
- RT-PCR:** Reverse Transcription PCR
- Se:** Vasos intersegmentales
- TAD-C:** Transactivation domain C-terminal
- TAD-N:** Transactivation domain N-terminal
- Vegf:** Vascular endotelial growth factor

1.5 RESUMEN

Los organismos eucariontes han seleccionado mecanismos para mantener la homeostasis de O₂, con el fin de aumentar su absorción y distribución. El gen maestro que regula la respuesta a cambios en la tensión de oxígeno es el factor inducible por hipoxia (*hypoxia-inducible factor*, HIF). HIF pertenece a la familia de factores de transcripción bHLH-PAS formando un dímero activo α/β . En condiciones de normoxia, la sub-unidad α de HIF es degradada constitutivamente, mientras que, la falta de O₂ la estabiliza, dimerizando con la subunidad β en el núcleo y activando genes específicos. Uno de los miembros de esta familia de factores de transcripción es *hif-2 α* , cuyo patrón de expresión, de acuerdo a las evidencias existentes, se focaliza en tejidos endoteliales, tanto en humano como en ratón. Por otra parte, a partir de estudios en ratones que no expresan *hif-2 α* (ratones KO) se deduce que este gen podría participar en algún proceso importante durante el desarrollo.

En esta Tesis se ha clonado el cDNA de *hif-2 α* de pez cebra, que codifica una proteína de 832 aminoácidos y que presenta conservación de los dominios característicos de las proteínas HIF, en comparación con proteínas ortólogas. Usando la técnica de RT-PCR se encontró que este gen se expresa en todos los estadios del desarrollo. El patrón de expresión de *hif-2 α* , determinado por hibridación *in situ* en embrión completo de pez cebra, mostró expresión en diferentes regiones del embrión, principalmente en la región de la cabeza, vasos sanguíneos longitudinales (aorta dorsal y vena posterior caudal) y transversales (vasos intersegmentales). Experimentos de falta de función utilizando microinyección de un morpholino antisentido (MO*hif-2 α*) en embriones transgénicos

tg(*fli:egfp^{yl}*), que expresan la proteína fluorescente verde en el sistema vascular, mostraron que la falta de función de *hif-2α* afecta la formación de vasos sanguíneos, observándose ausencia de vasos. Asimismo, se encontraron defectos en la formación de la cola en los embriones *knockdown* para *hif-2α*. Al estudiar la expresión de genes marcadores de vasos sanguíneos (*flk1*, *flt4* y *vegf*), se observó que la falta de función de *hif-2α* altera la expresión de todos los marcadores analizados, sugiriendo que *hif-2α* podría participar en el desarrollo de los vasos sanguíneos en el embrión. Estos resultados indican que *hif-2α* participaría en el desarrollo de los vasos sanguíneos del pez cebra, no obstante, se necesitan más estudios para dilucidar su función específica.

1.6 ABSTRACT

Eukaryotic organisms have selected homeostatic mechanism to enhance the absorption and distribution of O₂. The master gene that regulates the response to a low oxygen concentration is the *hypoxia-inducible factor* (HIF). HIF is a transcription factor that belongs to bHLH-PAS family and forms a α/β active heterodimer. In normoxia, the α subunit of HIF is degraded constitutively, but under hypoxia it dimerizes in the nucleus activating specific genes. One of the members of this transcription factors family is *hif-2 α* , that is expressed in endothelial tissue, in human and mouse. In addition, studies in *knockout* mice *hif-2 α ^{-/-}*, suggests that *hif-2 α* could participate through the embryonic development.

In this Thesis, we cloned the cDNA of *hif-2 α* from zebrafish embryos. This gene codifies a deduced protein of 832 aminoacids that shows conservation of the characteristic domains of HIF, compared with orthologues proteins. Studies from RT-PCR show that the mRNA of *hif-2 α* is present at all development stages analyzed. The *hif-2 α* expression pattern during developmental stages of zebrafish was performed by *in situ* hybridization and showed expression in different regions in the embryo, especially in head, longitudinal vessels (dorsal aorta and posterior caudal vein) and transversal vessels (intersegmental vessels). *Knockdown* experiments with specific *hif-2 α* morpholino (MO*hif-2 α*) show that the loss of function of this factor affects the development of the vascular system. We observed absence of intersegmental vessels in microinjected transgenic embryos tg(*fli:egfp^{y1}*), that express green fluorescent protein (GFP) in the vascular system. We also found defects in the tail formation. The

expression pattern of the vascular system markers *flk1*, *flt4* and *vegf* was also altered, suggesting that *hif-2 α* could participate in the vascular system development. These results suggest that the transcription factor *hif-2 α* could participate in the development of the vascular system in zebrafish embryos, however, we need more experiments for elucidate its specific function.

2.1 INTRODUCCIÓN

En su ambiente natural los organismos se encuentran sometidos a distintas condiciones de oxígeno, tanto durante el proceso de desarrollo como en la vida adulta; la disminución en la concentración de oxígeno se conoce como hipoxia y es una condición que puede ocurrir en el organismo completo o en algún tejido específico. Así, los organismos vivos tienen la capacidad de responder a diferentes condiciones de oxígeno, adaptándose a estos nuevos ambientes, adaptaciones que se llevan a cabo gatillando una respuesta a hipoxia y que se manifiesta en la expresión de los genes encargados de sobrellevar esta condición. El cambio en la expresión génica se traduce en la adaptación del organismo a nivel celular, estableciendo los mecanismos necesarios para la generación de energía en condiciones desfavorables. En el último tiempo ha existido un gran interés en estudiar los mecanismos que sobrellevan la respuesta a hipoxia, dado que, este proceso aparece necesario en la evolución de patologías como cáncer y enfermedades cardiovasculares (Semenza, 2003).

La respuesta a hipoxia ha sido bien descrita en diferentes organismos, en especial en el pez cebra donde mediante estudios en microarray se ha logrado describir qué genes están implicados en esta respuesta (Ton y cols., 2003). Los genes que aumentan su expresión corresponden a genes relacionados con glicólisis y con procesos de optimización de energía y transporte de oxígeno, mientras que los genes que disminuyen su expresión forman parte del grupo de genes relacionados con el ciclo de Krebs, y de la maquinaria metabólica encargada de sintetizar macromoléculas, es decir, la respuesta a hipoxia sigue un patrón de ahorro de energía confiriendo el grado de adaptación al organismo necesario para su supervivencia.

El factor encargado de iniciar y regular la respuesta a hipoxia y que actúa como “switch” metabólico es el factor de transcripción llamado **factor inducible por hipoxia** (HIF, *hypoxia-induced factor*), un heterodímero que consta de dos subunidades: α y β (Wang y Semenza, 1995), donde la estabilidad de la subunidad α es regulada por la concentración de oxígeno, mientras que la subunidad β es expresada constitutivamente. Estas subunidades dimerizan en el núcleo para ejercer su actividad transactivadora (Chilov y cols., 1999).

HIF pertenece a la familia de factores de transcripción bHLH-PAS (bHLH por *basic helix-loop-helix* y PAS por Per/ARNT/Sim), un grupo de factores de transcripción relevantes en procesos fisiológicos y en el desarrollo embrionario (Gu y cols., 2000; Kewley y cols., 2004). Estructuralmente se caracterizan por tener un dominio básico de unión a DNA de tipo *helix-loop-helix* y presentar un dominio de dimerización, siendo su forma funcional un heterodímero. Los sitios de unión al DNA reconocidos por el factor de transcripción se denominan HRE (*hypoxia responsive element*) y se ubican en la región promotora de los genes que van a ser regulados por HIF (Semenza y cols., 1996). La secuencia nucleotídica de estos elementos de respuesta es 5'-RCGTG-3', donde R puede ser adenina o guanina.

Actualmente se han descrito 3 proteínas HIF α : HIF-1, HIF-2 y HIF-3, siendo HIF-1 α la primera en caracterizarse; de ésta se han descrito 5 isoformas presentes en humano (Gothie y cols., 2000; Lee y cols., 2004), algunas de ellas se han descrito sin actividad transcripcional. De HIF-2 α , también conocida como EPAS1, HLF, HRF y MOP2 sólo se ha descrito una isoforma (Tian y cols., 1997; Ema y cols., 1997; Flamme

y cols., 1997; Hogenesh y cols., 1997). Finalmente para HIF-3 α se han descrito 6 isoformas en humanos, incluyendo un dominante negativo (Makino y cols., 2002).

Actualmente no existe mucha información de cómo actúan estas proteínas, sólo se sabe que la expresión del mRNA de HIF-3 α aumenta significativamente en hipoxia, a diferencia de los mRNAs de HIF-1 α y de HIF-2 α , cuya expresión no varía significativamente cuando se someten ratas a hipoxia por tiempos cortos (Heidbreder y cols., 2003). Adicionalmente, se ha descrito que HIF-2 α presenta regulación por hidroxilación al igual que HIF-1 α y que ambas proteínas presentarían diferentes mecanismos de regulación post-transcripcional bajo condiciones de hipoxia, planteándose que HIF-2 α sería el responsable de mantener la respuesta a hipoxia en el tiempo, en cambio que HIF-1 α sería el encargado de iniciar esta respuesta adaptativa (Uchida y cols., 2004). Se sabe también que HIF-1 α es activador transcripcional de muchos genes, incluso se ha descrito que el 1-2% de los genes humanos son blancos de HIF-1 (Mazure y cols., 2004), concitando más interés aquellos relacionados con procesos como cáncer y angiogénesis. Existe evidencia de que el gen *VEGF* (*vascular endothelial growth factor*) es inducido en condición de hipoxia por acción de HIF-1 o por HIF-2, lo que se explica por la importancia que tiene la angiogénesis en la distribución del oxígeno en los organismos, especialmente en condiciones hipóxicas. Además, en algunos tumores, las proteínas HIF-1 α y HIF-2 α se encuentran sobre-expresadas (Kress y cols., 1998), lo que es consecuente con el papel crítico que representa la distribución de oxígeno en el desarrollo tumoral.

Se ha descrito que HIF-2 α se expresa en muchos tejidos en humanos y se ha reportado tanto aumento como disminución de su expresión en cultivos celulares derivados de tumores (Tian y cols., 1997; Ema y cols., 1997; Flamme y cols., 1997; Hogenesh y cols., 1997; Talks y cols., 2000; Wiesener y cols., 2003). Estudios en desarrollo de ratas han mostrado que la expresión de HIF-2 α se restringe a las células endoteliales en embriones de estadio E11 y E13 (Tian y cols., 1997).

La proteína HIF-2 α también presenta los dominos descritos para su homólogo HIF-1 α : dos dominios PAS, un dominio de unión a DNA bHLH, un dominio inhibitorio llamado ODDD (en el que se encuentran dos residuos de Prolina que son hidroxilados y un residuo de Lisina que es acetilado, en presencia de oxígeno) y dos dominios transactivadores TAD-N y TAD-C (Pugh y cols., 1997), en este último un residuo de Asparragina es susceptible a ser hidroxilado para inhibir la acción transactivadora en presencia de oxígeno (Lando y cols., 2002).

Los principales factores que participan en la regulación de la actividad de HIF por oxígeno son las enzimas prolil-hidroxilasas (PHD), que hidroxilan los dos residuos Prolina del dominio ODDD (Masson y cols., 2001). Estas enzimas son dioxigenasas, es decir, unen oxígeno molecular, que en presencia de hierro (Fe^{+2}) entrega un oxígeno al residuo prolil y otro a una molécula de 2-oxoglutarato para producir succinato (Semenza, 2004). La hidroxilación de estos residuos favorece la unión de la proteína de Von Hippel-Lindau (pVHL), que es parte del complejo E3 ubiquitin ligasa, que lleva a la proteína HIF a degradación proteosómica (Huang y cols, 1998, Ohh y cols, 2000). La acetilación de un residuo de lisina en el dominio ODDD por parte de ARD1 (*N*-

Acetyltransferase) favorece la unión a pVHL (Jeong y cols, 2002). En condición de hipoxia, las enzimas que participan en la degradación de HIF unen menor cantidad de oxígeno molecular, por lo tanto la estabilización de HIF es mayor, aumentando así su concentración intracelular (Semenza y col 2004). Esta vía de estabilización por la baja concentración de oxígeno es conocida actualmente como vía canónica (Gustafsson y cols., 2006). Además de la vía canónica, se ha descrito una segunda vía de estabilización independiente de hipoxia y se establece en condiciones de normoxia, generándose una competencia entre los factores que favorecen la degradación de esta proteína, con otros que favorecen su estabilización. En esta vía no-hipóxica participan factores tales como factores de crecimiento, citoquinas y hormonas vasculares (Richard y cols., 2000, Poysegur y cols., 2006). Estas evidencias dan cuenta que bastaría un aumento en el nivel de traducción de HIF para que el balance degradación/estabilización sea favorable hacia la estabilización de la subunidad y la actividad del factor de transcripción. El mecanismo propuesto para la activación de HIF de manera no-hipóxica incluye la vía IP3K y MAPK, la primera estabilizaría la unión del mRNA de HIF con el ribosoma, por medio de efectores tales como mTOR y la segunda por medio de fosforilaciones que estabilizan alguno de estos efectores (Fukuda y cols., 2002). La actividad transcripcional de HIF-1 α y de HIF-2 α también es regulada por el dominio TAD-C que en condiciones de hipoxia une al coactivador CBP/p300, en cambio en condiciones de normoxia el residuo Asparagina 851 de HIF-2 α es hidroxilado por la enzima dioxigenasa FIH-1 (*factor inhibiting HIF-1*). Esta hidroxilación impide que el coactivador CBP/p300 se una al dominio TAD-C (Lando y cols., 2002). También se ha descrito que HIF-1 α es

fosforilado en condiciones de normoxia por MAPK, aumentando su actividad transcripcional y además, por esta misma vía, el coactivador CBP/p300 también es fosforilado, traduciéndose en un aumento significativo de la actividad transcripcional de HIF en presencia de oxígeno. Por otra parte se sabe que la actividad transcripcional de HIF-2 α se ve aumentada por la unión de la proteína REF-1 (una proteína con propiedades reductoras), que no tiene el mismo efecto sobre HIF-1 α , afectando de forma diferencial la unión de estas proteínas al DNA (Lando y cols., 2000).

Hasta ahora se ha enunciado que las proteínas HIF son las encargadas de regular la respuesta a hipoxia, describiéndose su mecanismo de regulación en base a la presencia o ausencia de oxígeno, pero además se ha mostrado una vía de estabilización de HIF en presencia de oxígeno. Esta última visión muestra dos posibilidades de función, una función adaptativa de respuesta al estrés por hipoxia y otra función diferente en presencia de oxígeno, vislumbrando una función más general de HIF en condiciones normales de oxígeno. Uno de estos procesos donde se ha descrito la participación de estos factores de transcripción es el desarrollo embrionario. Estudios en ratones *knockout* (K.O.), han mostrado el rol crítico de las proteínas HIF durante el desarrollo, encontrándose fallas tanto en el desarrollo del sistema nervioso, como del cardiovascular, observándose en la mayoría de los casos letalidad. Se han descrito cuatro K.O. independientes para HIF-2 α en donde se ha eliminado el exón 2, que codifica para el dominio de unión a DNA, encontrándose fenotipos letales en tres de ellos (Tian y cols., 1998; Peng y cols., 2000; Comperolle y cols., 2002; Scortegagna y cols., 2003a/b). El análisis de estos K.O. muestra fenotipos diferente para cada uno de ellos,

encontrándose fallas en el sistema respiratorio e inmadurez de los pulmones, debido a problemas en la producción de surfactante y por tanto se observó colapso alveolar (Compernelle y cols., 2002). También se han descrito deficiencias en la vascularización y remodelamiento de los vasos sanguíneos, observándose letalidad debido a hemorragias en estadios E8-E10 (Peng y cols., 2000). Así mismo se han descrito, en ratones $\text{hif-2}^{-/-}$, fallas en el desarrollo cardíaco y una alteración en la homeostasis de catecolaminas (Tian y cols., 1998). Finalmente, Scortegagna y colaboradores (2003a y b), muestran un fenotipo no letal con múltiples anomalías metabólicas, tales como hipoglicemia, acidosis láctica, desregulación de la oxidación de ácidos grasos y del ciclo de Krebs, diferentes defectos en órganos como retina (retinopatía), problemas hepáticos (esteatosis), hipertrofia cardíaca y anomalías en mitocondrias. Además, se han descrito deficiencias en la homeostasis de especies reactivas del oxígeno (ROS) y se muestra que HIF-2 α es necesario para la normal hematopoyesis en rata (Scortegagna y cols., 2003a y b).

Algunas de estas evidencias sugieren que para algunos procesos donde inicialmente se describió la participación solo de HIF-1 α , estaría participando también HIF-2 α , siendo un ejemplo de esta situación el desarrollo del sistema vascular por inducción de VEGF. Se sabe que el promotor de VEGF tiene sitios HRE y se ha demostrado que es inducible por HIF-1 α por medio de estudios de EMSA (Forsythe y cols., 1996), no obstante, también se ha mostrado que tanto HIF-1 α como HIF-2 α pueden unirse a sitios HRE, por tanto es posible que en la inducción de VEGF participe HIF-2 α (Ema y col, 1997). Cabe destacar que la formación de surfactante en los

alvéolos pulmonares, es un proceso mediado por VEGF, siendo afectado en uno de los fenotipos descritos en ratones K.O. (Compernelle y cols., 2002). Otra evidencia que relaciona hipoxia con el desarrollo embrionario es el efecto de la disminución de oxígeno en el retraso del desarrollo, siendo objeto de estudio la vía IGF (*insulin-like growth factor*) relacionada con el crecimiento fetal. En estudios realizados en el pez cebra se observa un retardo en el desarrollo influenciado por hipoxia, en donde aumenta la expresión de IGFBP-1 (*IGF binding protein-1*), cuya función es secuestrar IGF inhibiendo su vía de señalización (Kajimura y cols., 2005). Adicionalmente, en un estudio reciente, se encontró que la expresión de IGFBP-1 podría estar siendo modulada por HIF, dada la presencia de sitios HRE en su promotor (Kajimura y cols., 2006).

Debido a que HIF-2 α se expresa en tejidos endoteliales, es posible que sea necesario para la expresión de VEGF, factor primordial en el desarrollo de los vasos sanguíneos, u otros factores que participen en el desarrollo de vasos sanguíneos, pero actualmente no hay estudios que lo indiquen. Uno de los fenotipos descritos en ratones K.O. son defectos en vasos sanguíneos (Peng y cols., 2000) lo que indicaría que HIF-2 α podría participar en mecanismos tempranos o tardíos en el desarrollo de éstos.

A este respecto se han descrito dos mecanismos por los que se desarrollan los vasos sanguíneos: vasculogénesis y angiogénesis (Risau y cols., 1997); el primero forma vasos sanguíneos a partir de células embrionarias y el segundo los forma a partir de vasos preexistentes. Estos procesos están regulados por VEGF, que posee receptores caracterizados en pez cebra (*Flk1* y *Flt4*), por lo que dadas las evidencias anteriormente

descritas, HIF-2 α podría participar en alguno de estos dos procesos formadores de vasos sanguíneos.

Finalmente, cabe destacar, que el modelo pez cebra ha sido ampliamente utilizado para múltiples estudios, en especial en biología del desarrollo debido a sus ventajas; en primer lugar es un organismo con un ciclo de vida relativamente corto, donde llega a su estado de madurez sexual a los 3 meses de vida, donde es posible trabajar con tasas de aproximadamente 100 a 200 huevos por hembra, lo que sin lugar a dudas es ventajoso con respecto a otros modelos, como murinos. Los embriones de pez cebra son transparentes, esto permite estudiar directamente toda la morfología de su desarrollo hasta varios días después de la fertilización, siendo por esta razón buen modelo para el estudio del sistema circulatorio. El desarrollo del sistema vascular en pez cebra es de fácil observación a través de microscopía simple, debido a la transparencia de sus embriones, además, debido a esta característica se ha construido un atlas del sistema vascular del pez cebra por medio de microangiografía (Isogai y cols., 2000). La mayoría de los genes implicados en desarrollo de vasos sanguíneos han sido clonados en pez cebra, encontrándose que su expresión coincide con los genes de otras especies, como ratón y pollo. El modelo pez cebra además es ventajoso al analizar el fenotipo de mutantes, debido a la gran rapidez con que se pueden rastrear éstos, siendo posible comparar defectos en el sistema vascular con la condición silvestre. Por otra parte, el estudio de mutantes se ha hecho mucho más fácil en pez cebra, debido a la secuenciación completa de su genoma, ya que el rastreo genético es más sencillo de realizarse.

En esta Tesis se espera clonar *hif-2 α* y caracterizar su expresión durante el desarrollo del pez cebra y mediante estudios funcionales, determinar su participación en el desarrollo de los vasos sanguíneos.

Hipótesis

Con los antecedentes antes expuestos, nuestra hipótesis de trabajo es:

“*hif-2 α* participa en el desarrollo de los vasos sanguíneos en el pez cebra, modulando la expresión de genes que participan en angiogénesis, como *flk1* y *flt4*”.

Objetivo general:

Estudiar la función de *hif-2 α* sobre la formación de vasos sanguíneos durante el desarrollo del pez cebra.

Objetivos específicos:

- Clonamiento de *hif-2 α* de pez cebra y determinación de su estructura genómica.
- Determinación del patrón de expresión *hif-2 α* durante el desarrollo de pez cebra por RT-PCR e hibridación *in situ* en embrión completo.
- Estudiar la falta de función de *hif-2 α* utilizando microinyección de oligonucleótidos antisentido (morpholinos) y genes marcadores de vasos sanguíneos, tales como *vegf*, *flk1* y *flt4*.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 Material biológico.

En esta Tesis se trabajó con embriones y larvas de pez cebra (*Danio rerio*) obtenidos por cruza naturales de peces adultos. Se utilizaron líneas silvestres de pez cebra (AB) y transgénica *tg(fli1:egfp^{yl})* (Lawson y Weinstein 2002). Los peces fueron mantenidos en un vivero con condiciones de temperatura controlada (28 °C) y con un fotoperíodo de 14 horas luz y 10 horas de oscuridad. Los peces fueron mantenidos de acuerdo a lo descrito por Westerfield (1995). Para realizar los cruzamientos, se separan los machos de las hembras sexualmente maduras el día anterior y se juntan en la mañana del día siguiente en cajas especiales para colectar los huevos. Los huevos obtenidos son mantenidos en una estufa a 28 °C en placas Petri con medio E3 (E3 1X: 5 mM NaCl, 0.17 mM KCl, 0.13 mM CaCl₂, 0.33 mM MgSO₄, 5-10% Azul de Metileno).

2.2.2 Clonamiento *in silico* de *hif-2α*

Por homología de secuencias con otras especies se encontraron ESTs homólogos a *hif-2α* de pez cebra, de los clones candidatos se seleccionó uno de ellos que parecía contener el cDNA completo de *hif-2α* de pez cebra (#BM860907), este clon se compró en una empresa del rubro (Open Biosystems, USA). Al secuenciar el clon, éste no contenía la secuencia codificante completa. Para obtener la secuencia completa se utilizó la secuencia nucleotídica del clon para alinearla con base de datos, GeneBank y usando el programa BLAST (*blastn*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) se encontraron dos clones de interés *hif-2α*, uno de pez carpa (grass carp, número de acceso al GeneBank:

AY577524) que contenía el mRNA completo de *hif-2 α* , que presentó una identidad sobre el 80%. Usando esta última secuencia, se encontró un clon genómico de pez cebra que contenía el gen completo de *hif-2 α* (número de acceso al Gene Bank: BX248102). Se alinearon estas 3 secuencias y se logró completar el mRNA de *hif-2 α* , utilizando el programa MegAlign (DNASTAR Inc. 5.0, Zachar Danish Society) y el algoritmo CLUSTAL W.

2.2.3 Extracción de RNA total

Se extrajo RNA total a partir de larvas de pez cebra de 48 horas post-fertilización (hpf), 200 μ l de Trizol (Gibco BRL, UK) por cada 50 embriones. Se homogeneizaron los embriones con 30 golpes y se mezcló en vórtex por un minuto, posteriormente se agregó una mezcla 1/5 del volumen de cloroformo-álcohol isoamílico (24:1) y se mezcló nuevamente por vórtex por 15 segundos. Posteriormente la mezcla se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos. A continuación la mezcla se centrifugó por 15 minutos a 12.000g a temperatura ambiente y se transfirió la fase acuosa obtenida a un tubo nuevo. Se agregaron 500 μ l de isopropanol (Merck, Alemania) y se dejó incubando por 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación se centrifugó a 14000g por 2 minutos a 4 °C. El pellet obtenido se lavó con 500 μ l de etanol 70% y se centrifugó nuevamente por 2 minutos a 14.000g a 4 °C. El pellet se secó a temperatura ambiente por 15 minutos y se resuspendió en 50 μ l de agua libre de nucleasas (Winkler Ltda., Chile). Finalmente se determinó la razón de absorbancias 260/280 en un

espectrofotómetro (UV-VIS TU1800, P-General, China) para determinar la cantidad y pureza del RNA. La integridad del RNA se determinó en un gel de agarosa.

2.2.4 Síntesis de cDNA y amplificación de *hif-2α*

Para la preparación de cDNA se agregaron a un tubo 2 µg de RNA total purificado y se mezcló con 1 µl de partidores *Oligo(dT)₁₈* (Fermentas, Canadá) y se completó con agua libre de nucleasas a volumen final de 12 µl. La mezcla se denaturó a 70 °C por 5 minutos y luego se puso el tubo en hielo rápidamente. Enseguida se agregaron a la mezcla 4 µl de buffer de reacción 5X, 1 µl de inhibidor de ribonucleasa 20U/µl y 2 µl de 10 mM dNTPs mix (10 mM de dATP, dCTP, dTTP y dGTP). La mezcla se incubó por 5 minutos a 37 °C y se agregó 1 µl de transcriptasa reversa (Revertaid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit, Fermentas, Canadá). La solución con un volumen final de 20 µl se incubó por una hora a 42 °C y luego se detuvo la reacción calentando la mezcla a 70 °C por 10 minutos. La mezcla de reacción se mantuvo a 4 °C.

El cDNA completo de *hif-2α* fue amplificado por PCR. Luego se tomó una alícuota de 0,5 µl del cDNA obtenido y se mezcló con 1,6 µl de MgCl₂ 50mM (concentración final 4 mM), 2 µl de buffer de PCR 10X (concentración final 1X), 0,4 µl dNTPs 10 mM (concentración final 0,2 mM), 0,1 µl de Taq polimerasa 5 U/µl (concentración final de 0,025 U/µl, Invitrogen, USA), 0,5 µl de cada partidor, F₁ y R₁ (concentración final de 0,25 µM, ver Tabla 1) y se completó con agua libre de nucleasas

hasta 20µl. El programa de PCR utilizado fue: 5 minutos a 94 °C (denaturación inicial), 30 ciclos de: 30 seg a 94 °C, 30 seg a 60 °C, 3 min a 72 °C; extensión final de 20 min a 72 °C. Luego la mezcla de amplificación fue mantenida a 4 °C.

TABLA 1. Oligonucleótidos usados en el desarrollo de esta Tesis.

Nombre	Secuencia	Uso
F ₁	5'GGGAATTACGCGAGAACGG 3'	Clonamiento <i>hif-2α</i>
R ₁	5' CGGTCTAAGTCGCCTGGTC 3'	Clonamiento y sonda <i>hif-2</i>
F ₂	5' CTTCCAACCCTTGAGTTCAC 3'	Sonda <i>hif-2α</i>
<i>βactF</i>	5' TTCTGGTCGGTACTACTGGTATTGTG 3'	Forward <i>β</i> -actina
<i>βactR</i>	5' ATCTTCATCAGGTAGTCTGTCAGGT 3'	Reverse <i>β</i> -actina

2.2.5 Clonamiento de *hif-2α* y análisis de secuencias.

El cDNA de *hif-2α* fue clonado en el vector pGEMT-Easy (Promega, USA). Se tomaron 3 µl de producto de PCR, usando los partidores F₁ y R₁ y se mezclaron con 5 µl de buffer de ligación 2X, 1 µl de plasmidio pGEMT-Easy y 1 µl de ligasa T4. La mezcla se incubó toda la noche a 4 °C. Se tomó 1 µl de esta ligación para transformar bacterias DH5α por electroporación a 1800V (Electroporator 2510, Eppendorf, Alemania). Las bacterias electroporadas fueron resuspendidas en 1 ml de medio LB (Invitrogen, USA) sin antibióticos. El cultivo se dejó creciendo a 37 °C por una hora con agitación. Luego se centrifugó a 5000 rpm por 5 minutos y se descartaron 850 µl de sobrenadante; las bacterias restantes se resuspendieron y se sembraron en placas LB-Ampicilina-X-Gal. Las placas sembradas fueron incubadas a 37 °C hasta el día siguiente y se rastrearon colonias blancas, que contenían el fragmento de PCR clonado. Estas colonias fueron picadas con una punta de micropipeta estéril, que luego fue incubada en un tubo de 15 ml conteniendo LB-Ampicilina (1X, stock 1000X, 100 mg/ml) y se crecieron a 37 °C

por toda la noche con agitación. Las colonias que crecieron en presencia de Ampicilina fueron utilizadas para extracción del plasmidio (Miniprep, Sambrook y Russell, Molecular Cloning, 2001). Los clones positivos que contenían *hif-2 α* completo, fueron evaluados por PCR, para esto se tomó una alícuota de 0.5 μ l de DNA plasmidial de cada clon y se utilizó el programa anteriormente señalado y los partidores F₁ y R₁. Finalmente la secuencia nucleotídica de *hif-2 α* fue secuenciada y reportada al GeneBank (Número de acceso DQ375242).

La secuencia aminoacídica de *hif-2 α* deducida se analizó por alineamientos múltiples de secuencias usando el programa MegAlign y el algoritmo CLUSTAL W. A partir de estos alineamientos se construyó un árbol filogenético. Las secuencias utilizadas en estos análisis con sus respectivos números de acceso al GeneBank fueron las siguientes: gcHIF-1 α (AAR95697), hHIF-1 α (AAP88778), mHIF-1 α (Q61221), rHIF-1 α (CAA70701), sHIF-1 α (AAU14021), dHIF-1 α (AAR19225), cHIF-1 α (JC7619), gcHIF-2 α (AAT76668), hHIF-2 α (NP_001421), mHIF-2 α (P97481), rHIF-2 α (Q9JHS1), cHIF-2 α (NP_990138), xtHIF-2 α (AAH74648) y qHIF-2 α (AAF21052). Las abreviaciones correspondientes están basadas en el nombre común de la especie en inglés: gc-grass carp, carpa (*Ctenopharyngodon idella*), h-humano (*Homo sapiens*), m-mouse, ratón (*Mus musculus*), r-rata (*Rattus norvegicus*), s-squirrel, ardilla (*Spermophilus tridecemlineatus*), d-dog, perro (*Canis familiaris*), c-chicken, pollo (*Gallus gallus*), xt-silurana tropicalis (*Xenopus tropicalis*), q-common quail, codorniz (*Coturnix coturnix*), z-zebrafish, pez cebra (*Danio rerio*).

2.2.6 RT-PCR de estadios y tejidos

A partir de embriones de 0, 10, 18, 24, 48 y 72 hpf y tejido adulto (músculo, agallas, corazón, testículos, hígado, intestino y cerebro), se extrajo RNA total por extracción con Trizol, como se describió anteriormente. Utilizando Revertaid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Canadá), se sintetizó cDNA de cada uno de estos estadios y tejidos. Se tomó 0,5 µl de cada cDNA y utilizando los partidores F₂ y R₁ (Tabla 1) se realizó un PCR, con las mismas condiciones que para la amplificación del ORF de *hif-2α*. Sólo se modificó el tiempo de extensión, que fue 1 minuto. Como control interno se amplificó β-Actina.

2.2.7 Síntesis de ribosondas.

Se utilizaron los partidores F₂ y R₁ (Tabla 1) para amplificar un fragmento de 814 pares de bases (pb); este amplicón fue usado como molde para la síntesis de la sonda específica de *hif-2α*. El programa de PCR utilizado para amplificar este fragmento fue similar al descrito previamente con tiempo de extensión de 1 minuto. Este fragmento fue clonado en pGEMT-Easy.

Para la obtención de plasmidio linearizado se tomaron 10 µg de DNA plasmidial conteniendo el fragmento de 814 pb y se digirió con 10 unidades de la enzima de restricción Sall (Fermentas, Canadá) y con ApaI (Fermentas, Canadá) en un volumen final de 50 µl por 3 horas a 37 °C. El DNA digerido fue purificado por extracción fenólica (Sambrook y Russell, Molecular Cloning, 2001), y se resuspendió en 20 µl de

agua libre de nucleasas. La concentración de los productos digeridos se determinó por gel de agarosa al 1%.

Posteriormente se tomó 1 µg de DNA digerido (con Sall para la sonda antisense y con ApaI para la sonda sense) y se mezcló con 5 µl de Buffer de transcripción 5X (Fermentas, Canadá), 5 µl de Dig Mix (2.5 mM NTP: CTP, GTP, ATP, UTP, digoxigenina-UTP 10 mM, Roche, USA), 0,5 µl de RNAsa inhibidor (Promega, USA), 2,5 µl de RNA polimerasa T7 o SP6 (Fermentas, Canadá) según correspondiera. El DNA digerido con Sall fue transcrito con RNA polimerasa T7 y el DNA digerido con ApaI fue transcrito con RNA polimerasa SP6. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 25 µl, completando la diferencia con agua libre de nucleasas. La mezcla se incubó por 2 horas a 37 °C. Luego se añadió a la mezcla 2,5 µl de DNAsa RQ1 (Promega, USA) y se incubó por media hora a 37 °C. La actividad de la DNAsa se detuvo agregando 5 µl de EDTA 0,5 M pH 8,0 (Stop Solution, Promega). Las ribosondas se precipitaron agregando 2 µl de LiCl 10 M (Winkler Ltda., Chile) y 200 µl de Etanol 100% (Merck, Alemania) y se dejaron precipitando a -20 °C por toda la noche. Posteriormente, el RNA sintetizado fue recuperado por centrifugación a 14.000g por 30 minutos, se descartó el sobrenadante, el pellet se lavó con 100 µl de etanol 70%, libre de nucleasas. Se centrifugó nuevamente a velocidad máxima por media hora, se descartó el sobrenadante y el pellet fue secado a temperatura ambiente por 15 minutos. Las ribosondas fueron resuspendidas en 11 µl de agua libre de nucleasas y su concentración fue estimada en gel de agarosa. Los 10 µl restantes se diluyen en buffer de hibridación (Formamida 50%, SSC 5X, Heparina 50 µg/ml, RNA Tórula 500 µg/ml, Tween-20

0.1%) hasta una concentración final de 10 µg/ml (stock 10X). El stock se guardó a -20 °C.

2.2.8 Hibridación *in situ* de embrión completo.

Embriones de estadios de 0, 10, 18, 24, 28, 32, 48, 60, 72 y 120 hpf se fijaron en paraformaldehído 4% (2 g de paraformaldehído (J.T. Baker, USA) en 50 ml de PBS 1X) por una noche a 4 °C. Después de fijados, los embriones se pusieron en placas Petri con PBS 1X estéril para extraer manualmente el corion usando pinzas de disección (Dumont, Suiza). Los embriones sin corion fueron deshidratados en metanol 100% (Merck, Alemania) por 10 minutos, luego de ese tiempo el medio fue cambiado por metanol frío y los embriones se mantuvieron a -20 °C por toda la noche. Luego los embriones fueron rehidratados, cambiando el medio metanol 100% sucesivamente por 75% Metanol / 25% PBS 1X, 50% Metanol / 50% PBS 1X y 25% Metanol / PBS 1X Tween-20 0.1% (PBS-T) y finalmente se hicieron 4 cambios con PBS-T cada incubación fue por 5 minutos. Posteriormente los embriones fueron incubados en tampón de hibridación por 10 minutos a 65 °C, luego de este tiempo se cambió el medio por buffer de hibridación fresco, y se pre-hibridaron a 65 °C por más de 5 horas. Para embriones de más de 24 hpf previo a la pre-hibridación fueron incubados con una solución de blanqueo (1 ml de solución de blanqueo contiene 595 µl de agua libre de nucleasas, 25 µl de 20X SSC (Winkler Ltda., Chile), 50 µl de Formamida (Merck, Alemania) y 330 µl de H₂O₂ 30% (Merck, Alemania)). Los embriones fueron incubados en solución de blanqueo y expuestos a la luz por 15 minutos. Luego se lavaron 3 veces con 1 ml de PBS-T.

Posterior a esto, los embriones de 24, 28 y 32 hpf fueron pre-hibridados. Para los embriones de más de 48 hpf fueron incubados con una solución de Proteinasa K (Fermentas, Canadá) para eliminar las proteínas asociadas al RNA y además para facilitar la entrada de la sonda al embrión. Todos los embriones fueron digeridos con 200 µl de Proteinasa K 10 µg/ml diluida en PBS-T por 5 minutos (embriones de 48 y 60 hpf), 8 minutos (embriones de 72 hpf) y 15 minutos (embriones de 120 hpf). Inmediatamente terminado el tiempo de digestión, la reacción se detuvo con paraformaldehído 4% en PBS 1X por 20 minutos. Terminado el tiempo de re-fijación, se realizaron 5 lavados de 5 minutos cada uno con PBS-T y luego los embriones fueron incubados en tampón de hibridación. Posterior a la prehibridación, se hibridó con las sondas correspondientes diluidas en tampón de hibridación (1µg/ml). Las sondas se hibridaron a 65 °C toda la noche. Los embriones de 120 hpf fueron prehibridados 2 días e hibridados 2 días. Una vez finalizado el tiempo de hibridación, las ribosondas fueron recuperadas y guardadas a -20 °C. Los embriones hibridados fueron lavados con soluciones sucesivas de formamida/SSC (1 ml) precalentadas a 65 °C, para eliminar el exceso de sonda y eliminar uniones inespecíficas. Primero se lavó con formamida 75% / SSC 2X, luego con formamida 50% / SSC 2X, formamida 25% / SSC 2X, cada lavado se realizó por 10 min. Luego se hicieron dos lavados con SSC 0,2X por media hora. Posteriormente se procedió a hacer la detección de la sonda, para esto se agregó 1 ml de MAB-T (100 mM ácido maleico, 150 mM NaCl y 0,1% Tween-20 pH 7.5) y se dejó reposar a temperatura ambiente por 5 minutos. En esta etapa se realizó el bloqueo de proteínas, para ello se cambió la solución de MAB-T por 500 µl de solución de bloqueo

(MAB-BMBR (Roche, Suiza)-LS, GibcoBRL, USA) y se dejó por una hora a temperatura ambiente. Luego se cambió por 500 µl de solución fresca y se dejó bloqueando por más de 3 horas a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se agregó el anticuerpo anti-digoxigenina (Roche, Suiza) diluido 1: 2000 en solución de bloqueo y se incubando toda la noche a 4 °C. Al día siguiente el exceso de anticuerpo fue lavado 5 veces por 20 min con MAB-T usando un balancín para optimizar el lavado. Después de los lavados, se incubó 3 veces por 5 minutos con buffer AP (buffer fosfatasa alcalina, 100 mM Tris, 50 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 0.2% Tween-20, 0,2% Triton X-100, pH 9,5) y luego se agregó la solución de revelado (4,5 µl NBT; 3,5 µl BCIP en 1 ml de buffer AP; Fermentas, Canadá) y se incubó en oscuridad a temperatura ambiente. El tiempo de revelado fue variable y se reveló hasta que se observó marca específica, sin que aparezca tinción oscura en el vitelo. Una vez terminado el tiempo de revelado, se lavó 3 veces con PBS-T y la reacción se detuvo con paraformaldehído 4% y los embriones se guardaron a 4 °C.

2.2.9 Inmunohistoquímica en embrión completo acoplada a hibridación *in situ* (inmuno-*in situ*) en embriones transgénicos.

Embriones tg(*fli:egfp*^{y1}) (Lawson y Weinstein 2002) de 72 hpf teñidos por hibridación *in situ*, usando la ribosonda *hif-2α* y fijados en paraformaldehído 4% toda la noche a 4 °C, fueron lavados dos veces por 5 minutos en PBS 1X y una vez por 5 minutos con agua destilada. Luego se cambió el agua destilada por acetona (Merck, Alemania), que es mantenida a -20 °C. Se dejó por 7 minutos a -20 °C y se lavó una vez

con agua destilada por 5 minutos y una vez con PBS 1X por 5 minutos. Luego se dejó bloqueando por media hora a temperatura ambiente con solución de bloqueo, la misma solución que se utilizó en hibridación *in situ*. Una vez terminado el tiempo de bloqueo, se adicionó el anticuerpo primario diluido en solución de bloqueo 1:200 (anticuerpo policlonal de conejo α -GFP, SC-8334, Santa Cruz Biotechnology, USA) y se dejó incubando toda la noche a 4 °C. Al día siguiente el anticuerpo fue lavado 4 veces por 20 minutos con MAB-T con agitación y luego se bloquea por media hora. Después se agregó el anticuerpo secundario (anticuerpo de cabra anti-rabbit acoplado a peroxidasa, Bios Chile) diluido en solución de bloqueo 1:250, se incubó por 4 horas a temperatura ambiente. El anticuerpo secundario fue lavado de la misma forma que el primario (4 veces por 30 minutos con MAB-T). Después se revela agregando una solución que contiene DAB 0.03% (Diaminobencidina, Sigma-Aldrich, USA) por 10 minutos y se cambió por 200 μ l de solución de DAB 0.03% que contenía 1 μ l de H₂O₂ 3%. Se incubó a temperatura ambiente hasta observar aparición de color marrón. En los lugares en donde se sobrepone la marca de la hibridación *in situ* con la marca de la inmunohistoquímica se observa marrón oscuro.

2.2.10 Cortes histológicos en embriones de pez cebra.

Embriones fijados en paraformaldehído 4% (a 4 °C por toda la noche) de 28, 48 y 72 hpf sobreteñidos para hibridación *in situ* de *hif-2 α* y de embriones transgénicos teñidos para inmuno-*in situ* de 48 y 72 hpf y fueron post-fijados en paraformaldehído 2%/ glutaraldehído 1.25% (Sigma-Aldrich, USA) en buffer BT (0,15 mM CaCl₂, 4% de

sacarosa, 0,1 M buffer fosfato) por 20 minutos a temperatura ambiente. Estos embriones fueron deshidratados por medio de una batería de etanol de concentraciones porcentuales v/v decrecientes (50, 70, 90, 96, 100 I y 100 II), por 30 minutos cada solución. Posteriormente los embriones fueron aclarados con Xilol 100% (Merck) por 2 x 20 minutos cada uno. Posteriormente se incluyeron en Paraplast Plus® (Kendall, Tyco Healthcare Group, USA). Luego de la inclusión, los embriones fueron orientados bajo lupa y se realizaron cortes con micrótopo (Leite, Alemania) de 6 µm los que fueron montados en portaobjetos de vidrio tratados con 3-aminopropiltrióxilano (Polysciences, Inc., Washington, PA, USA). Los cortes montados fueron contrateñidos con eosina.

2.2.11 Microinyección de oligonucleótidos antisentido (morpholinos) en embriones de pez cebra y estudios de falta de función.

A partir de la secuencia de *hif-2α* se diseñó un oligonucleótido antisentido (morpholino) contra la región de ATG de inicio para ser inyectado en embriones de pez cebra. El diseño fue hecho contra la región que contenía el codón de inicio de *hif-2α*. La síntesis del morpholino fue realizada por Gene Tools (USA) y la secuencia fue: 5'GAATTACGCGAGAACGGCGCGATGA 3' y se llamó MO*hif-2α*. Se preparó un stock de 300 µl de morpholino, (10X) y se diluyó en buffer Danieau (50 mM NaCl, 0.7 mM KCl, 0.4 mM MgSO₄, 0.6 mM Ca(NO₃)₂ y 5 mM HEPES).

Los embriones a inyectar se tomaron en estadio de una a dos células y se lavaron 2 veces con medio Holfreter 1X (2X: 7 g de NaCl, 0.4 g de Na₂HCO₃, 0.2 g CaCl₂ y 0.1

g KCl en agua destilada). Luego los embriones se incubaron con 20 ml de medio Holfreter y se agrega Pronasa (0.35 mg/ml concentración final, Sigma) para digerir el corion. Se incubó hasta observar que aproximadamente el 75% de los embriones se encontraban descorionados. En este punto los embriones fueron lavados 5 veces con 40 ml de Holfreter por agitación y teniendo cuidado con que los embriones no sean expuestos al aire. Para la inyección, los embriones fueron montados en una rampa preparada con agarosa 2% en agua. El morpholino a inyectar se diluyó a 1X o 0.5X a partir de un stock 5X (50 μ M). Los embriones fueron microinyectados (7nl/embrión) utilizando un microinyector IM 300 (Narishige, Japón). Posterior a la inyección, los embriones se mantuvieron en medio Holfreter por 4 horas en placas de vidrio a 28,5 °C. Luego de este tiempo, el medio fue cambiado por una mezcla de Holfreter y antibióticos (Estreptomicina y Penicilina (GibcoBRL, USA), 2 μ g/ml). Los embriones inyectados fueron crecidos hasta el día siguiente para el análisis fenotípico y la determinación de la tasa de sobrevivencia. Algunos embriones inyectados (wt) fueron fijados a 10,5; 18; 24 y 48 hpf para hibridación *in situ*. Las sondas utilizadas para realizar los estudios funcionales fueron: *flk1*, *flt4*, *vegfl21* y *vegfl65*. Los embriones *tg(fli:egfp^{y1})* inyectados fueron visualizados a las 24 y 48 horas post inyección bajo fluorescencia para observar los vasos sanguíneos. Como control se inyectaron embriones con un morpholino control (mismatch). Todas las inyecciones fueron repetidas al menos 3 veces con n > 100 embriones cada vez y al considerar el error estándar asociado al promedio la significancia considerada fue de 0.05.

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Clonamiento de *hif-2 α* y caracterización de la proteína deducida, a partir de alineamientos de secuencias con proteínas ortólogas.

Para estudiar la función de Hif-2 α en el desarrollo del pez cebra, inicialmente se clonó este factor *in silico* y por análisis de secuencias.

A partir de alineamientos de secuencias se determinó el mRNA completo de *hif-2 α* . El resultado de este alineamiento arrojó regiones que mostraron 100% de identidad. Con estos resultados fue posible determinar la estructura genómica de *hif-2 α* de pez cebra determinando exones e intrones. En *hif-2 α* se encontraron 16 exones y 15 intrones, siendo el primer exón codificante y el codón de término se encontró en el último exón. Por otra parte, rastreando en la base de datos GeneBank se encontró que *hif-2 α* pertenece al LG13 (Linkage Group). La información de esta estructura exónica se resume en la Figura 1 y en la Tabla 2.

La secuencia determinada del mRNA de *hif-2 α* fue de 3148pb y su número de acceso en el GeneBank es DQ375242. El tamaño de la secuencia codificante deducida fue de 2499 pb y la proteína correspondiente deducida consta de 832 aminoácidos. Esta secuencia se alineó junto a otras proteínas Hif-2 α (Figura 2) encontrándose regiones conservadas a lo largo de la proteína. Estas regiones correspondieron a los dominios característicos de HIF descritos previamente (Figura 1), los dominios identificados fueron: bHLH (*basic helix loop helix*), PAS (*Pern-Arnt-Sim*), ODDD (*oxygen dependent degradation domain*) y TAD (*transactivation domain*). Se encontraron dos dominios

PAS (A y B) y dos dominios TAD, estos últimos correspondientes al dominio N-terminal y al C-terminal (TAD-N y TAD-C).

Además de encontrar dominios característicos de este factor de transcripción, se dedujo la presencia de 4 regiones NLS (*nuclear localization sequence*) (Figura 2), descritas previamente para HIF humano (Semenza 1999).

TABLA 2. Estructura exónica de *hif-2α*. Se resumen los sitios de empalme de los 16 exones que constituyen el gen *hif-2α*, mostrándose los sitios 3' y 5' de los intrones vecinos a cada uno de los exones, además se indican los tamaños de los exones en pares de base (pb).

Exón	Intrón 3'	Exón 5'-3'	Intrón 5'	pb
E1	tcaccg ⁻²⁴⁹	CAAAAC ⁺¹ ATG	GAAGAG ⁺²⁶	gtgagt 285
E2	ctgtag ⁺²⁷	GTGCAG	ACTCAG ⁺²¹⁷	gtacac 191
E3	ttgcag ⁺²¹⁸	GCTACA	ACTCAG ⁺³⁶⁹	gtgagt 152
E4	ttgtag ⁺³⁷⁰	GTGGAG	AAGCCG ⁺⁴⁵⁴	gtatgt 85
E5	ctgcag ⁺⁴⁵⁵	GCATTG	TGGAAG ⁺⁵⁶⁷	gtcaat 113
E6	tgtag ⁺⁵⁵⁸	GTTCTA	TGAAAG ⁺⁷⁶⁹	gtactc 202
E7	ttctag ⁺⁷⁷⁰	GGTTAC	AGAACC ⁺⁸⁷⁶	gtatgt 107
E8	ctctag ⁺⁸⁷⁷	TGTGCA	GCTGAG ⁺¹⁰²⁴	gtaagg 148
E9	tcatag ⁺¹⁰²⁵	TGACGT	ACTTTG ⁺¹²³⁰	gtgaga 206
E10	tttcag ⁺¹²³¹	GTCAGT	TCTACG ⁺¹⁴²¹	gtaaac 191
E11	gaacag ⁺¹⁴²²	CCCAGC	CAAGAG ⁺¹⁵³⁵	gttaa 114
E12	tttcag ⁺¹⁵³⁶	ACTGAC	GCAAAG ⁺¹⁹⁹⁹	gtaagt 464
E13	tcacag ⁺²⁰⁰⁰	GCCTAT	GCCATG ⁺²⁰⁹⁶	gtttgt 97
E14	tttcag ⁺²⁰⁹⁷	GCAGAG	TGTCAG ⁺²²⁰²	gtatta 106
E15	tcctag ⁺²²⁰³	ACAAAA	TGGATG ⁺²³⁵¹	gtgagc 149
E16	ttgcag ⁺²³⁵²	GAATCG TGA ⁺²⁴⁹⁹		552

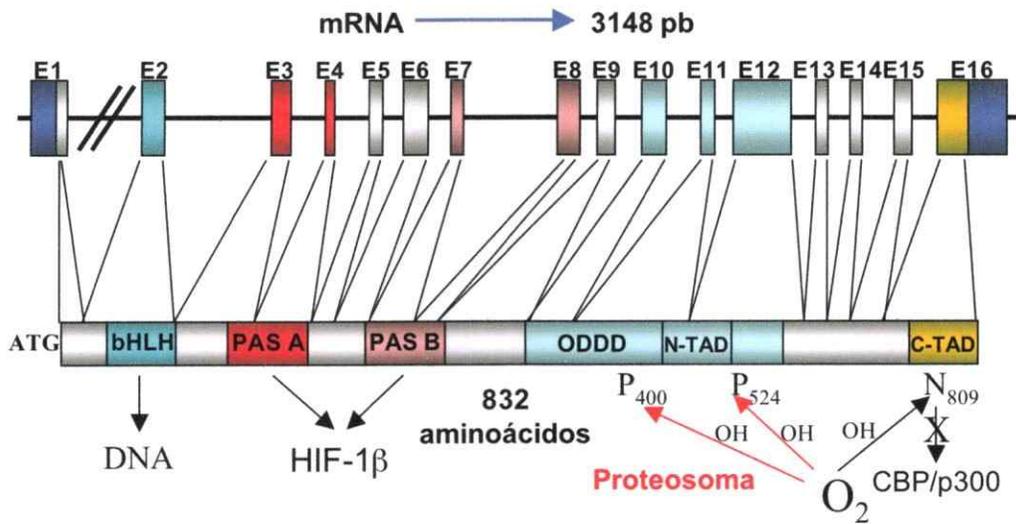


Figura 1. Estructura genómica, aminoacídica y regulación por oxígeno de *Hif-2α*. La estructura genómica de *hif-2α* consta de 15 intrones y 16 exones (exones E1 a E16). El mRNA deducido para este gen es de 3148 pb, siendo el primer exón codificante (E1). La proteína deducida a partir de esta secuencia consta de 832 aminoácidos y presenta los dominios característicos de HIF descritos en la proteína humana: bHLH (unión a DNA), PAS (dimerización con HIF-1β), ODDD (estabilidad), N-TAD y C-TAD (transactivadores). En el dominio ODDD (u ODD) se encuentran los residuos P₄₀₅ y P₅₃₀, que en presencia de oxígeno son hidroxilados, llevando la proteína a degradación vía proteosoma. El residuo N₈₅₁ también es hidroxilado en presencia de oxígeno impidiendo su unión al complejo activador CBP/p300, es decir su función es inhibida. Tanto la estabilización como la función transactivadora de *Hif-2α* son reguladas por la concentración de oxígeno.

Al comparar la identidad entre los dominios característicos de la proteína deducida de *Hif-2α* con las proteínas ortólogas de carpa, humano y ratón, se observaron porcentajes de identidad superiores al 90% (Tabla 3), así como también se identificaron los residuos descritos para la estabilidad y la función transactivadora de *Hif-2α* (Figura 2). Estos residuos, cruciales en la estabilidad de la proteína (P₄₀₅, K₄₉₅ y P₅₃₀ en la proteína de pez cebra), se ubican en el dominio ODDD y la región transactivadora (N₈₅₁). A partir de estos resultados se pudo concluir que tanto la estructura como la función de *Hif-2α* se encuentran conservadas.

Para establecer que *hif-2α* y *hif-1α* clonados en el laboratorio correspondían a proteínas diferentes y no a la variante de una misma proteína, se alinearon todas las secuencias descritas de *Hif-1α* y de *Hif-2α* disponibles en ese momento y se alinearon usando el protocolo CLUSTAL W, agrupando los resultados en un árbol filogenético.

El árbol filogenético muestra que ambos genes forman familias distintas, distribuyéndose en dos clúster (Figura 3). Estos mismos resultados muestran el grado de cercanía de las proteínas en relación al grupo taxonómico, siendo *Hif-2α* de carpa la más cercana a la de pez cebra (en rojo en Figura 3).

TABLA 3. Conservación de dominios de *Hif-2α*. Se determinaron los porcentajes de identidad de los dominios característicos de HIF entre *Hif-2α* de pez cebra (zf) comparado con proteínas ortólogas (carpa, humano y ratón).

Dominio	(%) zf/carpa	(%) zf/humano	(%) zf/ratón
bHLH	95.6	93.3	93.3
PAS A	98.2	91.1	91.1
PAS B	92.4	86.7	86.7
TAD-N	91.8	67.3	70.8
TAD-C	93.3	86.7	81.1
NLS1	80	80	90
NLS2	90	70	70
NLS3	80	-	-
NLS4	100	100	100

Figura 2. Alineamiento de secuencias de *Hif-2α*. Alineamiento múltiple de secuencias de *Hif-2α*, se comparó *Hif-2α* de pez cebra con otras proteínas ortólogas, *chif-2* (pez carpa), *hhif-2* (humano), *mhif-2* (ratón), *rhif-2* (rata) y *cothif-2* (codorniz). En colores se muestran los distintos dominios característicos de HIF; bHLH, PAS A y B, ODD, N-TAD y C-TAD, además con líneas negras horizontales se indican las secuencias NLS. Con asterisco (*) se indican los residuos hidroxilables (prolinas) y la lisina acetilable. El resultado de este alineamiento muestra que los dominios característicos de HIF se encuentran conservados a pesar de las distintas identidades mostradas entre las proteínas ortólogas apreciadas en la figura.

NLS1 bHLH

1 MT AEKKEKRCSSERRKEKSRDAARCRSRKTEVTVPELAKQLP IPHS ISSHLDKAS INPLA19 FLRTRKLVNSGCVNTPTEM shif-2a
1 MT AEKKEKRCSSERRKEKSRDAARCRSRKTEVTVPELAKQLP IPHS ISSHLDKAS INPLA19 FLRTRKLLTS9GCAATET chif-2a
1 MT ADKKEKRCSSERRKEKSRDAARCRSRKTEVTVPELAKQLP IPHS ISSHLDKAS INPLA19 FLRTRKLLTS9GCAATET hif-2a
1 MT ADKKEKRCSSERRKEKSRDAARCRSRKTEVTVPELAKQLP IPHS ISSHLDKAS INPLA19 FLRTRKLLTS9GCAATET hif-2a
1 MT ADKKEKRCSSERRKEKSRDAARCRSRKTEVTVPELAKQLP IPHS ISSHLDKAS INPLA19 FLRTRKLLTS9GCAATET hif-2a
1 MT ADKKEKRCSSERRKEKSRDAARCRSRKTEVTVPELAKQLP IPHS ISSHLDKAS INPLA19 FLRTRKLLTS9GCAATET cothif-2a

NLS2 PAS A

81 TDADRLMDSWLTKSLGGFTVAATSDGDMIFLSEMIKIMGLTQVELTGHSIFDITFPCDHEEIRENLSLKAG--IGKKGK shif-2a
81 TDVDRLMDSWLTKSLGGFTVAATSDGDMIFLSEMIKIMGLTQVELTGHSIFDITFPCDHEEIRENLSLKAG--HGKKGK chif-2a
81 AEADQMDMLYLKALEGFIAAATQDGMIFLSEMIKIMGLTQVELTGHSIFDITFPCDHEEIRENLSLKAGSGGKKGK hif-2a
81 AEADQMDMLYLKALEGFIAAATQDGMIFLSEMIKIMGLTQVELTGHSIFDITFPCDHEEIRENLSLKAGSGGKKGK hif-2a
81 AEADQMDMLYLKALEGFIAAATQDGMIFLSEMIKIMGLTQVELTGHSIFDITFPCDHEEIRENLSLKAGSGGKKGK hif-2a
81 LEADQMDMLYLKALEGFIAAATQDGMIFLSEMIKIMGLTQVELTGHSIFDITFPCDHEEIRENLSLKAGSGGKKGK cothif-2a

159 ELSTERDFPIMKCTVTRGRTVNLKASAWKULNCTGHLKUCNGCPARU-LCGFKPEPLTCUWHMCEP IUPHSM IDTFLD shif-2a
159 ELNTERDFPIMKCTVTRGRTVNLKASAWKULNCTGHLKUCNGCPARU-LCGFKPEPLTCUWHMCEP IUPHSM IDTFLD chif-2a
161 DNSTERDFPIMKCTVTRGRTVNLKASAWKULNCTGHLKUCNGCPARU-LCGFKPEPLTCUWHMCEP IUPHSM IDTFLD hif-2a
161 DVSTERDFPIMKCTVTRGRTVNLKASAWKULNCTGHLKUCNGCPARU-LCGFKPEPLTCUWHMCEP IUPHSM IDTFLD hif-2a
161 DRSTERDFPIMKCTVTRGRTVNLKASAWKULNCTGHLKUCNGCPARU-LCGFKPEPLTCUWHMCEP IUPHSM IDTFLD hif-2a
161 ENSTERDFPIMKCTVTRGRTVNLKASAWKULNCTGHLKUCNGCPARU-LCGFKPEPLTCUWHMCEP IUPHSM IDTFLD cothif-2a

PAS B

238 SKTFLSRHSHDKKTYCDRUTELMGVYPEDELLGRSAVEFYHALDSENRVTKSHQMLCTKGQAVSGQYRMLAKHGCVYVWAE shif-2a
238 SKAFLSRHSHDKKTYCDRUTELMGVYPEDELLGRSAVEFYHALDSENRVTKSHQMLCTKGQAVSGQYRMLAKHGCVYVWAE chif-2a
241 SKTFLSRHSHDKKTYCDRUTELMGVYPEDELLGRSAVEFYHALDSENRVTKSHQMLCTKGQAVSGQYRMLAKHGCVYVWAE hif-2a
241 SKTFLSRHSHDKKTYCDRUTELMGVYPEDELLGRSAVEFYHALDSENRVTKSHQMLCTKGQAVSGQYRMLAKHGCVYVWAE hif-2a
241 SKTFLSRHSHDKKTYCDRUTELMGVYPEDELLGRSAVEFYHALDSENRVTKSHQMLCTKGQAVSGQYRMLAKHGCVYVWAE hif-2a
241 SKTFLSRHSHDKKTYCDRUTELMGVYPEDELLGRSAVEFYHALDSENRVTKSHQMLCTKGQAVSGQYRMLAKHGCVYVWAE cothif-2a

318 TRGTVIYVSRNSQPQC IVCUNYVLSVVEEKSIFG-DQTESLTKFPH--KLGFTFP--KEALGSDPADLLFTKLKEEPEDELL shif-2a
318 TQGTVIYVSRNSQPQC IVCUNYVLSVVEEKSIFG-DQTESLTKFPH--KLGFTFP--KEALGSDPADLLFTKLKEEPEDELL chif-2a
321 TQGTVIYVSRNSQPQC IVCUNYVLSVVEEKSIFG-DQTESLTKFPH--KLGFTFP--KEALGSDPADLLFTKLKEEPEDELL hif-2a
321 TQGTVIYVSRNSQPQC IVCUNYVLSVVEEKSIFG-DQTESLTKFPH--KLGFTFP--KEALGSDPADLLFTKLKEEPEDELL hif-2a
321 TQGTVIYVSRNSQPQC IVCUNYVLSVVEEKSIFG-DQTESLTKFPH--KLGFTFP--KEALGSDPADLLFTKLKEEPEDELL hif-2a
320 TQGTVIYVSRNSQPQC IVCUNYVLSVVEEKSIFG-DQTESLTKFPH--KLGFTFP--KEALGSDPADLLFTKLKEEPEDELL cothif-2a

ODD

NLS3

394 TQLAFTPGDTIISLDF----GQSQVEERTVYVYKVSVAAPTUSHPVVDGHRISVSGEHAAMATTSVPSAPPSSATPFLS shif-2a
396 TQLAFTPGDTIISLDF----GQSQVEERTVYVYKVSVAAPTUSHPVVDGHRISVSGEHAAMATTSVPSAPPSSATPFLS chif-2a
401 AQLAFTPGDAIISLDF----GQSQVEERTVYVYKVSVAAPTUSHPVVDGHRISVSGEHAAMATTSVPSAPPSSATPFLS hif-2a
401 AQLAFTPGDAIISLDF----GQSQVEERTVYVYKVSVAAPTUSHPVVDGHRISVSGEHAAMATTSVPSAPPSSATPFLS hif-2a
401 AQLAFTPGDAIISLDF----GQSQVEERTVYVYKVSVAAPTUSHPVVDGHRISVSGEHAAMATTSVPSAPPSSATPFLS hif-2a
398 AQLAFTPGDAIISLDF----GQSQVEERTVYVYKVSVAAPTUSHPVVDGHRISVSGEHAAMATTSVPSAPPSSATPFLS cothif-2a

TAD-N

NLS4

470 S----CSTPSSPDDYVTPVDSLDLRLVETELFSLDTQKRAVSHRQVTELSENLETLAPVYVIMDGEDFOLNFIICPEEPPS shif-2a
472 S----CSTPSSPDDYVTPVDSLDLRLVETELFSLDTQKRAVSHRQVTELSENLETLAPVYVIMDGEDFOLNFIICPEEPPS chif-2a
474 SSSSSCSTPSSPDDYVTPVDSLDLRLVETELFSLDTQKRAVSHRQVTELSENLETLAPVYVIMDGEDFOLNFIICPEEPPS hif-2a
474 SSSS-CSTPSSPDDYVTPVDSLDLRLVETELFSLDTQKRAVSHRQVTELSENLETLAPVYVIMDGEDFOLNFIICPEEPPS hif-2a
474 SSSS-CSTPSSPDDYVTPVDSLDLRLVETELFSLDTQKRAVSHRQVTELSENLETLAPVYVIMDGEDFOLNFIICPEEPPS hif-2a
474 SSSS-CSTPSSPDDYVTPVDSLDLRLVETELFSLDTQKRAVSHRQVTELSENLETLAPVYVIMDGEDFOLNFIICPEEPPS cothif-2a

546 EIGLGTNMQCFMITSIFQPLSSPSAAH--YQPMNSGGDEKQINIGGSSUESW--PUPYSRGPMPQ--HPPYHDPASTPLS shif-2a
548 EIGLGTNMQCFMITSIFQPLSSPSAAH--YQPMNSGGDEKQINIGGSSUESW--PUPYSRGPMPQ--HPPYHDPASTPLS chif-2a
553 AENPQSTPQHCFSMTNIFQPLAPVAFHSPFLDKFQQLSEKRTES--ENRPMSSIFPDAGSKASLPPCCGQASTPLS hif-2a
552 PESQPPTQHCFSMTNIFQPLAPVAFHSPFLDKFQQLSEKRTES--ENRPMSSIFPDAGSKASLPPCCGQASTPLS hif-2a
552 PESQPPTQHCFSMTNIFQPLAPVAFHSPFLDKFQQLSEKRTES--ENRPMSSIFPDAGSKASLPPCCGQASTPLS hif-2a
552 SESAQNTQQNLSMSTIFQPLVAFHSPFLDKFQQLSEKRTES--ENRPMSSIFPDAGSKASLPPCCGQASTPLS cothif-2a

621 SHGGRQMLQWPPDPL--P SKAGMMD-----PLAAGRSCQTHP ANRMAP IYQRPHEMIVQVYRD-TSPARLALAN shif-2a
623 SHGGRQMLQWPPDPL--P SKAGMMD-----PLAAGRSCQTHP ANRMAP IYQRPHEMIVQVYRD-TSPARLALAN chif-2a
630 SHGGRSMTQWPPDPLHFGPTKMAVGDQRTEFLGAAPLQ----PPVSPPHUSTFKTRSAGFGARCPDULSPAMVALSN hif-2a
629 SHGGRSMTQWPPDPLHFGPTKMAVGDQRTEFLGAAPLQ----PPVSPPHUSTFKTRSAGFGARCPDULSPAMVALSN hif-2a
629 SHGGRSMTQWPPDPLHFGPTKMAVGDQRTEFLGAAPLQ----PPVSPPHUSTFKTRSAGFGARCPDULSPAMVALSN hif-2a
629 SHGGRSMTQWPPDPLHFGPTKMAVGDQRTEFLGAAPLQ----PPVSPPHUSTFKTRSAGFGARCPDULSPAMVALSN cothif-2a

688 SFK-----RSFQMAAETPPTKSQQTWCKR---LRHESCAM-ERKSLSSS-LSD-----KSHAMN-RGMDHQ shif-2a
690 GFK-----RSFQMAAETPPTKSQQTWCKR---LRHESCAM-ERKSLSSS-LSD-----KSHAMN-RGMDHQ chif-2a
705 KLKLRQLEYEEA(QDLSGGDDPPGCTSSHLNMGKMKSLMGCTCPLMPDK-PLSAMVNDKIKQMPHRLGQPLRHLPLP hif-2a
709 KLKLRQLEYEEA(QDLSGGDDPPGCTSSHLNMGKMKSLMGCTCPLMPDK-TISAMHAPDEITQKSHRGLGQPLRHLPLP hif-2a
709 KLKLRQLEYEEA(QDLSGGDDPPGCTSSHLNMGKMKSLMGCTCPLMPDK-TUSAMHAPDEITQKSHRGLGQPLRHLPLP hif-2a
701 SLKLRQLDVEEQAMQQLTGGDPSAIMPQLNMGKMKSLMGCTCPLMPDK-TUSAMHAPDEITQKSHRGLGQPLRHLPLP cothif-2a

TAD-C

746 HRKQYSGNQNGQPTKH--YREQFCN--YREYVHNPSSKMDG IASRLIGPSTETVYSLPELTRYDCVNVPLQGNLHLLQG shif-2a
749 HRKQYSGNQNGQPTKH--YREQFCN--YREYVHNPSSKMDG IASRLIGPSTETVYSLPELTRYDCVNVPLQGNLHLLQG chif-2a
784 QP---PSAISPGENSKSR-IPPQCYATQYQDYSLSAHRUSGMSRLLGSPFESVYLLPELTRYDCVNVPLQGNLHLLQG hif-2a
784 QP---PSAISPGENSKSR-IPPQCYATQYQDYSLSAHRUSGMSRLLGSPFESVYLLPELTRYDCVNVPLQGNLHLLQG hif-2a
788 QP---PSAISPGENSKSR-IPPQCYATQYQDYSLSAHRUSGMSRLLGSPFESVYLLPELTRYDCVNVPLQGNLHLLQG hif-2a
780 QQQQQCTCGSGENLKAAGATSPQYFSHTQDYTVQSAHRUSGMSRLLGSPFESVYLLPELTRYDCVNVPLQGNLHLLQG cothif-2a

822 SLLLRALDQAT shif-2a
825 SLLLRALDQAT chif-2a
860 GLLLRALDQAT hif-2a
864 SLLLRALDQAT hif-2a
864 SLLLRALDQAT hif-2a
860 SLLLRALDQAT cothif-2a

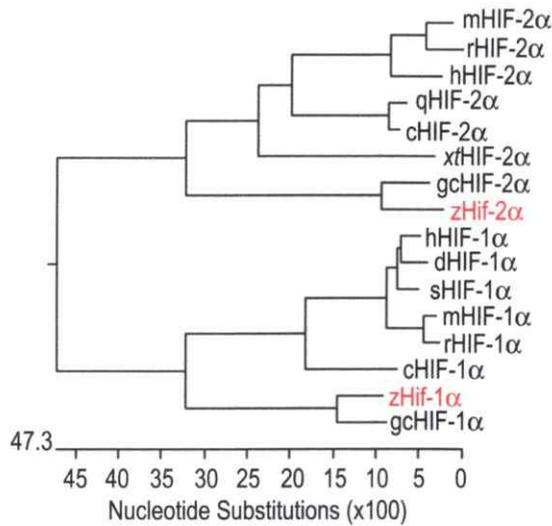


Figura 3. Árbol filogenético de ortólogos de *Hif-1α* y *Hif-2α*. El árbol filogenético se construyó por alineamiento múltiple de secuencias. Se muestra una separación clara entre estas dos proteínas *Hif* de pez cebra (en rojo). Las proteínas que se ubican de forma más cercana corresponden a las de organismos cercanos desde el punto de vista evolutivo, tal es el caso la *Hif-2α* de carpa con la proteína de pez cebra. Abreviaciones: m: ratón, r: rata, h: humano, q: codorniz, c: pollo, xt: *Xenopus tropicalis*, gc: carpa, z: pez cebra, d: perro, s: ardilla.

2.3.2 Análisis de la expresión de *hif-2α* por RT-PCR.

Posterior al clonamiento y a la caracterización de las secuencias obtenidas para el mRNA y para la proteína de *hif-2α*, se decidió estudiar la expresión de su mRNA.

La expresión de *hif-2α* en pez cebra fue evaluada inicialmente por RT-PCR a partir de RNAs totales de embriones de 0, 10, 18, 24, 48 y 72 horas post-fertilización (hpf). Se encontró que la expresión de este gen comienza desde las 0 hpf, es decir es un gen con expresión materna. Esta expresión continúa durante todos los estadios analizados presentando una expresión constante; no se detectaron variaciones en los niveles de expresión con esta técnica entre los diferentes estadios analizados (Figura 4A). Asimismo, se aislaron RNAs totales de tejidos de peces adultos provenientes de músculo, agallas, corazón, testículos, hígado, ovario, intestino y cerebro. En estos

ensayos se encontró expresión en todos los tejidos analizados, siendo mayor la expresión en agallas, hígado, ovario y cerebro (Figura 4B). Se utilizó como control la expresión de β -Actina.

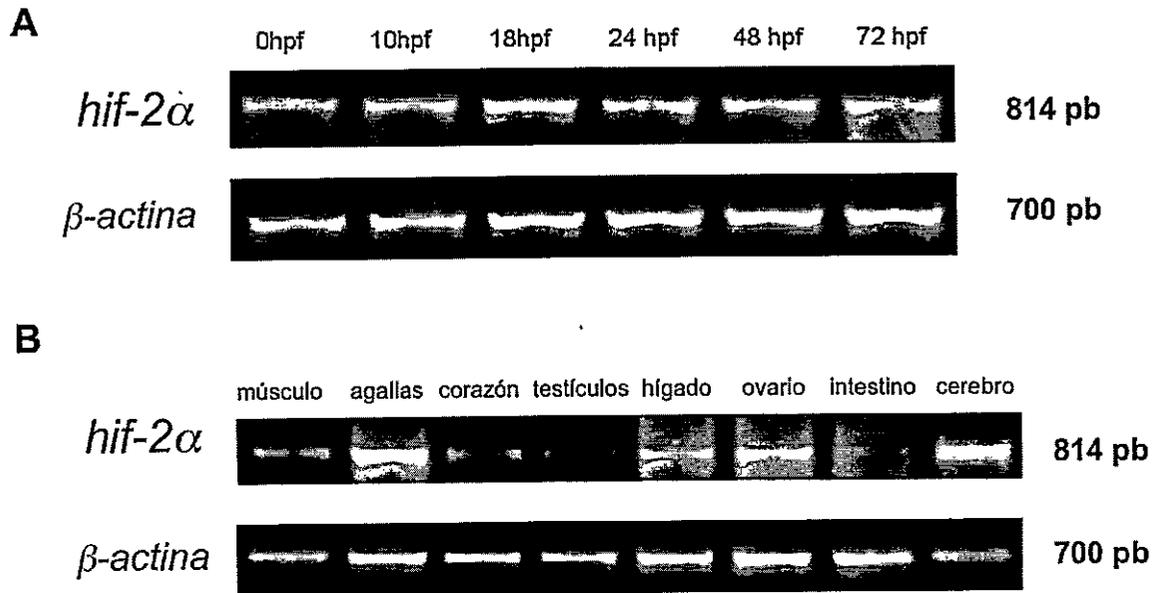


Figura 4. Expresión de *hif-2α* analizado por RT-PCR. (A) Análisis de la expresión de *hif-2α* en estadios de 0, 10, 18, 24, 48 y 72 hpf por RT-PCR utilizando partidores específicos., No se observa variación detectable en la expresión de *hif-2α* durante los estadios del desarrollo analizados. (B) También se estudió la expresión de *hif-2α* en diferentes tejidos de peces adultos (B), encontrándose expresión en todos ellos. Los tejidos que presentaron mayor presencia de mensajero de *hif-2α* fueron agallas, hígado, ovarios y cerebro. hpf: horas post fertilización.

2.3.3 Determinación del patrón de expresión de *hif-2α* por hibridación *in situ* de embrión completo.

Una vez determinada la expresión de *hif-2α* por RT-PCR, que entregó información sobre los estadios del desarrollo en que se expresaba este gen, se quiso estudiar el patrón de expresión espacial en embriones de pez cebra, es decir, en qué territorios del embrión se estaba expresando este gen.

Usando hibridación *in situ* de embrión completo se determinó el patrón de expresión del mRNA de *hif-2α* durante el desarrollo embrionario y larval del pez. Se

fijaron embriones de 0, 10, 18, 24, 28, 32, 48, 60 hpf y larvas de 72 y 120 hpf. Se utilizó la sonda antisense homóloga de *hif-2α* (Figura 5). El análisis por hibridación *in situ* de la expresión de *hif-2α* mostró que el mRNA se expresa desde las 8 células (1,25 hpf) (Figura 5A). Posteriormente en el desarrollo en estadios de 10 y 18 hpf se observó expresión ubicua en el embrión, pero restringida en la región ventral (Figura 5B y 5C). A las 24 hpf la expresión de *hif-2α* comenzó a ser más restringida, observándose expresión en la cabeza, epitelio de los ventrículos cerebrales y somitos. A las 28 hpf se detectó expresión en vasos sanguíneos cerebrales, epitelio de los ventrículos cerebrales, somitos y vasos intersegmentales (Figura 5D). Posteriormente, en estadio de 28 hpf se observó expresión en vasos sanguíneos cerebrales, como MCeV (vena cerebral media), somitos y vasos intersegmentales, siendo mucho más clara la expresión en los vasos de la cabeza (Figura 5E). Por otra parte, en este estadio no se observó expresión en notocorda, como lo demuestra la fotografía de un corte histológico longitudinal a nivel de la cola de un embrión de 28 hpf teñido por hibridación *in situ* (inserto en la Figura 5E), este patrón se mantiene hasta las 32 hpf (Figura 5F). Luego a las 48 hpf el transcrito de *hif-2α* fue detectado en vasos sanguíneos de la cabeza, somitos, notocorda y vasos intersegmentales de la cola (Figura 5G). La expresión en notocorda y en vasos cerebrales e intersegmentales fue observada por medio de cortes histológicos (insertos en Figura 5G).

A 60 hpf se mantiene la expresión en cabeza, pero además se observó expresión en notocorda, somitos, vasos longitudinales (aorta dorsal) e intestino. En este mismo estadio se observaron bajos niveles de expresión en tubo neural (Figura 5H).

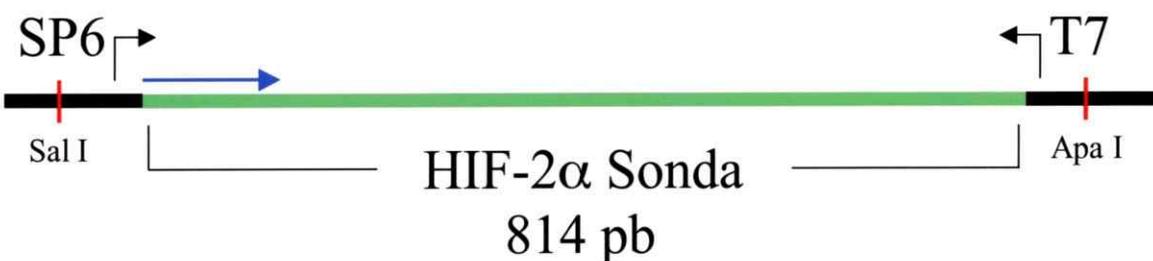
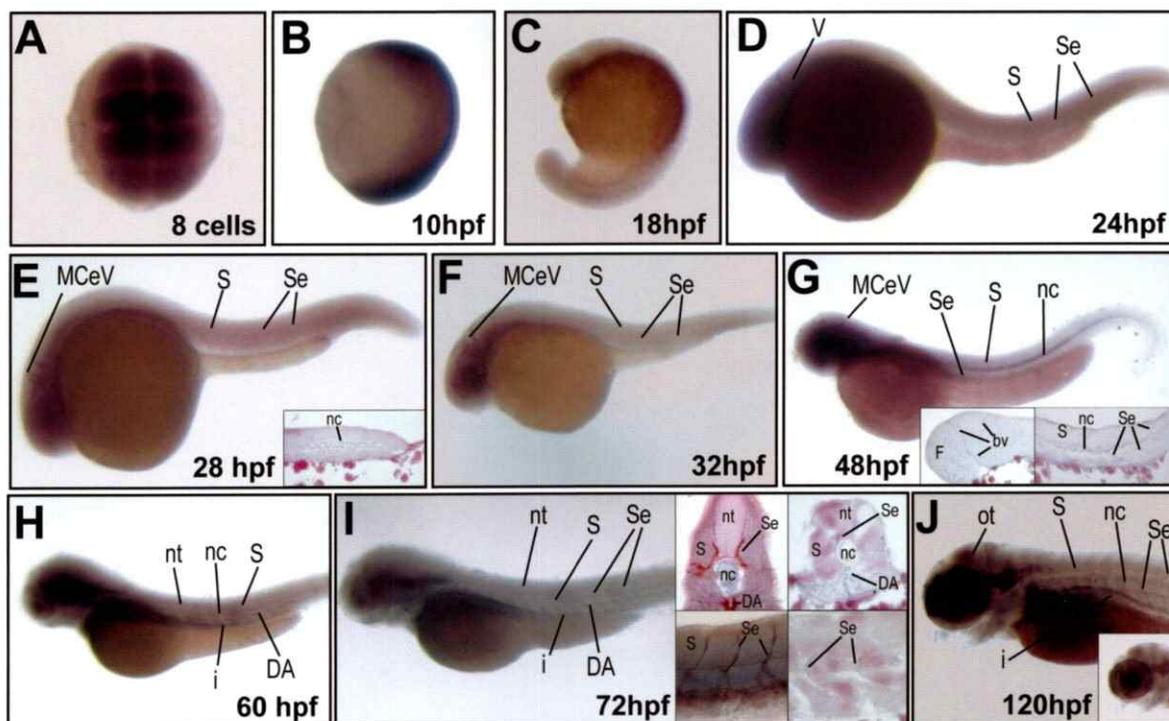


Figura 5. Patrón de expresión de *hif-2α* durante el desarrollo del pez cebra. Usando hibridación *in situ* se determinó la distribución temporal y espacial del mRNA de *hif-2α* durante el desarrollo del pez cebra. Se observó que *hif-2α* tiene expresión materna en el estadio de 8 células (A). En estadios posteriores en el desarrollo embrionario, 10 y 18 hpf, la expresión de *hif-2α* es ubicua y se restringe a la región ventral del embrión (B y C). En 24, 28 y 32 hpf se detecta expresión de *hif-2α* en vasos sanguíneos en la cabeza y en la cola y en somitos (D, E y F). No se detecta expresión de *hif-2α* en notocorda (inserto en E). Posteriormente en 48 hpf se observa expresión de *hif-2α* en la cabeza, en vasos sanguíneos de la cola, somitos y notocorda (G). La expresión en notocorda y vasos sanguíneos se estudió en cortes histológicos (insertos en G). A 60 hpf se observa expresión en notocorda, intestino, aorta dorsal y una mínima expresión en tubo neural. En 72 hpf se observó expresión de *hif-2α* en regiones similares al estadio anterior (I). La expresión en vasos sanguíneos fue corroborada por inmuno-*in situ* (detalles en el texto) observándose doble marcación en los vasos sanguíneos (insertos en I). A 120 hpf se observa expresión en los vasos intersegmentales, notocorda, somitos, intestino, tectum óptico (J) y en retina (inserto en J). Abreviaturas: DA: aorta dorsal, i: intestino, MCEV: vena media cerebral, nc: notocorda, nt: tubo neural, ot: tectum óptico, S: somitos, Se: vasos intersegmentales. En la parte inferior de la figura se aprecia el esquema de la sonda de *hif-2α* utilizada, mostrándose en azul la dirección de la hebra sentido (sense).

Posteriormente en el desarrollo a 72 hpf se observó expresión de *hif-2α* en los vasos longitudinales del tronco y la cola (aorta dorsal y vena posterior caudal) y en vasos intersegmentales, intestino, somitos y notocorda (Figura 5I). La expresión de *hif-2α* en vasos sanguíneos fue corroborada utilizando peces transgénicos *tg(fli:egfp^{v1})* de 72 hpf; estos transgénicos expresan GFP en los vasos sanguíneos, proteína que puede ser localizada por técnicas de inmunohistoquímica. De este modo, los peces transgénicos fueron hibridados con la sonda específica de *hif-2α* y luego incubados con un anticuerpo contra GFP (técnica llamada inmuno-*in situ* en esta Tesis). En estos peces se encontró

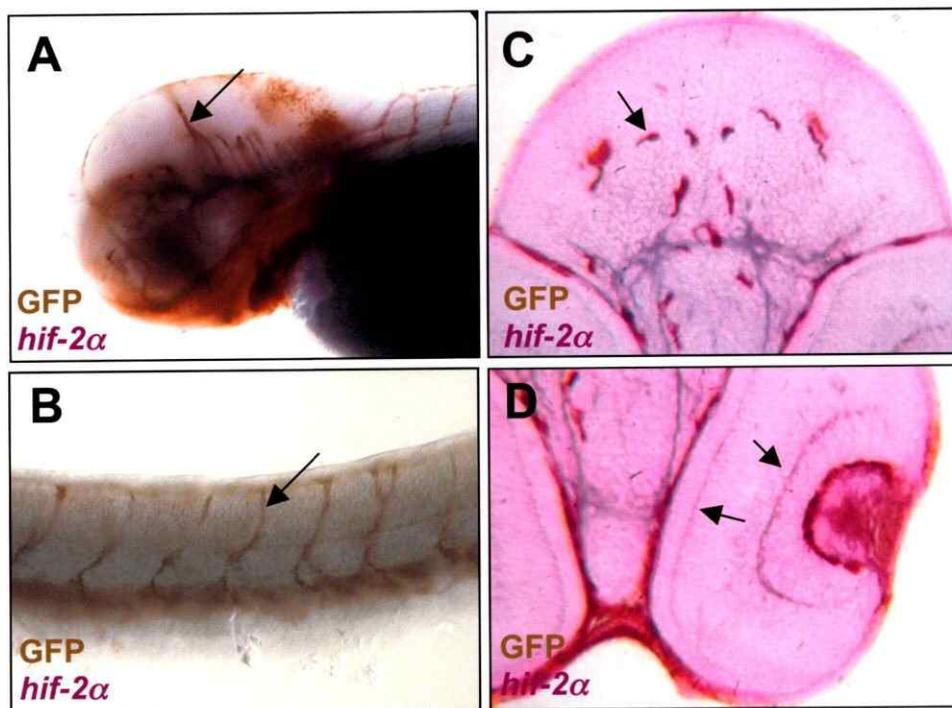


Figura 6. Inmuno *in situ* muestra colocalización de la tinción en vasos sanguíneos. Embriones transgénicos *fli:egfp^{v1}* teñidos por hibridación *in situ* contra *hif-2α* fueron teñidos por inmunohistoquímica de embrión completo. En A se observa colocalización de tinción en vasos sanguíneos de la cabeza. En B se observa colocalización de tinción en vasos sanguíneos de la cola, especialmente en los vasos intersegmentales (flecha). Estos embriones seccionados para determinar la doble marcaión en vasos sanguíneos (flecha). También se observó expresión de *hif-2α* en retina (flechas en D).

doble marcación en el sistema vascular, tanto en los vasos de la cola (intersegmentales y aorta dorsal) como de la cabeza. Posteriormente estos peces fueron incluidos en Paraplast[®], cortados y contrateñidos con eosina para observar de forma detallada la distribución histológica de esta doble marcación (insertos en Figura 5I). En estos cortes se observaron los vasos intersegmentales, aorta dorsal y retina marcados (Figura 6).

En larvas de 120 hpf también se observó expresión de *hif-2α* en los vasos sanguíneos del tronco, cola y de la cabeza, siendo mucho más evidente la expresión en la región anterior de la aorta dorsal y de la vena posterior caudal, en la región naciente del tronco (Figura 5J). En este mismo estadio se observó expresión en *tectum óptico*, notocorda, somitos, intestino, cerebro y retina.

2.3.4 Estudios de falta de función por medio de microinyección de morpholino antisentido (MO*hif-2α*).

2.3.4.1 Efecto de MO*hif-2α* en la tasa de sobrevivencia. Una vez determinado el patrón de expresión de *hif-2α*, y con el objetivo de determinar la función de este factor de transcripción en el desarrollo del pez cebra, se realizaron estudios de falta de función, para que, de esta manera, podamos aproximarnos a este objetivo. Estos estudios se llevaron a cabo, microinyectando embriones con un oligonucleótido antisentido morpholino, que hibrida en la región del ATG del mRNA de *hif-2α* (MO*hif-2α*).

Inicialmente se estudió el efecto de este morpholino en la tasa de sobrevivencia de los embriones. Se inyectaron dosis crecientes de MO*hif-2α*: 2, 3, 4.7, 5.6 y 8 ng/embrión

de pez cebra (silvestres) y se determinó la tasa de sobrevivencia para todas las dosis señaladas, cuantificando el número de peces vivos a las 24 horas post inyección del total de embriones inyectados. De acuerdo a los resultados obtenidos se encontró que el aumento de la dosis de morpholino se correlaciona con la disminución de la tasa de sobrevivencia llegando a 9%, mientras que al inyectarse dosis menores (2 ng/embrión) la tasa de sobrevivencia fue cercana al 30% (Figura 7).

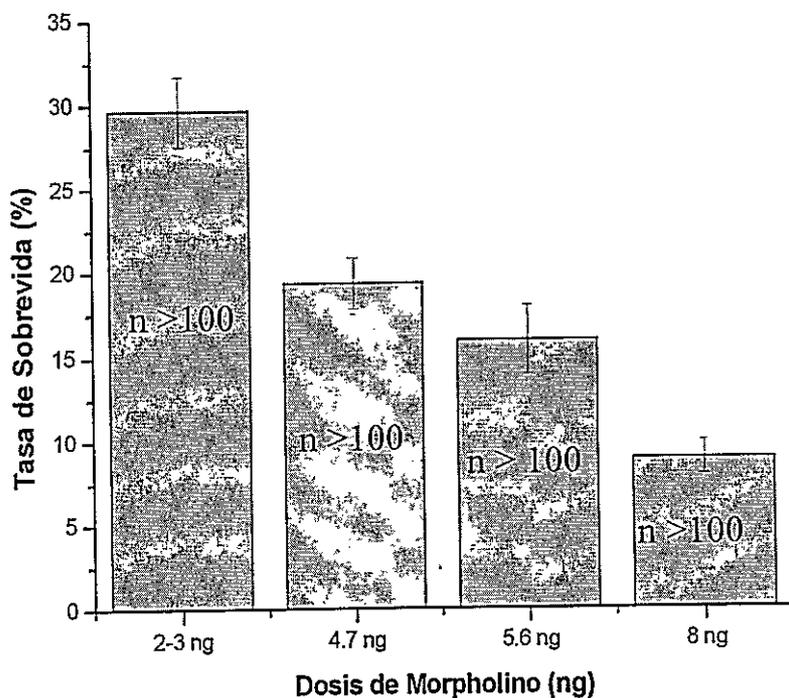


Figura 7. Efecto de la dosis sobre la tasa de sobrevivencia de embriones inyectados con *MO*hif-2* α* a las 24 hpf. Se inyectaron diferentes dosis de morpholino/embrión y se determinó la tasa de sobrevivencia para cada una de éstas luego de 24 horas post inyección. Se observa que a medida que la dosis aumenta la tasa de sobrevivencia va disminuyendo.

2.3.4.2 La inyección de MO*hif-2α* en embriones de pez cebra afecta la formación de la cola. Los embriones inyectados (silvestres) con dosis crecientes de MO*hif-2α* (morfantes) mostraron un fenotipo característico a las 24 horas post-inyección (hpi), observándose defectos en la cola, comparado con embriones inyectados con morpholino control. Aproximadamente el 60% de los peces inyectados con dosis de MO*hif-2α* de 5 ng/embrión mostraron este fenotipo, siendo los fenotipos más representativos los embriones que presentan la cola curva o ausencia completa de ella (Figura 8); estos embriones también presentaban defectos en la formación de la cabeza.

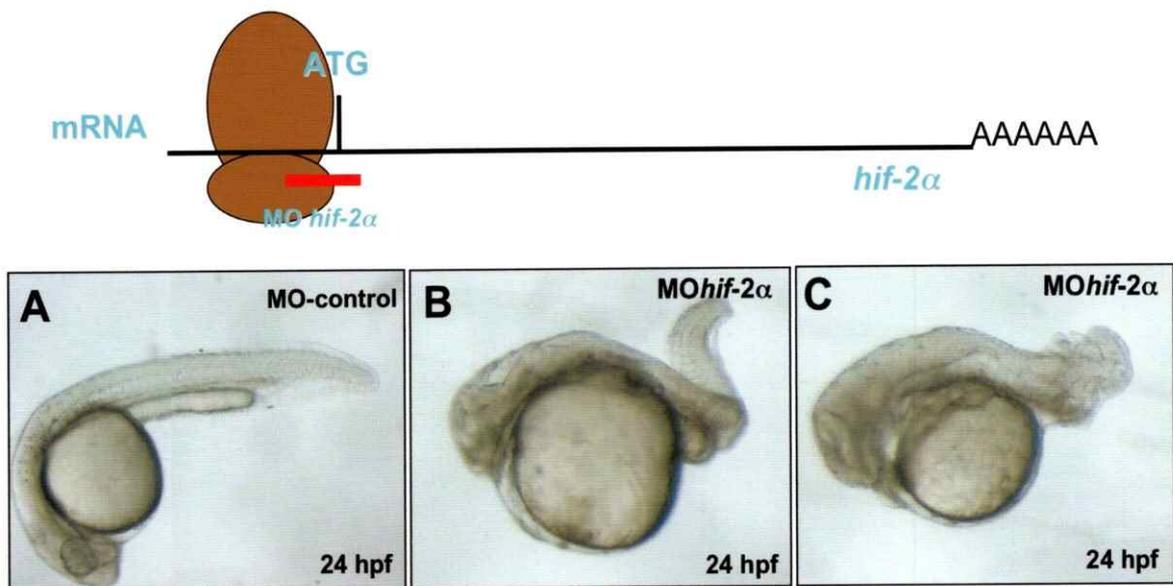


Figura 8: La falta de función de *Hif-2α* afecta la formación de la cola. Se diseñó un morfolino contra la región vecina al codón de inicio de la secuencia codificante de *hif-2α* (esquema superior) y se microinyectó en embriones de pez cebra de 1 a 2 células con MO*hif-2α*. Se observan defectos en la formación de la cola y en la cabeza (B). Otros morfantes mostraban falta completa de la cola (C), comparando con embriones microinyectados con morfolino control (A). Embriones inyectados con 5 ng de morfolino. Todas las fotografías corresponden a vistas laterales.

Posteriormente se realizaron inyecciones del morfolino de *hif-2α* con dosis menores de 5 ng/embrión, para acceder a estadios posteriores a las 24 hpf. En estos

experimentos se obtuvieron embriones de 48 hpf los que mostraron defectos leves en la formación de la cola, observándose una curvatura en el extremo de ésta y edema cardíaco (Figura 9).

2.3.4.3 La inyección de MO*hif-2α* en embriones de pez cebra afecta la formación de vasos sanguíneos de la cola en forma dosis dependiente. El fenotipo observado con la microinyección del morpholino de *hif-2α* muestra que la principal estructura embrionaria afectada es la cola, sin embargo, existen evidencias en otros modelos animales que sustentan la participación de este factor de transcripción en la formación de vasos sanguíneos (Peng y col. 2000). Por este motivo se decidió estudiar el efecto de la falta de función de *hif-2α* en el desarrollo de los vasos sanguíneos del pez cebra. Para ello se trabajó con los embriones transgénicos *tg(fli:egfp^{vl})*, de esta manera

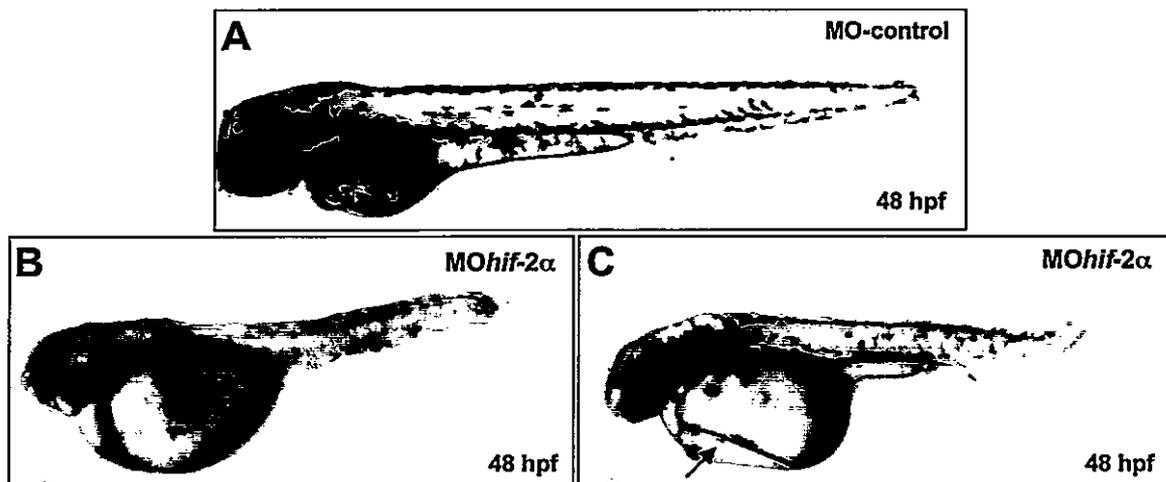


Figura 9: Defectos en la formación de la cola en embriones de 48 hpf microinyectados con 2 ng de morpholino. Embriones microinyectados con MO*hif-2α* observados en 48hpf muestran defectos en la formación de la cola y de la cabeza (B y C) y además se observa edema cardíaco (flecha en C). Embriones microinyectados con 2 ng de morpholino.

se pudo visualizar el efecto de la inyección de MO*hif-2α* sobre el desarrollo de estas estructuras. Se inyectaron embriones *tg(fli:egfp^{v1})* con 1 ng/embrión del MO*hif-2α*, en los que no se observaron defectos morfológicos evidentes, sin embargo, al analizar la expresión de GFP bajo fluorescencia se observó ausencia de algunos vasos intersegmentales, comparado con embriones inyectados con morpholino control (Figura 10 A y B). Al aumentar la dosis de morpholino en rangos de 2 y 4 ng/embrión, se obtuvo nuevamente el fenotipo de defecto en la formación de la cola. Interesantemente, al observar estos embriones bajo fluorescencia se observó la falta de una mayor cantidad

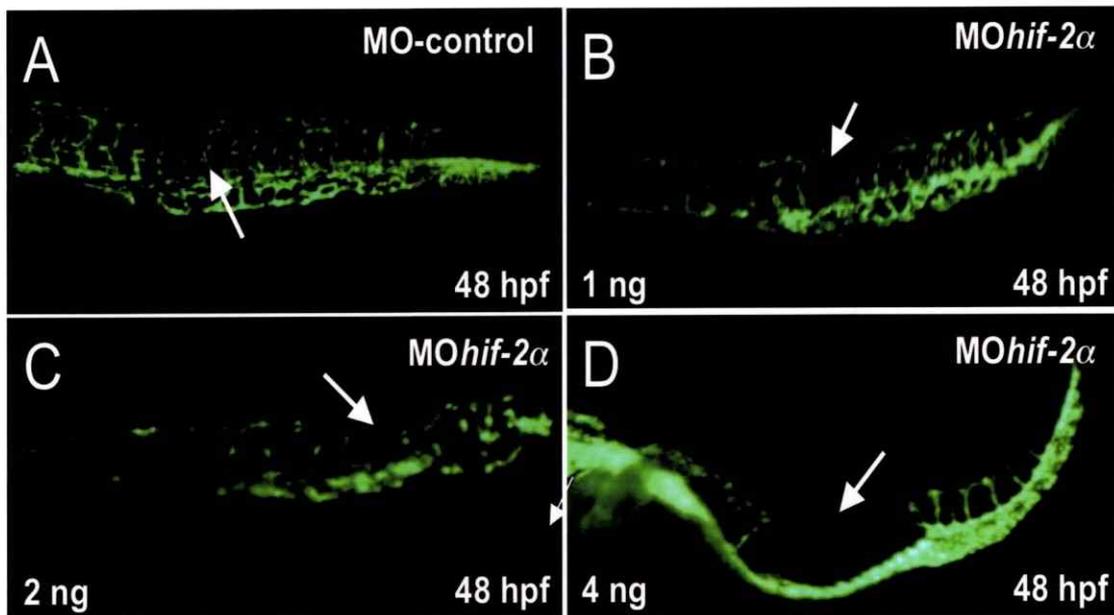


Figura 10: Falta de función de *hif-2α* afecta el desarrollo de vasos sanguíneos de manera dosis dependiente. Se microinyectaron embriones de pez cebra *tg(fli:egfp^{v1})* en estadio de 1 a 2 células con dosis crecientes de MO*hif-2α* y se observó el fenotipo a las 48 hpf. Con dosis de 1 ng/embrión se observan defectos leves en la formación de vasos intersegmentales al comparar con embriones inyectados con morpholino control (comparar flechas en A y B). Al aumentar la dosis a 2 ng/embrión, estos defectos fueron más evidentes y el número de vasos ausentes mayor (C). Al inyectar 4 ng de morpholino los defectos aumentaron, observándose la falta casi total de vasos intersegmentales en la cola y tronco.

de vasos intersegmentales, llegando en algunos casos a la ausencia total de éstos (Figura 10 C y D). Los vasos longitudinales como aorta dorsal y vena posterior caudal, no mostraron defectos aparentes por la falta de función de *hif-2α*, siendo entonces el efecto específico para vasos sanguíneos formados por angiogénesis. Estos fenotipos fueron corroborados por inmunohistoquímica contra GFP en los embriones microinyectados con 2 ng/embrión de MO*hif-2α* (Figura 11).

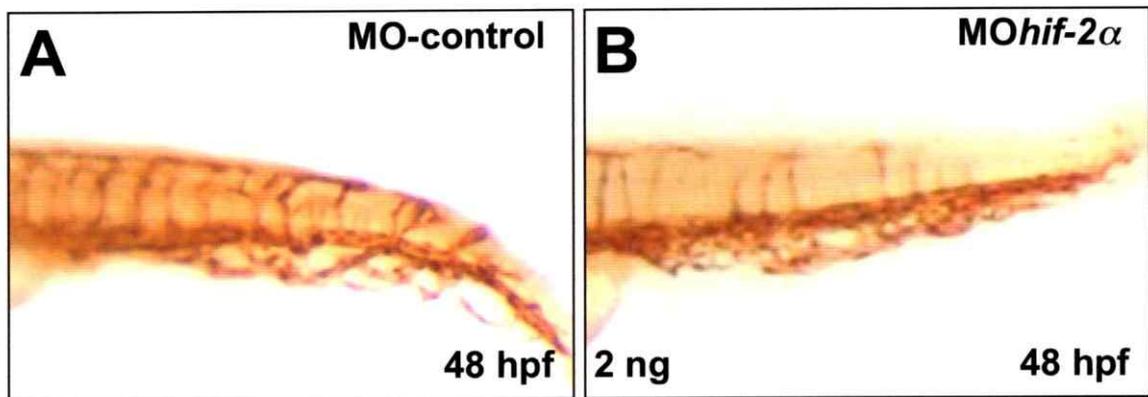


Figura 11: Inmunohistoquímica en embrión completo en embriones *tg(fli:egfp^{yl})*. Embriones microinyectados con 2 ng de MO*hif-2α* fueron analizados a las 48 hpf por inmunohistoquímica usando un anticuerpo anti-GFP. Se observa ausencia de vasos intersegmentales al comparar con embriones microinyectados con morpholino control (comparar A con B)

2.3.4.4 La inyección de MO*hif-2α* en embriones de pez cebra afecta la expresión de marcadores de vasos sanguíneos de la cola. Los resultados anteriores muestran que la falta de función de *hif-2α* estaría afectando la formación de los vasos sanguíneos, específicamente los formados por angiogénesis. Existen genes marcadores de vasos sanguíneos que son importantes la formación éstos, tales como *Vegf* y sus receptores, *Flk1* y *Flt4* (marcadores específicos de vasos sanguíneos) (Thompson y col.

1998). Dadas estas evidencias se estudió el efecto de la falta de función de *hif-2α* sobre la expresión de estos genes marcadores.

Usando hibridación *in situ* se estudió el efecto de la falta de función de *hif-2α* sobre la expresión de *flk1* y *flt4*. Los animales control mostraron que *flk1* se expresa en todos los vasos sanguíneos, mientras que *flt4* sólo se expresa en las venas, como se había descrito anteriormente (Thompson y col. 1998). Al analizar los fenotipos obtenidos por

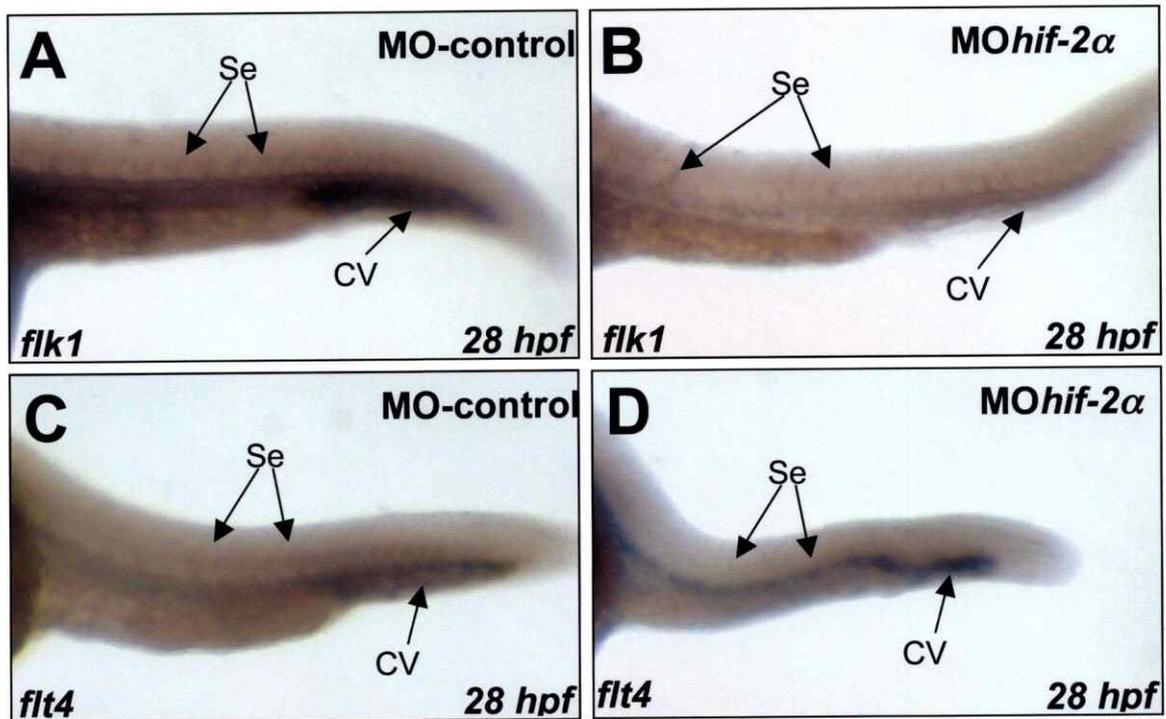


Figura 12: La falta de función de *hif-2α* afecta la expresión de genes marcadores de vasos sanguíneos. Se microinyectaron embriones de 1 a dos células con MO*hif-2α* y fueron fijados a las 28 hpf. Estos embriones fueron analizados por hibridación *in situ* y se estudió la expresión de genes marcadores de vasos sanguíneos. En embriones inyectados con morpholino se observó disminución de la expresión de *flk1* y *flt4* en vasos intersegmentales (B y D) y en el caso de *flk1*, se observó además disminución de su expresión en la vena caudal (CV en B), comparado con embriones inyectados con morpholino control (A). La región en donde se expresa *flt4* mostró un disminución, especialmente en la vena caudal (D) al comparar con embriones inyectados con morpholino control (C). Estos embriones fueron inyectados con 2-3 ng de morpholino. Se: vasos intersegmentales. CV: vena caudal.

la inyección del MO*hif-2α*, se observó que en embriones de 28 hpf inyectados con 2 ng/embrión de MO*hif-2α*, mostraron que la expresión de *flk-1* y *flt4* estaba alterada. En el caso de *flk1*, se observó disminución de su expresión en los vasos sanguíneos de la cola, tanto en los vasos longitudinales (aorta dorsal y vena posterior caudal) como en los vasos intersegmentales (Figura 12A y B). Asimismo, se observó disminución de la expresión de *flk1* en la región que irriga la vena caudal en la parte posterior de la cola. Estos fenotipos se observaron en el $51 \pm 14\%$ de los embriones inyectados ($n > 100$ embriones). En los embriones hibridados con la sonda para *flt4*, se observó también una disminución de la expresión de este marcador en los vasos intersegmentales y la región irrigada por la vena caudal mostró una menor extensión (Figura 12C y D). Este fenotipo fue observado en el $44 \pm 6\%$ de los embriones inyectados. La falta de expresión de *flk1* y *flt4* se correlaciona con lo descrito con el *knockdown* en embriones *tg(fli:egfp^{yl})*.

Finalmente, se estudió el efecto de MO*hif-2α* sobre la expresión de *Vegf*, y para ello se utilizaron las sondas *vegfl21* y *vegfl65*, isoformas de *Vegf* expresadas en pez cebra (Liang y col, 2001). En embriones de 28 hpf inyectados con 2 ng de MO*hif-2α* mostraron que la expresión de *Vegf* se encuentra alterada comparado con los controles respectivos. Para *vegfl21*, no se observó la expresión característica restringida a los vasos intersegmentales (Figura 13 A y B). Este fenotipo se observó en el $46 \pm 5\%$ de los embriones inyectados. En embriones hibridados con *vegfl65* se observó también una disminución de su expresión en vasos intersegmentales. Además se encontró que la expresión de este marcador estaba aumentada en el territorio de la vena caudal (Figura

13 C y D), donde embriones controles no presentan expresión de *vegfl65*. Este fenotipo se observó en el $56 \pm 5\%$ de los embriones inyectados.

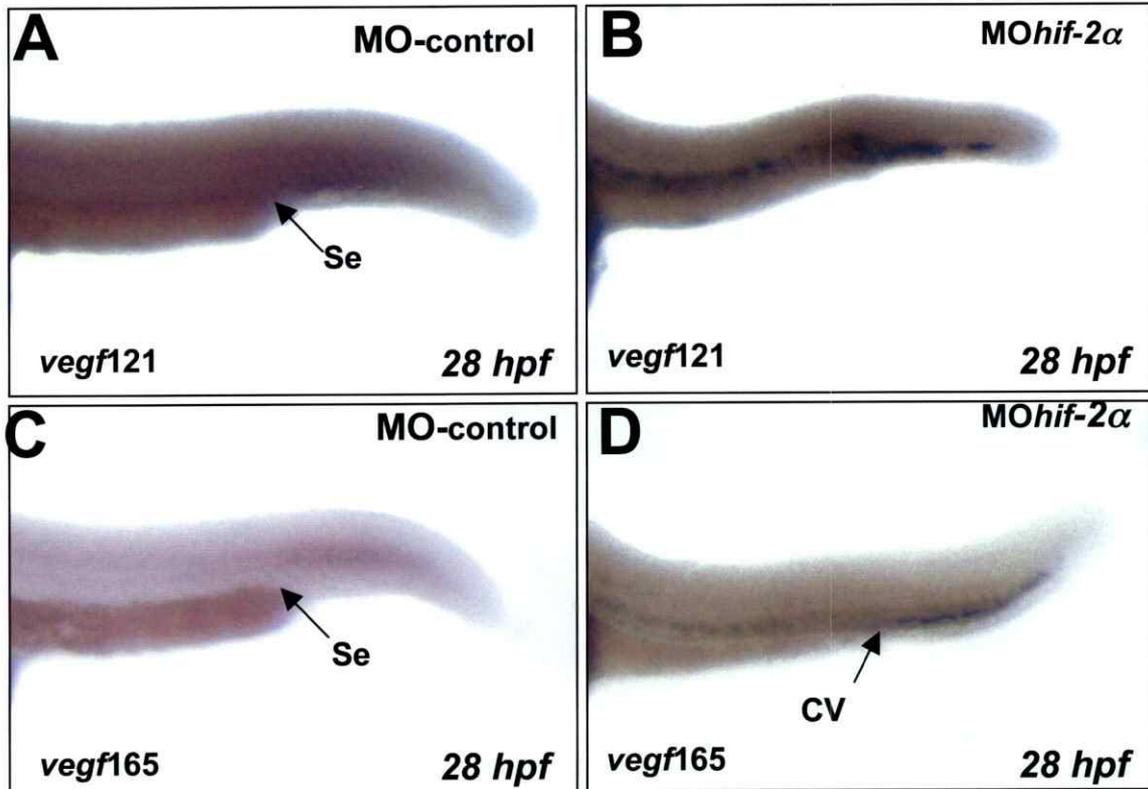


Figura 13: La falta de función de *hif-2α* afecta la expresión de *vegfl*. Se microinyectaron embriones de 1 a 2 células con MO*hif-2α* y fueron fijados a las 28 hpf. Estos embriones fueron analizados por hibridación *in situ* y se estudió la expresión de las dos isoformas de *Vegf* en pez cebra: *vegfl21* y *vegfl65*. En embriones inyectados con morpholino no se observó expresión de *vegfl21* en vasos intersegmentales (comparar A con B). En el caso de *vegfl65*, se observó disminución de su expresión en vasos intersegmentales (comparar C con D). *vegfl65* también se expresó en la vena caudal en comparación con embriones controles donde no se observó expresión (comparar D con C). Estos embriones fueron inyectados con 2 ng de morpholino. Se: vasos intersegmentales. CV: vena caudal.

2.4 DISCUSIÓN

La disponibilidad de oxígeno por las células es un factor limitante y es por eso que la adaptación de éstas o de organismos completos a un ambiente hipóxico es fundamental para su sobrevivencia. El estudio de genes que regulan esta adaptación ha sido importante en los últimos años debido a los nexos que podrían tener con patologías tales como cardiopatías y cáncer (Semenza, 2003). El factor de transcripción Hif-1 α ha sido descrito como el gen maestro en la respuesta a hipoxia, pero además se han encontrado nexos con cáncer y desarrollo (Tian y cols., 1998, Peng y cols., 2000, Compornolle y cols., 2002, Scortegagna y cols., 2003a/b, Semenza 2004). Es así como también se han encontrado proteínas homólogas a Hif-1 α , tal es el caso de Hif-2 α , que ha mostrado tener funciones mucho más específicas que Hif-1 α en el proceso de adaptación a condiciones de hipoxia (Uchida y cols., 2004).

El objetivo de esta Tesis fue caracterizar la función de Hif-2 α en el desarrollo del pez cebra, dadas las evidencias que existen al respecto (Tian y cols., 1998; Peng y cols., 2000; Compornolle y cols., 2002; Scortegagna y cols., 2003a y b). Específicamente se pensó que este factor de transcripción podría participar en la formación de los vasos sanguíneos (Peng y cols., 2000). Inicialmente se procedió a clonar el cDNA de *hif-2 α* de pez cebra, dado que aun no había sido clonado. De este modo se identificaron cuatro clones EST por homología de secuencia con los cDNAs de *hif-2 α* descritos hasta ese momento y se procedió a determinar la secuencia completa del mRNA de *hif-2 α* *in silico* para así poder tener la información necesaria para clonarlo en el laboratorio. La información deducida de la secuencia del mensajero mostró una extensión mayor a 3000

nt, indicando lo largo del mensajero. Al identificar el ORF de Hif-2 α , se encontró que codificaba una proteína de 832 aminoácidos. Estos datos correlacionan con la información de las secuencias de proteínas ortólogas, que contienen alrededor de 800 residuos aminoacídicos.

Una vez deducida la secuencia de la proteína, se caracterizó, encontrándose la presencia de todos los dominios específicos de los factores inducibles por hipoxia (HIF). Se encontraron los dominios bHLH de unión al DNA y dos dominios de dimerización (PAS-A y PAS-B); también se encontró el dominio ODDD (*oxigen-dependent degradaron domain*) y los dominios transactivadores TAD-N y TAD-C (Figura 1). Al comparar la secuencia completa de Hif-2 α deducida con las proteínas ortólogas se encontró porcentajes de identidad variable, por ejemplo con la proteína humana se encontró cerca de un 50% de identidad. No obstante, al analizar sólo las secuencias proteicas de los dominios característicos de Hif-2 α se encontró identidades sobre el 90%, demostrando que correspondían a dominios conservados y sugiriendo la conservación funcional de este factor de transcripción. Al agrupar las secuencias de proteínas ortólogas de Hif-2 α , se encontraron diferencias debido a los porcentajes de identidad de las secuencias completas, pero al analizar los datos de la Tabla 1 se observa que especies alejadas en términos de identidad de secuencia completa, tal como pez cebra y ratón, muestran conservación de los dominios funcionales, como bHLH y PAS, con valores de identidad mayor al 90%, indicando de Hif-2 α , que su regulación es similar a la de Hif-1 α (Semenza 2004). Por otra parte, la conservación de la función de este factor de transcripción también está ligada a la conservación de su estructura

genómica, 16 exones y 15 intrones, patrón que se ha mantenido en otras especies, como humano y ratón. La similitud de secuencia de las proteínas Hif de pez cebra, puede generar diferentes preguntas, por ejemplo si ambas proteínas forman familias diferentes. Para dilucidar esta problemática, se construyó un árbol filogenético con todas las secuencias disponibles en ese momento en las bases de datos para Hif-1 α y Hif-2 α . Este árbol filogenético mostró dos ramas principales, agrupando todas las secuencias de Hif-1 α en una rama o familia y las secuencias de Hif-2 α en otra diferente, indicando que ambos genes pertenecen a familias distintas; esto se confirma al encontrar que ambos genes mapean en linkage groups (LG) diferentes: LG 13 para *hif-2 α* y LG 20 para *hif-1 α* . Estos resultados deducidos a partir de estudios de secuencias, indicaron que el gen clonado era efectivamente *hif-2 α* .

El siguiente paso en la caracterización de *hif-2 α* fue estudiar su expresión, para ello se utilizaron dos aproximaciones: RT-PCR e hibridación *in situ*. La caracterización de la expresión de *hif-2 α* por RT-PCR mostró que este gen se expresa en todos los estadios del desarrollo evaluados y en tejidos adultos. Así mismo, se encontró que este gen tenía expresión materna, lo que sugiere que *hif-2 α* podría participar en procesos tempranos en el desarrollo, tal como otros genes ya descritos, cuya expresión materna regula estos procesos, por ejemplo participando en la formación de ejes en embriones de vertebrados (Howley y Ho, 2000, Reim y Brand, 2006). Todas estas observaciones de la expresión de *hif-2 α* coinciden con descripciones hechas para especies como ratón y humano (Tian y cols., 1997, Wiesener y cols., 2003, Talks y cols., 2004).

Posteriormente, usando la técnica de hibridación *in situ* de embrión completo, se determinó la expresión de *hif-2α* en embriones y larvas de pez cebra. Para esto se diseñó una sonda de 814 pb específica contra una región de *hif-2α* que tuviera un mínimo de identidad con *hif-1α*, debido a la conservación de los dominios funcionales de HIF. La región utilizada para el diseño de esta sonda fue el extremo carboxilo terminal, región donde menor es la identidad entre ambos mRNAs. La hibridización *in situ* mostró expresión en todos los estadios analizados, confirmándose que este gen tiene expresión materna. También se encontró expresión ubicua hasta las 10 hpf. A las 18 hpf la expresión se restringió hacia ventral. En estadios posteriores a 24 hpf se observó mayor expresión en la cabeza, como en los ventrículos, pero en general no se observaron regiones específicas, aunque de todas maneras se sugiere que *hif-2α* tendría una función en el desarrollo de este territorio, lo que no está descrito en la literatura. También se observó expresión en notocorda a partir de las 48 hpf, sugiriendo que la función que tendría *hif-2α* en notocorda sería, por lo tanto tardía dado que la notocorda ya se encuentra formada en este estadio (Talbot y cols. 1995). Se sabe que la notocorda juega un papel importante en la formación de los vasos longitudinales del pez cebra (aorta dorsal y vena posterior caudal), debido a la expresión de sonic hedgehog (*Shh*), un morfógeno que estimula la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (*Vegf*) en los somitos (Lawson y col, 2002), induciendo la diferenciación arterial y cuyo efecto aún se puede apreciar en el estadio de 48 hpf, aunque los vasos longitudinales son los primeros que se forman, a las 24 hpf (Isogai y col, 2003). Por tanto esta observación sugiere que *hif-2α* no tendría una función en la formación de la notocorda ni de los

vasos longitudinales en el pez cebra, no obstante, la expresión tardía de *hif-2α* en esta estructura sugiere que su expresión podría estar asociada a la formación de los vasos que se forman más tardíamente.

De acuerdo a lo descrito en nuestro laboratorio (Rojas y col. 2007), la expresión de *hif-1α* y *hif-2α* son complementarias en diferentes estadios. En estadios anteriores a 48 hpf sólo se expresa *hif-1α* en la notocorda, mientras que a las 48 hpf se reprime la expresión del mRNA de *hif-1α* y se expresa *hif-2α*. Esta observación corrobora el hecho que estos genes pueden tener funciones complementarias, pero no necesariamente redundantes. En este sentido, la diferencia de fenotipos observada entre los modelos *knockout* de *hif-1α* y de *hif-2α*, sugieren que las funciones de estos genes son no-redundantes (Iyer y cols. 1998, Ryan y cols. 1998, Tian y cols. 1998, Peng y cols. 2000, Comperolle y cols. 2002, Scortegagna y cols. 2003a/b). Existen evidencias adicionales que indican que estos genes podrían tener una función complementaria, como se ha descrito en modelos murinos embrionarios deficientes de Arnt (*Arnt^{-/-}*), que muestran que tanto *hif-1α* como *hif-2α* son necesarios para la formación de la placenta y para el desarrollo normal del trofoblasto (Cowden Dahl y cols. 2005). No obstante, en líneas tumorales como las de carcinoma renal (RCC) se ha descrito que genes pro-tumorales como algunos factores de crecimiento, son regulados positivamente por Hif-2α, mientras que genes proapoptóticos son regulados positivamente por Hif-1α y negativamente por Hif-2α, mostrando funciones específicas y algunas veces opuestas para ambos genes (Raval y cols. 2005).

En estadios tardíos del desarrollo del pez cebra se observó expresión de *hif-2α* en vasos sanguíneos, a partir de las 24 hpf. Esta observación sugiere que este factor de transcripción podría tener una función importante en el desarrollo de éstos, como ocurre en ratón (Tian y cols. 1998, Peng y cols. 2000, Compernelle y cols. 2002). Como se menciona más arriba, el proceso de formación de vasos sanguíneos está modulado por *vegf* y está descrito que el gen de *vegf* es blanco transcripcional de Hif-1α (Forsythe y cols., 1996). Existen evidencias que en la región promotora de *vegf* se encuentran sitios HRE (*hypoxia-responsive elements*) a los cuales, Hif-2α se une al igual que Hif-1α *in vitro* (Ema y cols. 1997). Por este motivo se podría esperar que Hif-2α también fuera capaz de modular la expresión de *vegf in vivo*. Por otra parte, estudios de microarray en células HEK293T han mostrado que *vegf* es inducido positivamente por Hif-2α, además de Hif-1α (Wang y cols. 2005).

Los resultados obtenidos por hibridación *in situ* coinciden con lo descrito en trabajos reportados en embriones de ratón (Jain y cols. 1998), mostrando un patrón de expresión acotado a territorios específicos en los embriones y en tejidos adultos (Tian y cols. 1997). Este hecho significó diferenciar a *hif-2α* de *hif-1α*, cuya expresión es más amplia, lo que dio pie a la búsqueda de funciones que tendrían ambos genes en la regulación de la respuesta a hipoxia. Como ya se mencionó, existe similitud en la estructura y función de Hif-1α y Hif-2α, y probablemente en su regulación, por este motivo es importante dilucidar si existen funciones específicas o compartidas entre estos factores.

En este sentido, una vez determinado el patrón de expresión de *hif-2α*, se procedió a estudiar su función usando la técnica de falta de función. Para ésto se diseñó un oligonucleótido antisentido (morpholino) específico contra la región del ATG de *hif-2α*. Para confirmar la especificidad sobre *hif-2α*, se alineó la secuencia diseñada del morpholino de *hif-2α* con la región el mRNA de *hif-1α* donde se observó identidad en sólo 7 nt, indicando que la secuencia del morpholino era específica para *hif-2α*. Otro experimento sugerido para confirmar la especificidad del morpholino es realizar un western blot contra Hif-1α y determinar que los niveles de esta proteína no disminuyen en embriones microinyectados con morpholino de *hif-2α*.

Al microinyectar dosis crecientes de morpholino MO*hif-2α* en embriones de pez cebra, se observó una disminución en la tasa de sobrevivencia en función del aumento de la dosis del morpholino, indicando que la falta de función de *hif-2α* era letal en los embriones, lo que es avalado por la letalidad observada en modelos de ratones knockout (Tian y cols., 1998, Peng y cols., 2000, Compennolle y cols., 2002). No obstante, una de las ventajas de la utilización de morpholinos es la posibilidad de modificar la dosis inyectada para obtener fenotipos menos agresivos o leves. Al utilizar dosis de 2 ng de morpholino/embrión, se observó una tasa de mortalidad cercana al 30%, siendo esta dosis la utilizada en la mayoría de los experimentos de función. Utilizando las dosis sub-letales de morpholinos se observaron fenotipos de defectos en la morfología general, mostrando curvatura del embrión y falta casi completa de la cola, igualmente se observaron defectos en la morfología de la cabeza. Estos fenotipos se observaron a partir de las 24 hasta 48 hpf. Asimismo, los fenotipos observados por la falta de función de *hif-*

2α mostraron ser dependientes de las dosis microinyectadas. Estos resultados indican que Hif- 2α podría estar participando en el proceso de estructuras como la cola, sin embargo, se requiere de más estudios para confirmar esta afirmación.

Hasta ahora nuestros resultados indican por primera vez que Hif- 2α estaría participando en la formación de vasos sanguíneos en pez cebra, no obstante, estas evidencias no son concluyentes. De este modo se decidió estudiar el efecto de la falta de función de *hif-2 α* en el desarrollo de los vasos sanguíneos del pez cebra. Para ello se utilizó la línea de peces transgénicos *tg(fli:egfp^{y1})*, que expresan GFP específicamente en células endoteliales bajo el control del factor de transcripción Fli1 (Lawson y Weinstein 2002), modelo que ha sido ampliamente utilizado para estudiar la formación de vasos sanguíneos (Gray y cols., 2007; Kinna y cols., 2006). Con este modelo fue posible visualizar inmediatamente el efecto de la inyección del morpholino de *hif-2 α* sobre la formación de los vasos sanguíneos. Al estudiar el fenotipo de los embriones inyectados con el morpholino de *hif-2 α* se observaron los mismos efectos morfológicos descritos anteriormente y al mismo tiempo fue posible determinar que se presentaban defectos en la formación de vasos sanguíneos, indicando que *hif-2 α* efectivamente participaría en este proceso. Interesantemente, los vasos sanguíneos afectados por la falta de función de *hif-2 α* , fueron específicamente los vasos intersegmentales, observándose ausencia de estos en los embriones knockdown de *hif-2 α* . Este efecto mostró también ser dosis dependiente.

El hecho de que el efecto sobre la formación de vasos sanguíneos sea exclusivamente a nivel de los vasos intersegmentales sugiere que *hif-2 α* estaría

participando en algún paso de la vía de angiogénesis, ya que estos vasos son formados por este mecanismo, al igual que los capilares en mamíferos (Risau y cols. 1997; Childs y cols. 2002).

Para corroborar que la falta de función de Hif-2 α afecta la formación de vasos sanguíneos, se analizó la expresión de genes marcadores de la formación de vasos como son *vegf*, *flk-1* y *flt4*. Todos éstos se expresan específicamente en el sistema vascular y han sido descritos como genes esenciales en los procesos de angiogénesis y vasculogénesis (Habeck y col, 2002, Lawson y cols., 2006). El análisis de estos marcadores mostró que todos presentaban expresión alterada en los vasos intersegmentales, en los embriones inyectados con el morpholino de *hif-2 α* , mostrando una clara disminución de su expresión. De igual forma, se observó alteraciones en la expresión de estos marcadores en vasos longitudinales, como la vena caudal (Figura 11), mostrando aumento del territorio de expresión de estos marcadores. Al analizar el patrón de expresión de las isoformas de *vegf* en la vena caudal, que muestran un claro aumento en su expresión, se observan varias regiones punteadas que al parecer no serían parte de la vena caudal. Al comparar con patrones de expresión similares, tal como el marcador *ikaros*, es probable que sean hemangioblastos (Patterson y cols. 2005). De acuerdo a estudios reportados en pez cebra, el defecto principal descrito en los mutantes de *flk-1* es la ausencia de vasos intersegmentales, similar a lo observado en los embriones morfantes de *hif-2 α* (Habeck y col, 2002). En estos mismo mutantes se observaron defectos en la expresión de las isoformas de *vegf* en pez cebra, *vegf121* y *vegf165*, un gen esencial para la formación de los vasos sanguíneos, en especial durante la

angiogénesis. Como ambas isoformas se vieron afectadas en los embriones inyectados con el morpholino de *hif-2 α* se puede deducir que Hif-2 α estaría río arriba de *vegf*. Anteriormente se describió que Hif-1 α también era capaz de afectar la expresión de *vegf* y como experimentos futuros se podría estudiar si esta proteína es capaz de actuar sinérgicamente con Hif-2 α o incluso si puede rescatar en parte su función. Para resolver esta interrogante se debería diseñar un experimento donde se rescate la falta de función de *hif-2 α* con el mensajero de *hif-1 α* y viceversa.

Respecto al solapamiento de funciones entre ambos factores HIF, hasta ahora no existen evidencias que la función de Hif-1 α sea compensada por Hif-2 α , observándose en estudios *in vitro* en células tratadas con RNAs de interferencia específicos contra HIF-1 α , que la expresión de genes inducidos por hipoxia no es afectada por HIF-2 α y viceversa (Hu y cols., 2003, Sowter y cols., 2003). Por otra parte, sólo se ha encontrado que Hif-2 α puede unirse a sitios HRE en el promotor de *Vegf* por medio de ensayos de EMSA, en modelo de ratón, donde se sugiere que esta unión podría ser funcional *in vivo* (Ema y col, 1997), lo que aún no ha sido corroborado *in vivo*.

De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo se puede concluir que *hif-2 α* estaría participando en el desarrollo del pez cebra, dada las evidencias que existen al respecto por trabajos en ratones K.O. y dada la baja tasa de sobrevivencia que se encuentra al microinyectar embriones con dosis de 2 ng/embrión de morpholino de *hif-2 α* , es probable que este factor de transcripción juegue un papel importante en alguno de los mecanismos que definen el desarrollo temprano del pez cebra. Adicionalmente, a partir de los estudios de falta de función con dosis menores de morpholino de *hif-2 α* se podría

plantear que es probable que éste factor participe en el proceso de angiogénesis, dado por los defectos observados en los vasos intersegmentales y que además muestran defectos similares a los reportados en el mutante de *flkl* (Habeck y col, 2002).

Los resultados discutidos hasta el momento confirman la hipótesis planteada para esta Tesis, sin embargo, sería interesante estudiar la función de Hif-1 α en la formación de los vasos sanguíneos en pez cebra y estudiar el posible efecto sinérgico que podría tener actuando con Hif-2 α . Hasta ahora tenemos evidencias que la falta de función de Hif-1 α también afecta el desarrollo de vasos sanguíneos y además está descrito que también se expresa a nivel de mensajero en vasos sanguíneos durante el desarrollo del pez cebra (Rojas y col, 2007, datos no publicados). Otro punto importante a considerar es el mecanismo de acción de estos factores de transcripción, que son activos solo si dimerizan con Hif-1 β , por lo que la expresión del mensajero no indica necesariamente que sean activos en los tejidos en que se expresan. Para ello en nuestro laboratorio se están diseñando anticuerpos contra Hif-1 α y Hif-2 α de pez cebra, que serán de gran utilidad para estudios futuros.

Hasta ahora se ha discutido el efecto de la falta de función de *hif-2 α* sobre la formación de vasos sanguíneos, un evento tardío en el desarrollo del pez cebra (Childs y cols. 2002), pero además se deben considerar los eventos tempranos que definen los territorios que darán origen a los precursores de los vasos sanguíneos (Childs y cols. 2002). Para ello es necesario realizar más experimentos de falta de función, utilizando genes marcadores que participen en eventos tempranos del desarrollo y corroborar

algunos resultados no mostrados en este trabajo que indicarían alteración de algunos marcadores tempranos del desarrollo del pez cebra.

2.5 CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos y en relación a la hipótesis planteada, se puede concluir que *hif-2 α* participa en el desarrollo del pez cebra y en la formación de los vasos sanguíneos. Al mismo tiempo es necesario realizar experimentos de rescate del fenotipo morfante de *hif-2 α* . Por otra parte, es necesario confirmar si los fenotipos observados en la formación de los vasos sanguíneos son consecuencia de eventos tempranos del desarrollo. Asimismo cabe destacar que debido a lo poco que se sabe de la función de *hif-2 α* en el desarrollo, el pez cebra sería un buen modelo de estudio, lo que permitiría dilucidar funciones de *hif-2 α* que no son posibles de estudiar en otros modelos como knockout o cultivos celulares.

2.6 BIBLIOGRAFÍA

Childs S, Chen JN, Garrity DM, Fishman MC. 2002. Patterning of angiogenesis in the zebrafish embryo. *Development*. 129, 973-82.

Chilov D, Camenisch G, Kvietikova I, Ziegler U, Gassmann M, Wenger RH. 1999. Induction and nuclear translocation of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1): heterodimerization with ARNT is not necessary for nuclear accumulation of HIF-1alpha. *J Cell Sci*. 112, 1203-12.

Compernelle V, Brusselmans K, Acker T, Hoet P, Tjwa M, Beck H, Plaisance S, Dor Y, Keshet E, Lupu F, Nemery B, Dewerchin M, Van Veldhoven P, Plate K, Moons L, Collen D, Carmeliet P. 2002. Loss of HIF-2alpha and inhibition of VEGF impair fetal lung maturation, whereas treatment with VEGF prevents fatal respiratory distress in premature mice. *Nat Med*. 8, 702-10. Erratum in: *Nat Med* 2002. 8, 1329.

Cowden Dahl KD, Fryer BH, Mack FA, Compernelle V, Maltepe E, Adelman DM, Carmeliet P, Simon MC. 2005. Hypoxia-inducible factors 1alpha and 2alpha regulate trophoblast differentiation. *Mol Cell Biol*. 25, 10479-91.

Ema M, Taya S, Yokotani N, Sogawa K, Matsuda Y, Fujii-Kuriyama Y. 1997. A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1alpha regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94, 4273-8.

Flamme I, Frohlich T, von Reutern M, Kappel A, Damert A, Risau W. 1997. HRF, a putative basic helix-loop-helix-PAS-domain transcription factor is closely related to hypoxia-inducible factor-1 alpha and developmentally expressed in blood vessels. *Mech Dev*. 63, 51-60.

Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD, Semenza GL. 1996. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol*. 16, 4604-13.

Fukuda R, Hirota K, Fan F, Jung YD, Ellis LM, Semenza GL. 2002. Insulin-like growth factor 1 induces hypoxia-inducible factor 1-mediated vascular endothelial growth factor expression, which is dependent on MAP kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signaling in colon cancer cells. *J Biol Chem*. 277, 38205-11.

Gothie E, Richard DE, Berra E, Pages G, Pouyssegur J. 2000. Identification of alternative spliced variants of human hypoxia-inducible factor-1alpha. *J Biol Chem*. 275, 6922-7.

Gray C, Packham IM, Wurmser F, Eastley NC, Hellewell PG, Ingham PW, Crossman DC, Chico TJ. 2007. Ischemia is not required for arteriogenesis in zebrafish embryo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 27(10):2135-41.

Gu YZ, Hogenesch JB, Bradfield CA. 2000. The PAS superfamily: sensors of environmental and developmental signals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 40, 519-61. Review.

Gustafsson MV, Zheng X, Pereira T, Gradin K, Jin S, Lundkvist J, Ruas JL, Poellinger L, Lendahl U, Bondesson M. 2006. Hypoxia requires notch signaling to maintain the undifferentiated cell state. *Dev Cell.* 9, 617-28.

Habeck H, Odenthal J, Walderich B, Maischein H, Schulte-Merker S; Tubingen 2000 screen consortium. 2002. Analysis of a zebrafish VEGF receptor mutant reveals specific disruption of angiogenesis. *Curr Biol.* 12, 1405-12.

Heidbreder M, Fröhlich F, Jöhren O, Dendorfer A, Qadri F and Dominiak P. 2003. Hypoxia rapidly activates HIF-3 α mRNA expression. *The FASEB Journal.* 17, 1541-1543.

Hogenesch JB, Chan WK, Jackiw VH, Brown RC, Gu YZ, Pray-Grant M, Perdew GH, Bradfield CA. 1997. Characterization of a subset of the basic-helix-loop-helix-PAS superfamily that interacts with components of the dioxin signaling pathway. *J Biol Chem.* 272, 8581-93.

Howley C, Ho RK. 2000. mRNA localization patterns in zebrafish oocytes. *Mech Dev.* 92, 305-9.

Hu CJ, Wang LY, Chodosh LA, Keith B, Simon MC. 2003. Differential roles of hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) and HIF-2 α in hypoxic gene regulation. *Mol Cell Biol.* 23, 9361-74.

Huang, L.E., Gu, J., Schau, M. and Bunn, H.F. 1998. Regulation of hypoxia-inducible factor 1 α is mediated by an O₂-dependent degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95, 7987-7992.

Isogai S, Horiguchi M, Weinstein BM. 2001. The vascular anatomy of the developing zebrafish: an atlas of embryonic and early larval development. *Dev Biol.* 230, 278-301.

Isogai S, Lawson ND, Torrealday S, Horiguchi M, Weinstein BM. 2003. Angiogenic network formation in the developing vertebrate trunk. *Development.* 130, 5281-90.

Iyer NV, Kotch LE, Agani F, Leung SW, Laughner E, Wenger RH, Gassmann M, Gearhart JD, Lawler AM, Yu AY, Semenza GL. 1998. Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 α . *Genes Dev.* 12, 149-62.

Jain S, Maltepe E, Lu MM, Simon C, Bradfield CA. 1998. Expression of ARNT, ARNT2, HIF1 alpha, HIF2 alpha and Ah receptor mRNAs in the developing mouse. *Mech Dev.* 73, 117-23.

Jeong, J.W., Bae, M.K., Ahn, M.Y., Kim, S.H., Sohn, T.K., Bae, M.H., Yoo, M.A., Song, E.J., Lee, K.J. and Kim, K.W. 2002. Regulation and destabilization of HIF-1alpha by ARD1-mediated acetylation. *Cell.* 111, 709-720.

Kajimura S, Aida K, Duan C. 2005. Insulin-like growth factor-binding protein-1 (IGFBP-1) mediates hypoxia-induced embryonic growth and developmental retardation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102, 1240-5.

Kajimura S, Aida K, Duan C. 2006. Understanding hypoxia-induced gene expression in early development: in vitro and in vivo analysis of hypoxia-inducible factor 1-regulated zebra fish insulin-like growth factor binding protein 1 gene expression. *Mol Cell Biol.* 26, 1142-55.

Kewley RJ, Whitelaw ML y Chapman-Smith A. 2004 The mammalian basic helix-loop-helix/PAS family of transcriptional regulators. *Int J Biochem Cell Biol.* 36, 189-204. Review.

Kinna G, Kollé G, Carter A, Key B, Lieschke GJ, Perkins A, Little MH. 2006. Knockdown of zebrafish *crim1* results in a bent tail phenotype with defects in somite and vascular development. *Mech Dev,* 123(4):277-87.

Kress S, Stein A, Maurer P, Weber B, Reichert J, Buchman A, Huppert P and Schwarz M. 1998. Expression of hypoxia-inducible genes in tumor cells. *J Cancer Res Clin Oncol.* 124, 315-320.

Lando D, Pongratz I, Poellinger L, Whitelaw ML. 2000. A redox mechanism controls differential DNA binding activities of hypoxia-inducible factor (HIF) 1alpha and the HIF-like factor. *J Biol Chem.* 275, 4618-27.

Lando, D., Peet, D.J., Gorman, J. J., Whelan, D.A., Whitelaw, M.L. and Bruick, R.K. 2002. FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes Dev.* 16, 1466-1471.

Lawson ND, Weinstein BM. 2002. In vivo imaging of embryonic vascular development using transgenic zebrafish. *Dev Biol.* 248, 307-18.

Lawson ND, Vogel AM, Weinstein BM. 2002. *sonic hedgehog* and *vascular endothelial growth factor* act upstream of the Notch pathway during arterial endothelial differentiation. *Dev Cell.* 3, 127-36.

Lee JW, Bae SH, Jeong JW, Kim SH and Kim KW. 2004. Hypoxia-inducible factor (HIF-1) α : its protein stability and biological functions. *Exp Mol Med.* 36, 1-12.

- Li YX, Zdanowicz M, Young L, Kumiski D, Leatherbury L, Kirby ML.** 2003. Cardiac neural crest in zebrafish embryos contributes to myocardial cell lineage and early heart function. *Dev Dyn.* 226, 540-50.
- Liang D, Chang JR, Chin AJ, Smith A, Kelly C, Weinberg ES, Ge R.** 2001. The role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in vasculogenesis, angiogenesis, and hematopoiesis in zebrafish development. *Mech Dev.* 108, 29-43.
- Makino Y, Kanopka A, Wilson WJ, Tanaka H, Poellinger L.** 2002. Inhibitory PAS domain protein (IPAS) is a hypoxia-inducible splicing variant of the hypoxia-inducible factor-3alpha loci. *J. Biol Chem.* 277, 32405-8.
- Masson, N., William, C., Maxwell, P.H., Pugh, C.W. and Ratcliffe P.J.** 2001. Independent function of two destruction domain of hypoxia-inducible factor 1 alpha chains activated by prolyl hydroxylation. *EMBO J.* 20, 5197-5206.
- Mazure N, Brahim-Horn MC, Berta MA, Benizri E, Bilton R, Dayan F, Ginouvès A, Berra E and Pouyssegur J.** 2004. HIF-1: master and commander of the hypoxic world. A pharmacological approach to its regulation by siRNAs. *Bioch. Pharm.* 68, 971-980.
- Ohh, M., Park, C.W., Ivan, M., Hoffman, M.A., Kim, T.Y., Huang, L.E., Pavletich, N., Chau, V. and Kaelin, W.G.** 2000. Ubiquitination of hypoxia-inducible factor requires direct binding to beta-domain of the von Hippel-Lindau protein. *Nat Cell Biol.* 2, 423-427.
- O'Rourke JF, Tian YM, Ratcliffe PJ, Pugh CW.** 1999. Oxygen-regulated and transactivating domains in endothelial PAS protein 1: comparison with hypoxia-inducible factor-1alpha. *J Biol Chem.* 274, 2060-71.
- Patterson LJ, Gering M, Patient R.** 2005. Scl is required for dorsal aorta as well as blood formation in zebrafish embryos. *Blood.* 105, 3502-11.
- Paul S, Simons J and Mabeesh N.** 2004. HIF at the crossroads between ischemia and carcinogenesis. *J Cell Physiol.* 200, 20-30.
- Peng, J., Zhang, L., Drysdale, L. and Fong, G.H.** 2000. The transcription factor EPAS-1/hypoxia inducible factor 2alpha plays an important role in vascular remodeling. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97, 8386-8391.
- Pouyssegur J, Dayan F, Mazure NM.** 2006. Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature.* 441, 437-43. Review.
- Pugh CW, O'Rourke JF, Nagao M, Gleadle JM and Ratcliffe PJ.** 1997. Activation of hypoxia-inducible factor; definition of regulatory domains within the α subunit. *J Biol Chem.* 272, 11205-11214.
- Pugh CW and Ratcliffe P.** 2003. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat Med.* 9, 677-684.

Raval RR, Lau KW, Tran MG, Sowter HM, Mandriota SJ, Li JL, Pugh CW, Maxwell PH, Harris AL, Ratcliffe PJ. 2005. Contrasting properties of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and HIF-2 in von Hippel-Lindau-associated renal cell carcinoma. *Mol Cell Biol.* 25, 5675-86.

Reim G, Brand M. 2006. Maternal control of vertebrate dorsoventral axis formation and epiboly by the POU domain protein Spg/Pou2/Oct4. *Development.* 133(14):2757-70.

Richard DE, Berra E, Pouyssegur J. 2000. Nonhypoxic pathway mediates the induction of hypoxia-inducible factor 1alpha in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 275, 26765-71.

Risau W. 1997. Mechanisms of angiogenesis. *Nature.* 386, 671-4. Review.

Rojas DA, Perez-Munizaga DA, Centanin L, Antonelli M, Wappner P, Allende ML y Reyes AE. 2007. Cloning of hif-1 α and hif-2 α and mRNA expression pattern during development in zebrafish. *Gene Expr Patterns.* 3, 339-45.

Roman BL y Weinstein BM. 2000. Building the vertebrate vasculature: research is going swimmingly. *Bioessays.* 22, 882-93. Review.

Ryan HE, Lo J, Johnson RS. 1998. HIF-1 alpha is required for solid tumor formation and embryonic vascularization. *EMBO J.* 17, 3005-15.

Scortegagna M, Morris MA, Oktay Y, Bennett M, Garcia JA. 2003. The HIF family member EPAS1/HIF-2alpha is required for normal hematopoiesis in mice. *Blood.* 02, 1634-40.

Scortegagna M, Ding K, Oktay Y, Gaur A, Thurmond F, Yan LJ, Marck BT, Matsumoto AM, Shelton JM, Richardson JA, Bennett MJ, Garcia JA. 2003. Multiple organ pathology, metabolic abnormalities and impaired homeostasis of reactive oxygen species in Epas1^{-/-} mice. *Nat Genet.* 35, 331-40.

Semenza GL, Jiang BH, Leung SW, Passantino R, Concordet JP, Maire P, Giallongo A. 1996. Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem.* 271, 32529-37.

Semenza GL., 1999. Regulation of mammalian O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 15, 551-78.

Semenza G.L., 2003. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 3, 721-732.

Semenza GL. 2004. Hydroxylation of HIF-1: oxygen sensing at the molecular level (Review). *Physiology.* 19, 176-182.

- Sowter HM, Raval RR, Moore JW, Ratcliffe PJ, Harris AL.** 2003. Predominant role of hypoxia-inducible transcription factor (Hif)-1alpha versus Hif-2alpha in regulation of the transcriptional response to hypoxia. *Cancer Res.* 63, 6130-4.
- Takeda N, Maemura K, Imai Y, Harada T, Kawanami D, Nojiri T, Manabe I, Nagai R.** 2004. Endothelial PAS domain protein 1 gene promotes angiogenesis through the transactivation of both vascular endothelial growth factor and its receptor, Flt-1. *Circ Res.* 95, 146-53.
- Talbot WS, Trevarrow B, Halpern ME, Melby AE, Farr G, Postlethwait JH, Jowett T, Kimmel CB, Kimelman D.** 1995. A homeobox gene essential for zebrafish notochord development. *Nature.* 378, 150-7.
- Talks, K.L., Turley, H., Gatter, K.C., Maxwell, P.H., Pugh, C.W., Ratcliffe, P.J. and Harris, A.L.** 2000. The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages. *Am J Pathol* 157, 411-42.
- Thompson MA, Ransom DG, Pratt SJ, MacLennan H, Kieran MW, Detrich HW 3rd, Vail B, Huber TL, Paw B, Brownlie AJ, Oates AC, Fritz A, Gates MA, Amores A, Bahary N, Talbot WS, Her H, Beier DR, Postlethwait JH, Zon LI.** 1998. The cloche and spadetail genes differentially affect hematopoiesis and vasculogenesis. *Dev Biol.* 197, 248-69.
- Tian H, McKnight SL, Russell DW.** 1997. Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes Dev.* 11, 72-82.
- Tian H, Hammer RE, Matsumoto AM, Russell DW, McKnight SL.** 1998. The hypoxia-responsive transcription factor EPAS1 is essential for catecholamine homeostasis and protection against heart failure during embryonic development. *Genes Dev.* 12, 3320-4.
- Ton C, Stamatiou D. y Liew C.** 2003. Gene expression profile of zebrafish exposed to hypoxia during development. *Physiol Genomics.* 13, 97-106.
- Uchida T, Rossignol F, Matthay MA, Mounier R, Couette S, Clottes E and Clerice C.** 2004. Prolonged hypoxia differentially regulates hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α and HIF-2 α expression in lung epithelial cells. *J Biol Chem.* 279, 14871-14878.
- Wang, GL y Semenza, GL.** 1995. Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem.* 270, 1230-1237.
- Wiesener MS, Jurgensen JS, Rosenberger C, Scholze CK, Horstrup JH, Warnecke C, Mandriota S, Bechmann I, Frei UA, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Bachmann S, Maxwell PH, Eckardt KU.** 2003. Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-2alpha in distinct cell populations of different organs. *FASEB J.* 17, 271-3.