

UCH-FC
Biotecnología
P 438
C.1



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS

CLONAMIENTO, EXPRESIÓN Y FALTA DE FUNCIÓN DE *hif-1 α*
EN EL DESARROLLO EMBRIONARIO DE PEZ CEBRA.

MEMORIA DE TÍTULO
ENTREGADA A LA UNIVERSIDAD DE CHILE
EN CUMPLIMIENTO PARCIAL DE LOS REQUISITOS
PARA OPTAR AL GRADO DE:



INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR

POR

DANIELA ANDREA PÉREZ MUNIZAGA

Agosto, 2008

Santiago-Chile

DIRECTOR DE TESIS:

DR. ARIEL EDUARDO REYES ZAMBRANO

PATROCINANTE:

DR. MIGUEL ALLENDE



**FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE**

**INFORME DE APROBACION
MEMORIA DE TÍTULO**

Se informa a la Escuela de la Facultad de Ciencias que la Memoria de título presentada por el candidato.

DANIELA ANDREA PÉREZ MUNIZAGA

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la Memoria de Título como requisito para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular, en el examen de Defensa rendido el día , agosto 2008.

Director de Tesis:
Dr. Ariel Reyez Z.

Ariel Reyez Z.
.....

Patrocinante
Dr. Miguel Allende C.

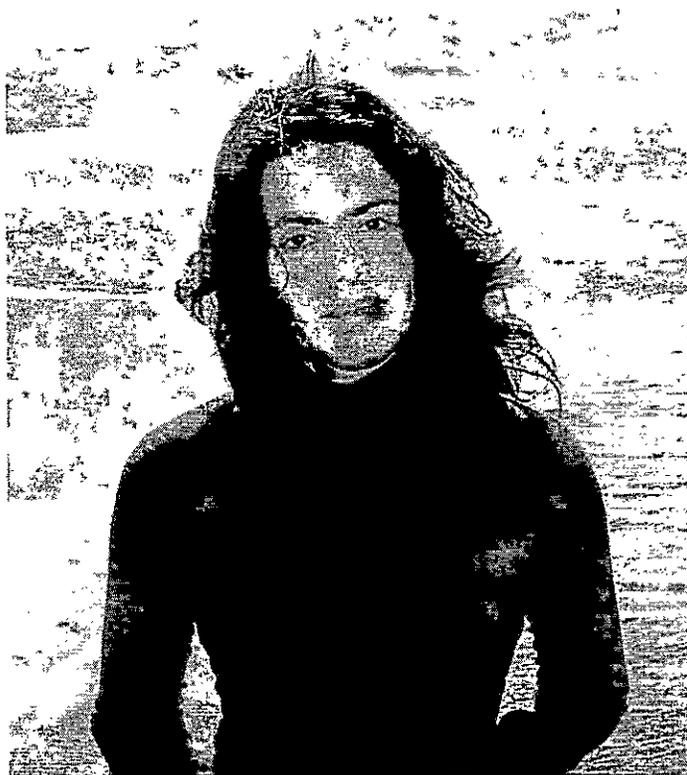
Miguel Allende
.....

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Alvaro Glavic
Dr. Verónica Palma

[Signature]
.....
.....





Mi nombre es Daniela Andrea Pérez Munizaga, nací el 7 de noviembre de 1981. Desde muy pequeña la naturaleza y su entorno me llamaron la atención y sobretodo averiguar el porqué ocurren las cosas. Con el transcurrir de los años y un buen rendimiento en mi época escolar tuve la oportunidad de estudiar Ingeniería en Biotecnología Molecular con una beca de excelencia en la Universidad de Chile. Esta maravillosa oportunidad me ha permitido desarrollarme tanto en lo personal como en lo profesional.

“La vida a veces nos pone obstáculos... no importa cuántos sean... lo importante es saber enfrentarlos, superarlos, salir adelante y siempre pensar positivo”.

AGRADECIMIENTOS

Sin duda estos últimos meses han sido los más intensos de mi vida, lejos los de mayor crecimiento personal y desafíos profesionales.

Quisiera dar las gracias a todos los que me acompañaron en esta etapa, en especial a D. Salinas, mi partner de deporte y consejero; Verónica Codelia por ser una excelente amiga y a Marcelo Chacón por sus observaciones en el escrito.

A toda mi familia, a mi hermano que lo quiero demasiado, mi papá y a MI MAMA.... siempre fue y será mi ángel sin importar la distancia.

Mami esto es para ti. Te AMO mucho.

También quisiera agradecer a mi tutor Ariel Reyes por ser un excelente guía, las estadías a Congresos, su enorme espíritu crítico y sobretodo su paciencia; y al Dr. Miguel Allende por haberme permitido realizar la Tesis fuera de la Universidad.

Finalmente, al proyecto Fondecyt 1060441 por el financiamiento de este trabajo.



INDICE GENERAL



INDICE GENERAL	IV
INDICE DE FIGURAS	VI
INDICE DE TABLAS	VII
SIMBOLOS Y ABREVIATURAS	VIII
RESUMEN	X
ABSTRACT	XI
1. INTRODUCCION	1
HIPOTESIS	12
OBJETIVO GENERAL	12
OBJETIVOS ESPECIFICOS	12
2.1 MATERIALES	13
2.1.1 Mantención de peces cebra silvestres y líneas transgénicas	13
2.1.2 Reactivos para biología molecular	14
2.1.3 Soluciones	15
2.1.4 Reactivos para PCR	16
2.1.5 Reactivos para hibridación <i>in situ</i>	17
2.1.6 Reactivos para inmunohistoquímica	17
2.1.7 Reactivos para microinyección	17
2.1.8 Equipos utilizados	18
2.1.9 Kits comerciales	18
2.2 METODOS	19
2.2.1 Clonamiento <i>in silico</i> de <i>hif1-α</i> de pez cebra	19



2.2.2	Extracción de RNA total	20
2.2.3	RT-PCR	21
2.2.4	Síntesis de las ribosondas marcadas con digoxigenina	22
2.2.4.1	Obtención de DNA plasmidial	23
2.2.4.2	Extracciones fenólicas	24
2.2.5	Hibridación <i>in situ</i>	24
2.2.6	Inmuno- <i>in situ</i> en embriones de pez cebra	26
2.2.7	Cortes histológicos de embriones de pez cebra	27
2.2.8	PCR cuantitativo en tiempo real (qPCR)	27
2.2.9	Morfolinos antisentidos del gen <i>hif-1α</i> de pez cebra	29
3	RESULTADOS	31
3.1	Clonamiento y análisis de secuencia de <i>hif-1α</i>	30
3.2	Estructura genómica de <i>hif-1α</i>	36
3.3	Expresión temporal y espacial de <i>hif-1α</i> analizado por RT-PCR semicuantitativo y PCR en tiempo real	37
3.4	Expresión temporal y espacial de <i>hif-1α</i> detectado por hibridación <i>in situ</i> en embriones de pez cebra	40
3.5	Falta de función del gen <i>hif-1α</i> de pez cebra	43
4.	DISCUSION	45
5.	CONCLUSIONES	56
6.	PROYECCIONES	57
7.	BIBLIOGRAFIA	58

INDICE DE FIGURAS

Figura 1	Esquema de los multidominios que regulan la estabilidad y actividad de HIF-1 α humano.	3
Figura 2	Ortólogos de Hif-1 α y sus dominios.	32
Figura 3	Árbol filogenético.	34
Figura 4	Estructura genómica de <i>hif-1α</i> de pez cebra.	36
Figura 5	Expresión de <i>hif-1α</i> en diferentes estadios del desarrollo mediante RT-PCR semicuantitativo.	38
Figura 6	Estudio de la expresión de <i>hif-1α</i> en el desarrollo temprano de pez cebra por PCR en tiempo real.	39
Figura 7	Expresión de <i>hif-1α</i> durante el desarrollo de pez cebra.	42
Figura 8	Falta de función de <i>hif-1α</i> en embriones transgénicos <i>tg(fli1:egfp^y)¹</i> .	44



INDICE DE TABLAS

N° TABLA

- | | | |
|---|--|----|
| 1 | Identidad de los dominios de Hif-1 α de pez cebra con sus ortólogos
pez carpa, humano, ratón y rata. | 35 |
| 2 | Estructura genómica de <i>hif-1α</i> de pez cebra. | 37 |



SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

AP	Fosfatasa alcalina
BMB	Solución de bloqueo
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
DAB	Diamino Bencidina
dpf	Días post fertilización
DO	Densidad óptica
GFP	Proteína fluorescente verde
hpf	Horas post fertilización
Kb	Kilobases
K.O.	<i>knockout</i>
LS	Suero de bovino
MAB	Tampón de ácido maleico
MABT	Tampón de ácido maleico más Tween-20
MO	Morfolino
Morfantes	Embriones inyectados con morfolino
NTP/BCIP	Nitro blue tetrazolium chloride/5-bromo-4chloro-3-indolyphosphate
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino
PBST	Tampón fosfato salino más Tween-20
PFA	Paraformaldehído
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa – Transcripción inversa

SSC	Citrato salino de sodio
TAE	Tris-acetato-EDTA
UV	Ultravioleta

RESUMEN

Los organismos eucariontes han seleccionado mecanismos muy conservados capaces de aumentar la absorción y distribución de oxígeno. Un factor de transcripción muy importante en este proceso es el factor inducible por hipoxia 1 (HIF-1). Este es un factor de transcripción heterodimérico de la familia bHLH-PAS, formado por dos subunidades: α y β . La subunidad HIF-1 α es regulada en condiciones de hipoxia, mientras que HIF-1 β se expresa constitutivamente. En condiciones hipóxicas HIF-1 dimeriza en el núcleo promoviendo la expresión de múltiples genes.

En nuestro laboratorio hemos clonado *hif-1 α* de pez cebra, cuyo transcrito de aproximadamente 4kb, codifica una proteína predicha de 777 aminoácidos. El mapeo genómico indica que el gen de *hif-1 α* de pez cebra estaría formado por 15 exones y 14 intrones al igual que lo reportado en humano y ratón.

Además, hemos caracterizado el patrón de expresión de *hif-1 α* usando hibridación *in situ* en embriones de pez cebra, mostrando una expresión dinámica durante el desarrollo. La expresión de *hif-1 α* comienza desde las 0 horas post fertilización (expresión materna), restringiéndose posteriormente a regiones ventrales del embrión. En estadios avanzados se expresa en la notocorda, plexo venoso caudal, vasos sanguíneos, somitos, *tectum optico*, retina, hígado y neuromastos. Ensayos preliminares de falta de función utilizando microinyección de oligonucleótidos antisentido (morfolinos) en peces transgénicos *tg(fli1:egfp^y)¹* muestran alteraciones en la formación de los vasos sanguíneos, sugiriendo que *hif-1 α* participaría en la angiogénesis durante el desarrollo embrionario del pez cebra.

ABSTRACT

The eukaryotes have selected highly conserved mechanisms capable of increasing the absorption and distribution of oxygen. A transcription factor very important in this process is hypoxia inducible factor 1 (HIF-1). This is a transcription factor heterodimeric belong to the family bHLH-PAS, consisting of two subunits: α and β . The subunit HIF-1 α is regulated under conditions of hypoxia, whereas HIF-1 β is expressed constitutively. In hypoxic conditions HIF-1 dimerizes in the nucleus promoting the expression of multiple genes.

In our laboratory we have cloned *hif-1 α* zebrafish, whose transcript of approximately 4kb, encodes a protein predicted of 777 aminoacids. The genome mapping indicates that the gene *hif-1 α* would consist of 15 exons and 14 introns as it is reported in human and mouse.

In addition, we have characterized the pattern of expression of *hif-1 α* using in situ hybridization in zebrafish embryos, showing a dynamic expression during development. The expression of *hif-1 α* starts from 0 hours post fertilization (maternal expression), subsequently restricted to ventral regions of the embryo. In advanced stages expressed in the notocorda, plexus flow, blood vessels, somites, optic tectum, retina, liver and neuromasts. Preliminary tests with lack of function using microinjection of antisense oligonucleotides (morpholino) in transgenic fish *tg(fli1:egfp^y)¹* showed alterations in the formation of blood vessels, suggesting that *hif-1 α* is involved in angiogenesis during embryonic development of zebrafish.

1. INTRODUCCION

La capacidad para mantener la homeostasis de oxígeno es esencial para la supervivencia, así como para el desarrollo de los organismos eucariontes. El estado hiperóxico o de alta tensión de oxígeno genera especies reactivas de oxígeno (ROS), daños a las membranas celulares y al DNA, mientras que el estado hipóxico o baja tensión de oxígeno, resulta en niveles de ATP insuficientes para mantener las funciones celulares esenciales. Debido a esto, los organismos eucariontes han adoptado mecanismos especializados capaces de aumentar la captura y distribución de oxígeno. Las vías de respuesta dependientes de oxígeno se encuentran altamente conservadas y se expresan en cada una de las células en mamíferos (Bruick, 2003). La respuesta a hipoxia en animales se encuentra mediada por factores de transcripción inducibles por hipoxia (*hypoxia-inducible factors*, HIFs) pertenecientes a la familia de proteínas *basic helix-loop-helix* (bHLH) y *Per-Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-SIM* (PAS). Los factores de transcripción bHLH-PAS participan en procesos esenciales como neurogénesis, ritmo circadiano, metabolismo de toxinas y desarrollo de tráqueas en invertebrados (Gu y col., 2000; Lavista-Llanos y col., 2002). En las células de mamíferos, el factor transcripcional bHLH-PAS HIF-1 juega un papel esencial en la homeostasis de oxígeno celular y sistémica (Iyer y col., 1998a; Semenza, 1999; Semenza, 2000). HIF-1 induce la expresión de múltiples genes involucrados en

metabolismo, transporte de glucosa, eritropoyesis y angiogénesis (formación de vasos sanguíneos), aumentando la disponibilidad de oxígeno y glucosa (Semenza, 2003).

El descubrimiento de HIF-1 como regulador de la homeostasis de oxígeno se realizó mediante la identificación de un elemento de respuesta a hipoxia (HRE, 5'-RCGTG-3') en la región promotora del gen que codifica para la eritropoyetina humana (Semenza y col., 1991). Estudios posteriores revelaron que HIF-1, bajo condiciones hipóxicas, se une a regiones específicas del DNA llamadas HRE (*hypoxia responsive element*), como un factor de transcripción heterodimérico compuesto de las subunidades α y β (Wang y col., 1995). Esta última subunidad fue descrita como un translocador nuclear ARNT (*aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*) (Wang y col., 1995). Cada subunidad pertenece a la familia bHLH-PAS (Per/Arnt/Sim). Los dominios HLH y PAS (designados PAS-A y PAS-B) se requieren para la formación del heterodímero entre las subunidades α y β con propiedades de unión a DNA, mientras que las regiones básicas se unen específicamente a los HRE (Jiang y col., 1996). La subunidad HIF-1 α también contiene dos dominios de transactivación, ambos hacia el extremo carboxilo de la proteína; dentro de esta región uno está localizado más hacia el amino y otro hacia el extremo carboxilo terminal de la proteína (TAD-N y TAD-C, respectivamente). El dominio TAD-C interactúa con coactivadores, como p300/CBP (*cyclic-AMP responsive element binding (CREB)- binding protein*). Entre los dominios PASs y TAD-C se encuentra el dominio que controla la degradación de HIF-1 α en presencia de oxígeno, llamado ODDD (*oxygen-dependent degradation domain*) (Ruas y col., 2002) (**Figura 1**).

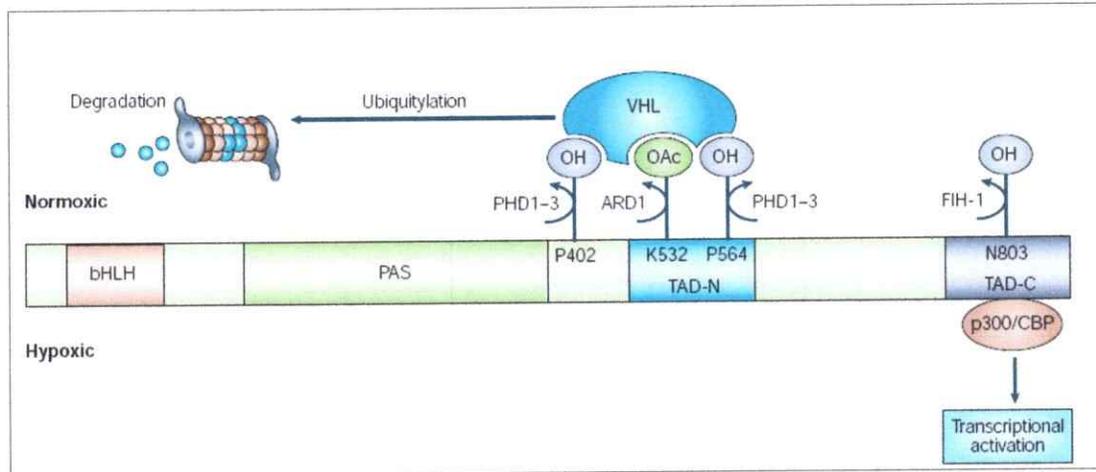


Figura 1. Esquema de los multidominios que regulan la estabilidad y actividad de HIF-1 α humano. Se indican los dominios bHLH (*beta helix-loop-helix*), PAS (*Per/ArnT/Sim*), ODDD (*oxygen dependent degradation domain*) y TAD (*transactivation domain*) de HIF-1 α humano. Los residuos aminoacídicos P₄₀₂, P₅₆₄ corresponden a sustratos para las hidroxilasas PHD (*prolyl hidroxilases*) y K₅₃₂ para ARD1 (*acetyl transferase*). El aminoácido N₈₀₃ puede ser hidroxilado por el inhibidor de HIF-1 (FIH-1) bloqueando la interacción con los coactivadores (p300/CBP) (Semenza, 2003).

Regulación de la estabilidad de HIF-1 α .

Los niveles de oxígeno afectan la estabilidad, localización subcelular y niveles de expresión de la subunidad HIF-1 α , mientras que la subunidad β es expresada constitutivamente (Wang y col., 1995; Huang y col., 1996; Kallio y col., 1997). Estudios con cultivos celulares en condiciones de hipoxia (*in vitro* ~1% O₂), muestran que HIF-1 α se estabiliza en el citosol, transloca desde el citoplasma al núcleo donde dimeriza con la subunidad β y forma el factor de transcripción activo (Huang y col., 1996; Kallio y col., 1997). Mientras que en normoxia (~21% de O₂), la subunidad HIF-1 α sufre modificaciones post-traduccionales como hidroxilaciones y acetilaciones en el ODDD que permiten la interacción con la proteína supresora de tumores Von Hippel Lindau

(pVHL). pVHL forma parte del complejo E3 ubiquitina ligasa y es responsable de ubiquitinación y posterior degradación de HIF-1 α por el sistema proteosoma (Brahimi y col., 2005).

La regulación de la estabilidad de HIF-1 α está dada por la actividad de enzimas que lo hidroxilan en posiciones específicas, llamadas prolil hidroxilasas (PHD). Las PHDs son enzimas dioxigenasas que utilizan 2-oxoglutarato y oxígeno molecular como sustratos, y que además necesitan hierro (Fe⁺²) como cofactor (Masson y Ratcliffe, 2003). Estas enzimas transfieren uno de los átomos de oxígeno molecular a un residuo de prolina, mientras que el segundo átomo reacciona con 2-oxoglutarato, generando succinato y CO₂. En humanos se ha descrito que HIF-1 α contiene dos sitios de hidroxilación en las prolinas P₄₀₂ y P₅₆₄, presentes en motivos conservados (LXXLAP) del dominio ODDD. De este modo, la actividad de las PHDs sobre HIF-1 α depende de la concentración de oxígeno, actuando como sensores de éste (Masson y Ratcliffe, 2003). Estudios *in vitro* muestran que la inactivación de PHDs por quelantes de Fe⁺² (como desferrioxamina) o inhibidores competitivos de éste (tales como Co⁺², Ni⁺² y Mn⁺²) estabilizan HIF-1 α simulando la condición de hipoxia (Ivan y col, 2002; Jaakkola y col, 2001).

En células de mamíferos, se ha reportado la expresión de tres isoformas para las prolil hidroxilasas, denominadas PHD1, PHD2 y PHD3 (Bruick y McKnight, 2001). Estudios *in vitro* han mostrado que estas PHDs tienen la capacidad de hidroxilar HIF-1 α con diferentes actividades relativas entre ellas (PHD2 >> PHD3 > PHD1) (Huang y col., 2002; Berra y col., 2003). Estudios de pérdida de función usando RNA de

interferencia (siRNA) contra *PHD2* estabilizaron los niveles de HIF-1 α en normoxia, mientras que siRNAs dirigidos contra *PHD1* o *PHD3* no produjeron efectos similares sobre HIF-1 α , demostrándose así que PHD2 corresponde a la enzima limitante en el control de la hidroxilación de HIF-1 α en normoxia (Berra y col., 2003).

Acción de ARD1 sobre HIF-1 α .

Usando ensayos de doble híbrido en levaduras para identificar proteínas que interactúan *in vivo* con el ODDD de HIF-1 α humano, se encontró otra enzima que actúa como sensor de oxígeno molecular, la acetil transferasa ARD1 (*arrest defective proteína 1 homologue*) (Jeong y col., 2002). Para demostrar que esta enzima transfiere un grupo acetilo desde el grupo acetil-coenzima A (Ac-CoA) hasta el residuo lisina del dominio ODDD de HIF-1 α humano, se realizaron experimentos *in vitro* usando vectores que expresan ODDD y ARD1 recombinante, encontrándose que los residuos lisina fueron acetilados en presencia de ARD1 y Ac-CoA, mientras que en ausencia de ARD1 o Ac-CoA no se detecta ODDD acetilado. La acetilación en el residuo lisina favorece la interacción de HIF-1 α con la proteína Von Hippel Lindau (pVHL), provocando de este modo, la desestabilización de HIF-1 α en normoxia (Jeong y col., 2002).

Además del mecanismo de regulación de HIF-1 α a nivel de su estabilidad en condiciones de normoxia, existe otro mecanismo que regula la actividad transcripcional de este factor en condiciones normales de oxígeno. El dominio TAD-C de HIF-1 α actúa reclutando coactivadores transcripcionales, tales como p300/CBP, SRC-1 y TIF2, los que estimulan el ensamblaje de la maquinaria basal de la transcripción (Carrero y col., 2000). La interacción entre el dominio TAD-C y el coactivador p300/CBP puede ser

bloqueada en condiciones de normoxia por la hidroxilación en el residuo N₈₀₃ de HIF-1 α humano en el dominio TAD-C por el factor de inhibición de HIF-1 (FIH-1) (Lando y col, 2002), que al igual que las PHDs, es una dioxigenasa dependiente de Fe²⁺ y 2-oxoglutarato (Lando y col, 2002). Aunque la actividad de HIF podría estar regulada por mecanismos adicionales, las hidroxilasas dependientes de oxígeno parecen ser las principales reguladoras en respuesta a diferentes niveles de oxígeno.

Papel de HIF-1 en el desarrollo embrionario.

Se ha establecido que HIF-1 juega un importante papel durante el desarrollo embrionario de mamíferos a presiones normales de oxígeno, usando como modelos de estudio ratones *knockouts* (K.O.) de HIF-1 α y HIF-1 β (Iyer y col., 1998a; Ryan y col., 1998; Kotch y col., 1999; Maltepe y col., 1997).

Los embriones K.O. homocigotos HIF-1 α ^{-/-} se detienen en su desarrollo al noveno día embrionario (E9) y mueren en estadio E10,5 (Iyer y col., 1998a; Ryan y col., 1998). Durante los estadios E8,5 y E8,75, tanto la morfología como el desarrollo vascular son indistinguibles entre los embriones HIF-1 α ^{+/+} y HIF-1 α ^{-/-}, sin embargo, durante el estadio E9,25 en los ratones K.O. de HIF-1 α existe una marcada regresión de los vasos sanguíneos y reemplazo por un pequeño número de estructuras vasculares alargadas en la región cefálica (Iyer y col., 1998a). Posteriormente, durante los estadios E9,75 a E10, los embriones HIF-1 α ^{+/+} presentan 29 somitos, mientras que los embriones mutantes HIF-1 α ^{-/-} sólo 12 somitos, indicando que el arresto del desarrollo ha ocurrido a más tardar en el día embrionario 8 (11 somitos) (Ryan y col., 1998). Además, se observaron fallas en el cierre del tubo neural con degeneración cística y prolapso de los

pliegues neurales, alargamiento del cerebro posterior y desarrollo anormal del sistema cardíaco con hiperplasia del miocardio presuntivo (Ryan y col., 1998). Anterior a los defectos morfológicos y vasculares en los ratones HIF-1 α ^{-/-}, los embriones presentan muerte celular en la región de la unión neurosomática, sitio desde el que migran las células de la cresta neural desde el tubo neural hacia el mesénquima cefálico (Ryan y col., 1998). Estas células son esenciales para el desarrollo normal del sistema circulatorio (Bergwerff y col., 1998). La expresión de la proteína HIF-1 α aumenta entre los estadios E8,5 y E9,5, período en el que las malformaciones son aparentes en los ratones de HIF-1 α ^{-/-} (Iyer y col., 1998a).

Los embriones de ratones K.O. de HIF-1 β mueren en E10,5 y muestran defectos en la formación de los vasos sanguíneos, angiogénesis defectiva en el saco vitelino y arcos branquiales (Maltepe y col., 1997). Además, las células HIF-1 β ^{-/-} presentan fallas en la activación de genes que responden normalmente a hipoxia y a baja concentración de glucosa (Maltepe y col., 1997).

Como se señala anteriormente, los modelos de ratones K.O. de HIF-1 α y HIF-1 β muestran remodelamiento vascular, indicando que la secreción de factores angiogénicos como VEGF (*vascular endothelial growth factor*) blanco transcripcional directo de HIF, son modulados naturalmente por hipoxia durante el desarrollo embrionario (Maltepe y col., 1997; Ramírez-Bergeron y col., 2006). De este modo, el patrón en la formación de los nuevos vasos sanguíneos durante la embriogénesis y organogénesis, está dado por microambientes hipóxicos locales, donde los vasos

existentes se ramifican hacia regiones con bajos niveles de nutrientes y O₂ (Simon y Keith, 2008).

Expresión de HIF-1 α durante el desarrollo embrionario en vertebrados.

Los estudios de expresión de HIF-1 α durante el desarrollo embrionario en mamíferos en normoxia han revelado una regulación espacial del mensajero de este factor. Mediante la técnica de hibridación *in situ* se detectaron elevados niveles del mensajero de HIF-1 α en cerebro, corazón y riñón de ratón (Jain y col., 1997). Además, la expresión del transcrito de *hif-1 α* fue detectada en pollo durante los primeros siete días de su gestación, encontrándose principalmente en el neuroepitelio, mesénquima mesonefrítico y cefálico, para luego comenzar a restringirse hacia zonas proliferativas del sistema nervioso central (Etchevers, 2003). Por otro lado, los estudios de hibridación *in situ* en *Xenopus laevis* mostraron un patrón de expresión y regulación altamente dinámico, siendo Xhif-1 α expresado constitutivamente en bajos niveles durante la embriogénesis y aumentando su nivel de expresión en la etapa de gastrulación. En estadios posteriores se expresa en regiones específicas del sistema nervioso central y tejidos axiales (Sipe y col., 2004).

Efecto de HIF-1 α sobre vías de señalización durante el desarrollo.

Otros estudios funcionales *in vitro* de HIF-1 α relacionados al desarrollo de mamíferos en hipoxia señalan que ésta estimula la proliferación de células precursoras del sistema nervioso central (Studer y col., 2000) y células troncales de la cresta neural (Morrison y col., 2000), promueve la supervivencia de la placa de crecimiento de condrocitos (Schipani y col., 2001) e inhibe la diferenciación de adipocitos (Yun y col.,

2002), pero se desconoce qué procesos moleculares se encuentran asociados a estos efectos. Recientemente, en estudios con cultivos celulares se ha descrito un vínculo entre la vía de señalización Notch y HIF que explica en parte como el efecto sinérgico entre estas dos vías inhibiría la diferenciación de células precursoras durante las primeras etapas de la embriogénesis (Gustafsson y col., 2005).

Existen evidencias que demuestran que la acumulación de HIF-1 α en condiciones hipoxia (~1% de O₂), bloquea la diferenciación de células de mioblastos C2C12 y de células de carcinoma embrionario neuronal P19. Los bajos niveles de O₂ también inhiben la maduración de células satélites primarias obtenidas de células troncales de músculo y neuronales derivadas de la corteza de embrión de rata. Estos efectos fueron eliminados en presencia de inhibidores γ -secretasa, que inhiben la señalización de Notch al bloquear la proteólisis y posterior liberación del dominio intracelular de Notch. Además, la hipoxia aumenta la expresión de los blancos transcripcionales de Notch, *HES1* y *HEY2* (Gustafsson y col., 2005).

Actualmente, los modelos de ratones K.O. de HIF-1 α han mostrado que éste factor de transcripción es esencial durante el desarrollo en condiciones de normoxia, sin embargo, la temprana muerte de estos embriones no permiten caracterizar qué genes y etapas del desarrollo embrionario serían regulados por HIF-1.

En la búsqueda de un nuevo modelo que nos permita comprender el papel de HIF-1 α durante el desarrollo de vertebrados, el pez cebra (*Danio rerio*) resulta un modelo atractivo. Esto debido a que, la embriogénesis ocurre externamente, los embriones son transparentes facilitando la observación de cambios morfológicos y en la

expresión de genes por hibridación *in situ* en embriones completo. Tiene ciclos generacionales cortos (dos a tres meses), alta disponibilidad de material biológico por la cantidad de embriones que una pareja de peces puede producir cada semana (entre cien y doscientos individuos) y su genoma se encuentra secuenciado (Eisen, 1996; Ingham y col., 1997; Talbot y col., 2000). Además, este pez es capaz de sensar gradientes de oxígeno en su ambiente natural, gatillando la respuesta a hipoxia. Finalmente, en el pez cebra es posible realizar experimentos de falta y ganancia de función, siguiendo su efecto tanto en la embriogénesis como en la morfogénesis.

Estudios de sobre-expresión de HIF-1 α o el tratamiento con CoCl₂ en embriones de pez cebra, resultaron en un incremento de los niveles de *Igfbp-1* (*insulin-like growth factor binding protein 1*), causando un retraso en el desarrollo y crecimiento de estos embriones (Kajimura y col., 2005). Por otra parte, ensayos de falta de función, por inyección de oligonucleótidos antisentidos (morpholinos) contra *igfp-1* eliminaron los efectos provocados por la hipoxia, mientras que la sobre-expresión de *Igfp-1* retrasó el desarrollo y crecimiento en condiciones de normoxia (Kajimura y col., 2005). Estudios posteriores sobre el promotor del gen *igfp-1* revelaron que este gen contiene 13 HREs, de los cuales sólo el elemento posicionado entre -1090/-1086 es requerido para la inducción por HIF-1 α en hipoxia. Estos resultados sugieren que HIF-1 α media la expresión del gen *igfp-1* inducida por hipoxia, a través de su interacción selectiva con el elemento -1090/-1086 encontrado en el promotor de *igfp-1* durante el desarrollo temprano de pez cebra (Kajimura y col., 2006).

Esta tesis tiene como finalidad aumentar el conocimiento del papel del *factor inducible por hipoxia-1 α* durante el desarrollo embrionario del pez cebra mediante su clonamiento, caracterización de la expresión espacio-temporal y efecto de la falta de función de este factor en condiciones de normoxia.

Hipótesis.

“La falta de función del factor transcripcional inducible por hipoxia *hif-1 α* altera el desarrollo embrionario en el pez cebra”.

Objetivo general.

- Clonar *hif-1 α* de pez cebra, caracterizar el patrón de expresión y determinar el efecto de la falta de función durante el desarrollo.

Objetivos específicos.

1. Clonar por homología el factor transcripcional inducible por hipoxia *hif-1 α* de pez cebra.
2. Caracterizar la expresión espacial y temporal de *hif-1 α* durante el desarrollo embrionario del pez cebra.
3. Estudiar el efecto de la falta de función de *hif-1 α* durante estadios tempranos del desarrollo de pez cebra.

2.1 MATERIALES

2.1.1 Mantención de peces cebra silvestres y líneas transgénicas.

Se utilizaron peces cebra (*Danio rerio*) silvestres (cepa AB) y la línea transgénica Tg(*fli1:egfp^{vl}*). Este transgénico expresa GFP bajo el control del promotor del factor de transcripción *fli1* (*Friend leukemia integration site-1*), expresado específicamente en células endoteliales vasculares (Lawson y Weinstein, 2002).

Fli-1 pertenece a la familia de factores de transcripción ETS, los que se encuentran definidos por un dominio conservado de unión a DNA llamado ETS, que forma un motivo '*winged helix-turn helix*'. Esta familia de factores participa en procesos tales como diferenciación y crecimiento celular, desarrollo vascular y angiogénesis (Sato, 2001). Los modelos de ratones K.O. de FLI-1 son capaces de formar redes funcionales de vasos sanguíneos, sin embargo, los mutantes homocigotos (FLI-1^{-/-}) mueren en el E11,5, debido a una hemorragia cerebral, sugiriendo que la vasculogénesis y angiogénesis ocurren en ausencia de este factor (Sato, 2001).

Estas líneas de peces cebra fueron mantenidos en acuarios con ciclos de luz de 14 horas, circulación constante de agua a pH 7,5, aireación constante y mantenidos a 28°C (Westerfield, 1995). Los embriones y larvas desovados naturalmente fueron mantenidos en placas Petri en medio E3 (NaCl 5 mM; KCl 0,17 mM; CaCl₂ 0,13 mM; MgSO₄ 0,33 mM; Azul de Metileno 5 - 10 %) a 28°C en una estufa de cultivo (Haffter y col., 1996).

Luego los embriones se colectaron y fijaron con PFA 4% en diferentes estadios (Kimmel y col., 1995).

2.1.2 Reactivos para Biología Molecular.

- Acetato de sodio 3M pH 5,2, Winkler Ltda.
- Acetona, Merck.
- Agarosa, Winkler Ltda.
- Agua sin nucleasas, Winkler Ltda.
- Blocking reagent (BMB), Roche.
- Bromuro de etidio 10 mg/mL, Winkler Ltda.
- Cloroformo, Merck.
- Cloroformo: alcohol isoamílico 24:1, Winkler Ltda.
- Cloruro de magnesio ($MgCl_2$), Winkler Ltda.
- Digoxigenina-11-dUTP, Roche.
- DMSO, Winkler Ltda.
- DNAsa (libre de RNAsa), Promega.
- DNAsa, Promega.
- dNTPs, Fermentas.
- DTT 0,1 M, Invitrogen.
- Enzimas de restricción: *Apal*, *Sall* con sus respectivos tampones 10X, Fermentas.
- Etanol, Merck.
- Fenol: cloroformo básico: alcohol isoamílico 25:24:1, Winkler Ltda.
- Inhibidor de RNAsas, Roche.
- Isopropanol, Merck.

- LiCl, Winkler Ltda.
- Marcador de tamaño molecular (DNA) 1 kb, Fermentas.
- NTPs, Fermentas.
- Peróxido de hidrógeno 30%, Merck.
- Plasmidio pGEM-T 3Kb, Promega.
- Suero de oveja, Gibco BRL.
- T4 DNA ligasa, Fermentas.
- Tampón 5X Transcriptasa reversa SUPERScript II, Invitrogen.
- Tampón de carga 6X, Fermentas.
- Tampón transcriptasa reversa 10X, Fermentas.
- Transcriptasa reversa SUPERScript II, Invitrogen.
- Triton X-100, Winkler Ltda.
- Trizol (Total RNA Isolation Reagent), Invitrogen.
- Tween 20, Winkler Ltda., Chile.
- X-gal, Winkler Ltda.

2.1.3 Soluciones.

- MAB (Ácido Maleico 0,1 M; NaCl 0,15 M; pH 7,5).
- MABT (MAB + Tween-20 0.1%).
- Medio E3 1X (NaCl 5 mM, KCl 0,17 mM, CaCl₂ 0,13 mM, MgSO₄ 0,33 mM, Azul de Metileno 5 - 10 %).
- Paraformaldehído 4% en PBS.

- Solución de blanqueo (595 μ l de agua sin nucleasas, 25 μ l de SSC 20X, 50 μ l de formamida, 330 μ l de péroxido de hidrógeno al 30% para 1 ml total).
- SSC 20X, Winkler Ltda.
- Tampón AP ($MgCl_2$ 50 mM, NaCl 100 mM, Tris-X 100 mM 0,2%, Tween-20 0.2%; pH 9,5).
- Tampón de corrida TAE 50X, Winkler Ltda.
- Tampón de hibridación (SSC 5X; Heparina 50 μ g/ml; RNA tórula 500 μ g/ml; Tween-20 0,1%).

2.1.4 Reactivos para PCR.

- Buffer de PCR 10X sin magnesio, Invitrogen.
- $MgCl_2$ 50 mM, Invitrogen.
- Partidores RT-PCR:

- *hif-1 α* :

F₁-5'-CCAGTGGAACCAGACATCAG -3' y

R₁-5'-GACTTGGTCCAGAGCACGC-3'

- *β -actina*:

F₀- 5'-TTCTGGTCGGTACTACTGGTATTGTG-3' y

R₀-5'-ATCTTCATCAGGTA-GTCTGTCAGGT-3'

- Partidos qPCR

- *hif-1 α* :

RTF₁-5'-AGTCCTCTCCTCCAGTCT-3' y

R₂-5'-GACTTGGTCCAGAGCACGC-3'

- β -actina:

RTF₀-5'-GGTCGTACTACTGGTATT-3' y

RTR₀-5'-ATCAGGTAGTCTGTCAGGTC-3'

- *Taq* Polimerasa 5 u/ μ l, Invitrogen

2.1.5 Reactivos para hibridación *in situ*.

- Anticuerpo anti-Digoxigenina- AP, Roche Diagnostics GMBH, Mannheim.
- Formamida, Merck.
- Heparina, Sigma.
- Metanol, Merck.
- NBT/BCIP (Nitro blue tetrazolium Chloride/5 bromo-4 - chloro-3-indolphosphate), Promega.
- PFA 4%, J.T. Baker.
- Proteínasa K, Merck.
- RNA Tórula, Sigma.

2.1.6 Reactivos para inmunohistoquímica.

- Anticuerpo policlonal de conejo α -GFP, Santa Cruz Biotechnology.
- Anticuerpo de cabra anti- IgG de conejo acoplado a peroxidasa, BiosChile.
- DAB (30 mg en 100 ml PBS, 0.03% w/v), Sigma.

2.1.7 Reactivos para microinyección.

- Danieau (NaCl 58 mM, KCl 0,7 mM, MgSO₄ mM, Ca(NO₃), HEPES 50 mM; pH 7,6).
- Morfolino, oligo antisentido *hif-1 α* , 300 nM classic, Gene Tools, LLC; EE.UU.

- Rojo de fenol, Sigma.

2.1.8 Equipos utilizados.

- Centrífuga 5415-D, Eppendorf.
- Centrífuga 5804-R, Eppendorf.
- Electroporador 2510, Eppendorf.
- Equipo Mx3000p[®] qPCR System, Stratagene.
- Estirador de puntas Modelo PC- 10,M, Narishige.
- Estufas, Binder.
- Fuente de poder 500, Polyscience.
- Fuente luz fría CLS150X, Leica.
- Lupa con sistema de fluorescencia MZ125, Leica.
- Lupa M3C, Leica.
- Microinyector IM 300, Narishige.
- Microscopio Nomarski BX61, Olympus.
- Micrótopo, Leitz.
- pH 200 Microprocessor pH/°C Meter, Hanna Instruments.
- Placa termoreguladora, Barnstead/Lab- Line.
- Termociclador Mastercycler Gradient, Eppendorf.
- UV-VIS Espectrofotómetro TU-1800, Shimatzu.

2.1.9 Kits comerciales.

- Brilliant[®] SYBR[®] Green qPCR Master Mix, Stratagene.
- GFX[™] PCR DNA and Gel Band Purification Kit, Amersham Biosciences.

- pGEM®-T Easy Vector System, Promega.
- Revertaid™ H Minus First Strand cDNA Síntesis Kit, Fermentas.
- Wizard^R Plus Midipreps Purification Kit, Promega.

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Clonamiento *in silico* de *hif-1α* de pez cebra.

Se buscaron secuencias conservadas de *hif-1α* de humano, ratón y rata en bases de datos de pez cebra, identificándose varios ESTs (expressed sequence tag). De éstos, se seleccionó uno con número de acceso **BM1822886**. Este clon se adquirió comercialmente y se envió a secuenciar, encontrándose una secuencia de 3,5 Kb. El alineamiento de este clon usando BLAS-T reveló un porcentaje de identidad superior al 90% con una secuencia de cDNA de pez cebra con número de acceso **AY326951**, clon genómico **BX255914**. Posteriormente, se realizó un alineamiento múltiple de secuencias aminoacídicas entre la deducida para Hif-1α de pez cebra (**CAH68916**) y otros miembros de la familia HIF de vertebrados usando el programa CLUSTALW.

A continuación, se generó el árbol filogenético usando el programa MegAlign (DNASTAR). Para esto, se eligieron secuencias aminoacídicas representantes de todos los HIFs de vertebrados depositadas con los siguientes números de acceso: gcHIF-1α (**AAR95697**), hHIF-1α (**AAP88778**), mHIF-1α (**Q61221**), rHIF1α (**CAA70701**), sHIF-1α (**AAU14021**), dHIF-1α (**AAR19225**), cHIF-1α (**JC7619**), gcHIF-2α (**AAT76668**), hHIF-2α (**NP_001421**), mHIF-2α (**P97481**), rHIF-2α (**Q9JHS1**), cHIF-2α (**NP_990138**), *Xenopus tropicalis* HIF-2α (**AAH74648**) y qHIF-2α (**AAF21052**).

2.2.2 Extracción de RNA total.

Se extrajo RNA total de embriones de pez cebra en diferentes estadios del desarrollo (0, 10, 18, 24, 48 y 72 hpf). y de tejidos de peces adultos (1 año aproximadamente). Además, se extrajeron desde peces adultos los siguientes tejidos: agallas, ovario, cerebro, hígado, músculo, testículos e intestino para extracción de RNA total.

Para la extracción de RNA desde embriones se homogeneizaron 50 embriones con 200 μ l de Trizol (Gibco BRL, Inglaterra), con un homogeneizador de tubos con 10 golpes. Luego, las muestras homogeneizadas se incubaron por 5 minutos a temperatura ambiente para permitir la completa disociación de los complejos núcleo-proteicos y se adicionaron 40 μ l de cloroformo (1/5 del volumen agregado de Trizol®). Las muestras se mezclaron por agitación durante 15 segundos e incubaron por 5 minutos a temperatura ambiente. Después, se centrifugó a 12.000 x g por 15 minutos. Posteriormente, se transfirió la fase acuosa a otro tubo estéril. Para precipitar el RNA desde la fase acuosa se agregaron 500 μ l de isopropanol y se incubaron las muestras durante 15 minutos a temperatura ambiente. Luego, se centrifugó durante 30 minutos a velocidad máxima a 4°C. A continuación, se removió el sobrenadante y se lavó el precipitado de RNA con 1 ml de etanol 75%. Las muestras se mezclaron por agitación y se centrifugaron a velocidad máxima durante 2 minutos a 4°C. Finalmente, se secaron los precipitados de RNA durante 15 minutos a temperatura ambiente y se resuspendieron las muestras en 50 μ l de agua libre de nucleasas. Las muestras se almacenaron a -80°C y se cuantificó la cantidad de RNA extraído por espectrofotometría. Para esto, se

utilizaron 2 μ l de RNA total y se diluyeron en 500 μ l de agua sin nucleasas. Se consideró que 1 OD a 260 nm equivale a 38 μ g RNA/ml. Se realizaron mediciones a 260 nm (absorción de ácidos nucleicos) y a 280 nm (absorción de proteínas), para luego obtener un índice de pureza calculado por medio de un cociente entre los valores de absorbancia obtenidos entre ambas longitudes de onda. Se consideró 1,6 como valor aceptable.

Para extraer RNA desde los diferentes tejidos se siguió el mismo protocolo tomando 50 a 100 mg de tejido que se homogeneizó en 1 ml de Trizol[®].

2.2.3 RT-PCR.

Para sintetizar la primera hebra de cDNA se preparó la siguiente mezcla de reacción: 2 μ g de RNA total, 1 μ g de random primers (0,2 μ g/ μ l) y agua sin nucleasas hasta completar un volumen de 12 μ l. Se resuspendió y se dio un spin de 5 segundos en una microcentrífuga. Las mezclas de reacción se incubaron a 70°C durante 5 minutos. Luego se adicionaron los siguientes componentes en el orden indicado: 4 μ l de tampón de reacción 5X, 1 μ l de inhibidor de ribonucleasas (20 U/ μ l), 2 μ l de dNTP mix 10 mM. Las reacciones de transcripción se incubaron a 25°C por 5 minutos y luego se agregó 1 μ l de transcriptasa reversa SUPERScript II (Invitrogen) completando un volumen final de 20 μ l. La reacción se incubó a 25°C por 10 minutos y finalmente a 42°C por 60 minutos. Para detener la reacción de transcripción los tubos se incubaron a 70°C por 10 minutos.

A continuación, para amplificar el fragmento de *hif-1 α* a partir de cDNA obtenido de embriones en diferentes estadios y tejidos adultos de pez cebra, se realizó la

siguiente reacción de PCR: 1 μ l de cDNA de *hif-1 α* ; 13,9 μ l de agua libre de nucleasas; 0,5 μ l de partidor F₁ 10 mM; 0,5 μ l de partidor R₁ 10 mM; 2 μ l tampón 10X de PCR; 1,6 μ l MgCl₂ 50 mM; 0,4 μ l de dNTPs 10 mM; 0,1 μ l Taq DNA polimerasa (5 U). Se utilizó el siguiente programa en el termociclador de 30 ciclos: 94°C: 5 minutos, 94°C: 30 segundos, 60°C: 30 segundos, 72°C: 1 minuto, 72°C: 10 minutos, 4°C ∞ .

Para comparar los niveles de expresión del transcrito *hif-1 α* en los diferentes estadios y tejidos de pez cebra, se usó *β -actina* como control interno de la cantidad de templado de inicio. Los partidores para amplificar *β -actina* de pez cebra fueron RTF₀ y RTR₀ (Chen y col., 2002; Mackenzie y col., 2004).

Los fragmentos amplificados de *hif-1 α* (788 pb) y *β -actina* (679 pb) se resolvieron en un gel de agarosa al 1%.

2.2.4 Síntesis de las ribosondas marcadas con digoxigenina.

Se sintetizaron dos tipos de ribosondas para *hif-1 α* : una sentido y otra antisentido. Para ello se amplificó por PCR la región 3' codificante del gen *hif-1 α* de 788 pb (desde la base 1777 a 2565 de clon AY326951). Los productos de PCR fueron purificados y clonados en el vector pGEM-T easy (2.2.4.1). Luego, se determinó la orientación del inserto por secuenciación de éste.

El clon que contenía el cDNA de la sonda para detectar *hif-1 α* se linearizó por digestión con *ApaI* (sonda sentido) y separadamente con *Sall* (sonda antisentido). Luego se realizó la extracción fenólica del DNA linearizado para cada caso (2.2.4.2). Las sonda sentido se transcribió con RNA polimerasa SP6 y la sonda antisentido con la RNA polimerasa T7.

La síntesis de la ribosonda se llevó a cabo por transcripción *in vitro* en presencia de 11-dUTP-digoxigenina. Se utilizaron 1 µg de DNA linearizado purificado; 5 µl de dig mix; 5 µl de tampón de transcripción 5X; 0,5 µl de inhibidor de RNAsas; 2,5 µl de RNA polimerasa T7/SP6 (Fermentas) y agua sin nucleasas hasta completar un volumen de 25 µl. Las mezclas de reacción de transcripción se incubaron a 37°C durante 2 horas, luego se agregaron 2,5 µl de DNasa (Promega), se incubaron por 30 minutos a 37°C y se detuvo la reacción adicionando 5 µl de EDTA 0,5 M pH 8,0. A continuación, las ribosondas se precipitaron agregando 2 µl de LiCl 10M y 200 µl de etanol absoluto, se mezclaron suavemente y se incubaron a -20°C por toda la noche. Luego, se centrifugaron a 14.000 rpm durante 30 minutos y se lavaron los sedimentos con 200 µl de etanol 70%. Finalmente, se resuspendieron en 11 µl de agua sin nucleasas.

Para calcular la concentración de RNA, 1 µl de la ribosonda se resolvió en un gel de agarosa al 1% durante 5 minutos a 200 V. Las sondas se resuspendieron en tampón de hibridación; la concentración del stock fue de 10 µg/ml y se utilizó a 1µg/ml.

2.2.4.1 Obtención de DNA plasmidial.

Se transformaron cepas de *Escherichia coli* (DH5α) electrocompetentes con el vector pGEM-T Easy con el inserto correspondiente y se crecieron en 5 ml de medio líquido LB por 16 horas. Luego, se obtuvo el DNA plasmidial a pequeña escala con el sistema comercial 'WizardPlus SV Minipreps' (Promega), basado en el método de lisis alcalina (Birboim y Doly, 1979). Usando este método, se obtuvieron entre 5 y 20 µg de DNA plasmidial. Para la purificación a mediana escala a partir de 200 ml de cultivo

bacteriano, se usó el sistema 'WizardPlus SV Midipreps' (Promega), obteniendo aproximadamente 100 µg de plásmido purificado y libre de ribonucleasas.

2.2.4.2 Extracciones fenólicas.

El DNA linearizado se llevó a 100 µl de volumen final, luego se agregó un volumen de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico 25:24:1, se mezcló por agitación y se centrifugó a velocidad máxima por 5 minutos. Luego, se transfirió la fase acuosa a otro tubo y se adicionó un volumen de cloroformo: alcohol isoamílico 24:1, se mezcló por agitación y se centrifugó a velocidad máxima por 5 minutos. A continuación, se recuperó la fase acuosa, precipitando el DNA con 0,1 volumen de acetato de sodio y 2 volúmenes de etanol absoluto, e incubando a -20°C durante toda la noche. Luego, se centrifugó a máxima velocidad durante 30 minutos a 4°C. Finalmente, los precipitados se lavaron con 1 ml de etanol 70%, se volvió a centrifugar en las mismas condiciones y se resuspendió el DNA en 50 µl de agua sin nucleasas.

2.2.5 Hibridación *in situ*.

Los embriones se fijaron con una solución de paraformaldehído 4% en PBS durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente se eliminó manualmente el corion de los embriones utilizando pinzas de disección en una placa petri en PBS. Posteriormente, los embriones se deshidrataron en metanol 50% y luego con metanol 100%, cada vez durante 10 minutos a temperatura ambiente. Los embriones se guardaron a -20°C en una nueva solución de metanol 100% durante al menos 3 horas. Luego, se rehidrataron por 5 minutos en metanol 75%/ PBS 25%, 5 minutos en metanol 50%/ PBS 50%, 5 minutos en metanol 25%/ (PBS 1X, Tween-20 0,1%) 75% y 4 veces durante cinco minutos en PBS-

T. Con el propósito de remover los pigmentos se realizó el blanqueo en embriones mayores de 48 hpf con una solución de blanqueamiento (595 μ L de agua destilada, 25 μ L de SSC 20X, 50 μ L de formamida, 330 μ L de H₂O₂ 30% para 1 ml total). Luego, los embriones se expusieron a la luz fluorescente durante 10 minutos y se realizaron 3 lavados con PBS-T por 5 minutos.

Para digerir las proteínas asociadas al mRNA los embriones de 48, 60, 72 y 120 hpf fueron tratados con proteinasa K (10 mg/ml) a temperatura ambiente durante 8 minutos para embriones de 48 y 60 hpf, 10 y 20 minutos para embriones de 72 y 120 hpf, respectivamente. Posteriormente, los embriones se re-fijaron en paraformaldehído 4 % en PBS durante 20 minutos y luego se lavaron 5 veces durante 5 minutos cada vez en PBS-T. Inmediatamente, los embriones se cubrieron con 500 μ l de tampón de hibridación (formamida 50%, SSC 5X, heparina 50 μ g/mL, RNA tórula 500 μ g/mL, Tween-20 0,1%) a 65°C durante 10 minutos, luego se cambió la solución y los embriones se pre-hibridaron por toda la noche. Las ribosondas-DIG se desnaturaron durante 5 minutos a 65°C para luego agregarlas a los embriones e incubarlas durante toda la noche a 65°C. Para el lavado de las sondas las soluciones se precalentaron a 65 °C. Los embriones se incubaron 10 minutos en formamida 75%/ SSC 2X, 10 minutos en formamida 50%/ SSC 2X, 10 minutos en formamida 25%/ SSC 2X y dos veces por 30 minutos en SSC 0,2X. Luego para la detección de la sonda los embriones se pre-incubaron por 5 minutos en MAB-T (100 mM ácido maleico, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20, pH 7.5) a temperatura ambiente y luego en MAB+BMB+LS durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, los embriones se incubaron en la solución del anticuerpo

anti-digoxigenina/MAB+BMB+LS (1: 2.000) por toda la noche a 4°C. Los lavados del anticuerpo se realizaron con agitación 5 veces en MAB-T durante 20 minutos a temperatura ambiente. Luego, se realizaron 3 lavados con tampón AP durante 5 minutos. Finalmente, para obtener la tinción de los embriones se incubaron en una solución NBT/BCIP durante el tiempo necesario hasta observar color púrpura en la región de expresión del mRNA.

2.2.6 Inmuno-*in situ* en embriones de pez cebra.

Embriones transgénicos *tg(fli1:egfp^{y1})* de 72 hpf teñidos por hibridación *in situ* usando la ribosonda *hif-1 α* , se fijaron en paraformaldehído 4% toda la noche a 4°C. Luego se lavaron dos veces por 5 minutos en PBS 1X y una vez por 5 minutos con agua destilada. Posteriormente, se cambió el agua destilada por acetona (Merck) a -20°C y se incubó por 7 minutos a -20°C, para luego lavar con agua destilada y PBS 1X, cada uno por 5 minutos. Luego se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente con solución de bloqueo (20% suero de bovino, 1% DMSO en PBS 1X y 0,1% Tween-20). Una vez finalizado el bloqueo se agregó el anticuerpo primario (anticuerpo policlonal de conejo anti-GFP, Santa Cruz Biotechnology) diluido 1:200 en solución de bloqueo y se incubó toda la noche a 4°C. Al día siguiente los embriones fueron lavados 4 veces durante 20 minutos con MAB-T en agitación; luego se agregó el anticuerpo secundario (anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo acoplado a peroxidasa) diluido en solución de bloqueo 1:250 y se incubó por 4 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron 4 lavados por 30 minutos con MAB-T. Después del último lavado se agregó DAB 0,03% en PBS por 10 minutos y se cambió por 200 μ L DAB 0,03% más 1 μ L de H₂O₂ 3%. Los

embriones se incubaron 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 inmuno se observó un color negro oscuro.

2.2.7 Cortes histológicos de embriones de pez cebra.

Para obtener secciones histológicas de los embriones teñidos por hibridación *in situ* e inmuno-*in situ*, se fijaron en 1 ml de una solución paraformaldehído 2%, glutaraldehído 1,25% pH 7,5 por 20 minutos. Las muestras se deshidrataron completamente en una batería de etanol (50%, 70%, 95%, 100% I y 100% II) durante 30 minutos en cada solución. Para aclarar las muestras y permitir la inclusión en parafina, los embriones se incubaron en xilol 100% dos veces, Xilol: Paraplast® (1:1) y Paraplast® dos veces, cada incubación se realizó por 30 minutos. Luego los embriones se orientaron bajo lupa. Una vez solidificada la parafina, se utilizó un micrótopo para obtener cortes de 6 a 10 μm de espesor. Los cortes se montaron sobre portaobjetos y se secaron en una platina por toda la noche a 40°C. Las muestras se contratiñeron con eosina.

2.2.8 PCR cuantitativo en tiempo real (qPCR).

Se determinaron los niveles de expresión relativa de *hif-1 α* durante el desarrollo embrionario del pez cebra, utilizando *β -actina* como normalizador. El diseño experimental se subdividió en tres etapas consecutivas. La primera etapa consistió en verificar la especificidad de los productos de PCR obtenidos mediante el análisis de la curva de disociación. Esta permitió determinar con precisión las temperaturas de fusión T_m (*melting temperatures*) en las que sólo existen amplificaciones específicas del

producto de interés, descartando amplificaciones inespecíficas a causa de eventuales dímeros de partidores. Para esto, se realizó un PCR en tiempo real en el equipo Mx3000p[®] qPCR System (Stratagene) en un volumen final de 20 μ l, el que contenía 10 μ l del Brilliant[®] SYBR[®] Green qPCR Master Mix (Stratagene), 0,2 μ l de los partidores sentido y antisentido (100nM), 0,14 μ l de ROX 1mM, 3 μ l de cDNA y 6,46 μ l de agua libre de nucleasas. ROX fue utilizado como fluoróforo de referencia. El programa de PCR en tiempo real fue el mismo para los dos genes analizados (*hif-1 α* y *β -actina*) y consistió de dos etapas. La primera etapa de desnaturalización inicial a 95°C por 10 minutos, y una segunda etapa con 50 ciclos de amplificación, utilizando una temperatura de desnaturalización de 95°C por 30 segundos. El apareamiento de los partidores se realizó a 56°C por 30 segundos y la extensión a 72°C por 20 segundos. La segunda etapa consistió en la realización de una curva estándar con el objeto de determinar la eficiencia de las amplificaciones obtenidas anteriormente para cada gen. Para ello, se realizaron cinco diluciones seriadas (1/10 cada una) de los productos de PCR obtenidos en la primera etapa (realizadas en duplicado). El programa y las condiciones de los reactivos del PCR en tiempo real fueron las mismas que se utilizaron en la primera etapa.

Una vez determinadas las diferencias de amplificación entre cada amplicón, la tercera y última etapa consistió en la cuantificación relativa de *hif-1 α* , utilizando *β -actina* como normalizador y el T_0 para la calibración. T_0 corresponde al punto de referencia inicial; en este caso se comparó el nivel de expresión de 10, 18, 24 y 48 hpf

respecto a 0 hpf. El programa y las condiciones del qPCR fueron las mismas empleadas en la primera etapa.

Los datos de diferencia relativa fueron obtenidos directamente desde el equipo MX3000P usando el programa MxPro™ stratagene ©.

2.2.9 Morfolinos antisentidos del gen *hif-1α* de pez cebra.

Luego de clonar completamente la secuencia de *hif-1α* de pez cebra, se diseñó un oligonucleótido antisentido para hacer el *knockdown* de Hif-1α (inhibición de la traducción). Este oligonucleótido se sintetizó en una empresa del rubro y su secuencia fue 5'-GTGACAACTCCAGTATCCATTCTG-3'.

Posteriormente, se preparó un stock 10X con 300 nM del óligo en 300 µl de DANIEAU 1% y rojo fenol 10%. Este compuesto sirve para visualizar la entrada de la solución al inyectarse directamente al huevo. Luego, se realizaron diluciones 10X; 5X; 1X; 0,5X; 0,25X y 0,125X para encontrar la concentración adecuada, de esta manera se evitan efectos inespecíficos. Las inyecciones superiores a 1X fueron muy tóxicas para los embriones, mientras que entre 1X y 0,25X la tasa de mortalidad aún era muy alta, escogiendo 0,125X a la que los efectos fueron reproducibles y mostraron diferencias con respecto a los embriones controles. Estos últimos corresponden a embriones inyectados con un óligo control. Los morfolinos fueron inyectados en estadio de una o dos células. Las inyecciones se realizaron con un microinyector provisto de un micromanipulador.

3. RESULTADOS

3.1 Clonamiento y análisis de la secuencia de *hif-1 α* .

Con el fin de analizar la expresión y función del factor inducible por hipoxia-1 α (Hif-1 α), clonamos por homología el cDNA de pez cebra *in silico*. Para ello, se identificaron cinco ESTs (expressed sequence tag) desde las bases de datos disponibles para el pez cebra, usando la búsqueda de secuencias conservadas de HIF-1 α de humano, rata y ratón. De las secuencias obtenidas se eligieron aquellas que tenían una imagen comercialmente disponible, de estos clones se seleccionó uno por presentar el inserto de mayor tamaño, el que correspondería con nuestra proteína de interés (número de acceso **BM1822886**). El inserto de este clon (3,5 Kb) fue secuenciado completamente (dos hebras). Posteriormente, al deducir la proteína resultante ésta se alineó usando el programa BLAS-T. Este alineamiento reveló un porcentaje de identidad superior al 90% con una secuencia identificada como cDNA de *hif-1 α* de pez cebra (**AY326951**) y un clon genómico **BX255914**. De la primera secuencia se dedujo una proteína de 777 aminoácidos. De la segunda secuencia se dedujo la localización de intrones y exones del gen de *hif-1 α* de pez cebra.

Posteriormente, se realizó un alineamiento múltiple de secuencias aminoacídicas entre la secuencia deducida para Hif-1 α de pez cebra y todas las proteínas HIF-1 α de

vertebrados disponibles en ese momento, usando el programa ClustalW (Figura 2). El alineamiento de la secuencia de Hif-1 α de pez cebra con las secuencias aminoacídicas de HIF-1 α del pez carpa, humano, ratón y rata mostró porcentajes de identidad de 88, 54, 52 y 53 %, respectivamente. Luego, para confirmar que el gen clonado era efectivamente *hif-1 α* se generó un árbol filogenético, usando el programa MegAlign (DNASTAR). Este análisis reveló que la proteína Hif-1 α de pez cebra cosegrega con el resto de las proteínas HIF-1 α de otras especies de vertebrados, mientras que Hif-2 α , también clonado en el laboratorio, cosegrega con sus correspondientes ortólogos de otros vertebrados (Figura 3). Además, se pudo determinar que el gen *hif-1 α* de pez cebra se localiza en el *linkage group* (LG) 20. Por otra parte, el gen correspondiente a *hif-2 α* estaría localizado en el LG 13, indicando que corresponderían efectivamente a genes distintos.

bHLH NLS1 NLS2

1 MD-TGVVTEKKRVSSERRKEKSRDAARRRGGKESEVFFYELAHQLPLPHNVTSHLDKASIMRLTISYLRMRKLLNSDEKEE zHIF-1a
1 MD-TGVVTEKKRVSSERRKEKSRDAARRRGGKESEVFFYELAHQLPLPHNVTSHLDKASIMRLTISYLRMRKLLNSDDTDK gcHIF-1a
1 MEGAGGANDKKKISSERRKEKSRDAARRRGGKESEVFFYELAHQLPLPHNVSSHLDKASVMRLTISYLRVLRKLLDAGLDI hHIF-1a
1 MEGAGGENEKKKMSERRKEKSRDAARRRGGKESEVFFYELAHQLPLPHNVSSHLDKASVMRLTISYLRVLRKLLDAGGLDS mHIF-1a
1 MEGAGGENEKKKMSERRKEKSRDAARRRGGKESEVFFYELAHQLPLPHNVSSHLDKASVMRLTISYLRVLRKLLDAGLDI rHIF-1a

NLS3 PAS-A

80 KEENELESQNGFYLKALEGFLMVLSEEDGMVYLSENVSKSMGLTQFDLTGHSIFEFSSHPCDHEELREMLVHRTGS-KKT zHIF-1a
80 --ENELEGQNGFYLKALEGFLMVLSEEDGMVYLSENVSKSMGLTQFDLTGHSVFEFSSHPCDHEELREMLVHRTVS-KKT gcHIF-1a
81 --EDDMKAMNCFYLKALDGFVMVLTDDGDMYISDNVNKYMGLTQFELTGHSVDFDTHPCDHEEMREMLTHRNGLVKKG hHIF-1a
81 --EDEMKAQMDCFYLKALDGFVMVLTDDGDMYISDNVNKYMGLTQFELTGHSVDFDTHPCDHEEMREMLTHRNGPVRKG mHIF-1a
81 --EDEMKAQMNCFYLKALDGFVMVLTDDGDMYISDNVNKYMGLTQFELTGHSVDFDTHPCDHEEMREMLTHRNGPVRKG rHIF-1a

159 KEQNTSFLLRMKCTLSRGRVTNIKSATWVLCAGHVRVHEGSEASEDSGFKPEPVTYLVLCICEPIPHPSNIEVPLD zHIF-1a
157 KEQNTSFLLRMKCTLSRGRVTNIKSATWVLCAGHVRVQSERSESGSGFKPEPVTYLVLCICEPIPHPSNIEVPLD gcHIF-1a
159 KEQNTQSFLLRMKCTLSRGRVTNIKSATWVLCAGHVRVQSERSESGSGFKPEPVTYLVLCICEPIPHPSNIEVPLD hHIF-1a
159 KELNTQSFLLRMKCTLSRGRVTNIKSATWVLCAGHVRVQSERSESGSGFKPEPVTYLVLCICEPIPHPSNIEVPLD mHIF-1a
159 KEQNTQSFLLRMKCTLSRGRVTNIKSATWVLCAGHVRVQSERSESGSGFKPEPVTYLVLCICEPIPHPSNIEVPLD rHIF-1a

PAS-B

239 SKTFLSRHTLDMKFSYCDERITELMGYEPDLDLNRSVYEEYHALSDHDLTKTHHNLFAKQATTGQYRMLAKKGGFVWVE zHIF-1a
237 SKTFLSRHTLDMKFSYCDERITELMGYEPDLDLNRSVYEEYHALSDHDLTKTHHNLFAKQATTGQYRMLAKKGGFVWVE gcHIF-1a
239 SKTFLSRHTLDMKFSYCDERITELMGYEPDLDLNRSVYEEYHALSDHDLTKTHHNLFAKQATTGQYRMLAKKGGFVWVE hHIF-1a
239 SKTFLSRHTLDMKFSYCDERITELMGYEPDLDLNRSVYEEYHALSDHDLTKTHHNLFAKQATTGQYRMLAKKGGFVWVE mHIF-1a
239 SKTFLSRHTLDMKFSYCDERITELMGYEPDLDLNRSVYEEYHALSDHDLTKTHHNLFAKQATTGQYRMLAKKGGFVWVE rHIF-1a

319 TQATVIYNPKNSQPQCIVCVNYVLSGIVEGDVVLSQLQQTVEPKAVEKESSETEEKTSELDILKLFKPELNCLESSTL zHIF-1a
317 TQATVIYNPKNSQPQCIVCVNYVLSGIVEGDVVLSQLQQTVEPKAVEKESQKVEDEASEVDMLKFKPENLKPMECSDL gcHIF-1a
319 TQATVIYNPKNSQPQCIVCVNYVLSGIVEGDVVLSQLQQTVEPKAVEKESQKVEDEASEVDMLKFKPENLKPMECSDL hHIF-1a
319 TQATVIYNPKNSQPQCIVCVNYVLSGIVEGDVVLSQLQQTVEPKAVEKESQKVEDEASEVDMLKFKPENLKPMECSDL mHIF-1a
319 TQATVIYNPKNSQPQCIVCVNYVLSGIVEGDVVLSQLQQTVEPKAVEKESQKVEDEASEVDMLKFKPENLKPMECSDL rHIF-1a

399 YNKLKEPEALTVLAPAAGDAIISLDF--NNSDSDIQLLKEVPLYNVMLPSSSEKLP---LSLSPLTPSDSIPALT--- zHIF-1a
397 YEQLKEPEALTVLAPAAGDTIISLDF--NNSDSMQLVKDVPLYNVMLPSSSEKLP---ISLSALTPSDPTALS--- gcHIF-1a
387 FDKLKEPEALTVLAPAAGDTIISLDFSGSDTETEDDQLEEDVPLYNVMLPSSSEKLP---NINLAMSPLPASETPKPLRSSA hHIF-1a
387 FDKLKEPEALTVLAPAAGDTIISLDFSGSDTETEDDQLEEDVPLYNVMLPSSSEKLP---NINLAMSPLPASETPKPLRSSA mHIF-1a
387 FDKLKEPEALTVLAPAAGDTIISLDFSGSDTETEDDQLEEDVPLYNVMLPSSSEKLP---NINLAMSPLPASETPKPLRSSA rHIF-1a

* ODD

471 -----KLETTGGEDFPFSSASDRVPDPTNTPSTSLGSSGP-----NSPMDYGFVPEPDISSEFK zHIF-1a
469 -----KLETRAEDFPFSSASDRVPDPTNTPSTSLGSSGP-----NSPMDYCFQVDSDISSEFK gcHIF-1a
467 DPALNQEVALKLEPNPESLESFTMPQIQDQTPSPSDGSTRQSSPE-----PNSPSEYCFVDSDMVNEFK hHIF-1a
466 DPALNQEVALKLEPNPESLESFTMPQIQDQTPSPSDGSTRQSSPERLLQENVTNPFSPNSPSEYCFVDSDMVNEFK mHIF-1a
466 DPALNQEVALKLEPNPESLESFTMPQIQDQTPSPSDGSTRQSSPE-----PNSPSEYCFVDSDMVNEFK rHIF-1a

NLS4 TAD-N NLS5

525 LDELVEKLFADTEAKNPFSTQDQMEDLDLEMLAPYIPMDDDFQLRIPSPDLPLPSATHSVSAMSSL----FQPL----PS zHIF-1a
523 LDELVEKLFADTEAKNPFSTQDQMEDLDLEMLAPYIPMDDDFQLRIPSPDLPLPSATHSVSAMSSL----FQPL----PS gcHIF-1a
533 LDELVEKLFADTEAKNPFSTQDQMEDLDLEMLAPYIPMDDDFQLRIPSPDLPLPSATHSVSAMSSL----FQPL----PS hHIF-1a
546 LDELVEKLFADTEAKNPFSTQDQMEDLDLEMLAPYIPMDDDFQLRIPSPDLPLPSATHSVSAMSSL----FQPL----PS mHIF-1a
532 LDELVEKLFADTEAKNPFSTQDQMEDLDLEMLAPYIPMDDDFQLRIPSPDLPLPSATHSVSAMSSL----FQPL----PS rHIF-1a

*

596 SPASPASSTSTVKQEASSRA-----PSPLHLLQEVCSAPVSPFSG--SRDASPVR--STPQS zHIF-1a
594 -PASPASSTSTVKQEASSRA-----PSPLHLLQEVCSAPVSPFSG--SRDASPVR--STPQS gcHIF-1a
612 ---ANATTTTATDELKTVTKDRMEDIKILIASPSPTHIKETTATSSPYRDTQSRRTASPNRAGKGVIEQTEKSHPRS hHIF-1a
622 IT---ATATTTTATDELKTVTKDRMEDIKILIASPSPTHIKETTATSSPYRDTQSRRTASPNRAGKGVIEQTEKSHPRS mHIF-1a
608 ITVTAATATTTATDELKTVTKDRMEDIKILIASPSPTHIKETTATSSPYRDTQSRRTASPNRAGKGVIEQTEKSHPRS rHIF-1a

651 ----SSQLNRR-----EMSPKMLAFQNIQRKRKLNEVTSLSAEVGLGALLHSVD--SAIDPGKRAKVLKGVSSVGLG zHIF-1a
648 ----SNQLNRR-----ELSPKMLAIQVQRKRKLNEVTSLSAEVGLGALLHSVD--SAIEPGKRAKVLKGVSSVGLG gcHIF-1a
688 PNVLVSLQRTVPEEELNPKILALQNAQRKRKMEHDGSLFQAAGIGTLLQPPDHAATSLSWKRVKGCSSSEQNGME hHIF-1a
699 LN-LSATLNQRNTVPEEELNPKIATQNAQRKRKMEHDGSLFQAAGIGTLLQPPDHAATSLSWKRVKGVISSEQNGTE mHIF-1a
688 LN-LSVTLNQRNTVPEEELNPKIATQNAQRKRKMEHDGSLFQAAGIGTLLQPPDHAATSLSWKRVKGVISSEQNGME rHIF-1a

TAD-C

718 NKTILILPSDVLASRLSSLEGSGGLPQLTRYDCEVNAPVQDRHLLQGEELLRALDQVN zHIF-1a
715 NKTILILPSDVLASRLSSLEGSGGLPQLTRYDCEVNAPVQDRHLLQGEELLRALDQVN gcHIF-1a
768 KQTILILPSDLACRLLGQSMDESG-LPQLTSYDCEVNAPIQGSRNLLQGEELLRALDQVN hHIF-1a
778 KQTILILPSDLACRLLGQSMDESG-LPQLTSYDCEVNAPIQGSRNLLQGEELLRALDQVN mHIF-1a
767 KQTIFLILPSDLACRLLGQSMDESG-LPQLTSYDCEVNAPIQGSRNLLQGEELLRALDQVN rHIF-1a

*

Figura 2. Ortólogos de Hif-1 α y sus dominios. Mediante un alineamiento múltiple de secuencias aminoacídicas se estudió la homología entre Hif-1 α de pez cebra y sus ortólogos (carpa, humano, ratón y rata). Hif-1 α codifica para una proteína de 777 aminoácidos. En color se marcan los dominios funcionales de Hif-1 α : bHLH (dominio de unión a DNA), PAS (dominio de dimerización), NLS (secuencias de localización nuclear), ODD (dominio regulatorio) y TAD-N y TAD-C (dominios transactivadores). Los residuos aminoacídicos regulatorios se encuentran marcados con asterisco. La homología entre los diferentes ortólogos es variable, pero al analizar cada dominio se observa una conservación superior al 72%, lo que denota una conservación funcional a través de las distintas especies (Rojas y col., 2007).

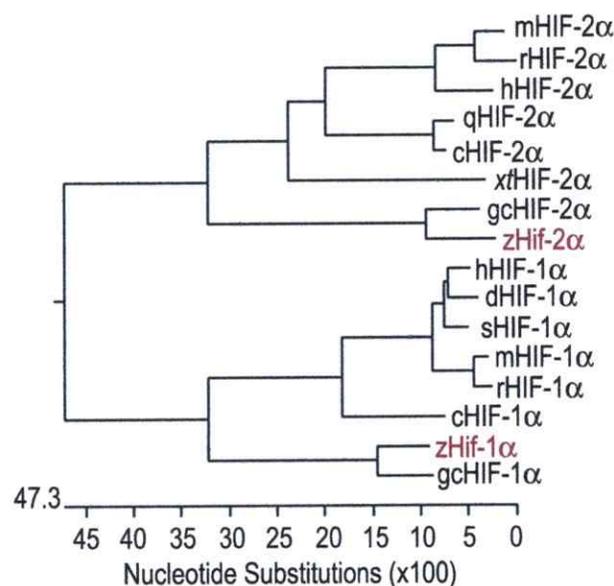


Figura 3. Árbol filogenético. Se realizó un alineamiento múltiple de secuencias aminoacídicas de Hif-1 α usando el algoritmo CLUSTALW. El árbol filogenético se generó mediante MegAlign (DNASTAR). Las líneas horizontales indican el grado de cercanía entre los HIFs- α de los distintos vertebrados. Simbología: gc- carpa (*Ctenopharyngodon idella*), h- humano (*Homo sapiens*), m- ratón (*Mus musculus*), r- rata (*Rattus novergicus*), s- ardilla thiertee-lined ground squirrel (*Spermophilus tridecemlineatus*), d- perro (*Canis familiaris*), c- pollo (*Gallus gallus*), xt- *Xenopus* (*Xenopus tropicalis*), q- codorniz (*Coturnix coturnix*) y z- pez cebra (*Danio rerio*) (Rojas y col., 2007).

Posteriormente, se analizó la estructura primaria de la proteína Hif-1 α de pez cebra para localizar los dominios funcionales **bHLH**, **PAS-A**, **PAS-B**, **ODDD**, **TAD-N** y **TAD-C**, descritos anteriormente para los HIF-1 α de otros vertebrados (Jiang y col, 1996; Ruas y col., 2002). Cuando se alinearon cada uno de estos dominios conservados con los de HIF-1 α de pez carpa, humano, ratón y rata, se encontró identidad superior al 72% (**Tabla I**). También, se identificaron los aminoácidos correspondientes a P₄₀₂, K₅₃₂ y P₅₆₄, descritos en el dominio ODDD de HIF-1 α de humano como esenciales para su regulación por degradación en presencia de oxígeno. Se sabe que estos residuos sufren

modificaciones post-traduccionales (hidroxilaciones y acetilaciones) en condiciones de normoxia, permitiendo la degradación de HIF-1 α vía ubiquitina-ligasa-proteosoma. En nuestra secuencia estos aminoácidos conservados corresponden a P₄₁₄, K₅₂₄ y P₅₅₇. Por otro lado, también se identificó el residuo N₇₅₄ en el dominio TAD-C de Hif-1 α , el que posiblemente es hidroxilado por Fih-1 en condiciones de normoxia, bloqueando el reclutamiento de coactivadores, tales como p300/CBP. Estos resultados sugieren que Hif-1 α de pez cebra también se encontraría regulado por oxígeno en su estabilidad y actividad en condiciones de normoxia.

Tabla I. Identidad de los dominios de Hif-1 α de pez cebra con ortólogos de carpa, humano, ratón y rata.

Dominios de HIF	Hif-1 α de pez cebra vs.			
	Pez carpa	Humano	Ratón	Rata
bHLH	100	93	91	91
PAS A	98	76	76	72
PAS B	98	88	87	86
TAD-N	91	89	86	84
TAD-C	100	100	80	82
NLS1	100	100	100	100
NLS2	100	90	90	90
NLS3	90	50	40	60
NLS4	100	8	91	91
NLS5	100	100	100	100

Porcentajes de identidad determinados por el alineamiento múltiple de secuencias aminoacídicas entre Hif-1 α de pez cebra y sus ortólogos pez carpa, humano, ratón y rata. Se consideró sólo la región correspondiente a cada dominio para calcular la identidad. Los números corresponden a porcentajes.

3.2 Estructura genómica de *hif-1α*.

La estructura genómica se obtuvo comparando las secuencias del clon genómico disponible en la bases de datos correspondiente a *hif-1α* de pez cebra (**BX255914**) con el clon de cDNA identificado como *hif-1α* de pez cebra (**AY326951**). El alineamiento de secuencias reveló que el gen de *hif-1α* se encontraría formado por 14 intrones y 15 exones, al igual que lo reportado para humano y ratón (Iyer y col., 1998b; Luo y col., 1997). Los tamaños de los 15 exones son de Ex1, 270pb; Ex2, 190pb; Ex3, 152pb; Ex4 85; Ex5, 110; Ex6, 203; Ex7, 107; Ex8, 113; Ex9, 292; Ex10, 350; Ex11, 123; Ex12, 335; Ex 13, 91; Ex14, 118 y Ex15, 155 pb. Los tamaños de los intrones por su parte son i1; 13.014 pb, i2; 3.364 pb, i3; 86 pb, i4; 93 pb, i5; 797 pb, i6; 1.293 pb, i7; 138 pb, i8; 579 pb, i9; 2.424 pb, i10; 115 pb, i11; 343 pb, i12; 683 pb, i13; 122 pb e i14; 1.731 pb. El codón que codifica para la metionina de inicio de la traducción se encuentra en el primer exón, tal como en humano y ratón (Iyer y col., 1998b) (**Figura 4, Tabla II**).

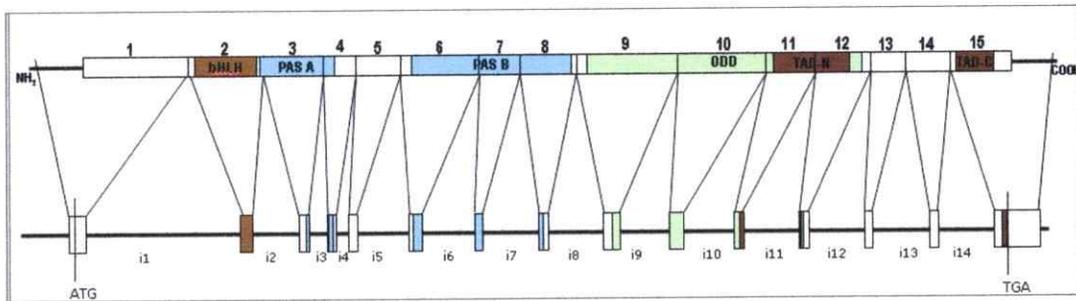


Figura 4. Estructura genómica de *hif-1α* de pez cebra. El gen de *hif-1α* de pez cebra está compuesto por 14 intrones, 15 exones.

Tabla II. Estructura genómica de *hif-1 α* de pez cebra.

Exón (pb)	Intrón Extremo 3'	Exón (5' -> 3')	Intrón Extremo 5'
E1 (270)		+237 CTGCAC	AAAAGG ⁺³³
E2 (190)	Ttgtag	+34 GGTGAG	ATTCCG ⁺²²³
E3 (152)	Ttgcag	+224 ATGAAA	ACACAG ⁺³⁷⁵
E4 (85)	Tcttag	+376 TTTGAT	GAACAG ⁺⁴⁶
E5 (110)	Gttag	+461 GATCCA	TGGAAG ⁺⁵⁷⁰
E6 (203)	Tctcag	+571 GTTCTT	TGAAAG ⁺⁷⁷³
E7 (107)	Ccaaag	+774 GATCAC	ACAACC ⁺⁸⁸⁰
E8 (113)	Ctgcag	+881 TGTTTCG	TCTCAG ⁺⁹⁹³
E9 (292)	Atccag	+994 TGCCAT	ACTCAG ⁺¹²⁸⁵
E10(350)	Ctccag	+1286 ATTCTG	TCGGGG ⁺¹⁵¹²
E1 (123)	Tcttag	+1513 CCCAAC	ACCCAG ⁺¹⁶³⁵
E12(335)	Ttacga	+1636 CCCATG	CAACAG ⁺¹⁹⁷⁰
E13 (91)	Ttacga	+1971 AGAAAT	GGACTG ⁺²⁰⁶¹
E14(118)	Ctgcag	+2062 GTGCT	CCTCTG ⁺²¹⁷⁹
E15(155)	Ctgcag	+2180 ATGTGG	TGA ⁺²³³⁴

Secuencias de unión intrón-exón de la estructura genómica de *hif-1 α* de pez cebra. Las letras minúsculas corresponden al intrón y las letras mayúsculas al exón.

3.3 Expresión temporal y espacial de *hif-1 α* analizado por RT-PCR semicuantitativo y PCR en tiempo real.

Se realizaron estudios de RT-PCR para analizar la expresión temporal del factor inducible por hipoxia *hif-1 α* , en embriones de pez cebra de diferentes estadios embrionarios y tejidos disecados de peces adultos.

Los resultados obtenidos de la amplificación de *hif-1 α* mostraron que la expresión del mensajero es detectada desde las 0 hpf (huevos recién fertilizados). Los resultados obtenidos por RT-PCR semicuantitativo sugieren que *hif-1 α* se expresa en diferentes niveles durante todos los estadios analizados (**Figura 5**). Asimismo, quisimos estudiar si el mRNA de *hif-1 α* se expresa en tejidos de peces adultos (aproximadamente 1 año de edad). Para esto, se realizó un RT-PCR utilizando como templado RNA total extraído desde músculo, agallas, corazón, cerebro, testículos, hígado, ovario e intestino.

Los resultados mostraron la presencia del transcrito de *hif-1 α* en todos los tejidos analizados (**Figura 5**). Para controlar la cantidad de templado de inicio en cada reacción de RT-PCR se amplificó *β -actina*, presumiendo su expresión constante en todo el organismo (Chen y col., 2002; Mackenzie y col., 2004). Como se observa en la Figura 5, los niveles de *hif-1 α* son mayores en cerebro y agallas, comparado con músculo, corazón, testículo, hígado y ovario, indicando que existen mayores niveles de este mRNA en éstos tejidos.

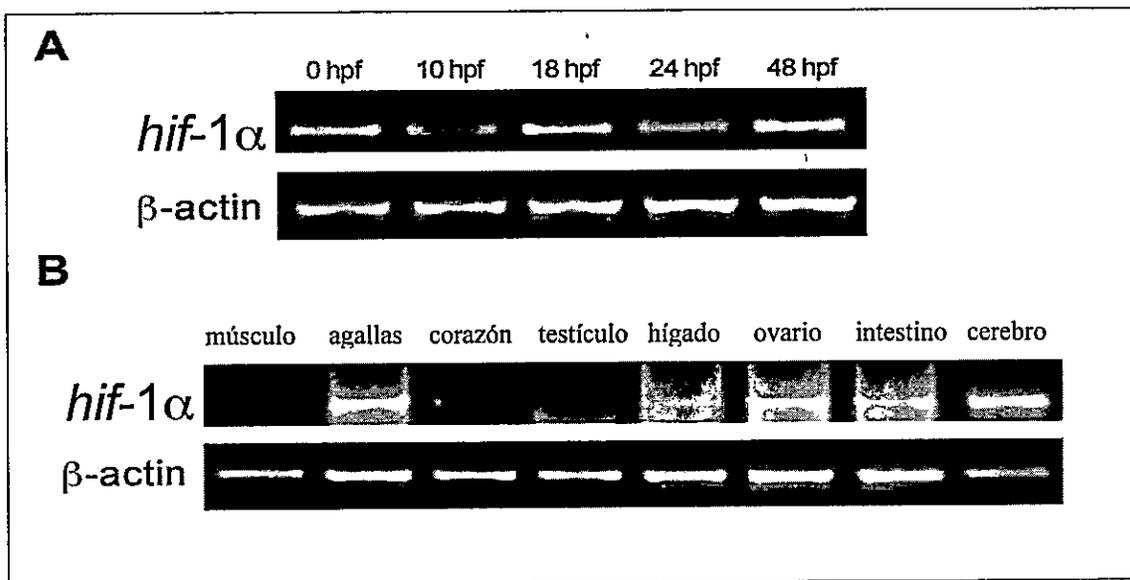


Figura 5. (A) Expresión de *hif-1 α* en diferentes estadios del desarrollo mediante RT-PCR semicuantitativo. El RNA total fue extraído desde los siguientes estadios: 0, 10, 18, 24, 48 y 72 hpf. El transcrito de *hif-1 α* fue detectado en todos los estadios analizados. Como control interno se utilizó *β -actina*. **(B) Expresión de *hif-1 α* en diferentes tejidos de pez cebra adulto usando RT-PCR.** El RNA total fue preparado desde los siguientes tejidos: músculo, agallas, corazón, testículos, hígado, ovario, intestino y cerebro. El mensajero de *hif-1 α* fue detectado en todos los tejidos analizados, detectándose distintos niveles de expresión según el tejido. Se utilizó *β -actina* como control interno de carga de templado (Rojas y col., 2007).

Posteriormente, para corroborar las diferencias en los niveles de expresión del transcrito *hif-1 α* observadas mediante RT-PCR semicuantitativo durante el desarrollo embrionario del pez cebra, se realizó un RT-PCR en tiempo real (qPCR) nuevamente normalizado con *β -actina*. Para estos experimentos se tomó arbitrariamente el estadio de 0 hpf como punto de referencia inicial; de esta manera, se compararon las cantidades de mRNA expresadas en embriones de 10, 18, 24 y 48 hpf con las de 0 hpf. Los resultados muestran que *hif-1 α* se expresa 8 veces por sobre la detección en 0 hpf en el estadio 18 hpf, 2 veces a 24 hpf y 1,5 veces a 48 hpf. Sin embargo, se observaron niveles menores del mRNA de *hif-1 α* a 10 hpf comparado con los determinados a 0 hpf (**Figura 6**).

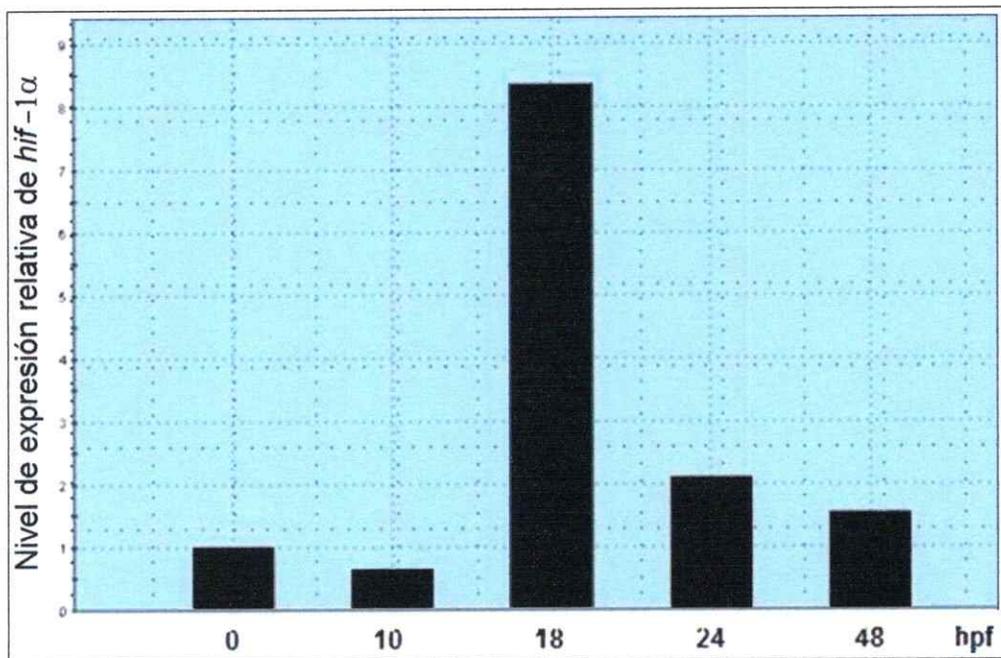


Figura 6. Estudio de la expresión de *hif-1 α* en el desarrollo de pez cebra por PCR en tiempo real. Nivel de expresión del mensajero de *hif-1 α* en diferentes estadios, relativa a la expresión determinada a 0 hpf y normalizado por *β -actina*. La cuantificación se llevó a cabo utilizando 5 μ g de RNA total de 0, 10, 18, 24 y 48 hpf de pez cebra. Se grafica el promedio de dos experimentos independientes.

3.4 Expresión temporal y espacial de *hif-1α* determinado por hibridación *in situ* en embriones de pez cebra.

Se procedió a evaluar la expresión espacial-temporal del gen *hif-1α* durante el desarrollo del pez cebra utilizando hibridación *in situ*. Estos experimentos se realizaron con embriones fijados a 0, 10, 18, 24, 48, 72 y 144 hpf.

La expresión del mensajero detectada por hibridación *in situ* reveló un patrón de expresión dinámico para *hif-1α*. El transcrito se expresó desde el comienzo del desarrollo (0 hpf), lo que indica una contribución materna del mRNA de *hif-1α* al cigoto. A 10 hpf se observa una distribución homogénea del mRNA de *hif-1α*, mientras que a las 18 hpf la expresión del mensajero se restringe hacia las regiones ventrales del embrión. A 24 hpf *hif-1α* se detectó en el epitelio ventricular del cerebro y en la vena caudal posterior. Para confirmar la expresión en el epitelio ventricular del cerebro se observaron preparaciones en *flat mount* bajo microscopía DIC (*differential interference contrast*). A las 28 hpf la expresión de *hif-1α* se detectó en estructuras cerebrales, en la notocorda y en la vena caudal posterior. Los embriones de 32 hpf, muestran expresión del mRNA de *hif-1α* en el cerebro y la notocorda. Asimismo, cortes histológicos realizados en embriones de estos estadios muestran el transcrito de *hif-1α* en somitos, notocorda, aorta dorsal y vasos sanguíneos intersegmentales. A las 48 hpf, el transcrito se detectó en cerebro, notocorda, somitos e intestino y a 60 hpf, *hif-1α* se expresó en la región branquial, notocorda, somitos y vasos intersegmentales. A las 72 hpf, la expresión del mRNA de *hif-1α* se detectó en la vena mesencefálica, retina, notocorda, tubo neural, aorta dorsal, vasos intersegmentales, somitos e intestino. Para detectar la

expresión de *hif-1 α* en tejidos con bajos niveles de expresión, se realizó una sobretinción de la hibridación *in situ* en embriones de 72 hpf. Interesantemente, este tratamiento reveló una débil expresión de *hif-1 α* en neuromastos.

A continuación, para verificar la expresión de *hif-1 α* en los vasos sanguíneos de embriones de pez cebra (debido al pequeño diámetro de éstos) se usó el pez cebra transgénico *tg(fli1:egfp^y)*¹. Para esto, primero se realizó una hibridación *in situ* contra *hif-1 α* , y luego la inmunohistoquímica para detectar GFP. Aunque su detección fue difícil, las secciones histológicas de estos experimentos observadas bajo microscopía, confirmaron que *hif-1 α* se expresa en los vasos sanguíneos. Finalmente, en embriones de 144 hpf se observó que *hif-1 α* se expresa en cerebro, vasos sanguíneos, tubo intestinal, retina y *téctum óptico* (**Figura 7**) (Rojas y col., 2007).

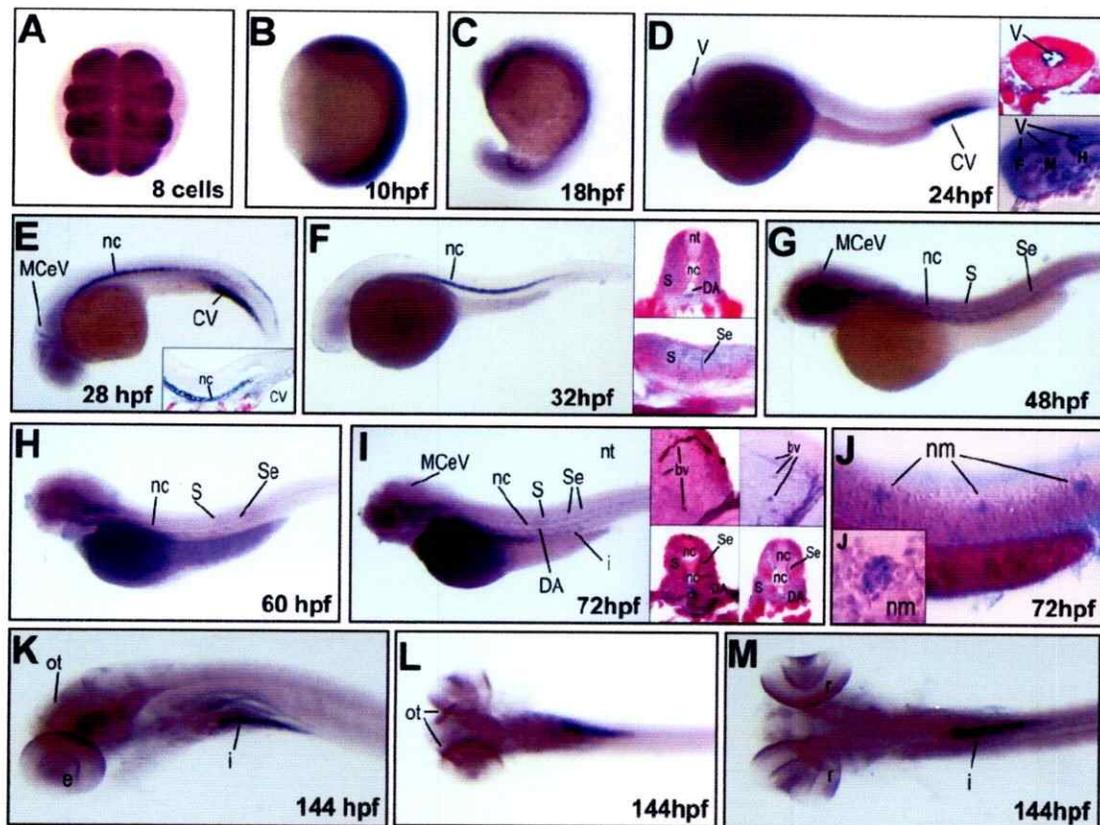


Figura 7. Expresión de *hif-1α* durante el desarrollo del pez cebra. Usando hibridación *in situ* se detectó la expresión del RNA mensajero de *hif-1α* en diferentes estadios de pez cebra. (A y B) El mRNA se detecta en estadios tempranos en forma ubicua y (C) posteriormente comienza a restringirse hacia regiones ventrales del embrión. A corresponde a una vista dorsal; B y C vista lateral, anterior superior. (D) En 24 hpf, *hif-1α* se expresa en el epitelio ventricular. Esto fue confirmado por secciones transversales observadas bajo microscopía DIC (*differential interference contrast*) (Parte superior derecha en D). (E) En 28 hpf, este transcrito se expresa en notocorda, vena caudal y vasos sanguíneos del cerebro. Esto se confirmó por secciones transversales sagitales (Parte derecha en E). (F) En 32 hpf, el mRNA de *hif-1α* se detectó en cerebro y notocorda. Secciones histológicas de estos embriones muestran que este transcrito se expresa en somitos y aorta dorsal (Cortes transversales), así como en vasos sanguíneos intersegmentales (Cortes sagitales) (Parte derecha en F). (G y H) En 48 y 60 hpf, la expresión de *hif-1α* se detecta en cerebro, notocorda, somitos y vasos sanguíneos intersegmentales. (I) En 72 hpf, el transcrito se observa en cerebro, arcos branquiales, vasos sanguíneos intersegmentales, aorta dorsal e intestino. En I se muestran secciones transversales de una inmunohistoquímica contra GFP en el embrión *tg(fli1:egfp^y)¹* y una hibridación *in situ* contra el mensajero de *hif-1α*. (J) Una sobretinción en embriones de 72 hpf reveló expresión de este transcrito en neuromastos bajo microscopía DIC. (K) En 144 hpf, se observa expresión en tectum óptico, retina e intestino en vista dorsal. (L y

M) En vista dorsal de embriones en 144 hpf, se muestra expresión del transcrito en tectum óptico y retina, respectivamente. D - M, los embriones se encuentran en una vista lateral, anterior izquierda. Secciones transversales, vista dorsal superior; secciones sagitales, vista anterior izquierda. Abreviaciones: V, epitelio ventricular; MceV, vena mesencefálica; CV, vena caudal; Se, vasos intersegmentales; DA, aorta dorsal; nc, notocorda; S, somitos; nt, tubo neural; I, intestino; bv, vasos sanguíneos; nm, neuromastos; ot, tectum óptico; e, ojo; r, retina.

3.5 Falta de función del gen *hif-1α* de pez cebra.

Con el objeto de estudiar el efecto de la falta de función de *hif-1α* en el desarrollo de embriones y larvas de pez cebra, se realizaron experimentos de falta de función usando oligonucleótidos antisentido (morfolinos) contra *hif-1α* (MoATG*hif-1α*). Se inyectaron aproximadamente 10 nl de MO*hif-1α* por embrión (3,2 ng de morfolino/embrión) en estadio de una a dos células. Los embriones morfantes mostraron una tasa de supervivencia cercana al 30% en el estadio 50% de epibolia. A las 20 hpf, los embriones morfantes presentaron un fenotipo anormal, observándose alteraciones en la formación de la cola y el acortamiento antero-posterior del embrión (Figura 8), sugiriendo que *hif-1α* jugaría un papel importante en el desarrollo embrionario de pez cebra.

Finalmente, se microinyectaron huevos recién fertilizados provenientes de peces transgénicos *tg(fli1:egfp^y)¹* con el morfolino diseñado contra *hif-1α*. Los embriones morfantes observados a las 20 hpf bajo un microscopio de fluorescencia, presentaron malformación en el desarrollo del sistema vascular, donde se observó ausencia de los vasos intersegmentales, generados por angiogénesis, así como también se observaron alteraciones en vasos de mayor calibre, como la aorta dorsal (generados por vasculogénesis) (Figura 8). Estos resultados indicarían que *hif-1α* sería necesario para

la correcta formación de los vasos sanguíneos durante el desarrollo embrionario del pez cebra.

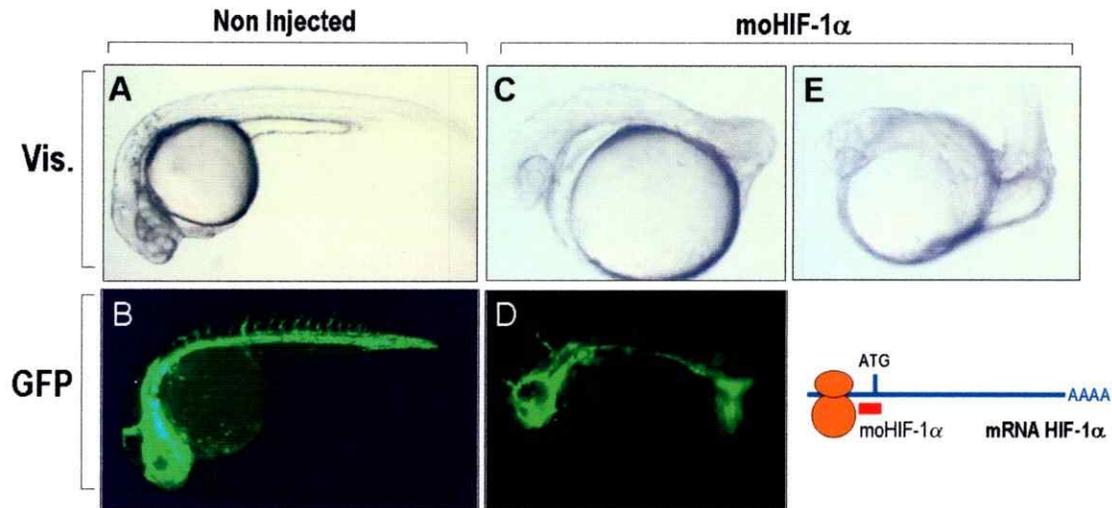


Figura 8. Falta de función de *hif-1α* en embriones transgénicos $tg(fli1:egfp^y)^1$. Se inyectaron 3,2 ng/embrión de morfolino de *hif-1α* (*MOhif-1α*) en embriones transgénicos $tg(fli1:egfp^y)^1$, los que expresan GFP en las células endoteliales. **(A)** A las 20 hpf, se observa un embrión $tg(fli1:egfp^y)^1$ inyectado con morfolino control iluminado con luz visible y **(B)** bajo microscopía de fluorescencia. **(C)** A las 20 hpf, se observa un embrión $tg(fli1:egfp^y)^1$ inyectado con *MOhif-1α* iluminado con luz visible y **(D)** bajo microscopía de fluorescencia. Los embriones morfantes muestran deficiencia en la formación de vasos pequeños, mientras que los vasos grandes se encuentran formados, pero alterados en su morfología. **A, B, C** y **D** se encuentran en una vista lateral, anterior izquierda. En **E** se muestra una vista dorsal del mismo embrión que en **C**. La figura bajo **E** muestra el diseño del *MOhif-1α*.

4. DISCUSION

Durante el desarrollo embrionario de mamíferos existen bajas fisiológicas en la tensión de oxígeno (Lee y col., 2001). Se ha demostrado que en este estado hipóxico, células troncales y precursoras son capaces de proliferar manteniendo su grado de indiferenciación (Morrison y col., 2000; Studer y col., 2000). Asimismo, otros estudios señalan que las células son capaces de responder a estos microambientes de hipoxia mediante el factor de transcripción inducible por hipoxia HIF-1 α , un factor esencial que regula el desarrollo del sistema vascular, placenta, sistema nervioso y otros órganos (Simon y Keith, 2008).

En el presente trabajo se ha demostrado que el factor inducible por hipoxia-1 α , maestro regulador de la homeostasis de oxígeno celular, tiene un ortólogo en el pez cebra y que su función es esencial para su desarrollo embrionario.

4.1 Estructura de Hif-1 α .

La secuencia de cDNA de *hif-1 α* de pez cebra de 3,5 Kb codifica para una proteína de 777 aminoácidos. Esta secuencia tiene un tamaño levemente menor que lo descrito para HIF-1 α de humano, ratón y rata con 826, 836 y 825 aminoácidos, respectivamente. El alineamiento entre la secuencia primaria de Hif-1 α de pez cebra y las de humano, ratón y rata reveló porcentajes de identidad inferiores al 60%, mientras

que el alineamiento entre los dominios funcionales de Hif-1 α (**bHLH (basic helix-loop-helix)**, **PAS-A** y **PAS-B** (Per/Arnt/Sim), **ODDD** (*oxygen-dependent degradation domain*), **TAD-N** (*transactivation domain* amino terminal) y **TAD-C** (*transactivation domain* carboxilo terminal)) y HIF-1 α de pez carpa, humano, ratón y rata mostró porcentajes de identidad superiores al 72% (**Tabla I**). El elevado porcentaje de identidad entre los dominios funcionales de Hif-1 α de pez cebra y los otros vertebrados indica un alto grado de conservación evolutiva de este factor, lo que sugiere que su función en la homeostasis de oxígeno es muy importante.

Se sabe que los residuos de prolina, Pro₄₀₂ y Pro₅₅₇, del dominio ODDD de HIF-1 α son hidroxilados por prolil hidroxilasas, mientras que la lisina K₅₃₂ es acetilada por ARD1 en este dominio de HIF-1 α de humano en normoxia, lo que permite el reconocimiento de la proteína por pVHL (von Hippel-Lindau tumor suppressor protein) para su posterior degradación por el sistema ubiquitina ligasa-proteosoma (Tanimoto y col., 2000). Interesantemente, como resultado del alineamiento entre la secuencia aminoacídica de Hif-1 α de pez cebra y sus ortólogos en vertebrados (**Figura 2**), encontramos que los residuos aminoacídicos Pro₄₁₄, K₅₂₄, Pro₅₅₇ en el ODDD de esta proteína se localizan en el mismo contexto aminoacídico que los residuos Pro₄₀₂, K₅₃₂ y Pro₅₆₄ y Pro₄₀₂, K₅₄₅ y Pro₅₇₇ del ODDD de HIF-1 α de humano y ratón, respectivamente, sugiriendo que estos residuos cumplirían la misma función que los descritos en el ODDD de HIF-1 α de humano y ratón. Lo que sugiere que los residuos Pro₄₁₄, K₅₂₄, Pro₅₅₇ localizados dentro del ODDD de Hif-1 α sufrirían modificaciones post-

traduccionales en normoxia, permitiendo el reconocimiento de esta proteína por la maquinaria proteosómica.

Por otra parte, nuestro análisis del alineamiento del dominio TAD-C de la secuencia aminoacídica de Hif-1 α de pez cebra con sus ortólogos, muestra que el residuo N₇₅₄ se encuentra en el mismo contexto aminoacídico que los residuos, N₈₀₃ de HIF-1 α humano y el N₈₁₃ en el TAD-C de ratón. Estos residuos de Arginina son hidroxilados por FIH-1 (factor de inhibición de HIF-1), produciendo el bloqueo en el reclutamiento del coactivador transcripcional p300/CBP, lo que impide que HIF-1 α promueva la transcripción de sus genes blancos (Lando y col, 2002). Se sugiere que la actividad transcripcional dependiente de Hif-1 α en normoxia sería regulada mediante la hidroxilación del residuo N₇₅₄ en el TAD-C de Hif-1 α de pez cebra.

4.2 Expresión temporal de *hif-1 α* de pez cebra durante el desarrollo embrionario.

Al analizar los resultados de la expresión temporal usando RT-PCR y qPCR (Figura 5), encontramos que *hif-1 α* se expresa en todos los estadios del desarrollo analizados (0, 10, 18, 24 y 48 hpf) (Rojas y col., 2007). Estos resultados sugieren que *hif-1 α* tiene diferentes niveles de expresión durante la embriogénesis, tal como se ha reportado en *Xenopus laevis* por ensayo de protección de ribonucleasa (Sipe y col., 2004). También determinamos la expresión temporal del mensajero de Hif-1 α en músculo, agallas, corazón, testículo, hígado, ovario, intestino y cerebro de peces cebra adultos mediante RT-PCR (Rojas y col., 2007). Esta expresión es similar a la descrita en la literatura, donde solamente se ha mostrado la expresión del mRNA de HIF-1 α de

humano en cerebro, hígado y músculo esquelético utilizando la técnica de Northern blot (Wiener y col., 1996).

Los resultados de expresión de *hif-1 α* en tejidos mostrados en este trabajo indican que existen mayores niveles de este transcrito en cerebro y agallas, en comparación al resto de los tejidos analizados. A este respecto, se ha descrito previamente que el cerebro es un tejido altamente sensible a bajas presiones de oxígeno. Estudios realizados por Chavez y colaboradores (2007), usando un modelo de ratón *knockout* condicional de HIF-1 α específico de neuronas del cerebro anterior, mostraron que al someter a isquemia cerebral focal transiente estos animales K.O. presentaron un aumento en el tejido dañado y disminución en la tasa de supervivencia (Baranova y col., 2007). Además, este grupo demostró que drogas activadoras de HIF-1 α tanto en cultivos celulares como *in vivo* tienen propiedades neuroprotectoras frente a isquemia cerebral. El tratamiento con estas drogas usando el modelo de ratones HIF-1 α ^{-/-} condicionales específicos de neuronas sometidos a isquemia cerebral transiente, mostró una significativa disminución en la regeneración del tejido isquémico, no así en los ratones controles (Baranova y col., 2007). En este trabajo de Tesis describimos que el mRNA de *hif-1 α* se expresa en la región del cerebro del pez cebra durante el desarrollo; esta observación sugiere que este factor de transcripción podría jugar un papel en la formación del sistema nervioso central.

Asimismo, se observó expresión de *hif-1 α* en las agallas, lo que concuerda con que en este tejido ocurre el intercambio de gases, O₂ y CO₂, entre el organismo y el ambiente. Estudios en otros modelos de peces han demostrado que la superficie de

intercambio de gases en las agallas de *Carassius carassius*, aumenta 7,5 veces en respuesta a hipoxia, debido a procesos de muerte y arresto del ciclo de celular en territorios específicos de este tejido (Sollid y col., 2003). Esto sugiere que en condiciones de hipoxia en las que Hif-1 α se estabilizaría, se produce un cambio morfológico en las agallas del pez, capaz de aumentar la captación de oxígeno por procesos que dependen de una amplia variedad de genes, donde HIF-1 α promovería la expresión de genes como p53, p21 (Carmeliet y col., 1998).

No obstante, resultaría necesario realizar estudios que determinen la estabilidad de la proteína Hif-1 α , para establecer la correlación entre la expresión del mRNA y la actividad transcripcional Hif-1 α , considerando que sufre modificaciones post-traduccionales que regulan su estabilidad. Para esto, en el laboratorio del Dr. Reyes se está trabajando en la generación de un anticuerpo policlonal contra una región de Hif-1 α de pez cebra.

4.3 Patrón de expresión de *hif-1 α* durante el desarrollo embrionario del pez cebra.

El análisis de la expresión de *hif-1 α* por hibridación *in situ* (Figura 7) mostró que el patrón de expresión de *hif-1 α* es dinámico durante el desarrollo. Este factor está presente desde las 0 horas post fertilización, lo que indica una contribución materna del mRNA de *hif-1 α* al cigoto. Nuestros resultados de la hibridación *in situ* son comparables con los descritos en ratón, *Xenopus laevis* y pollo (Jain y col., 1998; Sipe y col., 2004; Etchevers, 2002), aunque en ninguno de estos trabajos se describe con detalle la expresión de *hif-1 α* durante el desarrollo (Rojas y col., 2007). En ratón, en el estadio

E9,5 el mRNA de HIF-1 α se expresa en altos niveles en el neuroepitelio del cerebro, espina cordal, ganglio trigémino, arcos branquiales, corazón, primordio hepático e intestino primitivo (Jain y col., 1998). En E13,5 este transcrito tiene un amplio espectro de expresión con elevados niveles en epitelio olfatorio y neural, desarrollo del timo, glándula pituitaria, pared ventricular del corazón y riñones. En estadios posteriores en ratón, el mensajero de HIF-1 α se expresa de forma ubicua con niveles relativamente menores de expresión (Jain y col., 1998). Por otra parte, trabajos realizados en *Xenopus laevis*, muestran que el patrón espacial del mensajero de Xhif-1 α se expresa constitutivamente en bajos niveles durante la embriogénesis, sin embargo, éstos aumentan luego de la gastrulación. En estadios más tardíos de *Xenopus*, se observaron niveles elevados de expresión de Xhif-1 α en sistema nervioso y somitos. Secciones transversales realizadas para caracterizar el patrón de expresión de *hif-1 α* de pez cebra mostraron elevada expresión en tubo neural y somitos, tal como lo reportado en *Xenopus* (Sipe y col., 2004). Otro patrón de expresión descrito de *hif-1 α* en embriones de pollo, muestra este transcrito en regiones proliferativas del sistema nervioso, retina, mesencéfalo y telencéfalo (Etchevers, 2002).

Los resultados de expresión de *hif-1 α* de pez cebra y los *hif-1 α* de ratón, *Xenopus* y pollo (Rojas y col., 2007; Jain y col., 1998; Sipe y col., 2004; Etchevers, 2002), describen la expresión de este factor de transcripción principalmente en el sistema nervioso durante la embriogénesis, lo que sugiere una función asociada de este gen en este territorio. Se ha establecido que HIF-1 α es esencial para el desarrollo del sistema nervioso central durante la embriogénesis usando un modelo de ratón *knockout*

condicional (C.K.O.) específico de células neuronales (Tomita y col., 2003). Para generar este ratón *knockout* se utilizó el sistema Cre-LoxP, en el que la expresión de la transposasa Cre se encuentra dirigida bajo el promotor de nestina, gen que se expresa exclusivamente en células neuronales; por lo tanto, estos ratones son *knockouts* condicionales de HIF-1 α específicos de células neuronales. El fenotipo de estos ratones muestra hidrocefalia, disminución en el número de células neuronales y pérdida de memoria espacial (Tomita y col., 2003). Experimentos de TUNEL e inmunohistoquímica contra CD31 (un marcador de células endoteliales) en E19, demostraron que la apoptosis coincide con una disminución en la densidad de vasos sanguíneos en el telencéfalo de los ratones mutantes, posiblemente por la falla en la mantención de los vasos sanguíneos formados. Este fenotipo fue totalmente rescatado por la electroporación *in utero* de HIF-1 α en el embrión (Tomita y col., 2003).

Lo anterior sugiere que HIF-1 α es esencial para el desarrollo normal del cerebro en condiciones normales de oxígeno durante el desarrollo embrionario en vertebrados (Tomita y col., 2003).

La caracterización del patrón de expresión del transcrito de *hif-1 α* de pez cebra concuerda con los estudios realizados donde se utiliza un marcador de hipoxia, pimonidazole, que es convertido en hipoxia, por nitrorreductasas activadas, en un reactivo capaz de unirse covalentemente a moléculas dentro de la célula, que a su vez es reconocido por su anticuerpo (Lee y col., 2001). Durante el desarrollo embrionario de ratón se observaron regiones hipóxicas durante la formación del sistema nervioso central. En regiones como el tubo neural se observó colocalización de regiones hipóxicas

con la expresión de la proteína HIF-1 α y de VEGF, indicando que la estabilización de HIF-1 α por hipoxia promovería la expresión de VEGF y la formación de vasos sanguíneos, lo que sugiere que eventos de hipoxia durante el desarrollo embrionario de ratón promueven la formación del sistema vascular en el embrión. En estadios posteriores en el desarrollo embrionario de ratón, se detectaron regiones hipóxicas en el bulbo olfatorio, somitos, corteza cerebral, tejido conectivo cráneo-facial, muscular y gastrointestinal (Lee y col., 2001).

En este contexto sería interesante realizar estudios en el pez cebra que muestren la existencia de regiones hipóxicas relativas durante el desarrollo embrionario en condiciones de normoxia del medio; posiblemente estas regiones hipóxicas colocalizarían con el patrón de expresión del mRNA de *hif-1 α* en el sistema nervioso y vasos sanguíneos.

También fue posible la detección del mRNA de *hif-1 α* en neuromastos (72 hpf), esta detección concuerda con el papel que cumpliría este factor de transcripción en la regulación transcripcional de CXCR4, receptor de SDF-1, en condiciones de hipoxia. Estudios *in vitro* han demostrado que células como monocitos aumentan los niveles de CXCR4 por la activación de HIF-1 α en condiciones de hipoxia, aparentemente por la estabilización del mRNA de CXCR4, junto con esto también aumenta la expresión de VEGF (Schioppa y col., 2003). Ensayos *in vitro* utilizando fibroblastos de ratones normales y *knockout* de HIF-1 α mostraron que éste es necesario para la expresión de CXCR4 y de VEGF (Schioppa y col., 2003). De este modo *hif-1 α* podría estar activando la expresión de CXCR4 en las células de los neuromastos en estadios

tempranos de la migración del primordio para el establecimiento de la línea lateral del pez cebra (David y col., 2002). Por otra parte, la detección de *hif-1 α* en neuromastos a las 72 hpf, podría correlacionarse con el aumento en la expresión de componentes de la vía de señalización de Notch (*notch3*, *deltaA* y *atoh1a*), que ocurre cuando regeneran las células ciliadas (*hair cells*), que forman parte de los neuromastos, al sufrir muerte celular inducida por exposición a drogas y cobre (Ma y col., 2008). De esta manera, Hif-1 α podría potenciar la actividad de Notch (Gustafsson y col., 2005) en células precursoras de los neuromastos, aumentando la proliferación de éstas en el proceso de regeneración de los neuromastos de la línea lateral posterior. Esta co-localización sugiere la participación de la llamada vía no canónica, de interacción entre Hif-1 α y Notch en condiciones de hipoxia durante la regeneración de los neuromastos (Ma y col., 2008; Gustafsson y col., 2005).

4.4 Falta de función de *hif-1 α* en el pez cebra.

Los morfolidos son oligonucleótidos antisentidos modificados químicamente con estructura similar a los nucleótidos que forman el DNA, pero con un grupo morfolido en lugar de ribosa, que además presenta una unión a un grupo fosforodiamidato resultando en un esqueleto de morfolido de carga neutra. Ambas modificaciones lo hacen un polímero altamente soluble, capaz de hibridar con ácidos nucleicos de simple hebra con una alta afinidad, baja toxicidad y libre de efectos laterales no específicos (a bajas concentraciones). Además, no están sujetos a degradación enzimática. Todo lo anterior hace que los morfolidos sean una eficaz herramienta para bloquear la traducción del mRNA tanto *in vitro* como *in vivo* (Ekker, 2000). Así, es posible utilizarlos para realizar

estudios de falta de función de nuestro gen de interés, *hif-1 α* , durante la embriogénesis. Sin embargo, el uso de morfolinós no asegura una completa eliminación de la proteína en estudio, lo que dependerá de las dosis administradas y su correcta distribución en las células.

En el laboratorio del Dr. Reyes contamos con un pez transgénico *tg(fli1:egfp^y)¹*, que expresa GFP bajo el control del promotor *fli1*, un factor de transcripción específico de células endoteliales (Lawson y Weinstein, 2002). El uso de este pez transgénico permite observar *in vivo* el desarrollo de la vascular durante la embriogénesis de pez cebra, lo que facilita el análisis de genes que afectan el desarrollo vasos sanguíneos en vertebrados (Lawson y Weinstein, 2002). Estudios previos han demostrado que dentro de los blancos transcripcionales de HIF-1 α se encuentra el factor angiogénico VEGF (*vascular endothelial growth factor*) (Semenza, 1999). Por este motivo, realizamos estudios de falta de función de *hif-1 α* en peces transgénicos *tg(fli1:egfp^y)¹*. Estos ensayos mostraron alteraciones en el desarrollo del sistema vascular de los peces morfantes antes de las 26 hpf, período en el que comienza la circulación sanguínea (Lawson y Weinstein, 2002). Estos resultados, concuerdan con estudios donde se han usado ratones K.O. de HIF-1 α en los que existen entre E8,75 y E9,25 remodelamiento vascular en la región cefálica concomitante con una marcada muerte celular mesenquimática y en E10,5 arresto del desarrollo y letalidad (Iyer y col., 1998a; Kotch y col., 1999).

Los resultados obtenidos para la falta de función de *hif-1 α* en embriones *tg(fli1:egfp^y)¹*, se correlacionan con la expresión de *hif-1 α* descrita en este trabajo, donde

se muestra la expresión del mRNA de *hif-1α* en vasos sanguíneos a partir de las 24 hpf, detectados por inmunohistoquímica contra GFP posterior a la hibridación *in situ* de *hif-1α* de peces *tg(fli1:egfp^y)*¹. Estos antecedentes sugieren un papel importante de *hif-1α* en la formación de vasos sanguíneos de novo y angiogénesis durante el desarrollo embrionario del pez cebra.

Cabe destacar que para analizar nuestros resultados es necesario realizar experimentos de rescate de función y sobre-expresión de *hif-1α*. Actualmente, experimentos de rescate co-inyectando el mRNA de Hif-1α con el morfolino de *hif-1α* muestran que el fenotipo morfante es rescatado completamente en estos embriones (Carlos Henríquez, comunicación personal).

5. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos podemos concluir:

1. El factor inducible por hipoxia 1 alpha, *hif-1 α* , presenta un homólogo en el pez cebra. Esta proteína presenta una estructura primaria definida por sus dominios funcionales (bHLH, PASs, ODDD, TAD-N y TAD-C), los que se encuentran altamente conservados entre vertebrados.
2. El mRNA de *hif-1 α* se expresa durante el desarrollo de pez cebra en condiciones de normoxia del medio y tiene un patrón de expresión dinámico, siendo similar con lo descrito en ratón, *Xenopus* y pollo.
3. La falta de función de Hif-1 α provoca una tasa de mortalidad de 70 % por lo que este factor sería muy importante durante la embriogénesis de pez cebra.
4. La expresión espacial de *hif-1 α* en los vasos sanguíneos es concordante con los estudios de falta de función en embriones transgénicos *tg(fli1:egfp^{yl})* de pez cebra, sugiriendo que al igual que lo descrito en otros organismos, este factor participaría en el establecimiento del sistema vascular durante la embriogénesis.

6. PROYECCIONES

Actualmente en el laboratorio del Dr. Reyes se están realizando estudios para determinar la función de *hif-1 α* durante la embriogénesis del pez cebra, específicamente en la formación del sistema nervioso. Estos se enfocan en el análisis de la falta de función de *hif-1 α* usando morfolinós y la sobre-expresión de *hif-1 α* clonado completamente en pCS2-Myc. Se estudiará el efecto de Hif-1 α sobre la proliferación celular mediante ensayos de incorporación de BrdU e inmunostquímica usando el anticuerpo anti-pCNA, así como muerte celular mediante TUNEL y naranja de acridina. Además, por hibridación *in situ* se detectará el efecto sobre marcadores de cerebro (*isl-1*, *tcf4*, *krox20*, *pax2.1*, *neurogenina*, *huc*), así como la expresión de proteínas neuronales por inmunohistoquímica (anti-tubulina acetilada, anti-*isl1* y HNK/Zn12). El laboratorio cuenta con peces transgénicos que expresan GFP en el sistema nervioso central y periférico bajo el control del promotor de HuC e *Isl-1*.

7. BIBLIOGRAFIA

- Baranova, O., Miranda, L.F., Pichiule, P., Dragatsis, I., Johnson, R.S., Chavez, J.C. 2007. Neuron-specific inactivation of the hypoxia inducible factor 1 alpha increases brain injury in a mouse model of transient focal cerebral ischemia. *J. Neurosci.* **27**: 6320-32.
- Bergwerff, M., Verberne M.E., DeRuiter, M.C., Poelmann, R.E., Gittenberger-de Groot, A.C. 1998. Neural crest cell contribution to the developing circulatory system: implications for vascular morphology?. *Circ. Res.* **82**: 221-31.
- Berra, E., Benizri, E., Ginouvès, A., Volmat, V., Roux, D., Pouyssegur, J. 2003. HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1alpha in normoxia. *EMBO J.* **22**: 4082-90.
- Brahimi-Horn, C., Pouyssegur, J. 2005. When hypoxia signalling meets the ubiquitin-proteasomal pathway, new targets for cancer therapy. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **53**: 115-23.
- Bruick, R.K. 2003. Oxygen sensing in the hypoxic response pathway: regulation of the hypoxia-inducible transcription factor. *Genes Dev. Review.* **17**: 2614-23.
- Bruick, R.K., McKnight, S.L. 2001. A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science.* **294**: 1337-40.
- Carmeliet, P., Dor, Y., Herbert, J.M., Fukumura, D., Brusselmans, K., Dewerchin, M., Neeman, M., Bono, F., Abramovitch, R., Maxwell, P., Koch, C.J., Ratcliffe, P., Moons, L., Jain, R.K., Collen, D., Keshert E. 1998. Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature.* **394**: 485-90.
- Carrero, P., Okamoto, K., Coumailleau, P., O'Brien, S., Tanaka, H., Poellinger, L. 2000. Redox-regulated recruitment of the transcriptional coactivators CREB-binding protein and SRC-1 to hypoxia-inducible factor 1alpha. *Mol. Cell. Biol.* **20**: 402-15.
- Chen, W.Y., John, J.A., Lin, C.H., Chang, C.Y., 2002. Molecular cloning and developmental expression of zinc finger transcription factor MTF-1 gene in zebrafish, *Danio rerio*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **291**, 798-805.

- David, N.B., Sapède, D., Saint-Etienne, L., Thisse, C., Thisse, B., Dambly-Chaudière, C., Rosa, F.M., Ghysen, A. 2002. Molecular basis of cell migration in the fish lateral line: role of the chemokine receptor CXCR4 and of its ligand, SDF1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**: 16297-302.
- Eisen, J.S. Zebrafish make a big splash. *Cell.* 1996. **87**: 969-77.
- Ekker SC. 2000. Morphants: a new systematic vertebrate functional genomics approach. *Yeast.* **17**: 302-306. Review.
- Etchevers, H.C. 2003. Early expression of hypoxia-inducible factor 1alpha in the chicken embryo. *Gene Expr. Patterns.* **3**: 49-52.
- Gu, Y.Z., Hogenesch, J.B., Bradfield, C.A. 2000. The PAS superfamily: sensors of environmental and developmental signals. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. Review.* **40**: 519-61.
- Gustafsson, M.V., Zheng, X., Pereira, T., Gradin, K., Jin, S., Lundkvist, J., Ruas, J.L., Poellinger, L., Lendahl, U., Bondesson, M. 2005. Hypoxia requires notch signaling to maintain the undifferentiated cell state. *Dev. Cell.* **9**: 617-28.
- Haffter, P., Granato, M., Brand, M., Mullins, M.C., Hammerschmidt, M., Kane, D.A., Odenthal, J., van Eeden, F.J., Jiang, Y.J., Heisenberg, C.P., Kelsh, R.N., Furutani-Seiki, M., Vogelsang, E., Beuchle, D., Schach, U., Fabian, C., Nusslein-Volhard, C., 1996. The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, *Danio rerio*. *Development.* **123**: 1-36.
- Huang, L.E., Arany, Z., Livingston, D.M., Bunn, H.F. 1996. Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its alpha subunit. *J. Biol. Chem.* **271**: 32253-9.
- Huang, J., Zhao, Q., Mooney, S.M., Lee, F.S. 2002. Sequence determinants in hypoxia-inducible factor-1alpha for hydroxylation by the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3. *J. Biol. Chem.* **277**: 39792-800.
- Ingham, P.W. 1997. Zebrafish genetics and its implications for understanding vertebrate development. *Hum. Mol. Genet. Review.* **6**: 1755-60.
- Ivan, M., Haberberger, T., Gervasi, D.C., Michelson, K.S., Günzler, V., Kondo, K., Yang, H., Sorokina, I., Conaway, R.C., Conaway, J.W., Kaelin, W.G. 2002. Biochemical purification and pharmacological inhibition of a mammalian prolyl hydroxylase acting on hypoxia-inducible factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**: 13459-64.

- Iyer, N.V., Kotch, L.E., Agani, F., Leung, S.W., Laughner, E., Wenger, R.H., Gassmann, M., Gearhart, J.D., Lawler, A.M., Yu, A.Y., Semenza G.L. 1998. Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Genes Dev.* **12**: 149-62.
- Iyer, N.V., Leung, S.W., Semenza, G.L. 1998. The human hypoxia-inducible factor 1 alpha gene: HIF1A structure and evolutionary conservation. *Genomics.* **52**: 159-65.
- Jaakkola, P., Mole, D.R., Tian, Y.M., Wilson, M.I., Gielbert, J., Gaskell, S.J., Kriegsheim, A.V., Hebestreit, H.F., Mukherji, M., Schofield, C.J., Maxwell, P.H., Pugh, C.W., Ratcliffe, P.J. 2001. Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science.* **292**: 468-72.
- Jain, S., Maltepe, E., Lu, M.M., Simon, C., Bradfield, C.A. 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., Kim, K.W. 2002. Regulation and destabilization of HIF-1alpha by ARD1-mediated acetylation. *Cell.* **111**: 709-20.
- Jiang, B.H., Rue, E., Wang, G.L., Roe, R., Semenza, G.L. 1996. Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol. Chem.* **271**: 17771-8.
- 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**: 240-5.
- 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. .
- Kallio, P.J., Pongratz, I., Gradin, K., McGuire, J., Poellinger, L. 1997. Activation of hypoxia-inducible factor 1alpha: posttranscriptional regulation and conformational change by recruitment of the Arnt transcription factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**: 5667-72.
- Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B., Schilling, T.F., 1995. Stages of embryonic development of the zebra fish. *Dev. Dyn.* **203**: 253-310.

- Kotch, L.E., Iyer, N.V., Laughner, E., Semenza, G.L. 1999. Defective vascularization of HIF-1 α -null embryos is not associated with VEGF deficiency but with mesenchymal cell death. *Dev Biol.* **209**: 254-67.
- Lando, D., Peet, D.J., Gorman, J.J., Whelan, D.A., Whitelaw, M.L., Bruick, R.K. 2002. FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes Dev.* **16**: 1466-71.
- Lavista-Llanos, S., Centanin, L., Irisarri, M., Russo, D.M., Gleadle, J.M., Bocca, S.N., Muzzopappa, M., Ratcliffe, P.J., Wappner, P. 2002. Control of the hypoxic response in *Drosophila melanogaster* by the basic helix-loop-helix PAS protein similar. *Mol Cell Biol.* **22**: 6842-53.
- Lawson, N.D., Weinstein, B.M. 2002. In vivo imaging of embryonic vascular development using transgenic zebrafish. *Dev. Biol.* **248**: 307-18.
- Lee, Y.M., Jeong, C.H., Koo, S.Y., Son, M.J., Song, H.S., Bae, S.K., Raleigh, J.A., Chung, H.Y., Yoo, M.A., Kim, K.W. 2001. Determination of hypoxic region by hypoxia marker in developing mouse embryos in vivo: a possible signal for vessel development. *Dev Dyn.* **220**: 175-86.
- Luo, G., Gu, Y.Z., Jain, S., Chan, W.K., Carr, K.M., Hogenesch, J.B., Bradfield, C.A. 1997. Molecular characterization of the murine Hif-1 α locus. *Gene Expr.* **6**: 287-99.
- Ma, E.Y., Rubel, E.W., Raible, D.W. 2008. Notch signaling regulates the extent of hair cell regeneration in the zebrafish lateral line. *J Neurosci.* **28**: 2261-73.
- Mackenzie, N.C., Brito, M., Reyes, A.E., Allende, M.L. 2004. Cloning, expression pattern and essentiality of the high-affinity copper transporter 1 (ctr1) gene in zebrafish. *Gene.* **328**: 113-20.
- Maltepe, E., Schmidt, J.V., Baunoch, D., Bradfield, C.A., Simon, M.C. 1997. Abnormal angiogenesis and responses to glucose and oxygen deprivation in mice lacking the protein ARNT. *Nature.* **386**: 403-7.
- Masson, N., Ratcliffe, P.J. 2003. HIF prolyl and asparaginyl hydroxylases in the biological response to intracellular O₂ levels. *J. Cell. Sci. Review.* **116**: 3041-9.
- Morrison, S.J., Csete, M., Groves, A.K., Melega, W., Wold, B., Anderson, D.J. 2000. Culture in reduced levels of oxygen promotes clonogenic sympathoadrenal differentiation by isolated neural crest stem cells. *J. Neurosci.* **20**: 7370-6.
- Ramírez-Bergeron, D.L., Runge, A., Adelman, D.M., Gohil, M., Simon, M.C. 2006. HIF-dependent hematopoietic factors regulate the development of the embryonic vasculature. *Dev Cell.* **11**: 81-92.

- Rojas, D.A., **Perez-Munizaga, D.A.**, Centanin, L., Antonelli, M., Wappner, P., Allende, M.L., Reyes, A.E.. 2007. Cloning of hif-1alpha and hif-2alpha and mRNA expression pattern during development in zebrafish. *Gene Expr. Patterns*. **7**: 339-45.
- Ruas, J.L., Poellinger, L., Pereira, T. 2002. Functional analysis of hypoxia-inducible factor-1 alpha-mediated transactivation. Identification of amino acid residues critical for transcriptional activation and/or interaction with CREB-binding protein. *J Biol Chem*. **277**: 38723-30.
- Ryan, H.E., Lo, J., Johnson, R.S. 1998. HIF-1 alpha is required for solid tumor formation and embryonic vascularization. *EMBO J*. **17**: 3005-15.
- Schioppa, T., Uranchimeg, B., Saccani, A., Biswas, S.K., Doni, A., Rapisarda, A., Bernasconi, S., Saccani, S., Nebuloni, M., Vago, L., Mantovani, A., Melillo, G., Sica, A. 2003. Regulation of the chemokine receptor CXCR4 by hypoxia. *J. Exp. Med*. **198**: 1391-402.
- Sato, Y. 2001. Role of EST family transcription factors in vascular development and angiogenesis. *Cell Structure and function*. **26**: 19-24.
- Schipani, E., Ryan, H.E., Didrickson, S., Kobayashi, T., Knight, M., Johnson, R.S. 2001. Hypoxia in cartilage: HIF-1alpha is essential for chondrocyte growth arrest and survival. *Genes Dev*. **15**: 2865-76.
- Semenza, G.L., Koury, S.T., Nejfelt, M.K., Gearhart, J.D., Antonarakis, S.E. 1991. Hypoxia-Inducible Nuclear Factors Bind to an Enhancer Element Located 3' to the Human Erythropoietin Gene. Cell-type-specific and hypoxia-inducible expression of the human erythropoietin gene in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. **88**: 5680-84.8725-9.
- Semenza, G.L. 1999. Regulation of mammalian O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol. Review*. **15**: 551-78.
- Semenza, G.L. 2000. Expression of hypoxia-inducible factor 1: mechanisms and consequences. *Biochem. Pharmacol. Review*. **59**: 47-53.
- Semenza, G.L. 2003. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer*. **3**: 721-32.
- Simon, M.C., Keith, B. 2008. The role of oxygen availability in embryonic development and stem cell function. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. Review*. **9**: 285-96.
- Sipe, C.W., Gruber, E.J., Saha, M.S. 2004. Short upstream region drives dynamic expression of hypoxia-inducible factor 1alpha during *Xenopus* development.

Dev. Dyn. **230**: 229-38.

- Sollid, J., De Angelis, P., Gundersen, K., Nilsson, G.E. 2003. Hypoxia induces adaptive and reversible gross morphological changes in crucian carp gills. *J. Exp. Biol.* **206**: 3667-73.
- Studer, L., Csete, M, Lee, S.H., Kabbani, N., Walikonis, J., Wold, B., McKay, R. 2000. Enhanced proliferation, survival, and dopaminergic differentiation of CNS precursors in lowered oxygen. *J Neurosci.* **20**: 7377-83.
- Talbot, W.S, Hopkins, N. 2000. Zebrafish mutations and functional analysis of the vertebrate genome. *Genes Dev. Review.* **14**:755-62.
- Tanimoto, K., Makino, Y., Pereira, T., Poellinger, L. 2000. Mechanism of regulation of the hypoxia-inducible factor-1 alpha by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *EMBO J.* **19**: 4298-309.
- Tomita S, Ueno M, Sakamoto M, Kitahama Y, Ueki M, Maekawa N, Sakamoto H, Gassmann M, Kageyama R, Ueda N, Gonzalez FJ, Takahama Y. 2003. Defective brain development in mice lacking the Hif-1alpha gene in neural cells. *Mol. Cell. Biol.* **23**: 6739-49.
- Wang, G.L., Jiang, B.H., Rue, E.A., Semenza, G.L. 1995. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **92**: 5510-4.
- WesterWeld, M. 1995. *The ZebraWsh Book*, fourth ed. University of Oregon Press, Eugene.
- Wiener, C.M., Booth, G., Semenza G.L. 1996. *In Vivo* expression of mRNAs encoding hypoxia inducible factor-1. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* **225**: 485-488.
- Yun, Z., Maecker, H.L., Johnson, R.S., Giaccia, A.J. 2002. Inhibition of PPAR gamma 2 gene expression by the HIF-1-regulated gene DEC1/Stra13: a mechanism for regulation of adipogenesis by hypoxia. *Dev. Cell.* **2**: 331-41.