

UCH-FC
Biotecnología
C.117
C.1



FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

1. **FUNCIÓN DE PROX1 EN EL DESARROLLO DE LA LÍNEA LATERAL DEL PEZ CEBRA.**
2. **REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE LOS GENES *IROQUOIS*: ANÁLISIS DE MODIFICACIONES DE LA CROMATINA EN ELEMENTOS REGULADORES ALTAMENTE CONSERVADOS.**

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

Por
Pablo Ernesto Cabrera Reyes
Julio, 2009
Santiago – Chile



Director de Seminario de Título: Dr. Miguel Allende C



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el Sr.:

PABLO ERNESTO CABRERA REYES

- 1. FUNCIÓN DE PROX1 EN EL DESARROLLO DE LA LÍNEA LATERAL DEL PEZ CEBRA.**
- 2. REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE LOS GENES *IROQUOIS*: ANÁLISIS DE MODIFICACIONES DE LA CROMATINA EN ELEMENTOS REGULADORES ALTAMENTE CONSERVADOS.**

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

Dr. Miguel Allende Connelly

Director Seminario de Título

Comisión de Evaluación

Dr. Alvaro Glavic Maurer

Presidente

Dr. Lorena Norambuena

Evaluadora



Santiago de Chile, mayo de 2009



Pablo Ernesto Cabrera Reyes

Poseo un concepto de inteligencia -no significa que la tenga- que va mucho más allá de obtener buenas notas en evaluaciones o de poder memorizar más o menos datos de un tema muy específico. La inteligencia emocional, física y social son ámbitos del desarrollo personal que comúnmente no se cultivan estudiando una carrera profesional. Con éstos conceptos llegue a la Universidad y afortunadamente logré desarrollar, sin mucho apoyo oficial, muchas habilidades que me interesaban.

El deporte ha sido fundamental en mi vida, jugué fútbol representando a la facultad en mi año de ingreso en un campeonato mechón y luego defendí a la facultad jugando en la selección de fútbol durante varios años donde logramos obtener el campeonato por primera vez para la Facultad de Ciencias. Jugué todos los años el campeonato de futbolito de la facultad ganando el campeonato dos veces, además participé en competencias de atletismo corriendo 5000 metros junto a otros deportistas tan aficionados y motivados como yo.

He bailado salsa desde que entre a la universidad, y representé con gran éxito en concursos de salsa a otras instituciones, hasta que en el año 2006 y 2007 realicé un taller de salsa en la facultad con una inédita participación de los alumnos de todo el Campus, realizamos presentaciones en eventos de la facultad y en salsotecas con gran entusiasmo de mis alumnos.

Pero lo que me entregó la facultad en cuanto a los amigos y personas que conocí gracias al deporte, al baile y los estudios, es lo que más me satisface. Logré conocer realidades y opiniones tan diversas como interesantes... en la facultad se vive universidad en su más amplio concepto y es importante aprovecharlo.

Terminados los ramos oficiales intenté integrarme a algún laboratorio, y afortunadamente me abrieron las puertas en el laboratorio de biología de desarrollo con el Dr. Miguel Allende, donde desarrollé todo este trabajo. Junto a la Dr. Carmen Feijoó como mi jefecita, motivadora y verdugo, me propuse estudiar la regulación de los genes Iroquois empleando la técnica de inmunoprecipitación de cromatina, luego nos cambiamos a estudiar la función de Prox1 en el desarrollo y diferenciación de las células ciliadas en los neuromastos donde utilizamos técnicas más clásicas de biología del desarrollo. En este lugar interactué con personas que me mostraron lo necesario para hacer ciencia, no sólo conocimientos, sino actitudes y motivaciones que son necesarias para crecer y formarse un camino profesional.





Agradecimientos

Mi mayor agradecimiento es para mi familia, mi Mamita principalmente que me alegra los días con su energía. A mi abuelita preciosa y mi papi -mi abuelo-, y papito que los recuerdo mucho y marcaron mi vida con amor. A mis tíos Calelo, Alicia, Mary y Pancho. A mis hermanos que reman conmigo en la vida. A mis amigos Ítalo, Francisco, Miguel, Renato, Toti y Natalia que ayudan a cimentar mi vida buenos recuerdos y vivencias... Los quiero a todos

Además, esta es una oportunidad de dejar plasmado mis agradecimientos a muchas personas que me ayudaron desde que ingrese a estudiar a la Universidad. La Paty y la Margarita de asistencia social fueron increíblemente amables y acogedoras conmigo, a pesar de que iba a puro pedir el cheque. La Anita, Maria Eugenia y don Marcos de la biblioteca me ayudaron muchísimo con impresiones, internet y libros, estuvieron siempre dispuestos a dar una mano o simplemente conversar. Al Luchito, el profe de futbol que entrega su tiempo a formar un equipo de Ciencias y es capaz además de ofrecer una valorable amistad. Mis compañeros también fueron un gran apoyo en todos los años, juntos en el equipo sensación "La Pitilla" campeón impensadamente. A Florencio y Cata por su excelente disposición y alegría en todo lo que hacen. A Pablo Sandoval, Leo, Polo, Claudia y Undu que hacen del laboratorio un ambiente increíble gracias a su excelente compañerismo. A Rosario, Javiera y Vivi por el apoyo y ayuda. A la Carmen, mi negrera y compañera del laboratorio que uno termina queriendo mucho. A Miguel por su paciencia, soporte y ayuda, es un privilegio que existan personas como el formando científicos... Gracias a todos

"A nation or civilization that continues to produce soft-minded men purchases its own spiritual death on the installment plan".

- Martin Luther King, Jr.

ABREVIATURAS



CGM	Célula ganglional madre
ChIP	Inmunoprecipitación de cromatina
DiAsp	Yoduro de 4-(4-dietilaminoestiril)-N-metilpiridinio
DNA	Sigla en Inglés de "Ácido desoxirribonucleico"
dpf	Días post-fertilización
E260	Coefficiente de extinción molar a 260 nm
hpf	Horas post-fertilización
LLP	Línea lateral posterior
MO	morfolino (oligonucleótido antisentido)
o/n	Over night (durante la noche)
pb	pares de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
RNA	Sigla en Inglés de "Ácido ribonucleico"
Rpm	revoluciones por minuto
s/n	sin nucleasas

SNC	Sistema nervioso central
SqET20	Línea transgénica SqET20 (células del manto-GFP)
SqET4	Línea transgénica SqET4 (células ciliadas-GFP)
TUNEL	Sigla en inglés de "Marcación de Cortes Terminales con dNTP-biotinilados mediada por TdT"



ÍNDICE



Abreviaturas.....	v
Índice.....	vii
Índice de figuras.....	ix
Resumen.....	x
Abstract.....	xii
1. Introducción.....	1
1.1 División celular asimétrica.....	2
1.3 Desarrollo mecanosensorial en el pez cebra.....	4
1.4 Los Genes Iroquois.....	7
1.5 La Inmunoprecipitación de Cromatina (ChIP) como método para el análisis de la regulación transcripcional.....	10
Materiales y Métodos.....	13
2.1 Materiales.....	13
2.1.1 Animales.....	13
2.1.2 Reactivos para Biología Molecular.....	14
2.1.3 Reactivos para Hibridación <i>in situ</i>	15
2.1.4 Reactivos para Inmunofluorescencia.....	15
2.1.5 Reactivos para ChIP.....	16
2.1.6 Soluciones de uso general.....	18
2.1.7 Reactivos para TUNEL.....	18
2.2 Métodos.....	19
2.2.1 Tinciones vitales de embriones <i>in vivo</i>	19
2.2.2 Inmunocitoquímica en embriones completos.....	19
2.2.3 Hibridación <i>in situ</i>	20

2.2.4	Inmunoprecipitación de Cromatina	22
2.2.5	TUNEL	24
II.	Resultados	25
3.1	Patrón de expresión de <i>prox1</i> en la línea lateral	25
3.2	Análisis de la expresión de Prox1 en relación a distintos marcadores de tipos celulares en el neuromasto.....	26
3.3	Análisis de la falta de función de Prox1 en la línea lateral del pez cebra.....	27
3.4	Regulación transcripcional de los genes <i>Iroquois</i> : análisis de modificaciones de la cromatina en elementos reguladores altamente conservados.....	33
III.	Discusión.....	37
4.1	Patrón de expresión de <i>prox1</i> en la línea lateral del pez cebra.	37
4.2	Falta de función de <i>prox1</i> y su efecto en la línea lateral.....	39
1.2	Importancia biomédica de esta investigación	40
4.3	Proyecciones	41
4.4	Análisis del estado de acetilación de la histona H4 en las secuencias conservadas no codificantes entre los genes <i>Iroquois</i>	42
IV.	Conclusiones.....	47
	Bibliografía.....	48





ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Próspero se distribuye asimétricamente en los neuroblastos en el desarrollo del SNC de <i>Drosophila</i>	3
Figura 2. Línea lateral posterior (LLP) de pez cebra	6
Figura 3. Proteínas Iro y organización genómica de los genes <i>Iroquois</i>	9
Figura 4. Expresión de <i>prox1</i> en la línea lateral de embriones de pez cebra	26
Figura 5. Colocalización de Prox1 con diferentes marcadores de tipo celular en neuromastos.....	29
Figura 6. Efecto de la falta de función de Prox1 en la línea lateral posterior	31
Figura 7. La falta de función de Prox1 afecta la diferenciación funcional de las células ciliadas en los neuromastos de la línea lateral del pez cebra.....	1
Figura 8. Representación esquemática de los pasos seguidos en la técnica de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) utilizada	34
Tabla 1. Resultados de la Inmunoprecipitación de Cromatina	36
Figura 9. Perfil de enriquecimientos relativos de tres secuencias potenciadoras durante el desarrollo.....	44
Figura 10. Enriquecimientos relativos de todas las secuencias conservadas a 48 hpf.	45

RESUMEN

La división celular asimétrica es un mecanismo conservado por el cual se determinan distintos destinos celulares en el transcurso del desarrollo de organismos multicelulares. Estudios en la neurogénesis de *Drosophila* han demostrado que el factor de transcripción Prospero tendría una función fundamental durante las divisiones asimétricas y por ende en la diferenciación celular. El ortólogo de Prospero en vertebrados es Prox1, factor de transcripción que participa, entre otros procesos, en la diferenciación de las células ciliadas y de soporte del oído. Tipos celulares que se encuentran además en los neuromastos de la línea lateral de peces y anfibios.

En esta tesis, examinamos el patrón de expresión del mRNA de *prox1* y de la proteína Prox1 mediante hibridación *in situ* e inmunofluorescencia en embriones de pez cebra en diferentes estadios del desarrollo. Utilizando líneas transgénicas de pez cebra comparamos la distribución de Prox1 con diferentes marcadores celulares en la línea lateral. La expresión de *prox1* tanto a nivel de proteína como de mRNA la encontramos en células de soporte y en algunas células ciliadas, excluyendo a las células del manto. El rol de *prox1* lo analizamos observando el fenotipo de falta de función por inyección de morfolino antisentido y midiendo la funcionalidad de las células ciliadas por la tinción vital DiAsp. Los morfantes de *prox1* presentan un menor número de células ciliadas funcionales.

Dado el patrón de expresión de *prox1* y el fenotipo mostrado por los morfantes se puede concluir que Prox1 está relacionado en el desarrollo las células

mecanorreceptoras, posiblemente participando en las divisiones asimétricas que llevan a su diferenciación.

Por otro lado, los genes *Iroquois* (*Irx*) codifican para una familia de homeoproteínas presentes desde nemátodos hasta humanos. Participan en diversos procesos del desarrollo, tales como establecimiento de patrones y especificación de territorios y su organización genómica es altamente conservada. Para explicar dicha conservación, se han realizado análisis *in silico* comparando las regiones intergénicas entre *irx3-irx5*, *irx5-irx6*, *irx1~irx2* e *irx2~irx4* de humanos, ratón, pez cebra y fugu. Se encontraron de esta manera regiones no-codificantes altamente conservadas con propiedades de potenciador (de la Calle-Mustienes y col., 2005). Para complementar éstos resultados, analizamos la accesibilidad de los elementos reguladores identificados, monitoreando la acetilación de la histona H4 durante el desarrollo por medio de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP). Así, nos es posible postular la participación de HATs (histona acetil-transferasas) en las vías de señalización responsables de la activación de los elementos reguladores estudiados.

ABSTRACT

Asymmetric cell division is a conserved mechanism for determining specific cell fates during development of multicellular animals. Studies in *Drosophila* neurogenesis have demonstrated the fundamental role of the transcription factor Prospero during asymmetric cell divisions thus in cell differentiation. The vertebrate ortholog of this gene is *prox1*, and it has been shown to be critical for development of diverse cell types, including the sensory hair cells of the inner ear. These types of cells are found additionally in the lateral line organ of fish and amphibians.

In this thesis we examined the expression pattern of *prox1* mRNA and Prox1 protein by *in situ* hybridization and immunohistochemistry in different stages of zebrafish embryos. We compared the distribution of Prox1 using different cell type markers in the lateral line system. We observed the mRNA and protein expression of *prox1* in zebrafish neuromasts to be localized in supporting cells and in some hair cells excluding mantle cells. The role of *prox1* was analyzed using a loss of function approach by antisense morpholino injection and hair cell functionality by vital dye DiAsp staining. Morphant larvae for *prox1* have a lateral line with a reduce number of functional hair cells.

Given the expression pattern of Prox1 and the morphant phenotype we can conclude that Prox1 is related to the development of mechanoreceptor cells, probably regulating the asymmetric divisions that lead to their differentiation.

On the other hand, the *Iroquois (Irx)* genes encode a family of homeoproteins, found from nematodes to humans. They participate in many developmental processes, ranging from the specification of territories to the development of pattern elements. Their genomic organization is highly conserved in vertebrates. To attempt to explain the conservation of this genomic cluster, in our laboratory we compared by *in silico* analysis the intergenic regions between *irx3-irx5*, *irx5-irx6*, *irx1~irx2* and *irx2~irx4* of humans, mouse, zebrafish and fugu. We detected a number of highly conserved non-coding sequences, which in functional tests in transgenic zebrafish and *Xenopus* embryos promote expression of a reporter gene in *Irx* sub-territories. Interestingly, in some cases we found a high conservation in the expression promoted by the same conserved regions from mouse, *Xenopus*, fugu or zebrafish. In order to complement these results, we analyzed the status of previously identified enhancers, monitoring the acetylation of the H4 histones during development by chromatin immunoprecipitation (ChIP). We postulate the participation of HATs (histone acetyl transferases) in the signaling pathways responsible for transcriptional activation of the identified regulatory elements.

I. INTRODUCCIÓN

La biología del desarrollo estudia los procesos involucrados en la formación de un individuo adulto a partir de una única célula, el cigoto. La pregunta inmediata es cómo cientos de tipos celulares diferentes –neuronas, linfocitos, células epidermales, musculares, retinales, etc.- son generados desde esta única célula. La generación de esta diversidad celular se denomina diferenciación, y considerando que todas las células de un organismo –con pocas excepciones como células germinales y linfocitos- poseen el mismo material genético, el proceso de diferenciación se vuelve fascinante.

La diferenciación celular también se produce comúnmente en organismos adultos durante la reparación de tejidos y reposición de células transientes, y como resultado las células sufren cambios dramáticos en forma, tamaño, actividad metabólica y sensibilidad a señales externas. Estos cambios son producto de modificaciones controladas de la expresión génica, lográndose así que bajo un mismo repertorio genómico se expresen distintos tipos de proteínas. La regulación de la expresión génica se produce a distintos niveles: Transcripción diferencial de genes, regulando qué genes nucleares son transcritos; Procesamiento selectivo del RNA nuclear, regulando qué RNAs entran al citoplasma; Traducción selectiva de los RNA mensajeros (mRNA), regulando cuál de los mRNA se traducen a proteínas; y modificaciones diferenciales de las proteínas, regulando qué proteínas permanecen o son activas en la célula.

Existen muchos mecanismos celulares que controlan el proceso de diferenciación y principalmente se agrupan en dos categorías, una relacionada con

señalización celular e inducción de la diferenciación y otra, que trataremos en esta tesis, que es la división asimétrica, división que genera células hijas que difieren en características y destino.

1.1 División celular asimétrica

Durante la división celular, la localización asimétrica de RNAs o proteínas puede dar como resultado que las células hijas presenten entre ellas diferencias moleculares que las dirijan a distintos destinos. Este proceso es un fenómeno clave en la generación de la diversidad celular y ha sido documentado en una gran variedad de organismos como *Bacillus subtilis* (Jenal y Stephens, 1997), *Caulobacter* (Brun y col., 1994), *Sacharomyces cerevisiae* (Bobola y col., 1996; Long y col., 1997; Sil y Herskowitz, 1996; Takizawa y col., 1997) y *Caenorhabditis elegans* (Guenther y Garriga, 1996; Guo y Kempfues, 1996; Watts y col., 1996).

El sistema nervioso central en *Drosophila melanogaster* se desarrolla desde el neuroectodermo con una polaridad apical/basal (Knust, 1994; Spana and Doe, 1995) donde los progenitores neurales o neuroblastos migran basalmente hacia el embrión. Los neuroblastos se dividen asimétricamente para dar origen a dos células hijas de diferente tamaño, potencial mitótico, expresión génica y posición. Una célula hija se mantiene como neuroblasto, siempre en posición apical, de mayor tamaño, mitóticamente activa y expresa genes de "precursores neurales". La otra, denominada célula ganglionar madre (CGM) expresa un conjunto diferente de genes, su posición es basal y se divide sólo una vez para dar origen a neuronas o glías (Figura 1).

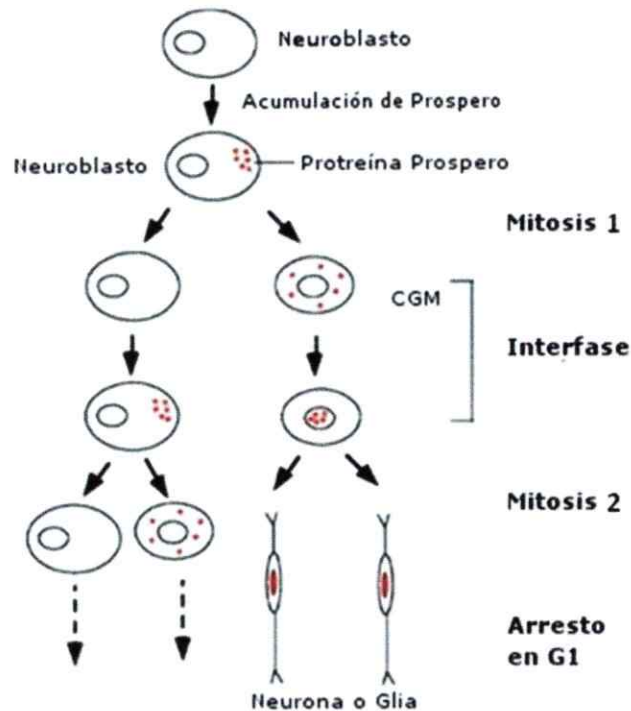


Figura 1. Próspero se distribuye asimétricamente en los neuroblastos en el desarrollo del SNC de *Drosophila*. Durante la neurogénesis en *Drosophila* el factor de transcripción Prospero se acumula en una región del citoplasma y durante la división celular (mitosis 1) se segrega mayoritariamente hacia la CGM. Luego se desplaza al núcleo de la CGM donde después de una última mitosis (mitosis 2) promueve la diferenciación a neurona y/o una célula glial. Esquema obtenido de Jan y Jan (1998).

En *Drosophila*, durante la neurogénesis, el regulador más temprano conocido de la identidad de las CGM es el factor de transcripción Prospero. Los neuroblastos contienen altos niveles de RNA de Prospero, pero el mRNA no es traducido eficientemente, y la poca proteína producida se acumula en una zona apical de la corteza celular durante la interfase (Doe y cols., 1991; Vaessin y cols., 1991). Al entrar el neuroblasto en mitosis, la proteína Prospero rápidamente se asocia a la parte basal de la membrana celular y es segregada específicamente a la CGM donde luego se trasloca al núcleo promoviendo así los genes específicos de CGM y reprime genes específicos de progenitor neural.

En vertebrados el ortólogo de Prospero es *prox1* (Oliver y col., 1993; Burglin, 1994). La expresión de *prox1* en ratón y pollo ha sido detectada en médula espinal, cerebro, músculo esquelético, corazón, hígado, páncreas y en células endoteliales formadoras del sistema endolinfático (Oliver y col., 1993; Tomarev y col., 1996; Glasgow y Tomarev., 1998; Wigle y Oliver., 1999; Burke y Oliver., 2002; Wigle y col., 2002; Wang y col., 2005; Bermingham-McDonogh y col., 2006). Además del papel asignado a *prox1* en diferenciación celular en estos tejidos, una expresión alterada de *prox1* ha sido detectada en ciertos tumores, considerándose así a este gen como supresor de tumores (Versmold y col., 2007).

El rol de *prox1* en desarrollo neural en vertebrados es aún poco claro. En el SNC, *prox1* es expresado en la zona sub-ventricular, ligando a este gen al proceso de neurogénesis. También se expresa en el oído interno en embriones de ratón y pollo, tanto en células de soporte como en células ciliadas mecanosensoriales inmaduras (Stone y col., 2003, 2004; Bermingham-McDonogh y col., 2006). El gen es rápidamente silenciado cuando las células ciliadas se diferencian. Las células de soporte mantienen bajos niveles de la proteína Prox1 después de que el órgano sensorial es formado y esta expresión latente se mantiene hasta la adultez. La evidencia apunta a un papel de *prox1* en la diferenciación de las células ciliadas a partir de células progenitoras multipotentes, pero la vía exacta en la que participa no ha sido dilucidada.

1.3 Desarrollo mecanosensorial en el pez cebra

Una regeneración robusta de células ciliadas ocurre en el oído y línea lateral de peces y anfibios. (Balak y col., 1990; Jones y Corwin., 1993, 1996; Williams y Holder., 2000; Harris y col., 2003; Hernandez y col., 2006, 2007; López-Schier y Hudspeth.,

2006). La línea lateral es un sistema mecanosensorial simple, formado por órganos sensoriales superficiales y las neuronas que los inervan (Baker y Bronner-Fraser., 2001). Se ha propuesto que realiza una especie de "tacto a distancia" (Dijkgraaf., 1989; Montgomery y col., 1995) con el cual el animal percibe movimientos del agua a un cuerpo de distancia, y se le asocia a respuestas conductuales que van desde la detección de potenciales presas, reconocimiento de pareja sexual, conducta de escuela o cardumen hasta la posibilidad de esquivar obstáculos y depredadores dependiendo del nicho ecológico en que el animal vive (Figura 2A) (Partridge and Pitcher., 1980; Coombs y col., 1989). Este sistema está compuesto por órganos mecanosensoriales individuales, los neuromastos, que presentan una disposición conservada entre los individuos de una misma especie, manteniendo un patrón especie-específico. Cada neuromasto está compuesto por células ciliadas y células accesorias de dos tipos: de soporte que rodean a las células ciliadas y del manto que rodean externamente al neuromasto (Figura 2C; Ghysen y Dambly-Chaudière, 2004) (Metcalf y col., 1985; Balak y col., 1990; Williams and Holder., 2000; Ghysen y Dambly-Chaudière, 2004). Ambos tipos celulares han sido implicados en procesos de regeneración de células ciliadas, ya sea por mecanismos que involucran una transdiferenciación directa o en procesos que incluyen proliferación de precursores seguido de una diferenciación celular (Izumikawa y col., 2005; White y col., 2006).

La línea lateral en el pez cebra se desarrolla a partir de un primordio migratorio de células progenitoras que distribuyen grupos de unas 20 células que formarán los neuromastos. Este primordio comienza a migrar al finalizar la somitogénesis, aproximadamente a las 20 hpf (horas post fertilización), en dirección caudal a lo largo de miosepto horizontal siguiendo una ruta estereotipada, y finaliza su recorrido en el

final de la cola alrededor de las 40-42 hpf. Así se establece una línea lateral primaria que se hace funcional a las 48hpf (Figura 2B). Las células ciliadas en los neuromastos comparten muchas de las características tanto celulares, fisiológicas como moleculares con aquellas del oído interno (Coombs y Montgomery, 1999), pero la accesibilidad de las primeras provee de una inigualable condición experimental para el estudio de los mecanismos celulares y moleculares que están involucrados tanto en el desarrollo de células ciliadas como en los procesos de su regeneración. La existencia de precursores neurales de tipo "stem cell" en la línea lateral del pez cebra ha sido propuesta por nuestro grupo debido a la expresión del marcador de progenitor neural *sox2* en el primordio y en neuromastos, expresión que coincide con la población de células en activa proliferación (Hernández y col., 2007).

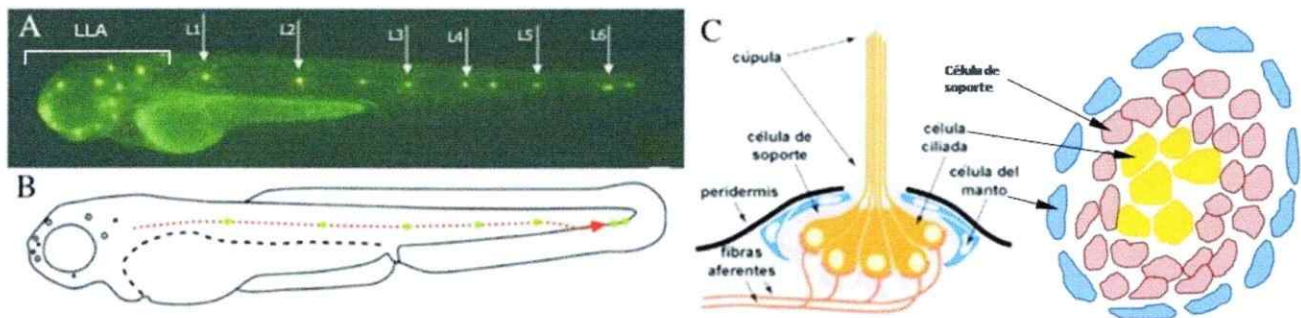


Figura 2. Línea lateral posterior (LLP) de pez cebra. (A) Patrón de distribución de neuromastos en la línea lateral posterior (LLP) al término de la embriogénesis (48hpf). A lo largo del cuerpo del pez se depositan en forma regular 5 neuromastos (L1-L5) y 2-3 neuromastos terminales en la región más caudal de la cola (L6). Además se muestran los neuromastos de la línea lateral anterior (LLA) (B) Los neuromastos primarios (puntos verdes) son depositados por un primordio que migra a través del miosepto horizontal (línea punteada roja), el pez está con anterior orientado a la izquierda y el dorso hacia arriba. (C) Esquema de vista lateral (izquierda) y apical (derecha) de un neuromasto, que muestra los diferentes tipos celulares que lo componen. Adaptado de Ghysen y Dambly-Chaudière (2004).

Nos interesa comprender el papel de *prox1* en el desarrollo de las células ciliadas y determinar si este gen es importante en los procesos de regeneración de estas células. Para ello, realizamos estudios de expresión y de función en la línea lateral del pez cebra dada la accesibilidad de este sistema para los experimentos propuestos.

La expresión del mRNA de *prox1* en el pez cebra ha sido descrita (Liu y col., 2003). El mRNA de este gen se detecta en el sistema nervioso central y en el primordio migratorio de la línea lateral y una vez que esta se forma, *prox1* se expresa en los neuromastos depositados. Esta expresión es consistente con un rol en la diferenciación de las células ciliadas a partir de células progenitoras ya que el proceso de especificación y diferenciación comienza en el primordio y continúa permanentemente en los neuromastos durante la regeneración celular.

1.4 Los Genes Iroquois

Los genes *Iroquois* (*Iro*) fueron descubiertos en *Drosophila* por una búsqueda de mutaciones que afectan el patrón de los pelos sensoriales que se encuentran en el cuerpo de la mosca. El primer alelo mutante identificado suprimía todos los pelos sensoriales del mesotórax dorsal de la mosca, dejando una banda de pelos en la zona central del mesotórax. Este patrón asemeja el corte de cabello típico de los indios americanos Iroquois, también conocidos como mohicanos, de ahí el nombre del locus.

Se han encontrado homólogos de los genes *Iro* desde nemátodos hasta humanos (Bao y col., 1999; Bellefroid y col., 1998; Bosse y col., 2000; Bosse y col., 1997; Christoffels y col., 2000; Cohen y col., 2000; Funayama y col., 1999; Gómez-Skarmeta y col., 1998; Goriely y col., 1999; Peters y col., 2000; Tan y col., 1999). Los

genes *Iro* codifican para una familia de homeoproteínas de la clase TALE y poseen un motivo característico involucrado en interacción proteína-proteína (la caja Iro). La organización genómica de los genes *Iro* está también muy conservada (Figura 3). Aunque actualmente sólo se conocen algunas de las funciones de los genes *Iro* en *Drosophila*, *Xenopus*, pollo y ratón, la visión consensuada es que estos genes participan en la definición de amplios territorios en estadios tempranos del desarrollo, como la región dorsal del ojo, cabeza y mesotórax en *Drosophila*. En estadios más tardíos participarían en la subdivisión de estos territorios en dominios más pequeños. El patrón de expresión de estos genes se correlaciona con ésta visión al inicialmente expresarse en grandes dominios y posteriormente es restringido a subdominios de los territorios amplios.

Drosophila melanogaster posee tres genes *Iro*, *araucan*, *caupolican* y *mirror* (Gómez-Skarmeta y col., 1996; McNeill y col., 1997) agrupados en cluster en el cromosoma 3L (Figura 3). *araucan* y *caupolican* están más relacionados, mientras *mirror* es más divergente. Seis genes *Iro* han sido identificados en ratón (*Irx1* – *Irx6*) (Bosse y col., 2000; Bosse y col., 1997; Bruneau y col., 2001; Christoffels y col., 2000; Cohen y col., 2000; Peters y col., 2000), están agrupados en tríos en dos cromosomas: cromosoma 13 posee los genes *Irx1*, *Irx2* y *Irx4* y el cromosoma 8 los genes *Irx3*, *Irx5* y *Irx6* (Bosse y col., 2000; Peters y col., 2000) (Figura 3). Los genes *Irx1*~*Irx3*, *Irx2*~*Irx5* y *Irx4*~*Irx6* son parálogos, probablemente originados de un evento de duplicación ocurrido en un ancestro del linaje de los vertebrados ya que ortólogos de al menos cuatro de los seis genes encontrados en ratón han sido encontrados en otros vertebrados. Existe evidencia que los peces teleósteos sufrieron un evento de duplicación genómica posterior a su divergencia evolutiva de los demás vertebrados

(Taylor y col., 2001, 2003). Se han encontrado 11 genes *Irx*, distribuidos en seis cromosomas donde algunos de los genes se han mantenido agrupados y otros se encuentran distribuidos en el genoma (Feijó y col., 2004).

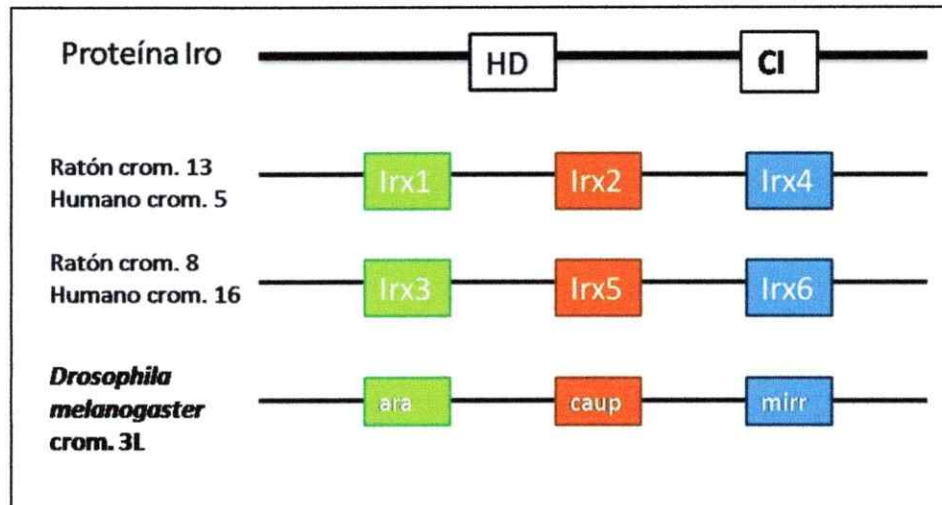


Figura 3. Proteínas Iro y organización genómica de los genes *Iroquois*. A) Todas las proteínas Iro poseen la misma estructura, con dos dominios muy conservados: Un homeodominio de la super clase TALE (HD) de unión a DNA y la caja Iro (CI), involucrada posiblemente en interacción proteína-proteína. B) Estructura genómica de los genes *Iroquois* en ratón, humano y *Drosophila melanogaster* (Dm). Los genes Iro están generalmente distribuidos cromosomalmente en grupos de tres genes. En la figura, los genes parálogos están marcados con el mismo color. (Bosse y cols., 2000; Gómez-Skarmeta y cols., 1996; McNeill y cols., 1997; Netter y cols., 1998; Peters y cols., 2000.)

Para explicar la conservación de la estructura genómica, se realizó un análisis *in silico* empleando la técnica phylogenetic footprinting que permite comparar las regiones intergénicas entre *irx3-irx5*, *irx5-irx6*, *irx1~irx2* e *irx2~irx4* de humanos, ratón, pez cebra y fugu (de la Calle-Mustienes E y cols, 2005). Los resultados obtenidos arrojaron la existencia de regiones no-codificantes altamente conservadas. Para analizar la funcionalidad de dichas regiones, se inyectaron en embriones de pez cebra y *Xenopus*, constructos que contenían una de las secuencias conservadas y un

promotor basal controlando la expresión de GFP. Al monitorear la fluorescencia se determinó que muchas de las regiones conservadas eran capaces de dirigir la expresión de GFP a subterritorios de expresión de los genes *lrx*. Interesantemente, en algunos casos se encontró una alta conservación entre la expresión dirigida por el equivalente elemento regulador de ratón, *Xenopus*, fugu o pez cebra (de la Calle-Mustienes y col., 2005).

1.5 La Inmunoprecipitación de Cromatina (ChIP) como método para el análisis de la regulación transcripcional.

Para complementar los resultados funcionales obtenidos con los elementos conservados de los genes *lrx*, analizamos la accesibilidad de los elementos reguladores identificados, monitoreando la acetilación de la histona H4 durante el desarrollo por medio de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP). Nuestro objetivo es eventualmente, identificar las vías de señalización responsables de la activación de los elementos reguladores identificados.

Comprender los mecanismos de la regulación transcripcional génica generalmente ofrece una gran oportunidad para definir vías moleculares asociadas a ciertas respuestas biológicas. La técnica de inmunoprecipitación de cromatina ha sido una importante herramienta para la determinación de uniones proteína-DNA específicas permitiendo así identificar interacciones endógenas de transactivadores y regiones cis-reguladoras. Además, ésta técnica ofrece la capacidad de confirmar la interacción de proteínas con genes previamente caracterizados por otros métodos como análisis mutacionales de promotores.

En eucariontes, todo proceso que utiliza el DNA como templado -transcripción, replicación, recombinación y reparación entre otros- es influenciado por el empaquetamiento del DNA en la cromatina. La unidad estructural básica de la cromatina es el nucleosoma que contiene 147 pb de DNA enrolladas un octómero compuesto por dos monómeros de cada histona H2A, H2B, H3 y H4. La cola amino-terminal de las histonas H3 y H4 es altamente cargada, se encuentra estrechamente asociada con DNA y es susceptible a modificaciones post-transcripcionales como acetilaciones, metilaciones, ubiquitaciones y fosforilaciones (Strahl y Allis, 2000; Zhang y Reinberg, 2001) que formarían un código de histonas regulador de la función de la cromatina afectando la dinámica estructural de los nucleosomas. En particular, existen dos modelos no mutuamente excluyentes para explicar el papel de la acetilación de las histonas. En el primero, la acetilación en ciertos residuos sirven de señal para la unión de factores transactivadores, por ejemplo algunos transactivadores, incluyendo varios HATs, poseen una región llamada bromodominio que interactúa específicamente con histonas nucleosomales acetiladas (Hassan, 2002; Dhalluin, 1999). En el otro modelo, acetilaciones en lisinas específicas producen una neutralización de la carga positiva en el residuo disminuyendo la afinidad del nucleosoma por el DNA y relajando la estructura de la cromatina, dejándola accesible para la maquinaria de la transcripción. Estudios *in vitro* han mostrado que sobre un cierto límite de acetilaciones por nucleosoma, la condensación de la cromatina se bloquea. Muchas enzimas que regulan la acetilación o deacetilación de las histonas son cofactores transcripcionales.

HIPÓTESIS

- A. "Prox1 es necesario para la diferenciación de las células ciliadas en neuromastos de la línea lateral de pez cebra"
- B. "La acetilación de la histona H4 está involucrada en la regulación transcripcional de los genes *Iroquois* en pez cebra"

OBJETIVO GENERAL

- A. Analizar participación de *prox1* en la diferenciación de células ciliadas en neuromastos.
- B. Correlacionar el estado de acetilación de los elementos reguladores de la familia de genes *Iroquois* con los ensayos funcionales antecedentes.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- A. 1. Estudiar el patrón de expresión del mRNA del gen *prox1* y de la proteína Prox1 en la línea lateral de larvas de pez cebra.
- A. 2. Análisis del efecto de la falta de función de *prox1* en la especificación, diferenciación y funcionalidad de las células ciliadas de la línea lateral del pez cebra
- B. 1. Estandarizar la técnica de inmunoprecipitación de cromatina en embriones completos
- B. 2. Análisis del grado de acetilación de la histona H4 en elementos reguladores de la expresión de la familia de genes *Iroquois*.

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materiales

2.1.1 Animales

Los experimentos aquí descritos se llevaron a cabo utilizando embriones y larvas de pez cebra (*Danio rerio*), obtenidos realizando cruces naturales de peces adultos. Los peces se mantuvieron en acuarios con circulación constante de agua y aire a una temperatura de 28°C, con un ciclo de 14 h de luz y 10h de oscuridad. Se alimentaron tres veces al día y se monitorearon sus condiciones de temperatura y pH. Para realizar cruces, se separaron los machos de las hembras durante la noche y se juntaron en la mañana siguiente en el momento en que la luz del vivero se enciende. De esta manera, es posible controlar el momento de la fertilización. El estadio de los embriones es expresado en horas post-fertilización (hpf) y días post fertilización (dpf). Durante el cruce los peces se colocaron en estanques pequeños provistos de una rejilla para impedir que los peces se alimenten de sus huevos. Los embriones y larvas se mantuvieron en incubadores a 28°C en medio E3 1X (5 mM NaCl, 0,17 mM KCl, 0,33 mM CaCl₂, 0,33 mM MgSO₄, 0,00001% (p/v) Azul de metileno) el cual contiene azul de metileno que evita el crecimiento de hongos.

Las líneas transgénicas *SqET4* y *SqET20* fueron obtenidas de Vladímir Korzh (Parinov y col., 2004). *Bm3c:GFP* se obtuvo de Herwig Baier (Xiao y col., 2005), *sox3:GFP* de Thomas Becker (resultados no publicados) y *SCM* se obtuvo de Kenna Shaw (resultados no publicados).

2.1.2 Reactivos para Biología Molecular

- Acetato de Sodio 3M pH5,2, Winkler Ltda., Chile.
- Agarosa, Winkler Ltda., Chile.
- Agua sin nucleasas, Winkler Ltda., Chile.
- Cloroformo: Alcohol iso-amílico 24:1, Winkler Ltda., Chile.
- DNAsa, Boehringer, Mannheim, Alemania.
- EDTA 0,5M pH8, Winkler Ltda., Chile.
- Etanol, Merck, Alemania.
- Fenol: Cloroformo básico, Winkler Ltda., Chile.
- Isopropanol, Merck, Alemania.
- LiCl 10M, Winkler Ltda., Chile.
- MgCl₂ 50mM, New England Biolabs, EE.UU.
- NTPs, MBI Fermentas, Lituania.
- RNAsa (libre de DNAsa), Boehringer, Mannheim, Alemania.
- RNAsin (inhibidor de RNAsas), Roche Diagnostics GMBH, Mannheim, Alemania.
- Tampón de reacción de PCR 10x sin cloruro de Magnesio, Taq polimerasa y Deoxinucleósidos de trifosfato para PCR, dTTP, dATP, dCTP, dGTP, GibcoBRL, Inglaterra.

1.1.3 Reactivos para Hibridación *in situ*

- Anticuerpo Anti-Digoxigenina y NBT/BCIP (Nitro blue tetrazolium chloride/5-bromo-4 -chloro-3-indolphosphate), Roche Diagnostics GMBH, Mannheim, Alemania
- Solución MAB-T (100 mM ácido maleico, 150 mM NaCl, 0,1% tween, pH 7,5).
- Solución MAB+BMB+LS (2% reactivo de bloqueo Boehringer y 20% suero caprino en solución MAB).
- Formamida, Merck, Alemania
- Metanol, Merck, Alemania
- Peróxido de hidrógeno, Merck, Alemania
- Proteinasa K, Merck, Alemania
- NBT/BCIP, Boehringer Mannheim, Alemania.
- PFA 4%, J.T. Baker, Phillipsburg, EE.UU.

2.1.4 Reactivos para Inmunofluorescencia

- Acetona, Merck, Alemania.
- Ácido clorhídrico (Merck, Alemania).
- Alexa Fluor 594-conjugado anti-ratón IgG (Molecular Probes A21200).
- Anticuerpo anti-Prox1, Santa Cruz Biotechnology, EEUU.
- Anticuerpo anti-tubulina acetilada, Upstate, EE.UU.
- Diaminobenzidina (DAB, 30mg en 100ml PBS, 0,03% w/v), Sigma, Saint Louis, EEUU.

- Metanol, Merck, Alemania.
- Peróxido de hidrógeno, Merck, Alemania.
- PFA 4%, J.T. Baker, Phillipsburg, EE.UU.
- Proteínasa K (Merck, Alemania).
- Solución de bloqueo (10% suero de bovino, 1% DMSO, 0,3%Tween-20 en PBS, 0,5% tritón).

2.1.5 Reactivos para ChIP

- Ácido deoxicólico, sal sódica, Winkler Ltda., Chile
- Agarosa beads acoplado a proteína G, Santa Cruz Biotechnology, EEUU
- Anticuerpo anti-Histona H4 acetilada, Upstate, EE.UU.
- Anticuerpo anti-IgG, Santa Cruz Biotechnology, EEUU
- Aprotinina, Sigma, Saint Louis, EE.UU.
- CaCl₂, Winkler Ltda., Chile
- Formaldehído, Winkler Ltda., Chile
- Glicina, Winkler Ltda., Chile
- Hapes, Winkler Ltda., Chile
- KCl, Winkler Ltda., Chile
- LiCl, Winkler Ltda., Chile
- MgCl₂, Winkler Ltda., Chile
- NP-40, Winkler Ltda., Chile
- Pepstatina A, Sigma-Aldrich, Alemania

- PMSF, Sigma-Aldrich, Alemania
- Proteinasa K, Sigma-Aldrich, Alemania
- Sacarosa, Merck, Alemania
- SDS, Winkler Ltda., Chile
- Tris, Winkler Ltda., Chile
- Tritón X-100, Winkler Ltda., Chile

Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación por PCR de las secuencias potenciadoras fueron sintetizados (Invitrogen, Chile):

Región	Nombre	Partidor Directo	Partidor Reverso
Irx3 – Irx5	Z54129	5'-GTTGGCGAGTCCCATACTTTC-3'	5'-GAGTCACATGGCTGTAGAGT-3'
	Z54302	5'-CGACTATACATCTATAACCGTG-3'	5'-GTGTTGTCTCTGATTGGCATG-3'
Irx5 – Irx6	Z54854	5'-CCTGTGTGGGACGCCGTATGC-3'	5'-GCAGCACACAGTGGGATGG-3'
	Z54781	5'-TCTCCTGTAGCGCAGCCG-3'	5'-GGCAGTAACGCGCATATACGC-3'
	Z55019	5'-CCCTCAAACCATATTCTGTGC-3'	5'-GCCCATCCCCAAATAATAGC-3'
	Z55203	5'-AATGCTGTATAGAGGCTGGC-3'	5'-GTCCTTTGAGAACGCCGCACG-3'
Irx1 – Irx2	Z5682	5'-ACGTCGGAAGCCAAAACCAG -3	5'ACTAACCACATGCGCCAAC-3
	Z3565	5'-GTGTCAAGTTGCGGGAGCAG-3'	5'-CTGAGTGGTGTCTGTAGCCC-3'
	Z2389	5'-ACACGACCCCTCAGAACAGC-3'	5'-AATGCAGCCTTGGTGAGCAG-3'
	Z2260	5'-GGCCTGTTTGGTTTTCG-3'	5'-CGATGCCATTGTTCTGCCGG-3'
	UCR0	5'-CGCGCTGTTGTTGTGCTATG-3'	5'-CCACTCCCCACCTCACACAC-3'
	Z5224	5'-GTAGATAAACGCCGGCGAGG-3'	5'-ATGGAATCAGCGCATTGACG-3'
	Z4126	5'-GATGGAGTTCTGCGGCAGTG-3'	5'-CTCGTTGTAAAGAGCGCCCC-3'
	Z5179	5'-TGAGATGAAGGGTGGAGCAG -3'	5'-GATCCGCCACAGTCCACATC -3'
control	Krx20	5'-GGGGTGTAGATGTTTACCGG-3'	5'-CTGCGCGTTCTGATTGGTTG-3'

2.1.6 Soluciones de uso general

- EDTA 0,2M, Winkler Ltda, Chile
- PBS, Winkler Ltda, Chile
- PBST (PBS+Tween-20 0,1%)
- Solución E3 1X (NaCl 5mM; KCl 0,17mM; CaCl₂ 0,13mM; MgSO₄ 0,33mM; Azul de Metileno 10⁻⁵ %).
- Solución de corrida de electroforesis TAE 50x (242 g de tris base, 57,1 mL de ácido acético glacial y 100 mL de EDTA 0,5 M pH 8 para un volumen final de 1L).

2.1.7 Reactivos para TUNEL

- DNAsa I (Fermentas EN0521).
- *In situ* cell death detection kit, TMR red (Roche 12.156.792.910).

2.2 Métodos

2.2.1 Tinciones vitales de embriones *in vivo*

Para la visualización de neuromastos funcionales se utilizó la tinción vital DiAsp -Yoduro de 4-(4-dietilaminoestiril)-N-metilpiridinio (4-di-2-Asp)-, Sigma D-3418) a una concentración 5 mM en medio E3. Las larvas se incubaron durante 5 min en DiAsp y luego se lavaron sucesivamente con medio E3. Finalmente se observaron los neuromastos utilizando una lupa o microscopio de fluorescencia (Collazo y col. 1994).

2.2.2 Inmunocitoquímica en embriones completos

Las larvas se fijaron incubándolas en paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS durante 1 h a temperatura ambiente o durante toda una noche (O/N) a 4°C . Luego se lavaron con PBS dos veces por 5 min, se traspasaron a metanol y se mantuvieron a -20°C durante al menos 1 h. Se incubaron en agua destilada por 1 hora, para luego incubar en acetona por 7 min, a -20°C. Posteriormente se lavaron nuevamente con agua destilada por 1 h y se incubaron con solución de bloqueo por 1 h. Luego se incubó con el anticuerpo primario correspondiente diluido en solución de bloqueo a 4°C durante toda la noche (diluciones: anti- α -tubulina acetilada 1/1000, anti-Prox1 1/200). Al día siguiente se lavó con solución de bloqueo 4 veces por 20 min y se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente (anti-ratón o anti-conejo acoplados a peroxidasa o a fluoresceína según el caso). Luego se lavaron 4 veces por 20 min. Cuando se ocupó anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa para revelar la presencia de anticuerpo se pre-incubó con DAB 0,03% por 10 min y después se

agregó peróxido de hidrógeno a una concentración final de 3% durante 15 min o durante el tiempo necesario para que se produzca la tinción producida por la reacción. La reacción fue finalizada lavando con PBST. Los embriones o larvas se transfirieron a glicerol para su visualización en lupa o montaje en portaobjetos, en caso de utilizar un microscopio.

2.2.3 Hibridación *in situ*

Se fijaron los embriones en PFA al 4% (en PBS) durante 2 h a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, los embriones se deshidrataron en metanol 100% durante 10 min a temperatura ambiente. Se realizó un cambio de metanol 100% y se incubaron a -20°C durante al menos 1 h (los embriones se pueden almacenar en esta etapa a -20°C hasta 6 meses). Luego se rehidrataron durante 5 min en 75% metanol/25% PBS, 5 min en 50% metanol/50% PBS, 5 min en 25% metanol/75% PBS y 4 veces durante 5 min en PBS-T. Con el objetivo de eliminar los pigmentos se realizó un tratamiento a los embriones de más de 48 hpf con una solución que contiene 5,95 mL de agua destilada, 0,25 mL de SSC 20x, 0,5 mL de formamida y 3,3 mL de peróxido de hidrógeno al 30%. Los embriones se incubaron en esta solución 10 min expuestos a un tubo fluorescente de luz, la cual permite una reacción de oxidación de los pigmentos por parte del peróxido de hidrógeno. Luego se realizaron tres lavados con PBS-T durante 5 min cada uno.

Para permeabilizar y digerir las proteínas asociadas al mRNA, los embriones se trataron durante 10 min a temperatura ambiente con 25 µg/mL de proteinasa K en PBS. Para los embriones de 72 hpf se incubo con proteinasa K durante 40 min. Después se realizaron 2 lavados de 5 min con PBS-T para detener la digestión. Para volver a fijar

los tejidos, los embriones se incubaron durante 20 min a temperatura ambiente en PFA al 4% en PBS y luego se lavaron 5 veces durante 5 min cada una en PBS-T. A continuación los embriones se incubaron con tampón de hibridación a 65°C durante 10 min y luego de hacer un recambio de la solución, se incubó toda la noche. La ribosonda-DIG fue previamente denaturada durante 5 min a 60°C para luego incubar los embriones toda la noche a 60°C.

Para eliminar las uniones inespecíficas de las sondas todas las soluciones se precalentaron a 65°C y luego se incubaron los embriones 10 min en formamida/SSC 2x al 75%, luego durante 10 min en formamida/SSC 2x al 50% y 10 min en formamida/SSC 2x al 25%, 10 min en SSC 2x y finalmente 2 veces durante 30 min en SSC 0,2x. Con el objetivo de bloquear los sitios inespecíficos, los embriones se incubaron durante 5 min en MAB-T, por 1 h en MAB+BMB+LS a temperatura ambiente y luego de un recambio de la solución se dejaron toda la noche a 4°C. En forma independiente, el anticuerpo anti-digoxigenina (dilución 1:200) debe incubarse a 4°C mientras los embriones se están bloqueando a 4°C, para luego incubar los embriones durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo anti-digoxigenina. El lavado del anticuerpo se realizó 5 veces durante 20 min cada una con MAB-T y 3 veces durante 5 min cada una en tampón AP. Finalmente, para revelar la presencia del anticuerpo los embriones se trataron con el sustrato de la fosfatasa alcalina NBT/BCIP BM *Purple AP Substrate* en oscuridad y durante el tiempo necesario para que apareciera la tonalidad púrpura esperada en la zona de expresión del mRNA. Finalmente, se lavo los embriones 3 veces durante 5 min en PBS-T.

2.2.4 Inmunoprecipitación de Cromatina

El ensayo de inmunoprecipitación de cromatina fue realizado de acuerdo a Havis (Havis y col, 2006) con modificaciones. Los resultados fueron obtenidos repitiendo tres veces el siguiente procedimiento para cada estadio analizado. Primero, los embriones desde 15 hpf en adelante son decorionados con forceps y los de 6 y 10 hpf fueron tratados por 2 min a temperatura ambiente con Pronasa 0,5 mg/mL en E3. Los embriones son homogeneizados en 2 mL de una solución que contiene sacarosa 2,2 M, CaCl₂ 3 mM, Tris-HCl pH 7,5 10 mM, 0,5% Tritón X-100 PMSF 1mM, Aprotinina 1µg/µL, Pepstatina 1µg/µL. El macerado es centrifugado a 100.000 g (rotor Sorvall AH-650) durante 3h a 4°C. El pellet es resuspendido en 1 mL de una solución sacarosa 0,25 M, Tris-HCl pH 7,5 10 mM, CaCl₂ 3 mM, PMSF 1 mM, Aprotinina 1µg/µL, Pepstatina A 1µg/µL y centrifugado a 6000 g por 5 min a 4°C (Hermle Z 233 MK, rotor 220.59 V07), el pellet es resuspendido en 360 uL de la misma solución. Para entrecruzar las proteínas con el DNA, los núcleos son tratados con formaldehído 1% por 10 min en hielo y 20 min a temperatura ambiente. Se detiene el entrecruzamiento tratando con glicina 0,125 M. Se centrifugan los núcleos a 6000g por 5 min a 4°C y se resuspenden en 400 µL de buffer SDS lisis (SDS 1%, Tris-HCl 50 mM pH 8.1, EDTA 10 mM, PMSF 1mM, Aprotinina 1µg/µL, Pepstatina A 1µg/µL). Luego se sonicán los extractos en hielo para obtener fragmentos de DNA de 500 a 1500 pb, 15 pulsos de 10 s en posición 3 (20%) con intermedios de 1 min (sinicador Misonix XL-100). Se cargan 10 µL del sonicado en un gel de agarosa al 1% para evaluar la calidad de la cromatina y el grado de la sonicación. Se centrifuga el sonicado a 14.000 rpm por 15 min. Luego, la cromatina soluble es cuantificada midiendo el coeficiente de extinción molar a una longitud de onda de 260 nm (E260) de una dilución 1:50 en agua, donde el valor

entregado se considera arbitrariamente como el número de unidades E260 por cada 2 μL de solución, se alícuota la cromatina soluble de 8-10 unidades E260 y se guardan 3 unidades E260 para ser usadas posteriormente como control de cantidad de cromatina

Se diluyen 8-10 unidades E260 por inmunoprecipitación hasta 400 μL totales en tampón de sonicación (50 mM Hepes pH 7,9, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Tritón X-100, 0,1% Na deaxicolato, 0,1% SDS). Para el pre-aclaramiento se agregan 20 μL de esferas de agarosa más proteína G (Santa Cruz Biotechnology, EE.UU) y se incuba con agitación durante hora a 4°C. Se precipitan las esferas centrifugando a 14.000 rpm por 5 min y se rescata el sobrenadante, al que se le agrega 4 μL de anticuerpo anti-IgG (Santa Cruz Biotechnology, EE.UU) y 3 μL de anticuerpo anti-histona H4 acetilada (Upstate, EE.UU) y se rota o/n a 4°C. Luego se agregan 50 μL de esferas de agarosa más proteína G y se incuban 1 h a 4°C. Se precipitan y se rescatan las esferas centrifugando 5 min a 5000 g a 4°C y se lavan agitando por 5 min a 4°C y centrifugando por 5 min a 5000 g a 4°C con las siguientes soluciones: Tampón de Sonicación (2 veces), tampón LiCl (20 mM Tris pH 8, 250 mM LiCl, 1 mM EDTA, 0.5 % Tritón X-100, 0,5% Na deoxicolato), Tampón de lavado Farham IP (100mM tris pH 8, 500 mM LiCl, 1% NP40, 1% Na deoxicolato), tampón TE. Se agregan 100 μL de tampón de elución (50 mM Tris pH8, 1 mM EDTA, 1% SDS) y se incuban por 15 min a 65°C. Las esferas luego se eliminan centrifugando a 14.000 rpm por 20 min y rescatando el sobrenadante. Se le agregan 4 μL de NaCl 5M (200mM concentración final) y 1 μL de Rnasa 10 mg/mL, a las alícuotas "control de cantidad de cromatina" se les agrega tampón de elución hasta 100 μL y NaCl hasta una concentración final de 200mM. Se incuban o/n a 65°C para revertir el entrecruzamiento. Se agregan 2.5 μL de

proteínasa K 10 mg/mL y se incuban por 2 h a 42°C. Luego se recupera el DNA mediante el protocolo de extracción de DNA con fenol/clóroformo.

2.2.5 TUNEL

Larvas WT de 48 hpf fueron fijadas en PFA 4% durante la noche a 4° C. Luego se incubaron en metanol por 1 h y se rehidrataron en gradiente. Posteriormente fueron procesadas para marcaje mediante la técnica de TUNEL utilizando el kit "*In situ* cell death detection TMR red", Roche. Se permeabilizaron las larvas tratando con proteínasa K por 30 minutos, se fijaron en PFA 4% por 20 minutos y luego se siguieron las instrucciones del fabricante. Como control negativo se realizó el marcaje de larvas sin uno de los componentes del kit no obteniéndose marca alguna. Como control positivo se trataron larvas con DNAsa I en tampón especial para esta enzima (Boehringer), por 20 minutos posterior a la permeabilización, y luego se procesaron normalmente obteniéndose marca en muchos núcleos a lo largo del cuerpo de la larva. Se observó la fluorescencia en el microscopio y se observaron los núcleos marcados.

II. RESULTADOS

3.1 Patrón de expresión de *prox1* en la línea lateral

Con el fin de determinar la participación de *prox1* en el desarrollo de la línea lateral del pez cebra analizamos, en colaboración con el Dr. Franco Cotelli de la Universidad de Milán, su patrón de expresión mediante hibridación *in situ*. El primordio de la línea lateral posterior expresa el transcrito durante todo su recorrido, comenzando aproximadamente a las 20 hpf y termina al final de la cola alrededor de las 40-42 hpf. En los neuromastos la expresión del transcrito de *prox1* es ubicua, tanto en células del manto, de soporte y ciliadas y se encontró durante todos los estadios analizados (Figura 4 A, B). La expresión de la proteína Prox1 se analizó utilizando un anticuerpo comercial de ratón que ha sido descrito reconoce la proteína Prox1 de pez cebra (Ober y col., 2006) y un anticuerpo secundario Alexa Fluor-594. En todos los estadios analizados se encontró una expresión heterogénea de Prox1 en los neuromastos (Figura 4 D-F). Probablemente esto se deba a las distintas distribuciones que posee la proteína en distintas etapas del ciclo celular: mayor análisis se requiere para definir esto. Además encontramos que cerca del 15% de los neuromastos analizados poseen células que expresan Prox1 externas al neuromasto, fuera del límite definido por las células del manto, con una fuerte fluorescencia. Posiblemente estas células sean algún tipo de progenitor de células del neuromasto que actúen en casos severos de daño que involucren a las células de soporte.

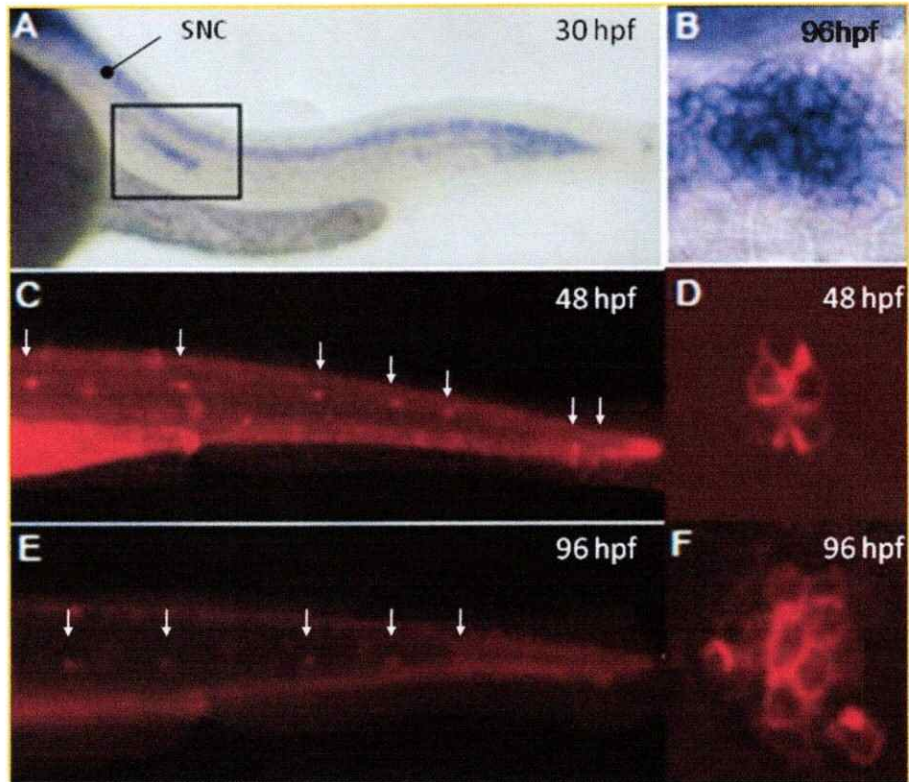


Figura 4. Expresión de *prox1* en la línea lateral de embriones de pez cebra. (A) Hibridación *in situ* de *prox1* a 30 hpf mostrando expresión en el SNC y en el primordio (cuadro). (B) Acercamiento a un neuromasto depositado de la LLP. (C, E) Inmunofluorescencia usando un anticuerpo anti-Prox1 y un anticuerpo secundario Alexa Fluor-594 a 48 y 96 hpf, las flechas blancas indican los neuromastos depositados. (D, F) Acercamiento a la expresión de Prox1 en neuromastos en ambos estadios.

3.2 Análisis de la expresión de Prox1 en relación a distintos marcadores de tipos celulares en el neuromasto

Para determinar los tipos celulares que expresan Prox1, analizamos su expresión en cinco líneas transgénicas, que se encuentran en nuestro laboratorio, y que expresan la proteína fluorescente verde (GFP) en distintos tipos celulares del neuromasto. Usamos las siguientes líneas transgénicas: línea *CldnB::GFP* con destinación a membrana celular que expresa GFP en todas las células del neuromasto;

línea *SqET20::GFP*, en células del manto; líneas *SqET4::GFP* de localización citoplasmática y *Bm3C::GFP* destinado a membrana, en células ciliadas; línea *Sox3::GFP*, en células progenitoras neurales (ver esquema de tipos celulares en neuromasto Figura 2C).

Las células del manto presentan una expresión de GFP más periférica que la de *Prox1*, siendo el único tipo celular con el que no encontramos colocalización (Figura 5 B, G). La expresión de *Prox1* dentro de la población de células de soporte se distribuye ampliamente, limitando con las células del manto. Es importante observar que la expresión de *Prox1* en las células de soporte es débil, comparable a la expresión en músculo esquelético que rodea los neuromastos pero encontramos frecuentemente entre una y tres células que expresan fuertemente *Prox1*, generalmente en el centro del neuromasto, cercanas entre ellas y con morfología similar a las células ciliadas (Figura 5 C, B, H), y otra veces en los bordes del neuromasto (Figura 5 D, F). Probablemente éstas sean células en proceso de diferenciación. Dentro de las células de soporte, todas las células que expresan *Sox3* también expresan *Prox1* y representan así un subgrupo de las células de soporte que expresan *Prox1* (Figura 5 E, J). Las células ciliadas muestran poca expresión de *Prox1*, sólo algunas células que expresan *Prox1* fuertemente colocalizan con la expresión de GFP en las células ciliadas. (Figura 5 C, D, H, I).

3.3 Análisis de la falta de función de *Prox1* en la línea lateral del pez cebra

La pérdida de función de *prox1* se obtuvo mediante la inyección de oligonucleótidos antisentido (morfolinos; Nasevicius y Ekker, 2000) en embriones de pez cebra inhibiendo específicamente la traducción de *prox1*. Los embriones

inyectados fueron mantenidos a 28°C hasta que fueron requeridos para analizarlos. Se diseñaron dos morfolidos, uno complementario a una secuencia del mRNA del gen que incluye el codón de inicio de la traducción ATG, impidiendo de esta forma el acceso de la maquinaria de traduccional, y un segundo morfolido diseñado para bloquear el correcto procesamiento –splicing- del RNA forzando a una expresión alterada del transcrito. Ambos morfolidos generan el mismo fenotipo, lo que demuestra la especificidad del método utilizado. Los embriones control fueron inyectados con un morfolido dirigido para contra el gen *zash1a*, el cual no produce un fenotipo evidente (Sarrazin y cols., 2006).

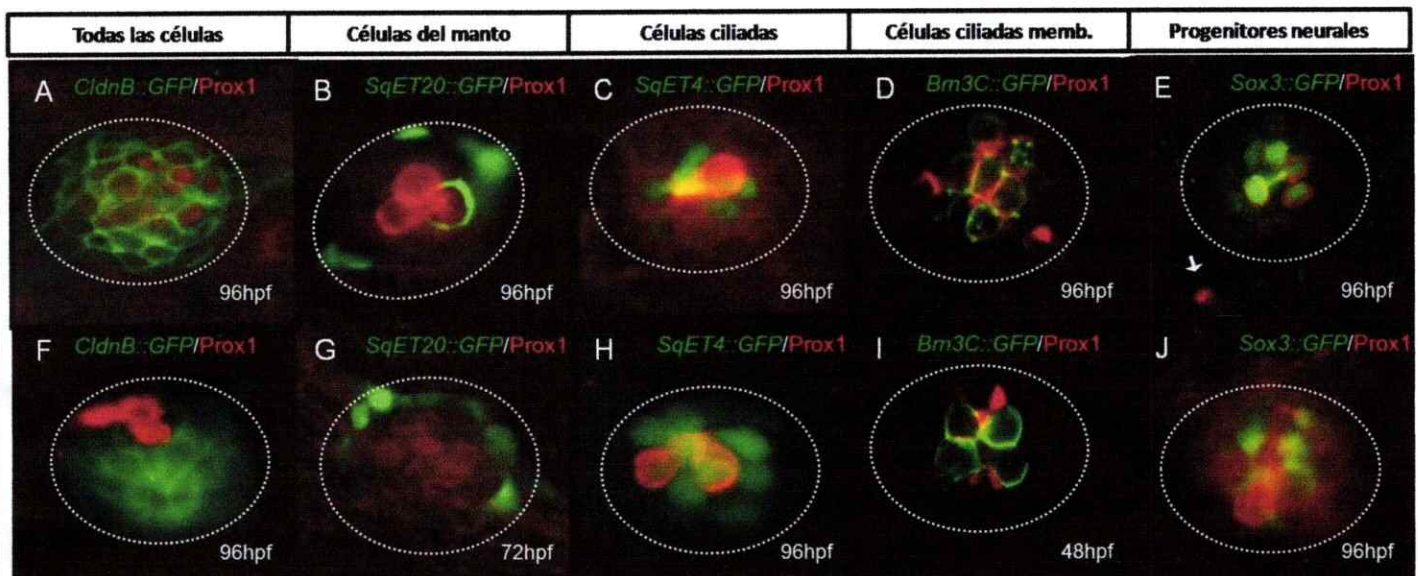


Figura 5. Colocalización de Prox1 con diferentes marcadores de tipo celular en neuromastos. Inmunofluorescencia de Prox1 (rojo) en diferentes líneas transgénicas: (A,F) *cldnB::GFP* que marca la membrana de todas las células del neuromasto, (B,G) *SqET20::GFP* que marca las células del manto, (C,H) *SqET4::GFP* que marca células ciliadas, (D,I) *Bmn3c::GFP* que marca membrana de células ciliadas, (E,J) *Sox3::GFP* que marca presuntas células progenitoras entre las células de soporte. Todas las imágenes corresponden a larvas de 96hpf, exceptuando la imagen G, que corresponde a una larva a 72 hpf y la imagen I a una larva de 48 hpf. Las circunferencias puntadas blancas muestran el tamaño aproximado del neuromasto observado. En cada caso mostramos dos ejemplos de la expresión de Prox1 en el neuromasto. 85% (n=120) de los neuromastos presentan una fluorescencia de Prox1 de baja intensidad y abarca la mayor parte de las células de soporte, y un 15% presentó fluorescencias fuertes en pocas células que pueden ser ciliadas, de soporte o periféricas al neuromasto.

Para analizar el efecto de la falta de función de Prox1 en la línea lateral del pez cebra se recogieron los embriones que a las 48 hpf poseían una estructura corporal normal, con una leve disminución del tamaño de la cola y que en gran porcentaje presentaron un edema en el corazón. En una primera aproximación se observaron los neuromastos mediante la tinción vital DiAsp, molécula que tiene la capacidad, con el protocolo realizado, de penetrar en las células ciliadas vía canales mecanotransductores presentes en la superficie apical. Este procedimiento marca

células ciliadas en una etapa tardía de diferenciación, cuando han alcanzado la funcionalidad y presentan cilios. Al realizar la tinción vital DiAsp, un 90% de los embriones control (n=80) presentaron entre 5 y 7 neuromastos depositados por lado a las 48 hpf (Figura 6A). En contraste sólo un 15% de los embriones inyectados con morfolino de *prox1* presentan un número de neuromastos depositados normal (Figura 6 B), un 65% presentó una reducción en el número de neuromastos marcados, entre 1 y 4, y un 20% no presentó neuromastos marcados (n=76). Para estudiar las razones del menor número de neuromastos marcados utilizamos el transgénico *CldnB::GFP* y contamos las células del primordio en embriones control y morfantes, no encontramos diferencias significativas (Figura C y D). Además realizamos inmunocitoquímica de tubulina acetilada, que marca células ciliadas diferenciadas y el nervio de la línea lateral, observándose un patrón normal de expresión en el nervio de la línea lateral (Figura 6 E, F) y, al igual que con el fluoróforo DiAsp, se encontró menor cantidad de neuromastos marcados. No realizamos el conteo de neuromastos con esta técnica por la dificultad de identificar neuromastos depositados. Realizamos el ensayo de TUNEL para detectar un posible aumento en la muerte celular por apoptosis (Figura 6 G y H), y no se encontraron diferencias significativas entre el morfante y el WT que explicasen el menor número de neuromastos marcados con DiAsp.

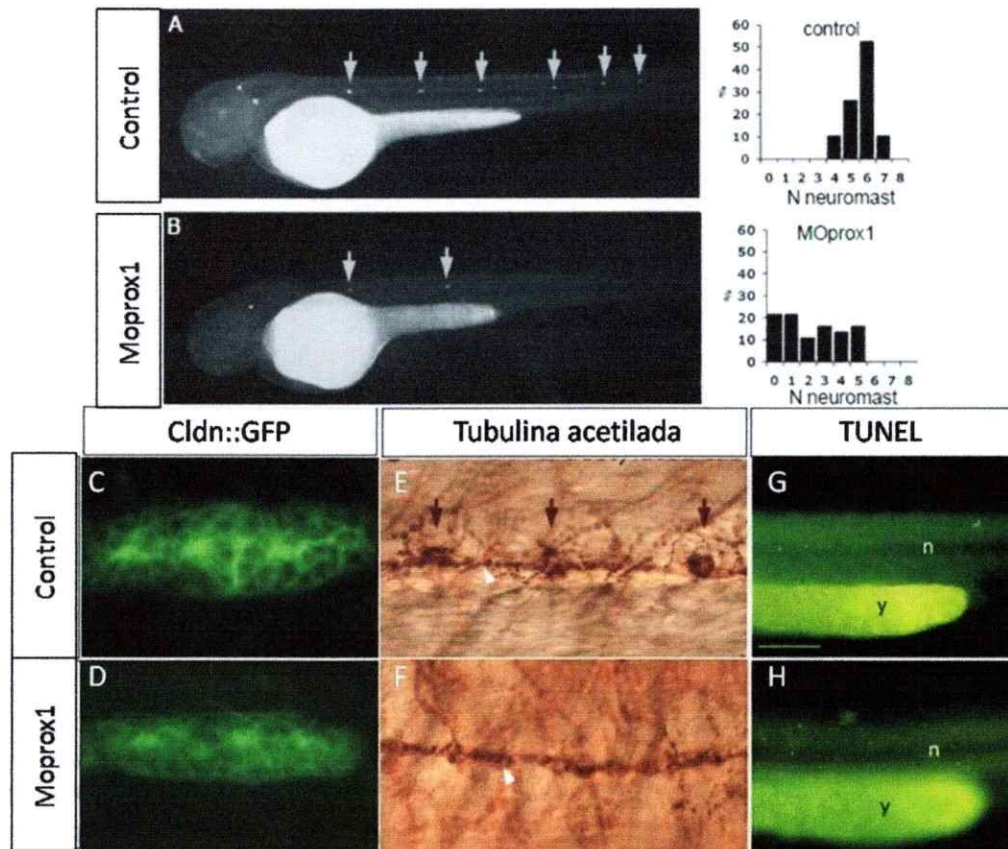


Figura 6. Efecto de la falta de función de Prox1 en la línea lateral posterior. (A,B) Neuromastos en una larva de 48 hpf marcados con la tinción vital DiAsp (indicados con flechas blancas) en una larva wild type (A) y en una larva inyectada con un morfolino de Prox1 (B). Se produce una reducción en el número de neuromastos marcados en el morfante.. Se grafica además el número de neuromastos marcados en 76 embriones morfantes y 80 embriones control donde el 85% de los embriones inyectados con morfolino de *prox1* presenta entre 0 y 4 neuromastos marcados (C,D) Primordio marcado con GFP migrando a las 32 hpf en la línea transgénica *cldnB::GFP*. El número de células en el primordio no se ve afectado en las larvas morfantes. (E,F) Inmunocitoquímica de tubulina acetilada revelada con DAB (diaminobenzidina) indica que el nervio de la línea lateral no está afectado en morfantes. Nervio aparece indicado por una cabeza de flecha blanca y neuromastos por flechas café. (G,H) Las larvas morfantes no muestran un aumento en la muerte celular indicada por el ensayo de TUNEL. n, notocorda; y, vitelo.

Analizamos además el efecto de la falta de función de Prox1 específicamente en el neuromasto, y para esto inyectamos embriones de las líneas transgénicas que expresan GFP en los distintos tipos celulares que componen los neuromastos. No observamos efecto en el transgénico que SqET20::GFP que expresa GFP en las células del manto (Figura 7 A y B). Tampoco notamos alteraciones utilizando el transgénico SCM que expresa GFP en las células de soporte (Figura 7 C y D). Con el transgénico Brn3C que expresa GFP en membrana de las células ciliadas y nuevamente no encontramos ningún efecto en las larvas morfantes (Figura 7 E y F). Pero al marcar las células ciliadas con la tinción vital DiAsp en embriones control y morfantes de la línea transgénica *Brn3c::GFP*, nuestros resultados muestran que menos del 50% de las células ciliadas que expresan GFP son capaces de incorporar el DiAsp (Figura 7 G y H). Existe entonces en las larvas morfantes la capacidad de desarrollar y diferenciar células ciliadas pero algún problema poseen durante estos procesos que menos células ciliadas alcanzan a ser funcionales.

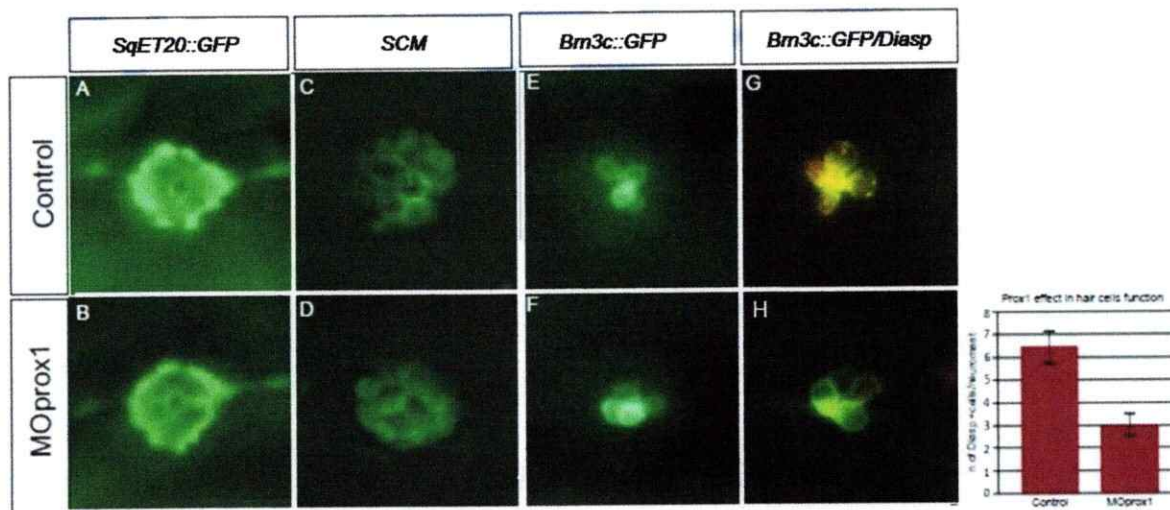


Figura 7. La falta de función de Prox1 afecta la diferenciación funcional de las células ciliadas en los neuromastos de la línea lateral del pez cebra. Las larvas morfantes muestran una expresión de GFP normal en las células del manto (A, B), (C, D) células progenitoras, y (E, F) células ciliadas. Lo que indica que no existe un efecto del morfolino de Prox1 en la especificación de éstos tipos celulares en el neuromasto. (G, H) La tinción vital DiAsp indica que cerca de un 50% de las células ciliadas presentes en un neuromasto no son funcionalmente activas. El gráfico muestra la cuantificación de las células marcadas con DiAsp en larvas control y morfantes.

3.4 Regulación transcripcional de los genes *Iroquois*: análisis de modificaciones de la cromatina en elementos reguladores altamente conservados.

Los genes *Iroquois* presentan una estructura genómica evolutivamente muy conservada. Se han logrado identificar regiones intergénicas de una alta conservación realizando comparaciones *in silico* entre las regiones *irx3-irx5*, *irx5-irx6*, *irx1-irx2* e *irx2-irx4* de humanos, ratón, pez cebra y fugu (de la Calle-Mustienes E y cols, 2005), En ese trabajo se realizó un experimento llamado Phylogenetic Footprinting que consiste en comparar secuencias genómicas de distintas especies y alinearlas entre sí con el programa VISTA, y de esta forma se encontraron secuencias altamente conservadas en regiones no codificantes comparando especies muy divergentes como humano y fugu, estas regiones, por lo tanto, deben tener una función regulatoria

Se realizaron ensayos funcionales para saber si estas secuencias encontradas eran secuencias reguladoras potenciadoras de la transcripción y analizaron sus actividades potenciadoras dirigiendo la expresión de GFP, lo que otorga un fuerte argumento para explicar esta alta conservación.

La transcripción además está regulada por modificaciones a la cromatina, como acetilaciones, fosforilaciones y ubiquitinaciones. Para profundizar el estudio de la regulación transcripcional de los genes *Iroquois*, en este trabajo analizamos el estado de acetilación durante el desarrollo de la histona H4 en las regiones intergénicas altamente conservadas que en los ensayos funcionales potenciaron la expresión de GFP, empleando la técnica de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) para precipitar las regiones unidas a histona H4 acetilada en embriones de pez cebra de 6 hpf, 10 hpf, 15 hpf, 24 hpf, 48 hpf, 72 hpf y 96 hpf. Utilizamos como control un par de partidores

diseñados para amplificar 310 pb del promotor de *kx20* (Havis y col., 2006), cuyo patrón de expresión ha sido estudiado previamente por hibridación *in situ* (Oxtoby y Jowett, 1993). La expresión de *kx20* comienza a las 10 hpf en los rombómeros 3 y 5 del cerebro posterior y se mantiene hasta las 30 hpf, último estadio analizado. Nuestros resultados son consistentes con el patrón de expresión observado por hibridación *in situ*.

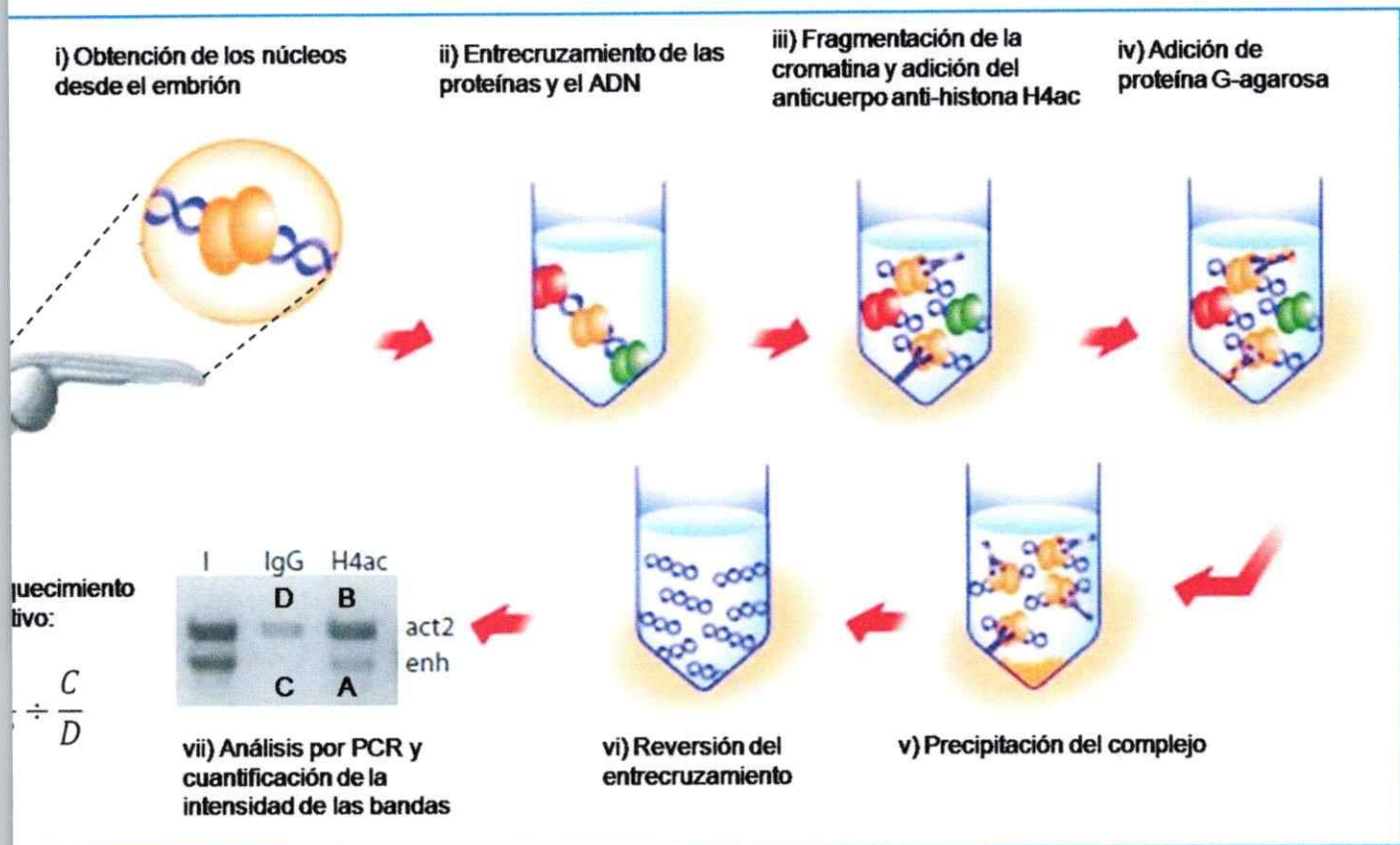


Figura 8. Representación esquemática de los pasos seguidos en la técnica de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) utilizada. Luego del ChIP las secuencias potenciadoras previamente identificadas fueron amplificadas por PCR. Un par de partidores de beta-actina 2 también fue añadido a la mezcla de PCR como control interno de amplificación. El enriquecimiento relativo del precipitado de las distintas secuencias potenciadoras fue calculada. I, input (extracto total); IgG, anticuerpo anti-IgG (control negativo); H4ac, Histona H4 acetilada; act2, beta-actina 2; sp, secuencia potenciadora.

Región	Nombre	6h	10h	15h	24h	48h	72h	96h
lrx3 – lrx5	Z54129	3,771	6,301	12,589	60,445	56,738	3,860	3,052
	Z54302	1,993	1,172	0,741	1,142	11,169	10,787	0,947
lrx5 – lrx6	Z54854	0,600	1,784	9,597	1,320	3,929	3,416	5,247
	Z55019	1,153	0,694	1,522	0,538	0,654	0,970	1,171
	Z55203	0,753	0,127	39,290	1,184	6,979	22,192	8,613
lrx1 – lrx2	Z5682	20,787	4,297	9,080	4,357	9,615	14,485	10,489
	Z5179	20,122	6,195	23,576	2,130	15,258	3,401	4,175
	Z4126	1,614	2,905	2,430	2,309	1,545	6,748	1,420
	Z5224	1,410	0,118	1,691	0,745	0,966	0,576	0,580
	Z3565	15,522	NA	9,139	4,572	10,786	1,507	11,040
	Z2260	1,220	1,008	0,401	4,356	6,196	7,227	5,605
	Z2389	3,857	2,724	0,493	4,417	4,379	14,855	0,024
	UCR0	3,744	1,076	5,277	0,648	1,161	2,523	15,259




Tabla 1. Resultados de la Inmunoprecipitación de Cromatina. Promedio de tres cuantificaciones de la intensidad de banda realizadas con el programa Kodak 1D Image Analysis Software Versión 3.4.5 para cada secuencia en los estadios de 6 hpf, 10 hpf, 15 hpf, 24 hpf, 48 hpf, 72 hpf y 96 hpf luego de la inmunoprecipitación con un anticuerpo anti-histona H4 acetilada. La escala de colores utilizada muestra con rojo un enriquecimiento promedio igual a 0 y con verde promedios mayores o iguales a 10. Consideramos arbitrariamente un enriquecimiento relativo promedio igual a 2 con color amarillo más intenso. NA, dato no analizado.

La técnica de inmunoprecipitación de cromatina utilizada en este trabajo es una adaptación del método para su aplicación a embriones completos de pez cebra (Havis y col., 2006). Empleamos estadios de 6 hpf, 10 hpf, 15 hpf, 24 hpf, 48 hpf, 72 hpf y 96 hpf, y se basa en cinco principales etapas: i) Obtención de los núcleos, aislados principalmente de los lípidos del vitelo; ii) Entrecruzamiento de las proteínas y el DNA con formaldehído; iii) Fragmentación de la cromatina por sonicación; iv) Inmunoprecipitación selectiva de complejos DNA-histona H4 acetilada con anticuerpos específicos y v) PCR para analizar la presencia de la secuencia potenciadora previamente identificada. Se utilizó inmunoglobulina G (IgG) para cuantificar las uniones inespecíficas del anticuerpo y se añadió al PCR un par de partidores de beta-actina 2 como controles de carga. El amplificado se analizó mediante geles de acrilamida al 2% p/v y la intensidad de las bandas obtenidas fue medida con el programa Kodak 1D Image Analysis Software Versión 3.4.5. El enriquecimiento relativo en el inmunoprecipitado de las diferentes secuencias potenciadoras analizadas se calculó normalizando la intensidad de la banda de la secuencia potenciadora con la banda de beta-actina 2, en el precipitado de histona H4 acetilada y en el control, luego se divide la intensidad de la banda de la secuencia potenciadora normalizada de histona H4 acetilada con la de IgG. Esto se realizó para cada secuencia promotora en los siete estadios estudiados por triplicado, obteniéndose un enriquecimiento relativo promedio. Utilizamos una escala colorimétrica para presentar los valores de los enriquecimientos relativos, donde valores entre 0 y 2 se presentan con una gama de colores que van desde rojo a amarillo y valores entre 2 y 10 con colores que van desde el amarillo al verde, los valores superiores a 10 mantienen el mismo color verde (Tabla 1). Se muestra un gran dinamismo en el grado de acetilación de la histona H4 en las secuencias analizadas a través del desarrollo.

III. DISCUSIÓN

En vertebrados, *prox1*, ortólogo de Prospero, tiene un papel claro en el proceso de diferenciación celular en distintos tejidos como en médula espinal, cerebro, músculo esquelético, corazón, hígado, páncreas y en células endoteliales formadoras del sistema endolinfático. En el oído interno de ratón y pollo tendría un papel en la diferenciación de células ciliadas ya que se expresa en células de soporte y en células ciliadas inmaduras.

En este trabajo se buscó profundizar en el conocimiento actual sobre el desarrollo y regeneración de las células ciliadas en el sistema de la línea lateral del pez cebra. Para esto *prox1*, por sus características arriba mencionadas, es un buen candidato de estudio para la comprensión de la incapacidad de regeneración de las células ciliadas en el oído interno en mamíferos.

4.1 Patrón de expresión de *prox1* en la línea lateral del pez cebra.

Analizamos la expresión de *prox1* mediante hibridación *in situ* en el sistema de la línea lateral del pez cebra, encontramos que la expresión del mensajero de *prox1* abarca gran número de células tanto en el primordio migratorio, durante todo su recorrido, como en gran parte de las células que componen los neuromastos. De igual manera, la proteína Prox1, detectada mediante inmunofluorescencia, está presente en algunas células ciliadas y en gran parte de las células de soporte. Nos llamó la atención la aparición de células externas al neuromasto que expresan Prox1, Éstas células podrían estar involucradas en regeneración de células del neuromasto en casos de daño severo. Varios antecedentes indican (Hernandez y col., 2007) que al

dañar las células ciliadas, células de soporte que expresan *sox2* tienen la capacidad de regenerarlas, pero en daños más profundos que comprometan a las células de soporte es posible que pueden actuar las células periféricas que expresan *Prox1* en repoblar las células de soporte y las células ciliadas perdidas. Para definir esto se requieren estudios de regeneración dañando específicamente distintos tipos celulares, por ejemplo tratando a los embriones con distintas concentraciones de cobre (Hernández y col., 2006). La amplia expresión de *prox1* en el sistema de la línea lateral manifiesta una importancia relevante en el desarrollo del sistema, posiblemente está involucrado regulando las divisiones asimétricas que llevan a la diferenciación de las células mecanorreceptoras.

Definir los tipos celulares que expresan *Prox1* es un paso importante para definir las funciones en el desarrollo del sistema de la línea lateral. Analizamos por inmunofluorescencia la expresión de *Prox1* en cinco líneas transgénicas que expresan GFP en distintos tipos celulares: células del manto, células de soporte y células ciliadas. Encontramos dos tipos de expresiones de *Prox1* en las células de soporte, unas que lo expresan débilmente y que abarca gran cantidad de las células de soporte y otras, entre una y tres células por neuromasto, que expresan fuertemente *Prox1*. Homologando con lo que ocurre en neurogénesis en *Drosophila*, donde los neuroblastos contienen altos niveles de RNA de *prospero*, pero el mRNA no es traducido eficientemente, es posible que las células de baja expresión de *Prox1* son células de soporte de una potencialidad mayor que las células *sox3*, listas para diferenciarse si son requeridas durante el desarrollo o en regeneración. Las células que expresan *Prox1* fuertemente deben ser células que acumularon *Prox1* y entraron en proceso de diferenciación, por ejemplo a célula ciliada ya que hemos encontrado este

tipo de células en el centro del neuromasto con morfología de célula ciliada e incluso algunas cuya expresión de *Prox1* colocaliza con la expresión de GFP en las células ciliadas en el transgénico *SqET4::GFP*.

Vemos en consecuencia que el grupo de las células de soporte es un grupo muy heterogéneo, donde encontramos grupos celulares con expresiones distintas de marcadores como *sox3*, *SCM*, *prox1* entre otros. Las células que expresan *prox1* son numerosas, incluyen a las que expresan *sox3*, por lo que *sox3* podría expresarse en células de soporte progenitoras con características específicas y *prox1* marcar células de soporte con un potencial diferente.

4.2 Falta de función de *prox1* y su efecto en la línea lateral

Analizamos además el papel de *prox1* en la línea lateral por falta de función, inyectando morfolinós a embriones WT y de tres líneas transgénicas. Los embriones morfantos presentaron un menor número de neuromastos marcados por la tinción vital DiAsp. Para encontrar la razón de este fenotipo contamos el número de células en el primordio y resultó ser normal, el nervio de línea lateral tampoco se encuentra afectado y no encontramos un aumento en la muerte celular por apoptosis que diera cuenta del menor número de neuromastos marcados. Y analizando los morfantos de las líneas transgénicas *SqET20::GFP*, *SCM* y *Bm3c::GFP* no encontramos alteraciones en las células del manto, ni en las células de soporte que expresan *SCM*, ni en las células ciliadas. Pero al teñir con DiAsp los morfantos de la línea *Bm3c::GFP* encontramos que menos del 50% de las células ciliadas con respecto a los embriones WT logran incorporar DiAsp. La falta de *Prox1* no afecta la diferenciación de las células ciliadas ni el compromiso de las células progenitoras a célula ciliada, pero de alguna manera

afecta a las etapas finales de diferenciación, en la capacidad de las células con compromiso a célula ciliada de completar la diferenciación y lograr la funcionalidad. Si bien el morfolino de splicing y el complementario al codón de inicio de traducción producen el mismo fenotipo demostrando la especificidad del método, falta analizar si la inhibición de la expresión de la proteína es total o parcial para así poder definir si las células que logran la funcionalidad en los morfantes, al incorporar el pigmento DiAsp, lo hacen por participación de Prox1 en la diferenciación o porque de alguna forma soslayan su función. Será necesario, por lo tanto, analizar por Westernblot el nivel de la expresión de Prox1 en los morfantes.

1.2 Importancia biomédica de esta investigación

En el hombre, la principal causa de sordera es la pérdida de las células ciliadas por envejecimiento, enfermedad, trauma acústico o por drogas tóxicas. Este proceso es irreversible en estadios post embrionarios, ya que no se desarrollan nuevas células ciliadas de forma espontánea y no existe un tratamiento terapéutico para recuperar las células ciliadas en estos pacientes. En contraste, los vertebrados no mamíferos poseen una capacidad regenerativa muy robusta. Por ejemplo, daños a las células ciliadas en la cóclea de pollos induce regeneración de nuevas células ciliadas funcionales, además en peces existe un continuo recambio de células ciliadas como también una regeneración total de ellas posterior a un daño. En estas especies, la regeneración o reemplazo de las células ciliadas parece originarse de una población de las células de soporte que subyacen a las células ciliadas en estos órganos sensoriales (Corwin y Cotanche, 1988; Ryals y Rubel, 1988; Cotanche y Lee, 1994; Fekete y col., 1998; Roberson y col., 2004). Se desconoce actualmente si la ausencia de regeneración de células ciliadas en mamíferos se debe a una incapacidad inherente a las células de

soporte de dividirse y diferenciarse a célula ciliada o si existe un bloqueo de una señal esencial que gatille este proceso. Reportes recientes han mostrado que cultivos post-mitóticos de células de soporte aisladas de cóclea de ratón son capaces de dividirse y trans diferenciarse a célula ciliada (White y col., 2006). Además, estudios del gen *atonal homolog 1 (ath1)*, un factor de transcripción esencial para el desarrollo de células ciliadas, han entregado evidencia adicional de que las células de soporte mantienen este potencial. Sobreexpresión de *ath1* en el oído interno usando vectores retrovirales induce aparición de nuevas células ciliadas en cerdos de Guinea sordos, adquiriendo una recuperación parcial de la audición (Izumikawa y col., 2005). Sin embargo el papel de *prox1* en este proceso aún no ha sido analizado.

4.3 Proyecciones

Este es el primer paso en el análisis del papel de *prox1* en la diferenciación de las células ciliadas. Lo siguiente en este camino es sobreexpresar *prox1* mediante la inyección de su mRNA en embriones de pez cebra suministrando un excedente del transcrito de manera tal que, o bien actúe antes de lo correspondiente, ejerza su acción en lugares ectópicos, o bien fuerce la decisión de un número mayor de células a adoptar un destino de progenitor. También en este caso es importante definir la distribución subcelular de *Prox1* en las distintas etapas del desarrollo de la línea lateral, utilizando marcadores subcelulares y de polaridad celular ya que *Prox1* es una proteína que segrega asimétricamente durante la división celular.

La pérdida de células ciliadas por enfermedad, trauma y toxicidad a drogas en una causa común de sordera en humanos, una condición que se piensa irreversible debido a la incapacidad de producir nuevas células ciliadas. En otros vertebrados si se produce regeneración de las células ciliadas, ya sea luego de un daño o por continuo recambio celular. Lo mismo ocurre en el sistema de la línea lateral de peces y anfibios. Es nuestro objetivo comprender el proceso de regeneración de las células ciliadas en la línea lateral, y en este sentido es importante analizar el papel de *prox1*. Se han realizado distintos estudios de regeneración en pez cebra induciendo la muerte de las células ciliadas por antibióticos aminoglicósidos y drogas como cisplatina (Cheng y col., 2005; Henderson y col., 2006; Rizzi y Hirose, 2007; Selimoglu, 2007). En nuestro laboratorio se reportó que las células ciliadas de la línea lateral del pez cebra son sensibles a bajas concentraciones de cobre, como sulfato de cobre, disuelto en el medio (Hernández y col., 2006), lo que nos permitiría eliminar específicamente las células ciliadas de los neuromastos o además las células de soporte, y estudiar así el comportamiento de las células que expresan *prox1* y el papel que desempeñan en el proceso de regeneración.

4.4 Análisis del estado de acetilación de la histona H4 en las secuencias conservadas no codificantes entre los genes *Iroquois*

Debido a que el empaquetamiento del DNA en la cromatina provoca una represión general de la actividad génica, la reconfiguración de la cromatina es esencial para la formación del complejo de preiniciación de la transcripción (CPI), el inicio de la transcripción (Fry, 2001), y la unión de trasactivadores en secuencias potenciadoras. Esto se logra mediante complejos de remodelación adenosín trifosfato (ATP)

dependientes, que alteran la conformación de los nucleosomas, y por histonas acetiltransferasas (HATs), que insertan modificaciones covalentes en las histonas nucleosomales. La visión actual es que estos dos tipos de proteínas son reclutadas por factores de transcripción, específicos para algunas secuencias, que establecen una reestructuración local de la cromatina, permitiendo así la subsecuente unión de CPIs o de transactivadores.

Múltiples residuos de arginina y lisina en las histonas nucleosomales son sometidas a modificaciones post traduccionales incluyendo metilaciones y acetilaciones. Muchas de estas modificaciones están asociadas a distintos estados transcripcionales, en particular las acetilaciones en las histonas H3 y H4 se asocian a regiones activas.

En este trabajo monitoreamos el estado de acetilación de la histona H4 en los nucleosomas que agrupan las secuencias potenciadoras ubicadas entre los genes *irx3~irx5*, *irx5~irx6*, *irx1~irx2* e *irx2~irx4*. Asignamos un valor promedio de enriquecimiento relativo para cada secuencia potenciadora, valor que representa un grado de acetilación relativo entre las secuencias. No podemos asociar, con este estudio, una secuencia con un bajo enriquecimiento relativo promedio que sea una secuencia no activa, porque no es posible asignar a un valor específico de enriquecimiento relativo la relajación de la cromatina y exposición de la secuencia a la maquinaria transcripcional. Además existen otras modificaciones post traduccionales, en ésta y otras histonas, que pueden descondensar la cromatina como las acetilaciones a la histona H3 por ejemplo.

Encontramos una gran variabilidad durante el desarrollo en el grado de acetilación de la histona H4 con distintas secuencias potenciadoras, desde secuencias que mantienen un alto grado relativo de acetilación de la histona H4 en todos los estadios analizados, como las secuencias Z54129 y Z5179, hasta secuencias en que la histona H4 muestra un bajo grado de acetilación en todos los estadios del desarrollo, la secuencia Z55019 por ejemplo.

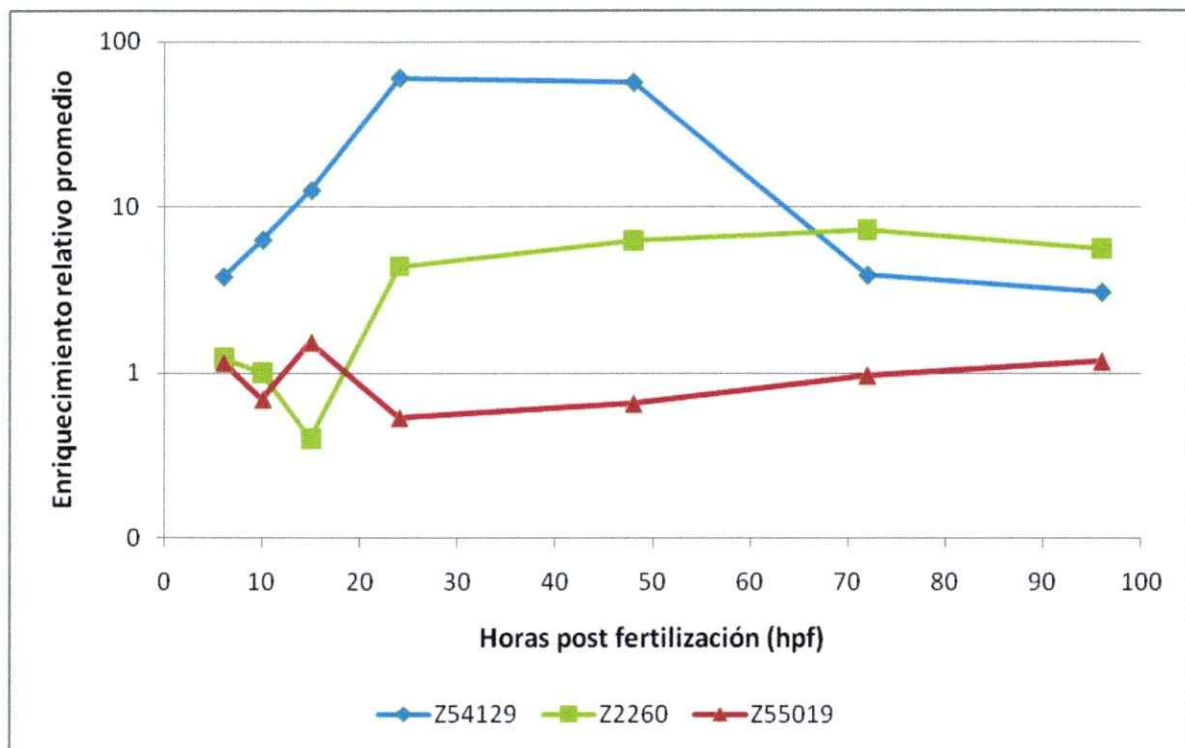


Figura 9. Perfil de enriquecimientos relativos de tres secuencias potenciadoras durante el desarrollo. Se muestran tres ejemplos de secuencias potenciadoras que representan tres comportamientos distintos. La secuencia Z54129 que presenta un grado relativo de acetilación de la histona H4 a través del desarrollo muy por encima del resto de las secuencias. La secuencia Z55019 por el contrario muestra en todos los estadios analizados un enriquecimiento relativo muy bajo. La secuencia Z2260 muestra un bajo enriquecimiento relativo en los tres primeros estadios analizados y luego aumenta a las 24 hpf fuertemente su nivel relativo de acetilación.

Los resultados de inmunoprecipitación de cromatina (Tabla 1) muestran una gran dinamismo en los grados de acetilación de las secuencias potenciadoras, y

podemos observar estas variaciones en una secuencia específica a través del tiempo (Figura 9) donde se presentan tres secuencias analizadas a través de los estadios estudiados, la secuencia . La secuencia Z54129 presenta un grado relativo de acetilación de la histona H4 a través del desarrollo muy por encima del resto de las secuencias, lo opuesto ocurre en la secuencia Z55019 que muestra en todos los estadios analizados un enriquecimiento relativo muy bajo. La secuencia Z2260 muestra un bajo enriquecimiento relativo en los tres primeros estadios analizados y luego aumenta a las 24 hpf fuertemente su nivel relativo de acetilación.

También es posible analizar los datos obtenidos observando el nivel relativo de acetilación de la histona H4 por región intergénica a un estadio del desarrollo en particular (Figura 10), lo que nos permite observar variaciones a nivel genómico.

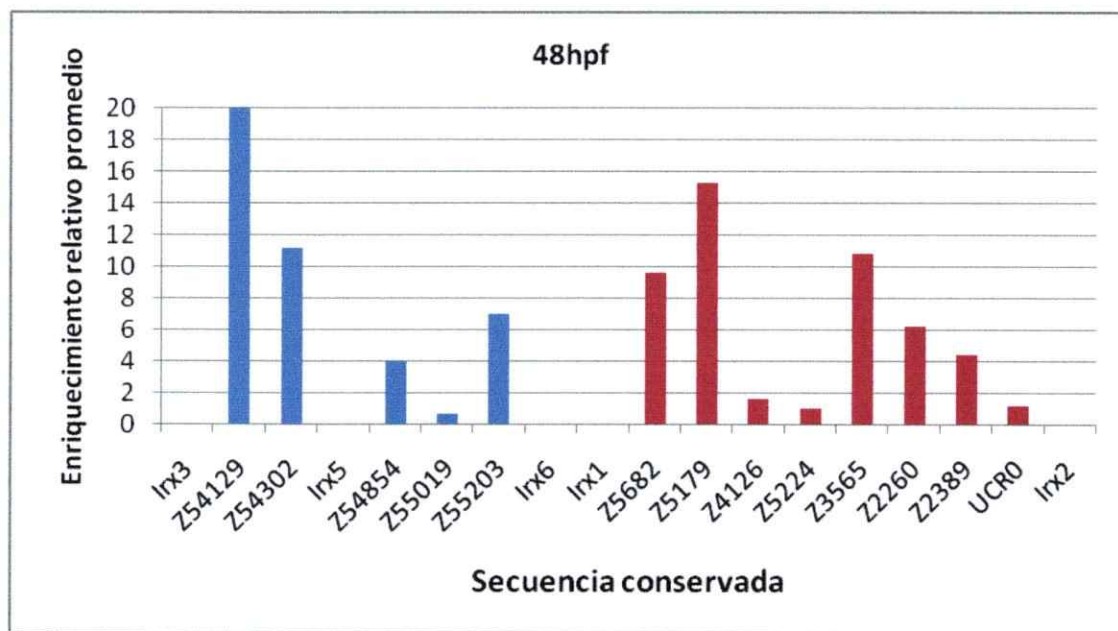


Figura 10. Enriquecimientos relativos de todas las secuencias conservadas a 48 hpf. Se muestra la posición de las secuencias conservadas en relación a los genes Irx. Se puede observar el gran dinamismo en los niveles relativos de acetilación en un estadio del desarrollo en particular.

Las secuencias analizadas fueron identificadas realizando comparaciones *in silico* entre las regiones *irx3-irx5*, *irx5-irx6*, *irx1~irx2* e *irx2~irx4* de humanos, ratón, pez cebra y fugu (de la Calle-Mustienes y col., 2005), donde probaron sus actividades potenciadoras clonando las secuencias río arriba del promotor basal de *irx3a* de pez cebra, promotor silente durante la embriogénesis en pez cebra, dirigiendo la expresión del gen reportero EGFP (de la Calle-Mustienes, 2005). Al sacar de contexto la secuencia potenciadora podemos probar su actividad pero perdemos toda la información relacionada a su regulación epigenética, pudiendo así dirigir una expresión de GFP en muchos territorios en transgénesis transiente pero en su condición nativa dirigirla sólo a algunos.

Con este trabajo complementamos estos resultados al analizar las secuencias potenciadoras en su contexto epigenético endógeno. Podemos, de esta forma, acercarnos de una mejor manera a explicar la conservación de los genes *Irx* y comprender finalmente los mecanismos de su regulación.

IV. CONCLUSIONES

- El mRNA de *prox1* presenta una distribución localizada en células que componen el sistema de la línea lateral en el pez cebra.
- La proteína Prox1 se encuentra presente en dos de los tipos celulares que componen los neuromastos de la línea lateral, en algunas células ciliadas y en algunas células de soporte.
- Prox1 es necesario para la diferenciación terminal de las células ciliadas en neuromastos de la línea lateral del pez cebra.
- Es posible realizar estudios de estado de acetilación de cromatina mediante inmunoprecipitación (ChIP) de embriones completos de pez cebra.
- Los elementos cis-reguladores conservados presentes en las regiones intergénicas del complejo de genes *lrx* de pez cebra, muestran modificaciones dinámicas de la cromatina consistentes con su rol en regulación transcripcional de esta familia génica.

BIBLIOGRAFÍA

- Balak KJ, Corwin JT, Jones JE. 1990. Regenerated hair cells can originate from supporting cell progeny: Evidence from phototoxicity and laser ablation experiments in the lateral line system. *J Neurosci.* **10**:2502-2512.
- Bao ZZ, Bruneau BG, Seidman JG, Seidman CE, Cepko CL. 1999. Regulation of chamber-specific gene expression in the developing heart by *Irx4*. *Science.* **283**:1161-4.
- Bellefroid EJ, Kobbe A, Gruss P, Pieler T, Gurdon JB, Papalopulu N. 1998. *Xiro3* encodes a *Xenopus* homolog of the *Drosophila Iroquois* genes and functions in neural specification. *EMBO J.* **17**:191-203.
- Birmingham-McDonogh O, Oesterle EC, Stone JS, Hume CR, Huynh HM, Hayashi T. 2006. Expression of *Prox1* during mouse cochlear development. *J Comp Neurol.* **496**(2),172-186.
- Bobola N, Jansen RP, Shin TH, Nasmyth K. 1996. Asymmetric accumulation of *Ash1p* in postanaphase nuclei depends on a myosin and restricts yeast mating-type switching to mother cells. *Cell* **84**(5), 699-709.
- Bosse A, Stoykova A, Nieselt-Struwe K, Chowdhury K, Copeland NG, Jenkins NA, Gruss P. 2000. Identification of a novel mouse *Iroquois* homeobox gene, *Irx5*, and chromosomal localisation of all members of the mouse *Iroquois* gene family. *Dev Dyn* **218**(1):160-74.
- Bosse A, Zülch A, Becker MB, Torres M, Gómez-Skarmeta JL, Modolell J, Gruss P. 1997. Identification of the vertebrate *Iroquois* homeobox gene family with overlapping expression during early development of the nervous system. *Mech Dev.* **69**(1-2):169-81
- Brun YV, Marczyński G, Shapiro L. 1994. The expression of asymmetry during *Caulobacter* cell differentiation. *Annu Rev Biochem.* **63**, 419-50.
- Bruneau BG, Bao ZZ, Fatkin D, Xavier-Neto J, Georgakopoulos D, Maguire CT, Berul CI, Kass DA, Kuroski-de Bold ML, de Bold AJ, Conner DA, Rosenthal N, Cepko CL, Seidman CE, Seidman JG. 2001. Cardiomyopathy in *Irx4*-deficient mice is preceded by abnormal ventricular gene expression. *Mol Cell Biol.* **21**(5):1730-6.
- Bürglin TR. A *Caenorhabditis elegans prospero* homologue defines a novel domain. 1994. *Trends Biochem Sci.* **19**(2),70-71
- Burke Z, Oliver G. 2002. *Prox1* is an early specific marker for the developing liver and pancreas in the mammalian foregut endoderm. *Mech Dev.* **118**(1-2),147-155.
- Cheng AG, Cunningham LL, Rubel EW. 2005. Mechanisms of hair cell death and protection. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* **13**(6):343-8.
- Christoffels VM, Keijser AG, Houweling AC, Clout DE, Moorman AF. 2000. Patterning the embryonic heart: identification of five mouse *Iroquois* homeobox genes in the developing heart. *Dev Biol.* **15**;224(2):263-74.
- Cohen DR, Cheng CW, Cheng SH, Hui CC. 2000. Expression of two novel mouse *Iroquois* homeobox genes during neurogenesis. *Mech Dev.* **91**(1-2):317-21.

- Collazo A, Fraser SE, Mabee PM. 1994. A dual embryonic origin for vertebrate mechanoreceptors. *Science*. **264**(5157):426-30.
- Corwin JT, Cotanche DA. 1988. Regeneration of sensory hair cells after acoustic trauma. *Science*. **240**(4860), 1772-1774.
- Cotanche DA, Lee KH, Stone JS, Picard DA. 1994. Hair cell regeneration in the bird cochlea following noise damage or ototoxic drug damage. *Anat Embryol (Berl)*. **189**(1),1-18.
- Cotanche DA, Lee KH. 1994. Regeneration of hair cells in the vestibulocochlear system of birds and mammals. *Curr Opin Neurobiol*. **4**(4),509-514.
- de la Calle-Mustienes E, Feijóo CG, Manzanares M, Tena JJ, Rodríguez-Seguel E, Letizia A, Allende ML, Gómez-Skarmeta JL. 2005. A functional survey of the enhancer activity of conserved non-coding sequences from vertebrate Iroquois cluster gene deserts. *Genome Res*. **15**(8):1061-72.
- Dhalluin C, Carlson JE, Zeng L, He C, Aggarwal AK, Zhou MM. 1999. Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. *Nature*. **399**(6735):491-6.
- Dijkgraaf, S. 1989. A short personal review of the history of lateral line research. In Coombs, S., Görner, P. and Münz, H. (eds.). *Mechanosensory lateral line: Neurobiology and Evolution*. Springer-Verlag, New York, pp 7-14.
- Feijóo CG, Manzanares M., de la Calle-Mustienes E., Gómez-Skarmeta JL., Allende ML. 2004. The *lrx* gene family in zebrafish: genomic structure, evolution and initial characterization of *irx5b*. *Dev Genes Evol*. **214**(6):277-84.
- Feijóo CG, Saldias M, De la Paz J, Gómez-Skarmeta JL, Allende ML. 2008. Formation of posterior placode derivatives requires the Iroquois transcription factor *irx4a*. *Mol. Cel. Neurosci*. **40**:328-337.
- Fekete DM, Muthukumar S, Karagozeos D. 1998. Hair cells and supporting cells share a common progenitor in the avian inner ear. *J Neurosci*. **18**(19), 7811-7821.
- Fry CJ, Peterson CL. 2001. Chromatin remodeling enzymes: who's on first? *Curr Biol*. **11**(5):R185-97.
- Funayama T, Narumi I, Kikuchi M, Kitayama S, Watanabe H, Yamamoto K. 1999. Identification and disruption analysis of the *recN* gene in the extremely radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *Mutat Res*. **435**(2):151-61
- Ghysen, A., Dambly-Chaudière, C. 2004. Development of the zebrafish lateral line. *Curr Opin Neurobiol* **14**, 67-73.
- Glasgow E, Tomarev SI. 1998. Restricted expression of the homeobox gene *prox1* in developing zebrafish. *Mech Dev*. **76**(1-2), 175-178.
- Gómez-Skarmeta JL, Glavic A, de la Calle-Mustienes E, Modolell J, Mayor R. 1998. *Xiro*, a *Xenopus* homolog of the *Drosophila* Iroquois complex genes, controls development at the neural plate. *EMBO J*. **17**(1):181-90.
- Goriely A, Diez del Corral R, Storey KG. 1999. *c-lrx2* expression reveals an early subdivision of the neural plate in the chick embryo. *Mech Dev*. **87**(1-2):203-6.

- Guenther C, Garriga G. 1996. Asymmetric distribution of the *C. elegans* HAM-1 protein in neuroblasts enables daughter cells to adopt distinct fates. *Development* **122**(11), 3509-3518.
- Hassan AH, Neely KE, Vignali M, Reese JC, Workman JL. 2001. Promoter targeting of chromatin-modifying complexes. *Front Biosci.* **6**:D1054-64.
- Havis, E. Anselme, Schneider-Maunoury, S. 2006. Whole embryo chromatin immunoprecipitation protocol for the in vivo study of zebrafish development. *BioTechniques.* **40**:34-40
- Henderson D, Bielefeld EC, Harris KC, Hu BH. 2006. The role of oxidative stress in noise-induced hearing loss. *Ear Hear.* **27**(1):1-19.
- Hernandez PP, Moreno V, Olivari FA, Allende ML. 2006. Sub-lethal concentrations of waterborne copper are toxic to lateral line neuromasts in zebrafish (*Danio rerio*). *Hear Res.* **213**:1-10.
- Hernandez PP, Olivari FA, Sarrazin AF, Sandoval PC, Allende ML. 2007. Regeneration in zebrafish lateral line neuromasts: expression of the neural progenitor cell marker *sox2* and proliferation-dependent and-independent mechanisms of hair cell renewal. *Dev Neurobiol.* **67**:637-54.
- Izumikawa M, Minoda R, Kawamoto K, Abrashkin KA, Swiderski DL, Dolan DF, Brough DE, Raphael Y. 2005. Auditory hair cell replacement and hearing improvement by *Atoh1* gene therapy in deaf mammals. *Nat Med.* **11**:271-6.
- Jenal U, Stephens C. 1996. Bacterial differentiation: sizing up sporulation. *Curr Biol.* **6**(2), 111-114.
- Jones JE, Corwin JT. 1993. Replacement of lateral line sensory organs during tail regeneration in axolotls: Identification of progenitor cells and analysis of leucocyte activity. *J Neurosci* **13**:1022-1034.
- Kemphues KJ, Etemad-Moghadam B, Guo S. 1996. Asymmetrically distributed PAR-3 protein contributes to cell polarity and spindle alignment in early *C. elegans* embryos. *Cell* **83**(5), 743-752.
- Kirjavainen A, Sulg M, Heyd F, Alitalo K, Ylä-Herttua S, Möröy T, Petrova TV, Pirvola U. 2008. Prox1 interacts with Atoh1 and Gfi1, and regulates cellular differentiation in the inner ear sensory epithelia. *Dev Biol.* **322**(1):33-45
- Lavado A, Oliver G. 2007. Prox1 expression patterns in the developing and adult murine brain. *Dev Dyn.* **236**: 518-524.
- Liu YW, Gao W, Teh HL, Tan JH, Chan WK. 2003. Prox1 is a novel coregulator of Fgf1b and is involved in the embryonic development of the zebra fish interrenal primordium. *Mol Cell Biol.* **23**:7243-55.
- Long M, de Souza SJ, Gilbert W. 1997. The yeast splice site revisited: new exon consensus from genomic analysis. *Cell* **91**(6), 739-740.
- López-Schier H, Hudspeth AJ. 2006. A two-step mechanism underlies the planar polarization of regenerating sensory hair cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **103**(49):18615-20.

- McNeill H, Yang CH, Brodsky M, Ungos J, Simon MA. 1997. *mirror* encodes a novel PBX-class homeoprotein that functions in the definition of the dorsal-ventral border in the *Drosophila* eye. *Genes Dev.* **11**(8):1073-82.
- Metcalfe WK, Kimmel CB, Schabtach E. 1985. Anatomy of the posterior lateral line system in young larvae of the zebrafish. *J Comp Neurol.* **233**:377-89.
- Montgomery, J., Coombs, S. y Halstead, M. 1995. Biology of the mechanosensory lateral line in fishes. *Rev Fish Biol Fish* **5**, 399-416.
- Nasevicius A, Ekker SC. 2000. Effective targeted gene 'knockdown' in zebrafish. *Nat Genet.* **26**(2):216-20.
- Nasevicius A, Ekker SC. 2001. The zebrafish as a novel system for functional genomics and therapeutic development applications. *Curr Opin Mol Ther.* **3**(3):224-8.
- Netter S, Fauvarque MO, Diez del Corral R, Dura JM, Coen D. 1998. *white+* transgene insertions presenting a dorsal/ventral pattern define a single cluster of homeobox genes that is silenced by the polycomb-group proteins in *Drosophila melanogaster*. *Genetics.* **149**(1):257-75.
- Ober EA, Verkade H, Field HA, Stainier DY. 2006. Mesodermal Wnt2b signalling positively regulates liver specification. *Nature.* **442**(7103):688-91.
- Oliver G, Sosa-Pineda B, Geisendorf S, Spana EP, Doe CQ, Gruss P. 1993. *Prox1*, a *prospero*-related homeobox gene expressed during mouse development. *Mech Dev.* **44**(1), 3-16.
- Oxtoby E, Jowett T. 1993. Cloning of the zebrafish *krox-20* gene (*krx-20*) and its expression during hindbrain development. *Nucleic Acids Res.* **21**(5):1087-95.
- Parinov S, Kondrichin I, Korzh V, Emelyanov A. 2004. Tol2 transposon-mediated enhancer trap to identify developmentally regulated zebrafish genes in vivo. *Dev Dyn.* **231**(2):449-59.
- Peters T, Dildrop R, Ausmeier K, R  ther U. 2000. Organization of mouse *Iroquois* homeobox genes in two clusters suggests a conserved regulation and function in vertebrate development. *Genome Res.* **10**(10):1453-62
- Rizzi MD, Hirose K. 2007. Aminoglycoside ototoxicity. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* **15**(5):352-7.
- Roberson DW, Alosi JA, Cotanche DA. 2004. Direct transdifferentiation gives rise to the earliest new hair cells in regenerating avian auditory epithelium. *J Neurosci Res.* **78**(4), 461-447.
- Ryals BM, Rubel EW. 1988. Hair cell regeneration after acoustic trauma in adult Coturnix quail. *Science.* **240**(4860),1774-176.
- Sarrazin, A.F., Villablanca, E.J., Nunez, V.A., Sandoval, P.C., Ghysen, A., Allende, M.L., 2006. Proneural gene requirement for hair cell differentiation in the zebrafish lateral line. *Dev. Biol.* **295**, 534-545.
- Selimoglu E. 2007. Aminoglycoside-induced ototoxicity. *Curr Pharm Des.* **13**(1):119-26.
- Sil A, Herskowitz I. 1996. Identification of asymmetrically localized determinant, Ash1p, required for lineage-specific transcription of the yeast HO gene. *Cell* **84**(5), 711-722.

- Soutoglou, E y Talianidis, I. 2002. Coordination of PIC assembly and chromatin remodeling during differentiation-induced gene activation. *Science*. **295**: 1901-1904.
- Stone JS, Shang JL, Tomarev S. 2003. Expression of Prox1 defines regions of the avian otocyst that give rise to sensory or neural cells. *J Comp Neurol*. **460**(4):487-502.
- Stone JS, Shang JL, Tomarev S. 2004. cProx1 immunoreactivity distinguishes progenitor cells and predicts hair cell fate during avian hair cell regeneration. *Dev Dyn*. **230**(4),597-614.
- Strahl BD, Allis CD. 2000. The language of covalent histone modifications. *Nature*. **403**(6765):41-5.
- Takizawa PA, Sil A, Swedlow JR, Herskowitz I, Vale RD. 1997. Actin-dependent localization of an RNA encoding a cell-fate determinant in yeast. *Nature* **389**(6646),90-93.
- Tan JT, Korzh V, Gong Z. 1999. Expression of a zebrafish *iroquois* homeobox gene, *Ziro3*, in the midline axial structures and central nervous system. *Mech Dev*. **87**(1-2):165-8.
- Taylor JS, Braasch I, Frickey T, Meyer A, Van de Peer Y. 2003. Genome duplication, a trait shared by 22,000 species of ray-finned fish. *Genome Res* **13**:382-390
- Taylor JS, Van de Peer Y, Braasch I, Meyer A. 2001. Comparative genomics provides evidence for an ancient genome duplication event in fish. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **356**:1661-1679
- Tomarev SI, Sundin O, Banerjee-Basu S, Duncan MK, Yang JM, Piatigorsky J. 1996. Chicken homeobox gene Prox 1 related to *Drosophila prospero* is expressed in the developing lens and retina. *Dev Dyn*. **206**(4),354-367.
- Versmold B, Felsberg J, Mikeska T, Ehrentraut D, Köhler J, Hampl JA, Röhn G, Niederacher D, Betz B, Hellmich M, Pietsch T, Schmutzler RK, Waha A. 2007. Epigenetic silencing of the candidate tumor suppressor gene *PROX1* in sporadic breast cancer. *Int J Cancer*. **121**(3):547-554.
- Wang J, Kilic G, Aydin M, Burke Z, Oliver G, Sosa-Pineda B. 2005. Prox1 activity controls pancreas morphogenesis and participates in the production of "secondary transition" pancreatic endocrine cells. *Dev Biol*. **286**(1),182-194.
- Watts JL, Etemad-Moghadam B, Guo S, Boyd L, Draper BW, Mello CC, Priess JR, Kempheus KJ. 1996. *par-6*, a gene involved in the establishment of asymmetry in early *C. elegans* embryos, mediates the asymmetric localization of PAR-3. *Development* **122**(10),3133-3140.
- White PM, Doetzlhofer A, Lee YS, Groves AK, Segil N. 2006. Mammalian cochlear supporting cells can divide and trans-differentiate into hair cells. *Nature*. **441**:984-7.
- Wigle JT, Harvey N, Detmar M, Lagutina I, Grosveld G, Gunn MD, Jackson DG, Oliver G. 2002. An essential role for Prox1 in the induction of the lymphatic endothelial cell phenotype. *EMBO J*. **21**(7),1505-1513.
- Wigle JT, Oliver G. 1999. Prox1 function is required for the development of the murine lymphatic system. *Cell*. **98**(6),769-778.
- Williams JA, Holder N. 2000. Cell turnover in neuromasts of zebrafish larvae. *Hear Res* **143**:171-181.
- Xiao T, Roeser T, Staub W, Baier H. 2005. A GFP-based genetic screen reveals mutations that disrupt the architecture of the zebrafish retinotectal projection. *Development*. **132**(13):2955-67.

Zhang Y, Reinberg D. 2001. Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev.* **15**(18):2343-60.