

UCH-FC
Biotecnología
V 792
C-1

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

LA LINEA LATERAL DEL PEZ CEBRA: UN
MODELO DE ESTUDIO IN VIVO DE MIGRACION,
PROLIFERACION, NEUROGENESIS Y
DIFERENCIACION CELULAR.

Memoria de Título
Entregada a la
Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al Título de
Ingeniero en Biotecnología Molecular.

Por

EDUARDO JAVIER VILLABLANCA
BRADANOVIC



Diciembre, 2003
Santiago-Chile

Director de tesis: Dr. Miguel L. Allende



**“LA LINEA LATERAL DEL PEZ CEBRA UN MODELO DE ESTUDIO
IN VIVO DE MIGRACION, PROLIFERACIÓN NEUROGENESIS Y
DIFERENCIACIÓN CELULAR”**

Memoria de Título entregada a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

EDUARDO VILLABLANCA BRADANOVIC

Dr. Miguel Allende Connelly
Director de Memoria de Título

Handwritten signature of Miguel Allende Connelly in blue ink, written over a horizontal line.

Comisión de Evaluación de la Memoria de Título

Dra. María Rosa Bono Merino
Presidente Comisión

Handwritten signature of María Rosa Bono Merino in blue ink, written over a horizontal line.

Dr. Miguel Concha Nordenmann

Santiago de Chile, marzo 2004



DEDICATORIA

Obviamente a mi familia,
en especial a quien me estimulo desde un principio,
mi padre Ricardo.

Y a quien estuvo siempre a mi lado,
sufrió y se alegró conmigo,
inclusive mas que yo,
a Nicole.

AGRADECIMIENTOS

A mis amigos y compañeros de carrera.

A Natalia Mackenzie por su amistad, de las mejores.

A Andres Sarrazin por su recepción, discusión y amistad

A Pedro Hernandez por la discusión, música y buena onda.

A Florencio Espinoza por hacer todo mas fácil.

A Juan Silva por hacer todo mas limpio.

A Ariel Reyes por estar siempre ahí.

A Rodrigo Young por ser mi hermano mayor.

A Carmen Feijoo por tener todo bajo control.

A Christine Dambly-Chaudiere por sus grandes aportes y cariño.

A Alain Ghysen por aceptarme en su laboratorio, por enseñarme rigurosidad y otra manera de hacer ciencia.

Y a Miguel Allende por aceptarme en el laboratorio, por guiarme en mis primeros pasos, por la confianza y libertad de desarrollar mis propios experimentos, por la oportunidad de viajar y por enseñarme el hacer ciencia de manera convincente y honorable.

INDICE DE CONTENIDOS.

DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
INDICE DE CONTENIDOS	iv
INDICE DE TABLAS	vii
INDICE DE FIGURAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	viii
RESUMEN	x
SUMMARY	xii
I.- INTRODUCCION	1
1.1 Ventajas del pez cebra	2
1.2 Sistema mecanosensorial de la línea lateral	3
1.3 Migración celular en la formación de la LLP	4
1.3.1 Glicoproteína de membrana, Trop2	6
1.4 Diferenciación celular en la LLP	8
1.4.1. Neurogénesis en la LLP	10
1.5 Especificación celular mediada por señalización Wnt	11
1.6 Análisis genético en el pez cebra	11
II.- MATERIALES Y METODOS	16
2.1 Materiales	16
2.1.1 Material Biológico	16
2.1.2 Reactivos para Biología Molecular	16
2.1.3 Reactivos para hibridación <i>in situ</i>	18
2.1.4 Reactivos de inmunocitoquímica	19
2.1.5 Reactivos para microinyección	19
2.1.6 Soluciones	19
2.1.7 Otros	20
2.2 Metodos	22
2.2.1 Mutantes	22
2.2.2 Tinciones	22

2.2.3 Plasmidios	22
2.2.4 Reacciones de PCR y RT-PCR	23
2.2.5 Librería BAC	25
2.2.6 Construcciones; <i>trop2</i> -MT, pEDO y pEDOK	25
2.2.7 Southern Blot	27
2.2.8 Mapeo de <i>trop2</i> de pez cebra	27
2.2.9 Microscopía confocal	28
2.2.10 Preparación de sondas de RNA para hibridación <i>in situ</i>	28
2.2.11 Hibridación <i>in situ</i>	30
2.2.12 Inmunocitoquímica	31
2.2.13 Morfolinos antisentido contra los genes <i>trop2</i> , <i>neuroD</i> , <i>tcf4</i> de pez cebra.	32
2.2.14 Síntesis de RNA sentido: <i>trop2</i> y <i>trop2</i> -MT de pez cebra.	33
III.- RESULTADOS	34
3.1 Genes involucrados en diferentes procesos del desarrollo de la LLP	35
3.2 Migración celular; Trop2.	35
3.2.1 Patrón de expresión de Trop2.	35
3.2.2 Caracterización de Trop2	38
Secuenciación y Nblast	38
Mapeo Genómico	39
Características de la proteína TROP2	40
3.2.3 Clonamiento de 3.9Kb de región río-arriba de <i>trop2</i>	41
Clon positivo para la región promotora de <i>trop2</i>	41
Construcciones	43
Expresión transiente	45
3.2.4 Localización celular de Trop2.	46
3.2.5 Función de Trop2: Experimentos de pérdida y ganancia de función	48
3.3 Neurogénesis en la LLP	53
3.3.1 Rol del gen proneural <i>neuroD</i>	53
3.3.2 Rol de <i>skip</i> en el desarrollo de los neuromastos	56
3.4 Tcf4 en diferenciación celular	57

IV. DISCUSION	60
4.1 Modelo para el estudio <i>in vivo</i> de la LLP	61
4.2 Migración en la LLP	62
4.3 Neurogénesis y diferenciación celular	64
4.4 Vía de señalización Wnt	68
4.5 Procesos y genes en el desarrollo de la LLP	69
V CONCLUSIONES	71
VI REFERENCIAS	72

INDICE DE TABLAS

Tabla 1, Partidores utilizados	24
Tabla 2, Transcritos	29
Tabla 3, Morfolinos	33

INDICE DE FIGURAS

Figura 1, Línea lateral de pez cebra	3
Figura 2, Desarrollo de la línea lateral posterior en pez cebra	5
Figura 3, Hibridación <i>in situ</i> con las sondas CB701 y CXCR4b	7
Figura 4, Diagrama del proceso de inhibición lateral	10
Figura 5, Técnica de inhibición génica mediante Morfolinos	12
Figura 6, Programas de PCR	23
Figura 7, Construcciones	26
Figura 8, Patrón de expresión del gen <i>trop2</i>	37
Figura 9, Gen <i>trop2</i>	38
Figura 10, Diagrama de obtención del clon 27	42
Figura 11, Región clonada de 3,9Kb río-arriba del gen <i>trop2</i>	44
Figura 12, Inyección de 25pg del constructo Pedok	46
Figura 13, Localización celular de Trop2	47
Figura 14, Pérdida de función de Trop2	49
Figura 15, Sobreexpresión de <i>trop2</i>	50
Figura 16, Inmunocitoquímica contra Histona H3 Fosforilada	52
Figura 17, Tinción DiAsp	53
Figura 18, <i>neuroD</i> no afecta la migración del primordio	54
Figura 19, Imágenes de microscopía Nomarski y fluorescencia por DiAsp en embriones silvestres e inyectados con Mo- <i>neuroD</i>	55
Figura 20, Análisis del gen <i>skip</i> en la LLP utilizando el mutante <i>sop</i>	56
Figura 21, Análisis de la función de Tcf4 en la LLP.	58

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>ath1</i>	<i>atonal1</i>
BCIP	5-Bromo 4-Cloro 3-Indol Fosfato
bHLH	Básica helice-vuelta-helice.
Cols	Colaboradores
DiAsp	4-(diethylaminostyryl)-N-methylpyridinium iodide
dpf	Dias post-fertilización
DAB	Diaminobenzidina
DTT	Ditiotriol
EGFP	Enhanced Green fluorescent protein
hpf	Horas post-fertilización
Kb	Kilo bases
LLP	Línea lateal posterior
M	Molar
MAB	Tampón de ácido maleico.
min	Minutos
mM	Milimolar
Myc	Epítopes MYC
Mo-neuroD	Morfolino antisentido contra <i>neuroD</i>
Mo-Tcf4	Morfolino antisentido contra <i>tcf4</i>
Mo-Trop2	Morfolino antisentido contra <i>trop2</i>
μ M	Micromolar.

mL	Mililitros
NBT	Cloruro de 4-Nitro Blue Tetrazolium
ng	Nanogramos
ngn1	Neurogenina1
nl	Nanolitros
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino
PFA	Fijador de paraformaldehído al 4% en PBS
pg	Picogramos
PLL	Primordio de la línea lateral posterior
Skip	Ski-interacting protein
SNC	Sistema nervioso central
<i>Sop</i>	Mutante <i>sopaipilla</i>
Tm	Temperatura de fusión
μ m	Micromolar

RESUMEN

La línea lateral es un sistema mecanosensorial presente en peces y anfibios compuesta por órganos denominados neuromastos. Los neuromastos, a su vez, se componen de células de soporte que rodean un grupo de células sensoriales ciliadas. En peces los neuromastos se distribuyen en la cabeza y a lo largo del tronco y cola en un patrón dependiente de la especie. En el pez cebra, a las 20 horas post fertilización (hpf) un grupo de células ubicadas en la región de la placoda ótica comienza a migrar. Este grupo de células se denomina primordio migratorio posterior, que dará origen a la línea lateral posterior (LLP). Al final de la embriogénesis, la LLP muestra un patrón simple de 7 a 8 neuromastos regularmente espaciados y completamente diferenciados que pueden ser visualizados *in vivo* con el marcador vital DiAsp. En este trabajo demostramos que el desarrollo de la LLP es un excelente modelo de estudio *in vivo* de procesos de proliferación, neurogénesis y diferenciación celular. Para validar este modelo, se estudió la expresión y función en LLP de genes involucrados en proliferación celular (*trop2*), neurogénesis (*neuroD* y *skip*), e involucrados en la vía de señalización Wnt (*tcf4*). Se realizaron experimentos de pérdida de función, mediante inyección de oligos antisentido o utilizando mutantes. Seleccionamos el gen *trop2* ,debido a su expresión restringida a la línea lateral, para hacer estudios funcionales y caracterización de la proteína. En el presente trabajo, se demuestra por primera vez la función de la proteína Trop2 *in vivo*, descubrimiento relevante por la importancia de Trop2 en tratamientos contra el cáncer colorectal y por las supuestas funciones restringidas solo a evidencias *in vitro*. Esta proteína

estaría regulando la proliferación celular en el primordio de la LLP y los neuromastos. Además, se demuestra por primera vez, la participación de la vía Wnt en el desarrollo de la LLP. Finalmente, se estudiaron las regiones cis-reguladoras del gen *trop2* que dirigen la expresión a los componentes de la LLP. Se clonó la región río-arriba del gen *trop2* y se fusionó al reportero EGFP, obteniéndose de esta manera el constructo pEDOK. La inyección del constructo produjo expresión transiente de EGFP restringida a células del primordio. De esta forma, concluimos que los 3,9kb de promotor clonados poseen regiones reguladoras suficientes para dirigir la expresión al primordio migratorio y el constructo pEDOK resulta adecuado para generar un modelo de estudio *in vivo* de la LLP vía transgénesis en pez cebra.

Summary

The lateral line is a mechanosensory system found in fish and amphibians and it is composed of sensory patches of cells called neuromasts. The neuromasts are composed of support cells surrounding a group of sensory hair cells. During zebrafish development, a group of cells originating from post-otic placode begins to migrate caudally at 20 hours post-fertilization. This group of cells, the Posterior Lateral Line (PLL) primordium, migrates posteriorwards along the horizontal myoseptum and deposits groups of cells at regular intervals. By the end of embryogenesis, the PLL extends from the head to the tip of the tail and comprises 7-8 regularly spaced neuromasts, which, once differentiated, can be visualized with the vital marker DiAsp.

In this work, we have focused on PLL development as a model for studying processes such as migration and differentiation *in vivo*. To validate this model, using *in situ* hybridization, we studied the expression pattern in the PLL of genes involved in migration, using *trop2*, neural fate, using *neuroD* and *skip* and cell specification via the Wnt pathway, using the *tcf4* gene. To functionally analyze gene function, we performed loss of function experiments, using Morpholino injections or by using mutants. We focused on the *trop2* gene, which has restricted expression in the PLL, to perform gain of function experiments and to characterize both the Trop2 protein and the genomic sequence. Finally, to obtain an *in vivo* model for the study of PLL development, we cloned the up-stream region of *trop2* gene. We fused this region

with a Gal4::UAS::EGFP sequence, obtaining the pEDOK construct. Then, we injected the construct at the one cell stage and we observed transient GFP expression only in primordium cells. Thus, we conclude that the 3.9Kb upstream sequence has the regulatory elements necessary to drive tissue specific expression to the migrating primordium. Results of this work show that the zebrafish PLL system is a good model for *in vivo* studies of processes like migration, neurogenesis and cell differentiation. On the other hand, the pEDOK construct has the regulatory elements to drive GFP expression to the migrating primordium. Thus, pEDOK should be a good candidate construct to generate transgenic fish and to obtain a tool for PLL development studies in zebrafish.

I. INTRODUCCION

Durante el desarrollo de organismos multicelulares, las células frecuentemente cambian su posición relativa hasta que alcanzan su ubicación final y se hacen funcionales. Estos movimientos migratorios han sido analizados en explantes de tejido o en sistemas *in vitro*, que han aportado con un gran conocimiento sobre los eventos intracelulares que ocurren en el movimiento celular, como por ejemplo, sobre la reorganización de la red de microtubulos y citoesqueleto durante la migración celular. (Lauffenburger y Horwitz, 1996, Sheetz y cols., 1999). Sin embargo, es necesario un modelo de estudio *in vivo* que cuente con la mayor similitud de sus componentes, y como estos se comportan, a los de un organismo multicelular.

En anfibios, ratón, pollo y otros organismos se han comenzado a estudiar movimientos celulares *in vivo*, sin embargo, cuentan con el problema de la pigmentacion que hace difícil la visualización del tejido.

El pez cebra cuenta con la ventaja de que sus células en el estado embrionario son transparentes, lo que facilita la visualización de estructuras internas, entre otras ventajas comparativas como tener gran cantidad de embriones por cruce, fácil mantenimiento, contar con mutantes gen específicos y con líneas transgénicas. Además el pez cebra, como otros peces y anfibios, cuenta con un sistema mecanosensorial llamado línea lateral, cuyos componentes son superficiales y pueden ser visualizados fácilmente. Por otro lado, el desarrollo de la línea lateral posterior comprende procesos como migración celular y axonal, proliferación,

neurogénesis y diferenciación celular, siendo de esta forma, un atractivo sistema de estudio *in vivo* de las bases moleculares y celulares de los procesos mencionados. Así como para la extrapolación a procesos involucrados en enfermedades humanas, como por ejemplo, metástasis y progresión del cáncer.

1.1 Ventajas del pez cebra.

Se han identificado cientos de mutaciones que afectan el desarrollo del pez cebra. Muchos de los fenotipos de estos mutantes son muy similares a desórdenes clínicos humanos. Usando este modelo, se espera descubrir las bases genéticas y moleculares de las enfermedades humanas o desarrollar agentes farmacológicos que inhiban o corrijan la progresión de desórdenes en el desarrollo.

Entre las ventajas del pez cebra se tiene que los huevos son fertilizados externamente y todas las etapas del desarrollo son accesibles a ser estudiadas. Se puede contar con cerca de 200 embriones por cruce. El tiempo de generación es relativamente corto (3 meses) lo que permite realizar genética. La transparencia del embrión, además de ser una ventaja para la observación *in vivo*, lo es para la visualización de tinciones (trazadores fluorescentes, anticuerpos, ribosondas etc.). Es posible generar líneas transgénicas sin mayor dificultad. Su mantención es de bajo costo, lo que permite contar con un gran número de líneas transgénicas, de mutantes y especies silvestres.

Por las razones anteriores, el pez cebra se ha transformado en un modelo de estudio cada vez más utilizado. Es así, como se ha propuesto para el estudio del sistema inmunológico (Yoder y cols, 2002), para el estudio del envejecimiento y senescencia gradual (Kishi y cols, 2003), para enfermedades cardiovasculares y hematopoyéticas humanas (North y cols, 2003), para estudiar el desarrollo del cáncer (Langenau y

cols, 2003; Amatruda y cols, 2002) o para comprender la metástasis (Sapede, 2003). Además, se ha usado el sistema de la línea lateral del pez cebra como modelo para el análisis morfogénico y desarrollo neural en vertebrados (Dambly-Chaudiere y cols, 2003) y para el estudio enfermedades auditivas y sordera. Esto es porque los receptores que componen la línea lateral del pez cebra son mecanoreceptores muy similares en estructura y función a los órganos sensoriales que se encuentran en el oído interno (Whitfield, 2002).

1.2 Sistema mecanosensorial de la línea lateral

Peces y anfibios acuáticos detectan los movimientos del agua en el entorno gracias al mencionado sistema mecanosensorial, denominado línea lateral. La línea lateral esta compuesto por órganos sensoriales individuales, los neuromastos (Figura 1a).

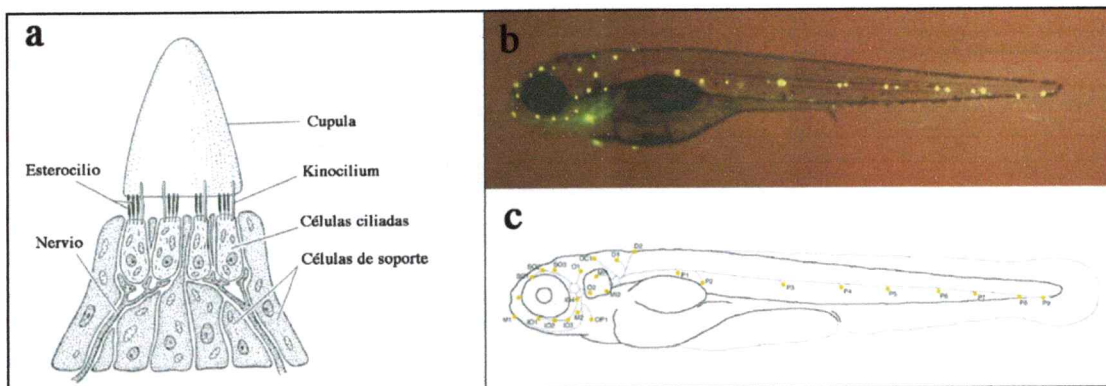


Figura 1, Línea lateral del pez cebra. a) Esquema de un neuromasto maduro, b) Visualización *in vivo*, de los neuromastos de la línea lateral del pez cebra mediante tinción Daspei, c) Diagrama de la línea lateral del pez cebra.

Estos órganos están compuestos a su vez por dos tipos celulares: las células de soporte y las células ciliadas (Fritsch y cols, 1988). En el pez cebra, el patrón embrionario de la línea lateral es relativamente simple y se compone de unos 20

neuromastos regularmente espaciados. Uno de los componentes principales de este patrón es la ramificación lateral de la línea lateral posterior (LLP) que va desde la cabeza hacia la cola a través del miosepto horizontal. La LLP se compone de 7 a 8 neuromastos diferenciados al final de la embriogénesis (Figura 1b,1c). La primera señal morfológica de la formación de la línea lateral posterior puede ser observada a las 20 horas post fertilización (hpf), cuando aproximadamente 150 células que se encuentran bajo la epidermis y justo posterior al oído, se dividen en dos grupos. Las células rostrales formarán el ganglio de la LLP mientras las caudales formarán un primordio (Figura 2) que migra posteriormente a lo largo del miosepto horizontal (Metcalf, 1985; Kimmel y cols, 1995). El primordio deposita durante su migración 6 a 8 grupos de células, denominadas pro-neuromastos. Al final de la embriogénesis estos pro-neuromastos estarán completamente diferenciados en neuromastos y pueden ser visualizados *in vivo* con el marcador vital DiAsp gracias a la capacidad de las células ciliadas de endocitar esta molécula (Figura 1b), (Gompel y cols, 2001).

1.3 Migración celular en la formación de la LLP.

La migración celular juega un rol esencial en varios procesos morfogenéticos y su desregulación produce consecuencias graves en el desarrollo. Por sus características, el desarrollo de la línea lateral posterior constituye un buen sistema-modelo para estudiar el control de la migración celular *in vivo*. El primordio de la línea lateral posterior (PLL), tiene su origen como un grupo de células justo bajo la epidermis y posterior a la vesícula ótica (Kimmel y cols, 1995). Estas células tienen un tamaño de unos 7 μ m en diámetro y pueden ser distinguidas fácilmente por su tamaño y forma (Figura 2).

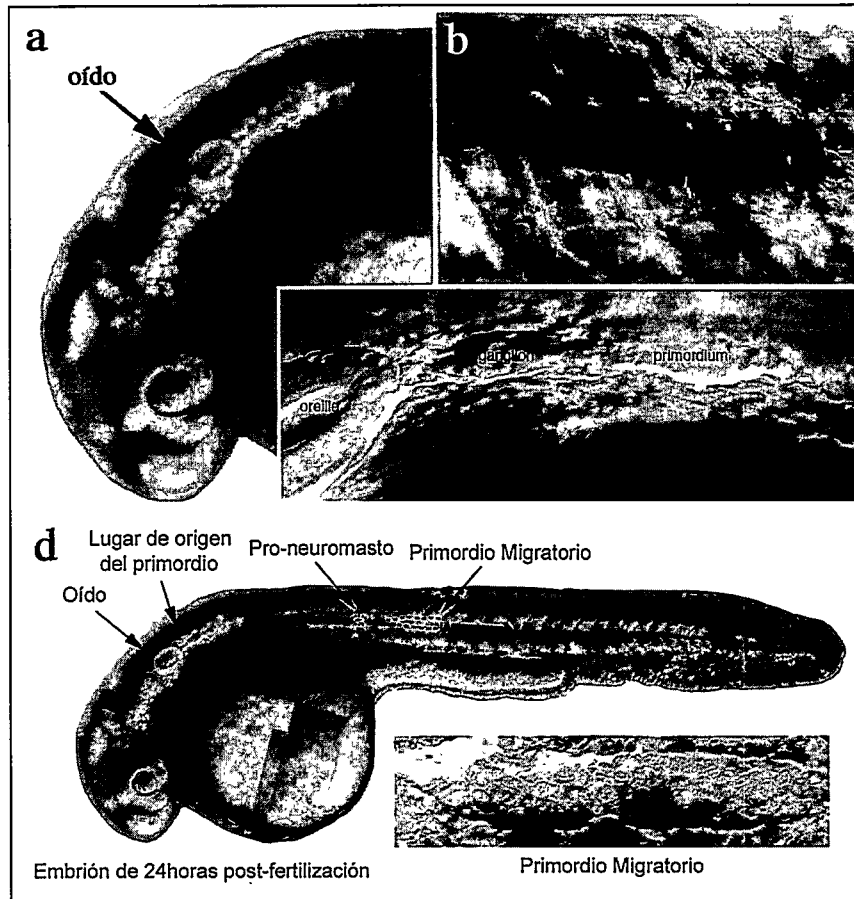


Figura 2; Desarrollo de la línea lateral posterior en pez cebra. a) Vista lateral de la cabeza del embrión. b) Origen del primordio migratorio, las flechas indican el punto donde se dividen las células migratorias (primordio) con las que darán origen al ganglio de la LLP. c) Comienzo de la migración del primordio y formación del ganglio de la LLP. d) Migración caudal del primordio a través del miosepto horizontal y depósito de células denominados pro-neuromastos. Imágenes obtenidas por microscopía Nomarski.

A las 20 hpf comienzan a migrar caudalmente a lo largo del miosepto horizontal hasta llegar al final del tronco alrededor de las 42 hpf. El número de células en el primordio es variable durante la migración. Antes del primer depósito de células el primordio se compone de 100 células en promedio. Este número decrece en aproximadamente 24 células después de cada depósito. No se han observado evidencias de células apoptóticas en el primordio, sin embargo, nuevas células se

suman al primordio mediante mitosis. Las mitosis en el primordio ocurren en una frecuencia de 2-4 mitosis por hora (Gompel y cols, 2001).

En este sistema migratorio se ha reportado la expresión del receptor de quimioquina CXCR4 en las células del frente migratorio del primordio, así como de su ligando SDF-1 a lo largo de la vía por la cual el primordio migra (David y cols, 2002). Inhibición de CXCR4 o SDF-1 evita la migración del primordio. En mutantes donde SDF-1 pierde su expresión en la región medial de los somitos, expresándose a nivel mas ventral, se observó que el primordio migra por la vía ventral alternativa (David y cols, 2002). Estos datos sugieren que SDF-1 define la vía invariante por la cual el primordio migra, mientras el receptor CXCR4 controla el movimiento del primordio. El sistema CXCR4/SDF-1 ha sido implicado en varios eventos migratorios de células en humanos, como por ejemplo, metástasis y destinación linfocitaria.

Por otro lado, se ha descrito la expresión específica de un gen, llamado inicialmente CB701, en el primordio de la línea lateral y en los pro-neuromastos (Figura 3; Gompel y cols, 2001), sugiriendo un rol importante en el desarrollo de la línea lateral del pez cebra. En base al patrón de expresión de CB701 en la región mas rostral del primordio y en los pro-neuromastos (Figura 3b-c), se ha sugerido un posible rol como molécula de adhesión, lo cual sería determinante para la migración del primordio de la línea lateral (Gompel y cols, 2001).

1.3.1 Glicoproteína de membrana Trop2

En el presente trabajo, se determinó que CB701 es el ortólogo de pez cebra al gen *Trop2* humano (*hTrop2*). *hTrop2* es una glicoproteína de membrana, dependiente de señales de calcio y altamente expresado en carcinomas humanos (Ripani y col,

1998). Además, hTrop2, es un importante antígeno específico utilizado para inmunoterapia contra el cáncer (Mangino y cols, 2002).

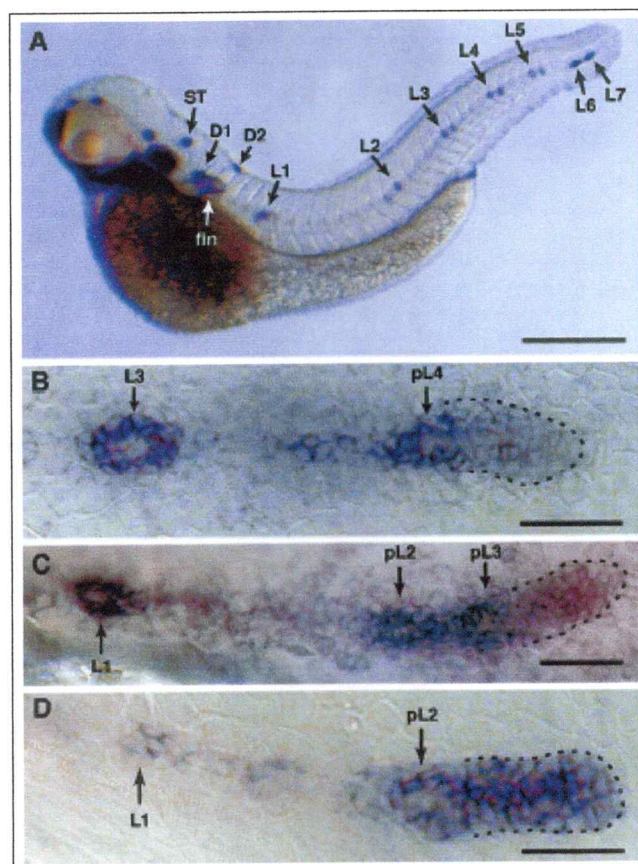


Figura 3; Hibridación *in situ* con las sondas CB701; (a-c) y CXCR4b (d). a) Embrión completo de 48 hpf donde L1-L7 corresponden a los neuromastos en cada lado del pez. b-d) Expresión en el primordio migratorio de CB701 (b-c) y CXCR4b (d). Note la definición de los pro-neuromastos dentro del primordio (pL2 y pL3) y el patrón de argolla de CB701 en los pro-neuromastos ya depositados (L1 y L3). Escala de barras; a) 250 μ m, b-d) 30 μ m. Gompel y cols, 2001.

La función de hTrop2 no ha sido establecida hasta ahora. Experimentos de activación de hTrop2 mediante anticuerpos específicos causa un incremento transiente de niveles intracelulares de calcio, indicando que hTrop2 podría ser un receptor de membrana que podría reconocer ligandos y transducir señales de calcio (Sewedy y cols, 1998). Además se ha propuesto que podría ser una molécula de adhesión como

es el caso de Trop1 (Litvinov y cols, 1994). Como evidencia de esto, existen diferentes moléculas de adhesión, como las integrinas, que son capaces de transducir señales de Calcio (Schwartz y cols, 1993) y regular diversas respuestas ligadas a la adhesión a un substrato, incluyendo proliferación celular (Assoian, 1997). Por otro lado, se ha encontrado que células humanas cancerígenas expresan una quimera oncogénica entre CyclinD1, un regulador maestro en la transición G1-S en el ciclo celular, y hTrop2, dando un potencial rol a hTrop2 en crecimiento celular (Baldin y cols, 1993).

1.4 Diferenciación celular en la LLP.

Durante el desarrollo de la línea lateral los pro-neuromastos son depositados y estos diferencian a dos tipos celulares, células neurales y no neurales. ¿Cuáles son los mecanismos moleculares que llevan a que una célula no diferenciada adopte un destino neural u otro tipo celular?. Para intentar contestar esta pregunta podemos enfocarnos en la fase inicial del desarrollo del sistema nervioso central (SNC). Esta fase se caracteriza por la proliferación de las células constituyentes del tubo neural que paulatinamente van saliendo del ciclo mitótico y se diferencian mediante el proceso denominado neurogénesis. En *Drosophila*, la neurogénesis está controlada por genes proneurales y neurogénicos. Los genes proneurales codifican para factores de transcripción del tipo bHLH cuyos representantes en *Drosophila* incluyen los genes *atonal* y los miembros del complejo *Achaete-scute*. En los vertebrados existe una gran familia de genes proneurales homólogos a los de *Drosophila* entre los que se incluyen *neurogenina1* (*ngn1*), *ngn2*, *neuroM* y *neuroD*. Estos genes confieren a los precursores neuronales la capacidad de diferenciarse en neuronas. Por su parte,

los productos de los genes neurogénicos median interacciones célula-célula e impiden que la mayoría de las células en un territorio de competencia neural se diferencien. En *Drosophila* existen dos ligandos neurogénicos, Delta y Serrate (representados también por dos subfamilias génicas en los vertebrados), que interaccionan con el receptor Notch. Al activarse, Notch sufre un corte proteolítico que libera su dominio intracelular (NotchIC). La translocación de NotchIC al núcleo reprime la expresión de los genes proneurales así como la de los propios ligandos de Notch. El resultado final es que aquella célula que expresa Delta en mayor nivel inhibe la expresión de los genes proneurales y de Delta en las células adyacentes; la disminución de la expresión de Delta en éstas últimas provoca, además, que la primera incremente la expresión de sus propios genes proneurales y se diferencie. Este proceso ha recibido la denominación de “inhibición lateral” (Figura 4a).

El mecanismo por el cual la señalización Notch activa sus genes blanco, es aún incierto. Uno de los blancos nucleares importantes de NotchIC es la familia CSL (por CBF1, Su(H) y Lag-1), que son proteínas de unión a DNA. Ha sido demostrada la interacción directa entre NotchIC y proteínas CSL (Fortini y col., 1994; Hsieh y col, 1996; Jarriault y col, 1995). Por otro lado, la proteína CSL humana, CBF1, funciona como un represor transcripcional que mantiene silenciado los genes blanco de la vía Notch (Dou y col, 1994; Hsieh y col, 1996). Se ha demostrado que lo anterior es por la unión de CBF1 con un complejo de proteínas correpressoras denominadas SMRT y HDAC (Kao y col, 1998), mientras que la unión de NotchIC a CBF1, activa la expresión de genes blanco (Hsieh y col, 1996). SKIP (Ski-interacting protein) es una proteína que interactúa con el complejo represor CBF1, y media la unión y el desplazamiento de las proteínas represoras SMRT-HDAC por NotchIC. El complejo

SKIP-CBF1-NotchIC se transforma así, en un complejo activador de los genes blanco de la señalización Notch/Delta (Zhou S. y cols, 2000; Figura4b).

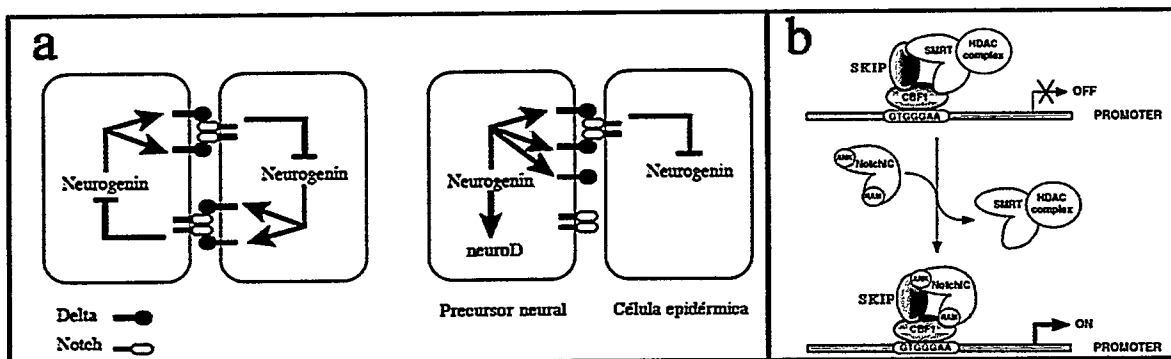


Figura 4, Diagramas del evento de inhibición lateral; a) Diagrama del proceso de inhibición lateral mediante la vía Notch/Delta. b) Diagrama del mecanismo de activación/represión de los genes blanco de Notch, donde la proteína Skip actúa como mediador de la interacción de CBF1 con activadores y represores. En rojo los genes estudiados en este trabajo.

1.4.1 Neurogénesis en la LLP.

La línea lateral posterior podría ser un atractivo modelo de estudio de genes y vías involucradas en neurogénesis. Esto se debe a la rápida diferenciación de los neuromastos y su simplicidad (compuesto por solo dos tipos celulares).

Seis horas después de ser depositado el neuromasto por el primordio, este se encuentra completamente diferenciado presentando células de soporte rodeando un grupo de células ciliadas cubiertas por una cúpula gelatinosa (Gompel y cols, 2001). La definición celular, de tipo neural, en los neuromastos podría estar mediada por el proceso de neurogénesis, en el cual células indiferenciadas comienzan adoptar destinos neurales y no-neurales. Genes neurogénicos de la vía de señalización Delta-Notch, podrían estar determinando el destino celular en los neuromastos mediante el

proceso de inhibición lateral, como es el caso descrito de las células ciliadas y de soporte en el oído de ratón (Morrison y cols, 1999). Se ha descrito la expresión de genes neurogénicos, como *notch3*, *deltaA* y *deltaB*, así como el gen proneural *ath1* en el primordio migratorio, lo cual se correlaciona con la selección del destino a células ciliadas y de soporte en neuromastos maduros (Itoh y Chitnis, 2001).

1.5 Especificación celular mediada por señalización Wnt

La señalización Wnt participa en múltiples eventos en el desarrollo, incluyendo proliferación celular, determinación del destino celular e interacción mesénquima-epitelio. La unión del ligando Wnt al receptor de membrana, Frizzled, activa la señalización de la vía Wnt. Uno de los efectores río-abajo de la señalización Wnt es la proteína β -catenina la cual forma complejos con la familia de factores de transcripción Lef/tcf. Entre los objetivos transcripcionales de este complejo Lef/tcf se incluyen los oncogenes celulares CyclinD1 y c-Myc (Tetsu y McCoormick, 1999, He y cols, 1998). Se ha descrito la expresión de Frizzled7a en el primordio migratorio y neuromastos (Sumanas y cols, 2002) sugiriendo una participación de la vía Wnt en el desarrollo de la línea lateral posterior del pez cebra. Sin embargo, no ha sido demostrada la participación directa de la vía Wnt en el desarrollo de la línea lateral del pez cebra.

1.6 Análisis genético en el Pez Cebra.

Para el descubrimiento de la función de genes o para el diseño de vías de señalización involucradas en los procesos de migración, diferenciación celular, o neurogénesis, entre otros, son de gran utilidad los experimentos de inhibición y/o

sobreexpresión de un gen. En pez cebra existe la ventaja de contar con un número importante de mutantes. Estos mutantes, generados químicamente o por mutaciones insercionales, son de gran utilidad en la determinación de la función de un gen y su posición en una vía regulatoria. Sin embargo, no existen, o no se han identificado, mutantes para todos los genes de interés. Oligos antisentido, denominados morfolinós (Figura 5), se utilizan para inhibir específicamente la actividad génica, constituyendo una buena alternativa para estudiar efectos de pérdida de función.

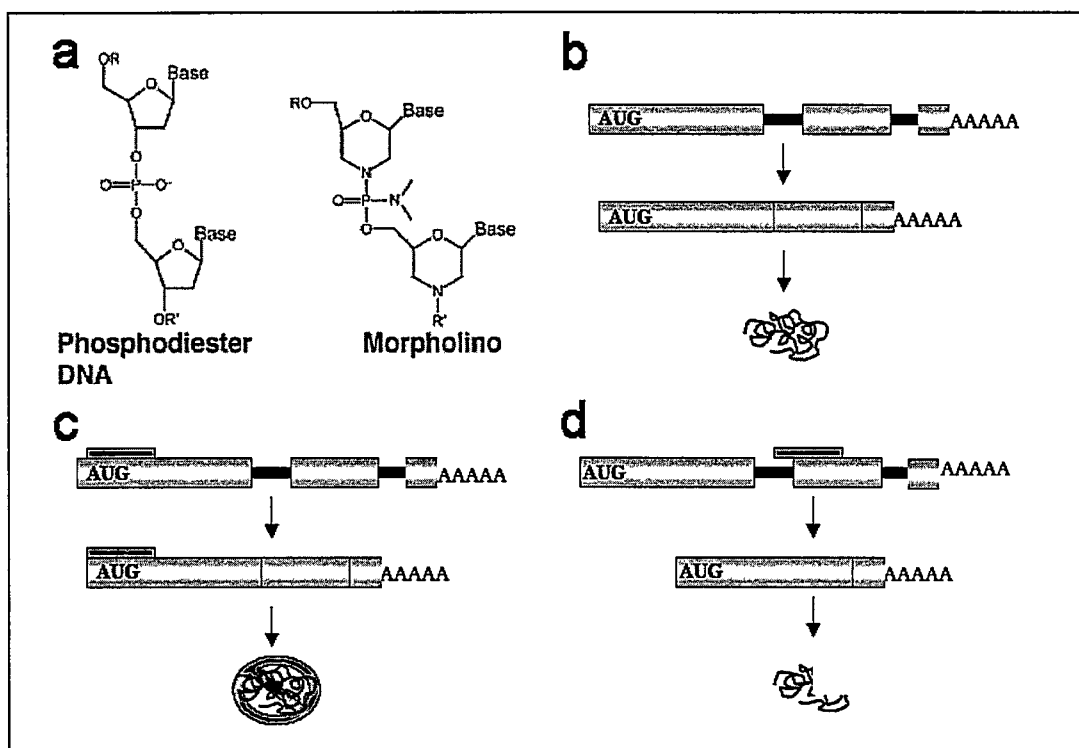


Figura 5; Técnica de inhibición génica mediante Morfolinós: a) Estructura de un enlace fosfodiéster en un oligo de DNA y de un Morfolino. b) Diagrama del procesamiento de un RNA mensajero y su traducción normal a proteína. c) Diagrama de un Morfolino dirigido al codón de inicio AUG, para inhibir la síntesis proteica. d) Diagrama de un Morfolino dirigido a un sitio aceptor de Splicing, produciéndose una proteína truncada.

Los morfolidos son oligos resistentes a degradación que se comportan como secuencias complementarias dirigidas al codón de inicio de la traducción o a un sitio aceptor de splicing. Estos al hibridar con el codón de inicio AUG del RNA mensajero blanco, bloquean el acceso del complejo ribosomal, impidiendo de esta forma la síntesis de la proteína. De otra manera, se puede generar una proteína truncada al dirigir la hibridación del morfolino a una secuencia aceptora de splicing del RNA mensajero blanco (Figura 5). Se ha comprobado la eficacia y especificidad de los morfolidos para inhibir la traducción de una proteína específica mediante Western Blot, por lo que es una técnica comprobada y aceptada en numerosos trabajos (revisado en Ekker y cols, 2000).

Otra herramienta importante es la transgénesis. De esta forma, se pueden generar líneas transgénicas, que expresan marcadores moleculares (GFP, YFP, RFP, etc) en ciertas células u órganos de interés. Además, se han creado estrategias para sobreexpresar genes en tejidos específicos. De esta manera, es posible realizar análisis genéticos en los órganos deseados, visualizando su desarrollo, gracias a estos marcadores celulares. En este trabajo se demuestra que el desarrollo de la línea lateral posterior en el pez cebra, es un buen sistema-modelo para realizar estudios *in vivo* de procesos tales como migración, diferenciación celular y participación de vías tales, como la vía Wnt. Se caracterizó y determinó por primera vez la función del gen *trop2 in vivo*, demostrándose la utilidad y ventajas de la línea lateral del pez cebra para estudios de función génica *in vivo*. Como antecedentes, solo hay experimentos *in vitro* que demuestran que Trop2 es una proteína que interactúa consigo misma y que su activación produce la acumulación de calcio intracelular. En este trabajo se determinó que este gen tiene una función esencial en el desarrollo de la LLP.

Específicamente, nuestros resultados sugieren que *Trop2* es un receptor de membrana que gatilla proliferación celular.

Por otro lado, se estudio la función en el desarrollo de la LLP del gen proneural *neuroD* y del cofactor *skip*, determinandose un rol de ambos en neurogénesis. De esta manera se demostró que el sistema de la LLP es un excelente modelo para estudiar procesos neurogénicos y de diferenciación celular. Además, se analizó la función del efector de la vía Wnt, *tcf4*, determinandose que la vía Wnt es esencial para la diferenciación o mantenimiento de los neuromastos maduros.

Nos centramos en el gen *trop2*, debido a su patrón de expresión limitada al oído, bulbo olfatorio y componentes de la línea lateral, para clonar su región promotora. Una vez clonado 3,9Kb de región río-arriba de *trop2* (3,9pTROP2), realizamos constructos fusionados al fragmento Gal4::UAS::EGFP (Koster y cols, 2001). Esta construcción funciona por la activación de la proteína Gal4, regulada por el promotor tejido-tiempo específico. Gal4 se une a la secuencia cis-activadora UAS (6 secuencias en tandem), reclutando los factores de transcripción basales para comenzar la síntesis de EGFP. De esta forma, se obtiene expresión de EGFP amplificada en el lugar y tiempo deseado. Por otro lado, al generar una línea transgénica 3,9pTROP2::Gal4::UAS::EGFP, se puede cruzar con otra línea transgénica de la forma UAS::GenX, donde GenX es algún gen de interes que se desea sobreexpresar en las células y tiempo específico, regulados por el promotor 3,9pTROP2. Estas construcciones se inyectaron para análisis de expresión transiente y así se determinó que la región clonada contine los sitios cis-reguladores para dirigir la expresión de EGFP a los componentes de la LLP.

HIPOTESIS

La línea lateral del pez cebra es un sistema versátil y simple en el cuál es posible identificar genes involucrados en procesos como migración, diferenciación y otros.

OBJETIVO GENERAL

Identificar funciones génicas que participan en los procesos de migración celular, neurogénesis y diferenciación celular y obtener una herramienta para el análisis genético de su desarrollo.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Dilucidar la función del gen *Trop2*.
- Analizar la secuencia proteica y estructura genómica de *Trop2*.
- Estudiar la función del gen *neuroD* para validar la LLP en estudios de neurogénesis.
- Estudiar la función del factor *skip*.
- Estudiar la función de *tcf4* para validar la LLP en estudios de diferenciación celular.
- Clonar la región río-arriba del gen *trop2*.
- Obtener un promotor específico de expresión en LLP.

II. MATERIALES Y METODOS

2.1 MATERIALES

2.1.1 Material biológico

Mediante cruces de peces adultos se obtuvo, de forma natural, los embriones de pez cebra (*Danio rerio*), que se utilizaron durante los experimentos descritos. Los peces se mantuvieron en acuarios con circulación constante de agua y aire a una temperatura de 28°C. Se monitorearon las condiciones de temperatura y pH. Los cruces se realizaron separando los machos de las hembras la noche anterior para, en la mañana siguiente, juntarlos en el momento en que la luz del vivero se enciende. De esta manera, es posible controlar el momento justo de fertilización. Los estadíos de los embriones se expresan en horas post-fertilización (hpf) y días post fertilización (dpf). Los peces se colocaron en estanques pequeños provistos de una rejilla que impide que los peces adultos tengan acceso a sus huevos y se alimenten de ellos. Los embriones se mantuvieron en incubadores a 28°C y para evitar el crecimiento de hongos se crecen en medio E3 1x.

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
- Blocking reagent (BMB), Roche, Alemania
- Cloroformo: Alcohol iso-amílico 24:1, Winkler Ltda., Chile
- dGTP Ext. Mix, Amersham Pharmacia Biotech, Inglaterra

- Dicromato de sodio y de potasio
- Dig-HighPrime, Roche, Alemania
- DNAsa , Boehringer, Mannheim, Alemania
- DTT 0.1M, Amersham Pharmacia Biotech, Inglaterra
- EDTA 0.5M pH8, Winkler Ltda., Chile
- Enzimas de restricción: ApaI, BamHI, BglII, EcoRI, SacII y sus tampones respectivos, Fermentas.
- Enzimas polimerasas Sp6, T7 y T3, MBI, Fermentas
- Escherichia coli DH5 α competentes (stock de laboratorio).
- Etanol, Merk, Alemania
- Fenol Absoluto, Winkler Ltda., Chile
- Fenol: Cloroformo básico, Winkler Ltda., Chile
- Isopropanol, Merck, Alemania
- LiCl 10M, Winkler Ltda., Chile
- MgCl₂ 50mM, New England Biolabs, Estados Unidos
- Naranja de acridina, Merck, Alemania
- NTPs, MBI Fermentas, Lituania
- Plasmidio pCR2,1 4Kb, Invitrogen
- Plasmido pSC2+MT. Turner, D.L y Weintraub, H(1994)
- RNAsa (libre de DNAsa), Boehringer, Mannheim, Alemania
- RNAsin (inhibidor de RNAsas), Roche Diagnostics GMBH, Mannheim, Alemania
- Silica, Winkler Ltda., Chile
- Suero de oveja, Gibco, BRL
- Tampón TTasa

- Tampón T4 DNA Ligasa 10x y T4 DNA Ligasa, Biolabs, New England
- Tampón transcriptasa reversa
- Tampón de reacción de PCR 10x menos Mg, 50mM Cloruro de Magnesio, Taq polimerasa y Deoxinucleósidos de trifosfato para PCR, dTTP, dATP, dCTP, dGTP, GibcoBRL, Inglaterra
- Transcriptasa reversa SUPERScript II
- Trizol (Total RNA Isolation Reagent), DTT 0.1M, tampon RT 5x, cloruro de magnesio 25 mM y Superscript II, GibcoBRL, Inglaterra
- X-gal, Winkler Ltda., Chile
- Xilol, J.T Baker Chemical Co, Phillipsburg

2.1.3 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
- Formamida, Merck, Alemania
- Metanol, Merck, Alemania
- Peróxido de hidrógeno, Merck, Alemania
- Proteinasa K, Merck, Alemania
- NBT/BCIP (Nitro blue tetrazolium chloridre/5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate), Boe hringer Mannheim, Alemania.
- Paraformaldehído 4%, PBS.
- SALT (50ml SALT: NaCl 11.4gr, Tris HCl 14.04gr, 50 ml formamida y 900ml de agua).

2.1.4 Reactivos de Inmunocitoquímica

- Acetona, Merck, Alemania
- Anticuerpo α -tubulina acetilada, Santa Cruz Biotechnology, EEUU
- DAB (30mg en 100ml PBS ,0.03% w/v), Sigma, Saint Louis, EEUU
- Ig anti-ratón, Amersham, Life Science.
- Solución de bloqueo (20% suero de bobino, 1% DMSO, 0.3%Tween-20 en PBS, 0.5% tritón).

2.1.5 Reactivos para inyección

- Rojo de fenol, SIGMA, Estados Unidos.
- Morpholino, antisense oligo ztrop2, 300nM classic, Gene Tools,LLC; USA
- DANIEAU (NaCl 58 mM, KCl 0.7mM, MgSO₄ 0.4mM, Ca (NO₃), HEPES pH 7.6 50mM).

2.1.6 Soluciones

- Acetona, Merk, Alemania
- EDTA 0.2M Winkler Ltda, Chile
- MAB (Acido Maleico 0.1M; NaCl 0.15M; pH7.5)
- MABT (MAB+Tween-20 0.1%)
- Solución blanqueo (5.95 ml de agua destilada, 0.25 ml de SSC20x, 0.5 ml de formamida, 3.3 ml de peróxido de hidrógeno al 30% para 10 ml totales)
- Solución de Hibridación in situ (SSC 5X; Heparina 50ug/mL; RNA de Tórula 500ug/mL; Tween-20 0.1%; pH x.x)

- PBS (Winkler Ltda, Chile)
- PBST (PBS+Tween-20 0.1%)
- PBSTT (PBS+Tween-20 0.1%+X-Triton 100 0,1%)
- Solución AP (MgCl₂ 50mM; NaCl 100mM; Tris 100mM; Triton-X100 0.2%; Tween-20 0.2%; pH 9.5)
- Solución E3 1X (NaCl 5mM; KCl 0.17mM; CaCl₂ 0.13mM; MgSO₄ 0.33mM; Azul de Metileno 10-5 %)
- Solución Paraformaldehido 4% en PBS
- SSC 20X (175 grs de NaCl, 88.5 grs de citrato de sodio, pH 7, para un volumen final de 1lt)
- Solución denaturante (Southern blot, 0.5 M NaOH, 1.5M NaCl)
- Solución neutralizante (Southern blot, 0.5 M tris, 1.5 M NaCl, PH 7)
- Tampón de Hibridación 50% formamida (southern Blot)(12.5 ml SSC 20x, 10 ml de blocking stock solution 10%, 0.5 ml N-laurilsarcosina 10%, 0.1 ml SDS 10%, 6.9 ml de agua destilada y 20 ml de formamida para un volumen final de 1 lt)
- Solución de lavado 1 (Southern blot) (SSC 2x, 0.1% SDS); 2 (SSC 0.1x, 0.1% SDS)
- Tampón de lisis (100mM Tris pH 8, 100mM NaCl, 10mM EDTA y 0.2 % SDS)
- Solución de corrida TAE 50x (242 grs 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 1 lt).

2.1.7 Otros

- Sistema comercial "Concert Rapid Gel Extraction System", GibcoBRL, Inglaterra

- Sistema comercial "Concert Rapid PCR Purification Protocol", GibcoBRL, Inglaterra.
- Sistema comercial "Kit 3` RACE" GibcoBRL, Inglaterra.

2.2 METODOS

2.2.1 Mutantes.

Peces de la línea mutante insercional *sopaipilla* (*sop*), fueron obtenidos en el laboratorio de la Dra. Nancy Hopkins, MIT, USA (R. Young y cols, datos no publicados).

2.2.2 Tinciones

Para visualizar los neuromastos maduros se utilizó la tinción vital DiAsp (4-(4-diethylaminostyryl)-N-methylpyridinium iodide, Molecular Probes). Este se diluye en una concentración de 2 mg/mL, en medio E3. Los embriones se incuban durante 5 min. en DiAsp y luego se lavan sucesivamente con medio E3. Finalmente, se observan los neuromastos con epifluorescencia usando un filtro verde (Collazo y cols, 1994).

2.2.3 Plasmidios

Los plasmidios utilizados para las síntesis de RNA sentido y antisentido se detallan en la Tabla 2. Para realizar las construcciones se utilizó Bluescript SK+, PCS2Myc, los TA clonning PGEM T-easy y TOPO PCR2,1 (Invitrogen), y el clon 211, el cual contiene las secuencias Gal4::UAS::EGFP (donado por R. Koster, Alemania). El EST CG2 y CB701 (*trop2*) fueron donados por el Dr. Alain Ghysen (Universite de Montpellier II, Montpellier, France). Los plasmidios conteniendo los cDNAs de *atonal1*, *tcf4* y *sop*-MT se encuentran en el laboratorio del Dr. Miguel L. Allende

2.2.4 Reacciones de PCR y RT-PCR

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo de dos maneras dependiendo del fragmento a amplificar: En el caso de la amplificación de fragmentos por sobre 3Kb se utilizó el Kit “Advantage® Genomic PCR” el cual contiene Tth y Taq DNA polimerasa. El programa P1 utilizado se esquematiza en la figura 6.

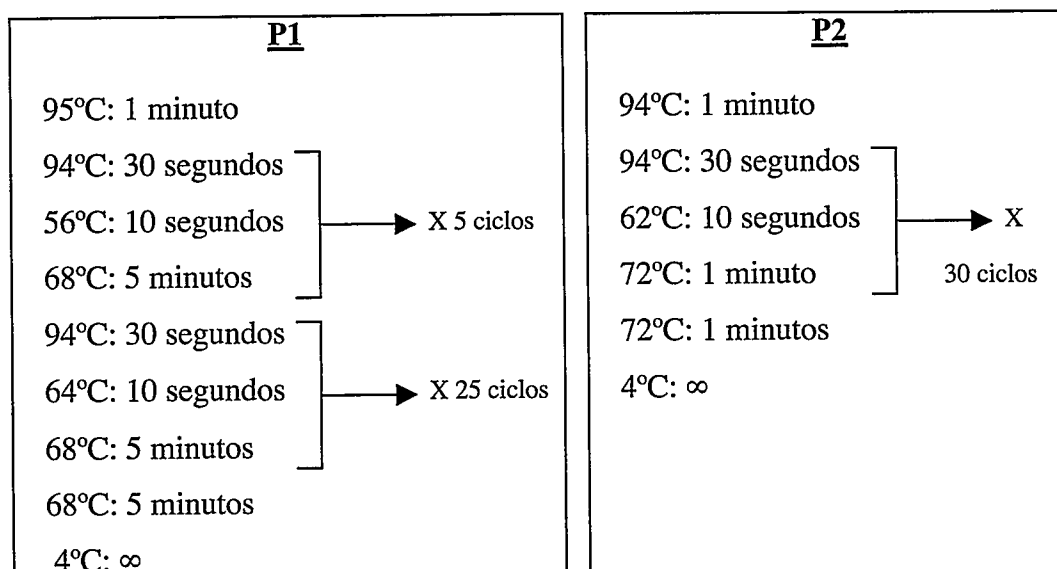


Figura 6: Programas de PCR.

Para el caso de fragmentos menores a 2Kb se utilizó la siguiente mezcla para 24 reacciones: 0,5µL HomeTaq polimerasa, 600µl de agua libre de nucleasas, 24µl de partidor sentido 10mM, 24µl partidor antisentido 10mM, 67 µL de tampón de PCR 11X, 2,5µL de cloruro de magnesio 1M, 7,5µL de β-mercaptoetanol 1M, 24µL de dNTPs 10 mM y 24µL de DNA templado 10pg/µL. Para las reacciones se utilizó el programa P2 (Figura 6) en el termociclador. Los partidores utilizados durante este trabajo se esquematizan en la Tabla1.

Tabla1; Partidores utilizados.

Partidor	Secuencia	Tm	mer	sitio restricción
CG2F1	CAG ATG AGA ATG CCT TTG TGG	62°C	21	
CG2F2	GTA CCA GGG TTT GCA TGT GTC	64°C	21	*
CG2F7	GAA GAG TTC ACA AGA CGA GCC	64°C	21	*
CG2R1	CGT ACA CCA GCA CTG TTG AC	62°C	20	*
CG2F4met	CCT CCG CGG GTG AGC GAG ACC TGA AAA	108°C	27	SacII
CG2R3	ACT CTT CAA GCT CAG ATC CCG	64°C	21	*
RyPCG2	CAG CCA AGC AAG GAT ATG TGC	64°C	21	*
F0b-act	GTC CCT GTA CGC CTC TGG TCG	70°C	21	*
R0b-act	GCC GGA CTC ATC GTA CTC CTG	68°C	21	*
Trop2RBam	AGA CGA GGA TCC ATA ACT TTA TTT CTG TG	80°C	29	BamHI
Ftrop2Cla	GTT AAT CGA TGA GAA ATT GTC TCC ATT TCT	80°C	30	ClaI
P1CG2	GTC AGC TCT CTG TTA CTC TCT	62°C	21	*
H1CG2	GCC TAC CCA ATT CAC CTA AAC	62°C	21	*

Para las reacciones de RT-PCR, la extracción de RNA se realizó a partir de embriones de estadíos entre 0 hpf, 6 hpf, 24 hpf, 48 hpf, 6 dpf y adulto. El cDNA se sintetizó a partir de mRNA obtenido de embriones en los diferentes estadíos analizados. La extracción de mRNA se realizó por homogenización de los embriones con Trizol (1mL para 50-100mg de tejido), para luego separar fases con 0,2mL de cloroformo, agitación por 15 segundos, incubación por 3 minutos a 28°C. Luego se centrifuga a 12.000g por 15 minutos. Para precipitar el mRNA se recupera la fase acuosa, se agregan 0,5mL de isopropanol, se incuba por 10 minutos a 28°C y se centrifuga a 12.000g por 10 minutos. Después se lava el mRNA, removiendo el sobrenadante y agregando etanol 75%. Esto se centrifuga a 7.500g por 5 minutos y se resuspende en 20µL de agua sin nucleasas. Con 2µg de mRNA como templado se sintetiza cDNA, agregando: 100ng de random primers y 1µL de dNTPs 10mM. Luego se incuba por 5 min. a 65°C, posteriormente se incuba en hielo por 1 min y se

agrega la mezcla que contiene: 4 μ L RT buffer 5X, 4 μ L MgCl₂ 25mM, 2 μ L de DTT 0,1M y 1 μ L de inhibidor de RNAasa, para luego incubar por 2 min a 25°C. Despues se agrega 1 μ L de la enzima transcriptasa reversa Super Script II y se incuba 10 min. a 25°C, 50 min. a 42°C y finalmente por 15 min. a 70°C.

Una vez obtenido los cDNAs de los distintos estadios, se amplificó un fragmento de aproximadamente 600pb con la pareja de partidores CG2R1y CG2F7 usando el protocolo P2. Como control positivo de expresión en los diferentes estadios analizados se amplificó β -actina de pez cebra. Los partidores utilizados para amplificar β -actina de pez cebra fueron: F0b-act y R0b-act (Chen y cols, 2002).

2.2.5 Librería BAC.

Se digirió el clon BAC número GS 26772 (Incyte Genomics Inc., BAC Zebrafish PCR library screening services). con la enzima de restricción BglIII y se ligaron los fragmentos en el sitio BamHI de Bluescript SK⁺. Posteriormente se transformo *E.coli* DH5 α para generar una librería con los fragmentos del clon BAC.

2.2.6 Construcciones; trop2-MT, pEDO y pEDOK

La construcción trop2-MT, se obtuvo amplificando mediante PCR los 1,5Kb de cDNA de *trop2* desde el clon CB701. Los partidores utilizados fueron Trop2RBam y Ftrop2Cla, los cuales contienen los sitios de restricción BamHI y ClaI respectivamente. El partidor Ftrop2Cla fue diseñado reemplazando el codón de termino del gen *trop2* por el sitio de restricción ClaI. Además se agregaron 2 bases adicionales para no cambiar el marco de lectura del epítopo Myc. El fragmento amplificado fue clonado en un plasmidio TA-cloning, para luego liberar el inserto

digiriendo con BamHI y ClaI (De esta forma se asegura que las enzimas de restricción cortaron). Este fragmento se insertó en los sitios BamHI y ClaI del plasmidio comercial PC2-MT. Dejando de esta forma el cDNA de trop2 fusionado a seis epítopes Myc en tandem (Figura 7).

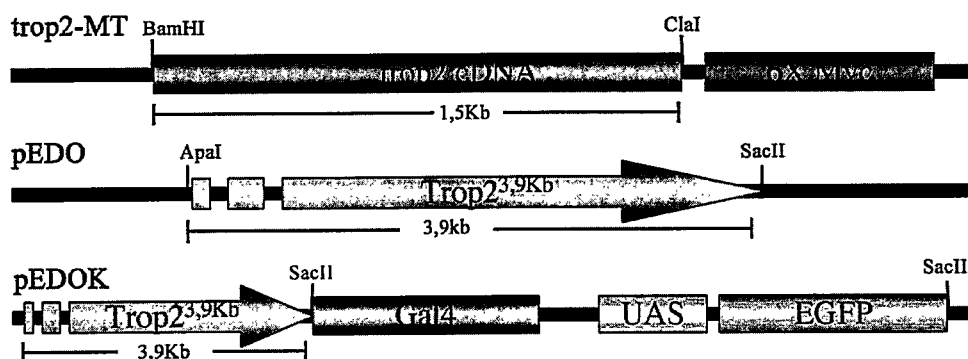


Figura 7, Construcciones.

Para las construcciones pEDO y pEDOK, primero se obtuvo un clon positivo (clon 27), mediante Southern Blot y PCR, para la región genómica río-arriba de *trop2*. Se amplificó por PCR (Protocolo P1, Figura 6) el inserto del clon 27, utilizando los partidores CG2F4met y RyPCG2. El partidor CG2F4met reemplaza el codón de inicio ATG, por el sitio de restricción SacII. El partidor RyPCG2 está ubicado río-arriba del sitio de restricción ApaI. Una vez amplificados los 3,9Kb de región promotora, se digirió con las enzimas de restricción SacII y ApaI para liberar el fragmento de 3,9Kb. El fragmento de 3,9Kb se insertó entre los sitios SacII y ApaI de Bluescript SK⁺, plasmidio denominado pEDO. Por otro lado se digirió el clon 211 con la enzima de restricción SacII, para liberar el fragmento Gal4::UAS::GFP (Koster). El fragmento Koster, se insertó en el sitio SacII de pEDO. Se confirmó la orientación del fragmento Koster por digestión con EcoRI y analizando el patrón de digestión. El clon con el patrón de digestión correcto para obtener la construcción

promotor $trop2^{3,9kb}::Gal4::UAS::GFP$, se denominó pEDOK (Figura 7). Este plasmidio se linearizó con la enzima de restricción *Apa*I y se purificó, para posteriores inyecciones.

2.2.7 Southern Blot

La síntesis de la sonda antisentido de 500pb se realizó por PCR a partir del cDNA de *Trop2* contenido en el EST CG2 y la sonda de 300 pares de bases se realizó utilizando, como templado, el clon 1,7kbPstI descrito anteriormente. Para ambas sondas, se denaturó 1 μ g del correspondiente DNA a 100°C durante 10 minutos y luego se enfrió rápidamente en hielo y se agregaron 4 μ l de DIG-High prime (Tampón de reacción 5X, Glicerol 50%, enzima Klenow 1 unidad/ μ l, mezcla de partidores random 5X, dATP, dCTP, dGTP, dTTP 1mM c/u, Dig-dUTP 0,35mM). Se incubó por 1hr a 37°C, y luego se agregaron 5 μ l a 10mL de tampón de hibridación. Antes de utilizar la sonda fue denaturada por 10 minutos a 100°C. El protocolo de Southern blot que se siguió fue el descrito por Sambrook y cols. (1987).

2.2.8 Mapeo de *trop2* de pez cebra.

Se realizó el mapeo genómico a partir de la técnica de paneles híbridos con el fin de encontrar en que cromosoma y locus se encuentra *trop2*. Estos paneles contienen el genoma completo del pez cebra fragmentado por irradiación unido a cromosomas de hámster con el fin de obtener híbridos estables (Kwok y cols, 1998). Se realizó PCR de 96 muestras de los diferentes conjuntos de DNA genómico, utilizando los partidores CG2F2 y CG2R3, los cuales corresponden a la secuencia genómica inmediatamente río-arriba del gen *trop2*. Los resultados obtenidos del PCR se

analizaron en un gel de agarosa al 2%, indicando cuales muestras presentaban la banda esperada y cuales no, de manera de generar un código binario final donde el 1 representa un resultado positivo y el 0 negativo. De esta manera se obtuvo un número de 96 cifras, el cual se ingresa en una base de datos ubicada en la página www.zfrhmaps.tch.harvard.edu. Automáticamente el programa arrojó un resultado el cual detallaba específicamente en que cromosoma se encontraba *trop2* y a que distancia de los marcadores identificados con un valor estadístico (LOD) el cual permite un grado de certeza suficiente si es mayor a 7.

2.2.9 Microscopía confocal.

Para determinar localización celular de *trop2*, los embriones sin inyectar e inyectados con 200pg/embrión de mRNA *trop2*-MT y 50pg/embrión de *sop*-MT como control de destinación nuclear, fueron fijados a las 24 hpf con PFA 4% en PBS durante dos horas a temperatura ambiente. Luego se lavaron con PBS y se les realizó inmunocitoquímica contra Myc (dilución 1:400). Como segundo anticuerpo se utilizó anti-mouse alexa 488 (dilución 1:200, Molecular Probes). Finalmente los embriones fueron montados en agarosa de bajo punto de fusión al 0,7% y visualizados por microscopía confocal con el objetivo Plan-Apochromat 63X/1,4 oil, filtro LP530 y a una longitud de onda de 488nm. Algunos embriones fueron incubados con 10µg/mL de Ioduro de propidio por 10 min. a temperatura ambiente, y luego lavados con PBS.

2.2.10 Preparación de sondas de RNA para hibridación *in situ*

Las diferentes sondas de RNA antisentido se prepararon a partir de los clones descritos en la tabla 2. Estos clones se linearizaron con las correspondientes enzimas

y en cada caso se verificó la presencia del DNA digerido mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1%. El DNA linearizado se purificó mediante extracción fenólica para eliminar las proteínas contaminantes. A continuación se realizó la transcripción *in vitro* de la sonda de RNA marcada con digoxigenina a partir de aproximadamente 1 µg de DNA linearizado, 10 µL de NTP mix-digoxigenina, 5µL de tampón de transcripción 10x, 1 µL de RNAsin y 90 unidades de la RNA polimerasa T7, T3 ó SP6 dependiendo del promotor que posee el clon. La mezcla se incubó durante dos horas a 37°C. Para eliminar el templado, se agregaron 5 µL de DNAsa I 10 mg/mL durante 5 minutos y se incubó a 37°C. Se detuvo la reacción agregando 5µl de EDTA 0,2M y se precipitó el RNA con 2 µL de LiCl 10 M y 200 µL de etanol absoluto durante toda la noche a -20°C. A continuación se recuperó el RNA centrifugando a 14000 g durante 30 minutos, se eliminó el sobrenadante, se lavó el precipitado con etanol al 70% y se dejó secar a temperatura ambiente. Las sondas recién sintetizadas se analizaron en un gel de agarosa al 1% para verificar la presencia del RNA y concentración estimada. Finalmente se resuspendió el RNA en 1 mL de tampón de hibridación *in situ* para ser utilizado o guardado a -20°C.

Tabla2; Transcritos

Gen	Enzima de restricción	RNA polimerasa	Propósito
trop2	NotI	T7	sonda
trop2-MT	XbaI	SP6	mRNA
cxcr4b	EcoRI	T3	sonda
ath1	BamHI	T7	sonda
tcf4	KpnI	T3	sonda

2.2.11 Hibridación *in situ*

Los embriones decorionados manualmente se fijaron incubandolos a temperatura ambiente, en los estadíos de 36 hpf y 48 hpf con paraformaldehido (PFA) al 4% preparado en PBS, durante dos horas. Luego se deshidrataron en metanol 100% durante 10 minutos a temperatura ambiente y se incubaron a -20°C durante al menos 1 hora (los embriones se pueden almacenar en esta etapa a -20°C hasta 6 meses). Posteriormente se rehidrataron durante 5 minutos en 75% metanol/25% PBS, 5 minutos en 50% metanol/50% PBS, 5 minutos en 25% metanol/75% PBS y 4 veces durante 5 minutos en PBS-T. Con el objetivo de eliminar los pigmentos se realizó el blanqueo a los embriones que tienen 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 por 10 minutos bajo luz fluorescente. Finalmente se realizaron tres lavados con PBS-T durante 5 minutos cada uno. Para digerir las proteínas asociadas al mRNA y permeabilizar los embriones de más de 48 hpf se trataron durante 10 minutos a temperatura ambiente con 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteinasa K en PBS. Para los embriones entre 24 y 48 hpf se utilizó una concentración de proteinasa K de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Después se realizaron 2 lavados de 5 minutos con PBS-T para detener la digestión. Para volver a fijar los tejidos, los embriones se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente en PFA al 4% en PBS y luego se lavaron 5 veces durante 5 minutos cada una en PBS-T. A continuación los embriones se incubaron con tampón de hibridación a 65°C durante 10 minutos. Las ribosondas-DIG fueron previamente denaturadas durante 5 minutos a 65°C para luego incubar los embriones con las

sondas toda la noche a 57°C para el caso de *trop2* y 65°C para el resto. Para el lavado de las sondas todas las soluciones se precalentaron a 65°C y luego se incubaron los embriones 10 minutos en formamida/SSC 2x al 75%, luego durante 10 minutos en formamida/SSC 2x al 50% y 10 minutos en formamida/SSC 2x al 25%, 10 minutos en SSC 2x y finalmente 2 veces durante 30 minutos en SSC 0,2x. Para bloquear los sitios inespecíficos, los embriones se incubaron durante 5 minutos en MAB-T, por 1 hora en MAB+BMB+LS a temperatura ambiente y luego de un recambio de la solución se dejaron por 4 horas a temperatura ambiente. Paralelamente, el anticuerpo anti-digoxigenina (dilución 1:2000) se incubaba en MAB+BMB+LS a temperatura ambiente mientras los embriones se bloquean. Luego se incuban los embriones durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo anti-digoxigenina. Se realizaron 5 lavados del anticuerpo de 20 minutos cada una con MAB-T y 3 veces durante 5 minutos cada una con tampón AP. Finalmente, la tinción de los embriones se realizó con el sustrato de la fosfatasa alcalina NBT/BCIP *BM Purple AP Substrate* en oscuridad y durante el tiempo necesario para que comience a visualizarse la tinción púrpura que indica la zona de expresión del mRNA. Finalmente, se detuvo la reacción incubando con PFA al 4% en PBS, se lavó 3 veces durante 5 minutos en PBS-T y se incubaron en un gradiente de Glicerol para ser montados para su visualización ya sea en lupas o microscopios.

2.2.12 Inmunocitoquímica

Los embriones decorionados manualmente se fijaron incubándolos a temperatura ambiente, en el estadio de 48 hpf con paraformaldehído (PFA) al 4% preparado en PBS, durante dos horas. Luego se lavaron con PBS dos veces, por 5 minutos, seguido

de un lavado con agua destilada por 5 minutos para luego incubar en acetona por 7 minutos, a -20°C . Posteriormente se lavaron nuevamente con agua destilada por 5 minutos y dos veces con PBS por 5 minutos. Se preincubaron con solución de bloqueo por 2 horas seguido de la incubación con el primer anticuerpo, en nuestro caso anti- α -tubulina acetilada diluido 1/1000 en solución de bloqueo a 4°C toda la noche. Al día siguiente se lavo con solución de bloqueo 4 veces por 20 minutos y se incubo con el segundo anticuerpo (anti-ratón acoplado a peroxidasa) por 4 horas a temperatura ambiente. Luego se lavaron 4 veces por 20 minutos, se preincubaron con DAB 0,03% por 10 minutos para finalmente agregar el sustrato de la peroxidasa, es decir H_2O_2 al 3% en DAB, por 15 minutos o hasta ver el precipitado café que detecta el antígeno. Una vez revelado, se detiene la reacción lavando con agua destilada. Se transfieren a glicerol para su visualización en lupa o para su montaje en porta-objetos, en el caso de visualizarlos por microscopía.

2.2.13 Morfolinos antisentido contra los genes *trop2*, *neuroD* y *tcf4* de pez cebra.

Se diseñaron oligos antisentido para realizar los experimentos de “knockdown”, es decir, de disminución de la expresión de un gen por interferencia de la traducción o el procesamiento de maduración del mRNA (Figura 5). Los oligos fueron sintetizados por la empresa Gene Tools, LLC. Las secuencias de los distintos morfolinos utilizados se indican en la Tabla 3. Se preparó un stock 10X con 300nM del oligo en 300 μl de DANIEAU 1X y 10% de rojo de fenol. El rojo de fenol es un compuesto inerte que permite visualizar la mezcla al ser inyectada directamente al huevo. Se hicieron diluciones 9X, 5X y 1X para encontrar la concentración indicada

y evitar efectos inespecíficos. Al encontrar la concentración adecuada en las cuales se reduce la toxicidad al mínimo es posible observar efectos analizables y comparables con los controles escogidos (embriones no inyectados o inyectados con un oligo control). El morfolino se inyectó directamente en el huevo recién fertilizado en el estadio de una célula y los embriones se dejaron crecer a 28°C hasta el estadio a analizar. Las inyecciones se realizaron con un microinyector provisto de un micromanipulador.

Tabla3; Morfolinos.

Morfolino	Secuencia	Concentración
trop2	CATTGTGAGCGAGAACTGAAAAATA	1mM
neuroD	TGACTTCGTCATGTTCGGAAGCTCTAG	2,5mM
tcf4	GATCACACCAAGATCAAGGGTTTAA	8pg/uL

2.1.14 Síntesis de RNA sentido: Trop2 y Trop2Myc de pez cebra

Para la síntesis de RNA mensajero de Trop2 y Trop2Myc se tomaron 2µg de DNA del clon CB701 (trop2) y del constructo Trop2Myc y se agregaron para cada caso: 5µl de buffer de transcripción, 5µl de RNA Cap, 2,5µl de mix de rNTPs 25mM c/u, 1 µl inhibidor de RNasa, 2,5µl de DTT 0.1M y 1µl de polimerasa T7. Luego se incubó la mezcla durante 20 minutos a 37°C y luego se le agregó 1µl de 7-metil-GTP 25mM y se dejó 100 minutos más a 37°C. Una vez sintetizado el RNA se corrió 1 µl de la mezcla en un gel de agarosa 1 % con el fin de verificar la síntesis del RNA. Luego se agregó 1 µl de DNAsa y se incubó a 37 °C durante 15 minutos. Luego se precipitó el RNA con 2µl de LiCl 5M más 200µl de EtOH durante toda la noche a -20 °C. Se guardó a -80 °C hasta que se utilizó, cuando fue centrifugado a 14000 rpm y resuspendido en 10 µl de agua sin nucleasas.

III. RESULTADOS

En este trabajo, se realizaron estudios de función de genes involucrados en procesos como neurogénesis, diferenciación celular y migración celular utilizando la línea lateral posterior (LLP) del pez cebra como modelo. De esta manera, se propone este sistema como un modelo vertebrado, versátil, accesible y de fácil manipulación para el estudio de los procesos mencionados. En una primera aproximación, utilizamos experimentos de pérdida y ganancia de función. Analizamos el gen *trop2* (inicialmente denominado CB701 por Gompel y cols, 2001), cuya función era desconocida. Luego estudiamos el proceso de destino neural en los pro-neuromastos, proceso denominado neurogénesis. Para este caso analizamos los genes *neuroD* y *skip*. Finalmente, estudiamos la vía Wnt, que esta involucrada en diferenciación celular, entre otros procesos. Estudiando el factor de transcripción *tcf4* logramos demostrar, por primera vez, la participación de la vía Wnt en el desarrollo de la LLP. Paralelamente, nos interesó generar un modelo para estudios *in vivo* del desarrollo de la LLP por lo que se analizó y clonó la región promotora del gen *trop2*. Nos centramos en el gen *trop2* debido a su expresión restringida a los componentes de la LLP y sus precursores. Se determinó la localización celular de *trop2*, se caracterizó la región genómica, se mapeó el gen y se realizó un análisis estructural de la proteína mediante bioinformática. Finalmente, se clonó la región promotora de *trop2* y se fusionó al gen reportero GFP con el objetivo futuro de realizar transgénesis y obtener

un modelo *in vivo* para estudiar el desarrollo de la LLP con todos los procesos que conlleva.

3.1 Genes involucrados en diferentes procesos del desarrollo de la LLP.

En este trabajo, se estudiaron los distintos aspectos involucrados en la génesis de la LLP en el pez cebra, identificándose genes que participan en estos procesos. Entre estos genes tenemos *neuroD*, *skip*, *tcf4* y *trop2*. Se determinó que estos genes se involucran en procesos como proliferación celular (*trop2*), neurogénesis (*neuroD*, *skip*) y diferenciación celular (*tcf4*) durante el desarrollo de la LLP. Se estudió el gen *trop2* en mayor profundidad debido a su patrón de expresión restringido a la LLP y por su importancia clínica, ya que se utiliza en el tratamiento de algunos tipos de cáncer por medio de inmunoterapia.

3.2 Migración y proliferación celular; Trop2.

3.2.1 Patrón de expresión de *trop2*.

Para dilucidar en que momento y en que territorios Trop2 podría estar ejerciendo su función, se caracterizó el patrón de expresión espacio-temporal de este gen (Figura 8). Para ello, se realizaron experimentos de RT-PCR para detectar la presencia del RNA mensajero de *trop2* durante el desarrollo. Se obtuvo RNA embrionario entre diversos estadios de 0 hpf (para ver si existe un componente materno) hasta el estado adulto. Se aprecia que la molécula *trop2* se expresa durante todo el desarrollo del embrión y en niveles similares (Figura 8a). Los partidores escogidos se encuentran en diferentes exones de *trop2*, por lo que el amplificado desde cDNA y DNA

genómico son de tamaños distinguibles. Se realizaron experimentos de hibridación *in situ* con la sonda *trop2* en embriones desde estadios de 4 somitos hasta de 40 hpf (Figura 8b-d). En embriones de 4 somitos, la expresión se restringe solo a la vesícula ótica. Luego a los 14 somitos, la expresión decae en la vesícula ótica y se aprecia expresión en el bulbo olfatorio (datos no mostrados). A las 23 hpf se aprecia expresión en el primordio migratorio de la línea lateral posterior y en el primordio migratorio de la línea lateral anterior, además de expresión en la vesícula ótica y el bulbo olfatorio (figura 8b). A las 28 hpf la expresión en la vesícula ótica se restringe a la zona ventral y se mantiene en los grupos de células depositadas por el primordio que se denominan pro-neuromastos. Finalmente, a las 40 hpf se ve una disminución de la expresión en el oído y se ve expresión tanto en pro-neuromastos como en neuromastos maduros (Figura 8d). De esta forma se concluye que *trop2* es un buen marcador del desarrollo de la línea lateral posterior y anterior del pez cebra ya que su expresión se limita a todos los componentes del sistema de la línea lateral durante su desarrollo, además de la vesícula ótica y el bulbo olfatorio. Considerese que estos dos últimos no afectan en la visualización de los componentes de la LLP. El gen *trop2* se expresa en un patrón de argolla en el neuromasto, lo que sugiere que la expresión está restringida a las células de soporte presuntivas. Para dilucidar esto, se realizaron experimentos de hibridación *in situ* con la sonda *ath1*. El gen proneural *ath1*, se expresa en las células precursoras sensoriales, es decir, en las células centrales del neuromasto. Se analizaron 20 neuromastos con las sondas *trop2* y *ath1* determinándose que la expresión de una sonda comparada con la otra son complementarias. Al fusionar dos imágenes tomadas en neuromastos equivalentes, en que una de ellas corresponde a la expresión de *trop2* en el neuromasto y la otra a

atonal, se aprecia la complementareidad (Figura 8g). El diagrama de la figura 8 ilustra la expresión de *trop2* en las futuras células de soporte y de *atonal* en las células sensoriales presuntivas.

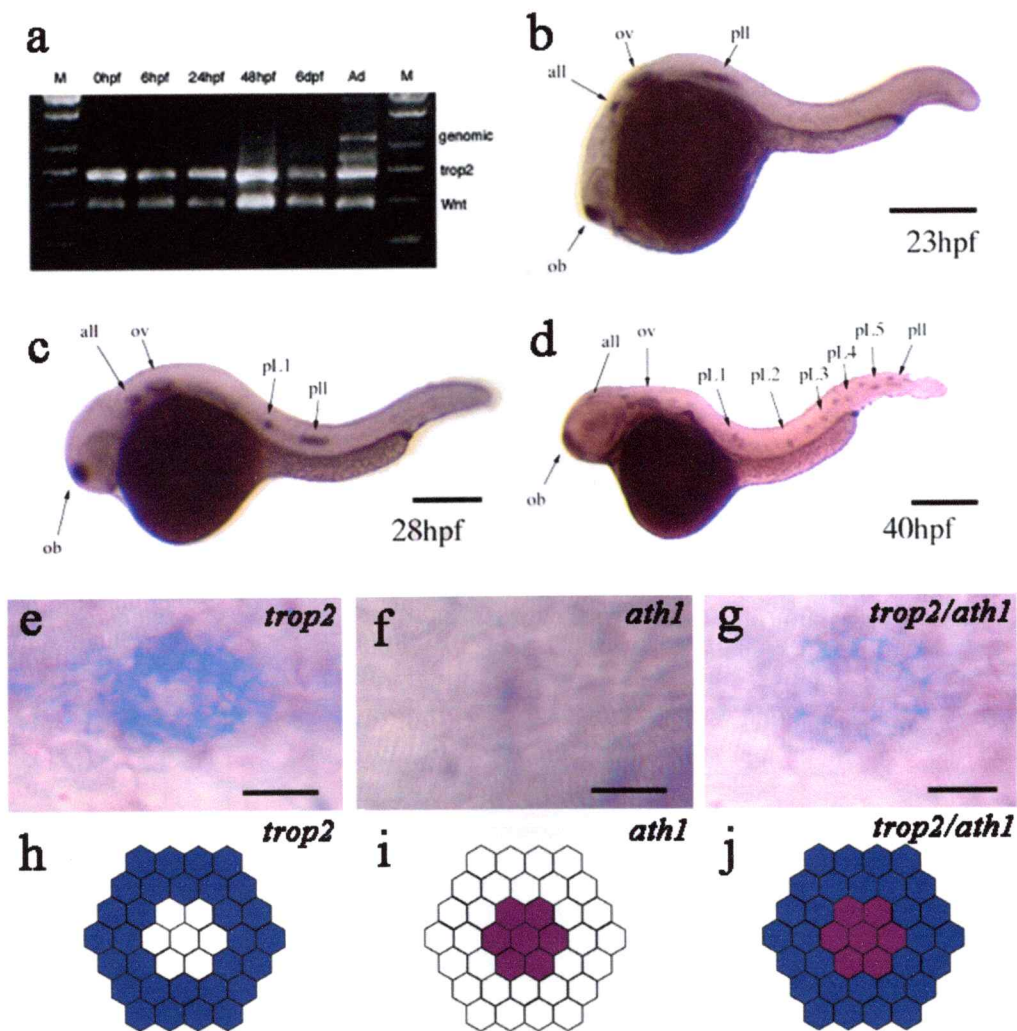


Figura 8; Patrón de expresión del gen *trop2*. a) RT-PCR en diferentes estadios de desarrollo embrionario; donde genomic es el amplificado de *trop2* a partir de DNA genómico, *trop2* es el amplificado del cDNA de *trop2* y Wnt es el control positivo (Wnt5a). b-d) Hibridación *in situ* con la sonda *trop2* en embrión completo. e-g) Hibridación *in situ* en embriones de 48 hpf mostrándose un aumento en la zona de los neuromastos. e) Neuromasto expresando *trop2*, f) Neuromasto expresando *ath1*. g) Fusión entre imágenes e y f, notese la complementariedad de las marcas. h-j) Esquemas de e, f y g respectivamente. Ob, bulbo olfatorio, ov, vesícula ótica, all, primordio de la línea lateral anterior, pll, primordio de la línea lateral posterior, pL1-pL7, neuromastos depositados. Escala de barras; b-d) 250µm, e-g) 15µm.

Con el objetivo de obtener la región genómica donde se encuentra *trop2*, se realizó un alineamiento contra la base de datos del servidor SSAHA (Instituto Sanger, UK) donde se encuentra secuenciado parcialmente el genoma de pez zebra. Este alineamiento nos dio como resultado homología con el clon z06s019787, el cual posee 20Kb de DNA secuenciado. Con el programa Spidey (www.molbiol.net) y manualmente se alineó la región genómica con la secuencia de cDNA para determinar los intrones y exones del gen *trop2*. Los resultados indican que *trop2* posee 10 exones espaciados en 3.500 pares de bases de DNA genómico (Figura 9c). Al analizar otro EST obtenido por el laboratorio, denominado CG2, con la región genómica nos percatamos que el exón 4 es mas corto debido a la ausencia de 27 aminoácidos que están presentes en CG77, por lo que se deduce que existe una variante de splicing del gen *trop2* (Figura 9d).

Mapeo Genómico

Con la pareja de partidores H1CG2 y P1CG2, ubicados 3Kb río-arriba del gen *trop2* se realizaron 96 reacciones de PCR utilizando como templado el genoma completo del pez cebra fragmentado por irradiación y unidos a cromosomas de hámster (Panel de radiación híbrido, Kwok y cols, 1998). Luego, se corrieron las muestras en un gel de agarosa al 2% y se determinó la presencia de bandas en las 96 reacciones. Se le asignó el número 1 a las reacciones positivas y el 0 a las reacciones negativas. De esta forma se obtuvo un número binario compuesto por ceros y unos. Al ingresar este número binario en la base de datos de la página web www.zfrhmaps.tch.harvard.edu se obtuvo que *trop2* está ubicado en el cromosoma 6 del pez cebra entre los marcadores fb11f01.u1 (LOD SCORE de 9,150) y wz12441.1.exp, (LOD

SCORE de 7,842) a una distancia aproximada de 24cR y 34cR respectivamente (Figura 9d).

Características de la proteína TROP2

Se predijeron *in silico*, características de la proteína con la secuencia proteica obtenida por la determinación del marco de lectura del gen *trop2* (Figura 9b) y programas computacionales. Como resultado se obtuvo que Trop2 posee las siguientes características:

- Repeticiones de tyroglobulinas tipo I: desde los aminoácidos 92 al 136 y con la secuencia; DPECESDGKFKAVQCNNTTEVCWCVNSAGVRRSDKKD KNIKCEPAE determinado con el programa SMART (E-Value de 0,0002), PFAM (score de $5,2e-13$). Se ha propuesto que esta región es inhibidora de cisteín-proteasas y sitio de unión para Heparinas.
- Región transmembrana: desde los aminoácidos 262 al 284, región que contiene la secuencia IIAVIVVVSLIVIGGFLVLFFLA. Determinado con los programas SMART, SOSUI, TMHMM. La secuencia sería una α -Helice.
- Región citosólica: desde los aminoácidos 285 al 303. Determinado por el programa TMHMM.
- Región extracelular: desde los aminoácidos 1 al 261. determinado por el programa TMHMM.
- Sitios de fosforilación: Serinas 43 (score de 0,865), 123 (score de 0,997), 178 (score de 0,781) y 222 (score de 0,805). Treoninas 24 (score de 0,525) y 76 (score de 0,983). Tirosinas 138 (score de 0,613) y 182 (score de 0,945). Determinado con el programa NetPhos 2.0.

3.2.3 Clonamiento de 3.9Kb de región río-arriba de *trop2*

Con el objetivo de contar con una región genómica río-arriba del gen *trop2*, para obtener y analizar los sitios cis-reguladores del gen, se diseñaron los partidores F1CG2 y R1CG2 para rastrear dicha región en una librería BAC (Incyte Genomics Inc., BAC Zebrafish PCR library screening services). Esta pareja de partidores se diseñó desde la secuencia de cDNA de *trop2* proporcionada por el EST CG2. De este rastreo se obtuvo el clon único 28 (numero control GS 26772), el cual contiene aproximadamente 100Kb de DNA genómico. Se realizó un patrón de digestión del clon BAC y por southern blot se hibridó con una sonda de 500 pares de bases obtenida de la región 5' del EST CG2. Como resultado se obtuvo que las enzimas de digestión PstI y BglII producen fragmentos de aproximadamente 1,5Kb y 3Kb de DNA conteniendo el fragmento 5' del gen *trop2*. Digiriendo con PstI, se logró aislar un fragmento de región genómica de 1.7Kb que posteriormente fue clonado en el plásmido bluescript SK y secuenciado. Este fragmento de 1.7Kb posee solamente 500pb de región río-arriba de *trop2*. Este fragmento se descartó por la baja probabilidad de poseer los sitios cis-reguladores necesarios. Por lo anterior, se construyó una librería digiriendo el plásmido BAC con la enzima de restricción BglII y se subclonaron los fragmentos en Bluescript SK+, para obtener, de esta forma, fragmentos mayores de promotor.

Clon positivo para la región promotora de *trop2*

Se digirió el clon BAC con la enzima de restricción BglII, se purificaron los fragmentos y se clonaron en el sitio BamHI de Bluescript SK+, obteniéndose de esta forma una librería BAC. Se purificaron, mediante minipreps, 50 sub-clones

preparados a partir de la librería BAC. Se digirieron estos clones con la enzima de restricción EcoRI para realizar un análisis de Southern Blot (Figura 10).

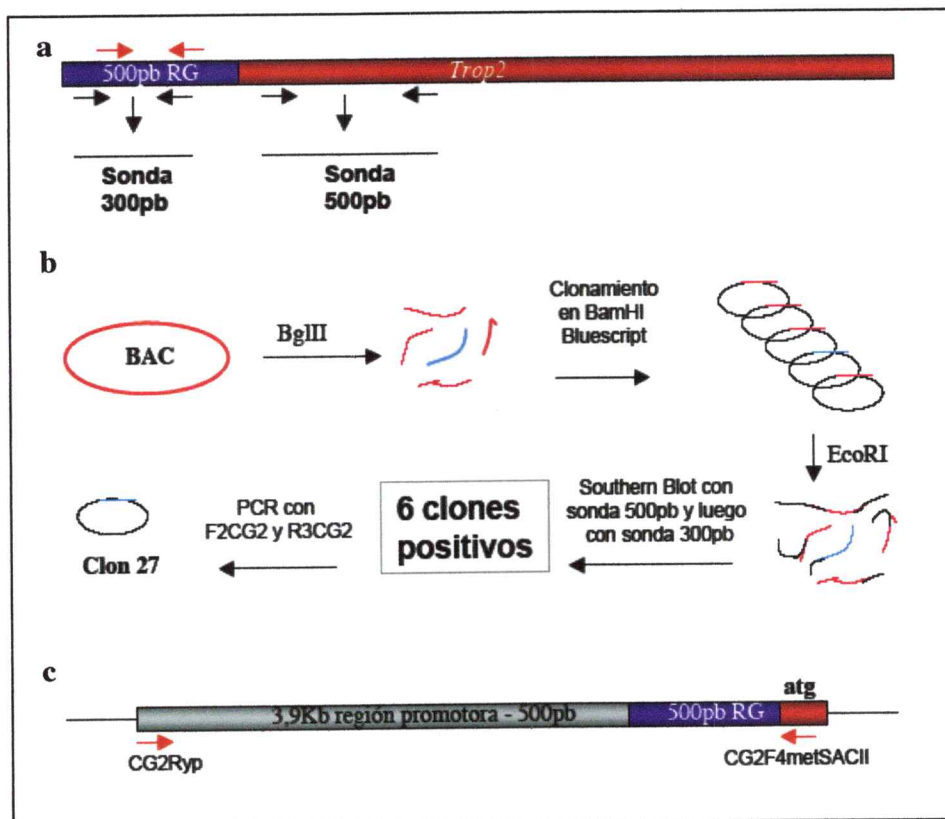


Figura 10, Diagrama de obtención del clon 27 a) Representación del clon 1,7KbPst1. Se ilustra la región codificante de *trop2* (rojo) y 500pb de región genómica (500pb RG, azul). Flechas en negro ilustran los partidores para obtener las sondas. Flechas rojas ilustran los partidores para realizar el PCR (F2CG2 y R3CG2). b) Diagrama del procedimiento para obtener el clon 27. c) Clon 27, donde se ilustra la secuencia codificante (rojo), 500pb de región genómica (azul) y la nueva secuencia promotora clonada (gris). En rojo, los partidores para amplificar la región promotora.

Se hibridó en una primera instancia, con una sonda de 500 pares de bases obtenida del cDNA de CG2. De esta forma, se obtuvo una primera placa radiográfica. Luego se lavó la misma matriz utilizada anteriormente y se hibridó con la sonda de 300pb de región río-arriba del gen *trop2*. El origen de las sondas dentro del gen *Trop2* se diagrama en la figura 10a. La segunda placa radiográfica obtenida indica que los

clones 4, 8, 24, 27, 33 y 36 son candidatos a portadores de la región promotora de *trop2*. Esto se debe al aumento de hibridación y por la aparición de nuevas bandas en la segunda placa en comparación al Southern blot realizado con la sonda de 500pb (datos no mostrados). Se comprobó por PCR, con los partidores F2CG2 y R3CG2, específicos de región genómica inmediatamente río-arriba del gen *trop2*, resultando positivo solo el clon 27 (datos no mostrados). La secuencia de este clon en su región 3' muestra identidad con la región 5' del clon 1,7KbPstI. De esta manera, se obtuvo 3,9Kb de región río-arriba de *trop2*. Se secuenció parcialmente el inserto de este clon y se comparó con la secuencia genómica, comprobándose así que el clon 27 contiene el promotor de Trop2. Esta secuencia se analizó para encontrar posibles sitios de unión a factores trans-activadores (Figura 11). Nótese los sitios de unión a AML-1 α , que es una proteína que se sobreexpresa en cáncer colorectal y Tcf11, efector de la vía Wnt.

Construcciones

Se diseñaron los partidores CG2F4metSACII y CG2Ryp para amplificar los 3,9Kb de promotor con el sitio de restricción SacII agregado en su extremo 3' (Figura 10c). Se amplificaron 3,9Kb de promotor, se subclonaron en "PGEM-TA cloning plasmid" y luego se removió el fragmento con las enzimas de restricción ApaI y SacII para ser subclonado en los sitios ApaI y SacII de Bluescript SK. Este plasmidio se denominó pEDO (Figura 7). Se insertó el fragmento Koster (Gal4::UAS::EGFP) (Köster y Fraser, 2001) en el sitio SacII de pEDO, posteriormente se transformó *E. coli* DH5 α . Se realizó extracción plasmidial de estas transformantes y luego se determinó la orientación del fragmento Koster por digestión con la enzima de restricción EcoRI.

```

-3636 CAGCCAAAGCAAGGATATGTCAGTGGCAATGTGATATTTTGCACGACACTAGCTGATGGACAGCCTGCGAACATTTTT
-3558 AGGTTCTGGATAAAACCTTTCTTTAATGTTCCCTAATGCTATTATAATTCCTACTATCACTGGTATGTTTCAAAATTT
-3480 CACATCCTGCTGATCTGTAAGTCTTTCGATTTACTGATCTTCTCAGTCTCCATTAACGTGATTTTGTATCATCTGGG
-3402 ACAGCTATAGTGATCAGCAGACATGTTTTATCCTTTTTSTCATGCGAGCCTTACAGTATGTCAGGACAGTAAGTAGGA
-3323 TGGTTTTAATTTGGTAACTATTGGGATAAATATGGTGCATAAATTTATTTATTTTTCATTCCCTTATTCTTTCTTCGGC
-3245 GTAGCCCCTTTATTAATCTGGGGTCAACCAGCGGAATGAGCCTCCACTTATCCAGAAAGTTTACGCATCCATTACA
-3167 CATTACATACACTAAGAACAAATTAGGCAAGGCAAGGCAAGGCAAGGCAAGTTTATTTATATAGCACATTTTCATACACA
-3089 ATGGCAATCAAAGTGCTTTACATAAACAAGATAAATGAAACAAGTAAATAAAAATAAAAAATAAAAAATAAAAAATG
-3011 CATAAAAACAAAACAAAACATAAAAACAGGTAAGATGTGATATGAAAGAATGAAGATGAATTTAGCTTACCTAGTTCA
-2933 TCTATAGCAGCTCTTTGGACTTGGCGGGGAAACAGAGCACACAGAGAAAACCCATACGAACACGGGGGAGAACATGCA
-2855 AACTCCAGATAGAAATGCTAACTGACCAGCGAGGCTCGAAACAGCGACCTTCTTGTGTGAGGCGCATATGCTACC
-2777 CACCGCACCACTGTGACGCCGAAATTTATTATTCATCATTAAATAAATTTATTATATTTAATAAATAAACTAAA
-2699 TAAATGTATTAACATTTTTTTATTATTTAAATAAATTAATTTATAAAATTCATAAATTTGTCATACATTTTGTGTGCTC
-2621 GGACTGTTCCATGACATATTCGAAATTTAATGGGTTAACCTGAAAAACTGAAAAATGTTACAGTATAATAAAATG
-2543 TCTCATATCATCATCATTATCATTACAGCAACAACAAAATTTATTATTTACTATTTACTATATTTGCTTAAAGCTAGG
-2465 CCCACACAGAAATCTGTGCGCTCAGAATTCGGCAGATTTTTAGCCAATCATTATTCAGTTTATTACCTGTGTGCAAAAT
-2387 TCATATATATTTAGTTTTTAAATTAATTTTCAGTGATATCATTGACTAGTATGAAAAATTTATATGATTTATTATACAA
-2309 TACAGCTAGTTCAACAATAATTTCTGTCTTTAAGTAGAGATATAAATGAGAGCCTTGTCTTGTTCACAGATATAAGT
-2231 GGATCTAATTTGGATTGTCATGTAAACATTTAATACAAGTTAAAAGGCATTACTTTAAATTTTATATAAAGGTTT
-2153 TAGTCTTGATCTCCAAAAATAATTTTCAGTAAATTCAGTAAATTCAGTAAATTTAACAAAATTTCTGCGCAAAAATAGCCAAAAT
-2075 GCTGCGAGATCCGCTCGCCCTTTTATAGCTCAGATTTGCATACTCTGAGAATAGTACTGTACCCCTAAAAGTTAAAG
-1997 GCAATTTGTGTAGCTCAATTTTTAAATTTATCTCTGCTTAATTCAGGATCACACATTAATTTAATAACTAAGA
-1919 AGTGAGATGTTGTGTTTTGTTGAGTGCTTACAATGTTTTTTTTTTTTTTTGTACCATGGAAATATAAATTTTCT
-1841 AACATTTAACAGTATTTGCTAATTCAGCACTCTCAGAAATAAAGGTACTTGAGATGTAACCTGGTGTTCGATGTTG
-1763 TGGGTATCACCTTTGCAATGGGTGTGCCATTTTACAGATTTTCCGTTGTGATGGTCTTTGCTTCTTTGTAAGGTTA
-1685 TGAGACCTGTAGGCCCTGTACAGCAAAAGATAATCAATGAGTAGAGAACAATCTTCCAAAAAACTACTCTACATTT
-1607 TTAGTTTAGAATCCCTAGCAGAGTTTTACAGATTTACTTTAAATGATTTGCCCTGATTTGCCAAATGCTCAGGAAGTAC
-1529 TACCTGGGGGTTGGGCCATTTCTGTCCAAACTCGTTACCCGGGTTCTCGTCACATCTTTTGTGAGAGGTGTTGATGT
-1451 CTTGCTGAATGCTCATTACTGCCCATACCAATATCAATGTGTCATATGCTTATGATTTGCATCTTTCACCTAT
-1373 GATTTCAAAAATTTCAACATTTTACTGACACAAGTATAGGTTATGCTACCAAAATTCAGATATAGCTCTGTTTACC
-1295 ATATGTAACTAATGTTTTTGATAATTTTCAGACTTTTATAGCTTTTAAAGTACTTCATAAAAAATACATTTTTTTGCC
-1217 TGTGTGAATTAATGTTAAGTCTAAGCTTAAAAAAATGATGTAATACATTTATTTGTTTATCAAGATAGGATTTG
-1139 TAACCTCATTCTCAACACCTTGCATAATGTTAAACATTTTTAAAAATACAGATATAAGAGTAAAAACATTTGATAAC
-1061 ATTTAAATCAAGTATAATTAGTCTTAGCATATATAAGTACACCCCTCACAATCTTCATCAGTACTGAAGCCAAAT
-983 CTGTGCTTATTTCTAAAAATATTATTTAATAGATACATCTGTTTAAATAAATCAGTTTTGTTTAAATGCACCACAATA
-905 CATTGCCATGTTCTAAGAAAGTTGAGTTGAAGTCAAGATTTTTTTTTCTTTTAAATATTTTCCAAATATGTT
-827 TTAGCAGAGCGAGAAATTTTACAGCATGTCGATAATTTTTTCTTCTGGAGAAAGTCTTTTTTATTTCCGGCTAA
-739 AATAAAGCAGTTAAATTTTTTTTTTAAACATTTAAGGTCTAAATTTATAGCCCTTAAAGGTGTATAGACTTTTCC
-651 AATAGTTTACAACAGAACAAACCAATATACAATAACTTGCCTAATACCCTAACCTGCCTAGTTAACTAATCGA
-573 CCAAGGTAAGCATTTAAATGTCACCTTAAAGTGAATAGAAGTCTTAAAAATATGATGATAAATATTTACTTCC
-495 ATCATGGCAAATAAAAAATATGTTAGTTTAAAGTTATAGAAATTAGTTATTAAAAAATCTGCTCTGTGAAATTT
-417 GGGGAAAAATTAACAGAGGGCTAATACTTAAATCTGATTTCACTGTATACATACATACATACATACATACA
-339 TACATACATACATACATACATACATACATACATACATACATACATACATACATACATACATACATACATACATACAT
-261 TAGTGTGTCATAAACAACAACAACTGAAACTGCAGTGTACCAGGTTTGCATGTGTCAAGTTTCAAGTGAATACTTCGT
-183 CGGTACTTTACATTTCCAAAATGCAAGAAAGGATTTGGCTTCACTCTCGATGCTCAAGTACCAAAATATCTCAT
-105 GGGCGGAAAGAGAGCCTGTTTTTGTAGAGTTGAATCCACCCCGTAACCTGACGTCACCTTACTCAACAGGTAACAT
-27 AAATGTCACCTGTTGCGCATCTAGATCAGACGTTTGGCGGGCCAGAGAGGATATCTTCGGGATCTGAGCTGGAAG
+52 AGTTCACAAGACGACCATAACTTTATTTCTGTGTTTCAATGGAATATATCTGTTTCAAGTTAGGATTTGCTGAGTCC
+130 TTTTGGTAAAGTATTTAAACCTCTGTGTTAATGATTAAGTGTCTTCCAGTAAATAACGAAATAGTTTCTCATAATA
+208 ACTGATTTGTAACGTGTAACGTTTATTTTTCAGTTCTCGCTCACAATGAAGGTTTTAGTTGCTTGTGTTGTGGC
+286 ATTGTTGATGTGTAACCTCACAATGTCTTGTAAAAAATGAAGTGGG

```

MyoD	Score 90/100	Tcf11	Score 85/95
CREBP1CJUN Creb	Score 85/95	Sox 5	Score 85/95
Cdx4	Score 95/100	Nkx2.5	Score 85/95
AML-1a	Score 95/100	DELTAEP1	Score 85/95

Figura 11, Región clonada de 3,9Kb río-arriba del gen *trop2*. En colores se aprecian los sitios putativos de unión a factores de transcripción dilucidados con los programas TransFact y Promoter2.0.

Esta reacción enzimática da como resultado dos patrones de digestión diferentes. Del patrón de digestión esperado se obtuvo el plasmidio pEDOK (Figura 7). Por otro lado, se digirió el clon pEDO con la enzima de restricción EcoRI y se purificó desde el gel el fragmento de 1,2Kb de promotor para fusionarle EGFP río-abajo de esta secuencia. Este constructo se denominó 1,2Kb-EGFP.

Expresión Transiente.

Se inyectaron 25pg/embrión de los constructos 1,2kb-EGFP y pEDOK linearizados con la enzima de restricción ApaI, en embriones de estadio de 1 célula. Estos se crecieron hasta las 36 hpf y se analizó el primordio y neuromastos depositados de estos embriones por microscopía Nomarski y fluorescencia. Los resultados indican que el constructo 1,2kb-GFP es inespecífico, debido a que se ven células expresando GFP en diferentes órganos del embrión (datos no mostrados). Por otro lado, el constructo pEDOK, que posee el promotor de 3,9Kb, restringe la expresión de EGFP solamente a las células del primordio migratorio (Figura 12). Se demostró que las células EGFP positivas pertenecen al primordio migratorio, ya que al seguir la posición de una de ellas a diferentes tiempos se observó su desplazamiento acompañando a las demás células del primordio (Figura 12c-f). De esta manera, podemos concluir que los 3,9Kb de región promotora contienen los elementos regulatorios que dirigen la expresión específica al primordio migratorio, mientras que los 1,2Kb carecen de algunos elementos regulatorios que limiten la expresión a la LLP.

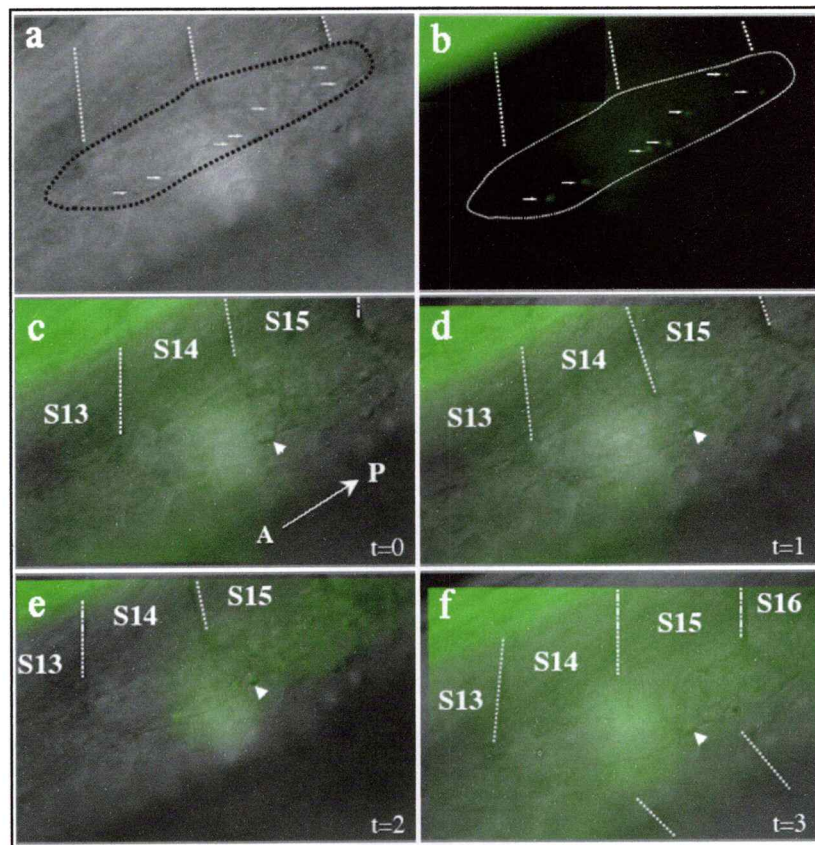


Figura 12, Inyección de 25pg del constructo pEDOK; a) Imagen Nomarski del primordio migratorio. b) Imagen de microscopía de fluorescencia de a. Las flechas indican células que expresan EGFP. c,d) Imágenes fusionadas entre Nomarski y fluorescencia para demostrar que las células que expresan GFP pertenecen al primordio migratorio. c) La flecha indica la posición de una célula que expresa EGFP ubicada en el borde entre dos somitos (S14 y S15), en un tiempo 1. d) La cabeza de flecha indica la misma célula en c, ubicada en el centro de un somito (S15), demostrando que es una célula del primordio migratorio. Las líneas punteadas indican los límites de los somitos (S). La elipse punteada indica el primordio migratorio. A → P indica el eje antero-posterior del embrión.

3.3.4 Localización celular de Trop2.

Con el fin de determinar si la proteína Trop2 se distribuye de manera similar a su ortólogo humano, se determinó la ubicación celular de esta proteína. Se inyectó 200pg/embrión del mRNA de *trop2* fusionado al epítopo Myc (*trop2*-MT) y se dejaron crecer los embriones hasta las 24 hpf para realizar inmunocitoquímica contra

Myc. Como controles se utilizaron embriones sin inyectar, embriones inyectados con el mRNA del factor de transcripción *skip* fusionado al epítipo Myc (sop-MT), y embriones inyectados con mRNA de trop2-MT con el nucleo teñido con Ioduro de propidio. Los resultados indican que Trop2 se localiza principalmente en la membrana plasmática (Figura 13). Además, se aprecia marca perinuclear, lo que podría corresponder a la membrana nuclear o al retículo endoplasmático, sin determinarse si es lo uno o lo otro (Figura 13b). El control sop-MT se localiza en el nucleo y los embriones sin inyectar no presentan marca, demostrandose, que la marca en la membrana plasmática observada con Trop2 es específica. Estos datos, demuestran que Trop2 es una proteína asociada a membrana plasmática.

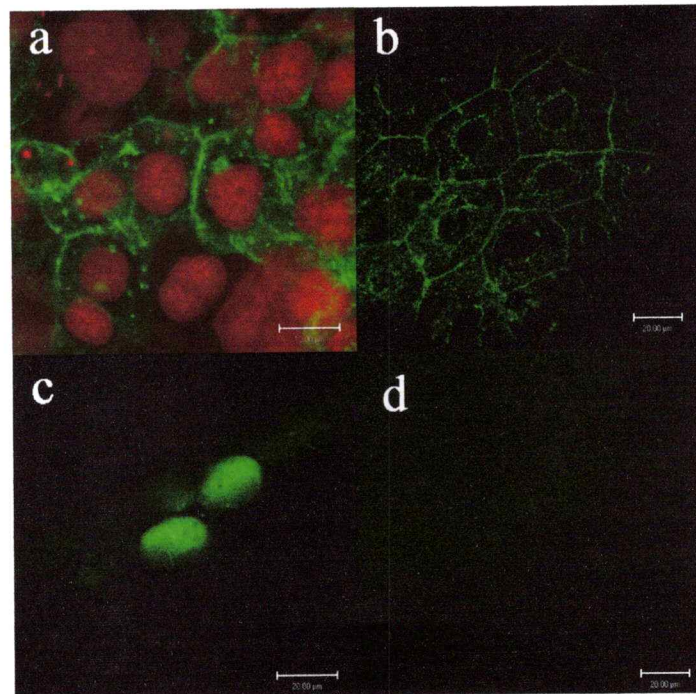


Figura 13, Localización sub-celular de Trop2; a-d) Microscopía confocal; a) Células epiteliales de embriones inyectados con mRNA Trop2-Myc e incubados con anti-myc e Ioduro de Propidio. Se observa marca localizada en membrana plasmática y esta excluida del nucleo. b) Células epiteliales de embriones inyectados con 500pg de mRNA Trop2-Myc. c) Células epiteliales de embriones inyectados con 100pg mRNA del factor de transcripción *Skip*, fusionado al epítipo Myc. Se puede apreciar marca localizada en el nucleo d) Control negativo sin inyectar.

3.2.4 Función de *trop2*: Experimentos de pérdida y ganancia de función.

Para determinar el rol de la proteína Trop2 *in vivo*, se realizaron experimentos de pérdida y ganancia de función para posteriormente analizar la LLP en embriones de pez cebra. En experimentos de pérdida de función, se inyectó el morfolino antisentido de *trop2* (Mo-*trop2*) para inhibir la traducción de la proteína bloqueando el acceso del complejo ribosomal al codón de inicio AUG. Como control de especificidad del Mo-*trop2*, se realizó una construcción compuesta por el cDNA de *trop2* fusionado al epítotope Myc (*trop2*-MT). De esta manera se puede visualizar por inmunocitoquímica contra el epítotope Myc si la proteína se está traduciendo. Se inyectaron 2 grupos de embriones, el primero con 100 pg/embrión del transcrito de *trop2*-MT y el segundo con 100 pg/embrión + 10nL de Mo-*trop2* 1,5mM. Como control negativo se usaron embriones sin inyectar. Luego, se realizó inmunocitoquímica usando el anticuerpo contra el epítotope Myc para visualizar si se está efectuando la traducción de la proteína recombinante Trop2-Myc. Como resultado, se obtuvo reacción negativa para los embriones sin inyectar como para los coinyectados con *trop2*-MT + Mo-*trop2*. Los embriones inyectados con 100 pg/embrión resultaron positivos para la reacción (Figura 14a). Estos resultados indican que el morfolino diseñado, está inhibiendo la traducción de Trop2. Embriones silvestres, en estadio de una célula, fueron inyectados con 10 nL/embrión de Mo-*trop2* 1,5mM y expuestos a los 4 dpf con el marcador vital DiAsp. Estos embriones expuestos a DiAsp mostraron ausencia de neuromastos maduros. Embriones sin inyectar expuestos al mismo tratamiento, presentan 8 parejas de neuromastos funcionales (Figura 14).

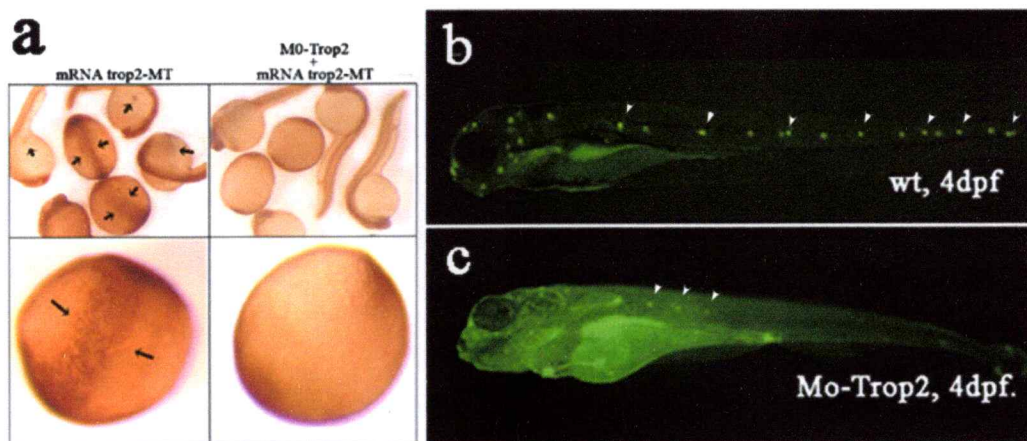


Figura 14, pérdida de función de *trop2*; a) Inmunocitoquímica contra el epítipo Myc como control del Mo-trop2. Las flechas negras indican localización de Myc b-c) DiAsp para larvas silvestres e inyectados con Mo-trop2 respectivamente. Las cabezas de flecha blancas indican los neuromastos de la LLP de un lado del embrión

Este resultado, revela un rol importante de *trop2* en el desarrollo de la línea lateral posterior y anterior del pez cebra. Análisis por microscopía Nomarski en embriones inyectados con el Mo-trop2, muestra que el primordio migra, pero que este no deposita los pro-neuromastos (datos no mostrados), lo cual nos sugiere que *trop2* participa en el depósito de los pro-neuromastos. En experimentos de sobreexpresión de mensajero de *trop2*, se inyectaron 200 pg de mRNA de *trop2*-MT por embrión en estadio de una célula. Se dejaron crecer los embriones hasta 48 hpf y se analizó la presencia de neuromastos funcionales mediante tinción DiAsp. Los embriones inyectados fueron negativos para la tinción DiAsp, lo cual indica ausencia de neuromastos maduros (Figura 15).

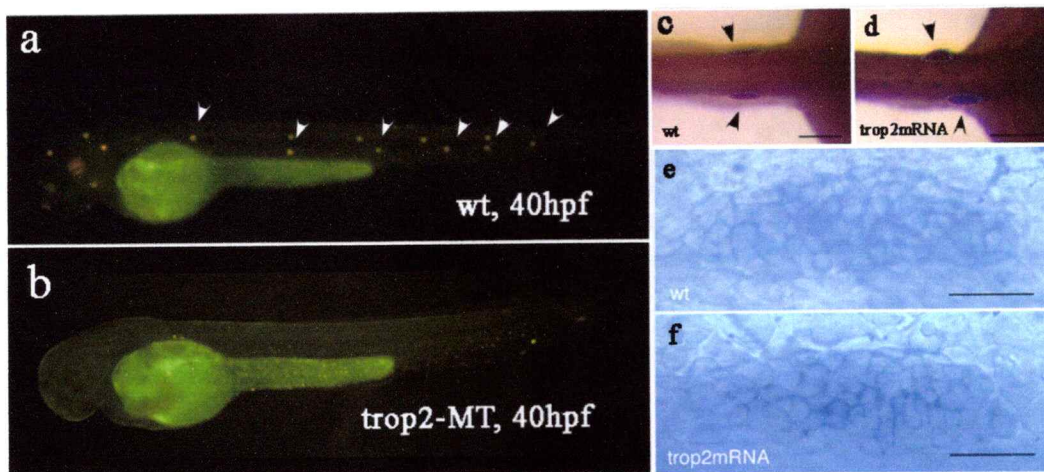


Figura 15, Sobreexpresión de *trop2*; a-b) Tinción DiAsp de embriones control e inyectados con mRNA *trop2*-MT, respectivamente. Cabezas de flecha blancas indican neuromastos maduros. c-f) Hibridaciones *in situ* con la sonda CXCR4b. c-d) Vista dorsal de los embriones, se aprecia el primordio más abultado de los embriones inyectados con mRNA *trop2*. Cabezas de flecha negra indican la ubicación del primordio migratorio e-f) Primordio migratorio en embrión silvestre e inyectado con mRNA *trop2*, respectivamente. En los embriones inyectados el promedio de células fue de 90, mientras en embriones *wt* de 72. Escala de barras; c-d) 15 μ m, e-f) 200 μ m.

Para descartar un efecto inespecífico del epítipo myc que afecte el correcto plegamiento de Trop2, se inyectaron 200 pg de mRNA *trop2*, se dejaron crecer los embriones hasta las 48 hpf y se visualizó la presencia de neuromastos. El fenotipo obtenido es idéntico al obtenido con la proteína recombinante. Por otro lado, los controles donde se inyectó el mensajero del epítipo c-Myc por sí sólo, así como los embriones sin inyectar, fueron positivos para la tinción DiAsp (datos no mostrados). Esto nos indica que el efecto se produce por sobreexpresión de *trop2* y no por la presencia del epítipo Myc o mRNA foráneo.

Experimentos de hibridación *in situ* con la sonda CXCR4b (marcador de primordio y proneuromastos) en los embriones inyectados con el mRNA de *trop2*-MT demostraron migración aparentemente normal del primordio con la salvedad que CXCR4b se expresa con mayor intensidad, sugiriendo una posible regulación de

CXCR4b por parte de Trop2. Este aumento en intensidad podría darse también como un efecto por un mayor número de células presentes en el primordio, consecuencia de una desregulación en la proliferación celular. Para determinar si *trop2* posee un rol en proliferación celular se comparo el número de células peresentes en el primordio migratorio entre embriones inyectados con mRNA *trop2*-MT y embriones de tipo silvestre. Este análisis se realizó en embriones de estadio prim9 (primordio ubicado en el somito número 9) debido a la variabilidad del número de células del primordio según la ubicación de este en el embrión. El promedio de células en el primordio de embriones de tipo silvestre en el estadio prim9 es de 72 (n=3), mientras en los embriones que sobreexpresan *trop2* el promedio es de 90 células (n=3). Estos resultados se correlacionan a el primordio mas abultado, observado desde una vista dorsal, en embriones inyectados (Figura 15d). Estos datos sugieren un posible rol de Trop2 en proliferación celular dentro del primordio migratorio. Para determinar si Trop2 posee finalmente un rol en proliferación celular, se analizó un marcador de células en mitosis en embriones inyectados con el mRNA de *trop2*. Se inyectó el mRNA de *trop2* en embriones de estadio una célula y se dejaron crecer hasta las 36 hpf. Luego se les realizó inmunocitoquímica contra Histona H3 fosforilada, La proteína histona H3 en su forma fosforilada se encuentra presente en células que estan en mitosis, por lo que las células que poseen marca, se encuentran proliferando. Al observar los embriones sin inyectar en la lupa, se ven marcas al azar en todo el embrión, siendo el bulbo olfatorio el único órgano donde se observa una marca localizada. A bajo aumento se observó una clara diferencia en los embriones inyectados ya que en un alto porcentaje se observa marca concentrada en primordio y en pro-neuromastos. Para examinar en detalle el primordio migratorio y los

neuromastos se observaron los embriones al microscopio con el objetivo 63X. Se aprecia en un 18% de los embriones controles (n=22), marca tanto en los neuromastos como en el primordio migratorio (Figura 16). En el caso de los neuromastos, se aprecia marca únicamente en las células centrales. En los embriones inyectados con el mRNA de *trop2* se aprecia en un 64,4% (n=45) una marca mas extensa en los neuromastos y en algunos casos las células mas rostrales del primordio migratorio (Figura 16), sitio en el cuál nunca se detecto tinción en embriones controles. Al visualizar los neuromastos de los embriones inyectados al microscopio con el objetivo 63X, se aprecia marca en casi la totalidad del neuromasto, demostrando así una proliferación aumentada en los embriones que sobreexpresan Trop2.

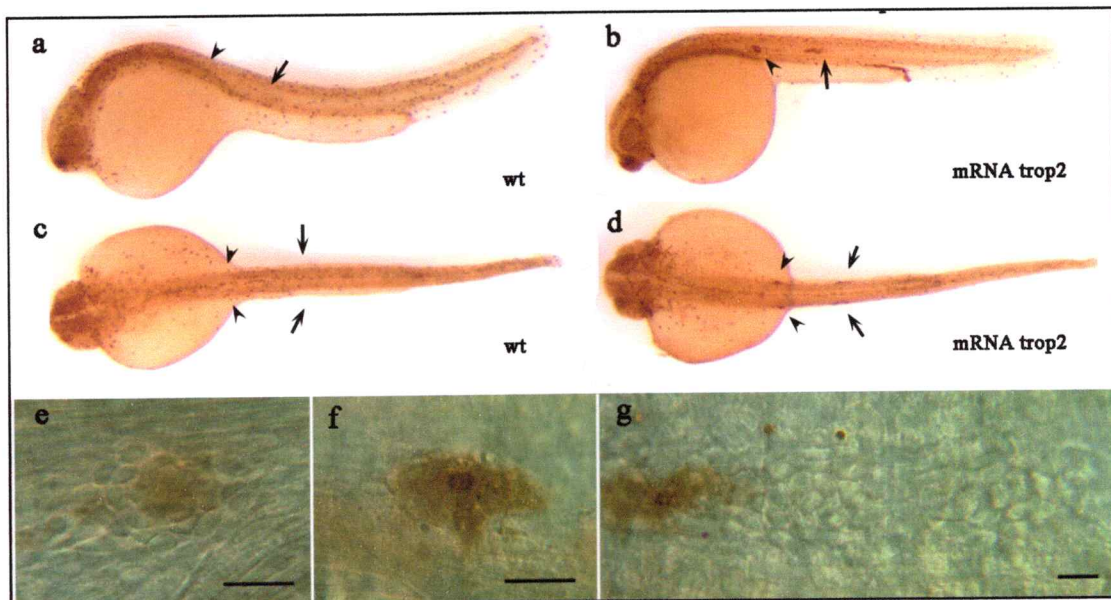


Figura 16, Inmunocitoquímica contra Histona H3 fosforilada; a-d) Imágenes de embriones completos a bajo aumento. a) Vista lateral de embrión control. b) Vista lateral de embrión inyectado. c) Vista dorsal de embrión control. d) Vista dorsal de embrión inyectado. Cabezas de flecha indican posiciones de neuromastos y las flechas indican el primordio migratorio. e) Neuromasto *wt*, f) Neuromasto de embrión inyectado, g) Primordio migratorio de embrión inyectado. Escala de barras. e-g) 15 μ m.

3.3 Neurogénesis en la LLP.

3.3.1 Rol del gen proneural *neuroD*.

El gen proneural *neuroD* se expresa en la placoda ótica en estadíos tempranos del desarrollo y despues se mantiene en el primordio migratorio distribuido en su totalidad (A. Sarrazin y E. Villablanca, datos no publicados).

Para conocer la posible función de este gen en el desarrollo de la LLP, se inyectó 10 nL de morfolino *NeuroD* (Mo-*neuroD*) 5mM por embrión en estadío de una célula, incubandose los embriones hasta 48 hpf y efectuando la tinción DiAsp de estos embriones. Los resultados negativos para la tinción DiAsp en mas de un 90% de los embriones inyectados indican ausencia de neuromastos maduros (Figura 17).

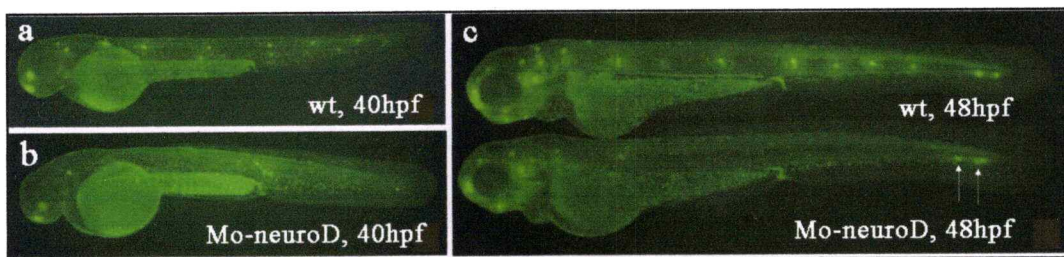


Figura17, Tinción DiAsp; a) Embrión control de 40 hpf. b) Embrión inyectado con Mo-*neuroD* de 40 hpf. c) Comparación entre un embrión control y otro inyectado con morfolino. Las flechas indican la presencia de algunos neuromastos maduros en el embrión inyectado con Mo-*neuroD*, probablemente por dilución del morfolino.

Para analizar si esta ausencia se debe a un impedimento en la migración del primordio, inhibición del depósito de los proneuromastos o a la no diferenciación de los proneuromastos a neuromastos maduros, realizamos hibridación *in situ* con la sonda *trop2* en embriones de 28 a 40 hpf inyectados con el Mo-*neuroD* (Figura 18).

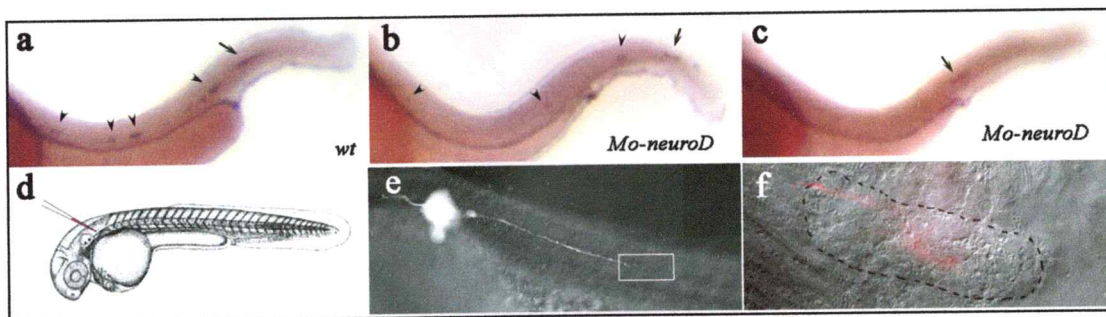


Figura 18, *neuroD* no afecta la migración del primordio; a-c) Hibridaciones *in situ* con la sonda *trop2*. a) Embrión *wild type*, b-c) Embriones inyectados con Mo-*neuroD*, donde se aprecia migración normal del primordio y depósito de los neuromastos. d) Diagrama de inyección DiI en el ganglio de la línea lateral posterior. e) Ganglio y prolongaciones marcados con DiI en embrión inyectado con Mo-*neuroD*. f) Ampliación del cuadro en e. Línea punteada define el primordio migratorio y en rojo se aprecia el cono de crecimiento.

Los resultados indican que el primordio migra y los proneuromastos son depositados normalmente. Para confirmar el resultado anterior y para verificar si el primordio comigra con el nervio de la línea lateral posterior, realizamos un marcaje del ganglio de la LLP con DiI en embriones de 36 hpf inyectados con el Mo-*neuroD*. Los resultados indican que hay una normal migración del cono de crecimiento del nervio de la LLP con el primordio migratorio de la línea lateral posterior (Figura 18), por lo que no se afectan estos eventos al inhibir el gen *neuroD*.

Para analizar un posible rol de *neuroD* en diferenciación celular, fue analizada la morfología de los neuromastos de los embriones de 48 hpf previamente inyectados con el Mo-*neuroD*. El análisis se realizó mediante microscopía Nomarski y tinción DiAsp. Por microscopía Nomarski se observaron neuromastos depositados a intervalos irregulares y con diferenciación aberrante ya que se pierde la disposición radial de las células ciliadas y sus tamaños son variables (Figura 19). Inclusive se aprecia que hay neuromastos que pierden su forma redondeada. Por otro lado, estos neuromastos aberrantes pierden la capacidad de endocitar el marcador vital DiAsp

probablemente por la falta de células ciliadas (Figura 19e-f). La ausencia de marca DiAsp en los neuromastos de los embriones inyectados, podría deberse a que las células ciliadas no se diferencian o a que sufren muerte celular.

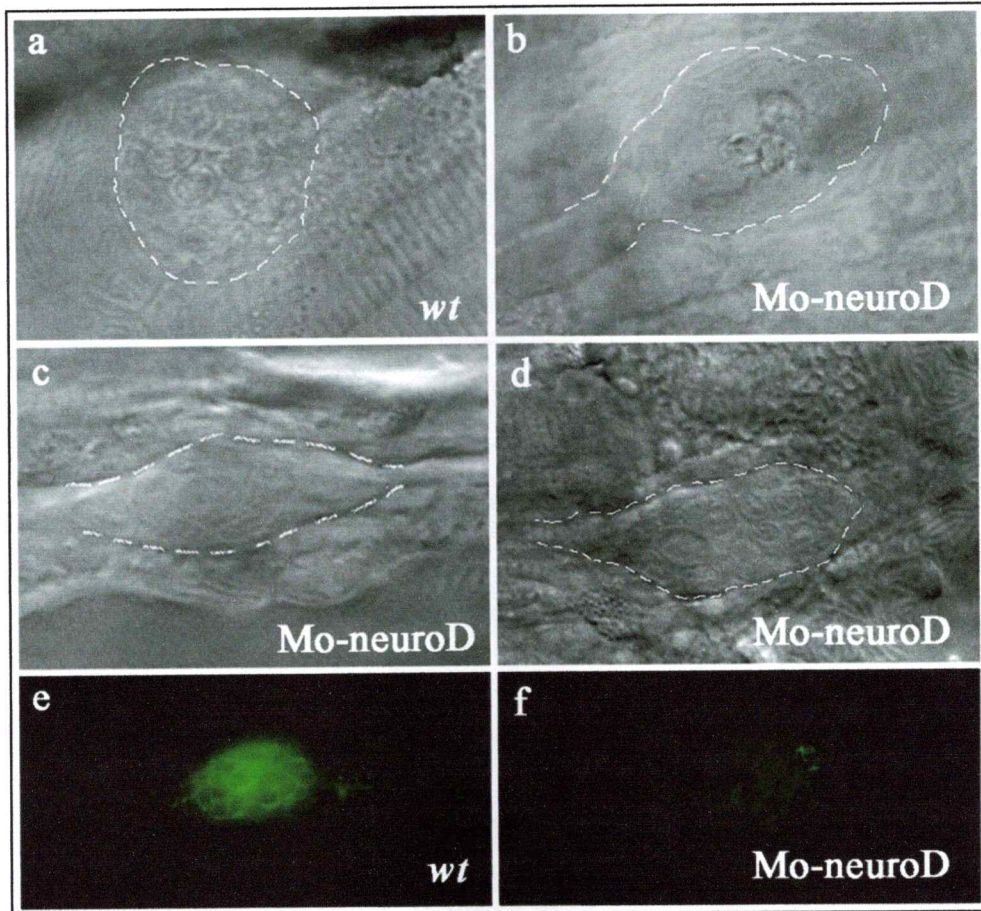


Figura 19, Imágenes de microscopía Nomarski y fluorescencia por DiAsp de neuromastos en embriones silvestres e inyectados con Mo-neuroD; a-d) Neuromastos visualizados por medio de microscopía Nomarski, e-f) Neuromastos teñidos con DiAsp y visualizados mediante fluorescencia. a) Neuromasto en embrión silvestre, b-d) Neuromastos aberrantes en embriones inyectados con Mo-neuroD. Líneas punteadas denotan el contorno del neuromasto. e) Tinción DiAsp de un neuromasto control, donde se aprecian las células ciliadas, f) Tinción DiAsp del neuromasto de un embrión inyectado con Mo-neuroD, notese la ausencia de células ciliadas.

3.3.2 Rol de *skip* en el desarrollo de los neuromastos.

El mutante *sopaipilla* (*sop*) posee una mutación por inserción viral en el gen homólogo a *Skip* humano. Su patrón de expresión es ubícua en el embrión durante su desarrollo (datos no mostrados).

Se ha sugerido la participación de *skip* como cofactor en la vía de señalización Notch/Delta (Zhou y cols, 2000). A modo de determinar la función de *skip* en el desarrollo de la LLP en el pez cebra, se realizaron estudios en el mutante *sop*. La tinción DiAsp en estos mutantes demuestra la ausencia de neuromastos maduros (Figura 20a). Hibridación *in situ* con la sonda *trop2* en mutantes *sop*, indica una migración normal del primordio, sin embargo, se puede apreciar que el proneuromasto depositado no presenta el patrón de argolla característico de la cepa silvestre (Figura 20e).

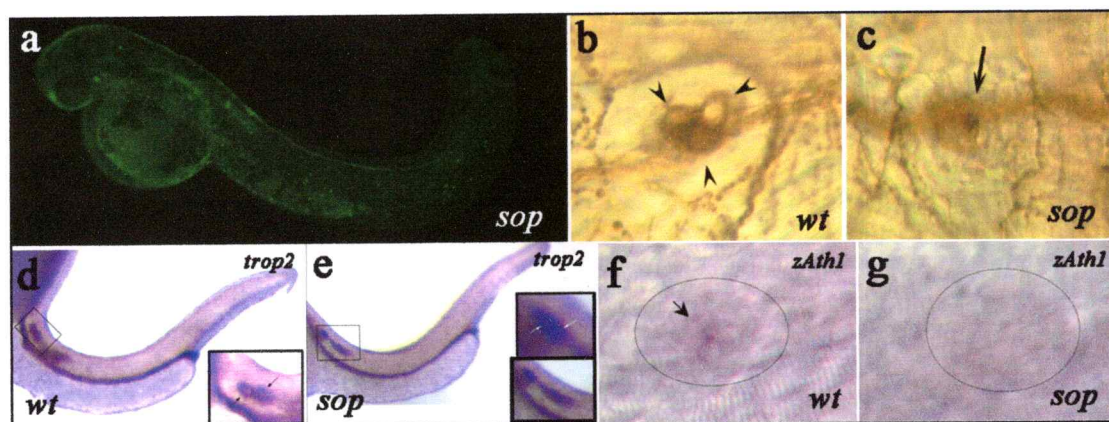


Figura 20, Análisis del gen *skip* en la LLP utilizando el mutante *sop*; a) Tinción DiAsp en mutante *sop*. b-c) Inmunoquímica contra tubulina acetilada; b) neuromasto silvestre. c) Neuromasto *sop*. Las cabezas de flecha indican marca en las células sensoriales diferenciadas. La flecha indica una célula sensorial diferenciada o la prolongación del nervio de la LLP. d-g) Hibridación *in situ*; d) Sonda *trop2* en tronco de embrión silvestre. e) Sonda *trop2* en tronco *sop*. f) Sonda *ath1* en neuromasto silvestre, la flecha indica una célula expresando *ath1*. g) sonda *ath1* en neuromasto *sop*, donde se aprecia la ausencia de expresión del gen proneural *ath1*.

El patrón de argolla en *wild type*, sugiere que *trop2* se expresa en las células de soporte presuntivas. El patrón “relleno” en los mutantes *sop* nos lleva a pensar que la ausencia del gen *skip* conlleva a una diferenciación errónea de las células ciliadas o a su ausencia. Para analizar si la falta de *skip* esta alterando la neurogénesis (posiblemente a través de la vía Notch/Delta), se realizó hibridación *in situ* con la sonda del gen proneural *ath1*. Los mutantes *sop* no presentan marca con *ath1*, mientras en el control se aprecian las células centrales del proneuromasto expresando *ath1* (Figura 20g). Los resultados anteriores, indican una transformación de las células ciliadas a otro destino en el mutante *sop*. Al analizar los mutantes *sop* de 48 hpf por medio de inmunocitoquímica con el anticuerpo tubulina acetilada, vemos la ausencia de células ciliadas en los neuromastos ya maduros (Figura 20c). Estos resultados nos llevan a la conclusión que *skip* tiene un rol en la neurogénesis de los neuromastos mediada por la vía de señalización Notch/Delta.

3.4 Tcf4 en diferenciación celular.

Mediante hibridación *in situ* con la sonda del gen *tcf4* en embriones de 48 hpf detectamos expresión en notocorda, cerebro y débilmente en los neuromastos maduros y en un característico patrón de argolla. (Figura 21a-c). Para determinar la posibilidad de una función para este factor de transcripción en diferenciación o desarrollo de la LLP, se inyectó el morfolino de *tcf4* en estadio de una célula. Observamos, mediante tinción DiAsp, ausencia de neuromastos maduros en embriones inyectados (Figura 21d-g). Al realizar hibridación *in situ* con la sonda *trop2* en embriones inyectados con el morfolino *tcf4* (Mo-*tcf4*), no apreciamos diferencia alguna con respecto a los embriones controles (datos no mostrados) lo cual

nos indica que la función de *tcf4* en el desarrollo de la línea lateral posterior no es ni en la migración del primordio ni en el depósito de los proneuromastos.

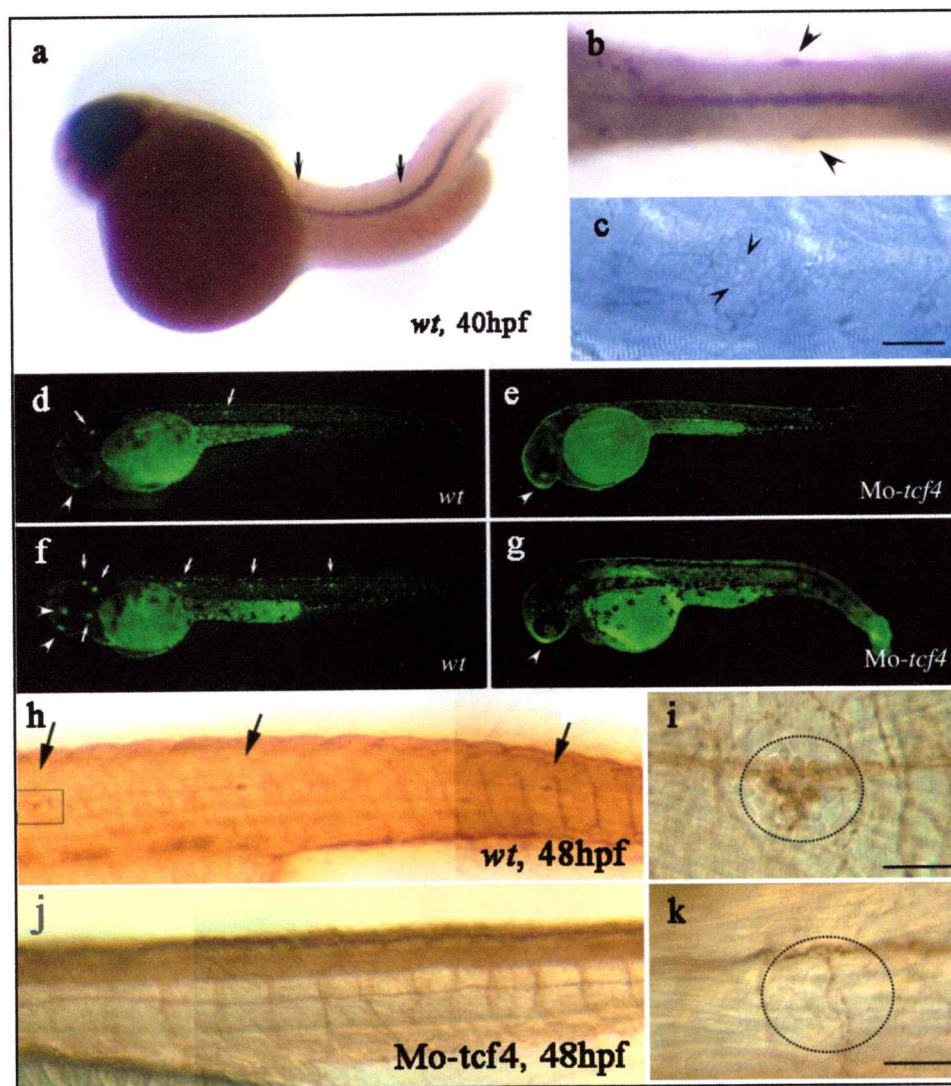


Figura 21, Análisis de la función de Tcf4 en la LLP; a-c) Hibridación *in situ* con la sonda *tcf4*, a) Vista lateral de embrión de 48 hpf, las flechas indican expresión en los neuromastos. b) Vista dorsal del tronco de un embrión de 48 hpf, las cabezas de flecha indican expresión en los neuromastos. c) Neuromasto expresando *tcf4*, las cabezas de flecha indican las células centrales que no expresan *tcf4*. d-e) Tinciones DiAsp; d y f) Embriones controles de 32 y 42 hpf respectivamente, las flechas indican los neuromastos maduros y las cabezas de flecha indican el bulbo olfatorio. e y g) Embriones inyectados con Mo-*tcf4*. Nótese la ausencia de neuromastos, no así de la marca en el bulbo olfatorio. h-k) Inmunocitoquímica contra tubulina acetilada; h) Embrión control de 48 hpf, las flechas indican la marca en células sensoriales de los neuromastos. i) Ampliación del cuadro en h, la línea puntada indica el contorno del neuromasto. j) Embrión inyectado con mo-*tcf4* de 48 hpf. k) Ampliación del recuadro en j. Escala de barras; c) 10µm. i,k) 15µm.

Inmunocitoquímica con el anticuerpo contra tubulina acetilada en los embriones inyectados reveló ausencia de células ciliadas en los neuromastos depositados (figura 21j), proponiendo así, un rol *tcf4* en la diferenciación de las células ciliadas en los neuromastos ya depositados. Al realizar Hibridación *in situ* con las sondas *trop2* y *atonal* en embriones inyectados, no se observaron diferencias con respecto a los embriones controles (datos no mostrados). Esto sugiere que Wnt no actúa durante la neurogénesis de los neuromastos, sino que en eventos de diferenciación posteriores o inclusive en la interacción célula de soporte-célula sensorial, posiblemente un mecanismo de mantenimiento celular.

IV. DISCUSION

La migración celular es una conducta en la cual un grupo de células cambia su posición relativa desde un punto de origen hasta su posición final, lugar donde se hacen funcionales. Para entender los mecanismos moleculares involucrados en la progresión tumoral y/o la destinación linfocitaria, se han analizado estos movimientos migratorios en explantes de tejido o en sistemas *in vitro*. De esta forma se ha aportado con un gran conocimiento sobre los eventos intracelulares que ocurren en el movimiento celular, como por ejemplo, sobre la reorganización de la red de microtubulos y citoesqueleto durante la migración celular. (Lauffenburger y Horwitz, 1996, Sheetz y cols., 1999). Sin embargo, es necesario un modelo de estudio *in vivo* que cuente con la mayor similitud de sus componentes, y como estos se comportan, a los de un organismo multicelular.

En organismos como el ratón o pollo, se han comenzado a estudiar movimientos celulares *in vivo*, sin embargo, cuentan con el problema de la pigmentación que hace difícil la visualización del tejido.

El pez cebra cuenta con numerosas ventajas, entre las cuales se cuentan la transparencia de las células en el estado embrionario, lo que facilita la visualización de estructuras internas. Además por cada cruce es posible obtener un gran número de embriones, el pez cebra es de bajo costo y fácil mantenimiento, existen mutantes gen específicos y líneas transgénicas para facilitar estudios de función genica. Por otro lado, el pez cebra cuenta con un sistema mecanosensorial llamado línea lateral, cuyos componentes son superficiales y pueden ser visualizados fácilmente. Durante el desarrollo del sistema de la línea lateral posterior se puede distinguir procesos como

migración celular, proliferación, neurogénesis y diferenciación celular, siendo de esta forma, un atractivo sistema vertebrado de estudio *in vivo* de las bases celulares y moleculares de los procesos mencionados anteriormente. Además, existen muchos genes homólogos en pez cebra a genes humanos, por lo que es posible la extrapolación de este modelo para entender los mecanismos moleculares de enfermedades humanas.

4.1 Modelo para el estudio *in vivo* de la LLP

En el presente trabajo, se clonaron 3,9Kb de región genómica río-arriba del gen *trop2* ($Trop2^{3,9Kb}$). El objetivo fué obtener los elementos regulatorios que podrían dirigir la expresión de un gen reportero (EGFP) al primordio migratorio y los neuromastos. Estos 3,9Kb de región genómica se fusionaron al constructo Gal4::UAS::EGFP. De esta forma, $Trop2^{3,9Kb}$ debe dirigir la expresión de Gal4 a las células del primordio migratorio. Gal4, a su vez, se uniría a la secuencia UAS, reclutando los factores de transcripción basales para transcribir EGFP. Gracias a las 6 repeticiones UAS en tandem, se amplifica la expresión de EGFP y de esta manera, se obtiene mayor expresión del reportero. Esto es de mucha utilidad para visualizar expresión transiente, ya que este tipo de expresión suele ser debil por la dilución del ADN. Otra ventaja del constructo $Trop2^{3,9Kb}::Gal4::UAS::EGFP$, es que una vez obtenido el transgenico, este se puede cruzar con otra línea transgenica UAS::GenX, donde X puede ser cualquier gen que se desee sobreexpresar en el sistema de la LLP. De esta forma podemos estudiar, sobreexpresando o inhibiendo por medio de dominantes negativos, genes potencialmente involucrados en los procesos de neurogénesis o migración celular.

La inyección del constructo linearizado $Trop2^{3,9Kb}::Gal4::UAS::EGFP$ en estadio de una célula, demostro que los 3,9Kb de región promotora contienen los elementos cis-regulatorios necesarios para dirigir la expresión de EGFP específicamente en el primordio migratorio. Sin embargo no logramos visualizar expresión en los neuromastos depositados, lo que sugiere que en estos 3,9Kb no estan los elementos cis-regulatorios para dirigir la expresión en los neuromastos.

Se concluye que el constructo $Trop2^{3,9Kb}::Gal4::UAS::EGFP$ es un buen candidato para realizar transgénesis estable en pez cebra. De esta manera se podrá obtener un modelo de estudio *in vivo* del proceso de migración, específicamente, migración del primordio migratorio. Este modelo puede ser de mucha utilidad para estudiar las bases moleculares de procesos como la propagación tumoral y metástasis, así como posibles terapias para inhibir los procesos mencionados.

4.2 Migración en la LLP

El gen homólogo a la glicoproteína humana Trop2, se expresa en el primordio migratorio y en los pro-neuromastos depositados, más específicamente, en las células de soporte presuntivas. *trop2* es un gen de gran interés por ser una glicoproteína de membrana que se sobreexpresa en cáncer colorectal en humanos y por ser un blanco para inmunoterapia anti-tumoral (Alberti, 2003). La función de *trop2* no ha sido demostrada. Solo se ha comprobado, por estudios *in vitro*, que Trop2 tiene un rol en adhesión celular homotípica (Trebak, 2001) y que es un transductor de señales de calcio asociado a tumores (Ripani, 1998). Sin embargo, no hay estudios *in vivo* de la función de *trop2*. En este trabajo, se determinó mediante estudios de pérdida y ganancia de función, que *trop2* es esencial para la correcta migración del primordio.

Los estudios de inyección de morfolinós para inhibir la traducción del gen, demostraron mediante tinción DiAsp, la ausencia de neuromastos maduros. Al observar el primordio de los embriones inyectados con Mo-Trop2, por medio de microscopía Nomarski, se demostró que este migra normalmente, pero no deposita los pro-neuromastos (datos no mostrados). Los experimentos de sobreexpresión de *trop2*, mediante inyección de mRNA de *trop2*-MT, muestran ausencia de neuromastos maduros y un tamaño mayor del primordio migratorio debido al incremento de células que lo componen. Se demostró que este aumento del primordio se debe a que la sobreexpresión de Trop2 gatilla proliferación tanto en las células del primordio como de los neuromastos. Estos resultados sugieren que al sobreexpresar *trop2*, el primordio y los pro-neuromastos poseen más células de lo normal. La sobreproliferación produciría una desregulación en los neuromastos que los conduce a muerte celular o a mantenerse indiferenciados. Por esta razón no se aprecian neuromastos diferenciados en embriones de 48 hpf mediante tinción DiAsp e inmunocitoquímica contra tubulina acetilada. Los datos de pérdida de función sugieren que al inhibir Trop2 mediante morfolinós anti-sentido, se inhibe la proliferación celular en el primordio migratorio y de alguna manera este no deposita los pro-neuromastos. Probablemente el primordio necesita de un número mínimo de células para realizar depósito de pro-neuromastos. De esta forma se concluye que la proliferación celular es esencial para el desarrollo de la LLP en pez cebra.

Los hallazgos de que Trop2 se localiza en la membrana plasmática y que la sobreexpresión de Trop2 produce una excesiva proliferación en la LLP, sugieren que Trop2 es un receptor de membrana que transduce señales gatillando proliferación celular. Sin embargo, el hecho de que la proliferación celular se vea aumentada

solamente en los componentes de la LLP, demuestra que Trop2 por si solo no es capaz de gatillar proliferación celular. Si fuese de esta manera, se apreciaría proliferación celular en forma ubicua. Con lo anterior, se sugiere que hay otro componente que interactúa con Trop2 para gatillar proliferación celular. Este componente esta presente solamente en los neuromastos y en el primordio migratorio. Extrapolando a los seres humanos, Trop2 podría estar activando un proceso de proliferación necesario para metástasis en cáncer colorectal y de esta forma se explicaría su sobreexpresión en este tipo de cáncer. Evidencias previas de experimentos *in vitro* indican que Trop2 es una molécula de adhesión homotípica. En este trabajo se determinó por primera vez la función *in vivo* en proliferación celular de Trop2. De esta manera, se comprobó que el sistema de la línea lateral posterior del pez cebra, es un buen sistema-modelo de estudio *in vivo* de genes involucrados en migración y proliferación celular. Como proyección, este sistema se puede utilizar para estudiar inhibidores de la migración que pueden ser aplicados en tratamientos anti-metastásicos. Además se puede utilizar para entender mejor las bases moleculares de proliferación y migración celular mediada por Trop2, y de esta forma diseñar estrategias terapéuticas para evitar la propagación tumoral en cánceres colorectales.

4.3 Neurogénesis y diferenciación neuronal

Durante la migración del primordio, este va depositando pequeños grupos de células en intervalos regulares que se diferenciarán en neuromastos maduros, los cuales se componen de células ciliadas rodeadas de células de soporte. Este evento de diferenciación en neuromastos involucra los procesos de neurogénesis y

diferenciación celular. En el sistema nervioso periférico de *Drosophila*, los precursores de órganos sensoriales son seleccionados, desde un grupo de células equivalentes, por el mecanismo de “inhibición lateral” mediada por la vía Notch-Delta. Delta actúa como una señal de represión neural que inhibe la expresión de genes pro-neurales por activación de Notch y de esta manera, conduce a estas células a un destino epidermal (Simpson y cols., 1997). En el SNC, la función de la inhibición lateral es mantener indiferenciado a un grupo de precursores neurales para una diferenciación neuronal secundaria más tardía (Appel y cols, 1999). Los genes neurogénicos *notch3*, *deltaA* y *deltaB* y el gen proneural *ath1* determinan dentro del primordio el destino neural y la diferenciación del neuromasto (Itoh y cols, 2001), demostrando la participación de la vía Notch-Delta en la neurogénesis de la LLP. Debido a la simpleza de los neuromastos, ya que poseen solo dos tipos celulares, y a la superficialidad de estos facilitando su visualización, se propuso en este trabajo que este es un excelente modelo para estudios *in vivo* de neurogénesis y diferenciación celular. Para validar esta hipótesis, estudiamos la función genica de *skip* y del gen proneural *neuroD*, determinando que poseen un rol en la neurogénesis y diferenciación de los neuromastos.

Skip (SKI-binding protein), es una proteína involucrada en represión y/o activación de la transcripción y es conocido como un cofactor en las vías Notch, Tgf- β y receptor de vitamina D (Kostrouchova y cols, 2002). Nosotros utilizamos el sistema de la línea lateral posterior del pez cebra para estudiar la función del gen *skip* en pez cebra. Se utilizó el mutante *sopaipilla* (*sop*), el cual posee una mutación del gen *skip* por inserción viral (R. Young y E. Villablanca, datos no publicados). En este mutante, todas las células de los pro-neuromastos son positivos para la sonda *trop2* y

negativos para la sonda *ath1*, mientras que en embriones silvestres, *trop2* se expresa en patrón de argolla (células de soporte presuntivas) y *ath1* se expresa en el centro del neuromasto (células sensoriales presuntivas). Esto se correlaciona perfectamente con los resultados de la inmunocitoquímica contra α -tubulina acetilada, donde en embriones *sop* no se aprecian células ciliadas diferenciadas. Estos resultados sugieren que la función normal de *skip* es restringir la expresión de genes proneurales a las células centrales de los neuromastos, probablemente favoreciendo la formación del complejo Skip-CBF1-NotchIC en las células de soporte precursoras. El mutante *sop* tiene un fenotipo contrario al descrito por Itoh (2001) en el mutante *mind bomb (mib)*. En el trabajo de Itoh, en *mib* se ve expresión de *notch3* en un territorio menor que en embriones controles, mientras que *deltaA*, *deltaB* y el gen proneural *ath1* se expresan en un territorio mayor dentro del proneuromasto y primordio migratorio (Itoh y cols, 2001). Producto de lo anterior, el mutante *mib* posee mayor número de células ciliadas y se concluye que la vía Notch está reprimida. En el caso de *sop*, los resultados para *ath1* y α -tubulina acetilada son opuestos, lo cual sugiere que la vía Notch está favorecida. Para comprobar lo anterior, se propone estudiar los blancos directos de NotchIC, como son los genes *her*. En el caso de que en el mutante *sop* esta favorecida la vía Notch, se debería ver una disminución de las células que expresando *her*. En este trabajo se buscó expresión de *her1* y *her4* en los neuromastos sin obtener resultados positivos. Por otro lado, solo se ha descrito activación de la vía Notch por medio de inyección de NotchIC exógeno, por lo que este sería el primer mutante descrito con esta característica. Finalmente, estos datos concluyen que *skip* está involucrado en el proceso de “inhibición lateral” mediada por la vía de señalización Notch/Delta.

El gen proneural *neuroD* codifica para un factor de transcripción tipo bHLH (básica helice-vuelta-helice), que es altamente expresado en estructuras que contienen neuronas en diferenciación. Entre los órganos que expresan *neuroD*, están los ganglios craneal y dorsal, vesícula óptica, retina, bulbo olfatorio, entre otros. Sobreexpresión de *neuroD* puede causar la prematura diferenciación de células precursoras de neuronas (Lee y cols, 1995). Interferencia mediante morfolinós, de la función de otro gen proneural, *neurogeninal (ngn1)*, bloquea la diferenciación de todos los ganglios craneales, sin embargo los neuromastos se desarrollan independientemente de la acción de *ngn1*, sugiriendo que dos de las placodas precursoras de la LLP, ganglio y primordio migratorio, están bajo controles genéticos separados (Andermann y cols., 2002). Nuestros experimentos de inhibición de la función de *neuroD* mediante oligonucleótidos morfolino antisentido, demuestran la ausencia de neuromastos maduros, sugiriendo un rol de *neuroD* en el desarrollo de la LLP. Experimentos de hibridación *in situ* con la sonda *trop2*, demostraron que la migración y el depósito de los neuromastos no se ve afectada por inhibición de *neuroD*. Así se concluye que *neuroD* está involucrado en un proceso posterior en el desarrollo de la LLP. Por medio de microscopía Nomarski, se demostró que los neuromastos están indiferenciados en los embriones inyectados con Mo-*neuroD*, por lo que se concluye la participación de *neuroD*, como gen proneural, en la diferenciación de los neuromastos.

Debido a que los neuromastos están compuestos por solo dos tipos celulares y por los antecedentes de genes neurogénicos y proneurales expresados en su desarrollo, el sistema de la línea lateral es un excelente modelo para el estudio de la neurogénesis *in vivo* en vertebrados.

4.4 Vía de señalización Wnt

Así como ocurre con el receptor de Wnt, *frizzled7a*, hemos descrito la expresión del factor de transcripción *tcf4* en los neuromastos de la LLP. La expresión de *tcf4* se puede visualizar en los neuromastos por medio de hibridación *in situ* forzada en su tinción. Esto sugiere que *tcf4* se expresa en niveles bajos en esta estructura. Experimentos de inhibición de la síntesis de Tcf4 demostraron la ausencia de neuromastos maduros al ser analizados con DiAsp. Al realizar experimentos de hibridación *in situ* con las sondas *trop2* y *ath1* en embriones inyectados con Mo-tcf4, no se ven diferencias apreciables con respecto a embriones controles. Lo anterior nos demuestra que *tcf4* no está involucrado ni en el proceso de migración ni en la neurogénesis en el desarrollo de la LLP. Por lo tanto, nuestros resultados indican un rol primordial de *tcf4* en procesos posteriores a la etapa de neurogénesis y anteriores a la maduración de los neuromastos, probablemente en diferenciación de las células ciliadas. Por otro lado, se demuestra por primera vez que al inhibir la vía de señalización Wnt, se afecta el desarrollo de la LLP. La simplicidad del sistema de los neuromastos, los hace un atractivo modelo de estudio de intermediarios de la vía Wnt en la diferenciación de órganos sensoriales. Sin embargo, se ha propuesto que componentes de la vía Wnt ejercen un rol de mantenimiento de las células ciliadas del oído interno de ratón. En este trabajo, no descartamos esta posibilidad, ya que la ausencia de células ciliadas, demostrada por DiAsp e inmunocitoquímica contra tubulina acetilada, podría deberse a su muerte post-diferenciación. Para analizar este factor, proponemos estudiar muerte celular en embriones inyectados con Mo-tcf4 para ver si se ve afectada la mantención de los neuromastos.

4.5 Procesos y genes en el desarrollo de la LLP.

En una línea de tiempo del desarrollo de la LLP tenemos que a las 20 hpf el primordio comienza a migrar caudalmente a través del miosepto horizontal. El primordio va depositando grupos de células en intervalos regulares. Se ha detectado, en baja frecuencia, mitosis en las células del primordio, lo que indica que hay divisiones celulares durante la migración (Gompel y cols, 2001). Por otro lado, en este trabajo, hemos detectado divisiones celulares en los pro-neuromastos depositados. Estos datos indican que hay proliferación celular tanto en el primordio como en los pro-neuromastos.

Se ha descrito expresión de genes neurogénicos y proneurales dentro del primordio y en los pro-neuromastos (Itoh y cols, 2001). Esto sugiere que las células de los neuromastos (ciliadas y de soporte) comienzan a especificarse durante la migración del primordio hasta que, ya depositados, comienzan a diferenciarse. La especificación de los neuromastos se lleva a cabo mediante el proceso de neurogénesis, por lo tanto, el periodo de neurogénesis en un grupo de células precursoras a neuromasto, transcurre desde que están migrando dentro del primordio hasta unas horas después de ser depositadas.

Una vez depositadas y especificados los destinos celulares de los componentes de los neuromastos, estos se diferencian en células ciliadas y de soporte, para luego ser conectadas por la inervación del nervio de la LLP. Si realizamos una escala temporal de los procesos involucrados en el desarrollo de un neuromasto, tenemos: Las células precursoras de un neuromasto migran siendo parte del primordio. Al comienzo de la migración no son distinguibles los diferentes tipos celulares. Más tarde los células

expresan genes de manera diferenciada, lo que permite distinguir precursores de distintos tipos celulares. Se depositan las células precursoras del pro-neuromasto, expresando aún y con mayor intensidad los genes proneurales y neurogénicos que les confiere su destino neural. El evento de proliferación visualizado en el primordio y neuromastos se situaría sin limite temporal nitido, entre la migración y deposito. El procesos de neurogénesis se extiende desde la migración hasta varias horas post-deposito. La ultima etapa del desarrollo de un neuromasto sería la diferenciación celular. La ubicación temporal de los genes estudiados en este trabajo se esquematizan en la figura 22. *Trop2* participa en las etapas mas tempranas del desarrollo de la LLP y se extiende su expresión casi en todo el desarrollo de un neuromasto. Luego actúan los genes *skip* y *neuroD*, siendo *tcf4* el gen mas tardío. Este ultimo se ubicó en la etapa de “diferenciación celular”, aunque podría estar cumpliendo un rol en la mantención de la función de los neuromastos, actuando en este caso en un evento mas tardío a la diferenciación celular.

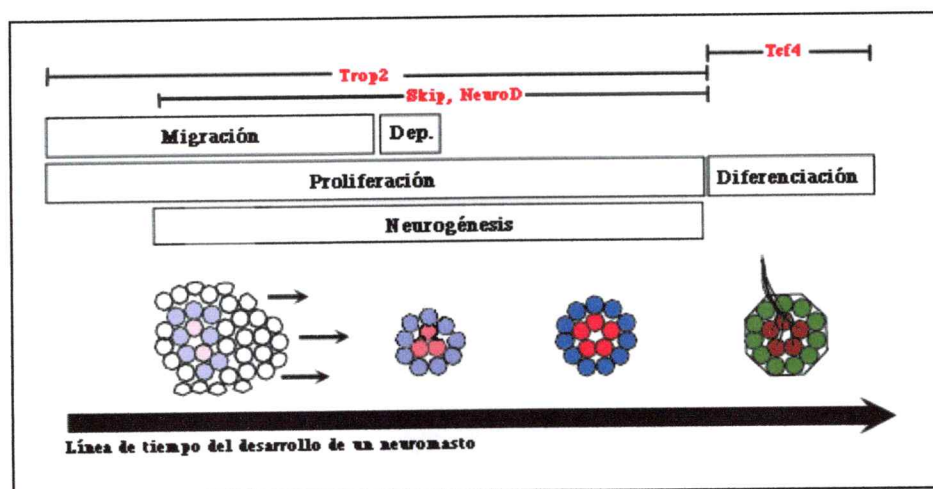


Figura 22, Modelo propuesto para el desarrollo de un neuromasto de la LLP; El nivel de expresión de genes neurogénicos y/o proneurales se esquematiza con la intensidad de los colores; Azul: genes de destinación epidermal, Rojo: genes de destinación neural. Café: Células ciliadas y verde: Células de soporte. Las barras indican el periodo que abarcan los genes estudiados (rojo).

V. CONCLUSIONES

- 1.- Trop2 es un gen necesario para el desarrollo de la LLP.
- 2.- Trop2 es una proteína que se localiza en la membrana plasmática y gatilla el proceso de proliferación en las células del primordio y neuromastos.
- 3.- Skip controla la neurogénesis de los neuromastos. Este actúa por medio de la vía de señalización Notch/Delta.
- 4.- *Sopaipilla*, es el primer mutante con características de tener la vía Notch/delta aumentada.
- 5.- El gen proneural *neuroD* tiene un rol en la diferenciación de los neuromastos.
- 6.- Tcf4 se expresa tardíamente en los neuromastos y es necesario para el desarrollo de estos.
- 7.- La LLP es un buen sistema-módulo para el estudio *in vivo* de los procesos de migración, proliferación y diferenciación celular.
- 8.- El constructo Trop2^{3,9Kb}::Gal4::UAS::EGFP, posee los elementos regulatorios necesarios para dirigir la expresión al primordio migratorio y es un candidato para realizar transgénesis en pez cebra.
- 9.- La proliferación celular es esencial durante el desarrollo de la LLP.

REFERENCIAS

- Amatruda JF, Shepard JL, Stern HM, Zon LI. "Zebrafish as a cancer model system" *Cancer Cell*, 2002 Apr;1(3):229-31
- Assoian RK. "Control of the G1 phase cyclin-dependent kinases by mitogenic growth factors and the extracellular matrix". *Cytokine Growth Factor Rev.* 1997 Sep;8(3):165-70.
- Baldin V, Lukas J, Marcote MJ, Pagano M, Draetta G. "Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1". *Genes Dev.* 1993 May;7(5):812-21.
- Dambly-Chaudiere C, Sapède D, Soubiran F, Decorde K, Gompel N, Ghysen A. "The lateral line of zebrafish: a model system for the analysis of morphogenesis and neural development in vertebrates". *Biol cell.* 2003 Dec;95(9): 579-87
- David N, Sapède D, Saint-Etienne L, Thisse C, Thisse B, Dambly-Chaudière C, Rosa F.M, and Ghysen A. "Molecular basis of cell migration in the fish lateral line: Role of the chemokine receptor CXCR4 and of its ligand, SDF1". *PNAS*, 2002 Dec 99: 16297-1630
- El Sewedy T, Fornaro M, Alberti S. "Cloning of the murine TROP2 gene: conservation of a PIP2-binding sequence in the cytoplasmic domain of TROP-2". *Int J Cancer.* 1998 Jan 19;75(2):324-3
- Fritzsich B. "The amphibian octavo-lateralis system and its regressive and progressive evolution". *Acta Biol Hung.* 1988;39(2-3):305-22.
- Gompel N, Cubedo N, Thisse C, Thisse B, Dambly-Chaudiere C, Ghysen A. "Pattern formation in the lateral line of zebrafish". *Mech Dev.* 2001 Jul;105(1-2):69-77.
- He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW. "Identification of c-MYC as a target of the APC pathway". *Science.* 1998 Sep 4;281(5382):1509-12.
- Itoh M, Chitnis AB. "Expression of proneural and neurogenic genes in the zebrafish lateral line primordium correlates with selection of hair cell fate in neuromasts". *Mech Dev.* 2001 Apr;102(1-2):263-6.
- Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF. "Stages of embryonic development of the zebrafish". *Dev Dyn.* 1995 Jul;203(3):253-310.
- Kishi S, Uchiyama J, Baughman AM, Goto T, Lin MC, Tsai SB. "The zebrafish as a vertebrate model of functional aging and gradual senescence". *Exp Gerontol.* 2003 Jul;38(7):777-86

- Koster RW, Fraser SE. "Tracing transgene expression in living zebrafish embryos". *Dev Biol*. 2001 May 15;233(2):329-46.
- Langenau DM y cols. "Myc-induced T cell leukemia in transgenic zebrafish" *Science*, 2003. Feb 7;299(5608):887-90
- Lauffenburger DA, Horwitz AF. "Cell migration: a physically integrated molecular process" *Cell* 1996 Feb 9;84(3):359-69.
- Litvinov SV, Bakker HA, Gourevitch MM, Velders MP, Warnaar SO. "Evidence for a role of the epithelial glycoprotein 40 (Ep-CAM) in epithelial cell-cell adhesion". *Cell Adhes Commun*. 1994 Oct;2(5):417-28.
- Litvinov SV, Velders MP, Bakker HA, Fleuren GJ, Warnaar SO. "Ep-CAM: a human epithelial antigen is a homophilic cell-cell adhesion molecule". *J Cell Biol*. 1994 Apr;125(2):437-46.
- Metcalfe WK. "Sensory neuron growth cones comigrate with posterior lateral line primordial cells in zebrafish". *J Comp Neurol*. 1985 Aug 8;238(2):218-24.
- Morrison A, Hodgetts C, Gossler A, Hrabe de Angelis M, Lewis J. "Expression of Delta1 and Serrate1 (Jagged1) in the mouse inner ear". *Mech Dev*. 1999 Jun;84(1-2):169-72.
- North TE, Zon LI. "Modeling human hematopoietic and cardiovascular diseases in zebrafish". *Dev Dyn*, 2003 Nov;228(3):568-83.
- Ripani E, Sacchetti A, Corda D, Alberti S. "Human Trop-2 is a tumor-associated calcium signal transducer". *Int J Cancer*. 1998 May 29;76(5):671-6.
- Sapède D. "Zebrafish a model for migration of cancer cells?" *Med Sci. (Paris)*, 2003 Aug-Sep;19 (8-9):780-2
- Schwartz MA, Brown EJ, Fazeli B. "A 50-kDa integrin-associated protein is required for integrin-regulated calcium entry in endothelial cells". *J Biol Chem*. 1993 Sep 25;268(27):19931-4.
- Sheetz MP, Falsenfeld D, Galbraith CG, Choquet D. "Cell migration as a five-step cycle" *Biochem Soc Symp*, 1999;65:233-43
- Sumanas S, Kim HJ, Hermanson SB, Ekker SC. "Lateral line, nervous system, and maternal expression of Frizzled 7a during zebrafish embryogenesis". *Mech Dev*. 2002 Jul;115(1-2):107-11.
- Tetsu O, McCormick F. "Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells". *Nature*. 1999 Apr 1;398(6726):422-6.
- Whitfield TT. "Zebrafish as a model for hearing and deafness" *J Neurobiol*, 2002

Nov 5;53(2):157-71

Yoder JA, Nielsen ME, Amemiya CT, Litman GW. "Zebrafish as an immunological model system" *Microbes Infect*, 2002 Nov;4(14):1469-78

Young RM, Reyes AE, Allende ML. "Expression and splice variant analysis of the zebrafish tcf4 transcription factor". *Mech Dev*. 2002 Sep;117(1-2):269-73.

Zhou S, Fujimuro M, Hsieh JJ, Chen L, Miyamoto A, Weinmaster G, Hayward SD. "SKIP, a CBF1-associated protein, interacts with the ankyrin repeat domain of NotchIC To facilitate NotchIC function". *Mol Cell Biol*. 2000 Apr;20(7):2400-10.