

**Análisis de los genes proneurales involucrados
en la formación de la línea lateral
del pez cebra (*Danio rerio*)**

Tesis
entregada a la
Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al grado de

**Doctor en Ciencias con Mención en Biología Molecular, Celular Y
Neurociencias**



Facultad de Ciencias

por

Andrés Fernando Sarrazin Castillo

Agosto, 2006

Director de Tesis Dr. Miguel L. Allende Conelly

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE



INFORME DE APROBACION

TESIS DE DOCTORADO

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

Andrés Fernando Sarrazin Castillo

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología Molecular, Celular y Neurociencias, en el examen de Defensa de Tesis rendido el 7 de Abril de 2006. (fecha del examen privado)

Director de Tesis:

Dr. Miguel L. Allende

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Juan Fernández (Presidente)

Dr. María Estela Andrés C.

Dr. Marcelo Antonelli A.

Dr. Jimena Sierralta J.



Nació en Coyhaique el 27 de abril de 1975. En 1982 se trasladó junto a su familia a la ciudad de La Serena y posteriormente (1988) a Santiago, en donde terminó la enseñanza media en el colegio De la Salle, el año 1992. Al año siguiente entró a la carrera de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Químicas (Universidad de Chile). El año 2000, realizó su tesis de bioquímico en el laboratorio del Dr. Miguel L. Allende. El año 2001 entró al programa de doctorado en Ciencias, mención Biología, de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile. El año 2002 se tituló de Bioquímico.

Andrés Fernando Sarrain Cuelino

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para el grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología (Molecular, Celular y Bioquímica) en el examen de Defensa de Tesis, celebrado el 7 de Abril de 2008 (fecha del examen privado).

Director de Tesis:

Dr. Miguel L. Allende

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Juan Fernández (Presidente)

Dr. María Estela Andrés C.

Dr. Marcelo Antonelli A.

Dr. Jimena Sieralta J.

AGRADECIMIENTOS

A Catalina Lafourcade y Florencio Espinoza por su asistencia técnica.

A Eduardo Villablanca por su colaboración en la inyección del trazador Dil y búsqueda de neuromastos por microscopía Nomarski.

A Viviana Núñez por su colaboración en el desarrollo y análisis de las hibridaciones *in situ* y demás resultados.

A Pablo Sandoval por su colaboración en el Western blot, hibridaciones *in situ* y análisis de resultados.

Al laboratorio del Dr. Alain Ghysen y Dr. Christine Dambly-Chaudière, por su colaboración en el desarrollo de toda esta tesis.

Al Dr. Robert Cornell por facilitarnos el morfolino y cDNA de *neurogenina1*

Al Dr. Vladimir Korzh por facilitarnos las líneas transgénicas ET4 y ET20 y el cDNA de *neuroD*.

Al Dr. Ajay Chitnis, por facilitarnos la línea mutante *mindbomb*.

Al Dr. Iman Sahly, por el cDNA de *eya1*.

Al Dr. Ajay Chitnis, por facilitarnos la línea transgénica HuC

Al Dr. Darren Gilmour, por facilitarnos la línea transgénica FoxD3-GFP

Al Dr. Ariel Reyes, por facilitarnos la lupa de fluorescencia al comienzo de esta tesis.

A la Iniciativa Científica Milenio, Ministerio de Planificación, proyecto P02-050 y beca de doctorado (años 2004 y 2005).

Al Ministerio de Educación, beca de doctorado (años 2001-2003)

Al departamento de post-título de la Universidad de Chile, proyecto de financiamiento parcial de tesis (PG/UCH0012/2003).

Fondecyt (1031003).

ICGEB (CRP/CHI03-03c)

ECOS-Sud (C03B01).

ÍNDICE

ÍNDICE.....	iii
LISTA DE TABLAS.....	v
LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vii
RESUMEN.....	viii
SUMMARY.....	ix
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 ¿Qué es y para qué sirve la Línea Lateral?.....	1
1.2 Desarrollo embrionario de la LL.....	2
1.2.1 Origen de las placodas de la LL.....	2
1.2.2 Migración del primordio y depósito de los neuromastos de la LL.....	3
1.2.3 Desarrollo post-embrionario de la LL.....	4
1.3 Genes involucrados.....	6
1.3.1 Especificación de las placodas de la LL.....	7
1.3.2 Migración del primordio y depósito de los neuromastos.....	8
1.3.3 Genes proneurales y neurogénicos involucrados en la formación de la LL.....	10
II. HIPÓTESIS.....	15
III. OBJETIVOS.....	15
3.1 Objetivo general.....	15
3.2 Objetivos específicos.....	15
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
4.1 Materiales.....	16
4.1.1 Reactivos para biología molecular y otros.....	17
4.1.2 Soluciones.....	18
4.2 Métodos.....	19
4.2.1 Mantenimiento de los peces y recolección de embriones.....	19
4.2.2 Microinyección de embriones.....	20
4.2.3 Síntesis de sondas e hibridación <i>in situ</i> en embrión completo.....	20
4.2.4 Inmunoquímica en embrión completo.....	22
4.2.5 Construcción de vectores de expresión y morfolinós.....	22
4.2.6 Marcación de células y microscopía.....	23

4.2.7 Extracción de proteínas y Western blot.....	24
V. RESULTADOS.....	25
5.1 Expresión de los genes <i>neurogenina 1</i> , <i>neuroD</i> y <i>homólogo de atonal 1</i> en la línea lateral del pez cebra (<i>Danio rerio</i>).....	25
5.1.1. <i>neurogenina 1</i>	26
5.1.2. <i>neuroD</i>	27
5.1.3. <i>homólogo de atonal 1</i>	30
5.2 Análisis funcional por pérdida de función de los genes <i>ngn1</i> , <i>neuroD</i> y <i>ath1</i>	31
5.2.1 Inhibición de la traducción por inyección de oligonucleótidos antisentido.....	31
5.2.2 Análisis de los fenotipos de los “embriones morfantes”.....	34
5.2.2.1 Formación del ganglio y nervio de la LLP.....	34
5.2.2.2 Migración del primordio y depósito de los neuromastos.....	36
5.2.2.3 Diferenciación de los neuromastos.....	37
5.3 Jerarquía de regulación entre los genes <i>neuroD</i> y <i>ath1</i>	41
5.3.1 Experimentos de rescate del fenotipo morfante.....	42
5.3.2 Análisis de sobre-expresión.....	43
VI. DISCUSIÓN.....	46
6.1 Formación de los neuromastos de la LL.....	47
6.1.1 Formación de las células accesorias.....	48
6.1.2 Formación de las células ciliadas.....	49
6.2 Jerarquías de regulación.....	50
6.3 Neuronas del ganglio y neuromastos mecanosensores.....	51
6.3.1 Un comentario acerca de la sobre-expresión de un gen.....	52
6.4 Origen evolutivo de las células ciliadas y neuronas ganglionares.....	52
6.5 Papel de <i>neuroD</i> en el desarrollo de la LL.....	53
VII. CONCLUSIONES.....	55
VIII. REFERENCIAS.....	57
VIII. APÉNDICE 1. Publicación derivada de esta tesis.....	63

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Sondas utilizadas para hibridación <i>in situ</i>	21
Tabla 2. Experimentos de rescate en embriones de pez cebra.....	43

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Neuromasto mecano-sensorial de la LL.....	2
Figura 2. Formación de la LLP.....	5
Figura 3. Expresión de genes proneurales y neurogénicos en la LLP.....	12
Figura 4. Expresión de <i>neurogenina 1</i> en la LLP.....	26
Figura 5. Expresión de <i>neuroD</i> en la LL.....	28
Figura 6. Expresión de <i>neuroD</i> en mutante <i>mib</i>	29
Figura 7. Expresión de <i>ath1</i> en la LLP.....	30
Figura 8. Efecto del morfolino para <i>neuroD</i> en la tinción de neuromastos funcionales.....	32
Figura 9. Rol indirecto de <i>ngn1</i> en la formación de la LLP.....	33
Figura 10. Efecto de <i>neuroD</i> MO en la formación del ganglio de la LLP.....	34
Figura 11. Inyección de Dil en el ganglio de la LLP de embriones morfantes para <i>neuroD</i>	35
Figura 12. Correcta migración del primordio y depósito de los neuromastos de la LLP en embriones inyectados con <i>neuroD</i> MO	36
Figura 13. Los embriones morfantes para <i>neuroD</i> poseen neuromastos aberrantes.....	38
Figura 14. Los neuromastos aberrantes no tienen células ciliadas.....	39
Figura 15. <i>ath1</i> y <i>neuroD</i> están implicados en la diferenciación de todo el neuromasto.....	40
Figura 16. La sobre-expresión de <i>ath1</i> provoca la expresión ectópica de <i>neuroD</i>	44
Figura 17. La ausencia de función de <i>neuroD</i> no afecta el proceso de migración.....	47
Figura 18. Esquema resumen.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>ath1</i>	gen <i>homólogo de atonal 1</i>
<i>cldB</i>	gen <i>claudina B</i>
DiAsp	Yoduro de 4-(4-dietilaminoestiril)-N-metilpridinio
dpf	días post-fertilización
ET4	línea transgénica ET4 (células ciliadas-GFP)
ET20	línea transgénica ET20 (células del manto-GFP)
<i>eya1</i>	gen homólogo de <i>eyes absent 1</i> de <i>Drosophila</i>
GFP	proteína fluorescente verde (<u>green fluorescent protein</u>)
hpf	horas post-fertilización
L1-L8	neuromastos de la línea lateral primaria numerados de anterior a posterior
L1'-L3'	neuromastos de la línea lateral secundaria numerados de anterior a posterior
LIN	línea interneuromástica
LL	línea lateral
LLA	línea lateral anterior o de la cabeza
LLP	línea lateral posterior o del tronco y la cola
<i>mib</i>	mutante <i>mindbomb</i>
MO	Morfolino (oligonucleótido antisentido)
Morfante	embrión inyectado con Morfolino
<i>ngn1</i>	gen <i>neurogenina 1</i>
<i>nrd</i>	gen <i>neuroD</i> (<i>neurogenic differentiation</i>)
primI	primordio que forma la línea lateral primaria
primII	primordio que forma la línea lateral secundaria
SDF1a	proteína Factor derivado del estroma 1a
SNC	sistema nervioso central
<i>tacstd 2</i>	transductor de señales de calcio asociado a tumores (<u>tumor-associated calcium signal transducer.2</u>)

RESUMEN

La línea lateral de peces y anfibios corresponde a un arreglo de órganos mecanosensores distribuidos sobre el cuerpo del animal. Cada órgano sensorial está compuesto por un grupo de células ciliadas mecanosensoras rodeadas por células accesorias de dos tipos, del manto y de soporte. En esta tesis mostramos que en el embrión del pez cebra dos genes proneurales son esenciales para la diferenciación de las células ciliadas, *neuroD* y homólogo de *atonal 1* (*ath1*). Mediante experimentos de pérdida de función inyectando oligonucleótidos antisentido (morfolinos), demostramos que la ausencia de función de cada uno de estos genes, pero no la del otro gen de la familia *atonal*, *neurogenina1* (*ngn1*), elimina marcadores específicos de células ciliadas. Esto se contrasta con lo ocurrido en otros sistemas sensoriales, donde *neuroD* es regulado por *ngn1* y no por *ath1*. El fenotipo producido por la eliminación de la función de *ath1* pudo ser rescatado parcialmente mediante la inyección del cDNA de *neuroD*, apoyando la conclusión de que en el linaje de las células ciliadas la activación de *neuroD* probablemente requiere *ath1* mientras que en las neuronas sensoriales del ganglio la activación de *neuroD* requiere *ngn1*. Propusimos por lo tanto, que los dos homólogos de *atonal*, *ath1* y *ngn1*, permiten la segregación de dos funciones, la mecanoreceptiva y la señalización eléctrica, las cuales originalmente eran desarrolladas por un solo tipo celular, como es lo que ocurre en insectos.

SUMMARY

The lateral line system comprises an array of mechanosensory organs distributed over the body surface. Each sense organ comprises a patch of mechanosensory hair cells surrounded by two kind of accesory cells, the mantle cells and the supporting cells. We show that in the zebrafish embryo two proneural genes are essential for differentiation of the hair cells, *neuroD* (*nrd*) and *atonal homolog 1* (*ath1*). Gene knockdown experiments demonstrate that loss of function of either gene, but not of the related proneural gene *neurogenin1* (*ngn1*), abrogate the appearance of hair cell markers. This is in contrast to other sensory systems where *nrd* is regulated by *ngn1* and not by *ath1*. The phenotype produced by loss of *ath1* function can be partially rescued by injection of *nrd* cDNA, supporting the conclusion that in the hair cell lineage the activation of *nrd* probably requires *ath1* whereas in sensory neurons *nrd* activation requires *ngn*. We propose that the emergence of two atonal homologs, *ath1* and *ngn*, allowed the segregation of the two functions, mechanoreception and electrical signalling, that were originally performed by a single cell type as found in insects.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 ¿Qué es y para qué sirve la Línea Lateral?

La línea lateral corresponde a un sistema mecano-eléctrico-sensorial propio de peces y anfibios acuáticos, usado para detectar estimulación hidrodinámica y eléctrica a lo largo del eje del cuerpo (Baker y Bronner-Fraser, 2001). Se ha propuesto que media una especie de "tacto a distancia" (Dijkgraaf, 1989; Montgomery y cols., 1995) con el cual el animal percibe movimientos del agua a un cuerpo de distancia, y se le asocia a respuestas conductuales que van desde la detección de potenciales presas, reconocimiento de pareja sexual, conducta de escuela o cardumen hasta la posibilidad de esquivar obstáculos y predadores, dependiendo del nicho ecológico en que el animal vive. Está compuesta por dos tipos de órganos sensoriales individuales: neuromastos mecano-receptores, que responden a movimientos del agua y órganos ampulares electro-receptores, que responden a campos eléctricos débiles. La disposición de cada órgano individual es conservada entre los individuos de una misma especie, manteniendo un patrón especie-específico. Esta tesis se centra en los neuromastos mecano-sensibles, que pueden estar libres en la piel, en surcos superficiales o en canales más profundos comunicados con la superficie a través de poros (Northcutt, 1989; Popper y Platt, 1993; Montgomery y cols., 1995; Baker y Bronner-Fraser, 2001). Cada neuromasto está compuesto por células ciliadas y células accesorias de dos tipos: de soporte que rodean a las células ciliadas y del manto que bordean externamente al neuromasto (Metcalf y cols., 1985; Ghysen y Dambly-Chaudière, 2004; Figura 1A). Las neuronas sensoriales aferentes y eferentes, que inervan a las células ciliadas, poseen sus cuerpos celulares en ganglios craneales y sus axones proyectan hacia y desde el sistema nervioso central (SNC) en el rombo-encéfalo (aferentes y eferentes inhibitorias) y en el cerebro anterior (eferentes excitatorias; McCormick, 1989). Principalmente, las inervaciones eferentes inhibitorias suprimen la auto-estimulación de la célula ciliada, causada por los movimientos del propio animal (Roberts y Meredith, 1989; Baker y Bronner-Fraser, 2001). El mecanismo receptor de cada célula ciliada involucra la disposición apical de un grupo de microvellosidades (estereocilio) y un único kinocilio (en conjunto conocidos como haz de cilios; Figura 1B) (Kroese y van Netten, 1989; Popper y Platt, 1993). Una cúpula gelatinosa (secretada por las células de soporte) cubre el haz de cilios (Popper y Platt, 1993), cuyo

desplazamiento estimula mecánicamente canales iónicos en la membrana de las células ciliadas. Un movimiento del haz de cilios en el sentido del kinocilio abre los canales de transducción produciendo un aumento en la conductancia de la membrana. Lo contrario ocurre con un movimiento en el sentido opuesto (Kroese y van Netten, 1989).

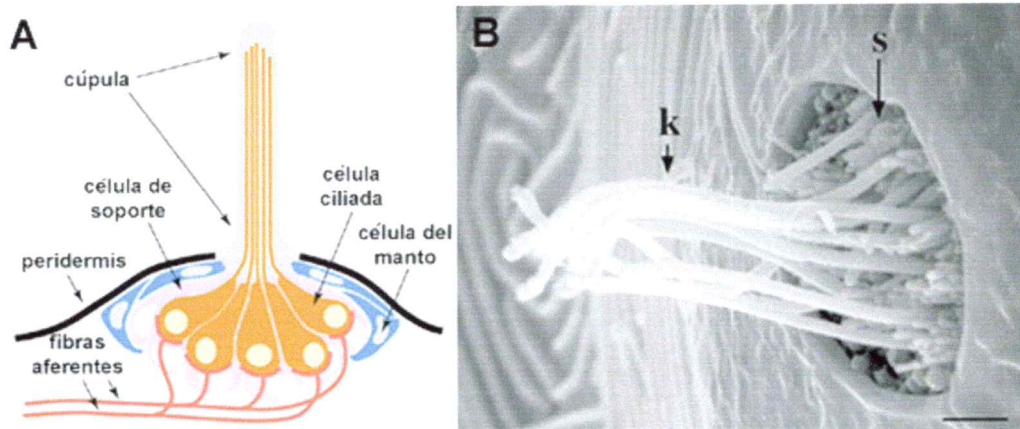


Figura 1. Neuromasto mecano-sensorial de la LL. (A) Sección esquemática de un neuromasto, que muestra los diferentes tipos celulares que lo componen. Las células gliales que envuelven a las fibras aferentes no están representadas, así como tampoco las fibras eferentes. Adaptado de Ghysen y Dambly-Chaudière, 2004. (B) Micrografía electrónica de un neuromasto de pez cebra de 10 días post-fertilización (Williams y Holder, 2000). Los kinocilios (k) y estereocilios (s) pueden ser vistos después de remover la cúpula mediante tratamiento con proteasa. Barra de tamaño: 1,5 μ m.

1.2 Desarrollo embrionario de la LL

1.2.1 Origen de las placodas de la LL

Las placodas¹ son estructuras embrionarias transitorias, esenciales para la formación de los componentes sensoriales del sistema nervioso periférico, que se encuentran en posiciones características, exclusivamente en la cabeza de los vertebrados (Graham y

¹ Las placodas ectodermales o neurogénicas (hipofisial, olfatoria, trigeminal, ótica, de la línea lateral, epibranchial e hipobranchial), corresponden a engrosamientos focales del ectodermo, se localizan laterales a las crestas neurales y fueron descritas inicialmente en anfibios. En pez cebra no ha sido posible identificar estas estructuras anatómicamente, sin embargo se utiliza el mismo término para definir los territorios presuntivos.

Begbie, 2000; Schlosser y Northcutt, 2000, 2001; Baker y Bronner-Fraser, 2001). Dan origen a las neuronas sensoriales (que formarán los ganglios craneales) y en algunos casos a las células receptoras de los sistemas sensoriales. El sistema de la LL se origina a partir de un grupo de placodas presente únicamente en peces y anfibios (placodas dorso-laterales), ubicadas a ambos lados (rostral y caudal) de la vesícula ótica. La placoda pre-ótica dará lugar a la componente anterior (LLA o de la cabeza) y la placoda post-ótica a la componente posterior de la LL (LLP o del tronco y la cola) (Northcutt y cols., 1994; Baker y Bronner-Fraser, 2001). La porción distal (con respecto a la vesícula ótica) de cada placoda migrará (primordio de la LL) y formará los órganos receptores (neuromastos; Figura 1), mientras la parte estática más proximal dará origen a los ganglios de la LL.

Según resultados propios y de otros autores (David y cols., 2002; Kozłowski y cols., 2005) se ha establecido que la formación de las componentes anterior y posterior de la LL difieren en algunos aspectos, no obstante compartir gran parte de los mecanismos involucrados en su desarrollo. En la presente tesis se puso especial énfasis en el desarrollo de la componente posterior de la LL en el embrión del pez cebra, de manera que se proseguirá con su descripción en particular.

1.2.2 Migración del primordio y depósito de los neuromastos de la LL

Antes del comienzo de la migración, el primordio de la LLP contiene aproximadamente 100 células, alrededor de 4-5 células de ancho y 20-25 células de largo (Gompel y cols., 2001; inserto en Figura 2A). Hacia el final de la somitogénesis, aproximadamente a las 20 horas post-fertilización (hpf), este primordio comienza a migrar caudalmente por el tronco del embrión, a lo largo del mioseptum horizontal², siguiendo una ruta estereotipada (Figura 2A). En forma paralela, el ganglio de la LLP, que se encuentra entre la vesícula ótica y el primordio, comienza a extender sus axones hacia el cerebro posterior (proyección central) y hacia el primordio migratorio (proyección periférica), con el que mantiene una estrecha relación a lo largo de todo el trayecto (los conos de crecimiento sensoriales son arrastrados por el primordio; Gilmour y cols., 2004). Durante su migración, el primordio deposita \approx 5 grupos de células indiferenciadas (pro-neuromastos L1-L5) sobre el mioseptum horizontal del tronco del embrión (a intervalos regulares de 5-6 somitos) y se

² Partición del tejido conectivo que se forma entre los miótomos y que separa los cuerpos musculares dorsal y ventral.

divide en 2-3 grupos de células en posiciones más ventrales (pro-neuromastos L6-L8), una vez que ha alcanzado el final de la cola (alrededor de las 40-42 hpf). Cada uno de estos grupos dará origen a un neuromasto completamente diferenciado un par de horas después de su depósito, y luego de 4 horas, ya es posible apreciar morfológicamente el haz de cilios de las células ciliadas, las cuales irán aumentando progresivamente en número en estadios posteriores (Metcalf y cols., 1985; Gompel y cols., 2001). El nervio de la LL, formado por los axones de las neuronas sensoriales que co-migraron junto al primordio y cuyos cuerpos celulares se agrupan en el ganglio, hace conexión sináptica con cada una de estas células ciliadas y sirve a su vez de guía de migración para las células gliales periféricas (derivadas de crestas neurales) asociadas a la LL (Gilmour y cols., 2002). La migración del nervio de la LLP es entonces dependiente de la migración del primordio (no en el caso contrario) así como la migración de las células gliales es dependiente de la migración del nervio (Metcalf, 1985; Gilmour y cols., 2002; Li y cols., 2004). Además, se ha visto que la ausencia de glías asociadas al nervio de la LLP, promueve la desfasiculación y desorganización de sus axones (Gilmour y cols., 2002).

Aproximadamente a las 72 hpf, es posible visualizar en el embrión vivo, mediante una tinción química (DiAsp; Collazo y cols., 1994) la disposición de los neuromastos de la línea lateral posterior ya maduros y funcionales (Figura 2B). En la Figura 2C, utilizando la misma tinción, podemos ver la LL que posee un pez cebra adulto. ¿Cómo se alcanza este complejo patrón de neuromastos?

1.2.3 Desarrollo post-embrionario de la LL

El aumento de complejidad que significa el paso de un estado embrionario a uno adulto, es concomitante al aumento en el número de neuromastos así como a la transformación de un patrón lineal antero-posterior a una disposición tridimensional. Dicha amplificación y modificación de la LL ha sido estudiada por diversos autores en el último tiempo (Ledent, 2002; Sapède y cols., 2002; Ghysen y Dambly-Chaudière, 2005; Grant y cols., 2005; López-Schier y Hudspeth, 2005), los que han evidenciado una compleja interacción entre los diversos tipos celulares que forman el sistema.

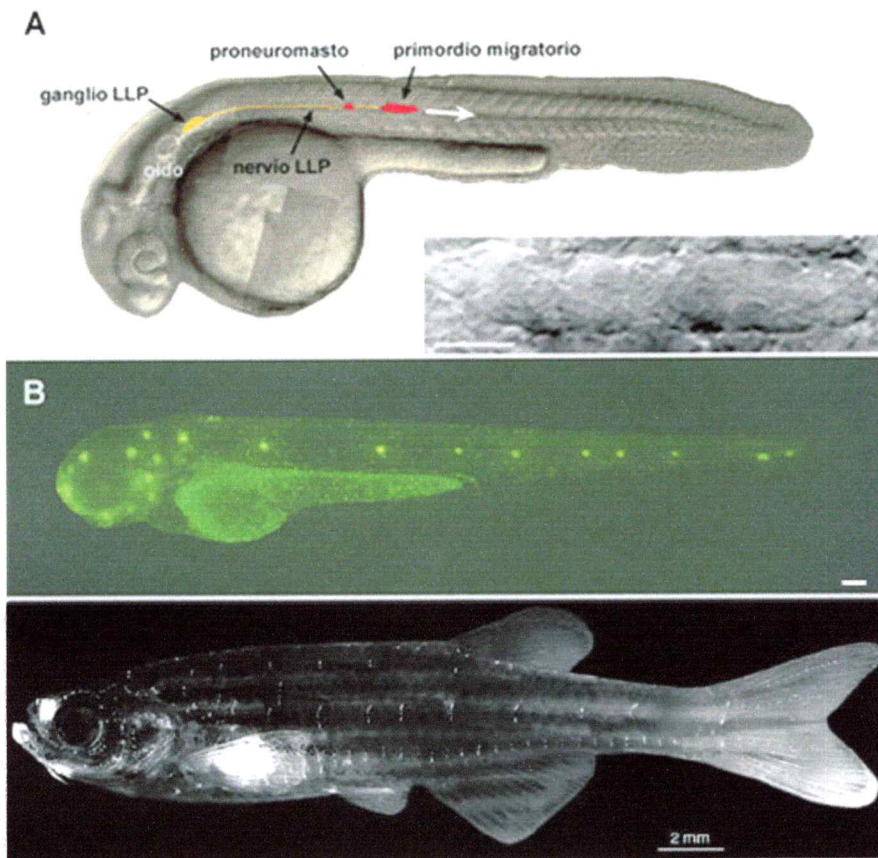


Figura 2. Formación de la LLP. (A) Esquema explicativo (embrión de 30 hpf) de la formación de la LLP. La flecha blanca indica el sentido de migración. Inserto: primordio visto mediante microscopía Nomarski. Patrón de tamaño: 350 μm . (Gompel, 2001). (B,C). Patrón de neuromastos de una larva de 3 dpf (B; Barra tamaño: 50 μm) y un pez adulto (C; Sapède y cols., 2002) teñidos con DiAsp. Todas vistas laterales.

A las 48 hpf, el primordio de la LLP ya dejó tras de sí 7-8 neuromastos y un sendero de células interneuromásticas conectándolos (López-schier y cols., 2004; Grant y cols., 2005). A partir de ese momento, un segundo primordio más pequeño (primordio secundario; primII) comienza a migrar siguiendo la misma trayectoria, depositando 2-3 pro-neuromastos (L1'-L3') sobre la zona más rostral del tronco de la larva, entre los neuromastos L1 y L3 de la línea lateral primaria (Ledent, 2002; Sapède y cols., 2002). Una vez depositados, estos nuevos pro-neuromastos migran ventralmente, arrastrando consigo al sendero de células interneuromásticas dejada por el primordio primario (primI), alejándolo del mioseptum horizontal y por consiguiente del nervio de la LL y sus células gliales asociadas (Ledent, 2002). Coincidente con esto, la línea de interneuromastos comienza a aglomerarse formando grupos de células que formarán nuevos neuromastos (Grant y cols., 2005). ¿Por qué las células interneuromásticas, que fueron tempranamente depositadas, se mantienen

en un estado latente e indiferenciado? Grant, Raible y Piotrowski responsabilizan de esto a las células gliales asociadas al nervio de la LLP:

- Embriones mutantes carentes de glías asociadas al nervio de la LLP (*colorless*, Kelsh y cols., 1996; *hypersensitive*, Whitfield y cols., 1996), muestran un exceso de neuromastos.

- La ausencia de nervio (por ablación con láser o inyección de un antisentido contra *neurogenina 1*; Grant y cols., 2005; López-Schier y Hudspeth, 2005) y por consiguiente de células gliales, provoca la aparición precoz de neuromastos adicionales.

- La inyección de células gliales normales en embriones mutantes (que no forman glías) rescata el fenotipo alterado (Grant y cols., 2005).

Entonces, las células interneuromásticas se mantienen en un estado quiescente mientras permanecen en el mioseptum horizontal, en contacto con las glías. Una vez que son alejadas de ellas (arrastradas por la migración ventral de los neuromastos secundarios), entran en activa proliferación, se aglomeran y cada grupo de células formado entra en un proceso de diferenciación que dará origen a nuevos neuromastos (neuromastos intercalares; Ghysen y Dambly-Chaudière, 2005). De esta manera, entre la primera y tercera semana post-fertilización, el pez cebra cuenta con 1 neuromasto en cada límite entre somitos, esto es, más de 30 neuromastos a cada lado de la larva.

1.3 Genes involucrados

En el último tiempo, diversos autores (e.g. Metscher y cols., 1997; Sahly y cols., 1999; Jeffery y cols., 2000; Itoh y Chitnis, 2001; Andermann y cols., 2002; David y cols., 2002) han ido correlacionando los diferentes procesos que acompañan la formación de la LL (establecimiento placodal, migración, crecimiento del cono axonal, depósito, establecimiento de patrones, diferenciación, etc.) con la expresión y función de distintos genes. Las bases moleculares que subyacen estos procesos parecen ser similares a las encontradas en otros sistemas, lo que sumado a la accesibilidad de la LL en el embrión de pez cebra³, han hecho de este sistema sensorial un excelente modelo de estudio y es por eso que ha sido elegido para realizar esta tesis. A continuación se comentarán las evidencias moleculares

³ Otras ventajas que presenta el pez cebra son: desarrollo externo y rápido, alto número de embriones por cruce, transparencia de sus embriones, una amplia colección de mutantes y la posibilidad de generar líneas transgénicas.

involucradas en las etapas principales del desarrollo de la LL, que sirvieron posteriormente para fundamentar la hipótesis propuesta (ver más adelante).

1.3.1 Especificación de las placodas de la LL

Temprano en el desarrollo, las placodas comienzan a formarse a partir de un área conocida como ectodermo pre-placodal. Existen evidencias morfológicas y moleculares que avalan la existencia de este dominio al borde de la placa neural cranial, del cual derivan todas las placodas ectodermales, incluyendo la de la LL (Baker y Bronner-Fraser, 2001; Brugmann y Moody, 2005). Este territorio ha sido encontrado en *Rana* (Baker y Bronner-Fraser, 2001), no obstante estudios en *Xenopus*, mediante análisis morfológico y la expresión de genes involucrados en regulación neurogénica, como *neurogenina 1*, *neuroD*, *MyT1* (factor de transcripción mielina 1) y *Delta1*, no dieron cuenta de un territorio placodal común (Schlosser y Northcutt, 2000). En peces, los genes *dlx3* y *dlx7* se expresan en estadios tempranos del desarrollo en la línea de células que formará el futuro borde de la placa neural y posteriormente su expresión se restringe a las placodas olfatoria y ótica y al ganglio trigémino (Akimenko y cols., 1994). Los factores de transcripción *six4.1* y *eya1*, se expresan en un dominio con forma de herradura característicamente pre-placodal, que se restringe progresivamente a las placodas olfatoria, hipofisial, ótica y de la LL (Kobayashi y cols., 2000; Sahly y cols., 1999).

Si presumimos la existencia de un dominio pre-placodal, el primer paso en el proceso de inducción será definir este territorio. Los primeros estudios de los procesos inductivos que subyacen la formación de las placodas se hicieron en las placodas olfatoria y ótica y sugieren que comparten características en común. Ambos territorios, por ejemplo, requieren para su inducción, de señales provenientes del mesodermo, endodermo y sistema nervioso central (Mendonsa y Riley, 1999; Graham y Begbie, 2000). Sin embargo, al estudiar las demás placodas, se ha encontrado que a pesar de compartir territorios inductivos e incluso las mismas señales, los tiempos en que cada tejido es competente a dicha señal son diferentes y al parecer, cada placoda o grupo de placodas actúa como un módulo independiente.

Con respecto a la LL, poco se sabe acerca de los territorios y moléculas señalizadoras involucradas en la inducción placodal. Por ejemplo en axolotl, se determinó mediante transplantes isocrónicos, que las placodas de la LL son definidas durante el

estadio de pliegue neural tardío (neurulación), pero no se mencionan los posibles genes involucrados (Schlosser y Northcutt, 2001). En lo que concierne a la expresión de genes en el territorio placodal mismo, se conocen algunos ya mencionados anteriormente (*dlx3*, *six4.1* y *eya1*) y otros, como *msx2*, *hoxb3* (Metscher y cols., 1997), *dachshundB* (Hammond y cols., 2002) y *nkx5.1* (Adamska y cols., 2000). Al analizar el mutante de *eya1* en pez cebra (*dog-eared*, Whitfield y cols., 1996; Kozłowski y cols., 2005), no se encontraron defectos evidentes en la formación temprana de la LL, salvo un aumento en la apoptosis de las células del primordio migratorio y la consiguiente disminución de las células que forman los neuromastos. Sin embargo, los autores no realizaron un análisis exhaustivo de los territorios placodales, por lo que no se puede descartar un efecto a nivel placodal, aunque es posible que *eya1* actúe en paralelo a otros genes en el establecimiento de las placodas de la LL y su ausencia sea rescatada por estos genes. En pez cebra, los factores de transcripción *dlx3*, *six4.1* y *eya1* se expresan, hacia el final de la gastrulación, en una banda con forma de herradura, que rodea la placa neural anterior y que corresponde a las células que formarán las placodas craneales. Durante la somitogénesis, *six4.1* restringe su expresión a las placodas olfatoria, ótica y de la LL y en estadios posteriores mantiene esta expresión en los neuromastos de la LL anterior y posterior. El gen *eya1*, mantiene su expresión durante todo el desarrollo en todas las componentes de la LL, incluidas las placodas, primordio migratorio, todos los tipos celulares del neuromasto y además en las células ganglionares.

1.4.2 Migración del primordio y depósito de los neuromastos

Lo más sorprendente e inusual del desarrollo de la LL es que la distribución de neuromastos sobre la superficie del cuerpo de peces y anfibios es producto del depósito de pequeños grupos de células por parte de un primordio que migra siguiendo una ruta estereotipada. Este depósito es producto de un proceso de partición intrínseco del primordio (Gompel y cols., 2001; Itoh y Chitnis, 2001) y parece depender de la activación de genes proneurales y neurogénicos de una manera que recuerda la formación de los órganos mecano-sensoriales en insectos (Itoh y Chitnis, 2001; Ghysen, 2003). Una vez que el futuro neuromasto ya está definido a través de la expresión local de estos genes, se escinde del primordio, y eventualmente se detiene y se diferencia (Gompel y cols., 2001). Resulta probable entonces, que la migración del primordio así como el depósito de los neuromastos dependa de la regulación positiva y/o negativa de los genes proneurales y neurogénicos

sobre diversos genes que codifican proteínas involucradas en migración y adhesión celular. Como en el caso de *cxcr4b* (Chong y cols., 2001), un receptor de quimioquinas expresado en el primordio de la LLP, que es regulado negativamente en el proneuromasto al momento de ser depositado (David y cols., 2002). La migración del primordio es completamente dependiente de la interacción de la proteína CXCR4b y su ligando, SDF1a (factor derivado del estroma 1a), este último expresado en el mioseptum horizontal, o sea, a lo largo de todo el trayecto que sigue el primordio (David y cols., 2002). Si analizamos más en detalle el patrón de expresión de *cxcr4b* en el primordio, encontramos que no es homogéneo a lo largo del eje antero-posterior, sino más bien polarizada hacia el borde líder (caudal con respecto al embrión), lo que se correlaciona con su papel en la migración de las células del primordio.

Existe otro gen de expresión polarizada dentro del primordio que se contrapone a la de *cxcr4b*, pues aumenta en el grupo de células del borde posterior del primordio que se disponen a detenerse y ser depositadas, mientras se mantiene baja en las del borde líder (Gompel, 2001). Este gen es *tacstd 2* (también conocido como *m1s1* ó *trop2*), y codifica para una putativa glicoproteína de superficie celular transductora de señales de calcio. Además de su expresión heterogénea dentro del primordio, *tacstd 2* no se expresa en las células centrales del neuromasto recién depositado (futuras células ciliadas en el neuromasto maduro), formando un anillo de expresión en las prospectivas células accesorias. Cuando embriones son inyectados con el morfolino de *tacstd 2*, el primordio de la LLP no presenta problemas de migración, sin embargo recorre el mioseptum horizontal hasta alcanzar la punta de la cola sin depositar neuromastos (A. Ghysen, comunicación personal).

Los patrones de expresión de los genes antes mencionados, así como los experimentos de pérdida de función, parecen prefigurar la formación del neuromasto antes de su depósito he incluso evidencian identidades celulares ya dentro del primordio. Esta pre-partición del primordio, así como la maduración en gradiente de los neuromastos por depositarse, señalan una intensa actividad de determinación y diferenciación celular, horas antes del depósito. Los genes típicamente involucrados en estos procesos (proneurales y neurogénicos), también presentan patrones de expresión heterogéneos dentro del primordio, siendo aún más claros y consistentes. La restricción progresiva en la expresión de estos genes, se correlaciona directamente con la selección de los tipos celulares que formarán el neuromasto maduro (Itoh y Chitnis, 2001). Como se mencionó al comienzo de este capítulo, estos genes además parecen estar relacionados con la activación de aquellos involucrados

en la migración y depósito de los neuromastos. Es posible entonces, que la aparición en escena de los genes proneurales y neurogénicos, sea clave para cada uno de estos procesos y de ellos dependa una correcta migración, el depósito de neuromastos y la especificación y diferenciación de los tipos celulares que lo conforman.

1.3.3 Genes proneurales y neurogénicos involucrados en la formación de la LL

Durante el desarrollo embrionario, antes de la selección de los precursores neuronales y de cualquier signo aparente de diferenciación neural, se expresan en el ectodermo un grupo de genes que codifican para factores de transcripción del tipo bHLH⁴ llamados proneurales, debido a que promueven la diferenciación de estos precursores y son esenciales para la diferenciación del sistema nervioso central y periférico (Ghysen y Dambly-Chaudière, 1988; Romani y cols., 1989). Se pueden agrupar en dos categorías en función del momento de la expresión de estos genes y de su sensibilidad a la inhibición lateral. Existen, entonces, los factores de determinación de destino neural (considerados factores verdaderamente “proneurales”) y los de diferenciación neural (Lee y cols., 1995; Lee, 1997).

Tan sólo tres artículos hacen mención de la participación de este tipo de genes en la formación de la LL (Itoh y Chitnis, 2001; Andermann y cols., 2002; Laguerre y cols., 2005). Sólo uno de estos había sido publicado al momento de presentar el proyecto de tesis. Motoyuki Itoh y Ajay Chitnis (2001) compararon la expresión del homólogo de *Math1* en el pez cebra, *ath1* (también llamado *zath1*) y los genes neurogénicos *deltaA*, *deltaB* y *notch3* en los neuromastos y primordio de la LLP de embriones silvestres y mutantes *mindbomb* (*mib*; Jiang y cols., 1996; Schier y cols., 1996). Los autores correlacionaron la restricción progresiva de la expresión de estos genes en el primordio migratorio, con la selección del destino de célula ciliada en el neuromasto maduro (Figura 3). La expresión de *ath1* en una o más células centrales del neuromasto depositado, antes de que las células ciliadas puedan ser identificadas con el anticuerpo anti- α tubulina acetilada (Bang y cols., 2001), sugiere su participación en la selección de este destino celular. La expresión de *notch3* en todo el neuromasto, siendo más tenue en las células centrales que formarán las células ciliadas, pone en evidencia la posible participación del proceso de inhibición lateral en la segregación

⁴ bHLH (basic Helix-Loop-Helix): Dominio básico-hélice-vuelta-hélice. Motivo estructural presente en muchos factores de transcripción caracterizado por 2 α -hélices separadas por una vuelta. Las hélices median la dimerización y el dominio básico la unión al DNA.

de los destinos celulares. La expresión de los genes *deltaA* y *deltaB* en las mismas células centrales que expresan *ath1* parece confirmar la hipótesis planteada.

El análisis de la expresión de estos genes en embriones mutantes *mib*, permitió a los autores apoyar sus presunciones. Estos mutantes presentan problemas en el proceso de inhibición lateral mediada por Notch. *Mindbomb* es una ubiquitin-ligasa que interactúa con el dominio intracelular de Delta, promoviendo su ubiquitinación e internalización. Cuando Notch y Delta interactúan, Delta es endocitado junto al dominio extracelular de Notch, liberando así el fragmento intracelular en la célula vecina, que activa genes blanco, promoviendo la adopción de un destino celular diferente al de la célula señalizadora (Itoh y cols., 2003). En *mib*, Delta no es endocitado, impidiendo así la activación de Notch en la célula vecina, con lo cual todas las células adoptan el mismo destino celular. Los patrones de expresión encontrados por Itoh y Chitnis (2001), se correlacionan con este fenotipo. El mayor número de células del neuromasto que expresan *ath1*, *deltaA* y *deltaB* en los embriones mutantes se corresponde con un mayor número de células marcadas con tubulina acetilada, de manera similar a lo previamente descrito en oído. El menor número de células marcadas con *notch3* sin embargo, no fue correlacionado con un marcador de células de soporte. De esta manera, se estableció que *ath1* estaría involucrado en la determinación del destino de célula ciliada en la LL y sería la vía de señalización Notch-Delta la que mediaría la restricción a unas pocas células dentro del neuromasto.

En base al trabajo de Itoh y Chitnis (2001), a los antecedentes antes expuestos y al patrón de expresión de los genes *ngn1* y *neuroD* obtenidos (ver capítulo 5.1 Expresión de los genes proneurales *neurogenina 1*, *neuroD* y homólogo de *atonal 1* en la línea lateral del pez cebra), propuse en mi proyecto de tesis, que la identidad celular neuronal sería alcanzada a nivel de la placoda y que la completa adquisición de las identidades celulares podría gatillar la expresión de genes involucrados en la capacidad migratoria del primordio. Sin embargo, rápidamente mi atención al estudiar el establecimiento de las identidades celulares, pasó de las placodas al primordio migratorio, e incluso al mismo neuromasto, principalmente en función de dos hechos:

En un intento por definir otros genes proneurales involucrados en la determinación y diferenciación celular en el sistema de la LL, busqué determinar si los genes *neurogenina1*, *neuroD* y los homólogos de *achaete-scute 1a* y *1b*, estaban involucrados en estos procesos. Para ello realicé experimentos de pérdida de función, mediante la inyección de oligonucleótidos antisentido (morfolinos) en embriones de pez cebra en estadio de 1 célula.

A las 72 hpf, los embriones inyectados fueron tratados con la tinción vital DiAsp y luego visualizados por microscopía de fluorescencia. Se analizó así, el efecto de la pérdida de función sobre el patrón de neuromastos funcionales en el embrión vivo. De esta manera se encontró que los embriones inyectados con el morfolino de *neuroD* presentaban una menor cantidad de neuromastos funcionales al compararlos con embriones control. Al analizar más en detalle estos embriones se determinó que la ausencia de función de *neuroD* no afecta la formación de la placoda, la migración del primordio ni el depósito de los neuromastos, sino al parecer la diferenciación de las células ciliadas en el neuromasto ya depositado.

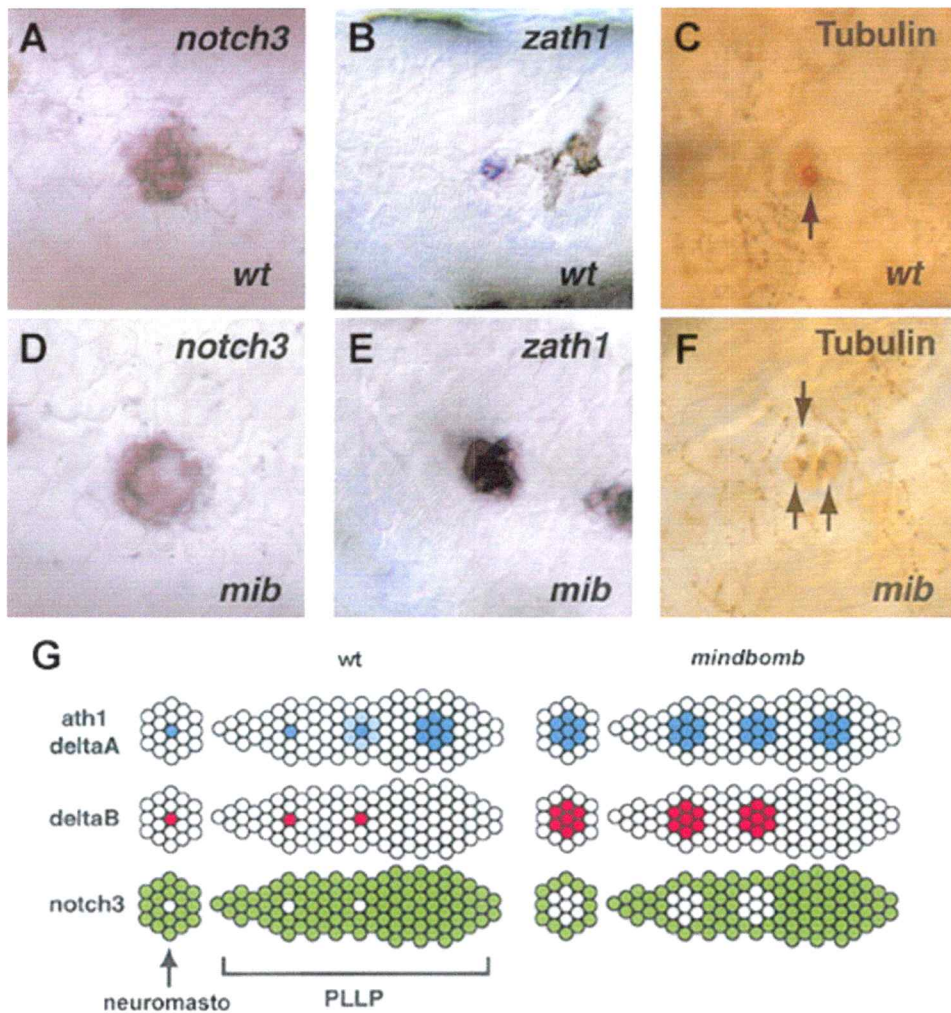


Figura 3. (ver leyenda en la página siguiente)

Figura 3. Expresión de genes proneurales y neurogénicos en la LLP. Neuromastos de embriones wt (A-C) y mutantes *mib* (D-F) de 36 hpf. En *mib*, la menor expresión de *notch3* en el centro del neuromasto (D) se correlaciona con una mayor expresión de *ath1* (E). La comparación entre la expresión de *ath1* (B, E) y tubulina acetilada (Tubulin; flechas) (C, F) parece indicar que la expresión de *ath1* identifica las futuras células ciliadas. (G) Esquema que representa la restricción de la expresión en el primordio de la LLP (PLL) en embriones wt y *mib*. (Itoh y Chitnis, 2001). Nota: Las fotos originales carecen de barra de escala. Todas vistas laterales. Anterior a la derecha.

El año 2002, Peter Andermann, Josette Ungos y David Raible establecieron, mediante experimentos de ausencia de función (morfolinos), que a diferencia de lo encontrado en el resto de los vertebrados, en el pez cebra, *neurogenina1* definía todos los precursores de los ganglios craneales. Encontraron, además, que la expresión de *ngn1* en las placodas prefigura la de *neuroD* en las mismas estructuras. En la LL, "embriones morfantes" para *ngn1* carecen del ganglio de la LL anterior y posterior. Sin embargo, la formación de los neuromastos no se ve afectada, a pesar de no estar inervados. Esto sugiere que los dos derivados de las placodas de la LL, ganglio y primordio migratorio, están regulados en forma separada. Posiblemente entonces, la expresión temprana de *ngn1* y *neuroD* en las placodas de la LL, indica un proceso de determinación y diferenciación celular en la componente ganglionar del sistema y no en la fracción placodal que da lugar al primordio migratorio y por ende a los neuromastos.

Debido a estos antecedentes, la diferenciación de las células ciliadas, a nivel de primordio y neuromasto, pasó a ser el tema principal de esta tesis y *neuroD*, el gen en estudio y posible encargado de este proceso. No obstante esto, el interés por encontrar un gen de actividad proneural involucrado en la formación del sistema de la LL seguía en pie, ya que posiblemente este gen estaría regulando la selección del destino de célula ciliada a través de *neuroD*. En virtud de antecedentes encontrados en otros sistemas, *ngn1* debería haber sido el gen de actividad proneural río arriba de *neuroD*. Sin embargo, su ausencia de expresión en el primordio y neuromastos, así como el hecho que embriones inyectados con el morfolino para *ngn1* no presentan problemas en la formación de la componente no ganglionar de la LL, descartaron su actividad reguladora sobre *neuroD* en la formación de las células ciliadas de los neuromastos.

Basándonos nuevamente en los resultados de Itoh y Chitnis (2001) y apoyándonos posteriormente en lo obtenido por Laguerre y colaboradores (2005), el candidato elegido para esta función fue *ath1*. Mediante la inyección del morfolino contra este gen, sobre-expresión y experimentos de rescate, establecimos una posible jerarquía de regulación en el establecimiento de la identidad de célula ciliada en la LL.

Laurent Laguerre y colaboradores (2005), del laboratorio de Christine Dambly-Chaudière, investigaron la relación entre migración y proliferación celular en el desarrollo de la LL del pez cebra. Mediante la incorporación de bromodeoxiuridina (BrdU) estudiaron la replicación del DNA en diferentes etapas de la formación de la LL posterior. El patrón de incorporación de BrdU en el borde líder del primordio en migración mostró un conjunto de células marcadas rodeando grupos de 2 a 4 células no marcadas. Esta disposición anular de las células en replicación se asemeja mucho a lo descrito por Itoh y Chitnis (2001) con respecto a los genes proneurales y neurogénicos, por lo que los autores realizaron una doble marcación BrdU-*ath1*, encontrando que la expresión de *ath1* se restringía a las células del primordio mitóticamente inactivas. En el borde posterior, por otro lado, se encontró un descenso en la incorporación de BrdU, indicando que las células que se preparan a ser depositadas entran en un período de quiescencia replicativa, quizás hasta que el neuromasto esté completamente diferenciado. Posterior a esta fase mitóticamente inactiva, nuevos períodos replicativos se observan en las células de soporte más cercanas a las células ciliadas, consistente con la idea de que la muerte de estas últimas, gatilla la proliferación de las células de soporte (Williams y Holder, 2000).

De esta manera, los esfuerzos se centraron en establecer una posible jerarquía regulatoria entre *ath1* y *neuroD*, en la adopción del destino de célula ciliada en la LL del pez cebra.

II. HIPÓTESIS

“Las células nerviosas que formarán el sistema de la LL posterior en pez cebra, alcanzan su especificación de destino celular en el territorio placodal, antes del establecimiento del primordio y esto es necesario para la adquisición de la capacidad migratoria del sistema “

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Analizar la expresión y función de los genes involucrados en la especificación de las células nerviosas que formarán el sistema de la LL posterior del embrión del pez cebra.

3.2 Objetivos específicos

1. Realizar un análisis espacio-temporal microscópico, de la expresión de los siguientes genes:

(a). *neuroD*

(b). *neurogenina1*

(c). *homólogo de atonal 1*

en la formación de la LL posterior de pez cebra.

2. Analizar los genes que presenten una relación entre su expresión y la definición de territorios a nivel placodal y primordial, mediante la sobre-expresión (inyección de mRNA) y la inhibición de la expresión (inyección de oligonucleótidos antisentido o Morfolinos) de los genes que presenten mayor relevancia en el estudio.

3. Establecer una posible relación entre los genes involucrados en el establecimiento de la identidad celular de la LL posterior en formación y la inducción de la migración del primordio.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Materiales

Anticuerpos:

Anti α Tubulina Acetilada (Sigma, USA)
Anti *c-myc* 9E10 (Santa Cruz Biotechnology, USA)
Anti Digoxigenina (Roche Diagnostics, Alemania)
Anti HuC (Invitrogen, USA)
Anti IgG de Ratón (Amersham Pharmacia Biotech, Inglaterra)

Bacterias *Escherichia coli* DH5 α competentes (Clontech). Los plásmidos utilizados en esta tesis se amplificaron previa transformación con golpe de calor en estas bacterias.

Enzimas de restricción y tampón respectivo (Fermentas):

*Bam*H I, *Cla* I, *Eco*R I, *Kpn* I, *Not* I

Peces y embriones de pez cebra (*Danio rerio*) fueron mantenidos a 28° C. Los embriones fueron obtenidos mediante cruces espontáneos de cepas silvestres, transgénicas o mutantes de peces adultos.

Líneas transgénicas:

ET4 (Dr. Vladimir Korzh, IMCB, Singapur)
ET20 (Dr. Vladimir Korzh, IMCB, Singapur)
FoxD3-GFP (Dr. Darren Gilmour, Tübingen, Alemania)
HuC-GFP (Dr. Ajay Chitnis, NIH, Bethesda)

Líneas mutantes:

mindbomb (*mib*; Dr. Ajay Chitnis, NIH, Bethesda)

Plásmidos:

pBluescript II SK +/- (Fermentas)
pGEM (T-easy-vector; Promega, USA)
pCS2+MT (Fermentas)

4.1.1 Reactivos para Biología Molecular y otros

- Acetato de sodio 3M, pH 5,2 (Winkler, Chile)
- Acetona (Merck, Alemania)
- Ácido maleico (Winkler, Chile)
- Agua sin nucleasas (Winkler, Chile)
- Cloruro de calcio (Merck, Alemania)
- Cloruro de litio (Merck, Alemania)
- Cloruro de potasio (Merck, Alemania)
- Cloruro de sodio (Winkler, Chile)
- Columnas de purificación BD.Chroma Spin-100 (Clontech)
- Diaminobencidina (DAB; Sigma, USA)
- DiAsp (Yoduro de 4-(4-dietilaminoestiril)-N-metilpridinio; Sigma, USA)
- Dil. (Perclorato de 1,1'-dioctadecil- 3, 3, 3', 3'-tetrametilindocarbocianina; Molecular Probes, USA)
- Dimetilsulfóxido (DMSO; Winkler, Chile)
- DNA ligasa T₄ (New England Biolabs, USA)
- DNA polimerasa Taq (GibcoBRL, Inglaterra)
- DNAsa (Boehringer Mannheim, Alemania)
- DTT (ditiotreitól; Winkler, Chile)
- EDTA (Winkler, Chile)
- Feniltiúrea (feniltiocarbamida; Sigma, USA)
- Formamida (Merck, Alemania)
- H₂O₂ (Merck, Alemania)
- HEPES (Sigma, USA)
- Marcador de peso molecular de 1kb (Fermentas)
- Metanol (Merck, Alemania)
- NBT / BCIP (nitro blue tetrazolium chloride / 5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl phosphate; Boehringer Mannheim, Alemania)
- Oligonucleótidos:
- | | | | |
|----|------------------------------|----|--------------------------------|
| 5' | CTAGGGATCCGACATGACGAAGTCATAC | 3' | (F1 <i>BamHI</i> <i>nrđ</i>) |
| 5' | AGGATCGATAGTCTCGTGAATATCGC | 3' | (R1 <i>Clal</i> <i>nrđ</i>) |
| 5' | CCGTCCTGGATCCATAGCCAC | 3' | (F1 <i>BamHI</i> <i>ath1</i>) |

5' GTATCGATCGCACTTCAGTGAGG 3' (R1 *Clal* *ath1*)
 5' TGACTTCGT**CAT**GTCCGGAAGTCTAG 3' (*nrd* MO)
 5' TCTGTTGGTTTGTGCTTTTGGGAGG 3' (*ath1* MO)
 5' CCATCTTGGCGGTGATGTC**CAT**TTC 3' (*ash1a* MO)
 5' TATACGATCT**CAT**TGTTGATAACC 3' (*ngn1* MO)

MO: Morfolino (Gene Tools; Philomath, Oregon)

Paraformaldehido (PFA; J. T. Baker, USA)

PBS (Tampón fosfato; Winkler, Chile)

Proteinasa K (GibcoBRL, Inglaterra)

Reactivo de bloqueo (BMB; Boehringer Mannheim, Alemania)

RNA de tóruia (Sigma, USA)

RNA polimerasa SP6, T3 y T7 (Fermentas)

RNAasa (Boehringer Mannheim, Alemania)

Suero de oveja inactivado (Sigma, USA)

Sustrato quimioluminiscente Supersignal West Pico (Pierce, IL, USA)

Tampón de transcripción (Roche, Alemania)

Tween 20 (Monolaurato de poli-oxietilen-sorbitan; Sigma; USA)

4.1.2 Soluciones

MAB (ácido maleico 100mM; NaCl 150mM; Tween 20 0,1%; pH 7,5)

MAB / BMB / LS (MAB + reactivo de bloqueo 2% + suero de oveja inactivado 20%)

MABT (MAB + Tween 20 0,1%)

Medio de peces (solución E3) (NaCl 5mM; KCl 0,17mM; CaCl₂ 0,13mM; MgSO₄ 0,33mM; azul de metileno 10⁻⁵ %)

Mezcla NTP digoxigenina (ATP, GTP, CTP 2,5mM; UTP 1,625mM; UTP-dig. 0,875mM)

PBST (PBS + Tween 20 0,1%)

Ringers (116mM NaCl; 2,9mM KCl; 1,8mM CaCl₂; 5mM HEPES; pH 7,2)

Ringers + (Ringers; 0,1mM EDTA; 0,3mM PMSF)

Sample buffer (0,63ml Tris 1M pH 6,8; 1ml glicerol 100%; 0,5ml β-mercapto-etanol; 1,75ml SDS 20%; 20μl PMSF 100mM, para 10 ml)

Solución AP (MgCl₂ 50mM; NaCl 100mM; Tris 100mM; Tween 20 0,2%; pH 9,5)

Solución de bloqueo inmunocitoquímica (suero de oveja 20%; DMSO 1% en PBST)

Solución de hibridación *in situ* (SSC 5X; heparina 50µg/ml; RNA de tórula 500µg/ml; formamida 50%; Tween 20 0,1%)

Solución peroxidasa de marcación para inmunocitoquímica (DAB 0,03% en PBS)
SSC 20X (175,3g NaCl; 88,2g citrato de sodio; pH 7 en 1 litro de agua destilada)

4.2 Métodos

4.2.1 Mantención de los peces y recolección de embriones

Los peces son mantenidos a 28° C en un ciclo de 14 horas luz, 10 horas oscuridad. Para la obtención de embriones, se seleccionaron cada vez un número similar de hembras y machos y se mantuvieron separados durante la noche. Al día siguiente, al momento de dar la luz, se juntaron hembras con machos y se dejaron en una cubeta con agua fresca, que contiene un inserto enrejado que permite pasar los huevos al fondo de la cubeta y así poder recolectar los huevos sin la posibilidad de que los peces se los coman. Una vez recolectados los huevos se traspasaron a Solución E3 1X y se utilizaron para microinyección o se dejaron en una estufa a 28° C para su crecimiento. Después de las 24 hpf, en algunas ocasiones, los embriones fueron mantenidos en feniltiúrea 0,03% para prevenir la formación de pigmentos (Westerfield, 1994).

Los embriones utilizados para hibridación *in situ* e inmunocitoquímica, fueron decorionados, clasificados por su estadio, según Kimmel y cols. (1995), y fijados en PFA 4% a 4°C, durante toda la noche. Al día siguiente se lavaron tres veces por 5 minutos con PBS y se deshidrataron agregándoles metanol 100% e incubándolos por 10 minutos a temperatura ambiente y luego 1 hora a -20°C. Luego de esto, los embriones fueron utilizados inmediatamente o almacenados a -20°C.

4.2.2 Microinyección de embriones

Para micro-inyectar embriones de pez cebra se utilizó una placa de Petri de plástico como soporte, en donde se colocó un portaobjetos de vidrio. Se depositaron los huevos recién fecundados sobre la placa, exactamente en el borde del portaobjetos, de manera que formaran filas paralelas al portaobjetos. Se retiró el exceso de agua a fin de que los huevos se adhirieran a la superficie por tensión superficial. Luego fueron instalados en una lupa de disección y microinyectados con 5 a 10 nL de una solución que contenía RNA, DNA y/o un oligonucleótido antisentido (Morfolino), usando para esto un inyector de presión de nitrógeno (Narishige).

4.2.3 Síntesis de sondas e hibridación *in situ* en embrión completo

Para la síntesis de sondas de RNA marcadas con digoxigenina, se incubó 1 µg de DNA digerido con la enzima de restricción correspondiente a 37 °C (ver Tabla 1) en las siguientes condiciones:

Tampón de transcripción	2 µl
RNA polimerasa (T3, T7 ó SP6)	2 µl
Mezcla NTP digoxigenina	8 µl
DTT 0,1 M	1 µl
DNA digerido (linearizado)	1 µg
H ₂ O libre de RNAsas	hasta completar 20 µl

Luego de incubar toda la noche se agregó 2 µl de DNAsa y se incubó por 30 minutos más. Posteriormente se añadió 30 µl de H₂O libre de RNAsas y se precipitó la mezcla agregando 2 µl de LiCl 10 M y 200 µl de etanol al 100% dejando a -20 °C toda la noche. Luego se centrifugó a 14.000 rpm por 30 minutos y el precipitado se lavó con etanol al 70%. Posterior a esto se resuspendió el precipitado en 50 µl de H₂O libre de RNAsas y se diluyó en 950 µl de tampón de hibridación.

La información relativa a la preparación de cada sonda se resume en la siguiente tabla:

Sonda:	vector	enzima	Polimerasa	referencia
ath1	pBluescript SK	BamHI	T7	Kim y cols., 1997
claudinB	desconocido	BamHI	T7	Kollmar y cols., 2001
eya1	desconocido	EcoRI	T7	Sahly y cols., 1999
neuroD	pBluescript SK	NotI	T3	Korzh y cols., 1998
ngn1	pCS2MT	BamHI	T7	Korzh y cols., 1998

Tabla 1. Sondas utilizadas para hibridación *in situ*. Se señala en cada caso la enzima de restricción y RNA polimerasa utilizadas, además del vector de clonamiento.

Para la hibridación *in situ* los embriones fijados fueron rehidratados mediante lavados sucesivos de 5 minutos con metanol 75%, 50% y 25% (en PBS), respectivamente, seguido de 3 lavados de 5 minutos con PBST. A continuación, los embriones se permeabilizaron incubándolos 10 minutos con una solución de proteinasa K 10 µg/ml en PBS. Luego se lavaron 2 veces con PBST y se refijaron en PFA al 4% durante 20 minutos. Se lavaron nuevamente en PBST 5 veces por 5 minutos cada una, para luego prehibridar los embriones entre 57°C y 65°C en solución de hibridación, por 4 horas, luego de un lavado corto de 10 minutos en la misma solución. Posteriormente se agregó la sonda y se incubaron durante toda la noche a la misma temperatura.

Al comienzo del segundo día se recuperó la sonda y se guardó a -20°C. Los embriones fueron lavados de la sonda con formamida al 50% y 25% en SSC 2X por 10 minutos cada vez, luego 30 minutos con SSC 2X y 2 veces de 30 minutos con SSC 0,2X, todo a la misma temperatura de hibridación. A continuación los embriones fueron incubados a temperatura ambiente en MAB durante 5 minutos, y en MAB+BMB+LS durante 4 horas. En forma paralela se bloqueó el anticuerpo anti digoxigenina (1:1000), incubándolo en la misma solución. Pasadas las 4 horas, se agregó el anticuerpo a los embriones y se dejó incubar por toda la noche, a 4°C.

Al tercer día, a fin de eliminar el anticuerpo libre, los embriones se lavaron en MABT 5 veces por 20 minutos. Luego se equilibraron en solución AP durante 5 minutos por 3 veces. A continuación se les agregó una solución de NBT/BCIP (sustratos de la fosfatasa alcalina que en una reacción de óxido-reducción dan como producto un precipitado azul/morado) diluida en solución AP y se incubaron a temperatura ambiente y en oscuridad, hasta la aparición del precipitado azul. Posteriormente se lavaron con PBS 3 veces por 5 minutos y si

la cantidad de tinción basal resultó muy alta se incubaron por 10 minutos en metanol 100%. Los embriones ya teñidos se pasaron a glicerol mediante incubaciones sucesivas a concentraciones crecientes de glicerol en PBS.

4.2.4 Inmunoquímica en embrión completo

Embriones fijados fueron lavados 3 veces por 5 minutos en PBS y 1 hora en agua destilada, incubados por 7 minutos en acetona fría, lavados 2 veces por 5 minutos en PBST y transferidos a solución de bloqueo por 1 hora. Luego, los embriones fueron incubados toda la noche a 4°C con el anticuerpo correspondiente diluido en solución de bloqueo (1:1000). A continuación se lavaron 4 veces por 25 minutos en PBST, se incubaron 30 minutos en solución de bloqueo y toda la noche a 4°C con el anticuerpo anti Ig de ratón diluido en solución de bloqueo (1:200). Posteriormente se lavaron 4 veces por 20 minutos en PBST y fueron transferidos a solución peroxidasa de marcación por 30 minutos y luego a solución de marcación 0,003% H₂O₂. Después que fue detectado el producto de la reacción de la peroxidasa, los embriones fueron lavados 3 veces en PBS y transferidos a glicerol.

4.2.5 Construcción de vectores de expresión y morfolinós

Para generar los constructos de fusión *neuroD*- y *ath1*-myc, utilizamos el cDNA completo de cada uno como templado para la reacción de PCR. Los partidores usados contienen un sitio *Bam*HI (partidor río-arriba que contiene el ATG) y un sitio *Cl*al (partidor río-abajo que carece el codón de término) y sus secuencias aparecen en el capítulo Materiales. Estos productos de PCR fueron clonados en un vector pGEM por clonamiento TA, digeridos con *Bam*HI y *Cl*al, y subclonados en el vector de expresión pCS2MT, generando los constructos pCS2*neuroDMT* y pCS2*ath1MT*.

El morfolino de *neurogenina1* fue cedido por el Dr. Robert Cornell (Cornell y Eisen, 2002). Los morfolinós de *neuroD*, *ath1*, *ash1a* y *ash1b* fueron sintetizados por Gene Tools. Todos los morfolinós fueron dirigidos contra la región 5' del cDNA.

8,5 ng de morfolino fueron inyectados en cada cigoto. En los experimentos de rescate, se co-inyectaron 4,25 ng de morfolino con 125 pg del plasmido de expresión.

4.2.6 Marcación de células y microscopía

Las células ciliadas de los neuromastos fueron marcadas en embriones vivos con DiAsp (Yoduro de 4-(4-dietilaminoestiril)-N-metilpiridinio; Sigma, USA) como se describe en Collazo y cols. (1994). Larvas de 48-72 hpf fueron incubadas en solución E3 1X 5 mM en DiAsp por 5 minutos y luego lavados varias veces con medio fresco y visualizados bajo luz fluorescente en un microscopio de disección. Al momento de evaluar el efecto de la perturbación de la actividad de un gen, contamos los neuromastos marcados con DiAsp de cada lado de la larva. La LL posterior embrionaria consta de 5 neuromastos laterales alineados a lo largo del mioseptum horizontal y 2-3 neuromastos terminales en una posición más ventral en la punta de la cola. Por lo tanto, el número total de neuromastos es 7-8 en más del 90% de los embriones. A fin de considerar la ocurrencia de embriones silvestres con menos neuromastos, consideramos "normal" cualquier embrión con 5-8 neuromastos, "subnormal" aquellos que posean 1-4 neuromastos, y "anormal" los embriones que no poseen neuromastos de la LL posterior marcados. Los dos lados de cada embrión fueron contados como resultados independientes.

Para seguir la formación del nervio de la LL posterior, embriones de 30 hpf fueron fijados toda la noche en paraformaldehído al 4% en PBS. La inyección de Dil (Perclorato de 1, 1'-dioctadecil- 3, 3, 3', 3'-tetrametilindocarbocianina; Molecular Probes, USA) en los embriones fijados se realizó como se describe en David y cols. (2002).

El primordio de la LL posterior y los neuromastos fueron visualizados también en animales vivos o fijados, mediante microscopía Nomarski en un microscopio Zeiss (#37477, Carl Zeiss). Aquellos embriones teñidos mediante hibridación *in situ* inmunocitoquímica, fueron transferidos a glicerol y en su mayoría desvitelados (remoción del vitelo), para ser observados. Los embriones vivos tratados con DiAsp fueron visualizados en un microscopio de fluorescencia Leica MZ12 en medio para embriones. En todas las fotografías que aparecen en esta tesis los embriones o parte de embriones están orientados con su cabeza o parte anterior hacia la izquierda, si es una vista lateral y hacia arriba si corresponde a una vista dorsal.

4.2.7 Extracción de proteínas y Western blot

Se pusieron 100 embriones decorionados, de 24hpf, en 1ml de Ringers+. Se disgregaron los embriones, utilizando una pipeta pasteur de diámetro interno menor que el tamaño de los embriones. Se lavó con Ringers+ hasta que la solución estuvo traslúcida. Se centrifugó en una picocentrífuga y se retiró el máximo de medio posible. Se agregó luego 40µl de Sample buffer y se homogeneizó en un vortex. Luego se incubó durante 5 minutos en un baño de agua hirviendo. A continuación se centrifugó (máxima velocidad) durante 5 minutos, se recuperó el sobrenadante y se guardó a -80°C.

El western blot fue realizado como se describe en Westerfield (1994), en gel de acrilamida al 10%. El gel fue transferido a una membrana de nitrocelulosa en cámara húmeda y se incubó con el anticuerpo anti *c-myc* 9E10 (1:1000). Luego de incubar durante toda la noche y lavar el anticuerpo primario se incubó con el anticuerpo anti IgG de ratón (1:2000), conjugado a peroxidasa. Posteriormente se detectó la señal utilizando un sustrato quimioluminiscente y exponiendo durante 5 minutos la membrana a una película fotográfica.

V. RESULTADOS

Como primer paso y con el objeto de determinar qué genes podrían estar involucrados en el proceso de decisión de destino celular de la componente sensorial de la LL posterior, procedí a realizar el análisis funcional por ausencia de función, de genes proneurales con conocida participación en procesos de determinación y diferenciación en otros sistemas. Tras la inyección de oligonucleótidos antisentido (morfolinos) para los genes *homólogo de achaete-scute 1a (ash1a)*, *homólogo de achaete-scute 1b (ash1b)*, *neuroD* y *neurogenina1 (ngn1)*, analicé, mediante tinción vital DiAsp, la presencia de neuromastos funcionales en los embriones inyectados. A las 72 hpf, cuando la línea lateral primaria está completamente formada, los "embriones morfantes" (embriones inyectados con oligonucleótido antisentido Morfolino) para *neuroD* mostraron una marcada disminución en el número de neuromastos teñidos. Para el resto de los genes analizados, no se observaron diferencias apreciables con respecto a los controles. No obstante estos resultados, la conocida relación funcional y jerárquica entre los genes *neuroD* y *ngn1*, me llevaron a no descartar del análisis a este último. Posteriormente, se incorporó al estudio el gen proneural *homólogo de atonal1 (ath1)*.

En virtud del buen entendimiento del trabajo realizado, comenzaré revisando los patrones de expresión y luego el análisis funcional por pérdida de función. Posteriormente se analizarán los fenotipos de "embriones morfantes" encontrados y se intentará establecer una posible jerarquía de regulación entre los genes en estudio. Finalmente examinaré los resultados encontrados mediante sobre-expresión.

5.1 Expresión de los genes proneurales *neurogenina 1*, *neuroD* y *homólogo de atonal 1*, en la línea lateral del pez cebra (*Danio rerio*)

Ngn1, *ath1* y *neuroD* corresponden a genes proneurales involucrados en diferentes etapas del proceso de adquisición de destino celular. Los dos primeros caen dentro de la categoría de genes de determinación (ver capítulo 1.4.3 Genes proneurales y neurogénicos involucrados en la formación de la LL) y *neuroD* en la de genes de diferenciación. Analicé sus patrones de expresión en el embrión del pez cebra, mediante hibridación *in situ*, usando sondas de RNA antisentido marcadas con digoxigenina, desde que las placodas de la LL

han sido establecidas (aproximadamente a las 10-11 hpf ó comienzo de la somitogénesis) hasta que los neuromastos de la LL primaria ya fueron depositados y diferenciados (48-54 hpf).

5.1.1 *neurogenina 1*

Con el fin de determinar la posible participación de *ngn1* en la formación de la LLP, procedí a analizar su patrón de expresión mediante hibridación *in situ*, poniendo especial cuidado en considerar expresiones débiles en el ganglio, primordio y neuromastos de la LLP, dado el carácter dinámico de la expresión de los genes en este sistema. No fue posible encontrar el transcrito de *ngn1* en las componentes sensoriales de la línea lateral, o sea neuromastos (Figura 4B) y primordio migratorio (Figura 4C). Sin embargo, el ganglio de la LLP presentó expresión de *ngn1* (Figura 4A), lo que concuerda con los resultados presentados por Andermann y cols. (2002) y con mis resultados de ausencia de función (ver más adelante).

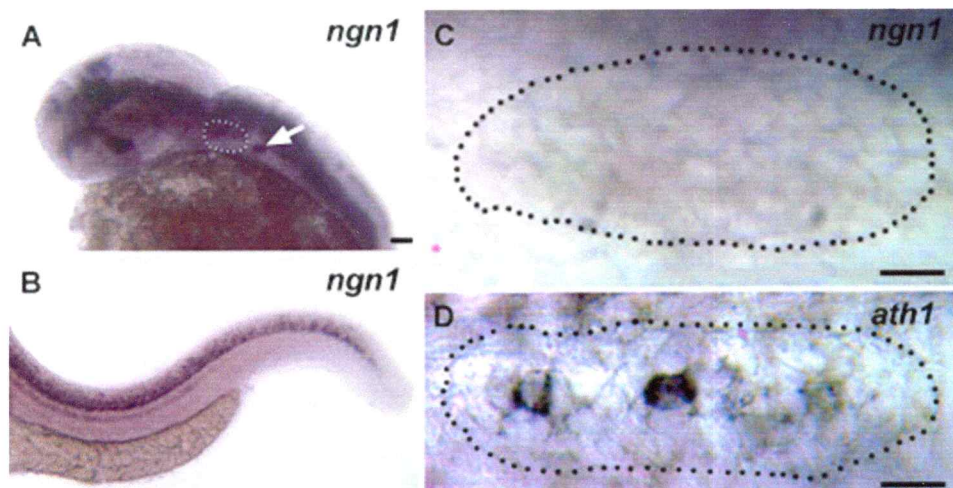


Figura 4. Expresión de *neurogenina 1* en la LLP. (A) Cabeza de un embrión de 48 hpf. La flecha blanca indica el ganglio de la LLP. La línea punteada delimita la vesícula óptica. (B) Ausencia de expresión en los neuromastos de un embrión de 48 hpf. Barra escala en A: 50 μ m para A y B. (C,D) Comparación entre la ausencia de *ngn1* (C) y presencia de *ath1* (D) en el primordio migratorio (delimitado con una línea punteada). Barra escala en C y D: 10 μ m. Todas vistas laterales.

Para estar completamente seguro de la ausencia de expresión de *ngn1* en los neuromastos y primordio migratorio, realicé hibridaciones *in situ* en diversos estadios y disminuyendo las restricciones de la hibridación *in situ*: bajando la temperatura de hibridación, aumentando los tiempos de incubación con la sonda y anticuerpos, aumentando la concentración de la sonda utilizada, etc. No obstante estos cambios, no encontré expresión en primordio y neuromastos. Por lo tanto puedo concluir que *neurogenina1*, no se expresa en el primordio migratorio ni neuromastos de la LLP hasta el establecimiento de la LL primaria (48-54 hpf).

5.1.2 *neuroD*

El transcrito de *neuroD* se comienza a detectar, en la LL, a partir de las 11 hpf, en las placodas anterior y posterior (Figura 5A). Además se observa su expresión en las células que formarán el ganglio trigémino y en una región anterior del cerebro, que posiblemente formará el telencéfalo (Korzh y cols., 1998). A las 18 hpf (Figura 5B), la expresión de *neuroD* se hace más evidente en las placodas de la LL anterior y posterior, sin embargo fue imposible determinar si esta expresión se restringe a la porción ganglionar o incluye al primordio pre-migratorio. También se puede observar su expresión en las células que formarán el ganglio del oído. A las 24 hpf (Figura 5C), varias horas después del comienzo de la migración del primordio posterior, *neuroD* restringe su expresión en los ganglios pero no muestra presencia del transcrito en el primordio ni en el neuromasto L1 recién depositado. Horas después y con mucha dificultad, es posible encontrar una débil expresión en el primordio en movimiento. Cabe destacar que no se observa expresión en el pro-neuromasto que está siendo depositado (Figura 5E). La expresión más llamativa de *neuroD* la encontramos en los neuromastos de la LL posterior ya depositados. En la Figura 5D es posible observar esta expresión. Si vemos en detalle la expresión de *neuroD* en el neuromasto (Figura 5F-H), podemos visualizar que el transcrito está más concentrado en las células centrales, que formarán las futuras células ciliadas mecano-sensoras (Itoh y Chitnis, 2001).

Este patrón de expresión en la componente sensorial de la LL no había sido descrita anteriormente para *neuroD*, siendo éste el segundo gen proneural de expresión en este sistema, junto con *ath1*.

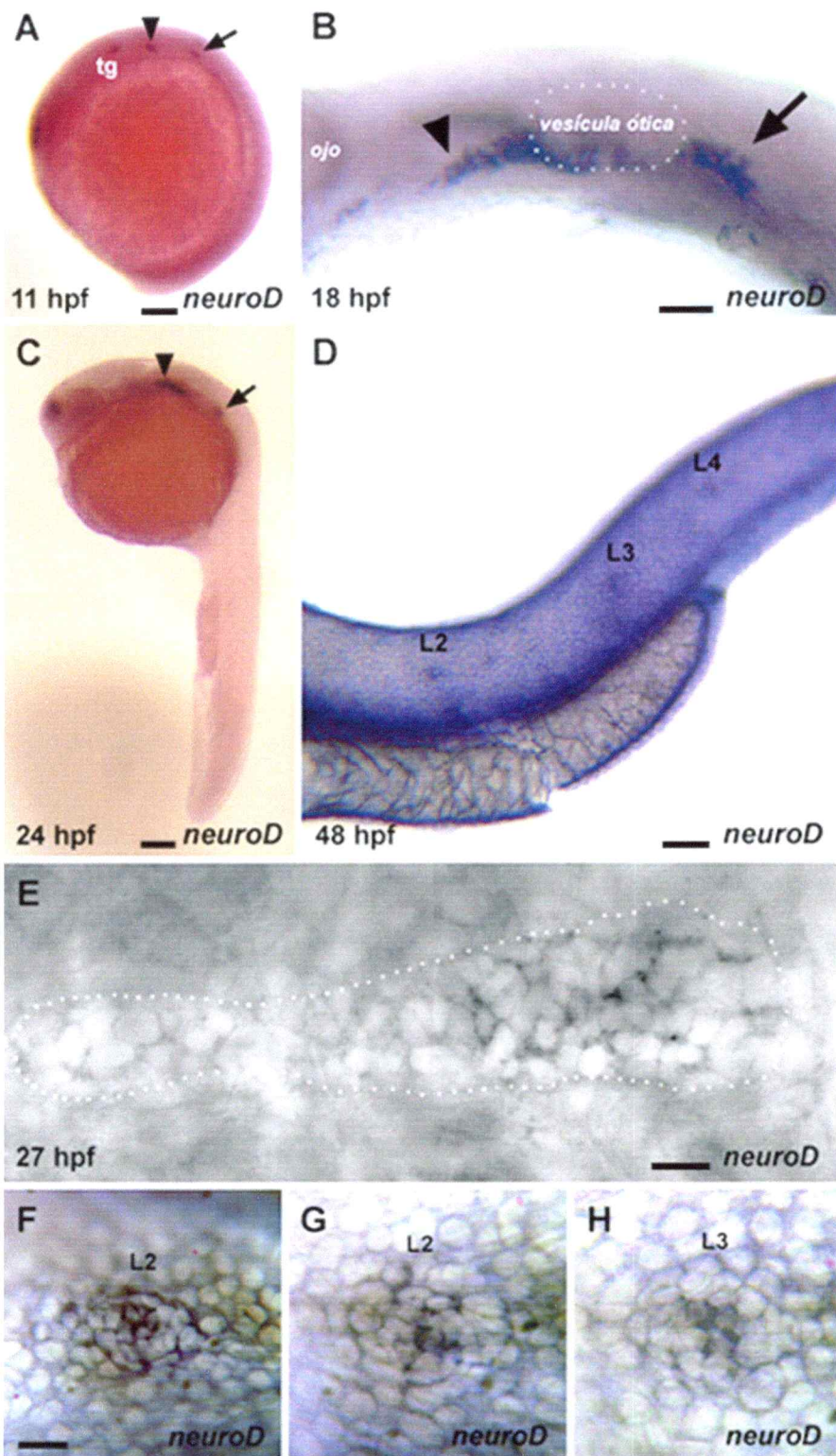


Figura 5. (ver leyenda en la página siguiente)

Figura 5. Expresión de *neuroD* en la LL. (A-C) Expresión de *neuroD* en las placodas de la LL anterior (cabeza de flecha) y posterior (flecha). (A) Embrión de pez cebra de 11 hpf. (B) Zona del oído en un embrión de 18 hpf. El vitelo ha sido removido para facilitar la visualización y la vesícula ótica está delimitada por una línea punteada. (C) Embrión de 24 hpf. Barra escala en A y C: 100 μ m. Barra escala en B y D: 50 μ m. (D, F-H) Embriones de 48 hpf. (D) Vista parcial del tronco de un embrión en donde se puede apreciar la presencia del RNA de *neuroD* en los neuromastos L2, L3 y L4 de la LL primaria. (F) Detalle del neuromasto L2 visto en (D). (G,H) Expresión de *neuroD* en neuromastos de otro embrión, a modo de ejemplo. (E) Transcrito de *neuroD* en el primordio en migración. El primordio fue delimitado por una línea punteada para facilitar su visualización. Barra escala en E y F: 10 μ m para E-H.

Con el fin de determinar si *neuroD* se expresa en el primordio de la LLP y dada la posibilidad de que se exprese en las células ciliadas que forman los neuromastos, procedí a realizar la hibridación *in situ* para este gen, en embriones mutantes *mindbomb*, que desarrollan un exceso de células ciliadas por un desequilibrio en la expresión de los genes neurogénicos Notch-Delta. En estos embriones encontré el transcrito de *neuroD* en los neuromastos y además una fuerte expresión en el primordio migratorio, similar a la encontrada para *ath1* en embriones silvestres (Figura 6).

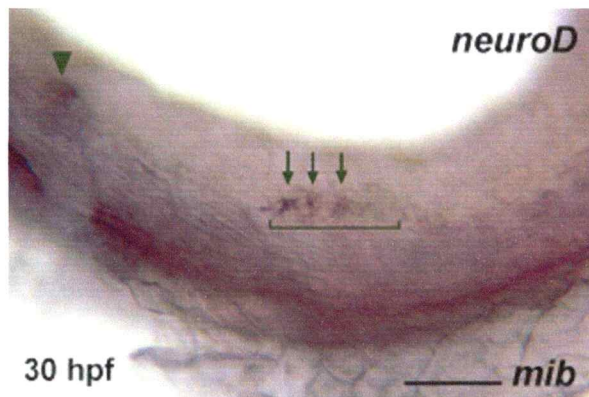


Figura 6. Expresión de *neuroD* en el mutante *mib*. Vista lateral del tronco de un embrión mutante *mib* de 30 hpf. Cabeza de flecha: neuromasto L1. Flechas: pro-neuromastos. El corchete señala el primordio. Parte del vitelo fue removido para facilitar la visualización. Barra escala: 50 μ m.

5.1.3 homólogo de atonal 1

La expresión de *ath1* en el sistema de la LL ya fue descrita (Itoh y Chitnis, 2001). Sin embargo, se hizo necesario re-analizarla durante el desarrollo de esta tesis, para compararla con la expresión de *neuroD* y así poder establecer una posible jerarquía de regulación entre estos dos genes (ver más adelante, capítulo 5.3).

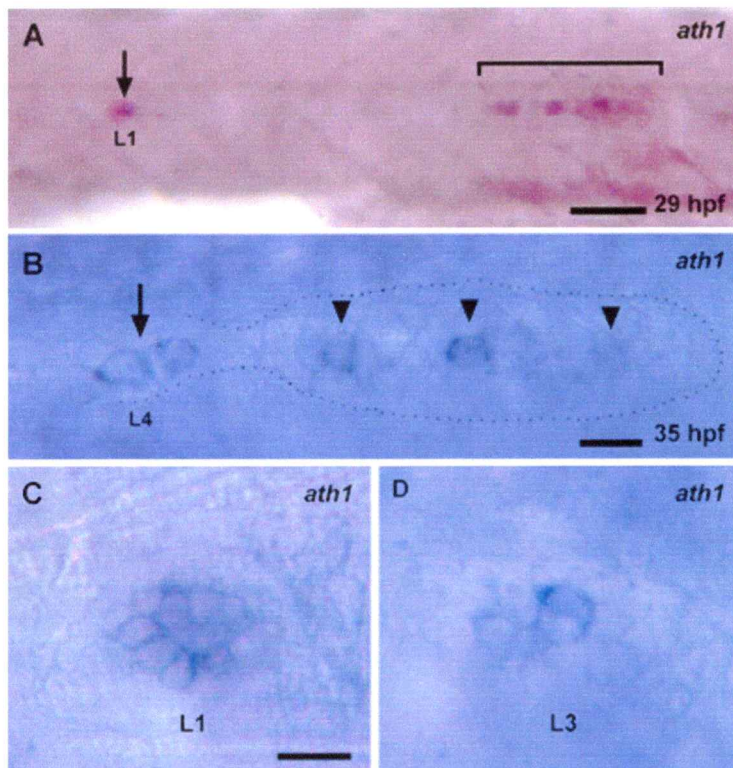


Figura 7. Expresión de *ath1* en la LLP. Expresión de *ath1* en el primordio migratorio (A), primordio depositando un pro-neuromasto (B) y neuromastos ya depositados (C, D). Flecha: neuromasto depositado o en proceso de depósito. Cabeza de flecha: pro-neuromasto. L1, L3 y L4 indican la posición del neuromasto indicado. El corchete y la línea punteada señalan el primordio migratorio. Todas vistas laterales. Barra escala en A: 50 μ m. Barra escala en B: 10 μ m. Barra escala en C: 10 μ m C y D. Anterior: Izquierda.

El patrón de expresión de *ath1* en el primordio migratorio (Figura 7A, B), señala la presencia de 2 a 3 grupos de células prefigurando la formación de pro-neuromastos previo a ser depositados. Esta expresión prosigue durante el depósito y se mantiene en el neuromasto ya depositado (Figura 7C, D), por lo menos hasta las 72 hpf, último estadio en ser analizado. Dentro del neuromasto, *ath1* parece expresarse en unas pocas células centrales (Figura 7D), tal como lo describiera Itoh y Chitnis (2001). Sin embargo, su expresión parece aumentar al pasar el tiempo, de manera que si se compara la presencia

del transcrito entre los neuromastos L3 y L1 (el último depositado 7 horas antes) se puede observar un mayor número de células marcadas.

Con respecto a las demás componentes del sistema, no encontré la presencia del transcrito de *ath1* en las placodas de la LL, así como tampoco en los ganglios y nervios de la LLP.

5.2 Análisis funcional por pérdida de función de los genes *ngn1*, *neuroD* y *ath1*

Para analizar la participación de los genes *ngn1*, *neuroD* y *ath1*, en la formación del sistema de la LL en el embrión del pez cebra, realicé dos aproximaciones experimentales: Pérdida y ganancia de función del gen en estudio.

5.2.1 Inhibición de la traducción por inyección de oligonucleótidos antisentido (morfolinos)

La pérdida de función se obtuvo mediante la inyección de oligonucleótidos antisentido (Morfolinos; Nasevicius y Ekker, 2000) en cigotos de pez cebra. Los morfolinos fueron diseñados para unirse a una secuencia del mRNA del gen que incluye el ATG y bloquear así el acceso al sitio de inicio de la traducción. Los embriones inyectados fueron mantenidos a la temperatura adecuada y a las 72 hpf se les realizó un primer examen incubándolos con la tinción vital DiAsp, un marcador fluorescente de neuromastos funcionales (Figura 8).

Los embriones inyectados con los morfolinos contra *neuroD* (*neuroD* MO) y *ath1* (*ath1* MO), presentaron una disminución en el número de neuromastos marcados con DiAsp (47% y 55% respectivamente; Tabla 2; Figura 8B, C). Además, un porcentaje no despreciable (31% para *neuroD* MO y 11% para *ath1* MO; Tabla 2) carecía absolutamente de neuromastos teñidos (Figura 8D). El efecto en la incorporación del compuesto DiAsp, por los neuromastos de los “embriones morfantes”, fue prácticamente igual para ambos morfolinos, por ello la Figura 8 sólo muestra aquellos embriones inyectados con *neuroD* MO.

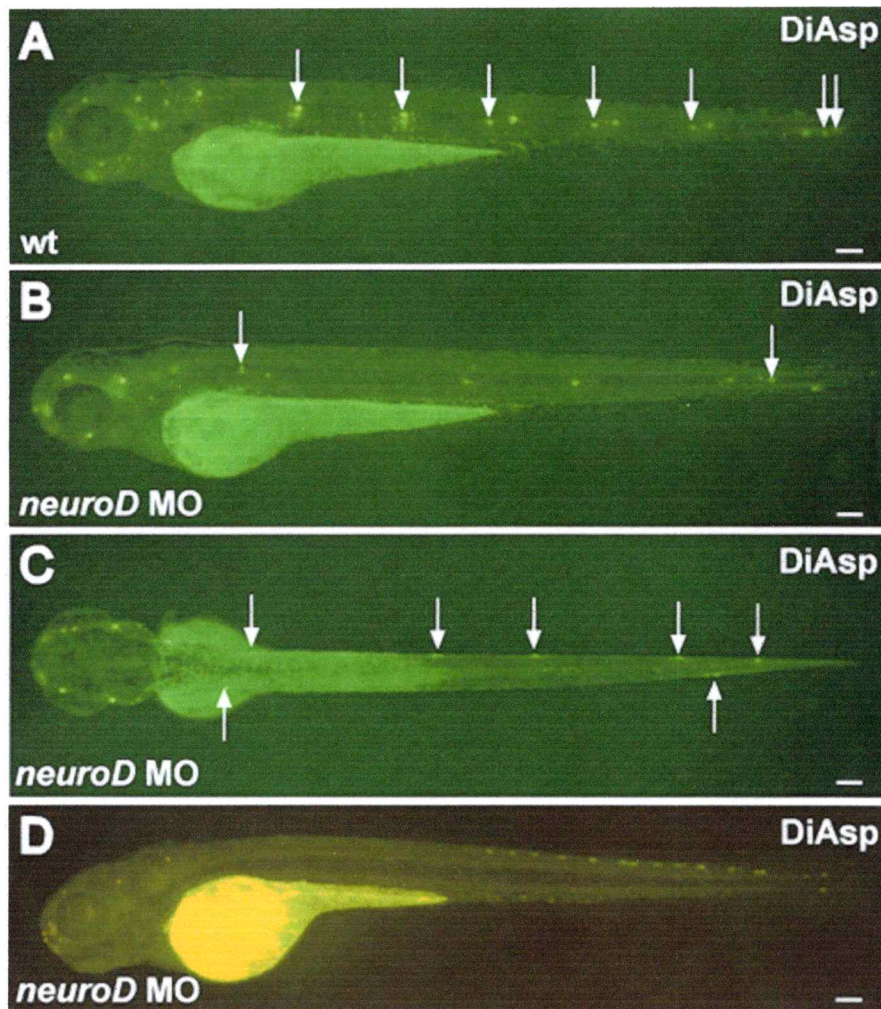


Figura 8. Efecto del morfolino para *neuroD* en la tinción de neuromastos funcionales. (A-D) Embriones de 3 dpf incubados con DiAsp, que revela la presencia de neuromastos funcionales. (A) Patrón de neuromastos (flechas blancas, lado izquierdo del embrión). (B-C) Vista lateral (B) y dorsal (C) de un embrión representativo morfante para *neuroD* con ausencia parcial de neuromastos. Nótese que el efecto del morfolino es diferente a cada lado del embrión. Mientras el lado izquierdo se ve afectado y sólo muestra 2 neuromastos marcados con DiAsp, el lado derecho se ve prácticamente normal. (D) Vista lateral de un embrión inyectado carente completamente de neuromastos marcados. Barra en D: 50 μ m para A-D.

El análisis por DiAsp realizado a las 72 hpf, a embriones inyectados con *ngn1* MO no arrojó diferencias al compararlos con los embriones control (Figura 9A). Sin embargo, al cabo de pocas horas, estos mismos embriones aumentaron progresivamente y de manera exacerbada el número de neuromastos de la LLP, fenómeno además visto en embriones *ngn1* $-/-$ y en embriones de la línea transgénica *foxD3*-GFP (fluorescente para las glías asociadas al nervio de la LLP) inyectados con *ngn1* MO (Figura 9B, C y D). El análisis de estos resultados concuerda con lo obtenido por López-Schier y Hudspeth, 2005.

Figura 9. Papel indirecto de *ngn1* en la formación de la LLP.

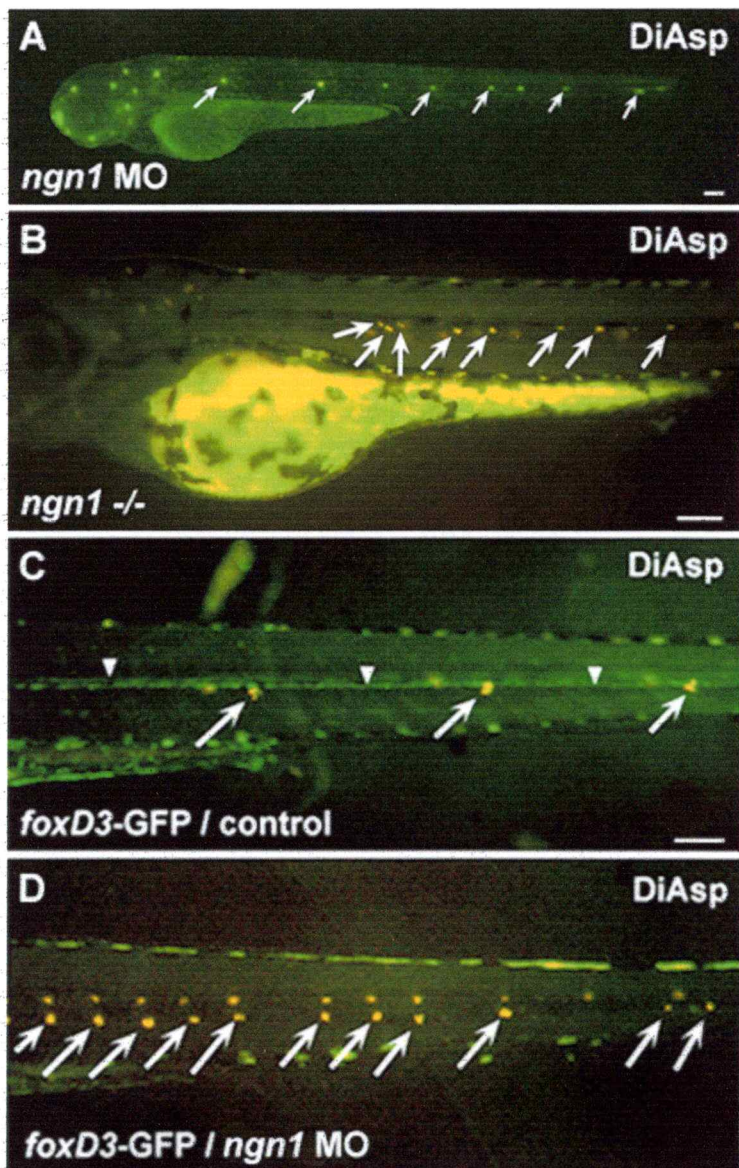
(A-D) Embriones incubados con DiAsp. (A) Embrión de 72 hpf inyectado con *ngn1* MO, donde se ve la ausencia de efecto del morfolino en el patrón de neuromastos (flechas).

Horas después, en el embrión morfante (no mostrado), así como en el mutante *ngn1* $-/-$ (B), se observa la aparición de neuromastos extras no presentes en el control.

(C, D) En la línea *foxD3*-GFP, que marca las glías asociadas al nervio de la LLP, resulta fácil comparar el número normal de neuromastos en este estadio (C), con la gran cantidad encontrada en los "embriones morfantes" (D). Nótese la presencia en el embrión control (C) y no en el inyectado (D), de marca verde en el nervio de la LLP (cabezas de flecha), dado que la ausencia de *ngn1* no permite la formación del ganglio de la LLP.

Barra escala en A y B: 50 μ m. Barra escala en C: 50 μ m para C y D.

Todas vistas laterales.



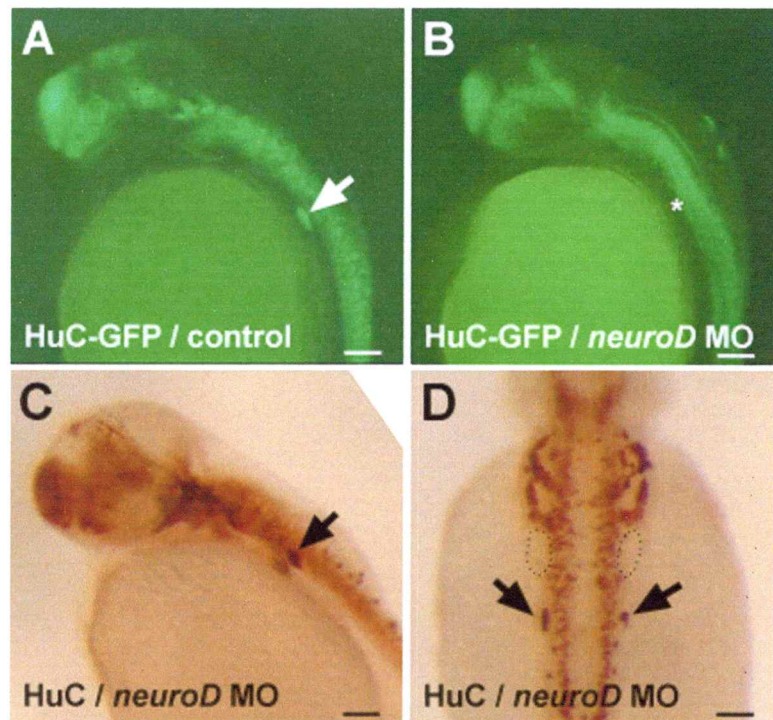
Luego de examinar los neuromastos funcionales mediante la tinción vital DiAsp en los “embriones morfantes”, fueron analizadas las diferentes estructuras (ganglios, nervios, primordio y neuromastos) y procesos (migración del nervio y del primordio, depósito y diferenciación de los neuromastos), involucrados en la formación de la LL.

5.2.2 Análisis de los fenotipos de los “embriones morfantes”

5.2.2.1 Formación del ganglio y nervio de la LLP

Debido a la presencia del transcrito de *neuroD* en el ganglio de la LLP (Figura 5B), decidí examinar si la inyección del morfolino contra este gen producía algún efecto en la formación de esta estructura. Para ello, primero analicé la expresión del marcador de neuronas HuC (que marcan el ganglio de la LLP), en una línea transgénica HuC-GFP (Figura 10A, B) y mediante inmunocitoquímica para esta proteína (Figura 10C, D), en embriones inyectados con *neuroD* MO.

Figura 10. Efecto de *neuroD* MO en la formación del ganglio de la LLP. (A-D) Embriones de 32 hpf. La flecha indica el ganglio de la LLP. (A, B) Vista lateral de embriones transgénicos HuC-GFP. (A) Control. (B) “Embrión morfante” para *neuroD*, en donde se ve la falta de fluorescencia en el ganglio (asterisco). (C, D) Inmunoquímica para HuC. Vista lateral (C) y dorsal (D) de un embrión inyectado con *neuroD* MO. HuC se expresa en el ganglio de los “embriones morfantes”. La línea punteada señala la vesícula óptica. Barra escala : 50 μ m.



La ausencia de NeuroD en los embriones de la línea transgénica HuC-GFP, provocó una disminución de la marca fluorescente en todo el embrión y la desaparición de ésta en el ganglio de la LLP, al ser visualizados embriones inyectados de 32 hpf (Figura 10A, B). No obstante, al realizar la inmunocitoquímica utilizando el anticuerpo anti-HuC, no se vió diferencias con respecto al control (Figura 10C, D). El mismo resultado se obtuvo al utilizar el anticuerpo anti-tubulina acetilada (dato no mostrado). A fin de determinar con mayor precisión, si el ganglio de la LLP estaba o no afectado en los “embriones morfantes”, decidí inyectar en estos embriones un trazador lipofílico (Dil) directamente en la zona donde normalmente está el ganglio y verificar así la presencia de éste y además la correcta formación del nervio de la LLP (Figura 11).

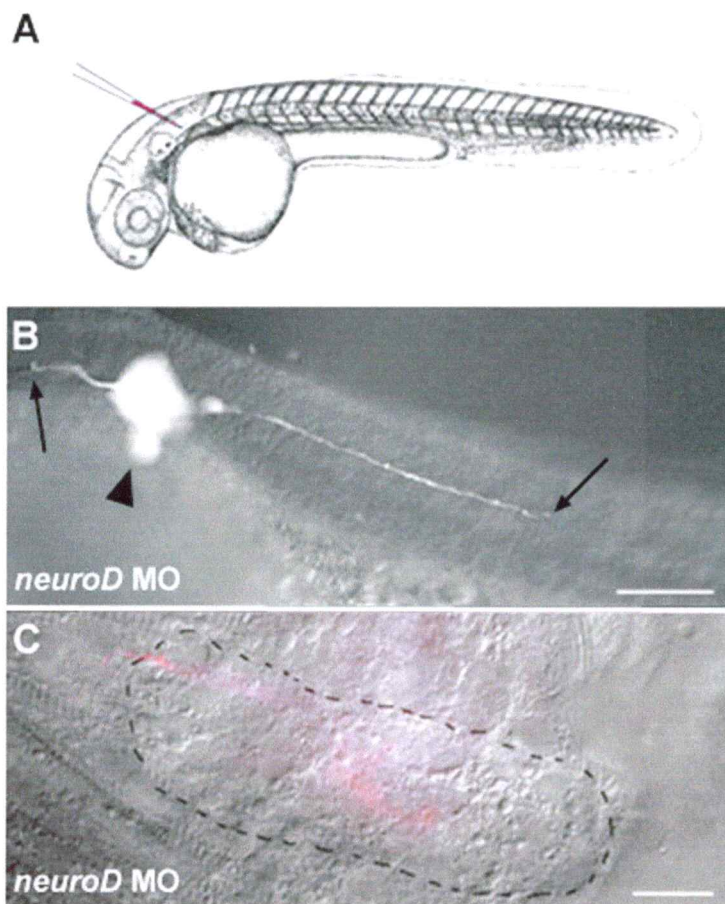


Figura 11. Inyección de Dil en el ganglio de la LLP de “embriones morfantes” para *neuroD*. (A) La inyección de Dil en la zona del ganglio de la LLP, se realizó a las 30 hpf, tal como lo muestra el esquema. (B) Se puede apreciar en este embrión morfante, visualizado bajo luz fluorescente, el ganglio marcado (cabeza de flecha), así como la correcta migración del nervio y su proyección hacia el cerebro posterior (flechas). (C) Imagen Nomarski / fluorescencia. Detalle de la Figura (B), en donde se ve la correcta co-migración del cono de crecimiento del nervio (en rojo) con el primordio (delimitado con una línea segmentada). Barra escala en B: 50 μ m y en C: 10 μ m. Todas vistas laterales.

El ganglio y nervio de la LLP pudo ser marcado con Dil en los embriones inyectados, mostrando además la co-migración normal de los conos axonales con el primordio de la LLP (Figura 11C).

5.2.2.2 Migración del primordio y depósito de los neuromastos

La reducción en el número o la completa ausencia de neuromastos marcados con DiAsp, que encontramos en los “embriones morfantes” para *neuroD* y *ath1* (Figura 8), puede deberse a muchas causas. Por ejemplo, una falla en la migración del primordio, en el depósito o diferenciación de los neuromastos, puede dar origen al fenotipo encontrado.

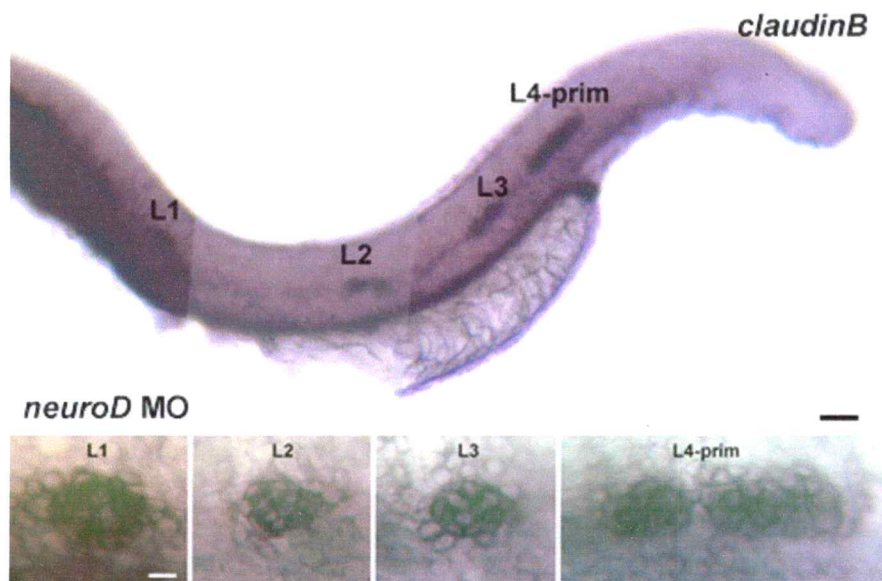


Figura 12. Correcta migración del primordio y depósito de los neuromastos de la LLP en embriones inyectados con *neuroD* MO. Hibridación *in situ* para *claudinB*, en un embrión inyectado con *neuroD* MO, indistinguible de la obtenida en un embrión control. Idéntico resultado fue obtenido con la sonda *eya1* y en “embriones morfantes” para *ath1*. Arriba: Vista lateral del tronco de un embrión morfante. Barra escala: 50 μ m. Abajo: Detalle de lo mostrado arriba. L1, L2 y L3 señalan las posiciones de los neuromastos indicados. L4-prim: primordio migrando depositando el neuromasto L4. Barra escala: 10 μ m. Todas vistas laterales.

Deseché la posibilidad de que la inyección de los morfolinós afectara la migración, basándome en dos líneas de evidencias: Primero, aun cuando los “embriones morfantes” muestran una pérdida de marcación por DiAsp en los neuromastos del tronco y la cola, en muchas ocasiones observé neuromastos en la punta de la cola (Figura 8B, C), lo que indica que el primordio alcanzó su destino final. Segundo, realicé hibridaciones *in situ* usando las sondas para *claudinB* (Kollmar y cols., 2001) y *eya1* (Sahly y cols., 1999), dos genes que se expresan en el primordio y neuromastos de la LLP. La expresión de estos dos genes en los “embriones morfantes” para *neuroD* y *ath1*, no mostraron diferencias significativas al ser comparados con embriones control (Figura 12). Por lo tanto, la migración del primordio de la LLP parece no depender de la actividad de estos genes proneurales. El depósito de los neuromastos parece realizarse con normalidad en los embriones inyectados, como lo muestra la expresión de *eya1* y *claudinB* (dato no mostrado y Figura 12), no obstante encontré algunos casos en donde no fue posible encontrar la expresión de *claudinB* en las posiciones donde normalmente los neuromastos son depositados (ver más adelante).

5.2.2.3 Diferenciación de los neuromastos

Dado que la mayoría de los neuromastos son depositados correctamente, pero no son marcados con la tinción vital DiAsp, examiné su morfología mediante óptica Nomarski / DIC en “embriones morfantes” para *neuroD* y *ath1* y los comparé con los de embriones control sin inyectar. Los neuromastos de embriones silvestres poseen una forma circular. Sus células ciliadas, localizadas centralmente, forman una roseta claramente distinguible (Figura 13A) y fácilmente visualizada con DiAsp (Figura 13E). Por el contrario, los neuromastos de los “embriones morfantes” aparecen aberrantes (Figura 13B-D), compuestos por células de diversos tamaños y formas. En ellos es imposible distinguir las células ciliadas por morfología o por marcación con DiAsp (Figura 13F). La forma irregular de estos neuromastos y la disposición caótica de sus células, podría estar mostrando células ciliadas muertas. Cabe mencionar que en algunos casos, no fue posible encontrar neuromastos en sus posiciones habituales en los “embriones morfantes” (ver más adelante).

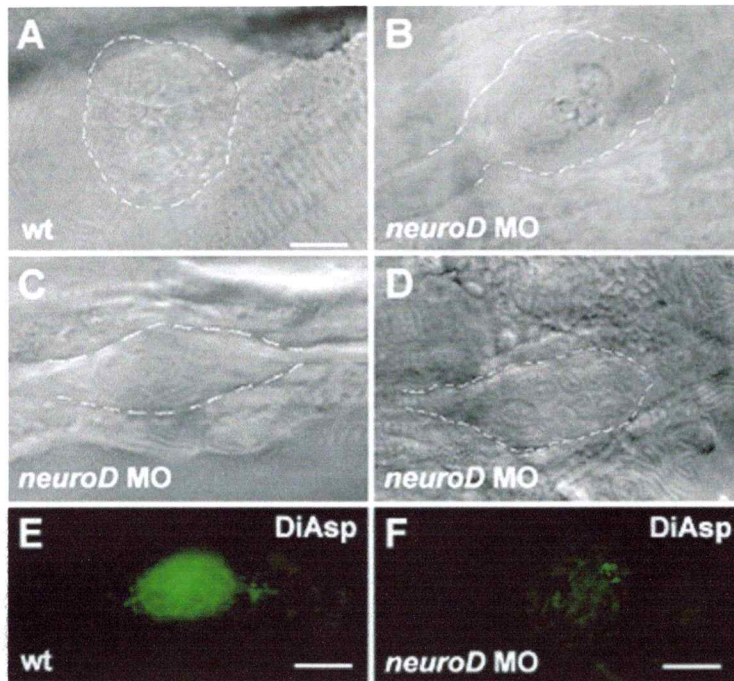


Figura 13. Los “embriones morfantes” para *neuroD* poseen neuromastos aberrantes. (A-D) Mediante microscopía Nomarski, es posible ver los neuromastos aparentemente ausentes de los “embriones morfantes” para *neuroD*. (A) Neuromasto control. (B-D) Ejemplos de neuromastos aberrantes. (E) Neuromasto control marcado con DiAsp. (F) Los neuromastos aberrantes no poseen células marcadas con DiAsp. Barra escala en A: 10 μ m para A-D. Barra escala en E y F: 10 μ m. Vistas laterales. Anterior a la izquierda.

Como las células ciliadas no son detectables por DiAsp en ausencia de función de *neuroD* ó *ath1*, utilicé otro marcador de diferenciación de células ciliadas: tubulina acetilada. En neuromastos control, la inmunodetección con un anticuerpo anti-tubulina acetilada marca los cuerpos y cilios de las células ciliadas (Raible y Kruse, 2000; Figura 14A-C), además del nervio de la LLP (Figura 14; cabeza de flecha). En cambio, en los “embriones morfantes” para *neuroD* ó *ath1*, la marca del anticuerpo se limita sólo al nervio de la LLP. No obstante esto, pude identificar los neuromastos de “embriones morfantes” mediante microscopía Nomarski y confirmé así la ausencia de tubulina acetilada (Figura 14D, E), lo que podría estar indicando la ausencia de células ciliadas en estos neuromastos. Para confirmar estos resultados, inyecté ambos morfalinós en la línea transgénica ET4, que expresa GFP en las células ciliadas (Parinov y cols., 2004). En los embriones inyectados, analizados a las 48 y 72 hpf, obtuve resultados similares con aquellos tratados con DiAsp (Figura 8), esto es, disminución en el número o absoluta ausencia de neuromastos marcados con GFP (dato no mostrado).

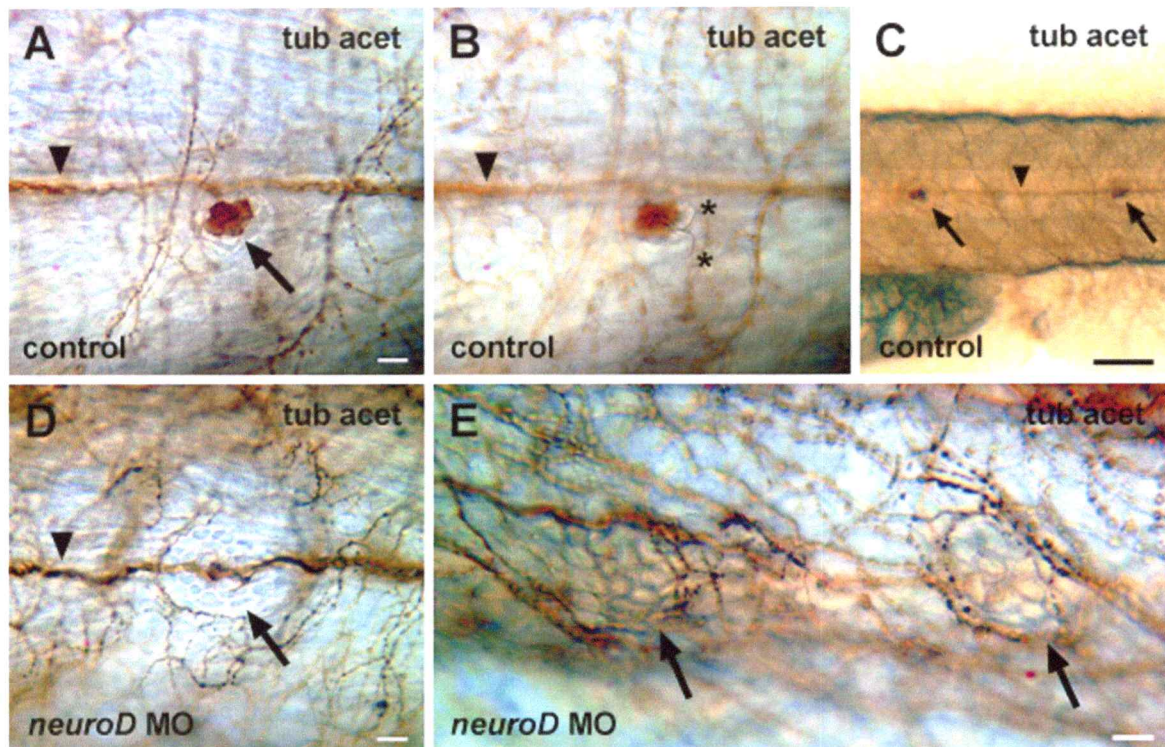


Figura 14. Los neuromastos aberrantes no tienen células ciliadas. (A-E) Inmunocitoquímica en embrión completo con el anticuerpo anti-tubulina acetilada. (A-C) Este anticuerpo marca el cuerpo (A) y cilio (B, asteriscos) de las células ciliadas de los neuromastos (C) y también el nervio de la LLP (cabeza de flecha), en los embriones control. En (B) el plano del foco fue ajustado para poder visualizar los cilios. En (C) se puede apreciar como se ve parte del tronco de un embrión control marcado con el anticuerpo. (D, E) Ninguna célula de los neuromastos de “embriones morfantes” posee marca del anticuerpo, sin embargo el nervio (cabeza de flecha) se ve similar al control. (E) Neuromastos de “embriones morfantes” de la cola del embrión. Barra escala en A y D: 10 μm para A, B y D. Barra escala en C: 50 μm . Barra escala en E: 10 μm . Vistas laterales. Anterior a la izquierda.

Además de la utilización de la línea transgénica ET4, también caractericé los efectos de la ausencia de función de *neuroD* y *ath1* en la línea ET20 (Figura 15), que expresa GFP en el anillo externo de células accesorias del neuromasto (células del manto) y en las células interneuromásticas que luego formarán los neuromastos intercalares (Grant y cols., 2005, Lopez-Schier y Hudspeth, 2005). Ambas líneas fueron generadas recientemente por “enhancer trapping” ó atrapamiento de secuencias promotoras activadoras usando el sistema del transposón Tol2 (Parinov y cols., 2004).

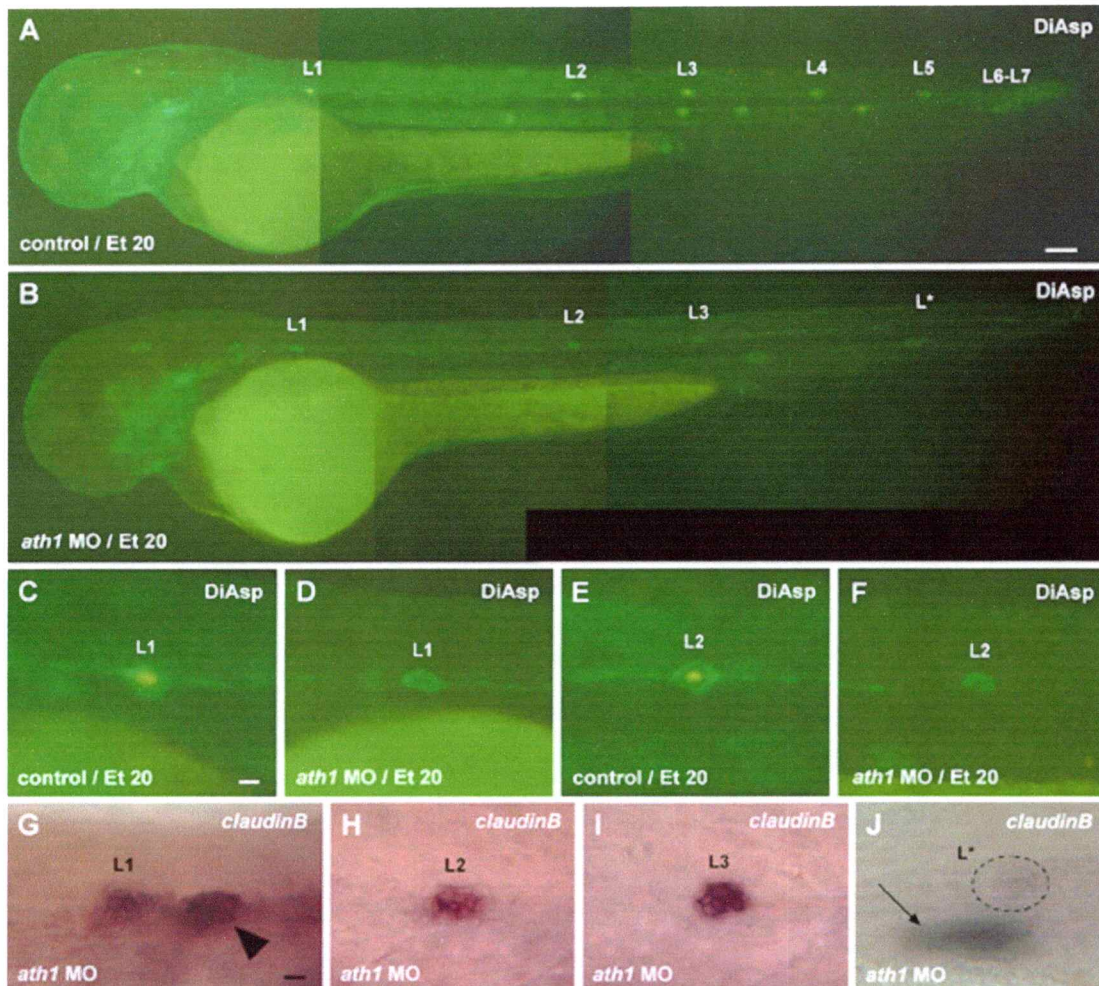


Figura 15. *ath1* y *neuroD* están implicados en la diferenciación de todo el neuromasto. (A-F) Embriones de la línea transgénica ET20 tratados con DiAsp y visualizados bajo luz fluorescente. (A) Embrión control de 48 hpf. (B) Embrión de 48 hpf, inyectado con *ath1* MO. L1, L2, L3...L7 indican la presencia y posición de los neuromastos de la LLP. Barra escala en A: 50 μ m para A y B. (C-F) Acercamiento de los neuromastos L1 y L2 de los embriones control (C y E) e inyectados (D y F) mostrados en (A) y (B), respectivamente. Nótese que los neuromastos de los embriones inyectados mantienen la expresión de GFP en las células del manto (en verde) pero carecen de la marca DiAsp en las células ciliadas (en amarillo). (G-J). Hibridación *in situ* del mismo embrión mostrado en (B), utilizando la sonda para *claudinB*. Acercamiento a los neuromastos. La expresión del mRNA de *claudinB* sólo se encontró en los neuromastos GFP positivos (G, H e I) y no en los neuromastos GFP/DiAsp negativos (J; neuromasto visualizado con Nomarski y señalado como L*). Cabeza de flecha en (G): Primordio secundario de la LL posterior. Flecha en (J): Neuromastos de la cola del otro lado del embrión, expresando *claudinB*. Barra escala en C y G: 10 μ m para C-F y G-J respectivamente. Vistas laterales.

Después de la inyección del morfolino, los embriones fueron teñidos con DiAsp a las 48 hpf (marca amarilla en la Figura 15). En la mayoría de los casos (sobre el 50%) los neuromastos observados poseían expresión de GFP y ausencia de tinción DiAsp. Este resultado indica que ni el depósito ni la formación de las células del manto está alterado en ausencia de la proteína NeuroD ó Ath1. (Figura 15B, D y F). Sin embargo, también encontré casos en los cuales la expresión de GFP no fue encontrada en posiciones donde normalmente están los neuromastos (Figura 15B). En estos casos, no siempre fui capaz de encontrar los neuromastos aberrantes por microscopía Nomarski (15B, J), quedando la duda de si en ocasiones los morfolinós afectan el depósito o quizás interfieren con la determinación o sobrevivencia de las células del manto. Procedí entonces, a tomar "embriones morfantes" ET20 individuales, los fotografié bajo fluorescencia y les realicé hibridación *in situ* usando las sondas de los genes *claudinB* y *eya1*, que se expresan en todas las células de la LLP (Lopez-Schier y cols., 2004; Sahly y cols., 1999). Encontré en estos embriones una relación estricta entre la expresión de GFP en las células del manto de los neuromastos y la expresión de *claudinB* y *eya1* (Figura 15B, D, G-I y datos no mostrados). Por lo tanto, a pesar de ser importantes para el desarrollo de las células ciliadas, posiblemente en su proceso de diferenciación, los genes *neuroD* y *ath1* podrían estar implicados, en menor grado, en el depósito de neuromastos, posiblemente a través de sus efectos en la diferenciación celular. Alternativamente, existe la posibilidad de que la pérdida de las células ciliadas de los neuromastos de "embriones morfantes", tenga un efecto indirecto en la supervivencia de las células accesorias, como ha sido observado previamente (Erkman y cols., 1996).

5.3 Jerarquía de regulación entre los genes *neuroD* y *ath1*

La ausencia de efecto del morfolino anti-*ngn1* sobre la formación de los neuromastos de la LLP sugiere, que la expresión de *neuroD* no está regulada por *ngn1* durante este proceso, en contraste con lo que ocurre en las células del ganglio de la LL (Andermann y cols., 2002) y en otras neuronas en el sistema nervioso central (Ma y cols., 1996, 1998; Perron y cols., 1999). Posiblemente entonces, *neuroD* debe estar controlado por otro gen proneural en el primordio y neuromastos. El gen *ath1* resultó ser el candidato más fuerte para esta función, debido a su importancia en el desarrollo de las células ciliadas en mamíferos

(Bermingham y cols., 1999; Chen y cols., 2002; Kawamoto y cols., 2003) y a su expresión en el primordio, pro-neuromastos y neuromastos maduros de la LLP, en una forma progresivamente restringida (Figura 7; Itoh y Chitnis, 2001), que podría correlacionarse con la selección del destino de célula ciliada.

5.3.1 Experimentos de rescate del fenotipo morfante

Las evidencias experimentales presentadas hasta el momento no apoyan una regulación de *neuroD* por parte de *ath1*. Prácticamente no existen diferencias entre los fenotipos obtenidos con la inyección del morfolino de ambos genes. Sin embargo, a pesar de que los resultados indican que *ath1* y *neuroD* podrían estar involucrados en el establecimiento de la competencia neural en el sistema de la LL, el gen *neuroD* generalmente ha sido implicado en procesos de diferenciación neuronal (Lee y cols., 1995; Korzh y cols., 1998) y me hace suponer que *ath1* podría estar actuando río-arriba de *neuroD* en este sistema.

Con el fin de esclarecer estas dudas y determinar una posible jerarquía de regulación entre estos dos genes, realicé experimentos de rescate y sobre-expresión. Inyecté el constructo de expresión NeuroD:Myc junto con el morfolino de *ath1* en cigotos de pez cebra. A las 72 hpf, analicé la presencia de neuromastos funcionales mediante tratamiento con DiAsp. Encontré que el fenotipo obtenido por la inyección de *ath1* MO, fue rescatado parcialmente con la co-inyección de *neuroD* (41% de rescate: 66% de “embriones morfantes” al inyectar *ath1* MO; 39% de “embriones morfantes” al rescatar; ver Tabla 2). Por lo tanto, propuse que *ath1* regula a *neuroD*, quizás directamente, y que es el gen proneural responsable del establecimiento del destino de célula ciliada en el sistema de la LL.

Además, a manera de control, realicé el rescate cruzado: Inyecté cigotos de pez cebra, con el morfolino de *neuroD* más el constructo de expresión de Ath1. Mediante el mismo análisis anterior, encontré que los embriones co-inyectados no presentaron diferencias apreciables al comparar la incorporación de la tinción DiAsp con los “embriones morfantes” (ver Tabla 2); lo que indica que *ath1* no estaría río-abajo de *neuroD*.

	normal (5-8 nm)	subnormal (1-4 nm)	anormal (0 nm)
CONTROLES: (P= 0.066)			
no inyectados (58 embriones)	97%	3%	0%
<i>ash1a</i> MO ^a (75 embriones)	95%	5%	0%
RESCATE 1: (P< 0.001)			
<i>neuroD</i> MO (78 embriones)	22%	47%	31%
<i>neuroD</i> MO co-inyectado con <i>neuroD</i> (71 embriones)	68%	18%	14%
RESCATE 2: (P< 0.002)			
<i>ath1</i> MO (53 embriones)	34%	55%	11%
<i>ath1</i> MO co-inyectado con <i>neuroD</i> (46 embriones)	61%	37%	2%
RESCATE 3: (P= 0.051)			
<i>neuroD</i> MO (52 embriones)	50%	50%	0%
<i>neuroD</i> MO co-inyectado con <i>ath1</i> (64 embriones)	52%	41%	7%

Tabla 2. Experimentos de rescate en embriones de pez cebra. Número de neuromastos (nm) visualizados con DiAsp a las 72 hpf en embriones inyectados con morfolinios *neuroD* y *ath1* y "embriones morfantes" rescatados con *neuroD* y *ath1*. Los neuromastos teñidos fueron contados en cada lado de cada embrión. Cada lado fue clasificado de acuerdo al grado de severidad del efecto: "normal" posee entre 5 y 8 nm; "subnormal" posee entre 1 y 4 nm; "anormal" no posee nm. Para determinar que las diferencias fueran significativas, usamos el test *t* de Student (SigmaStat 3.1) ^a La inyección del morfolino contra *ash1a* no afecta la formación normal de la LL posterior en los embriones y fue usada como inyección control.

5.3.2 Análisis de sobre-expresión

La aproximación experimental que permitió determinar y concluir que *ath1* estaría regulando a *neuroD* en la formación de los neuromastos de la LLP, fue la sobre-expresión de *ath1*. Cuando *ath1* es expresado ectópicamente, *neuroD* es regulado positivamente,

como lo pude observar mediante hibridación *in situ*, en embriones inyectados con un constructo de expresión de *Ath1*. Algunos embriones inyectados presentaron expresión ectópica del transcrito de *neuroD* (Figura 16A), mientras otros mostraron un aumento de su expresión en los neuromastos de la LLP (Figura 16B-E). En aquellos embriones que expresaban *neuroD* ectópicamente, no fue posible encontrar en todos un aumento en la expresión en los neuromastos, posiblemente debido a una distribución heterogénea del constructo inyectado, de la misma forma que no observé un efecto uniforme al inyectar los morfolinós de *ath1* y *neuroD* (Figura 8B,C). La sobre-expresión de *neuroD* sin embargo, no provocó el aumento ni la aparición ectópica del transcrito de *ath1* (dato no mostrado).

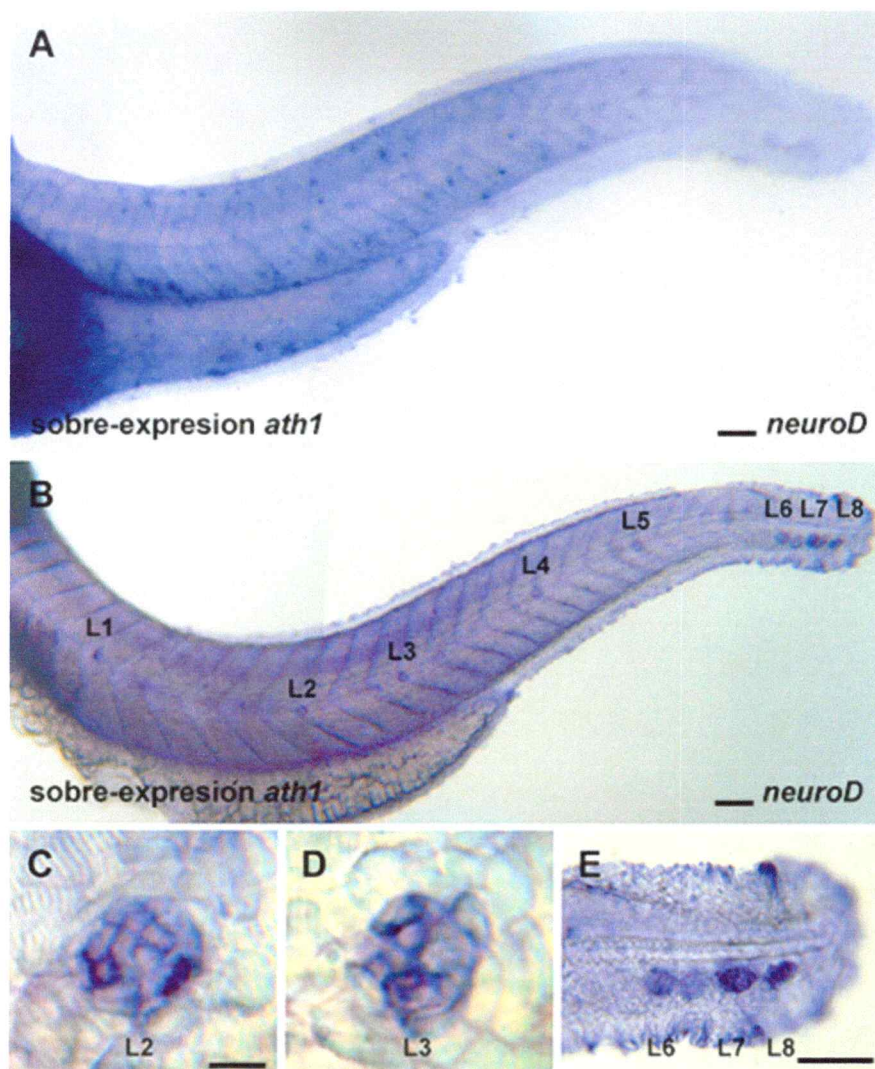


Figura 16. (ver leyenda en la página siguiente)

Figura 16. La sobre-expresión de *ath1* provoca la expresión ectópica de *neuroD*. (A-E) Expresión de *neuroD*, en embriones inyectados con el constructo de expresión de *ath1*, visualizada mediante hibridación *in situ*. (A) Expresión ectópica de *neuroD* a lo largo de todo el embrión. (B-E) Vista general (B) y detalles (C-E) de la expresión de aumentada de *neuroD* en un embrión sobre-expresado. L2, L3...L8 indican la posición del neuromasto señalado. (E) Neuromastos de la cola. Barra escala en A y B: 50 μ m. Barra escala en C: 10 μ m para C y D. Barra escala en E: 50 μ m. Vistas laterales. Anterior: izquierda.

Se estableció, de esta manera, una jerarquía de regulación en donde el gen proneural *ath1* regula la expresión del gen de diferenciación *neuroD*, el cual controla el proceso de diferenciación de las células ciliadas que formarán parte de los neuromastos de la LL en el pez cebra.

VI. DISCUSIÓN

En un esfuerzo por definir los genes proneurales involucrados en promover el destino de célula ciliada en el sistema de la LL y aprovechando la facilidad del análisis de neuromastos funcionales mediante la incubación de los embriones de pez cebra con la tinción vital DiAsp, desarrollé experimentos de pérdida de función mediante inyección de oligonucleótidos antisentido (morfolinos; Nasevicius y Ekker, 2000) en cigotos de pez cebra. De los cuatro genes estudiados (*ash1a*, *ash1b*, *neurogenina1* y *neuroD*), sólo uno (*neuroD*) resultó participar en la formación de los neuromastos de la LL. Desarrollé entonces, los análisis necesarios para determinar si el gen *neuroD* juega algún papel en el proceso que decide el destino de una célula ciliada. Detecté su expresión en la placoda de la LL anterior y posterior y bajos niveles de ella en el primordio migratorio y neuromastos. Los experimentos de pérdida de función usando oligonucleótidos morfolinos diseñados contra *neuroD* mostraron que es necesario para la diferenciación de las células ciliadas en el neuromasto y que juega un pequeño papel o no está involucrado, en el depósito de los neuromastos, así como en la formación de los ganglios y nervios de la LL.

Ha sido propuesto que la selección del destino de célula ciliada está bajo el control de los genes neurogénicos de las familias *notch* y *delta* (Henrique y cols., 1995), siendo *delta* regulado por los genes proneurales tanto en moscas como vertebrados. En la línea lateral, *delta* se expresa en el primordio migratorio en un patrón consistente con un papel en la determinación de célula ciliada (Itoh y Chitnis, 2001) y que corresponde al patrón de expresión del gen proneural *ath1*. En el mutante *mindbomb*, se producen células ciliadas supernumerarias concomitantemente con una sobre-expresión del gen *ath1* (Itoh y Chitnis, 2001). Por lo tanto, *ath1* fue el principal candidato para ser el gen proneural responsable de la determinación de las presuntivas células ciliadas a través de la activación de la expresión de *neuroD*.

La inyección de un morfolino dirigido contra *ath1* mostró un fenotipo indistinguible al observado con el morfolino para *neuroD*: La migración del primordio, así como el depósito de neuromastos no se vieron afectados, pero las células ciliadas no diferenciaron. Además, pude rescatar parcialmente el efecto de la ausencia de función de *ath1* sobre-expresando *neuroD* (41% de rescate), y no así el efecto del morfolino de *neuroD* co-inyectándolo con *ath1*. Estas observaciones fueron consistentes con mi idea de que *ath1* actúa río-arriba de *neuroD* en el desarrollo de las células ciliadas.

6.1 Formación de los neuromastos de la LL

Dado el carácter dinámico e inusual de la formación de la línea lateral, es que pretendí analizar la formación de los neuromastos en el contexto de un sistema complejo, en donde los procesos involucrados debían estar estrechamente relacionados. Sin embargo, ya desde un comienzo, me dí cuenta que los procesos de diferenciación, migración y depósito no estaban obligatoriamente vinculados. La ausencia de función de los genes proneurales *neuroD* y *ath1* no afectó de manera importante la correcta migración y depósito de los neuromastos (Figura 12), a pesar del contundente efecto en la formación del neuromasto y en particular de las células ciliadas que lo componen. Es posible por tanto, que los procesos de migración y especificación/diferenciación ocurran sin una interdependencia, no obstante en ocasiones no fue posible encontrar neuromastos mediante las técnicas utilizadas regularmente (hibridación *in situ*, inmunoquímica, microscopía Nomarski), por lo que no puedo desestimar una posible participación de estos genes en el proceso de depósito.

También es posible que *ath1* y *neuroD* participen en la especificación/diferenciación de las células accesorias del neuromasto, además de las células ciliadas y que esto explique la imposibilidad de encontrar algunos neuromastos en los “embriones morfantes” y no sea por un efecto en la migración o depósito (Figura 17).

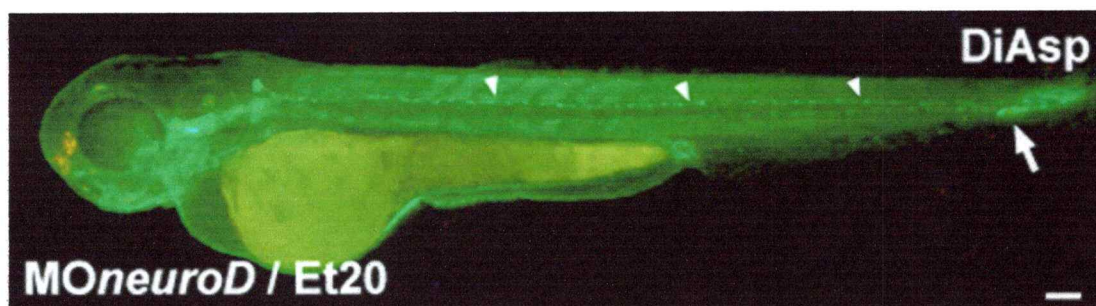


Figura 17. La ausencia de función de *neuroD* no afecta el proceso de migración. Embrión morfante de *neuroD*, de 72hpf, de la línea transgénica Et20, tratado con DiAsp. La flecha indica un neuromasto de la cola con la doble marca GFP-DiAsp. Las cabezas de flecha indican la línea interneuromástica que señala el paso del primordio a lo largo de todo el embrión. Sólo algunos neuromastos fueron encontrados por microscopía Nomarski. Barra escala: 50 μ m.

Hizo falta un análisis más preciso de la formación de cada uno de los tipos celulares que conforman el neuromasto o quizás un seguimiento mediante fotos en lapso de tiempo (time-lapse) a fin de comprobar si el neuromasto fue realmente depositado o si la ausencia de función afectó la formación del neuromasto en su totalidad.

6.1.1 Formación de las células accesorias

La ausencia de marca GFP (en las células del manto) en algunos de los neuromastos de embriones de la línea transgénica Et20 (Figura 15 y 17), inyectados con los Morfolinos para *neuroD* y/o *ath1*, abrieron la discusión de si acaso era posible que estos genes estuvieran implicados en la formación de todo el neuromasto y no sólo de las células ciliadas.

No existen evidencias contundentes de un progenitor común entre los tipos celulares que conforman el neuromasto, no obstante estudios en oído de pollo muestran un linaje común entre las células de soporte y ciliadas. Es posible por lo tanto que en el neuromasto se genere un territorio proneural inicial y que la segregación de destinos sea mediada por inhibición lateral vía señalización Notch/Delta. Sin embargo, las hibridaciones *in situ* de *neuroD* y *ath1* (Figura 6; Itoh y Chitnis, 2001) obtenidas en embriones de la línea mutante *mindbomb* sitúan a *neuroD* y *ath1* por debajo del proceso de segregación, o sea regulados por Notch/Delta, lo que no hace posible que participen en la especificación del territorio proneural, sino que los sitúa en el proceso de determinación y diferenciación de las células ciliadas.

Si *neuroD* y *ath1* no están involucrados en la formación de las células accesorias, es posible entonces que la ausencia de GFP en algunos neuromastos de "embriones morfantos", sea debido a que no fueron depositados. Si es así, el problema radica en que no se conocen los mecanismos que dirigen este proceso. No obstante, existe la hipótesis de que los niveles de proliferación dentro del primordio pueden afectar el depósito y ambos genes que estudiamos tienen conocida actividad anti-proliferativa, o más bien se sabe que su aparición provoca una salida del ciclo celular. Es probable que al inhibir la actividad de estos genes, las células del pre-proneuromasto (dentro del primordio migratorio) sigan dividiéndose, lo que de alguna manera impide la expresión de genes vinculados con proteínas de adhesión, por ejemplo, y así las células no se desprenden del primordio y no son depositadas. Sin embargo, si la ausencia de depósito de debe a un aumento en la

proliferación, deberíamos haber encontrado un mayor número de células en el primordio y quizás en los neuromastos que si fueron depositados. Queda abierta la posibilidad entonces, que los procesos de diferenciación y depósito sí estén vinculados y que la ausencia de algunos neuromastos en sus posiciones características sea producto de una desregulación de la diferenciación por la pérdida de función de *ath1* y/o *neuroD*.

6.1.2 Formación de las células ciliadas

A pesar de un posible papel de *neuroD* y *ath1* en el depósito o en la formación de las células accesorias de los neuromastos de la LL, el desarrollo de las células ciliadas es sin duda el papel principal de estos genes. Mediante tinción de células ciliadas funcionales en el embrión vivo (DiAsp; Figura 8), y tras la visualización de células ciliadas en embriones fijados con el anticuerpo anti tubulina acetilada (Figura 14), pudimos demostrar el papel esencial que ambos genes juegan en la definición de este tipo celular.

La participación de *ath1* en este proceso, no causó sorpresa. Conocida es su participación en la especificación de las células ciliadas del oído en mamíferos (Bermingham y cols., 1999; Kawamoto y cols., 2003), así como su expresión en el primordio y neuromastos de la LL (Itoh y Chitnis, 2001). Lo que sí resultó novedoso, es que *neuroD* participara en este proceso, pues no existían evidencias previas de su participación en la formación de las células ciliadas del oído o de la LL. La función de *neuroD* en el oído está dirigida a la diferenciación de las neuronas que formarán los ganglios y no a la formación de las células ciliadas (Kim y cols., 2001). Su alta expresión en el ganglio de la LL (Figura 5A-C; Andermann y cols., 2002) concuerda con estas evidencias, no obstante la ausencia de función no afectó de manera aparente la formación del ganglio ni del nervio asociado (Figuras 10, 11 y 14). Es posible entonces que *neuroD* esté participando en la formación de ambas estructuras (neuromastos y ganglio) en forma paralela y en diferentes grados. La Figura 10B nos muestra por ejemplo, que la expresión del marcador de neuronas HuC se vió disminuido en el ganglio al inyectarse el morfolino contra *neuroD* en la línea transgénica HuC-GFP, pero los demás resultados obtenidos (Figuras 10C-D, 11 y 14) nos muestran que el ganglio se formó correctamente. El efecto en la formación de las células ciliadas sin embargo, es muchísimo más marcado.

Ahora bien, *ath1* y *neuroD* parecían actuar sobre el mismo tipo celular y responder a la pérdida de función con igual penetrancia. Sin embargo, sabía que *ath1* posee una actividad

más "proneural" que *neuroD* (ver capítulo 1.4.3 Genes proneurales y neurogénicos), por lo que supuse una jerarquía de regulación que debíamos demostrar.

6.2 Jerarquías de regulación

A fin de determinar un orden de participación en la determinación del destino de célula ciliada, realizamos experimentos de rescate y sobre-expresión (Tabla 2 y Figura 16). Al analizar la incorporación de DiAsp por parte de los embriones inyectados, observamos que el cDNA de *neuroD* rescataba la ausencia de *ath1*, pero que no ocurría lo mismo al co-inyectar el morfolino de *neuroD* junto al cDNA de *ath1* (ver Tabla 2), lo que situó a *neuroD* río-abajo de *ath1*, como lo habíamos planteado. Es posible por tanto, que *ath1* esté especificando el destino hacia célula ciliada y *neuroD* sólo esté participando en el proceso de diferenciación.

Dado el grado de parentesco entre las células accesorias y ciliadas dentro del neuromasto (Fekete y cols., 1998), uno debiera esperar un aumento de células accesorias en desmedro de las células ciliadas no especificadas. Sin embargo, los marcadores de células de soporte (*claudinB* y *eya1*) y del manto (línea transgénica Et20) no mostraron un aumento sustancial en los embriones inyectados con el morfolino de *ath1*, además de no diferenciarse de lo observado en los "embriones morfantes" para *neuroD*. En el caso de sobre-expresar *ath1*, cabía esperar lo contrario: un aumento de las células ciliadas a expensas del resto de los tipos celulares que componen el neuromasto. Sin embargo, no fue lo que ví en los embriones transgénicos de la línea Et4 o en aquellos tratados con DiAsp, cuando inyecté el cDNA de *ath1* (datos no mostrados). La sobre-expresión de *ath1* si conllevó un aumento de la expresión de *neuroD*, e incluso su expresión ectópica (Figura 16), lo que confirmó la jerarquía de regulación propuesta, pero no derivó en un marcado aumento de células ciliadas dentro del neuromasto, que fuera posible observarlo con la tinción vital DiAsp o en la línea transgénica Et4. ¿Existirá entonces un gen proneural río-arriba de *ath1* y *neuroD* en la formación de los neuromastos de la LL?

6.3 Neuronas del ganglio y neuromastos mecanosensores

En el pez cebra, a diferencia de otros vertebrados, un único gen proneural, *neurogenina1*, define todos los precursores de las placodas craneales, de las cuales derivan la mayor parte de los sistemas sensoriales, incluida la LL (Andermann y cols., 2002). Supuse posible que *ngn1* fuera el gen proneural río-arriba de *ath1* y *neuroD*, y que la inyección de un morfolino contra este gen provocara la incapacidad del sistema de formar todos los tipos celulares que lo conforman. Sin embargo, la ausencia de función de *ngn1* no alteró la formación de los neuromastos ni la correcta diferenciación de sus células componentes (Andermann y cols., 2002 y mis propios resultados). Lo que sí se vió alterado, fue la formación de las neuronas del ganglio de la LL. Ambas estructuras, ganglios y neuromastos, se originan a partir de un territorio común o placoda de la LL. Existe por tanto, una segregación de las jerarquías regulatorias que controlan la formación de cada estructura, no obstante *neuroD* parece ser un blanco común en ambos sistemas.

Parece posible entonces, que existan dos genes proneurales de la LL que actúan en estos subterritorios en forma separada y que den cuenta de la definición de los destinos celulares de cada estructura, neuronas en los ganglios y células ciliadas y accesorias en los neuromastos. Propongo en base a mis resultados y evidencias de otros autores, que *ngn1* y *ath1* son los genes proneurales del sistema de la LL y que ambos actúan sobre *neuroD* (y posiblemente sobre otros genes relacionados con la definición de identidades neuronales).

Es posible sin embargo, según algunas evidencias en oído de ratón (Ma y cols., 1998; Ma y cols., 2000), que *ngn1* participe tempranamente, determinando todo el territorio sensorial y más tardíamente especificando sólo las neuronas que formarán los ganglios, de manera que su actividad en el territorio sensorial es relevada por *ath1* y así la ausencia de función de *ngn1* no altera de manera importante la formación de los parches sensoriales en el oído ni los neuromastos de la LL. Esto podría ser analizado mediante sobre-expresión de *ngn1*, lo que podría llevar a una expansión del territorio ganglionar a expensas del primordio, lo que apoyaría la hipótesis antes planteada. Es posible también, que exista otro gen proneural (diferente a *ngn1* y *ath1*), que regule la formación de todo el territorio de la LL.

6.3.1 Un comentario acerca de la sobre-expresión de un gen

La aproximación experimental de sobre-expresar artificialmente un gen, ya sea inyectando su RNA ó su DNA, resulta de mucha utilidad en el análisis funcional de dicho gen durante el desarrollo o formación de un órgano en particular. En la presente tesis permitió determinar la jerarquía regulatoria existente entre *neuroD* y *ath1* (Figura 16) así como la especificidad de acción de los morfolinós inyectados (Tabla 2). Sin embargo, cabe mencionar que no siempre es posible incluir estos experimentos en los análisis funcionales que se le realizan a un gen en particular. La inyección del RNA ó DNA de *neuroD* por ejemplo, generó la aparición de un número no despreciable de neuronas ectópicas (dato no mostrado) que podían interferir en la correcta migración del primordio o depósito de los neuromastos. Es por esto que no se incluyó en análisis de sobre-expresión de *neuroD* en esta tesis. Lo mismo ocurrió con el gen *ngn1*, que al ser inyectado en cigotos del pez cebra, provocó una alta mortandad (dato no mostrado), posiblemente por su participación en muchos otros procesos anteriores a la formación de la LL.

La ausencia de efectos morfológicos visibles con *ath1*, en el embrión del pez cebra, fue la razón de que si analizara su sobre-expresión. Su especificidad en cuanto a tipos celulares (parte del SNC, oído y LL) permitió que los embriones inyectados con su RNA ó DNA sobrevivieran hasta los 3 dpf, sin presentar además anomalías morfológicas evidentes.

6.4 Origen evolutivo de las células ciliadas y neuronas ganglionares

¿Cuál es el origen del control dual de la determinación celular de *ngn1* para las neuronas del ganglio y de *ath1* para las células ciliadas? La línea lateral de los peces (y el oído) posee similitudes importantes con los órganos mecanosensoriales de mosca, lo que sugiere un ancestro común (Adam y cols., 1998; Fritsch y cols., 2000). Existe sin embargo una gran diferencia entre los dos tipos de órganos: la función de la neurona mecanosensora presente en artrópodos ha sido subdividida en dos tipos celulares en vertebrados, la célula ciliada mecanosensorial por un lado y la neurona aferente (del ganglio) por otro. Parece posible que esta subdivisión esté reflejando la historia evolutiva y que el precursor único, presente en el ancestro común de moscas y vertebrados haya diversificado

subsecuentemente en el linaje vertebrado en dos tipos celulares descendientes (Ghysen, 2003).

Si consideramos que las células ciliadas y las neuronas aferentes derivaron de una neurona mecanosensorial ancestral (siendo así tipos celulares "hermanos"; Arendt, 2003), esto debió requerir un desacople en el programa de desarrollo de ambos tipos celulares divergentes. Ha sido propuesto que la divergencia de los genes del tipo bHLH es producto del desacople de subgrupos de neuronas, haciendo posible introducir cambios graduales en cada grupo sin desvirtuar la función del grupo (Brunet y Ghysen, 1999). La diversificación de los dos homólogos de *atonal*, *ngn1* y *ath1*, puede por lo tanto haber sido seguida por la diversificación de los dos tipos celulares hermanos, células ciliadas y neuronas aferentes, de un único precursor mecanosensor, aún encontrado en artrópodos.

Las ventajas obvias de esta diversificación incluyen la posibilidad de aumentar el número de receptores relativo al número de neuronas aferentes, de manera que se vean aumentadas la sensibilidad y la relación señal/ruido del sistema. }

6.5 Papel de *neuroD* en el desarrollo de la LL

Dada la temprana expresión del gen *neuroD* en las placodas de la LL, creí (al comienzo de esta tesis) ver un marcado proceso de diferenciación muchas horas antes del comienzo de la migración del primordio, lo que situaba a este gen en la categoría de "gen proneural" o indicaba, que en la LL, las decisiones de destino celular se tomaban muy al comienzo de su formación, y que los procesos de migración y depósito simplemente estaban encargados de distribuir neuromastos prácticamente listos. Con este razonamiento, cabía esperar que al bloquear la función de *neuroD*, y los neuromastos no lograran alcanzar el estado de diferenciación requerido, el proceso de migración se viera alterado e incluso interrumpido. Y no fue así. La migración del primordio no se vió afectada, pero los neuromastos depositados lucían aberrantes y afuncionales. ¿A qué se debía entonces la temprana expresión de *neuroD* en las placodas?

Posteriormente encontré que el transcrito de *neuroD*, se expresaba débilmente en el primordio migratorio y además en los neuromastos recién depositados. Además, que la ausencia de función de *ngn1* eliminaba la expresión de *neuroD* en el ganglio de la LL pero no afectaba la correcta formación de los neuromastos (Andermann y cols, 2002). Entonces, el

mismo gen *neuroD* estaba participando en dos lugares del mismo sistema a la vez, quizás determinando la identidad de tipos celulares diferentes.

Aún no tengo respuesta a la falta de efecto de la pérdida de función de *neuroD* en la formación del ganglio y nervio de la LL. Probablemente exista redundancia de genes encargados de la diferenciación neuronal en el ganglio, aunque tal vez la inyección del morfolino no produjo la eliminación completa de NeuroD, dada su alta expresión en este territorio, a diferencia de lo que ocurrió en los neuromastos, donde *neuroD* se expresa en pocas células y aparentemente en baja cantidad.

La participación de *neuroD* en la definición del destino de célula ciliada en el sistema de la línea lateral, río-abajo de *ath1*, y probablemente en el papel de gen de diferenciación, muestra la versatilidad de los factores de transcripción del tipo bHLH, así como la reutilización de mecanismos de regulación en diferentes sistemas y organismos.

VII. CONCLUSIONES

1. El gen *neuroD* se expresa a partir de las 11 hpf en las placodas de la línea lateral anterior y posterior.
2. El gen *neuroD* se expresa además en el primordio migratorio y en los neuromastos de la LLP hasta por lo menos las 54 hpf, último estadio analizado.
3. La ausencia de función de los genes *neuroD* ó *ath1* provoca una disminución de células ciliadas marcadas con la tinción vital DiAsp.
4. La actividad de los genes *neuroD* ó *ath1* es necesaria para la formación de las células ciliadas de los neuromastos de la línea lateral.
5. La ausencia de función de los genes *neuroD* ó *ath1* no altera la formación del ganglio y nervio de la línea lateral posterior, así como tampoco los procesos de migración del primordio y depósito de los neuromastos.
6. La pérdida de neuromastos funcionales, producto de la ausencia de función del gen *ath1*, es rescatada parcialmente por la sobre-expresión de *neuroD*.
7. La pérdida de neuromastos funcionales producto de la ausencia de función del gen *neuroD* no es rescatada por la sobre-expresión de *ath1*.
8. La sobre-expresión de *ath1* genera la expresión ectópica del transcrito del gen *neuroD*.
9. La sobre-expresión de *neuroD* no altera la expresión del gen *ath1*.
10. Postulamos que el gen *ath1* actúa río-arriba del gen *neuroD*, regulándolo positivamente.

11. El siguiente esquema resume las novedades aportadas por este trabajo de tesis en el entendimiento de la formación de la LLP del pez cebra:

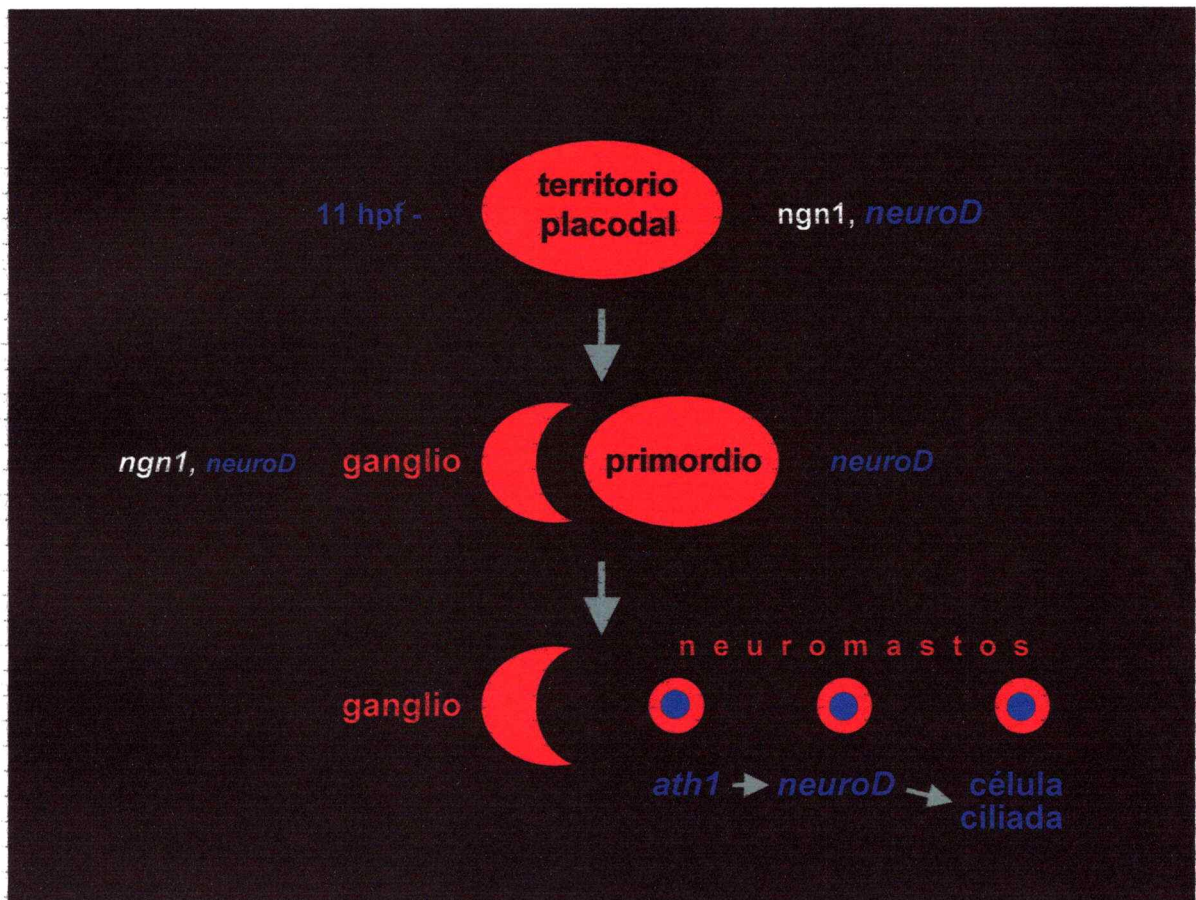


Figura 18. Esquema resumen. Esquema que muestra la expresión de genes asociada a la formación de los precusores de los neuromastos de la línea lateral posterior. Se muestran en azul los datos originales producidos en esta tesis.

VIII. REFERENCIAS

- Adam, J., Myat, A., Le Roux, I., Eddison, M., Henrique, D., Ish-Horowicz, D., Lewis, J., 1998. Cell fate choices and the expression of Notch, Delta and Serrate homologues in the chick inner ear: parallels with *Drosophila* sense-organ development. *Development* 125, 4645-4654.
- Adamska, M., Léger, S., Brand, M., Hadrys, T., Braun, T., Bober, E. 2000. Inner ear and lateral line expression of a zebrafish *nkx5.1* gene and its downregulation in the ears of FGF8 mutant, *ace*. *Mech Dev* 97, 161-165.
- Akimenko, M. A., Ekker, M., Wegner, J., Lin, W., Westerfield, M. 1994. Combinatorial expression of three zebrafish genes related to *Distal-less*: Part of a homeobox gene code for the head. *J Neurosci* 14, 3475-3486.
- Andermann, P., Ungos, J., Raible, D. 2002. *Neurogenin1* defines zebrafish cranial sensory ganglia precursors. *Dev Biol* 251, 45-58.
- Arendt, D., 2003. Evolution of eyes and photoreceptor cell types. *Int. J. Dev. Biol.* 47,563-571.
- Baker, C. V. H. y Bronner-Fraser, M. 2001. Vertebrate cranial placodes I. Embryonic induction. *Dev Biol* 232, 1-61.
- Bang, P. I., Sewell, W. F., Malicki, J. J. 2001. Morphology and cell type heterogeneities of the inner ear epithelia in adult and juvenile zebrafish (*Danio rerio*). *J Comp Neurol* 438, 173-190.
- Bermingham, N. A., Hassan, B. A., Price, S. D., Vollrath, M. A., Ben-Arie, N., Eatock, R. A., Bellen, H. J., Lysakowski, A., Zoghbi, H. Y. 1999. *Math1*: an essential gene for the generation of inner ear hair cells. *Science* 284, 1837-1841.
- Brugmann, S. A., Moody, S. A. 2005. Induction and specification of the vertebrate ectodermal placodes: precursors of the cranial sensory organs. *Biol Cell* 97, 303-319.
- Brunet, J. F., Ghysen, A. 1999. Deconstructing cell determination: proneural genes and neuronal identity. *Bioessays* 21, 313-318.
- Chen, P., Johnson, J.E., Zoghbi, H.Y., Segil, N., 2002. The role of *Math1* in inner ear development: Uncoupling the establishment of the sensory primordium from hair cell fate determination. *Development* 129, 2495-2505.
- Chong, S. W., Emelyanov, A., Gong, Z., Korzh, V. 2001. Expression pattern of two zebrafish genes, *cxcr4a* and *cxcr4b*. *Mech Dev* 109, 347-354.
- Collazo, A., Fraser, S., Mabee, P. 1994. A dual embryonic origin for the vertebrate mechanoreceptors. *Science* 264, 426-430.

Cornell, R.A., Eisen, J.S., 2002. Delta/Notch signaling promotes formation of zebrafish neural crest by repressing Neurogenin 1 function. *Development* 129, 2639-2648.

David, N., Sapede, D., Saint-Etienne, L., Thisse, C., Thisse, B., Dambly-Chaudière, C., Rosa, F., Ghysen, A. 2002. Molecular basis of cell migration in the fish lateral line: Papele of the chemokine receptor CXCR4 and of its ligand, SDF1. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 16297-16302.

Dijkgraaf, S. 1989. A short personal review of the history of lateral line research. In Coombs, S., Gömer, P. And Münz, H. (eds.). *Mechanosensory lateral line: Neurobiology and Evolution*. Springer-Verlag, New York, pp. 7-14.

Erkman, L., McEvilly, R.J., Luo, L., Ryan, A.K., Hooshmand, F., O'Connell, S.M., Keithley, E.M., Rapaport, D.H., Ryan, A.F., Rosenfeld, M.G., 1996. Role of transcription factors Brn-3.1 and Brn-3.2 in auditory and visual system development. *Nature* 381, 603-606.

Fekete, D. M., Muthukumar, S., Karagozeos, D. 1998. Hair cells and supporting cells share a common progenitor in the avian inner ear. *J Neurosci* 18, 7811-7821.

Fritsch, B., Beisel, K. W., Bermingham, N. A. 2000. Developmental evolutionary biology of the vertebrate ear: conserving mechanoelectric transduction and developmental pathways in diverging morphologies. *NeuroReport* 11, 1-10.

Ghysen, A. 2003. The origin and evolution of the nervous system. *Int J Dev Biol* 47, 555-562.

Ghysen, A., Dambly-Chaudière, C. 1988. From DNA to form: the achaete-scute complex. *Genes Dev* 2, 495-501.

Ghysen, A., Dambly-Chaudière, C. 2004. Development of the zebrafish lateral line. *Curr Opin Neurobiol* 14, 67-73.

Ghysen, A., Dambly-Chaudière, C. 2005. The three-sided romance of the lateral line: glia love axons love precursors love glia. *Bioessays* 27, 488-494.

Gilmour, D. T., Maischein, H. M., Nüsslein-Volhard, C. 2002. Migration and function of a glial subtype in the vertebrate peripheral nervous system. *Neuron* 34, 577-588.

Gilmour, D., Knaut, H., Maischein, H. M., Nüsslein-Volhard, C. 2004. Towing of sensory axons by their migrating target cells *in vivo*. *Nat Neurosci* 7, 491-492.

Gompel, N., Cubedo, N., Thisse, C., Thisse, B., Dambly-Chaudière, C., Ghysen, A. 2001. Pattern formation in the lateral line of zebrafish. *Mech Dev* 105, 69-77.

Gompel, N. 2001. Quelques aspects du développement de la ligene latérale chez le poisson-zèbre *Danio rerio* (Hamilton, 1822), (Actinoptérogien, Cypridinae). Tesis conducente al grado de Docteur de l'Université Montpellier II, pp. 40.

Graham y Begbie, 2000. Neurogenic placodes: a common front. *Trends Neurosci* 23, 313-316.

Grant, K.A., Raible, D.W., Piotrowski, T., 2005. Regulation of latent sensory hair cell precursors by glia in the zebrafish lateral line. *Neuron* 45, 69-80.

Hammond, K. L., Hill, R. E., Whitfield, T. T., Currie, P. D. 2002. Isolation of three zebrafish dachshund homologues and their expression in sensory organs, the central nervous system and pectoral fin buds. *Mech Dev* 112, 183-189.

Henrique D, Adam J, Myat A, Chitnis A, Lewis J, Ish-Horowicz D. , 1995. Expression of a Delta homologue in prospective neurons in the chick. *Nature*. 375:787-790.

Itoh, M., Kim, C. H., Palardy, G., Oda, T., Jiang, Y. J., Maust, D., Yeo, S. Y., Lorick, K., Wright, G. J., Ariza-McNaughton, L., Weissman, A. M., Lewis, J., Chandrasekharappa, S. C., Chitnis, A. B. 2003. Mind bomb is a ubiquitin ligase that is essential for efficient activation of Notch signaling by Delta. *Dev Cell* 4, 67-82.

Itoh, M. & Chitnis, A. 2001. Expression of proneural and neurogenic genes in the zebrafish lateral line primordium correlates with selection of hair cell fate in neuromasts. *Mech Dev* 102, 263-266.

Jeffery, W., Strickler, A., Guiney, S., Heyser, D., Tomarev, S. 2000. Prox 1 in eye degeneration and sensory organ compensation during development and evolution of the cavefish *Astyanax*. *Dev Genes Evol* 210, 223-230.

Jiang, Y. J., Brand, M., Heisenberg, C. P., Beuchle, D., Furutani-Seiki, M., Kelsh, R. N., Warga, R. M., Granato, M., Haffter, P., Hammerschmidt, M., Kane, D. A., Mullins, M. C., Odenthal, J., van Eeden, F. J., Nusslein-Volhard, C. 1996. Mutations affecting neurogenesis and brain morphology in the zebrafish, *Danio rerio*. *Development* 123, 205-216.

Kawamoto, K., Ishimoto, S., Minoda, R., Brough, D.E., Raphael, Y., 2003. *Math1* gene transfer generates new cochlear hair cells in mature guinea pigs *in vivo*. *J. Neurosci.* 23, 4395-4400.

Kelsh, R. N., Brand, M., Jiang, Y. L., Heisenberg, C. P., Lin, S., Haffter, P., Odenthal, J., Mullins, M. C., van Eeden, F. J., Furutani-Seiki, M., Granato, M., Hammerschmidt, M., Kane, D. A., Warga, R. M., Beuchle, D., Vogelsang, L., Nüsslein-Volhard, C. 1996. Zebrafish pigmentation mutations and the processes of neural crest development. *Development* 123, 369-389.

Kim, C.H., Bae, Y.K., Yamanaka, Y., Yamashita, S., Shimizu, T., Fujii, R., Park, H.C., Yeo, S.Y., Huh, T.L., Huh, T.L., Hibi, M., Hirano, T., 1997. Overexpression of neurogenin induces ectopic expression of HuC in zebrafish. *Neurosci. Lett.* 239, 113-116.

Kim, W.Y., Fritsch, B., Serls, A., Bakel, L., Huang, E., Reichardt, L., Barth, D., Lee, J., 2001. NeuroD-null mice are deaf due to a severe loss of the inner ear sensory neurons during development. *Development* 128, 417-426.

Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel S.R., Ullmann, B., Schilling, T.F., 1995. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn.* 203, 253-310.

Kobayashi, M., Osanai, H., Kawakami, K., Yamamoto, M. 2000. Expression of three zebrafish Six4 genes in the cranial sensory placodes and the developing somites. *Mech Dev* 98, 151-155.

Kollmar, R., Nakamura, S.K., Kappler, J.A., Hudspeth, A.J., 2001. Expression and phylogeny of claudins in vertebrate primordial. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 10196-10201.

Korzh, V., Sleptsova, I., Liao, J., He, J., Gong, Z. 1998. Expression of zebrafish bHLH genes *ngn1* and *nrd* defines distinct stages of neural differentiation *Dev Dyn* 213, 92-104.

Kozlowski, D. J., Whitfield, T. T., Hukriede, N. A., Lam, W. K., Weinberg, E. S. 2005. The zebrafish *dog-eared* mutation disrupts *eya1*, a gene required for a cell survival and differentiation in the inner ear and lateral line. *Dev Biol* 277, 27-41.

Kroese, A. B. A., van Netten, S. M. 1989. Sensory transduction in lateral line hair cells. In En Coombs, S., Gömer, P. And Münz, H. (eds.). *Mechanosensory lateral line: Neurobiology and Evolution*. Springer-Verlag, New York, pp. 265-284.

Laguerre, L., Soubiran, F., Ghysen, A., König, N., Dambly-Chaudière, C. 2005. Cell proliferation in the developing lateral line system of zebrafish embryos. *Dev Dyn* 233, 466-472.

Ledent, V. 2002. Postembryonic development of the posterior lateral line in zebrafish. *Development* 129, 597-604.

Lee, J., Hollenberg, S., Snider, S., Turner, D., Lipnick, N., Weintraub, H. 1995. Conversion of *Xenopus* ectoderm into neurons by Neuro-D, a basic helix-loop-helix protein. *Science* 268, 836-844.

Lee, J. 1997. Basic helix-loop-helix genes in neural development. *Curr Opin Neurobiol* 7, 13-20.

Li, Q., Shirabe, K., Kuwada, J. Y. 2004. Chemokine signaling regulates sensory cell migration in zebrafish. *Dev Biol* 269, 123-136.

López-Schier, H., Hudspeth, A. J. 2005. Supernumerary neuromasts in the posterior lateral line of zebrafish lacking peripheral glia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 1496-1501.

López-Schier, H., Starr, C. J., Kappler, J. A., Kollmar, R., Hudspeth, A. J. 2004. Directional cell migration establishes the axes of planar polarity in the posterior lateral-line organ of the zebrafish. *Dev Cell* 7, 401-412.

Ma, Q., Kintner, C., Anderson, D. J. 1996. Identification of neurogenin, a vertebrate neuronal determination gene. *Cell* 87, 43-52.

Ma, Q., Chen, Z., del Barco, I., de la Pompa, J., Anderson, A. **1998**. *neurogenin1* is essential for the determination of neuronal precursors for proximal cranial sensory ganglia. *Neuron* 20, 469-482.

Ma, Q., Anderson, D. J., Fritsch, B. **2000**. Neurogenin 1 null mutant ears develop fewer, morphologically normal hair cells in smaller sensory epithelia devoid of innervation. *J Assoc Res Otolaryngol* 1, 129-143.

McCormick, C. A. **1989**. Central lateral line mechanosensory pathways in bony fish. En: En Coombs, S., Görner, P. And Münz, H. (eds.). *Mechanosensory lateral line: Neurobiology and Evolution*. Springer-Verlag, New York, pp. 341-364.

Mendonsa, E. S., Riley, B. B. **1999**. Genetic analysis of tissue interactions required for otic placode induction in the zebrafish. *Dev Biol* 206, 100-112.

Metcalfe, W. K. **1985**. Sensory neuron growth cones comigrate with posterior lateral line primordium in zebrafish. *J Comp Neurol* 238, 218-224.

Metcalfe, W. K., Kimmel, C. B., Schabtach, E. **1985**. Anatomy of the posterior lateral line system in young larvae of the zebrafish. *J Comp Neurol* 233, 377-389.

Metscher, B. D., Northcutt, R. G., Gardiner, D. M., Bryant, S. V. **1997**. Homeobox genes in axolotl lateral line placodes and neuromasts. *Dev Genes Evol* 207, 287-295.

Montgomery, J., Coombs, S. y Halstead, M. **1995**. Biology of the mechanosensory lateral line in fishes. *Rev Fish Biol Fish* 5, 399-416.

Nasevicius, A. & Ekker, S. **2000**. Effective targeted gene "knockdown" in zebrafish. *Nat Genet* 26, 216-220.

Northcutt, R. G. **1989**. The phylogenetic distribution and innervation of craniate mechanoreceptive lateral lines. En: En Coombs, S., Görner, P. And Münz, H. (eds.). *Mechanosensory lateral line: Neurobiology and Evolution*. Springer-Verlag, New York, pp. 17-78.

Northcutt, R. G., Catania, K. C., Criley, B. B. **1994**. Development of lateral line organs in the axolotl. *J Comp Neurol* 340, 480-514.

Parinov, S., Kondrichin, I., Korzh, V., Emelyanov, A. **2004**. *Tol2* transposon-mediated enhancer trap to identify developmentally regulated zebrafish genes *in vivo*. *Dev. Dyn.* 231, 449-459.

Perron, M., Opdecamp, K., Butler, K., Harris, W., Bellefroid, E., **1999**. *X-ngnr-1* and *Xath3* promote ectopic expression of sensory neuron markers in the neurula ectoderm and have distinct inducing properties in the retina. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 14996-15001.

Popper, A. N., Platt, C. **1993**. Inner ear and lateral line. In Evans, D. H. (editor). *The physiology of fishes*. CRC Press, Florida, USA, pp. 99-136.

Raible, D.W. and Kruse, G.J., 2000. Organization of the lateral line system in embryonic zebrafish. *J. Comp. Neurol.* 421, 189-198.

Roberts, B. L. y Meredith, G. E. 1989. The efferent system. En Coombs, S., Görner, P. And Münz, H. (eds.). *Mechanosensory lateral line: Neurobiology and Evolution*. Springer-Verlag, New York, pp. 445-459.

Romani, S., Campuzano, S., Macagno, E. R., Modolell, J. 1989. Expression of achaete and scute genes in *Drosophila* imaginal discs and their function in sensory organ development. *Genes Dev* 3, 997-1007.

Sahly, I., Andermann, P., Petit, C. 1999. The zebrafish *eya1* gene and its expression pattern during embryogenesis. *Dev Genes Evol* 209, 399-410.

Sapède, D., Gompel, N., Dambly-Chaudière, C., Ghysen, A. 2002. Cell migration in the postembryonic development of the fish lateral line. *Development* 129, 605-615.

Schier, A. F., Neuhauss, S. C., Harvey, M., Malicki, J., Solnica-Krezel, L., Stainier, D. Y., Zwartkuis, F., Abdelilah, S., Stemple, D. L., Rangini, Z., Yang, H., Driever, W. 1996. Mutations affecting the development of the embryonic zebrafish brain. *Development* 123, 165-178.

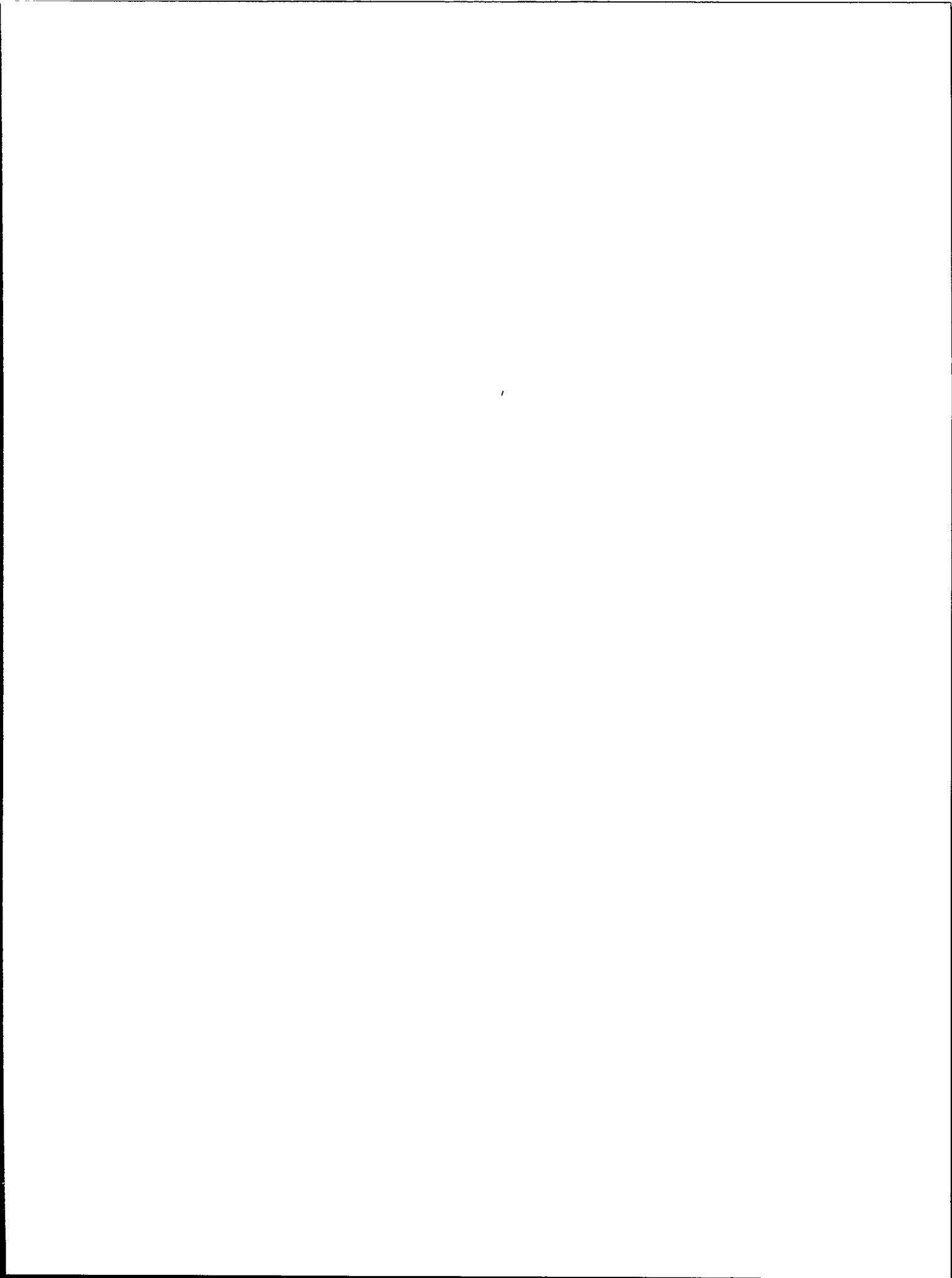
Schlosser, G., Northcutt, R. G., 2000. Development of neurogenic placodes in *Xenopus laevis*. *J Comp Neurol* 418, 121-146.

Schlosser, G., Northcutt, R. G. 2001. Lateral line placodes are induced during neurulation in the axolotl. *Dev Biol* 234, 55-71.

Westerfield, M., 1994. *The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio)* Eugene, University of Oregon Press.

Whitfield, T. T., Granato, M., van Eeden, F. J., Schach, U., Brand, M., Furutani-Seike, M., Haffter, P., Hammerschmidt, M., Heisenberg, C. P., Jiang, Y. J., Kane, D. A., Kelsh, R. N., Mullins, M. C., Odenthal, J., Nusslein-Volhard, C. 1996. Mutations affecting development of the zebrafish inner ear and lateral line. *Dev* 123, 241-254.

Williams, J. A., Holder, N. 2000. Cell turnover in neuromasts of zebrafish larvae. *Hear Res* 143, 171-181.





Proneural gene requirement for hair cell differentiation in the zebrafish lateral line

Andrés F. Sarrazin^a, Eduardo J. Villablanca^a, Viviana A. Nuñez^a, Pablo C. Sandoval^a,
Alain Ghysen^b, Miguel L. Allende^{a,*}

^a Millennium Nucleus in Developmental Biology, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Casilla 653, Santiago, Chile

^b INSERM, E343 and Université Montpellier II, cc103, Place E. Bataillon 34095 Montpellier, France

Received for publication 16 September 2005; revised 16 March 2006; accepted 28 March 2006

Available online 4 April 2006

Abstract

The lateral line system comprises an array of mechanosensory organs, the neuromasts, distributed over the body surface. Each neuromast consists of a patch of mechanosensory hair cells surrounded by support cells. We show that, in the zebrafish, two proneural genes are essential for differentiation of the hair cells, *neuroD* (*nrd*) and *atonal homolog 1* (*ath1*). Gene knockdown experiments demonstrate that loss of function of either gene, but not of the related proneural gene *neurogenin1* (*ngn1*), abrogate the appearance of hair cell markers. This is in contrast to other sensory systems, such as the neurons of the lateral line ganglion, where *nrd* is regulated by *ngn1* and not by *ath1*. Overexpression of *ath1* can induce *nrd*, and the phenotype produced by loss of *ath1* function can be partially rescued by injection of *nrd* mRNA. This supports the conclusion that the activation of *nrd* probably requires *ath1* in the hair cell lineage, whereas in sensory neurons *nrd* activation requires *ngn1*. We propose that the emergence of two *atonal* homologs, *ath1* and *ngn1*, allowed the cellular segregation of mechanoreception and signal transmission that were originally performed by a single cell type as found in insects.

© 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Lateral line; Neuromasts; Hair cells; Proneural genes; bHLH; Atonal homolog; NeuroD

Introduction

The generation of neurons in vertebrates involves the sequential expression of genes that promote the acquisition of neuronal identity and terminal differentiation. Among the most well-known genes that participate in this process are the proneural genes (reviewed in Bertrand et al., 2002). Proneural genes were originally identified in *Drosophila* as providing groups of cells with the potential to become sense organ precursors (Ghysen and Dambly-Chaudière, 1989). They code for transcription factors of the basic helix–loop–helix (bHLH) class (Murre et al., 1989) that are generally involved in neurogenesis (Villares and Cabrera, 1987). Two major families of proneural genes are known in vertebrates, the *Achaete–Scute* family and the *Atonal* family which includes the *atonal homolog* (*ath*), *neurogenin* (*ngn*) and *neuroD* (*nrd*) classes. bHLH proneural genes belonging to the two major families

have been identified subsequently in a wide range of multicellular animals.

The gene *nrd* is expressed in the central and peripheral nervous systems in vertebrates and has the capacity to induce neuronal differentiation in *Xenopus* (Lee et al., 1995; Lee, 1997). It is also expressed strongly in pancreatic cells where it regulates development of endocrine cells (Naya et al., 1997). In the mouse CNS, *nrd* is required for the formation of granule cells in the hippocampus and the cerebellum (Miyata et al., 1999) and for the formation of sensory neurons in the inner ear. One of the phenotypes of a mouse *nrd* null mutant is deafness (Kim et al., 2001).

Gain and loss of function studies have suggested that the neuronal expression of *nrd* is regulated by *ngn*, possibly directly (Ma et al., 1996, 1998; Fode et al., 1998; Perron et al., 1999; Andermann et al., 2002). *nrd* is expressed mostly in postmitotic cells (Cau et al., 1997; Korzh et al., 1998; Mueller and Wullmann, 2002; Cau and Wilson, 2003) and may be required for terminal differentiation rather than for neuronal precursor commitment.

* Corresponding author. Fax: +56 2 276 3802.

E-mail address: allende@uchile.cl (M.L. Allende).

The *atonal* family of genes plays a major role in the development of the auditory system of vertebrates. Loss of function analysis of *neurogenin* has shown that it is required for formation of the inner ear ganglion in mammals (Ma et al., 1998, 2000), while the mouse *atonal* homolog 1 gene *Math1* is required for the formation of hair cells (Bermingham et al., 1999; Ben-Arie et al., 2000). Overexpression of *Math1* is sufficient to induce the appearance of ectopic hair cells in the inner ear and can rescue hair-cell-deficient mice (Shou et al., 2003; Kawamoto et al., 2003).

We are interested in neuronal development in the fish lateral line, a mechanosensory organ involved in the detection of displacement waves in the water and which allows for schooling behaviors and predator or prey detection (Partridge and Pitcher, 1980; Coombs et al., 1989). The lateral line (LL) system arises from ectodermal placodes, as does the inner ear. Lateral line placodes develop anterior and posterior to the otic placode, generating, respectively, the anterior and posterior lateral line systems (ALL and PLL; Metcalfe et al., 1985; Andermann et al., 2002). The PLL placode gives rise to two cell populations: a stationary population which forms the PLL ganglion, and a migratory component which will deposit regularly spaced clusters of cells, the proneuromasts, along its way from the otic region to the tip of the tail (Metcalfe et al., 1985; Gompel et al., 2001). Deposited cells will differentiate as hair cells and accessory cells of two types: inner accessory (support) cells that surround the hair cells and a rim of outer accessory (mantle) cells.

In zebrafish, neurogenic and proneural genes are expressed in the lateral line components and some of these have been analyzed functionally. *neurogenin1* (*ngn1*) is essential for the development of the sensory neurons of most of the cranial ganglia, including those innervating the lateral line. In the PLL placode, *ngn1* precedes the expression of *nr2f*, and *nr2f* is strongly downregulated following injection of an antisense morpholino against *ngn1* (Andermann et al., 2002). This suggests that, as in other vertebrate systems, *nr2f* acts downstream of *ngn1*. Interestingly, a residual expression of *nr2f* is nevertheless observed after complete loss of function of *ngn1* (Andermann et al., 2002). The gene *atonal* homolog 1 (*ath1*; Kim et al., 1997) is not detectably expressed in the PLL placode but can be observed in the PLL migrating primordium and in developing neuromasts (Itoh and Chitnis, 2001). In the *mindbomb* mutant, in which the Notch signaling pathway is disrupted (Itoh et al., 2003), there is ectopic expression of *ath1* and differentiation of supernumerary hair cells in PLL neuromasts (Itoh and Chitnis, 2001). Thus, genes of the *atonal* family seem to be involved in lateral line development, but their precise functions remain unclear.

In this work, we show that, in addition to *ath1*, *nr2f* is also expressed in the lateral line neuromasts. We show that *nr2f* is upregulated in the migrating PLL primordium in *mindbomb* mutants, much as is the case for *ath1*. We find that loss of function of either *nr2f* or *ath1* results in a loss of hair cells, while the inactivation of two other proneural genes, *ngn1* and *achaete-scute homolog 1a* (*ash1a*), has no effect on hair cell determination or differentiation. Finally, rescue experiments

lead us to propose that, in lateral line hair cell precursors, *nr2f* is regulated by *ath1* rather than by *ngn1* as in all other systems studied so far.

Materials and methods

Fish and embryos

Zebrafish mutant and wild type embryos were collected from natural matings and kept at 28°C; stages are referred to as in hours post-fertilization, hpf. *mindbomb* mutants were a kind gift of Dr. Ajay Chitnis (NIH, Bethesda), transgenic lines ET4 and ET20 (Parinov et al., 2004) were kindly provided by Dr. Vladimir Korzh (IMCB, Singapore). All embryos were raised at 28°C and staged according to Kimmel et al. (1995). After 24 hpf, larvae were maintained in 0.03% phenylthiourea to prevent melanin pigment formation (Westerfield, 1994).

Cell labeling and microscopy

The neuromast hair cells were labeled in live embryos or larvae with 4-(4-diethylaminostyryl)-N-methylpyridinium iodide (Di-Asp; Sigma D3418, USA) as described in Collazo et al. (1994). For live staining, 48–72 hpf larvae were incubated in 5 mM Di-Asp in embryo medium for 5 min and then rinsed with fresh medium and visualized under fluorescent light in a dissection microscope. We counted Di-Asp-stained neuromasts on both sides of the larvae when evaluating the effects of perturbing gene activity, and, thus, each side was counted as an independent result. The embryonic PLL usually comprises 5 lateral neuromasts (very rarely 4 or 6) aligned along the horizontal myoseptum and 2–3 terminal neuromasts (very rarely one) in a more ventral position at the tip of the tail. The total number of neuromasts is therefore 7–8 per side in more than 90% of the embryos. To take into account the rare occurrence of embryos with 5 neuromasts on one side (4 lateral and one terminal) in wild type populations, we classified as “normal” any side with 5–8 neuromasts, “subnormal” those with 1–4 neuromasts and “abnormal” sides where no PLL neuromasts have formed. For carrying out statistical tests, we used as data the number of neuromasts counted per side in all groups of embryos and compared them within experiments (see Table 1). To determine significance of differences, we used the Student's *t* test (SigmaStat 3.1).

To trace the PLL nerve, 30 hpf embryos were fixed overnight in 4% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS). DiI (1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate; Molecular Probes, Eugene, OR) injection in fixed embryos was performed as described in David et al. (2002).

The posterior lateral line primordium and neuromasts were visualized in live or fixed animals under Nomarski optics using a Model III Zeiss Photomicroscope. In situ hybridized and antibody-stained embryos were post-fixed in 4% paraformaldehyde and transferred into glycerol for observation. Live embryos and larvae treated with Di-Asp were visualized in a Leica MZ12 fluorescence dissecting microscope in embryo medium.

Antibody staining and in situ hybridization

Embryos were staged and fixed overnight in 4% paraformaldehyde in PBS. Whole mount immunocytochemistry was performed as follows: embryos were rinsed three times for 5 min in PBS, washed one time for 1 h in distilled water, incubated for 7 min in acetone, washed one time in distilled water, two times for 5 min in PBS plus Tween-20 (polyoxyethylene-sorbitan monolaurate; Sigma, USA) and transferred to blocking solution (20% lamb serum, 1% dimethylsulfoxide, 0.1% Tween-20 in PBS) for 1 h. Embryos were then incubated overnight at 4°C with a mouse monoclonal anti-acetylated tubulin antibody (Sigma, USA) used at a 1:1000 dilution or with anti-HuC (Invitrogen) at 1:1000. They were then washed 4 times for 25 min in PBS plus Tween-20, incubated for 30 min in blocking solution and incubated overnight at 4°C in anti-mouse Ig, horseradish-peroxidase-linked whole antibody (Amersham Pharmacia Biotech, UK) diluted 1:200 in blocking solution. They were then rinsed four times for 20 min in PBS plus Tween 20, transferred to peroxidase staining solution (30 mg

Table 1
Loss of proneural gene function affects posterior lateral line hair cell development in zebrafish

	Normal (5–8-nm)	Subnormal (1–4 nm)	Abnormal (0 nm)
Controls ($P = 0.066$)			
No injection (58 embryos)	97%	3%	0%
<i>ash1a</i> MO ^a (75 embryos)	95%	5%	0%
Experiment 1 ($P < 0.001$)			
<i>nrd</i> MO (78 embryos)	22%	47%	31%
<i>nrd</i> MO co-injected with <i>nrd</i> (71 embryos)	68%	18%	14%
Experiment 2 ($P < 0.002$)			
<i>ath1</i> MO (53 embryos)	34%	55%	11%
<i>ath1</i> MO co-injected with <i>nrd</i> (46 embryos)	61%	37%	2%
Experiment 3 ($P = 0.051$)			
<i>nrd</i> MO (52 embryos)	50%	50%	0%
<i>nrd</i> MO co-injected with <i>ath1</i> (64 embryos)	52%	41%	7%

Embryos were injected with morpholino (MO) or with morpholino plus a DNA expression construct as indicated. They were raised to 72 hpf and stained with the vital dye Di-Asp. Labeled neuromasts (nm) were counted on each side for each larva. Larval sides were classified according to the severity of the effect: "normal" had between 5 and 8 neuromasts; "subnormal" had between 1 and 4 neuromasts; "abnormal" completely lacked neuromasts. Shown are the percentages for each category in the different experiments. Three different experiments were carried out; comparisons for rescue should be made within an experiment to eliminate differences in penetrance of the effect of the morpholinos that occur between experiments. To calculate significance values (P), we counted, for each side, the number of neuromasts present and compared the two conditions indicated in each experiment. Note that rescue is obtained by co-injecting the *nrd*MO with *nrd* ($P < 0.001$) and the *ath1*MO with *nrd* ($P < 0.002$), but not the *nrd*MO with *ath1* ($P = 0.051$).

^a Injection of the *ash1a* morpholino does not affect formation of the posterior lateral line in zebrafish embryos and was used as an injection control.

diaminobenzidine in 100 mL water) for 30 min and then to peroxidase staining solution containing 0.003% H₂O₂. After the product of the peroxidase reaction was detected, the embryos were rinsed three times in PBS.

Whole mount in situ hybridization was performed essentially as described in Jowett and Lettice (1994). Riboprobes were synthesized from template plasmids including *ngn1* (Blader et al., 1997; Kim et al., 1997; Korzh et al., 1998), *nrd* (Blader et al., 1997; Korzh et al., 1998), *ath1* (Kim et al., 1997), *eya1* (Sahly et al., 1999) and *claudinB* (Kollmar et al., 2001). For detection of *nrd* expression, we used a hybridization temperature of 58°C and we used a longer staining time (4–6 h at room temperature or overnight at 4°C). In all cases, control probes were negative for specific staining.

Constructs and antisense morpholinos

To generate an *nrd-myc* fusion construct, we used the full-length *nrd* cDNA (Blader et al., 1997) as a template for a PCR reaction. The primers contain a *Bam*HI site (upstream primer, contains the ATG, in bold below) and a *Cla*I site (downstream primer which mutates the stop codon). Their sequences are, respectively:

5' CTAGGGATCCGACATGACGAAGTCATAC 3' and
5' AGGATCGATAGTCGTGAAATATCGC 3'

This PCR product was cloned into the pGEM vector (Promega, Madison, WI, USA) by TA cloning, digested with *Bam*HI and *Cla*I and subcloned into the pCS2MT expression vector, generating the plasmid construct pCS2*nrd*MT.

A similar approach was used to generate an *ath1* expression construct, also cloned by introducing *Bam*HI and *Cla*I sites and inserting into pCS2MT to

generate plasmid pCS2*ath1*MT. Forward (sequence upstream of the ATG) and reverse primers were:

5' CCGTCCCTGGATCCATAGCCAC 3' and
5' GTATCGATCGCACTTCAGTGAGG 3'.

The *neurogenin1* morpholino (*ngn1*MO) was kindly provided by Dr. Robert Cornell (Cornell and Eisen, 2002). *nrd*, *ath1* and *ash1a* antisense morpholino oligonucleotides (*nrd*MO, *ath1*MO and *ash1a*MO respectively) were synthesized by Gene Tools (Philomath, OR, USA). All morpholinos were directed against the 5' region of the mRNA; triplets complementary to the ATG initiation codons are indicated in bold in the sequences (the *ath1*MO is complementary to the sequence just upstream of the ATG). The sequences of the antisense morpholino oligonucleotides used were:

5' TGACTTCGTCATGTCGGAAGTCTAG 3' (*nrd*MO)
5' TCTGTTGGTTTGTGCTTTTGGGAGG 3' (*ath1*MO)
5' CCATCTGGCGGGTGAATGCCATTTTC 3' (*ash1a*MO)
5' TATACGATCTGCATTTGTTGATAACC 3' (*ngn1*MO)

Note that the *nrd*MO should not bind to the RNA expressed from the pCS2*nrd*MT construct as there are 7 mismatches out of 25 bases (sequence upstream of the *Bam*HI site is lost after cloning in the pCS2 vector). For inhibiting gene function, 8.5 ng of morpholino oligonucleotide was injected into each embryo. In the rescue experiments, 4.25 ng of either the *nrd* or *ath1* morpholinos was co-injected with 125 µg of the pCS2*nrd*MT or pCS2*ath1*MT plasmids, per embryo.

Results

Expression of *nrd* in the zebrafish posterior lateral line

NeuroD (*nrd*) is a bHLH proneural gene implicated in neuronal differentiation. We investigated whether this gene is involved in the acquisition of neuronal identity and/or differentiation of PLL hair cells and sensory neurons. We examined the expression pattern of *nrd* in the different components of the PLL: placode, ganglion, primordium, proneuromasts and neuromasts, using in situ hybridization. We detected *nrd* transcripts beginning at 11 hpf in the brain and PLL placode and subsequently in the PLL ganglia, as described previously (Andermann et al., 2002). However, we were not able to detect expression in the lateral line primordium or neuromasts using our standard in situ hybridization protocol. As we had evidence from loss of function studies that *nrd* participates in hair cell development (see below), we forced the conditions of the in situ hybridization protocol to detect low levels of transcript. These became apparent only after modifying the hybridization and staining conditions (see Materials and methods) which also introduced high levels of background staining. Under these conditions, low levels of *nrd* expression were detected in deposited PLL neuromasts (Fig. 1A). Close inspection of neuromasts with higher magnification shows that *nrd* mRNA is localized to a group of 3–6 cells in the center of each neuromast (Figs. 1C–E), similar to what is observed with expression of the proneural gene *atonal homolog 1* (*ath1*) (Itoh and Chitnis, 2001). We were not able to detect expression of *nrd* in the migrating PLL primordium under these conditions.

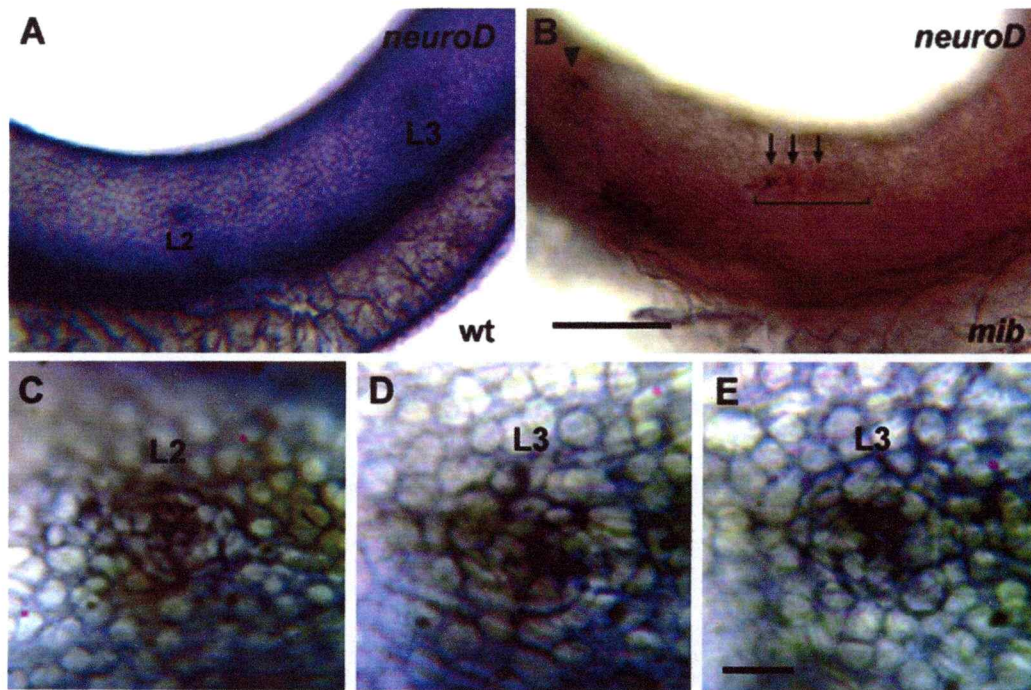


Fig. 1. Expression of *nrd* in the posterior lateral line system. *nrd* mRNA expression in wild type (A, C–E) or *mindbomb* mutant (B) embryos, detected by in situ hybridization. (A) *nrd* expression in the PLL neuromasts is detected when embryos are overstained. Indicated are the L2 and L3 neuromasts of a 42 hpf embryo. (B) *nrd* expression is observed in *mindbomb* 30 hpf embryos, in neuromasts (arrowhead) and often as clusters (arrows) in the migratory primordium (bracket) without the need for overstaining. (C–E) Close up images of neuromasts of wild type 42 hpf embryos labeled with the *nrd* riboprobe. All panels: lateral views, anterior to the left. Scale bar in B: 100 μ M for A and B; scale bar in E: 10 μ M for C–E.

In *mindbomb* (*mib*) mutants, there is an initial overproduction of hair cells in the ear and in LL neuromasts (Haddon et al., 1998), which is accompanied by increased expression of *ath1* in the primordium and neuromasts (Itoh and Chitnis, 2001). To determine whether this overproduction of hair cells is also preceded by increased expression of *nrd*, we performed in situ hybridization on homozygous *mib* embryos. *mib* embryos were fixed at 30 hpf, when the PLL migrating primordium has traveled about halfway to the tip of the tail and 2–3 proneuromasts have been deposited. We chose this stage because it is known that the hair cells produced in the ear and lateral line of *mindbomb* embryos die as they mature, around 48 hpf (Haddon et al., 1998; Itoh and Chitnis, 2001). We found that *mib* mutants show *nrd* label in the migrating PLL primordium (Fig. 1B, arrows) and expression appears increased in deposited proneuromasts (Fig. 1B, arrowhead). The increased expression is made evident by the fact that we did not have to use our modified in situ hybridization protocol to detect *nrd* expression in *mib* mutants (note the reduced background in Fig. 1B compared to Fig. 1A). Thus, the increase in *ath1* expression in *mib* embryos, which results in excess hair cells, is accompanied by elevated *nrd* expression, suggesting that *nrd* is also expressed in hair cell precursors. In addition, expression of *nrd* in the primordium in *mib* embryos suggests that there may be low levels of expression in these cells in wild type embryos, expression that is undetectable by in situ hybridization.

Loss of function of nrd, but not of ngn1, affects posterior lateral line development

In order to test whether *nrd* is implicated in lateral line formation, we blocked mRNA translation of this gene by using an antisense morpholino oligonucleotide (*nrd*MO). Morpholino was injected into 1-cell-stage embryos that were raised and were analyzed for developmental defects. At the concentration used (8.5 ng), most of the embryos showed no obvious anatomical phenotypes after 1, 2 or 3 days post-fertilization. A small percentage (<5%) of embryos were severely deformed after 24 h; these were discarded from further analysis as we attribute the malformations to non-specific effects of the injection. Since *nrd* is strongly expressed in the cranial ganglia (Andermann et al., 2002), we analyzed the formation of these structures in *nrd*MO-injected embryos. Comparison of *nrd*MO and control embryos shows no difference in the development of the PLL ganglion or other ganglia as assayed with anti-acetylated tubulin and anti-HuC antibodies (not shown). Moreover, the PLL nerve can be labeled with DiI in the injected embryos, showing normal co-migration of the pioneering axons with the PLL primordium (Fig. 2).

We next analyzed *nrd*MO-injected larvae with Di-Asp, a vital stain for mature hair cells (Collazo et al., 1994). The assay consisted in classifying fish that showed either a normal number of Di-Asp-positive neuromasts (5–8 per side), less than normal (1–4), or absence of labeled neuromasts 48–72 h after injection (Table 1). At 72 hpf, the primary lateral line is completely

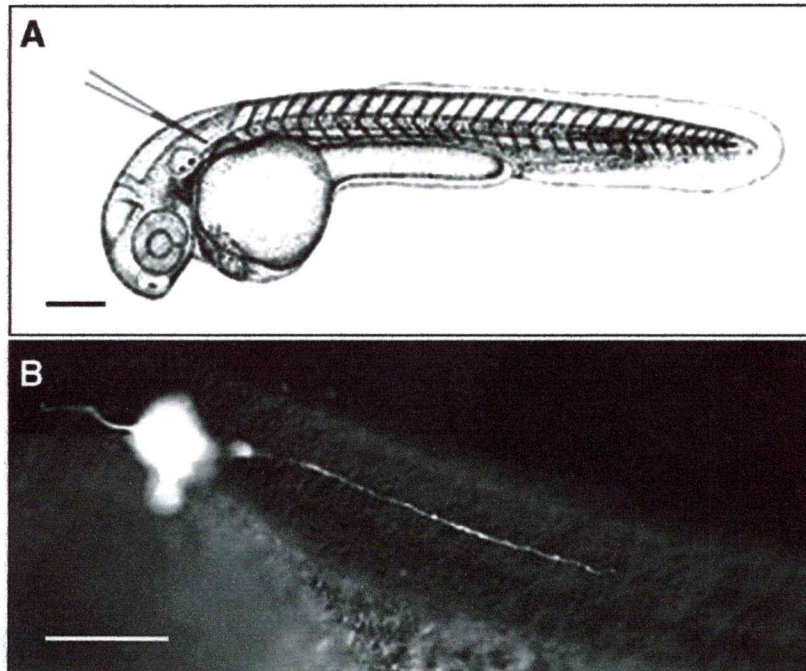


Fig. 2. The PLL nerve co-migrates with the PLL primordium in *NeuroD* (*nrd*) morphant embryos. (A) DiI injection in the posterior lateral line ganglion was performed at 30 hpf in *nrd* morphant embryos in order to mark the growing PLL nerve. (B) The PLL nerve is normally formed in a morphant embryo, can be labeled with DiI and is visualized under fluorescence microscopy; anterior to the left. Scale bar: 200 μ M for A and 100 μ M for B.

developed and neuromasts incorporate Di-Asp in wild type larvae (97% have between 5 and 8 neuromasts per side, see Table 1). In contrast, *nrd* morphants showed a marked decrease in the number of labeled neuromasts (Figs. 3B–D). Only 22% of the sides of *nrd*MO-injected larvae showed normal numbers of labeled neuromasts, 47% showing reduced numbers and 31% complete absence of labeling (Table 1). We attribute the heterogeneity among the injected embryo population to unequal delivery or distribution of the morpholino. Moreover, heterogeneity was observed within embryos as well since one side often showed more pronounced effects than the other (see Fig. 3C). As controls, we injected morpholinos directed against two other proneural genes, *zash1a* (Allende and Weinberg, 1994) and *ngn1* (Cornell and Eisen, 2002; Andermann et al., 2002). In the case of the *zash1a*MO, embryos injected with doses that produce loss of pineal neurons (Cau and Wilson, 2003) produce no defects in any of the lateral line components and neuromasts appear fully viable when assayed by Di-Asp staining (95% normal; Table 1). In the case of *ngn1*, morphants did not show a decrease in the number of labeled neuromasts when analyzed for Di-Asp staining and often showed an excess of neuromasts compared to the wild type larvae. This phenotype is due to the absence in *ngn1* morphant fish of the glia that normally accompany the migrating LL nerve (Lopez-Schier and Hudspeth, 2005; Grant et al., 2005).

We tested whether the inhibition in hair cell differentiation could be rescued by co-injecting the *nrd*MO together with a DNA construct encoding a NeuroD:Myc fusion protein, pCS*nrd*MT. The mRNA expressed from this construct should escape the translational block that inhibits the endogenous *nrd* gene as it has 7 mismatches out of 25 possible base pairings

with the morpholino. The result shows that the effect is reverted when the morpholino is co-injected with the expression construct, as the number of normal sides increases to 68%, compared to 22% in fish injected with *nrd*MO alone (Table 1).

Atonal homolog 1 (ath1) is required for neuromast development

The lack of effect of the anti-*ngn1* morpholino on neuromast development suggests that *nrd* expression is not regulated by *ngn1* during the formation of posterior lateral line neuromasts, in contrast to what occurs in the lateral line placode and ganglia (Andermann et al., 2002) and in other neurons in the central nervous system (Ma et al., 1996, 1998; Perron et al., 1999). We therefore hypothesized that *nrd* is most likely controlled by another proneural gene in the primordium or in neuromasts. The *ath1* gene is a strong candidate for this function as it is important for development of hair cells in mammals (Bermingham et al., 1999; Chen et al., 2002; Kawamoto et al., 2003) and *ath1* expression has been observed in the zebrafish posterior lateral line primordium, in proneuromasts and mature neuromasts, in a progressively restricted way (Itoh and Chitnis, 2001). The narrowing down of *ath1* expression could be correlated with the selection of hair cell fate.

In order to determine if *ath1* participates in hair cell differentiation in the lateral line, we injected a morpholino directed against the *ath1* gene into one-cell stage zebrafish embryos. The injection of the *ath1*MO again results in a decrease in the normal number of Di-Asp-labeled neuromasts, with 34% of the sides displaying less than 5 neuromasts, instead of 97% in uninjected controls or 95% in embryos injected with a

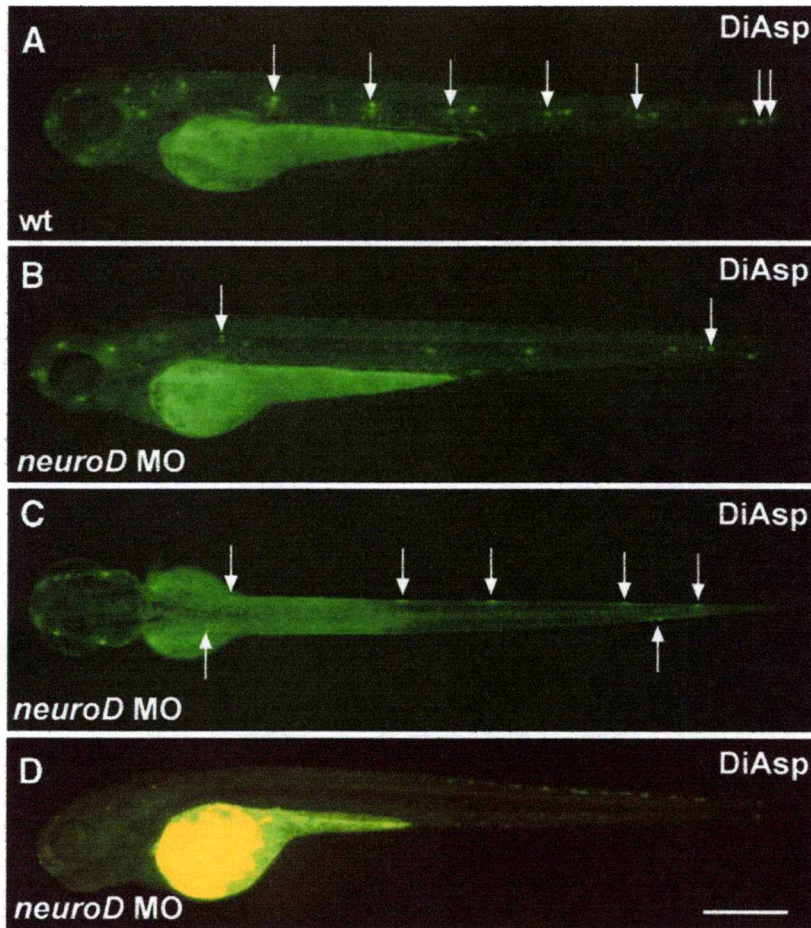


Fig. 3. *NeuroD* morpholino injection affects formation of the posterior lateral line. (A) Pattern of neuromasts (indicated by white arrows, only on the left side) in a 72-hpf larva stained with Di-Asp and visualized under fluorescence, revealing the presence of functional neuromasts. Lateral (B) and dorsal (C) view of a representative *nrd* morphant showing partial absence of neuromasts. Note that the *nrd* morpholino effect is different on each side. While the left side of the larva shows two neuromasts marked with Di-Asp, the right side is nearly normal in appearance. (D) Lateral view of a *nrd* morpholino-injected fish with complete absence of marked Di-Asp-labeled hair cells. All panels: anterior to the left. Scale bar: 100 μ M.

morpholino against another bHLH gene (Table 1). These results were practically indistinguishable from those obtained by injection of *nrd*MO.

Though both *ath1* and *nrd* can be involved in the establishment of neural competence, *nrd* has been mostly implicated in neuronal differentiation (Lee et al., 1995; Korzh et al., 1998). It is tempting, therefore, to speculate that *ath1* acts upstream of *nrd* in the lateral line neuromasts. Obvious predictions are then that *ath1* and *nrd* are co-expressed and that, in the absence of *ath1*, *nrd* expression should be abolished in the primordium and neuromasts. Unfortunately, the expression of *nrd* is very weak, making double in situ impractical, and thus an effect of *ath1* inactivation on *nrd* expression cannot be reliably demonstrated. We tried to circumvent this problem by assessing whether the effect of loss of function of *ath1* can be reverted with *nrd* overexpression. We injected the *Nrd:Myc* expression construct together with the *ath1*MO into one-cell stage embryos. Embryos were raised and assayed for functional hair cells by Di-Asp labeling as before. We found that the mutant phenotype induced by the *ath1*MO alone is partially rescued by *nrd* co-injection (61% of larval sides had normal

numbers of neuromasts in co-injected larvae versus 34% normal in *ath1*MO-injected larvae; Table 1). We then performed the opposite experiment, co-injecting the *nrd*MO with an *ath1* expression construct. In this case, we found no rescue (Table 1). Finally, we analyzed *nrd* expression after injecting the pCSath1MT construct (see Materials and methods), which strongly drives the expression of *ath1* in wild type larvae. Larvae were injected at the one-cell stage and were analyzed at 72 hpf by in situ hybridization using an *nrd* probe. Expression of *nrd* was clearly induced, though most of the larvae showed a random punctate pattern, possibly reflecting mosaicism in the distribution of DNA (Fig. 4A). About 20% of the larvae ($n = 25$) showed strong induction of *nrd* in neuromasts, expression that is never seen in non-injected controls with the in situ hybridization procedure used in this experiment (Fig. 4B, compare background levels to Fig. 1A). Higher magnification images of individual neuromasts (Figs. 4C, D) show strong expression of *nrd* in the entire neuromast, in contrast to the more restricted, and substantially weaker expression in non-injected fish (compare Figs. 4C, D with Figs. 1C–E). The terminal neuromasts are also very strongly labeled in *ath1*-injected

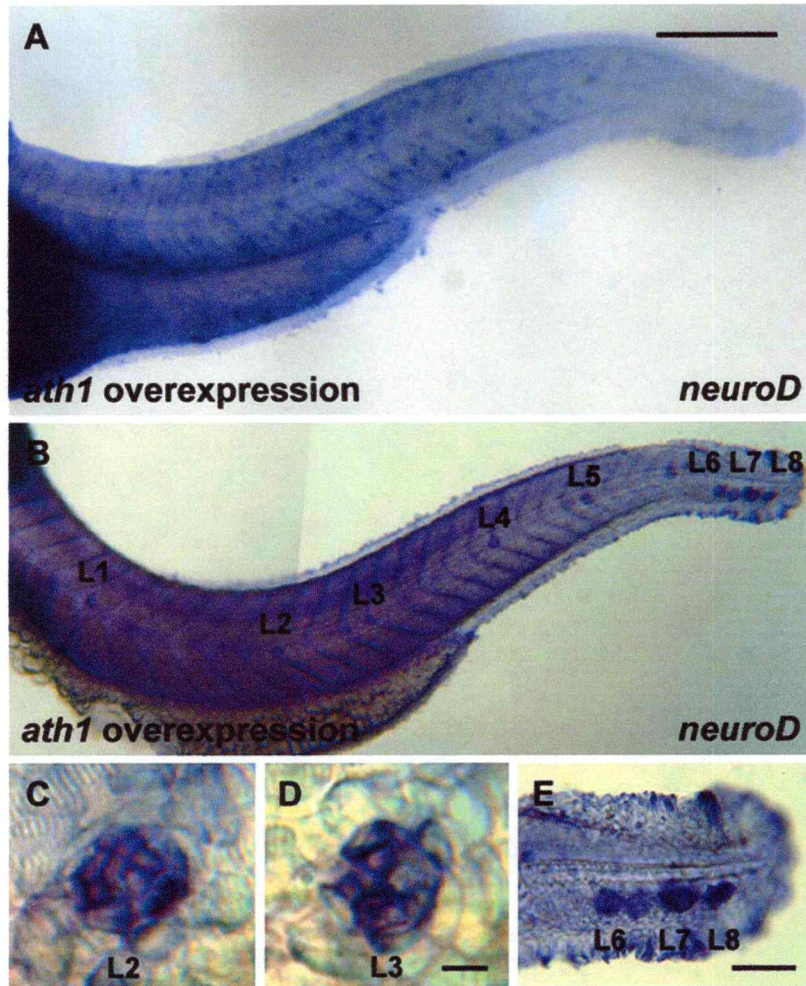


Fig. 4. *ath1* overexpression promotes ectopic *nrd* expression. (A–E) *nrd* mRNA expression in wild type embryos injected with the *ath1* cDNA, detected by in situ hybridization. (A) Punctate ectopic *nrd* expression can be observed along the trunk and tail of an injected embryo. (B) Increased *nrd* expression localized to neuromasts of an injected embryo; L1–L8 indicate positions of the individual PLL neuromasts. Close up views of the L2 (C), L3 (D) and terminal (E) neuromasts from the larvae shown in B. All panels: lateral views, anterior to the left. Scale bar in A: 200 μ M for A and B; scale bar in D: 10 μ M for C and D; scale bar in E: 50 μ M.

larvae (Fig. 4E). Our results strongly suggest that *ath1* regulates *nrd* and that it might be the proneural gene that is primarily responsible for establishing hair cell fate in the lateral line system.

nrd and *ath1* control hair cell development

The reduction in number or complete absence of Di-Asp-stained neuromasts found in *nrd* and *ath1* loss of function fish could have several causes. For instance, a failure in primordium migration, neuromast deposition or neuromast differentiation could give rise to this phenotype. We exclude the possibility that morpholino injections affect primordium migration based on two lines of evidence. First, even though morphant larvae show loss of Di-Asp staining in trunk and tail neuromasts, we often observed the presence of terminal neuromasts at the tip of the tail (Figs. 3B, C), indicating that the primordium had reached its final destination. Second, we carried out in situ hybridization using the *claudinB* probe, a gene that is expressed in the

posterior lateral line primordium and in proneuromasts (Kollmar et al., 2001). *ClaudinB* expression in *nrd* or *ath1* morphant larvae does not exhibit significant differences compared to the controls (data not shown). Thus, primordium size and migration along the trunk and tail of the embryo do not depend on proneural gene function. Neuromast deposition appears to occur normally in morphant larvae as well since *claudinB* label is in most cases indistinguishable from that found in wild types, though we found a few instances where we could not detect *claudinB* expression at positions where neuromasts are normally deposited (see below).

Since most neuromasts are deposited correctly, but fail to become labeled by Di-Asp, we examined the morphology of the neuromasts by Nomarski/DIC optics in *nrd* morphant larvae and compared them to wild types. Wild type neuromasts have a circular shape. The centrally located hair cells form clearly distinguishable, radially patterned rosettes (Fig. 5A) and are easily visualized with Di-Asp stain (Fig. 5E). On the other hand, neuromasts in *nrd* morphants (Figs. 5B–D) show irregularly

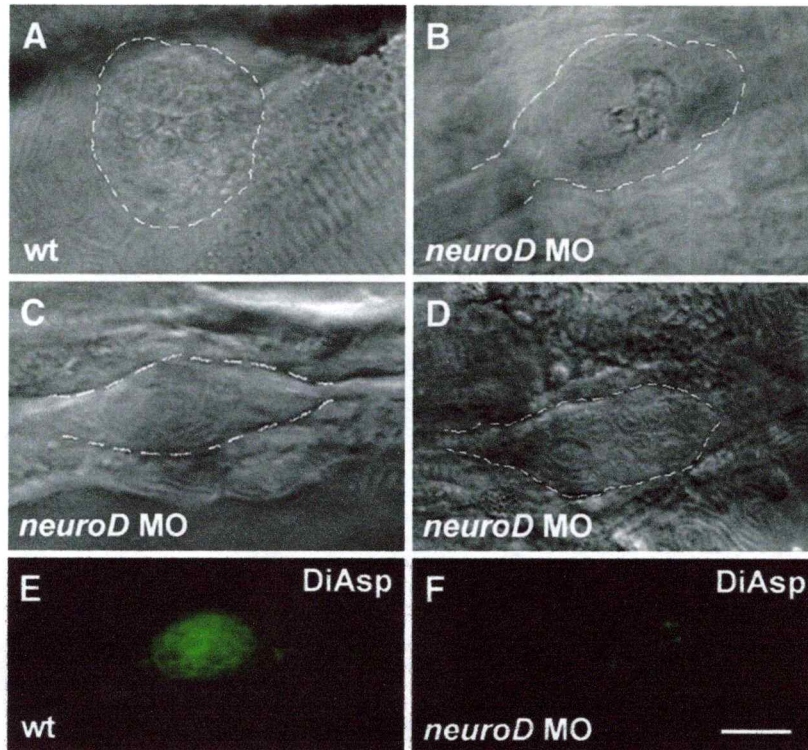


Fig. 5. Aberrant neuromasts form in *nrd* morphant larvae. (A–D) Neuromasts were localized in control and in *nrd* morphants and observed with Nomarski interference contrast microscopy. (A) A neuromast in a wild type larva showing a circular shape (delimited by a discontinuous white line) and a rosette pattern of hair cells concentrated in the center. (B–D) Three examples of Di-Asp-negative neuromasts found in *nrd* MO-injected larvae. Note the irregular shape of these neuromasts and the disorganized arrangement and size of the cells. (E) Wild type neuromast labeled with Di-Asp. (F) Aberrant neuromasts do not have Di-Asp-labeled cells. All panels: lateral views, anterior to the left. Scale bar: 10 μ M.

placed cells of varying shapes and sizes. It is not possible to distinguish hair cells by morphology or by labeling with Di-Asp (Fig. 5F). Similar results were observed in *ath1* morphants (not shown).

The vital dye Di-Asp labels hair cells that are differentiated and mature (Collazo et al., 1994). It is possible, therefore, that hair cells were still present in the morphant neuromasts but had lost the ability to incorporate the dye. To evaluate this possibility, we used another hair cell differentiation marker, acetylated tubulin. In control neuromasts, immunolabeling with an anti-acetylated tubulin antibody marks hair cell bodies and cilia (Raible and Kruse, 2000; Figs. 6A and B). The underlying PLL nerve is labeled, as are the axons that innervate the neuromast (thick arrow in Fig. 6A). However, in *nrd* and *ath1* morphant larvae, labeling is limited to the PLL nerve (Fig. 6C, arrowhead). Neuromasts in morphants could reliably be found using Nomarski optics, allowing us to confirm the absence of acetylated tubulin in neuromast cells. Nerve branches were not observed under the neuromasts either. Finally, we tested both *nrd* and *ath1* morpholinos in the ET4 transgenic background; these fish express GFP in hair cells several hours prior to their terminal differentiation (Parinov et al., 2004). Both morpholinos produced loss of GFP expression in these fish, which was perfectly correlated with the loss of Di-Asp staining (data not shown). Therefore, hair cells do not develop in the absence of *nrd* or *ath1*.

Effect of *nrd* and *ath1* on other cell types

To further characterize the effects of *nrd* or *ath1* loss of function, we analyzed other markers of neuromast cells in morphant embryos. First, we used the ET20 transgenic line, which expresses GFP in the outer rim of the accessory cells, the mantle cells (Parinov et al., 2004), as well as in the interneuromastic cells that will later form intercalary neuromasts (Grant et al., 2005; Lopez-Schier and Hudspeth, 2005). ET20 embryos were injected with morpholinos, were raised to 54 hpf, and were stained with Di-Asp to simultaneously detect hair cells and mantle cells (yellow and green label in Fig. 7, respectively). *nrd* and *ath1* morpholinos produced identical results in this experiment, though we show results only for *ath1* in Fig. 7. We observed that, in most cases (>75%), and despite losing the Di-Asp label as before, neuromasts showed normal GFP expression in morphants (compare Figs. 7A, B with C, D). This result indicates that neither neuromast deposition nor the formation of mantle cells or interneuromastic cells is altered in the absence of NeuroD or Ath1 protein (Figs. 7C, D). We found some cases in which GFP label was not detected at positions where neuromasts should normally lie. In these instances, we were not always able to find the aberrant neuromasts by Nomarski optics, leaving a doubt about whether the morpholinos occasionally affect neuromast deposition or whether they interfere with mantle cell determination or survival. We

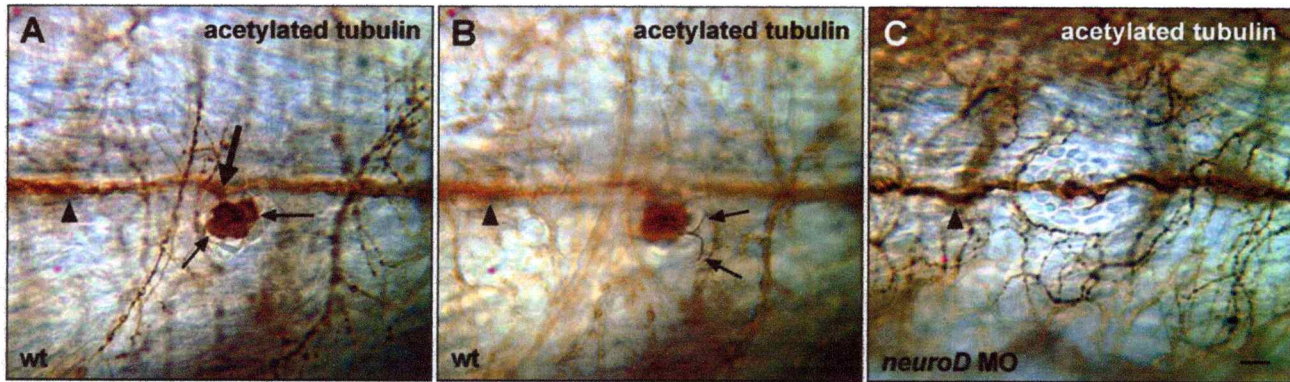


Fig. 6. Neuromasts formed in *nrd* morphant larvae lack hair cells. (A–C) Whole mount immunohistochemistry with anti-acetylated tubulin antibody. (A) In control larvae, anti-acetylated tubulin antibody marks the PLL nerve (arrowhead) and the two fibers that innervate the neuromast (thick arrow), as well as the hair cell somata (arrows). (B) Same image as in A, but the plane of focus was adjusted to visualize the hair cell kinociliae (arrows). (C) In neuromasts of *nrd* morphant larvae, there are no acetylated tubulin-labeled cells. The PLL nerve is unaffected (arrowhead). This particular neuromast looks somewhat larger than in the wild type, but this is not a consistent feature of morphant neuromasts. All panels: lateral views, anterior to the left. Scale bar: 10 μ M.

therefore took single ET20 *ath1* morphant larvae at 54 hpf, recorded the pattern of GFP expression and processed them for in situ hybridization using the *claudinB* and *eyal* probes, genes that are expressed in all PLL neuromast cells (Lopez-Schier et al., 2004; Sahly et al., 1999). We found a strict correlation ($n = 10$ larvae, both sides analyzed) between GFP label in the mantle cells of the neuromast and expression of *claudinB* and *eyal* (Figs. 7E, F, and data not shown). Thus, *nrd* and *ath1* are critical for hair cell development, but not for other cell types in the neuromast. These genes could also play a minor role on neuromast deposition, possibly through their effect on hair cell determination in the migrating primordium. Alternatively, the loss of hair cells could indirectly affect the survival of accessory cells as has been observed previously (Erkman et al., 1996).

Discussion

Role of *nrd* and of *ath1* in hair cell determination

In an attempt to define the proneural genes that are involved in promoting hair cell fate in the zebrafish lateral line system, we sought to determine whether *nrd* has a function in this process. While expression of *nrd* in the PLL placode is easily detected by in situ hybridization, expression is not detected in the migrating primordium and only weakly detected in recently deposited neuromasts. However, loss of function experiments using morpholino oligonucleotides designed against the *nrd* gene show that it is necessary for hair cell differentiation within neuromasts while it plays little or no role in lateral line ganglion specification, in primordium migration and in neuromast deposition. A previous study by Andermann et al. (2002) showed that *ngn1*, a proneural gene of the *Ath* family, is strongly expressed in the lateral line placode, regulates *nrd* and participates in ganglion development without affecting neuromast formation or hair cell differentiation. To reconcile both findings, it became necessary to search for an additional proneural gene responsible for the regulation of *nrd* in cells destined to become hair cells. A likely candidate was the *ath1* gene. Morpholino injections

directed against *ath1* showed a phenotype indistinguishable to that observed with *nrd* morpholinos: migration of the primordium and deposition of neuromasts are not affected but hair cells do not differentiate. Moreover, we showed that the effect could be partially rescued by overexpression of *nrd* and that overexpression of *ath1* can induce *nrd*. These observations are consistent with the idea that *ath1* acts upstream of *nrd* in hair cell development.

The selection of hair cell fate has been proposed to be under the control of the *Notch* and *Delta* families of neurogenic genes (Henrique et al., 1995), the latter being under the control of proneural genes both in flies and in vertebrates. In the lateral line, *delta* is expressed in the migrating primordium in a pattern that is consistent with a role in hair cell selection (Itoh and Chitnis, 2001) and that corresponds well to the pattern of expression of *ath1*. In the *mindbomb* mutant, supernumerary hair cells are produced in neuromasts concomitantly with overexpression of *ath1* (Itoh and Chitnis, 2001). Thus, *ath1* is a prime candidate for being the proneural gene responsible for the determination of presumptive hair cells in the zebrafish lateral line through activation of *nrd* expression.

We observed an occasional absence of all neuromast cell types after inactivation of either *ath1* or *nrd*. A simple explanation for the loss of support of cell markers or of neuromasts is that the integrity of the entire organ is dependent on the presence of hair cells. Indeed, it has been shown that ablation of hair cells can induce cell death in support cells (Erkman et al., 1996). We cannot rule out, however, involvement of *ath1* or *nrd* in the determination of other cell fates and/or in the process of neuromast deposition, though we clearly favor a specific role for *ath1* and *nrd* in hair cell development.

Evolutionary origin of hair cells and afferent neurons

What may be the origin of the dual control of cell determination by *ngn1* for the afferent neurons and by *ath1* for hair cells? The fish lateral line (and ear) shares impressive similarities with fly mechanosensory organs, suggestive of a common ancestry (Adam et al., 1998; Fritsch et al., 2000). One

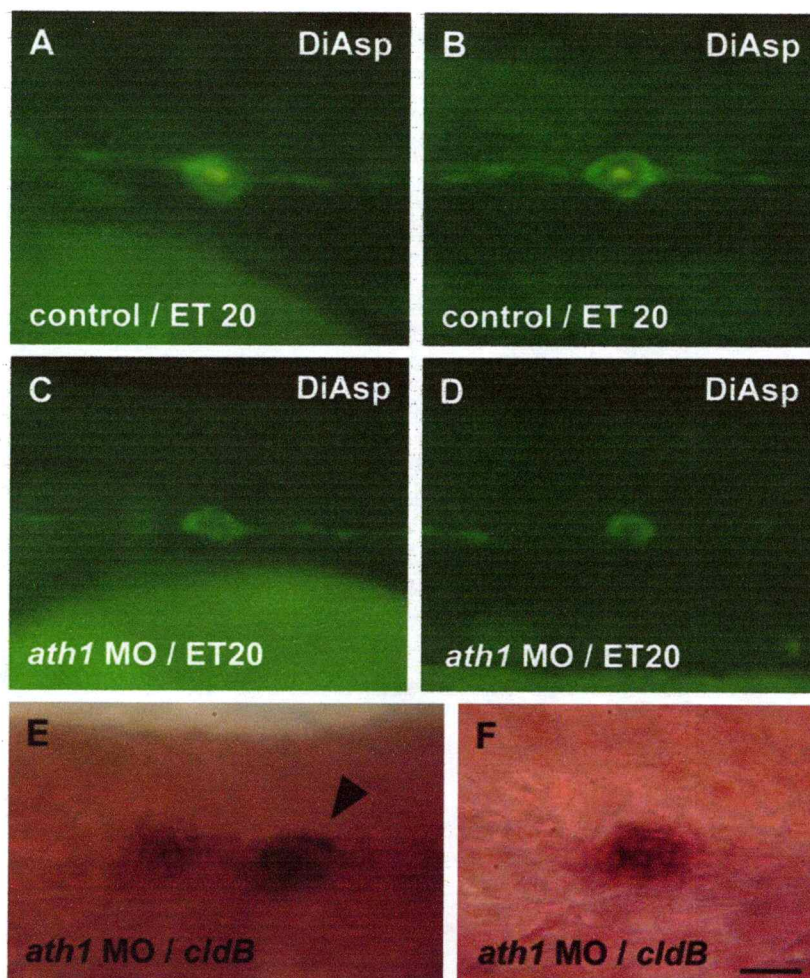


Fig. 7. Role of *ath1* in neuromast differentiation. (A–D) Control or *ath1* morphant ET20 transgenic larvae were incubated with Di-Asp and visualized under fluorescent illumination, allowing simultaneous visualization of GFP in mantle cells (green) and Di-Asp label in hair cells (yellow). Close up views of the L1 and L2 neuromasts from a control larva (A, B) and from an *ath1*MO-injected larva (C, D). Hair cells, but not mantle cells, are absent in *ath1* morphants. (E–F) The same morphant larva was processed for in situ hybridization using the *claudinB* (*cldB*) riboprobe, and the same neuromasts (L1 and L2) were analyzed. Both neuromasts are labeled with the *cldB* probe. Arrowhead in E corresponds to the secondary PLL primordium, which is also labeled by *cldB*. All views are lateral, anterior to the left. Scale bar: 20 μ M.

major difference exists between the two types of organs, however: the function of the mechanosensory neuron present in arthropods has been subdivided in two cell types in vertebrates, the mechanosensory hair cell on the one hand and the afferent neuron on the other. It seems plausible that this subdivision reflects evolutionary history and that a single precursor cell type present in a common ancestor to flies and vertebrates subsequently diversified in the vertebrate lineage into two descendant cell types (Ghysen, 2003). Such cell types related by common evolutionary origin have been called “sister cell types” by Arendt (2003).

Assuming that hair cell and afferent neuron are indeed derived from an ancestral mechanosensory neuron (through sub- and neofunctionalization), this required some way to uncouple the developmental program of the two divergent cell types. It has been argued that divergence of bHLH genes has precisely the effect of uncoupling subsets of neurons from each other, thus making it possible to introduce gradual changes in each set without perturbing the function of the other set (Brunet

and Ghysen, 1999). The diversification of the two *atonal* homologs, *ngn1* and *ath1*, from each other may therefore have been followed by the diversification of the two sister cell types, hair cells and afferent neurons, from a single mechanosensory cell type precursor still found in arthropods.

Advantages of this diversification include the possibility to increase the number of receptors relative to the number of afferent neurons, leading to an improved sensitivity and signal-to-noise ratio. Neuromasts comprise two populations of hair cells with opposite polarities and are innervated by two afferent neurons (Fig. 6A), each of which corresponds to one polarity. Increasing the number of hair cells innervated by a given afferent will obviously increase the sensitivity of the system. A similar trend is observed in the vertebrate retina, where sister cell types (rhabdomeric and ciliary photoreceptors) have also been combined to build a highly efficient sensory organ (Arendt, 2003). In the case of the mechanosensory organs, however, we need to know much more about the combination of transcription factors and effector genes

present in hair cells and afferent neurons before we can decide whether hair cells and afferent neurons are truly sister cell types.

Acknowledgments

We thank Catalina Lafourcade and Florencio Espinoza for expert technical assistance and Christine Dambly-Chaudière and David Raible for critical comments on the manuscript. We thank the following for their kind gifts of probes and reagents and help with various protocols: Christine Dambly-Chaudière, Robert Cornell, Vladimir Korzh, Ajay Chitnis, Ariel Reyes, Julio Amigo, Dora Sapede and Fabien Soubiran. This work was supported by grants from ICM (P02-050), FONDECYT (1031003), ICGB (CRP/CHI03-03c) to MA and ECOS/CONICYT (C03B01) to MA and AG, and by a fellowship from the Universidad de Chile (PG/UCH0012/2003) to AS.

References

- Adam, J., Myat, A., Le Roux, I., Eddison, M., Henrique, D., Ish-Horowitz, D., Lewis, J., 1998. Cell fate choices and the expression of Notch, Delta and Serrate homologues in the chick inner ear: parallels with *Drosophila* sense-organ development. *Development* 125, 4645–4654.
- Allende, M.L., Weinberg, E., 1994. The expression pattern of two achaete-scute homolog (ash) genes is altered in the embryonic brain of the cyclops mutant. *Dev. Biol.* 166, 509–530.
- Andermann, P., Ungos, J., Raible, D.W., 2002. Neurogenin1 defines zebrafish cranial sensory ganglia precursors. *Dev. Biol.* 251, 45–58.
- Arendt, D., 2003. Evolution of eyes and photoreceptor cell types. *Int. J. Dev. Biol.* 47, 563–571.
- Ben-Arie, N., Hassan, B.A., Bermingham, N.A., Malicki, D.M., Armstrong, D., Matzuk, M., Bellen, H.J., Zoghbi, H.Y., 2000. Functional conservation of *atonal* and *Math1* in the CNS and PNS. *Development* 127, 1039–1048.
- Bermingham, N.A., Hassan, B.A., Price, S.D., Vollrath, M.A., Ben-Arie, N., Eatock, R.A., Bellen, H.J., Lysakowski, A., Zoghbi, H.Y., 1999. *Math1*: an essential gene for the generation of inner ear hair cells. *Science* 284, 1837–1841.
- Bertrand, N., Castro, D.S., Guillemot, F., 2002. Proneural genes and the specification of neural cell types. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 517–530.
- Blader, P., Fischer, N., Gradwohl, G., Guillemot, F., Strahle, U., 1997. The activity of neurogenin1 is controlled by local cues in the zebrafish embryo. *Development* 124, 4557–4569.
- Brunet, J.F., Ghysen, A., 1999. Deconstructing cell determination: proneural genes and neuronal identity. *BioEssays* 21, 313–318.
- Cau, E., Wilson, S.W., 2003. *Ash1a* and neurogenin1 function downstream of floating head to regulate epiphyseal neurogenesis. *Development* 130, 2455–2466.
- Cau, E., Gradwohl, G., Fode, C., Guillemot, F., 1997. *Mash1* activates a cascade of bHLH regulators in olfactory neuron progenitors. *Development* 124, 1611–1621.
- Chen, P., Johnson, J.E., Zoghbi, H.Y., Segil, N., 2002. The role of *Math1* in inner ear development: uncoupling the establishment of the sensory primordium from hair cell fate determination. *Development* 129, 2495–2505.
- Collazo, A., Fraser, S.E., Mabee, P.M., 1994. A dual embryonic origin for vertebrate mechanoreceptors. *Science* 264, 426–430.
- Coombs, S., Görner, P., Münz, H., 1989. *The Mechanosensory Lateral Line*. Springer Verlag, New York, 724 pp.
- Cornell, R.A., Eisen, J.S., 2002. Delta/Notch signaling promotes formation of zebrafish neural crest by repressing Neurogenin1 function. *Development* 129, 2639–2648.
- David, N.B., Sapede, D., Saint-Etienne, L., Thisse, C., Thisse, B., Dambly-Chaudière, C., Rosa, F.M., Ghysen, A., 2002. Molecular basis of cell migration in the fish lateral line: role of the chemokine receptor CXCR4 and of its ligand, SFD1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 16297–16302.
- Erikman, L., McEvelly, R.J., Luo, L., Ryan, A.K., Hooshmand, F., O'Connell, S.M., Keithley, E.M., Rapoport, D.H., Ryan, A.F., Rosenfeld, M.G., 1996. Role of transcription factors Brn-3.1 and Brn-3.2 in auditory and visual system development. *Nature* 381, 603–606.
- Fode, C., Gradwohl, G., Morin, X., Dierich, A., LeMour, M., Gorodis, C., Guillemot, F., 1998. The bHLH protein NEUROGENIN2 is a determination factor for epibranchial placode-derived sensory neurons. *Neuron* 20, 483–494.
- Fritzsch, B., Beisel, K.W., Bermingham, N.A., 2000. Developmental evolutionary biology of the vertebrate ear: conserving mechanoelectric transduction and developmental pathways in diverging morphologies. *NeuroReport* 11, 1–10.
- Ghysen, A., 2003. The origin and evolution of the nervous system. *Int. J. Dev. Biol.* 47, 555–562.
- Ghysen, A., Dambly-Chaudière, C., 1989. Genesis of the *Drosophila* peripheral nervous system. *Trends Genet.* 5, 251–255.
- Gompel, N., Cubedo, N., Thisse, C., Thisse, B., Dambly-Chaudière, C., Ghysen, A., 2001. Pattern formation in the lateral line of zebrafish. *Mech. Dev.* 105, 69–77.
- Grant, K.A., Raible, D.W., Piotrowski, T., 2005. Regulation of latent sensory hair cell precursors by glia in the zebrafish lateral line. *Neuron* 45, 69–80.
- Haddon, C., Mowbray, C., Whitfield, T., Jones, D., Gschmeissner, S., Lewis, J., 1998. Hair cells without supporting cells: further studies in the ear of the zebrafish *mind bomb* mutant. *J. Neurocytol.* 28, 837–850.
- Henrique, D., Adam, J., Myat, A., Chitnis, A., Lewis, J., Ish-Horowitz, D., 1995. Expression of a Delta homologue in prospective neurons in the chick. *Nature* 375, 787–790.
- Itoh, M., Chitnis, A.B., 2001. Expression of proneural and neurogenic genes in the zebrafish lateral line primordium correlates with selection of hair cell fate in neuromasts. *Mech. Dev.* 102, 263–266.
- Itoh, M., Kim, C.H., Palardy, G., Oda, T., Jiang, Y.J., Maust, D., Yeo, S.Y., Lofrick, K., Wright, G., Ariza-McNaughton, L., Weissman, A., Lewis, J., Chandrasekharappa, S., Chitnis, A.B., 2003. *Mind Bomb* is a ubiquitin ligase that is essential for efficient activation of Notch signaling by Delta. *Dev. Cell* 4, 67–82.
- Jowett, T., Lettice, L., 1994. Whole-mount in situ hybridizations on zebrafish embryos using a mixture of digoxigenin- and fluorescein-labelled probes. *Trends Genet.* 10, 73–74.
- Kawamoto, K., Ishimoto, S.L., Minoda, R., Brough, D.E., Raphael, Y., 2003. *Math1* gene transfer generates new cochlear hair cells in mature guinea pigs in vivo. *J. Neurosci.* 23, 4395–4400.
- Kim, C.H., Bae, Y.K., Yamanaka, Y., Yamashita, S., Shimizu, T., Fujii, R., Park, H.C., Yeo, S.Y., Huh, T.L., Huh, T.L., Hibii, M., Hirano, T., 1997. Overexpression of neurogenin induces ectopic expression of *HuC* in zebrafish. *Neurosci. Lett.* 239, 113–116.
- Kim, W.Y., Fritzsch, B., Serls, A., Bakel, L., Huang, E., Reichardt, L., Barth, D., Lee, J., 2001. NeuroD-null mice are deaf due to a severe loss of the inner ear sensory neurons during development. *Development* 128, 417–426.
- Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B., Schilling, T.F., 1995. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn.* 203, 253–310.
- Kollmar, R., Nakamura, S.K., Kappler, J.A., Hudspeth, A.J., 2001. Expression and phylogeny of claudins in vertebrate primordium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 10196–10201.
- Korzh, V., Sleptsova, I., Liao, J., He, J., Gong, Z., 1998. Expression of zebrafish bHLH genes *ngn1* and *nr1* defines distinct stages of neural differentiation. *Dev. Dyn.* 213, 92–104.
- Lee, J.E., 1997. Basic helix-loop-helix genes in neural development. *Curr. Opin. Neurobiol.* 7, 13–20.
- Lee, J., Hollenberg, S., Snider, L., Turner, D., Lipnick, N., Weintraub, H., 1995. Conversion of *Xenopus* ectoderm into neurons by NeuroD, a basic helix-loop-helix protein. *Science* 268, 836–844.
- Lopez-Schier, H., Hudspeth, A.J., 2005. Supernumerary neuromasts in the posterior lateral line of zebrafish lacking peripheral glia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 1496–1501.

- Lopez-Schier, H., Starr, C.J., Kappler, J.A., Kollmar, R., Hudspeeth, A.J., 2004. Directional cell migration establishes the axes of planar polarity in the posterior lateral-line organ of the zebrafish. *Dev. Cell* 7, 401–412.
- Ma, Q., Kintner, C., Anderson, D., 1996. Identification of *neurogenin*, a vertebrate neuronal determination gene. *Cell* 87, 43–52.
- Ma, Q., Chen, Z., del Barco Barrantes, I., de la Pompa, J.L., Anderson, D.J., 1998. *neurogenin1* is essential for the determination of neuronal precursors for proximal cranial sensory ganglion. *Neuron* 20, 469–482.
- Ma, Q., Anderson, D.J., Fritschsch, B., 2000. Neurogenin 1 null mutant ears develop fewer, morphologically normal hair cells in smaller sensory epithelia devoid of innervation. *J. Assoc. Res. Otolaryngol.* 1, 129–143.
- Metcalfe, W.K., Kimmel, C.B., Schabtach, E., 1985. Anatomy of the posterior lateral-line system in young larvae of the zebrafish. *J. Comp. Neurol.* 233, 377–389.
- Miyata, T., Maeda, T., Lee, J.E., 1999. NeuroD is required for differentiation of the granule cells in the cerebellum and hippocampus. *Genes Dev.* 13, 1647–1652.
- Mueller, T., Wullmann, M.F., 2002. Expression domains of *neuroD* (*nrD*) in the early postembryonic zebrafish brain. *Brain Res. Bull.* 57, 377–379.
- Murre, C., Mc Caw, P.S., Baltimore, D., 1989. A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, *daughterless*, *MyoD* and *myc* proteins. *Cell* 56, 777–783.
- Naya, F.J., Huang, H.P., Qiu, Y., Mutoh, H., DeMayo, F.J., Leiter, A.B., Tsai, M.J., 1997. Diabetes, defective pancreatic morphogenesis, and abnormal enteroendocrine differentiation in BETA2/NeuroD-deficient mice. *Genes Dev.* 11, 2323–2334.
- Parinov, S., Kondrichin, I., Korzh, V., Emelyanov, A., 2004. *Toi2* transposon-mediated enhancer trap to identify developmentally regulated zebrafish genes in vivo. *Dev. Dyn.* 231, 449–459.
- Partridge, B.L., Pitcher, T.J., 1980. The sensory basis of fish school: relative roles of lateral line and vision. *J. Comp. Physiol.* 135, 315–325.
- Perron, M., Opdecamp, K., Butler, K., Harris, W., Bellefroid, E., 1999. *X-ngnr-1* and *Xath3* promote ectopic expression of sensory neuron markers in the neural ectoderm and have distinct inducing properties in the retina. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 14996–15001.
- Raible, D.W., Kruse, G.J., 2000. Organization of the lateral line system in embryonic zebrafish. *J. Comp. Neurol.* 421, 189–198.
- Sahly, I., Andermann, P., Petit, C., 1999. The zebrafish *eya1* gene and its expression pattern during embryogenesis. *Dev. Genes Evol.* 209, 399–410.
- Shou, J., Zheng, J.L., Gao, W.Q., 2003. Robust generation of new hair cells in the mature mammalian inner ear by adenoviral expression of *Flath1*. *Mol. Cell. Neurosci.* 23, 169–179.
- Villares, R., Cabrera, C.V., 1987. The *achaete-scute* gene complex of *D. melanogaster*: conserved domains in a subset of genes required for neurogenesis and their homology to *myc*. *Cell* 50, 415–424.
- Westerfield, M., 1994. *The Zebrafish Book. A Guide for The Laboratory Use of Zebrafish (Danio rerio)* Eugene. University of Oregon Press. 10.14 pp.