

UCH-FC  
DOC-BMCN  
N146  
C.1



**IDENTIFICACIÓN DE GENES ESENCIALES PARA  
EL DESARROLLO DE LA LÍNEA LATERAL Y LA  
DIFERENCIACIÓN DE LAS CÉLULAS  
MECANOSENSORIALES EN EL PEZ CEBRA**

**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**

**Leonardo Esteban Valdivia Álvarez**

**Enero, 2011**

**Director de Tesis Dr: Miguel L. Allende Connelly**

**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

**LEONARDO ESTEBAN VALDIVIA ALVAREZ**

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 día 24 de Enero de 2011

Director de Tesis:

Dr. Miguel Allende

*Miguel Allende*  
.....

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Christian González

*Christian González*  
.....

Dr. Álvaro Glavic

*Álvaro Glavic*  
.....

Dra. Verónica Cambiazo

*Verónica Cambiazo*  
.....

Dr. Manuel Kukuljan

.....



*A mi familia y Evelyn por estar ahí siempre.*



Hace mas de 29 años 2 gametos se fusionaron en un abrazo profundo para dar origen al organismo diploide que escribió esta tesis.

Aplicando el poder de síntesis a mi historia personal, paso directamente a los 18 años cuando me vi enfrentado a escoger una carrera, y elegí Licenciatura en Biología en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile. En el primer año de la carrera tomé el curso de biología del desarrollo, y quedé completamente maravillado con ello. Ese curso marcaría mi vida para siempre.

Al terminar mi carrera no dudé en entrar al doctorado de la facultad como una vía de canalización de mi interés por la investigación.

Ahora que termino esta etapa, puedo decir que el postgrado ha sido un período fantástico de aprender y vivir, y de aprender a vivir en un ambiente científico.

Creo que el poder haber hecho mi tesis en el laboratorio de Miguel me ha dejado preparado para enfrentar con ganas y experiencia los cambios , preguntas y nuevos desafíos que vienen a futuro.

Agradezco a todos quienes de alguna forma contribuyeron a que este trabajo saliera adelante.

Primero que todo a Miguel, mi director de tesis, por su confianza y por la libertad intelectual que me dio para dejarme explorar el embrión del pez cebra. Gracias por darme la oportunidad de visitar otros laboratorios en el extranjero y poder sumergirme a fondo en la biología del desarrollo. Nunca me imaginé que podría aprender tantas cosas en este periodo doctoral tan corto que ya termina.

A mis compañeros y amigos de laboratorio: Undo, Sharo, Javi, Cami, Vivi, Claudia, Marjorie, Oscar, Mario, Simón, José, Claudio, Polo, Elvis...gracias por compartir maravillosos momentos de trabajo y relajo, y por las discusiones científicas y surreales.

A mis amigos Ricardo, Elmer y César por ser parte importante de mi vida universitaria en pregrado y postgrado. Gracias por los gratos momentos y la amistad sincera...Ah ya!

A Carlos y Claudio Araya por la amistad y la discusión científica en torno a un *pint* durante el verano inglés.

A mis padres, Isidro y María, por dar todo por mí y permitirme hacer siempre lo que quise en la vida. A Naty y Daniela, las presencias mas pequeñas del hogar que dejé hace tiempo.

A Evelyn...mi Evelyn. Por acompañarme siempre, desde antes de entrar al doctorado. Gracias por la amistad y el amor...y ni un kiki.

A Catalina, Florencio y Juanito. La tría ancla del laboratorio que se preocupó de que todo funcionara bien. Gracias Floro por la ayuda que siempre me has dado, por los consejos y la amistad.

A Steve Wilson y Rodrigo Young, por darme la oportunidad de trabajar en un laboratorio increíble en Londres. Además a Tom Hawkins por las clases de simpleza y por alojar una enciclopedia casi completa en su encéfalo.

A Shawn, Nam y Jin y la gente del laboratorio en el NIH.

Y a los Umungastrofunfurdicoides que viven dentro de las ampollas y, desde hace ya algún tiempo, dentro de mi cabeza...

No puedo dejar de dar las gracias al financiamiento que CONICYT da a la ciencia chilena. En especial a la beca de doctorado y de apoyo de tesis doctoral. Además agradezco a la Becas de viaje Mecesup, Beca de la Vicerrectoría de Asuntos Académicos de la Universidad de Chile, Beca Development, Beca Fulbright y al Proyecto de la Royal Society de colaboración entre Steve y Miguel. Con todas estas ayudas pude realizar estadías de investigación en Londres y Estado Unidos.

Finalmente gracias de nuevo Miguel por permitirme trabajar en tu laboratorio por 1644 días, incluido hoy.

## INDICE DE CONTENIDO



INDICE GENERAL .....	ii
INDICE DE FIGURAS .....	iii
INDICE DE TABLAS .....	v
ABREVIATURAS.....	vi
RESUMEN.....	viii
ABSTRACT.....	x

I. INTRODUCCION.....	1
II. HIPOTESIS.....	28
III. OBJETIVOS .....	29
IV. MATERIALES Y METODOS.....	30
V. RESULTADOS.....	55
VI. DISCUSION .....	115
VII. CONCLUSIONES.....	141
VIII. REFERENCIAS.....	142

## INDICE DE FIGURAS



Página

FIGURA 1	Pez cebra ( <i>Danio rerio</i> ) .....	3
FIGURA 2	La línea lateral en el pez cebra .....	7
FIGURA 3	Formación de la línea lateral posterior del pez cebra.....	9
FIGURA 3	Comportamiento migratorio del primordio de la línea lateral posterior del pez cebra visto en la línea <i>tg(cldnB:lynGFP)<sup>zf106</sup></i> .....	12
FIGURA 5	Control de la expresión de <i>cxcr4b</i> y <i>cxcr7b</i> en la región líder (a la derecha) y posterior (izquierda) del primordio en migración.....	16
FIGURA 6	Modelo de segmentación del primordio de la línea lateral en el pez cebra .....	17
FIGURA 7	La expresión de genes proneurales y neurogénicos en el primordio de la línea lateral posterior se correlaciona con la selección de destino hacia células ciliadas mediante inhibición lateral.....	23
FIGURA 8	Ilustración esquemática del análisis de segregantes agrupados..	46
FIGURA 9	Búsqueda genómica en levaduras para identificar sitios de unión para <i>atonal1</i> .....	59
FIGURA 10	Las secuencias encontradas con el sistema del monohíbrido inverso contienen cajas E. ....	62
FIGURA 11	El conjunto de datos de VISTA enhancer browser consiste en información de secuencia de <i>enhancers</i> que es de libre acceso ....	65
FIGURA 12	Clonamiento de las secuencias genómicas en el vector reportero basado en el transposón Tol2, y estrategia experimental de análisis .....	68
FIGURA 13	Patrón de GFP dirigido por 2 <i>enhancers</i> : uno dirige GFP en dominios de expresión de <i>atonal1a</i> y otro en un territorio proneural distinto .....	69
FIGURA 14	Patrones de GFP en territorios proneurales y no proneurales ....	73
FIGURA 15	La inyección de un morfolino contra <i>gf1b</i> desorganiza y fragmenta las células ciliadas de los neuromastos .....	76
FIGURA 16	Expresión y relación de las línea <i>tg(gf1.1:GFP)</i> y <i>tg(atoh1a:dTOM)</i> en la línea lateral .....	78
FIGURA 17	La inyección de un morfolino contra <i>gf1.1</i> desorganiza y reduce el número de células ciliadas en los neuromastos.....	79
FIGURA 18	Esquema de mutagénesis y estrategia de rastreo.....	82

FIGURA 19	Imágenes bajo fluorescencia usando tinciones vitales que muestran los fenotipos de línea lateral en mutantes.....	84
FIGURA 20	Análisis de recombinación por SSLP.....	86
FIGURA 21	Caracterización de la mutación C27-B y mapeo del locus.....	88
FIGURA 22	Fenotipo de la mutación C27-H.....	90
FIGURA 23	Las células ciliadas de la línea lateral degeneran en los mutantes C27-H.....	92
FIGURA 24	Cuantificación de la degeneración de las células ciliadas de la línea lateral y mapeo inicial del gen C27H.....	93
FIGURA 25	Análisis de las proyecciones de los axones retinales muestra que los mutantes C27-H tienen truncadas las inervaciones al tectum.....	96
FIGURA 26	El desarrollo de las aletas es afectado en los adultos, pero no en los embriones en los mutantes <i>lef1/sin<sup>fu767</sup></i> .....	97
FIGURA 27	Caracterización de los mutantes <i>sinfin(sin<sup>fu767</sup>)</i> de pez cebra... ..	98
FIGURA 28	Mapeo y caracterización molecular de la mutación en <i>lef1</i> .....	99
FIGURA 29	Incubación de embriones <i>Tg(cldnB:lynGFP)<sup>zf106</sup></i> en BIO fenocopia el fenotipo observado en el primordio de la línea lateral posterior en los mutantes <i>apc</i> .....	100
FIGURA 30	El <i>patterning</i> de los neuromastos, pero no la capacidad migratoria del primordio y la expresión polarizada de receptores de quimioquina están afectados en la pérdida de función de <i>lef1</i> ..	102
FIGURA 31	Organización del primordio, morfología de los neuromastos y la diferenciación de éstos no están afectados en la condición de pérdida de función de <i>lef1</i> ..	104
FIGURA 32	La pérdida de función de <i>lef1</i> no afecta la neurogénesis mediada por <i>atona1a</i> ..	105
FIGURA 33	Análisis de la migración del primordio en embriones de la línea <i>Tg(cldnB:lynGFP)</i> por microscopia confocal de tiempo interrumpido.....	107
FIGURA 34	El primordio de la línea lateral posterior en los mutantes <i>lef1/sin<sup>fu767</sup></i> colapsa debido a una disminución en la tasa proliferativa y un agotamiento de las células del borde líder.....	108
FIGURA 35	Formación de los neuromastos terminales en el primordio de la línea lateral posterior en larvas silvestres, y patrón temporal de expresión de <i>lef1</i> .....	112
FIGURA 36	<i>lef1</i> es epistático a <i>apc</i> en el control del comportamiento de las células de la zona líder del primordio ..	113
FIGURA 37	Modelo que describe el desarrollo del primordio de la línea lateral silvestre, mutante <i>lef1</i> , y con la división celular bloqueada ..	136

## INDICE DE TABLAS



Página

TABLA 1	Lista de partidores utilizados .....	33
TABLA 2	Lista de morfornos usados .....	34
TABLA 3	Sondas utilizadas para hibridación <i>in situ</i> .....	48
TABLA 3	Concentración de proteinasa K y tiempo de incubación para los diferentes estadios de desarrollo de pez cebra.....	49
TABLA 5	Algunos de los genes candidatos putativos a ser regulados por <i>atona1</i> y cuyas secuencias de respuesta se encontraron dentro de 15 kilobases de distancia de la secuencia codificante.....	63
TABLA 6	Genes blanco candidatos cuyas putativas secuencias regulatorias dependientes de <i>atona1</i> fueron obtenidas con Vista Enhancer Browser .....	66



## ABREVIATURAS

DiAsp	4-(4-Diethylaminostyryl)-1-methylpyridinium iodide
DioC <sub>6</sub>	3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide
BSA	Albúmina sérica de bovino
BrdU	5-bromo-2-deoxyuridine
CaCl <sub>2</sub>	Cloruro de calcio
cDNA	Acido desoxirribonucleico complementario
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfato
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Acido etilendiaminotetracético
ENU	Etilnitrosourea
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i> (Factor de Crecimiento Fibroblástico)
GFP	Proteína fluorescente verde
HCl	Ácido clorhídrico
KCl	Cloruro de Potasio
LiCl	Cloruro de litio
MgCl <sub>2</sub>	Cloruro de magnesio
MgSO <sub>4</sub>	Sulfato de magnesio
mRNA	RNA mensajero
Mo	Morfolino
NaCl	Cloruro de sodio
PEG	Polietilenglicol

PFA	Paraformaldehido
PBS	Solución salina tamponada con fosfato
PBST	PBS con Tween 20 al 0.1%
PCR	Reacción en cadena de polimerasa
PFA	Paraformaldehído
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TAE	Tris acetato EDTA
TBE	Tris borato EDTA
TE	Tris EDTA
Tween 20	Polioxi-etilensorbitan monolaurato
tRNA	RNA de tórula
YPD	Yeast Peptone Dextrose
YPG	Yeast Peptone Galactose

## RESUMEN

La morfogénesis es un proceso fascinante del desarrollo, pero a la vez es complejo y por lo mismo es poco entendido en un contexto global. Cada evento que permite la morfogénesis requiere la expresión coordinada de genes particulares en tiempo y espacio. Por lo tanto la identificación de esos genes y su función es un objetivo fundamental en biología del desarrollo.

Recientemente la línea lateral posterior del pez cebra se ha establecido como un atractivo modelo para estudiar la morfogénesis, ya que su mecánica de desarrollo involucra una serie de procesos como migración celular y axonal dirigida, proliferación y diferenciación. Este sistema sensorial se desarrolla a partir de un primordio migratorio que deposita secuencialmente grupos de órganos llamados neuromastos, cada uno de los cuales se compone de un núcleo central de células ciliadas mecanosensoriales muy similares a las del oído interno de los vertebrados.

En esta tesis nos propusimos identificar genes esenciales para el desarrollo de la línea lateral y su relación con el proceso de diferenciación. Mediante experimentos de monohíbrido inverso y análisis de secuencias encontramos un grupo de genes que pueden ser blancos de *atonal1*, el regulador maestro de la diferenciación de las células ciliadas. Además mostramos un rol conservado para los genes *gfi1* en la mantención estas células. Finalmente realizamos un rastreo de mutaciones que afectan el desarrollo de la línea lateral, aislamos una valiosa colección de mutantes e identificamos algunos de los genes mutados.

La novedad de los genes y fenotipos encontrados sugiere que estos datos serán un paso significativo hacia el entendimiento de las bases moleculares del desarrollo de la línea lateral y pueden ser extrapolables a otros sistemas.

## ABSTRACT

Morphogenesis is a fascinating but complex and incompletely understood developmental process. Every step driving morphogenesis requires a tight control of the expressed genes, both in time and space. Therefore the identification of those genes and their functions is a main topic in developmental biology.

Recently, the posterior lateral line of the zebrafish has been established as an attractive model for studying morphogenesis because its mechanism of development involves a series of process as collective cell migration and axonal targeting, proliferation and cell differentiation. This system develops from a migrating primordium that sequentially deposits sensory organs named neuromasts at regular intervals. Each neuromast is composed of a central core of mechanosensory hair cells quite similar to those present in the inner ear of vertebrates.

In this study we aimed to identify essential genes for lateral line development and its relation with differentiation. By using reverse one hybrid assays and sequence analysis we were able to find a set of genes that could be targets of *atonal1*, the master regulator of hair cell differentiation. Moreover we showed a conserved role for *gfi1* genes in the maintenance of those cells. Finally we have undertaken a screening to find mutations affecting lateral line development, and we isolated a valuable mutant collection. We also identified some of the mutated genes.

The novelty of genes and phenotypes that we got suggest that they will be a significant step on the understanding of the molecular basis of lateral line development and the can be useful to other systems.

## I. INTRODUCCIÓN

Durante el desarrollo embrionario las células y estructuras funcionales deben ser establecidas y ordenadas con una distribución tridimensional precisa y una composición adecuada. En muchos casos, distintos tipos celulares son especificados en lugares lejanos de donde ellos se ubicarán definitivamente para alcanzar una diferenciación y función biológica normal. La dinámica celular y de desarrollo que lleva al establecimiento de esa reestructuración se conoce como morfogénesis, un fenómeno que refleja la capacidad de un material biológico para organizarse espacialmente a sí mismo y que involucra una serie de procesos como migración celular, proliferación, señalización, y diferenciación, entre otros (Lecaudey y cols., 2008, Nechiporuk y Raible., 2008). La complejidad de estos fenómenos requiere una robusta y precisa regulación de la expresión génica de manera temporal y espacial (Holley, 2007). Por ello, conocer la identidad y función de los genes responsables de estos eventos coordinados es una tarea que actualmente es abordada desde diferentes aristas (Morley y cols., 2009).

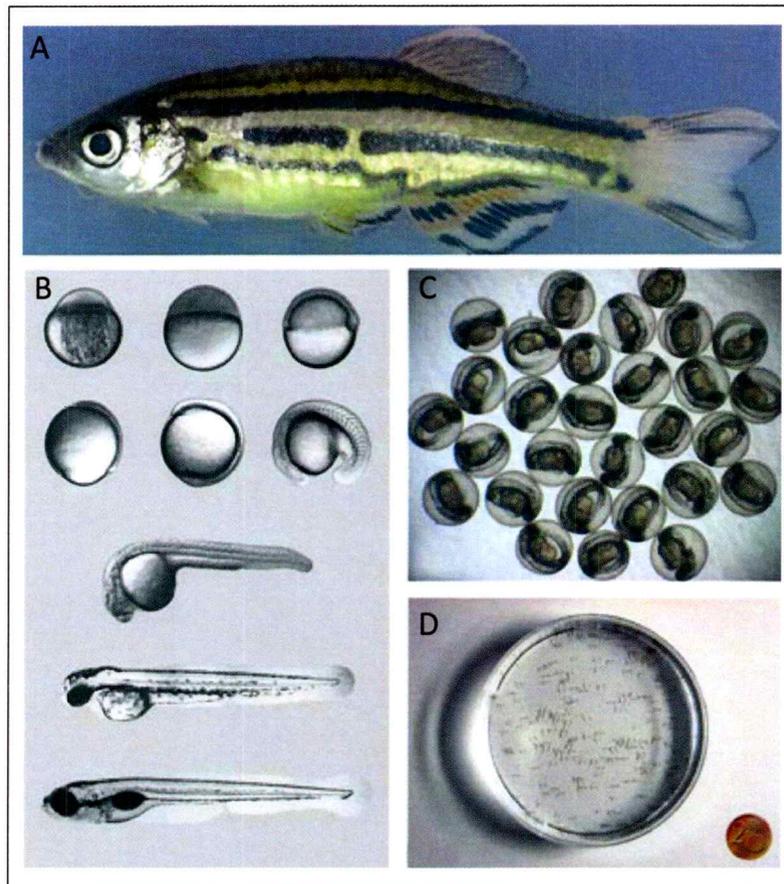
La evidencia experimental acumulada sobre las bases genéticas de los eventos que conducen la morfogénesis, ha permitido concluir que estos proceden a través de vías de señalización, mecanismos regulatorios, y genes efectores altamente conservados en vertebrados e invertebrados (Chan y cols., 2009). La trascendencia de esta conservación permite explicar cómo parte importante de los avances en el entendimiento genético de las enfermedades humanas ha venido de *Drosophila* o *C. elegans* (van Ham y cols., 2009).

La razón por la que estos organismos han sido útiles en esta tarea es que cada uno tiene características atractivas y potentes como modelo de estudio, como lo son la capacidad de hacer análisis genéticos, y que procesos y fenotipos pueden estudiarse a nivel de célula única o en tejidos compuestos de un pequeño número de ellas, pero en el contexto del organismo completo e intacto (Revisado en Giacomotto y Ségalat, 2010). Este nivel de resolución es fundamental para entender la función de genes en un contexto normal, y es ilustrado por el destacable progreso de la genética del desarrollo durante los últimos años (Duffy y Perrimon, 1996; Budirahardja y Gönczy, 2009; Shaham, 2010).

Recientemente la línea lateral del pez cebra ha ganado terreno como un atractivo sistema para estudiar *in vivo* las bases genéticas de la morfogénesis, porque posee las características relativamente simples y experimentalmente accesibles de *Drosophila* o *C. elegans*, pero en un modelo vertebrado, lo que permite generar conocimiento con impacto inmediato en esta clase de organismos (Dambly-Chaudière y cols., 2003; Ma y Raible, 2009).

### **1.1 Ventajas del pez cebra**

Desde hace ya casi 3 décadas, el uso del pez cebra (*Danio rerio*) se ha incrementado dramáticamente en la investigación científica (Westerfield, 2000; Lieschke y Currie, 2007)



**Figura 1. Pez cebra (*Danio rerio*).** (A) Un ejemplar adulto de pez cebra de aproximadamente 3 meses de edad. (B) Muestra de diferentes estadios del desarrollo desde un huevo recién fecundado (arriba izquierda) hasta una larva de 3dpf (abajo). Entre las primeras 6 imágenes de este panel han transcurrido aproximadamente 18hpf. La imagen siguiente es de un embrión de 30hpf y la penúltima es de una animal de 48hpf. (C) embriones de aproximadamente 36hpf. Se pueden observar claramente los ojos desarrollados. En esta etapa los embriones ya presentan bastante movimiento. La organogénesis ya ha comenzado. (D) Placa de Petri con muchos embriones nadando libremente. Se puede mantener una gran cantidad de embriones en un espacio reducido, lo que facilita los análisis estadísticos y es una característica atractiva para los estudios genéticos en vertebrados

La contribución de este modelo al avance de la biología molecular y la genética moderna se origina con su uso como un vehículo para poner a prueba ideas respecto a las bases genéticas de la formación y función del cerebro en vertebrados, en el Instituto de Neurociencias de la Universidad de Oregon

(Streisinger y cols., 1981). Su uso se ha masificado a tal punto que hoy es uno de los modelos más usados para el entendimiento de la genética, biología celular, y fisiología del desarrollo de vertebrados y enfermedades humanas, y actualmente se trabaja con él en cientos de laboratorios alrededor del mundo (Lieschke y Currie, 2007).

Entre las ventajas que presenta este modelo se cuentan: fertilización externa de sus huevos, lo que permite el estudio de todas las etapas del desarrollo; la gran cantidad de embriones obtenidos por cruce; sus tejidos son transparentes en estadíos embrionarios y larvales, lo que facilita la visualización de estructuras internas bajo una lupa de disección; presenta un tiempo generacional corto (3 meses aproximadamente); existe un siempre creciente número de líneas transgénicas y mutantes para genes específicos; su genoma está secuenciado; es posible inhibir la función génica con el uso de oligonucleótidos antisentido y existen otras técnicas moleculares poderosas. Finalmente su mantención es fácil y de bajo costo (Figura 1).

Estas y otras ventajas han permitido que el pez cebra se haya podido establecer como organismo de estudio para variados propósitos como: modelar enfermedades humanas (Lieschke y Currie, 2007); para el estudio de la organogénesis (Thisse y Zon, 2002); envejecimiento y neurodegeneración (Kishi y cols., 2009; Li y cols., 2010; Gerhard, 2007); metástasis y migración celular colectiva (Aman y Piotrowski, 2010, Friedl y Gilmour, 2009); regeneración (Poss y cols., 2003; Coffin y cols., 2010; Curado y Stainier, 2010); estudios toxicológicos (Froehlicher y cols., 2009) y respuesta inmune (Renshaw e Ingham, 2010; d'Alencon y cols., 2010), entre varios otros.

A la fecha, los investigadores que trabajan con pez cebra han contribuido fuertemente a la formación de bases de datos e información, y centros de mantención de líneas transgénicas y mutantes (The Zebrafish Model Organism Database, ZFIN, [http://zfin.org/cgi-bin/webdriver?MIval=aa-ZDB home.apg](http://zfin.org/cgi-bin/webdriver?MIval=aa-ZDB+home.apg); The Zebrafish International Resource Center, ZIRC, <http://zebrafish.org/zirc/home/guide.php>), lo que pone a disposición de la comunidad cientos de líneas con potencial biomédico. Con este tipo de inversión se espera que los diferentes usos de este modelo sigan aumentando, y contribuyan a entender las bases genético-moleculares de un creciente número de patologías humanas así como también desarrollar y proponer, en última instancia, terapias para ello (Lieschke y Currie, 2007).

## **1.2 La línea lateral**

En el pez cebra, así como también en otros peces y algunos anfibios, existe un sistema sensorial conocido como línea lateral que le permite detectar los movimientos del agua en torno a la superficie de su cuerpo y está involucrado en varios comportamientos como el escape de depredadores, cortejo sexual, y la sincronía del nado en cardumen (Dambly-Chaudière y cols., 2003). Este sistema ha desaparecido en los vertebrados terrestres, con excepción de su contraparte, el oído interno. Se postula que la línea lateral es un sistema auditivo ancestral (Dambly-Chaudière y cols., 2003).

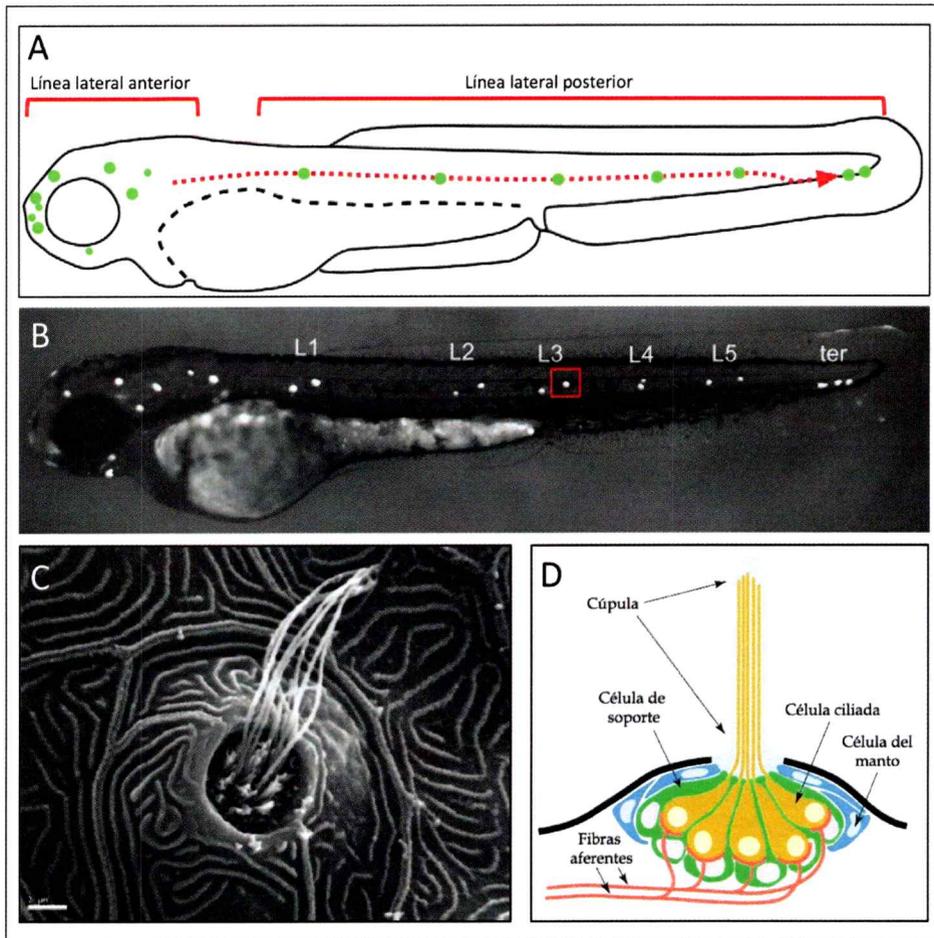
El sistema de la línea lateral se compone de una serie de órganos sensoriales, denominados neuromastos, distribuidos sobre la superficie del

cuerpo del animal, a intervalos regulares (Figura 2A-B). La disposición de cada uno de estos órganos es conservada entre individuos de una misma especie, y mantienen un patrón especie-específico. Cada neuromasto se compone de un núcleo central de células ciliadas, rodeado de células accesorias no sensoriales de 2 tipos: las de soporte que rodean a las células ciliadas, y las del manto que delimitan externamente al neuromasto (Metcalf y cols., 1985; Ghysen y Dambly-Chaudière, 2004; Figura 2C-D). Además las células ciliadas son innervadas por neuronas sensoriales que poseen sus somas en ganglios craneales (Ghysen y Dambly-Chaudière, 2004)

### **1.3 Desarrollo de la línea lateral posterior**

La línea lateral en el pez cebra comprende 2 ramas mayores: una línea lateral anterior cuyos neuromastos se ubican en la cabeza rodeando los ojos, y una línea lateral posterior con neuromastos que se encuentran sobre el tronco y la cola (Figura 2A-B). De la formación del componente anterior es bastante poco lo que se conoce, por lo que de aquí en adelante en esta tesis se hará referencia sólo a la rama posterior.

La línea lateral posterior surge a partir del depósito de neuromastos por un primordio con características migratorias, un proceso que durante los últimos años ha podido ser documentado *in vivo* de manera muy elegante con el uso de líneas transgénicas (Metcalf y cols., 1985; Haas y Gilmour, 2006). El primordio se forma a partir de las placodas de la línea lateral, uno de los varios engrosamientos ectodermales que dan origen a las estructuras sensoriales de la

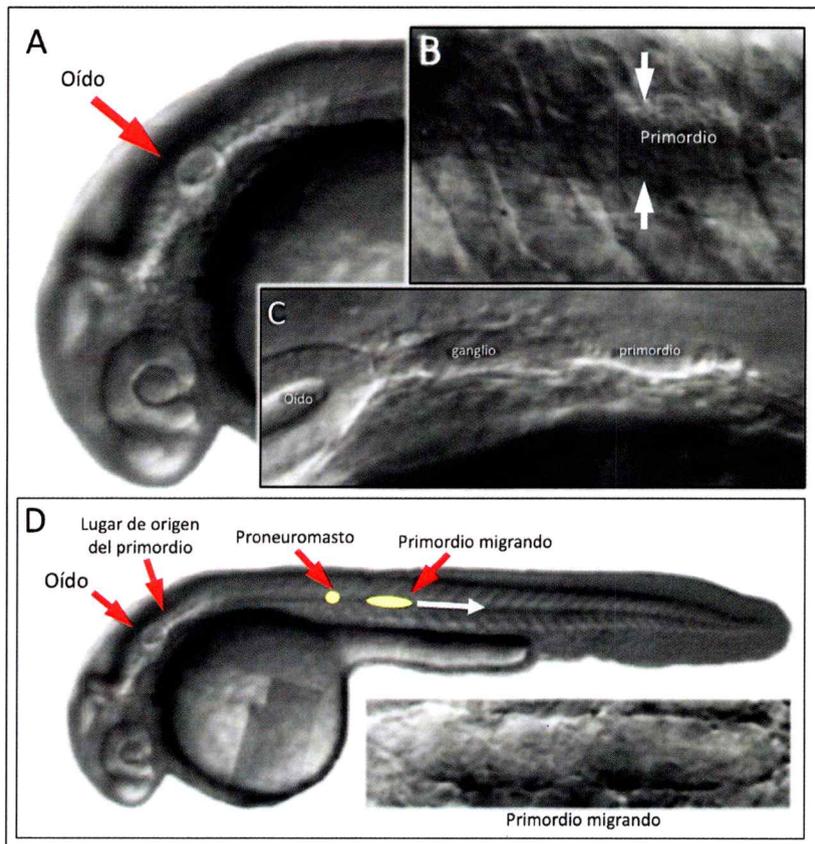


**Figura 2. La línea lateral en el pez cebra.** (A) Representación esquemática de la línea lateral embrionaria en una larva de 2.5dpf. Los puntos verdes representan los neuromastos. Se muestra la línea lateral anterior que rodea los ojos del animal, y la posterior que se distribuye sobre en el tronco del pez en el miosepto (representado por la flecha punteada roja, y que sirve como vía de migración para el primordio de la línea lateral). (B) Patrón real de neuromastos en una larva de 2.5dpf. Los neuromastos han sido teñidos con Diasp, una tinción vital que se incorpora específicamente en las células ciliadas activas de estas estructuras sensoriales y que permite visualizar este sistema *in vivo*. (C) Imagen de microscopía electrónica de barrido que muestra un neuromasto como el que esta encerrado en el cuadro rojo en (B) totalmente diferenciado. Se puede apreciar la estructura en forma de volcán del neuromasto y los cilios de las células ciliadas surgiendo desde el centro de éste. (D) Representación esquemática de un neuromastos mostrando su composición celular. En amarillo se observan las células mecanosensoriales rodeadas por las células de soporte, representadas en verde. Una cúpula gelatinosa cubre los cilios. En celeste se muestran las células del manto que delimitan el neuromasto. Las células ciliadas están inervadas por fibras aferentes.

cabeza en los vertebrados (Streit, 2004). Antes de comenzar la migración, la placoda que da origen al primordio de la línea lateral posterior contiene aproximadamente 100 células (Gompel y cols., 2001; Figura 3A-C). Hacia las 20hpf esta estructura comienza a migrar caudalmente sobre el miosepto horizontal del embrión, siguiendo una ruta estereotipada (Figura 3D). Al mismo tiempo los axones que se extienden desde el ganglio proyectan hacia el primordio y mantienen una estrecha relación con éste, lo que permite que los conos de crecimiento sean arrastrado por esta estructura migratoria durante todo su trayecto (Gilmour y cols., 2004).

A medida que el primordio migra, deposita grupos de células a intervalos de 5 a 7 somitos, lo que resulta en  $\approx 5$  proneuromastos (L1-L5) en el tronco, y 2 a 3 terminales (L6-L8) al final de la cola. Este proceso de depósito termina al rededor de las 42hpf y con esto se finaliza el proceso de formación de la línea lateral posterior embrionaria (Ghysen y Dambly-Chaudière, 2007). Poco tiempo después de que cada grupo de células es depositado, los neuromastos se diferencian completamente y adquieren sus características morfológicas y fisiológicas finales (Gompel y cols., 2001). Los conos de crecimiento axonal que co-migraron con el primordio ahora inervan las células ciliadas y sirven de guía para la migración de la glía periférica asociada, lo que a su vez mantiene una correcta fasciculación del nervio de la línea lateral (Gilmour y cols., 2002).

A los 3 días de desarrollo es posible visualizar *in vivo* el patrón completo de neuromastos de la línea lateral posterior embrionaria, mediante tinciones vitales fluorescentes como el Diasp, que es incorporado específicamente en las células ciliadas diferenciadas y activas (Collazo y cols., 1994; Figura 1A-B). De



**Figura 3. Formación de la línea lateral posterior del pez cebra.** (A) Vista lateral de la región cefálica de un embrión de 30hpf, donde se muestra la posición del oído, que es la estructura anatómica justo anterior al punto de partida del primordio migratorio. (B) Origen del primordio. Las flechas blancas delimitan la separación de las células que darán origen al ganglio (ubicadas hacia la izquierda con respecto a las flechas) y al primordio (hacia la derecha). (C) Comienzo de la migración. Se puede apreciar cómo las células que dan origen al ganglio quedan separadas del primordio, mientras que este se aleja por el miosepto. (D) Esquema explicativo donde la flecha blanca indica la dirección de migración del primordio y además se destaca un proneuromasto recién depositado. También se muestra el lugar del inicio de ruta migratoria. El inserto es un acercamiento al primordio. Todas las imágenes son de microscopía Nomarski.

esta manera, es posible ver que en aproximadamente 2 días se genera un patrón constante y específico en la línea lateral posterior, lo que sugiere que su mecánica de desarrollo involucra eventos de migración celular y axonal dirigidas, diferenciación celular para que el sistema sea funcional, y

proliferación celular que permite mantener un estado dinámico del primordio a pesar del depósito de los neuromastos. Todos estos procesos se encuentran acoplados temporal y espacialmente en este sistema, lo que lo convierte en un atractivo modelo para el estudio de estos eventos en un contexto normal. ¿Cuáles son las bases genéticas de los eventos que dan cuenta del desarrollo, organización y diferenciación en la línea lateral del pez cebra?

#### **1.4 Bases genéticas del desarrollo de la línea lateral posterior**

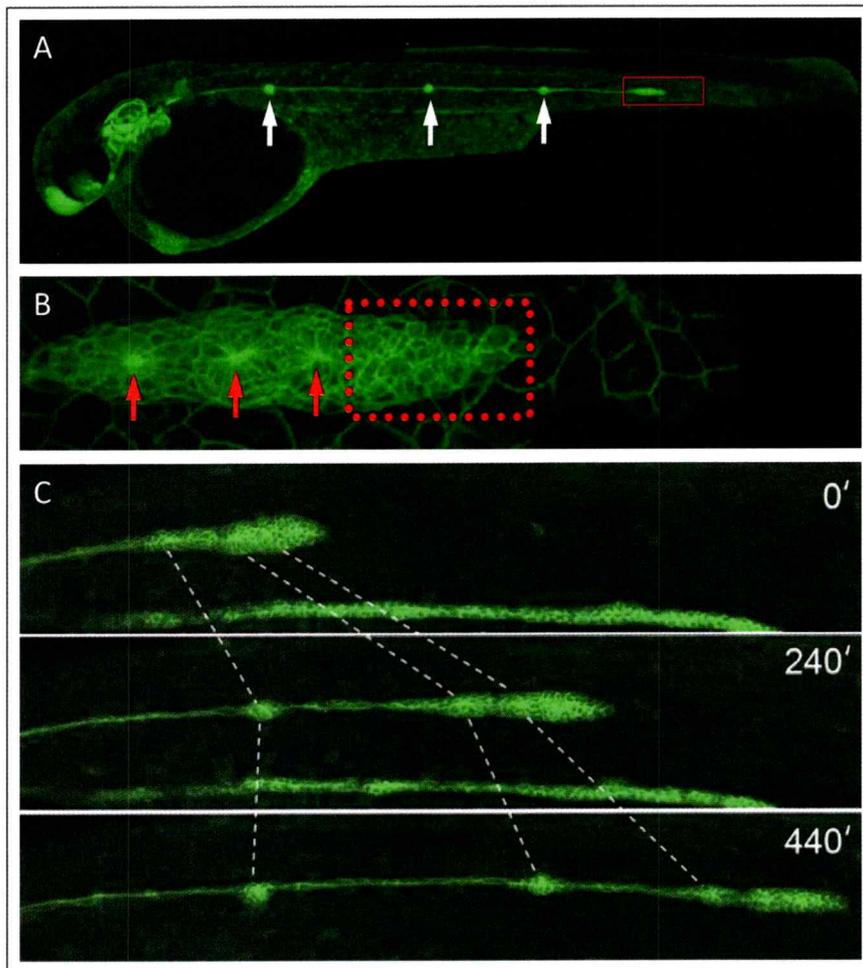
Cada vez se ha ido conociendo más sobre la genética involucrada en diferentes aspectos del desarrollo del pez cebra. Los rastreos sistemáticos de mutaciones que afectan el desarrollo de *Drosophila* y *C. elegans*, y que tuvieron un carácter fundador en los mecanismos genéticos del desarrollo (Nüsslein-Volhard y Wieschaus, 1980; Horvitz y Sternberg, 1991), han sido aplicados con éxito al pez cebra. Es así como una combinación de aproximaciones de mutagénesis química y, más tarde mutagénesis insercional, a gran escala han permitido obtener una valiosa colección de mutantes en genes esenciales para diversos procesos morfológicos y celulares en este organismo (Driever y cols., 1996; Haffter y cols., 1996; Amsterdam y cols., 1999). Esto sumado a la posibilidad de identificar perfiles de expresión génica durante el desarrollo y la disponibilidad del genoma secuenciado refuerzan el potencial del pez cebra como modelo de estudio.

En particular en la línea lateral posterior, durante los últimos años varios autores han ido estableciendo correlaciones entre los distintos eventos que

subyacen al desarrollo de este sistema y la expresión y función de diferentes genes (Koslowski y cols., 2005; Sarrazin y cols., 2006; Valentin y cols., 2007; Nechiporuk y Raible, 2008; Aman y Piotrowski, 2008; Lecaudey y cols., 2008; Matsuda y Chitnis, 2010). A continuación se comentará esta evidencia molecular involucrada en las diferentes etapas que llevan a la formación de la línea lateral y cómo esto sustenta la investigación propuesta en esta tesis.

### **1.5 Migración del primordio**

Una de las características más sorprendentes del desarrollo de la línea lateral es la migración celular colectiva y dirigida del primordio desde la cabeza del pez hasta la cola, periodo durante el cual se realiza el depósito de los neuromastos (Ghysen y Dambly-Chaudière, 2007; Figura 4A-C). Un aspecto esencial para llevar a cabo este proceso es la organización interna de esta cohorte de células, lo que queda de manifiesto en el patrón segmental del primordio, un fenómeno que en la naturaleza ocurre en el desarrollo temprano del embrión de *Drosophila* o la segregación del mesodermo paraxial en los somitos en vertebrados (revisado en Auleha y Pourquié, 2008). En el primordio de la línea lateral posterior los dos tercios traseros (respecto a la dirección de migración) están organizados en rosetas de células, cada una de las cuales corresponde a un proneuromasto en desarrollo que más tarde será depositado, mientras que el tercio líder permanece en un estado mesenquimático (Nechiporuk y Raible, 2008; Aman y Piotrowski, 2008; Lecaudey y cols., 2008; Figura 4B). Las células que componen esas rosetas evidencian una morfología



**Figura 4. Comportamiento migratorio del primordio de la línea lateral posterior del pez cebra visto en la línea *tg(cldnB:lynGFP)<sup>zf106</sup>*.** (A) Embrión transgénico de 36hpf donde se observa la expresión de GFP con localización en la membrana celular, en el primordio (encerrado en un cuadro rojo), en los neuromastos depositados (flechas blancas) y en las células interneuromásticas que conectan estos órganos sensoriales. (B) Acercamiento al cuadro rojo mostrado en (A), donde se observa que los dos tercios posteriores del primordio están organizados en rosetas (flechas rojas), mientras que el tercio líder que va en el frente de migración presenta características mesenquimáticas y no se ordena en rosetas (cuadro punteado en rojo). (C) Se muestra el primordio migrando a diferentes tiempos, y el depósito de los proneuromastos durante su trayecto. Los proneuromastos están marcados con las líneas punteadas blancas. (adaptado de Haas y Gilmour, 2006).

característica con un ordenamiento radial y una constricción apical producto del enriquecimiento diferencial de proteínas de adhesión en puntos focales, lo

que permite la organización de las células en ese tipo de ordenamientos y donde se ha mostrado la función de los reguladores de polaridad celular *Lgl1* y *Lgl2* (Lecaudey y cols., 2008; Hava y cols., 2009). La organización diferencial del primordio tiene profundas consecuencias en aspectos que son discutidos más adelante.

La polarización del primordio de la línea lateral a lo largo de su eje anteroposterior es crítica para la migración dirigida de esta estructura. Se ha documentado la expresión diferencial de 2 receptores de quimioquinas: *cxcr4b* y *cxcr7b*; éstos se expresan en la región líder y trasera del primordio, respectivamente, y mediante aproximaciones genéticas y manipulación de sus niveles de expresión se ha mostrado que son fundamentales para el proceso migratorio (David y cols., 2002; Dambly-Chaudière y cols., 2007; Valentin y cols., 2007). Se ha propuesto que la migración es dirigida por una interacción diferencial entre esos receptores y su ligando SDF1a, cuya expresión se restringe a una delgada línea sobre el miosepto horizontal, exactamente en la vía que usa el primordio para moverse (David y cols., 2002; Li y cols., 2004; Dambly-Chaudière y cols., 2007; Valentin y cols., 2007). Esta propuesta es avalada por el aislamiento del mutante *medusa*, que presenta una mutación en *sdf1a* y evidencia un fenotipo más severo que la inactivación de ambos receptores por separado (Valentin y cols., 2007). El mecanismo que actualmente se propone para explicar este fenómeno es que el primordio se mueve direccionalmente porque SDF1a activa a CXCR4b en el borde líder y esto reprime la expresión de *cxcr7b* en esa zona, mientras CXCR7b en la región

trasera secuestra el ligando SDF1a haciendo que no esté disponible para CXCR4b (Dambly-Chaudière y cols., 2007).

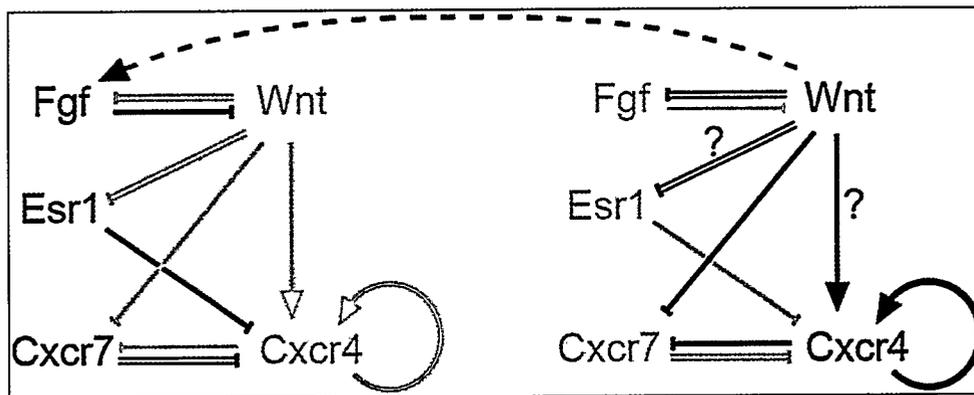
Esta relación CXCR/SDF1 tiene mucha importancia biomédica actual porque está presente en varios tipos de cáncer y ha sido implicada en la migración de células cancerosas a sitios blanco (Müller y cols., 2001). Al respecto, recientemente se ha agregado un nuevo actor molecular a este sistema en la línea lateral. Gamba y cols. (2010) han demostrado que la inactivación del receptor de estrógenos ESR1 inhibe a expresión de *cxcr4b* en el primordio, sugiriendo que actúa como un represor de ese receptor de quimioquinas. Esto podría explicar por qué los estrógenos disminuyen la capacidad metastásica de las células de cáncer de mama ESR positivas, y abre nuevas puertas para entender el comportamiento de las células cancerosas (García y cols., 1991).

Estudios recientes han revelado otro nivel de asimetría durante la migración del primordio, apuntando a la función de las vías FGF y Wnt/ $\beta$ -catenina y su relación con CXCR/SDF1, lo que recién comienza a develar el grado de conexión entre los diversos eventos morfogénicos de la línea lateral. La activación de la vía Wnt tiene lugar en el borde líder del primordio y activa a la señal FGF en las regiones trasera y medial del éste; FGF a su vez restringe la señal Wnt al borde líder (Aman y Piotrowski, 2008). La activación de la vía Wnt reprime la expresión de *cxcr7b* y se ha propuesto la hipótesis de que activa indirectamente a *cxcr4b* en la región líder inhibiendo a un putativo represor de éste; de esta manera Wnt regula la migración mediante una modulación de la expresión polarizada de los receptores de quimioquinas (Aman y Piotrowski, 2010).

Juntando la información con que se dispone actualmente, se ha propuesto un control dual de la expresión de *cxcr4b*, y en segunda instancia de *cxcr7b*, para controlar la migración del primordio de la línea lateral (Figura 5). Un nivel de control de la migración de esta cohorte de células es la represión directa de *cxcr4b* por ESR1 en la región trasera del primordio, resultando en la expresión de *cxcr7b* en ese dominio, y en una asimetría y migración direccional del primordio. La estabilidad de este nivel de control es reforzada por una retroalimentación positiva ejercida por SDF1/CXCR4 sobre la expresión de *cxcr4b* (Gamba y cols., 2010). El segundo nivel de control depende de la polarización Wnt/FGF del primordio. La actividad de la vía Wnt en el borde líder reprime a *cxcr7b* y probablemente promueve indirectamente la expresión de *cxcr4b*. Si *esr1* corresponde al represor hipotético propuesto por Aman y Piotrowski (2008) es algo que aun debe ser determinado (Gamba y cols., 2010).

### **1.6 Organización interna del primordio y formación de neuromastos**

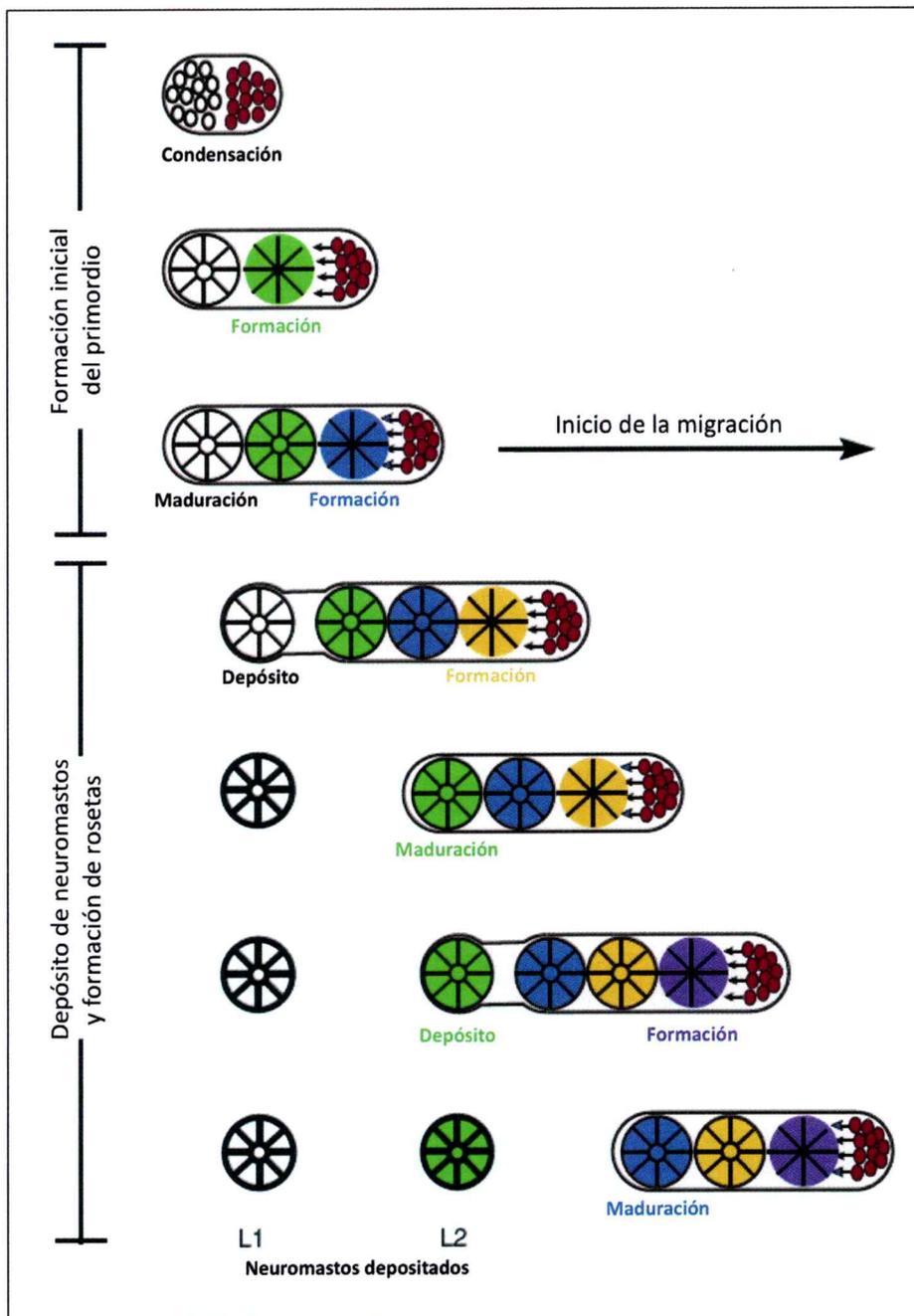
La maduración gradual de los proneuromastos/rosetas en el primordio es reflejada también a lo largo de su eje de migración. Se ha demostrado de manera elegante que a medida que el primordio deposita los proneuromastos durante su viaje, se van formando nuevas rosetas a partir de un conjunto de células progenitoras localizadas en la región líder del primordio; de esta forma se establece un gradiente de maduración desde la región líder hacia la región trasera (Nechiporuk y Raible, 2008; Figura 6). El comienzo del depósito de un neuromasto está asociado con la generación de una cuarta roseta tras el borde



**Figura 5 . Control de la expresión de *cxc7b* y *cxc4b* en la región líder (a la derecha) y posterior (izquierda) del primordio en migración.** La expresión de *cxc4b* es reprimida en la zona posterior por ESR1, y mantenida en la zona líder por un *feedback* positivo a través de la señal SDF1/CXCR4. Un mecanismo de activación adicional, probablemente bajo en control directo de Wnt, asegura la expresión de *cxc4b* en la región líder. El patrón complementario de expresión de *cxc7b* refleja represión por la señalización SDF1/CXCR4 y una represión adicional por parte de Wnt en la región líder. Las líneas simples indican control a nivel de expresión génica; las dobles, un control a nivel de la actividad del producto génico. En negro y gris se indican componentes que están activos o inactivos en la región líder o posterior, respectivamente. La línea punteada indica difusión de ligandos FGF inducida por Wnt en el borde líder. Los signos de interrogación indican interacciones probables, pero no demostradas. (Gamba y cols., 2010)

líder. Este proceso cíclico de generación de rosetas después del depósito de cada neuromasto continúa durante toda la vía migratoria del primordio. Este modelo de una "zona progenitora" es también apoyado por análisis de incorporación de BrdU en el primordio, donde los niveles más elevados de marca están hacia la región líder del primordio (Laguerre y cols., 2005). Sin embargo las señales que controlan la proliferación en este sistema migratorio permanecen muy poco exploradas.

Trabajos recientes han comenzado a dilucidar las bases moleculares de



**Figura 6. Modelo de segmentación del primordio de la línea lateral en el pez cebra.** La formación inicial del primordio consiste en la organización de las células en rosetas (arriba). Las rosetas que darán origen a los proneuromastos se forman atrás de la región líder, que se marca con un color diferente para explicitar cada evento de maduración. La migración se inicia una vez que se forman 2 a 3 rosetas, y el comienzo del depósito comienza con la formación de una cuarta roseta. Nuevas rosetas son cíclicamente formadas en la región líder después del depósito de neuromastos y esto continúa durante toda la migración del primordio de la línea lateral. (Adaptado de Ma y Raible, 2009).

esta organización regional del primordio, en particular las interacciones entre FGF y Wnt/ $\beta$ -catenina, y cómo una misma señal puede regular más de un proceso (Nechiporuk y Raible, 2008; Aman y Piotrowski, 2008; Lecaudey y cols., 2008).

La vía FGF es fundamental para establecer una correcta formación de las rosetas del primordio, y por lo tanto es esencial para el *patterning* interno de este tejido (Nechiporuk y Raible, 2008). Si se bloquea FGF, el primordio se desorganiza, no forma rosetas y la migración cesa; además se pierde la morfología columnar y el primordio completo permanece en un estado mesenquimático como el de las células del borde líder, lo que concuerda con la formación de un exceso de rosetas al sobreactivar la vía FGF (Lecaudey y cols., 2008).

Los ligandos FGF10 y FGF3 median la señal FGF en el primordio de la línea lateral posterior. Ambos se expresan en el borde líder en una posición que permite atribuirles una función en la formación de rosetas de los proneuromastos, y su expresión se regula negativamente en la región trasera del primordio, donde sólo hay 2 focos adicionales de expresión de FGF 10 en una o dos células en el centro de las rosetas traseras (Nechiporuk y Raible, 2008; Lecaudey y cols., 2008). Este punto es fundamental para comprender la complejidad y acoplamiento de varios procesos en la línea lateral, porque recientemente se ha mostrado que esos puntos de expresión de FGF10 en la región trasera del primordio dependen de la función proneural de *atonal1a*, el gen maestro de la diferenciación de las células ciliadas en la línea lateral y el oído de los vertebrados (Matsuda y Chitnis, 2010); además, *atonal1a* induce la

expresión de *deltaD*, el ligando de Notch, e inhibe la expresión del receptor *fgfr1*, cuya expresión se restringe a la región trasera del primordio y se excluye de la o las células que están comprometidas hacia un destino ciliado, evidenciando un patrón de expresión complementario a los ligandos y *ad hoc* para una correcta señalización. (Nechiporuk y Raible, 2008; Lecaudey y cols., 2008). Esta fuente trasera de señal FGF es fundamental para asegurar la formación estable de rosetas epitelializadas, por lo tanto neuromastos. Al mismo tiempo DeltaD activa a Notch en las células circundantes inhibiendo la expresión de *atonal1a* y asegura que esas células sean especificadas como células de soporte; este proceso conocido como inhibición lateral, que es esencial para la neurogénesis, también es fundamental para prevenir una catástrofe morfogénica en el primordio: en falta de función de Notch-Delta, la expresión no regulada de *atonal1a* reduce la expresión de *fgfr1*, lo que lleva a una atenuación de la señal FGF en la región trasera del primordio y previene la maduración efectiva de las rosetas y la falla en la formación de neuromastos. (Matsuda y Chitnis, 2010).

El hecho de que los patrones de expresión de ligandos y receptor de FGF sean complementarios indican que la señal FGF es activa en la región trasera del primordio, pero ausente de la zona líder. Análisis de mosaico han demostrado que FGF es crítico para el normal espaciamiento en el depósito de los neuromastos: cuando células silvestres son transplantadas en un primordio deficiente de FGF3 y FGF10, ellas son capaces de reclutar y ordenar a células vecinas para formar rosetas y restaurar el depósito de los neuromastos (Nechiporuk y Raible, 2008). El experimento contrario ha permitido concluir

además que la inhibición de la vía FGF también afecta la neurogénesis en la línea lateral, ya que si una célula que tiene bloqueada esta vía se introduce en un contexto de primordio silvestre, jamás llegará a ser una célula ciliada a pesar de que es capaz de incorporarse en los neuromastos formados (Nechiporuk y Raible, 2008). Estos resultados sugieren un modelo en que el espaciamiento normal de los neuromastos a lo largo del tronco del pez cebra es controlado por la tasa de producción de proneuromastos en el primordio, un proceso que depende de un delicado balance de FGF, y que además está íntimamente ligado a la neurogénesis de este tejido.

En paralelo, la vía Wnt/ $\beta$ -catenina también juega un rol importante sobre la regulación del *patterning* del primordio de la línea lateral a través de una modulación de la vía FGF (Aman y Piotrowski, 2008). En una línea de peces mutante para el gen *apc*, donde existe una activación constitutiva de la vía Wnt, el primordio presenta una sobreexpresión de *fgf3* y *fgf10*. Por otra parte, el experimento contrario, es decir, una reducción de los niveles de la señal Wnt, lleva a una disminución de la expresión de FGF. Además los dominios de expresión de *axin2* y *lef1*, genes que indican la actividad de la vía, muestran que la señal es activa en la región líder, apoyando la hipótesis de que Wnt regula a FGF en esa zona (Aman y Piotrowski, 2008). A su vez, la señal FGF limita la acción de la vía Wnt al regular positivamente a *dkk1*, un inhibidor extracelular de Wnt.

Estos datos demuestran que alteraciones en las vías de FGF, Wnt o Notch-Delta tienen consecuencias sobre la migración, *patterning* y diferenciación celular. Sin embargo debido al acoplamiento de estos procesos

hasta el momento no ha sido posible estudiar detalladamente la función de estas vías en fenómenos particulares del desarrollo de este sistema, lo que es necesario para poder disectar cómo ellas regulan procesos individuales.

### **1.7 Especificación y diferenciación.**

En el pez cebra, los neuromastos tienen células ciliadas funcionales a los 3 días de desarrollo, lo que puede ser visualizado en términos morfológicos, con el uso de tinciones vitales, y con líneas transgénicas específicas (Collazo y cols., 1994; Xiao y cols., 2005; Sarrazin y cols., 2006). Estas células son fisiológicamente muy similares a las del oído interno de los vertebrados, y la genética involucrada en la diferenciación de ambos tipos celulares es también conservada, como se verá más adelante en esta sección (Froelicher y cols., 2009).

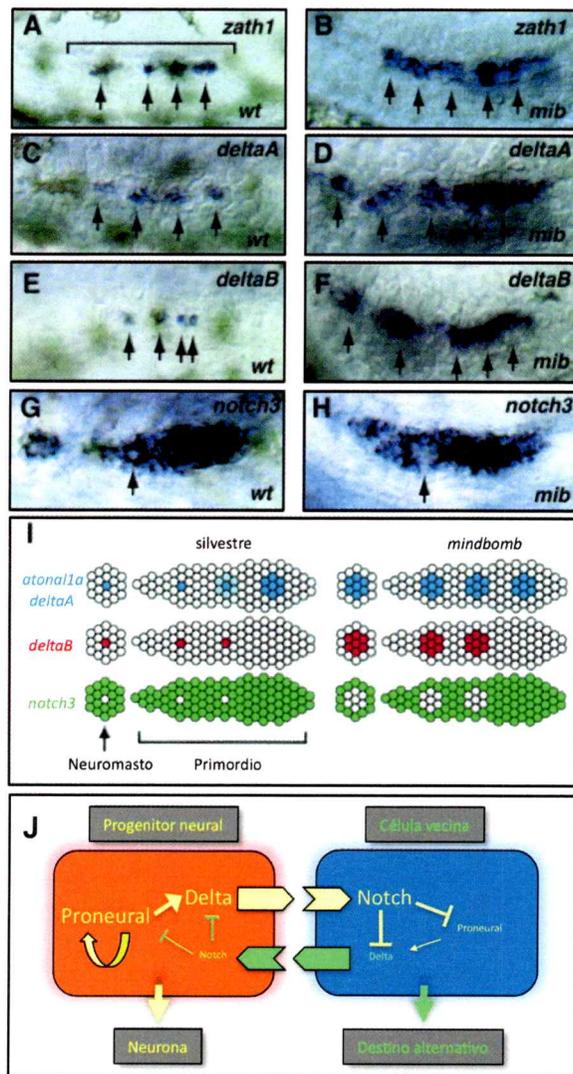
La correcta orientación de las células ciliadas a lo largo del sistema de la línea lateral es esencial para que el animal sense los movimientos direccionales del agua (López-Schier y cols., 2004). La orientación global de estas células en relación al eje anteroposterior es determinado primeramente por el movimiento direccional del primordio durante la embriogénesis, surgiendo como un nuevo ejemplo de cómo los diferentes procesos de la línea lateral se encuentran acoplados; esto ha sido demostrado de manera convincente con el uso de líneas mutantes que afectan el proceso (López-Schier y cols., 2004).

Durante el desarrollo de los neuromastos, la división de los progenitores de las células ciliadas producen pares de este tipo de células, lo que resulta en

dos *sets* que se enfrentan en un plano (López-schier y cols., 2006). Este compromiso de estos precursores hacia la diferenciación ha sido mostrado depender de las mismas señales que organizan las rosetas durante la migración del primordio confluyendo en la regulación de genes maestros de la diferenciación que son ampliamente conservados evolutivamente (Nechiporuk y Raible, 2008; Hassan y Bellen, 2000). Aunque se conoce cómo se activan estos genes esenciales para comprometer a una células hacia un destino, los mecanismos por los que ellos actúan permanecen ocultos (Krizhanovsky y cols., 2006; Scheffer y cols., 2007).

Estudios previos han mostrado que la vía FGF dirige la génesis de las células ciliadas mediante la activación del gen proneural *atonal1a* en el oído interno del pez cebra (Milimaki y cols., 2007). En el primordio de la línea lateral, la expresión de *atonal1a* y el *deltaA* (un ligando de Notch) se restringe de manera progresiva a un único precursor de célula ciliada desde la región líder hacia la trasera y en los neuromastos recién depositados, mientras que *notch3* se expresa en las células de soporte presuntivas (Itoh y Chitnis, 2001; Figura 7A-I). La evidencia funcional muestra que la inhibir *atonal1a* se produce un bloqueo de la diferenciación de las células ciliadas en la línea lateral (Sarrazin y cols. 2006). Finalmente La expresión de *atonal1a*, *deltaA* y *notch3* están ausentes en embriones deficientes en FGF3 y FGF10, indicando que el proceso ocurre de manera análoga al oído (Milimaki y cols., 2007; Nechiporuk y Raible, 2008).

La restricción de *atonal1a* y *deltaA* en el primordio es el resultado de la inhibición lateral a través de la vía Notch-Delta (Itoh y Chitnis, 2001). Este



**Figura 7. La expresión de genes proneurales y neurogénicos en el primordio de la línea lateral posterior se correlaciona con la selección de destino hacia células ciliadas mediante inhibición lateral. (A, C, E) Restricción progresiva de la expresión de *atonal1a* (*zath1* en esta figura) se correlaciona con la expresión de *deltaA* y *deltaB*. (G) *notch3* es excluido de las células seleccionadas hacia un destino ciliado. (B, D, F) La falla en la restricción de la expresión de *atonal1a* en el primordio se corresponde con un incremento en el número de células que expresan *deltaA* y *deltaB*. El incremento se correlaciona además con un aumento en el número de células desde las que *notch3* es excluido en la región trasera del primordio, como se ve en (H); la dirección de la migración es hacia la derecha. (Continúa en la siguiente página)**

(I) Esquema que representa la expresión de *atonal1a*, *deltaA*, *deltaB*, y *notch3* en un primordio silvestre y en el mutante *mindbomb*. (Adaptado de Itoh y Chitnis, 2001). (J) Representación esquemática de la inhibición lateral mediada por Notch-Delta. Inicialmente todas las células de un grupo proneural expresan niveles iguales de un gen proneural. Aquella célula que comienza a expresar mayores niveles de ese gen, expresará más Delta, que activará a Notch en la célula vecina. A su vez, Notch reprimirá la expresión del gen proneural, y de esta manera impedirá que esa célula adopte el destino neuronal, lo que sí será hecho por la que inicialmente tuvo altos niveles del proneural.

mecanismo es ampliamente conservado desde invertebrados a vertebrados y se ha demostrado su función en la selección de destinos en el oído interno de vertebrados y en los órganos cordotonales en *Drosophila* (Hassan y Bellen, 2000). Para que la vía funcione de manera correcta en la selección de un precursor, se requiere en primer lugar la expresión de un gen proneural particular en un grupo de células que adquieren así la competencia para ser precursores sensoriales. Luego, a través de la inhibición lateral, una célula de ese grupo adoptará el destino a precursor sensorial, mientras que el resto adquiere por defecto un destino alternativo. En esta etapa, el gen proneural inhibe su propia expresión activando al receptor Notch en las células vecinas: Delta, el ligando de Notch, se expresa y se ubica en la membrana de la célula que seguirá el destino neuronal. Esto activa la expresión de represores que regulan negativamente al gen proneural en esas células que rodean la "elegida", refinando el patrón inicial (Figura 7)

A pesar de las características ventajosas que posee la línea lateral, el desarrollo de las células ciliadas y su relación con las vías descritas, sólo recientemente se ha comenzado a estudiar en detalle este proceso en este modelo (Sarrazin y cols., 2006; Matsuda y Chitnis, 2010). De hecho la mayor

parte de la información existente hoy en día sobre el compromiso y diferenciación de estas células a partir de progenitores, como un proceso mediado por *atonal*, se ha obtenido de estudios en el oído interno de ratón (revisado en Kelley, 2006). En este sistema, el epitelio sensorial consiste en células ciliadas y de soporte, producidas a partir de grupos celulares que expresan tempranamente el gen proneural *atonal1* (*Math1*) (Ben-Arie y cols., 1996; Bermingham y cols., 1999). Consecuentemente con el modelo de inhibición lateral, a medida que este grupo celular se desarrolla, unas pocas células aumentan la expresión de *Math1* y completan su diferenciación como células ciliadas. El resto pierde la expresión de este gen y adquieren el destino de células de soporte (Kiernan y cols., 2005; Lanford y cols., 1999; Lanford y cols., 2000; Zeng y cols., 2000; Zine y cols., 2001). Existe además evidencia funcional con datos potentes sobre este factor de transcripción en el modelo murino. Primero, ratones *knock-out* para *Math1* no poseen células ciliadas en el oído (Bermingham y cols., 1999; Woods y cols., 2004). Segundo, su sobreexpresión en el órgano de Corti en desarrollo conduce a una inducción cercana al 100% de células ciliadas (Zheng y Gao, 2000; Woods y cols., 2004; Jones y cols., 2006). Y tercero, la sobreexpresión de *Math1* en el oído de cerdos de guinea sordos permite la aparición de nuevas células ciliadas y una recuperación de la audición (Izumikawa y cols., 2005). Esto indica que *Math1* es un regulador fundamental, necesario y suficiente, para la diferenciación de las células ciliadas, y debido a ello ha recibido gran atención tanto en investigación básica como aplicada (Shailam y cols., 1999; Landford y cols., 2000; Zheng y

Gao, 2000; Chen y cols, 2002; Wang y cols, 2002; Woods y cols., 2004; Fritzscht y cols, 2005; Izumikawa y cols., 2005; Kelley, 2006).

En pez cebrá existen un mutante llamado *mindbomb*, que tiene un defecto en la inhibición lateral, la cual no se lleva cabo porque existe una mutación en una ubiquitin-ligasa que interactúa con el dominio intracelular de Delta y lo procesa para llevar a cabo el evento normalmente cuando señala (Itoh y cols., 2003). Al hacer un análisis funcional con este mutante en la línea lateral, Itoh y Chitnis (2001) encontraron que la falla en la inhibición lateral resulta en un dominio expandido de *atonal1a*, *deltaA* y *deltaB* en el primordio en migración, lo que sucede a expensas del dominio de expresión de *notch3* en la región trasera del primordio. En consecuencia, se produce un exceso de células ciliadas (Figura 7A-I). Este punto no es sólo fundamental para la diferenciación y restricción de linaje, sino que además es necesario para el establecimiento de centros secundarios de expresión de *fgf10* que dependen de *atonal1a* para epitelializar el primordio en la región trasera y conducir a una normal diferenciación, morfogénesis de este tejido; sin ellos no se forman neuromastos (Matsuda y Chitnis, 2010). De esta forma *atonal1a* adquiere un rol central en el establecimiento de una robusta red regulatoria que es fundamental para los eventos recién descritos. Sin embargo a pesar de la evidencia sobre la importancia de este gen en el oído y línea lateral, no se conocen los mecanismos por los cuales esta proteína regula y organiza la selección de un dominio y la posterior diferenciación de las células ciliadas a partir de éste. Así, el rol de esta proteína como factor de transcripción y los genes blanco directos a través de los que actúa son casi totalmente desconocidos.

Todos los datos expuestos apuntan a una delicada regulación de procesos coordinados en la línea lateral, y por lo tanto creemos imperativo el poder hacer un análisis funcional más profundo para disectar los diferentes fenómenos que se llevan a cabo en este tejido. Debido a que los procesos de diferenciación, migración y proliferación que conducen a la morfogénesis de este sistema se encuentran acoplados, proponemos la siguiente hipótesis.

## II. HIPÓTESIS

La producción continua de neuromastos depende de un proceso proliferativo que es regulado por genes de vías que también controlan migración y *patterning* del primordio. La formación de los neuromastos ocurre en torno a un núcleo de expresión del gen proneural *atonal1a* cuyos blancos transcripcionales regulan la diferenciación de las células ciliadas en el centro de los neuromastos consolidando la apropiada morfogénesis del sistema de la línea lateral.

### III. OBJETIVOS

#### Objetivo general

Identificar genes esenciales para el desarrollo de la de la línea lateral del pez cebra y su relación con el proceso de diferenciación mediado por *atonal1a*.

#### Objetivos específicos

- 1.-Identificación de secuencias de unión de *atonal1a* y de potenciales genes blanco.
- 2.-Relación regulatoria entre *atonal1a* y *gfi1* en el desarrollo de las células ciliadas
- 3.-Identificación y análisis de nuevas mutaciones que afecten el desarrollo de la línea lateral del pez cebra y la relación de los genes correspondientes con *atonal1a* y el proceso de diferenciación de las células ciliadas.

## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

Este capítulo detalla los materiales e instrumentos utilizados y los protocolos celulares, moleculares y genéticos de esta tesis.

### 4.1 MATERIALES

#### 4.1.1 Material Biológico

Durante el desarrollo de esta tesis se utilizó especímenes de pez cebra (*Danio rerio*) que fueron mantenidos a 28.5°C, en ciclos de luz y oscuridad, y en agua desionizada tratada con 60mg/L de Instant Ocean a pH 7,0 usando protocolos de cuidado descritos anteriormente (Westerfield, 1994). Los embriones fueron obtenidos mediante cruces espontáneos de líneas silvestres, mutantes o transgénicas de peces adultos, y fueron mantenidos en medio E3 (5mM NaCl, 0.17mM KCl, 0.33mM CaCl<sub>2</sub>, 0.3 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.1% azul de metileno, pH 7.0). Los estadios embrionarios y larvales se expresan en horas post fertilización (hpf) y días post fertilización (dpf), respectivamente (Kimmel y cols., 1995).

Los peces silvestres usados fueron de las cepas AB y ekk. Las líneas mutantes (su generación y rastreo será descrito más adelante) y las líneas transgénicas utilizadas se detallan a continuación:

- *Tg(brn3c:GAP43-GFP)<sup>sf356t</sup>* : La expresión de GFP con destinación a membrana celular es dirigida por las regiones regulatorias del gen *brn3c* (Xiao y cols., 2005). Fue obtenida del laboratorio del Dr. Herwig Baier (UCSF, Estados Unidos)
- *Tg(-8.0cldnb:lynGFP)<sup>sf106</sup>* : La expresión de GFP de membrana es controlada por el promotor del gen *claudinB* (Haas y Gilmour, 2006). Esta línea se obtuvo del laboratorio del Dr. Darren Gilmour (EMBL, Alemania)
- *Tg(ato1:dTomato)<sup>nns8</sup>*: La expresión de *dimer tomato* esta bajo el control de las regiones reguladoras de *atona1a* (Kani y cols., 2010). Esta línea fue obtenida del laboratorio del Dr. Shin-ichi Higashijima (Japón)
- *Tg(gfi1.1:GFP)<sup>sf128</sup>*: Línea generada por *enhancer trap*, y cuya expresión de GFP recapitula el patrón de expresión del gen *gfi1.1* (Wei y cols, 2008). Esta línea proviene del laboratorio del Dr. Shuo Lin (UCLA, Estado Unidos).
- *Tg(7xTCF<sub>siam</sub>:eGFP)<sup>ia4</sup>*: Esta línea tiene 7 repeticiones del sitio de unión a TCFs y un promotor mínimo. Fue obtenida del laboratorio del Dr. Francesco Argenton (datos no publicados)
- *apc<sup>CA50a</sup>* : Esta línea mutante estaba disponible en el laboratorio del Dr. Steve Wilson (Paridaen y cols., 2009). La mutación introduce un sitio de restricción para Bpu10I y los embriones fueron genotipados mediante PCR/digestión usando partidores descritos en la sección de oligonucleótidos. El protocolo para esto se realizó de acuerdo a lo publicado (Paridaen y cols., 2009)

Para los ensayos de monohíbrido inverso se utilizó dos cepas de levaduras haploides MAT $\alpha$  y MAT $\alpha$ , denominadas W303 (*ade2-1, can1-100, his3-*

11,15, *leu2-3,112, trp1-1, ura3-1*) y BY404 (*ade2Δ::hisG his3Δ200 leu2Δ0 trp1Δ63 ura3Δ0*) respectivamente. Estas fueron obtenidas del laboratorio del Dr. Shawn Burgess (NIH, Estados Unidos).

Por último, se utilizó bacterias termocompetentes *Escherichia coli* Top10 (Invitrogen) para la transformación de los plásmidos usados en esta tesis.

#### 4.1.2 Reactivos

**Generales:** Acetato de sodio (Sigma), Acido Cítrico (Merck), Acido Clorhídrico (Merck), Agarosa de bajo punto de fusión (Sigma), Agua sin nucleasas (Winkler), BSA, Cloruro de calcio (Merck), Cloruro de Magnesio (Winkler), Cloruro de potasio (Merck), Cloruro de sodio (Winkler), DiAsp (Sigma), DioC<sub>6</sub> (Sigma), Dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma), EDTA (Winkler), Formamida (Merck), Glicerol (Winkler), Heparina (Sigma), HEPES (Sigma), Marcador de peso molecular de 100pb (Fermentas), Marcador de peso molecular de 1kb (Fermentas), Metanol (Merck), PFA (J. T. Baker), PBS (Winkler), Proteinasas K (GibcoBRL), Reactivo de bloqueo (BMB; Boehringer Mannheim), tRNA (RNA de Tórula, Sigma), SDS (Winkler), BSA (Sigma), Tween 20 (Sigma)

**Cultivo de levaduras:** YPD, sacarosa (Winkler), YPG, Galactosa (Winkler)

**Anticuerpos y tinción nuclear:** Anticuerpo monoclonal anti-BrdU (Roche), Anticuerpo monoclonal anti-Tubulina Acetilada (Sigma), Anticuerpo policlonal anti-GFP (Molecular Probes), Anti IgG de Ratón y de Conejo acoplados a fluoróforo (Molecular Probes), TOPRO (Molecular Probes), DAPI (Molecular Probes).

**Biología molecular:** Agarosa (Lafken), Agarosa Metaphor (Cambrex), BCIP, Kit para transcripción de mRNA *in vitro* "Message Machine" para Sp6 y T7 (Ambion), Mix de PCR de alta fidelidad "Hi Fi Supermix" (Invitrogen), DNA polimerasa de alta fidelidad "Pfx High fidelity taq" (Invitrogen), DNA polimerasa "Platinum Taq" (Invitrogen) Transcriptasa reversa Superscript II (Invitrogen), Trizol (Invitrogen), Kit de purificación DNA plasmidial maxiprep (Qiagen), Kit de purificación DNA plasmidial miniprep (Qiagen), Kit de transformación Alkali-Cation para levaduras (Talron Biotech), DNA ligasa T4 (New England Biolabs)

#### 4.1.3 Oligonucleótidos

**Tabla1. Lista de partidores utilizados.**

Nombre del partidor	Secuencia 5' - 3'
Forward366	GCGCTTTAAGAGAAAATATTTGTCCTG
Reverse366	CGGCTATTTCTCAATATACTCCTAATTAATAC
ReverseUra	GTAGCAGCACGTTCCCTTATATGTAGC
Ssbp3-F	CCGCTTGTTGAGTCTCCCCATACAG
Ssbp3-R	CCACGCCTACACTATCTAGCGTGTATG
DynLigchain4-F	CTCATCCCTCTTCCCCACAGATGTG
DynLigchain4-R	CTGTAGTTACTGCCAGCCCTCTGC
Dpp4-F	CCACCGGGTCATCTCTCCAGCTCTC
Dpp4-R	GACAAGACTCAGCGAGTCAAAATTC
Rims4-F	GCTCTGGCAGGAATACAAATGAGGC

Rims4-R	GCTGGGTCAAGTCTCAGGTCTGG
Ntrk2-F	ctgtgaagcgatcacaataactctttc
Ntrk2-R	gctttccacattgaaagtggagaagc
Sobp-F	cctatgtgtcaaggagaggctgtgc
Sobp-R	gtgtgtcaagcttgcctttcattgt
Lhx9-F	GGCTTTGTATGCCAAGTTTCTGCCG
Lhx9-R	CATGACATTATTACATCCGACATCC
Bmp1-F	CCTGCATGTGCCACCATTCC
Bmp1-R	CAGCCTGCCTCTGTTTCCTGAGTAC
Hydin-F	CCAGTGGCCCCATCCTTGCCTGTC
Hydin-R	AGTCTGGCACCTTCTATACATGCCC
Fzd10-F	GGTCCAGATTCTGCCCGCAGGGATG
Fzd10-R	CATGTAATTGCAGCACAAACAGACC
Kcng3-F	CCCCTGCTTCTAGAGAATGGGC
Kcng3-R	GATATACGCACATGAGTGCAGGTGC
VistaBrn3c-F	ctgccctttcatccaggcagctcg
VistaBrn3c-R	cctatgtccccgctgcctcc
VistaCutl1-F	CCTTCCCACCACAAGCACTGATAACC
VistaCutl2-R	CTCTTCTCACCGAACCCGGATCTC
VistaMath1-5Kb-F	GGGAGTGGAGAATGGGTAAATCCC
VistaMath1-5Kb-R	GCCGCCGCCCTCATCCCCTC
VistaGfi1-F	CTCCTGGCCTGCAACTTGGTACC
VistaGfi1-R	gtgtggcactgaagttgtcttcc
VistaHes5-F	CTCTCATTCTCTGCGCCTGTGGCC
VistaHes5-R	GCAGCGGCCCGGCGCCTG
Vista Barhl1-F	GAATCGGGCCGCGGGTTGTAGAG
Vista Barhl2-R	GGGTCAGCACGGCCGATAGC
apcGen-F	GTGTCCTGAGTGCCCTTTGG
apcGen-R	CTTGACACGTTTCTCAGAATGCCAC
Lef1Full-F	GTGCGCGAGCTGACCAGAAAC
Lef1Full-R	CCACTGGGGTTCGAGAGGTGATG
Lef1Ex2-Int2-F	GGAGTTTATTTCCCGGCACT
Lef1Ex2-Int2-R	CATGGGTGCATTTGAAATGCAATGC
Lef1Gen-F	ACAGGGACCATCCGGATGATCG
Lef1Gen-R	TGGAATTGGTTTCTTACACGTTTTACC
26bpAth1aTandemFwd	<b>P-AG</b> AGCACGCGCTGTCAGCTGGTGAGCGCA
26bpAth1aTandemRvs	<b>P-CT</b> TGCGCTCACCAGCTGACAGCGCGTGCT

#### 4.1.4 Morfolinos antisentido

**Tabla2. Lista de morfolinos usados**

Nombre Morfolino	Secuencia
Mo <i>gfi1.1</i>	CCAAAAATGACCTCGGCATGTTTAC
Mo <i>gfi1b</i>	CATTGTGTCCTCCTCTGCCTCATAT
Mo <i>lef1</i>	CTCCACCTGACAACTGCGGCATTT

## 4.2 MÉTODOS

### 4.2.1 Mantenición de los peces y recolección de embriones

Los peces adultos de todas las líneas usadas fueron mantenidos en un ciclo de 14 horas luz y 10 horas oscuridad. Para obtener embriones (para inyección o tratamientos) cada vez se seleccionó un número similar de hembras y machos, y fueron mantenidos en un tanque de cruce con doble fondo, separados por una lamina de acrílico durante la noche. Al día siguiente, al momento de encenderse la luz, se remueve el separador para permitirles aparearse. Una vez que los huevos son colectados se traspasan a medio E3 y se dejan en un incubador a 28.5°C para su crecimiento (Westerfield, 1994).

Los embriones utilizados para hibridación *in situ*, inmunohistoquímica, o tratamientos con drogas fueron decorionados, clasificados por su estadio, según Kimmel y cols. (1995), y fijados en PFA 4% a 4 °C, durante toda la noche (luego del tratamiento si es que correspondía). Al día siguiente se lavaron tres veces por 5 minutos con PBST 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 hasta ser usados.

#### 4.2.2 Monohíbrido inverso.

Los DNA complementarios de *zath1a/Math1* fueron insertados en el vector "shuttle" pYoh-1 usando los sitios de restricción NheI y NcoI, introducidos en partidores para PCR, para dejar la secuencia codificante en el marco de lectura con el dominio de activación de Gal4 (Zeng y cols., 2008). *ze47/Me47* fueron insertados en un vector donde la transcripción es inducible por galactosa usando los sitios de restricción XbaI y XhoI que también fueron introducidos en los partidores.

La doble transformación de las levaduras fue realizada secuencialmente, primero con *zath1a/Math1* y luego con *ze47/Me47*, usando un protocolo basado en el kit "Alkali-cation", para luego ser seleccionadas por doble auxotrofia. Brevemente, se inoculó una colonia de levaduras W303 en 100 ml de medio YPD y se creció a 30°C hasta una concentración de  $2 \times 10^6$  células/ml. Luego se centrifugó a 400 x g por 5 minutos y el *pellet* fue resuspendido en 9 ml de buffer TE, pH 7.5, luego de lo cual fue nuevamente centrifugado y resuspendido en 5ml de una solución de LiAc/Cesio. En este punto las levaduras fueron incubadas por 30 minutos a 30°C con agitación suave. Una nueva centrifugación y resuspensión en 1ml de buffer TE, pH 7.5 dejó las células listas para las transformación. En un tubo de 1.5 ml se hizo la siguiente mezcla: 100µl de levaduras, 5µl de DNA *carrier*, 5µl de una solución de histamina, 1µg del DNA a transformar (en un volumen de 5µl). Esta mezcla se incubó a temperatura ambiente por 15 minutos, después de lo cual se le agrego 800µl de PEG y 200µl de TE/Cation MIXX™. Finalmente se incubó esta

mezcla a 30°C por 10 minutos, se le dio un golpe de calor a 42°C, se centrifugó y se sembró en medio sin adenina para seleccionar el vector que llevaba el cDNA de *zath1a/Math1*. La incubación se realizó por 2 días a 30°C.

Para la segunda transformación se repitió el mismo protocolo pero al final se sembró en un medio sin leucina (para seleccionar por el vector *ze47/Me47*) y sin adenina (para evitar eventos de pérdida del primer plásmido)

Una vez obtenidas las levaduras dobles transformantes se utilizó un método optimizado para inducir la diploidía en levaduras (Soellick y Uhrig, 2001). El apareamiento entre las 2 cepas de levaduras haploides de tipo sexual opuesto, una llevando los plásmidos de *atona1/e47* y la otra los plásmidos de la librería genómica, resultan en la formación de cigotos diploides. Brevemente, una alícuota de cada cepa fue crecida en 10 ml a 30°C en medio selectivo toda una noche; al día siguiente, se contaron las células y se ajustaron a una concentración de  $5 \times 10^6$  células/ml y se continuó creciendo a 30°C hasta lograr  $2 \times 10^7$  células/ml. En este punto se reajustó el volumen de medio de manera tal que la concentración fuese  $1 \times 10^8$  células/ml. Luego se tomó 2ml ( $1 \times 10^8$  células/ml) de cada cepa y se mezclaron en un tubo Falcon de 15 ml, luego de lo cual se centrifugó y se resuspendió en 1 ml de YPD para sembrarse en placas YPD (medio completo) y dejar creciendo a 30°C. Al día siguiente se raspó con una rastrillo la capa gruesa de células crecidas, se diluyó en 5 ml de medio líquido selectivo con galactosa y se sembró en placas con medio selectivo para diploides (con galactosa). Para determinar la eficiencia de apareamiento, una pequeña cantidad de levaduras del raspaje inicial se diluyó

en agua estéril, y se plaqueó 1000 células en placas de selección para diploides, y en placas de medio completo para determinar el número real de células plaqueadas. Finalmente luego de 3 días de incubación a 30°C se obtuvo las colonias suficientemente grandes como para ser analizadas por PCR y posterior secuenciación. Con este método logramos una eficiencia de apareamiento de un 10%, que esta en el límite superior de lo posible de obtener.

#### **4.2.3 Secuenciación**

Todas las secuenciaciones de ADN (plasmidiales y genómicas) en esta tesis fueron determinadas usando el kit ABI BigDye® Terminator Version 3.1 (Applied Biosystems), siguiendo las instrucciones del fabricante. La reacción se hizo en un total de 10 µl que contenían 4 µl de BigDye, 1µl del Partidor correspondiente 3.2 mM, 200ng de DNA plasmidial o producto de PCR, y agua nanopura. Los parámetros de PCR se ajustaron de acuerdo al DNA templado.

Las reacciones de PCR para secuenciar las regiones genómicas aisladas con el monohíbrido inverso fueron anidadas usando 3 partidores de la manera que se explica en la figura 9B.

Los productos de estos PCR fueron enviados al departamento de secuenciación de UCL (Londres) o fueron analizados en el secuenciador ABI Prism 3700 DNA Analyzer, de acuerdo a protocolos existentes en National Institutes of Health (NIH, Estados Unidos).

#### **4.2.4 Análisis bioinformático**

Para realizar el mapeo de las secuencias obtenidas con la búsqueda genómica en levaduras con ambas genotecas se utilizó la herramienta BLAT del Centro de Genómica y Bioinformática de la Universidad de California, Santa Cruz ([genome.ucsc.edu/](http://genome.ucsc.edu/)), diseñada para encontrar rápidamente secuencias desde un 95% de similitud, de 25 bases o más.

Con el fin de realizar alineamientos de secuencias obtenidas entre sí, y para encontrar patrones de similitud entre ellas (motivos) se usó la herramienta MEME (<http://meme.sdsc.edu/>) del "National Biomedical Computation Resource", que es de libre acceso a través de Internet y permite obtener una representación gráfica de los motivos encontrados.

#### **4.2.5 Construcción de plásmidos reporteros basados en el transposón Tol2**

Usando DNA genómico de pez cebra y ratón se amplificó las regiones obtenidas del ensayo de monohíbrido inverso y del análisis de regiones conservadas con Vista Enhancer Browser. Se utilizó "Hi Fi Supermix" (invitrogen) para evitar la inclusión de potenciales mutaciones. El protocolo de las reacciones de PCR para cada región amplificada fueron las siguientes: 22.5 µl de Hi Fi Supermix, 1µl de cada partidor, 0.5µl agua nanopura. Las condiciones de temperatura y ciclos fueron: 94°C por 3 minutos; 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 58 a 66°C (dependiendo de los partidores usados) por

30 segundos, 72°C por 1 minuto; 72°C por 10 minutos. En todos los casos se obtuvo bandas únicas y del tamaño esperado.

En el caso de la región de 26 pares de bases ultra conservadas 1.5 kilobases corriente abajo de *atonal1a*, se diseñó partidores fosfatados con dos bases adicional complementarias en los extremos. Se dejaron hibridar a temperatura ambiente por 10 minutos y luego se realizó una reacción de ligación con protocolos del fabricante de la enzima DNA ligasa T4. Finalmente la muestra total se cargó en un gel de agarosa Metaphor (Cambrex) al 2%, que tiene una capacidad de resolución de bandas similar a la acrilamida. Al analizar el patrón de bandeo se seleccionó aquella banda que contenía 6 repeticiones de la región.

En todos los casos, los fragmentos de DNA cortados manualmente desde los geles de agarosa fueron extraídos usando QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Los fragmentos de DNA fueron clonados en el vector pCR®8/GW/TOPO® (Invitrogen) que es compatible con la plataforma de recombinación para clonamiento Gateway. La reacción de ligación se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante, se transformó en bacterias competentes TOP10 (Invitrogen), y se sembró en placas con espectinomicina para la selección de transformantes. Se seleccionó 2 colonias por placa, se extrajo DNA plasmidial y se secuenció para conocer la identidad del inserto.

La tecnología de clonamiento Gateway está basada en el sistema de recombinación de los sitios *att* del fago lambda que permite una rápida y eficiente transferencia de fragmentos de DNA y la construcción modular o

simple de vectores de expresión con orientaciones y órdenes específicos (Kwan y cols., 2007). El sistema se compone de 2 reacciones básicas, denominada BP y LR para construir los denominados vectores de “entrada” y “finales”, respectivamente. Estas reacciones son catalizadas por enzimas que median la recombinación de los diferentes fragmentos de DNA flanqueados por los sitios *att*. Nosotros clonamos los fragmentos de DNA genómico en el vector pCR®8/GW/TOPO® que permite la construcción inmediata del vector de entrada, evitando la reacción BP. Esto permite insertar directamente el fragmento genómico en el vector final de expresión, pGW\_ *cFos*EGFP, mediante una única reacción LR (Fisher y cols, 2006). Esto fue realizado de acuerdo a las instrucciones del fabricante usando el reactivo “Gateway® LR Clonase™ II Plus Enzyme Mix (Invitrogen). El vector de expresión vector fue proporcionado por el Dr. Andrew McCallion (Universidad John Hopkins, USA). Un esquema del método de clonamiento y estrategia se encuentra en la figura 12A.

Cada reacción fue transformada en bacterias competentes TOP10. Se aisló 2 colonias, se extrajo DNA plasmidial y se realizó PCR con los partidores respectivos para comprobar si contenían el inserto esperado.

#### **4.2.6 Transformación de bacterias competentes**

Para la transformación de plásmidos se usó bacterias competentes TOP10 y el método de golpe de calor. Para cada reacción se utilizó 50 µl de bacterias a las que se les agregó 50 ng del ADN a transformar y se incubó en

hielo por 30 minutos. Luego se dio un golpe de calor de 30 segundos a 42°C, en un baño termorregulado, para luego volver a incubar en hielo por 2 minutos. A continuación se agregó 250 µl de medio S.O.C. y se incubó en agitador a 37°C por una hora. Finalmente se sembró las bacterias en placas de agar con el antibiótico correspondiente y se dejó a 37°C toda la noche.

#### **4.2.7 Extracción de DNA plasmidial**

Colonias de bacterias aisladas fueron seleccionadas de placas con LB e inoculadas en medio LB fresco (10 gr de triptona, 10 gr de NaCl y 5 gr de extracto de levadura en un litro de agua destilada) con los antibióticos apropiados, según el caso. El cultivo fue incubado a 37°C con agitación vigorosa hasta la mañana siguiente cuando fue centrifugado y el LB sobrenadante fue removido. De este pellet resultante se extrajo DNA plasmidial. Esto fue realizado usando los kit "QIAprep Spin Miniprep" y "QIAGEN Plasmid Maxi", según instrucciones del fabricante. Las concentraciones de DNA fueron determinadas usando un equipo "NanoDrop™ND-1000 Spectrophotometer".

#### **4.2.8 Microinyección de embriones**

Para la microinyección de huevos de pez cebra se usó una placa de Petri de plástico, en donde se montó un portaobjetos de vidrio. Los huevos recién fecundados fueron depositados sobre la placa, justo en el borde del

portaobjetos, formando una fila única paralela al portaobjeto. Luego se removió el exceso de agua para que los huevos quedaran adheridos a la superficie por tensión superficial. Finalmente la placa con los huevos fue puesta en una lupa de disección y microinyectados con 5 a 10 nl de una solución que contenía ADN, ARNm y/o morfolino, usando para esto un inyector de presión de nitrógeno (Narishige). Todas las inyecciones se realizaron al estadio de una célula.

Para la inyección de los plásmidos reporteros *pcfosEGFP* se inyectó una concentración de 50ng/μl de DNA en conjunto con 50ng/μl de mRNA codificante para la enzima transposasa. La síntesis y purificación de este mRNA se realizó con el kit mMMESSAGE mMACHINE, según instrucciones del fabricante.

La inyección de los morfolinos de *gfi1.1* y *gfi1b* se realizó a 2 ng/μl (10 ng por embrión)

La inyección del morfolino contra *lef1* fue de 1ng/μl (5 ng por embrión).

El mRNA codificante para KAEDE se inyectó a una concentración de 100ng/μl. Su síntesis y purificación se realizó igual que con el de la transposasa.

#### **4.2.9 Mutagénesis por ENU y rastreo de mutantes de línea lateral**

Las mutaciones fueron inducidas en peces machos de la línea AB por 4 rondas de tratamientos con ENU 3mM como se ha descrito previamente (van Eeden y cols., 1999). Esto fue realizado en el laboratorio del Dr. Steve Wilson

(UCL, Reino Unido).

El esquema básico de rastreo se esquematiza en la Figura 18. Larvas F3 fueron incubadas por 5 minutos en una mezcla de Diasp y DioC6 a una concentración de 4µg/ml y 0.3µg/ml en E3, respectivamente. Luego fueron observadas bajo lupa de fluorescencia para identificar defectos en los neuromastos y células ciliadas.

#### **4.2.10 Mapeo de mutaciones**

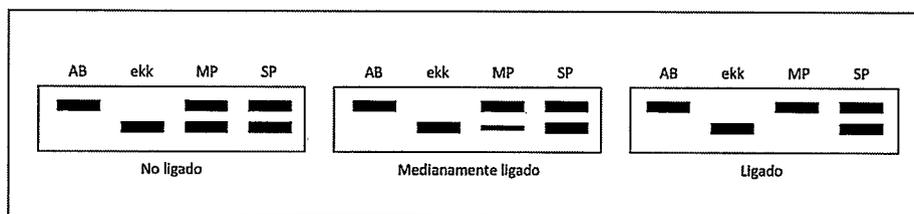
Las mutaciones fueron mapeadas mediante análisis de segregantes agrupados usando Polimorfismos de Longitud de Secuencia Simple (SSLPs) que pertenecen al panel MGH, de acuerdo a Talbot y Schier (1999). Para ello el primer paso fue extraer ADN genómico de mutantes y *siblings*, identificados mediante el método de rastreo descrito arriba en el texto. Para esto, todos los mutantes y un número equivalente *siblings* fueron transferidos individualmente en placas de 96 pocillos y se realizó una lisis directa de ellos. Brevemente, a cada pocillo se le removió el máximo de líquido posible, se le agregó 50µl de buffer de lisis (Tris-HCL 10mM pH8, NaCl 100 mM, EDTA 10 mM, SDS 0.4%) y la placa se incubó a 98°C por 10 minutos. Luego se agregó 10µl de proteinasa K 10µg/ml y se incubó por 2 horas mas a 55°C. Finalmente se subió la temperatura a 98°C por 10 minutos para proceder a inactivar la proteinasa K. Esta solución fue usada como templado para las reacciones de PCR para mapeo.

El mapeo fue llevado a cabo con un panel de 240 marcadores genéticos SSLPs, distribuidos en los 25 grupos de ligamiento del pez cebra. El principio del

análisis de segregantes agrupados es usar una mezcla de ADN genómico proveniente de embriones individuales para testear, mediante PCR, todos los marcadores en el panel de mapeo para simplificar el proceso de caza de marcadores ligados a la mutación. En este protocolo, 2 grupos de ADN genómico fueron generados: uno de mutantes y uno de *siblings*. El grupo mutante fue hecho tomando 10µl de DNA de cada uno de 8 larvas mutantes. Similares alícuotas de DNA de *siblings* fueron combinadas en otro tubo. Para realizar el análisis de PCR se siguió un protocolo de uso corriente en la laboratorio del Dr. Stephen Wilson. Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un total de 12µl consistentes en: 2µl buffer de PCR, 0.4µl 20 mM dNTPs, 0.8µl de cada partidor, 1µl de ADN genómico, 0.5µl de Taq Platinum y 6.5µl de agua sin nucleasas. Estas reacciones fueron realizadas en formato de placas de 96 pocillos, y fueron sometidas al siguiente programa de PCR: 94°C por 3 minutos; 45 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto; 72°C por 10 minutos. Todo el producto de cada reacción de PCR fue analizado en gel de agarosa al 3% en buffer TBE 0.5X (10X TBE: 890mM Tris-Base, 890mM ácido bórico, 20mM EDTA, pH 8.3). La interpretación de los resultados del gel fue facilitado por la combinación de un único ordenamiento de los partidores en el formato de 96 pocillos y por el uso de pipetas multicanal durante la preparación y carga de las muestras.

Los posibles bandeos esperados son esquematizados en la figura 8.

Después de mapear la mutación a cierto grupo de ligamiento con la ayuda de uno o dos marcadores del panel de mapeo, se inició una etapa de mapeo intermedio. En este punto los esfuerzos se concentran en aislar la mayor



**Figura 8. Ilustración esquemática del análisis de segregantes agrupados.** Un buen marcador SSLP para clonamiento posicional evidencia diferencias significativas en los tamaños de los productos de PCR que son analizables en gel. En este caso este marcador representa una ubicación genómica que tiene un polimorfismo de tamaño entre las cepas AB y ekk. A la izquierda se observa que cuando un marcador no está ligado a la mutación, la banda AB y la ekk deberían tener iguales probabilidades de ser amplificadas desde el pool de DNA genómico mutante (MP). Al medio se esquematiza un caso en el que un marcador está en el mismo cromosoma, pero no cercano a la mutación y por lo tanto la banda debería tener una mayor probabilidad de ser amplificado en el pool mutante, en relación a la banda ekk. A la derecha se muestra un marcador que está ligado (o muy cercano) a la mutación, donde sólo la banda AB puede ser amplificada del pool mutante. (SP: pool de DNA de *siblings*)

cantidad de mutantes posibles y en probar marcadores que sean polimórficos, para poder analizar DNA genómico de embriones individuales para la identificación de recombinantes (Talbot y Schier, 1999). Al mismo tiempo, la dirección en la que se encontraba la mutación también fue definida por la reducción del número de recombinantes cuando se testeó en una serie de marcadores en línea. Después de establecer tal mapa genético delineando la relación entre la mutación y los marcadores SSLP, los restantes recombinantes entre 2 marcadores cercanos fueron usados para el subsecuente mapeo más fino.

La información de secuencia de los marcadores genéticos más cercanos establecidos en el mapeo intermedio fue usada para ubicar la posición física en el genoma del pez cebra ([http://www.ensemble.org/Danio\\_rerio/Info/Index](http://www.ensemble.org/Danio_rerio/Info/Index)).

Así se identificó BACs o *contigs* que cubrieran la región para identificar marcadores adicionales y de esta forma estrechar un intervalo flanqueado por marcadores previos, hasta una región genómica crítica que puede ser caracterizada a nivel molecular para identificar la mutación. El diseño de nuevos marcadores SSLP fue hecho usando un software disponible en internet, el cual busca repeticiones de dupletes de bases CA dentro de una región de DNA genómico (<http://danio.mgh.harvard.edu/markers/ssr.html>). Los nuevos marcadores que fueron polimórficos se utilizaron para limitar la distancia llevando a cabo reacciones de PCR en los ADN de embriones individuales recombinantes.

#### **4.2.11 Secuenciación de genes candidatos**

Luego del mapeo fino, una aproximación de gen candidato fue llevada a cabo cuando no se pudo acotar más el intervalo crítico. Esta información se combinó con datos publicados de nuestro laboratorio sobre el repertorio de genes expresados durante el desarrollo de la línea lateral (Gallardo y cols., 2010), y de esta manera se escogieron candidatos *bonafide*. Las regiones codificantes candidatos fueron secuenciadas sistemáticamente para la identificación de una mutación mediante comparación de DNA genómico o cDNA, como se describirá más adelante en esta sección.

#### 4.2.12 Síntesis de sondas e hibridación *in situ* en embrión completo

Para sintetizar las sondas de RNA marcadas con digoxigenina, se digirió el ADN plasmidial con la enzima de restricción correspondiente (ver tabla 3), y luego se incubó 1µg de ese producto digerido en las siguientes condiciones: 2µl de Buffer de transcripción, 2µl RNA polimerasa (SP6, T3, o T7), 8µl Mezcla de NTP digoxigenina, 1µl DTT 0,1 M, 1µg DNA linearizado, H<sub>2</sub>O sin nucleasas hasta completar 20µl. Luego de incubar esta mezcla por 2 horas a 37°C se agregó 2µl de DNAsa y se incubó por 30 minutos más. Posteriormente se añadió 30µl de agua sin nucleasas y se precipitó agregando 2µl de LiCl 10M y 200µl de etanol al 100% dejando a -20°C toda la noche. Luego se centrifugó a 14000 rpm por 30 minutos y el precipitado se lavó con etanol al 70%. Posterior a esto se resuspendió el precipitado en 50µl de agua sin nucleasas y se diluyó en 950µl de buffer de hibridación.

La información relativa a la preparación de cada sonda se resume en la Tabla 3.

**Tabla 3. Sondas utilizadas para hibridación *in situ*.** Se señala en cada caso la enzima de restricción y RNA polimerasa utilizadas, además del vector de clonamiento.

Sonda:	enzima	Polimerasa
<i>atoh1a</i>	BamHI	T7
<i>lef1</i>	NotI	T7
<i>cxcr4b</i>	EcoRI	T7
<i>cxcr7b</i>	XhoI	SP6

<i>pea3</i>	NotI	T7
<i>sef1</i>	EcoRI	T7
<i>fgf3</i>	XhoI	SP6

Para la hibridación in situ se utilizó el protocolo descrito por Thisse C. Y Thisse B., (2008) con algunas modificaciones. Los embriones fijados y luego almacenados en metanol, fueron rehidratados mediante lavados sucesivos de 5 minutos con metanol 75%, 50% y 25% (en PBST), respectivamente, seguido de 3 lavados de 5 minutos con PBST. A continuación, los embriones se permeabilizaron incubándolos en una solución de proteinasa K 10 µg/ml a temperatura ambiente de acuerdo a los tiempos indicados en la tabla 4.

**Tabla 4. Concentración de proteinasa K y tiempo de incubación para los diferentes estadios de desarrollo de pez cebra**

Estadio de desarrollo	Concentración Proteinasa K	Tiempo de incubación
24 hpf	1 µg/ml	5 minutos
30-36 hpf	1 µg/ml	10 minutos
48 hpf	1.5 µg/ml	10 minutos
72 hpf	2 µg/ml	10 minutos

Luego se volvió a fijar los embriones fijaron inmediatamente en PFA al 4% durante 30 minutos. Se lavaron nuevamente en PBST 5 veces por 5 minutos cada vez, para luego prehibridarlos en buffer de hibridación (Formamida 50%, SSC 5X, Heparina 50 µg/ml, tRNA 500µg/ml, ácido cítrico 1M pH 6.0, Tween 20 al 0.1%) a 65°C, por al menos 4 horas. Posteriormente se agregó la ribosonda y fueron incubados durante toda la noche a la misma temperatura.

Al día siguiente, los embriones fueron lavados de la sonda con 3 incubaciones sucesivas de 10 minutos cada una con formamida al 50% y 25% en SSC 2X, y SSC 2X. Luego se hizo 2 lavados de 30 minutos con SSC 0,2X; todo fue hecho a la misma temperatura de hibridación. A continuación los embriones fueron incubados por 4 horas a temperatura ambiente en solución de bloqueo (BSA 0.2%, PBS1X, DMSO 1%, Tween 20 0.1%) para impedir la unión del anticuerpo a sitios inespecíficos. En forma paralela se bloqueó el anticuerpo anti-digoxigenina (1:4000), incubándolo en la misma solución. Terminadas las 4 horas, se agregó la solución con el anticuerpo a los embriones y se dejó incubar toda la noche a 4°C.

Al día siguiente se removió el anticuerpo y los embriones se lavaron en PBST 5 veces por 20 minutos para eliminar el anticuerpo libre. Luego se equilibraron en solución AP (NaCl 100mM, Tris 100mM pH 9.5, MgCl<sub>2</sub> 50mM, Tween 20 al 0.1%) durante 5 minutos por 3 veces. A continuación fueron incubados en solución NBT/BCIP a temperatura ambiente y en oscuridad, hasta la aparición de la marca. Posteriormente se lavaron con PBST 3 veces por 5 minutos.

Los embriones ya teñidos se pasaron a glicerol mediante incubaciones sucesivas a concentraciones crecientes de glicerol en PBS.

#### **4.2.13 Inmunohistoquímica en embrión completo**

Embriones fijados y almacenados en metanol, fueron rehidratados y lavados 3 veces por 5 minutos en PBST, luego tratados con proteinasa K y

fijados igual que en el protocolo de hibridación *in situ*. Hay modificaciones para el tratamiento de los embriones incubados en BrdU que serán explicitadas más adelante en esta sección. Luego, los embriones fueron incubados toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario correspondiente diluido en solución de bloqueo. A continuación se lavaron 4 veces por 20 minutos en PBST, y se incubaron toda la noche a 4°C con el anticuerpo secundario (de ratón o conejo), acoplado a fluoróforo, y diluido en solución de bloqueo. Posteriormente fueron lavados 4 veces por 20 minutos en PBST. Luego de esto se procedió a teñir los núcleos con DAPI o TOPRO.

Las diluciones de anticuerpo fueron: BrdU 1:200 (Roche); GFP 1:200 (Molecular Probes); tubulina acetilada 1:1000 (Sigma). La tinción nuclear fue hecha con DAPI 2µg/ml (10 minutos) o TOPRO 250µM (30 minutos) en PBST, seguido de 4 lavados de 5 minutos en PBST.

Los anticuerpos secundario estaban acoplados a Alexa 488 o 564 (Molecular Probes) y fueron usados a una dilución de 1:200.

#### **4.2.14 Identificación de la mutación en *lef1***

Para obtener la secuencia codificante completa de *lef1*, primero se realizó una extracción de RNA total de larvas mutantes y *siblings* de 3dpf usando Trizol (Invitrogen). Brevemente, 50 embriones fueron resuspendidos y homogeneizados en 200µl de Trizol y luego se agregó 40µl de cloroformo. Esto se centrifugó por 15 minutos a 12000 x g a 4°C. Luego, la fase acuosa fue transferida a un tubo estéril y el RNA se precipitó como 100µl de isopropanol

por 30 minutos a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente se centrifugó por 15 minutos a 12000 x g a  $4^{\circ}\text{C}$  y el precipitado de RNA se lavó con etanol 70%. Finalmente el RNA se resuspendió en  $11\mu\text{l}$  de agua sin nucleasas.

La síntesis de cDNA fue realizada con transcripción reversa con SuperScriptIII (Invitrogen) usando partidores oligo(dT), según instrucciones del fabricante. El protocolo de PCR para amplificar *lef1* fue el siguiente:  $2.5\mu\text{l}$  buffer 10X,  $1\mu\text{l}$   $\text{MgSO}_4$ ,  $1\mu\text{l}$  de cada partidor  $10\mu\text{M}$ ,  $0.5\mu\text{l}$  dNTP 10 mM,  $0.5\mu\text{l}$  cDNA,  $0.1\mu\text{l}$  Pfx High fidelity taq, agua sin nucleasas hasta  $25\mu\text{l}$ . Las condiciones de termociclador fueron: 2 minutos a  $94^{\circ}\text{C}$ ; 35 ciclos de 30 segundos a  $94^{\circ}\text{C}$ , 30 segundos a  $60^{\circ}\text{C}$ , 1.5 minutos a  $72^{\circ}\text{C}$ ; 5 minutos a  $72^{\circ}\text{C}$ . El producto de PCR fue resuelto en un gel de agarosa al 1.5% y la banda fue cortada y extraída para clonamiento en un vector pCR®-Blunt II-TOPO® (Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

La lesión genómica fue identificada mediante secuenciación directa del producto de PCR de muestras de DNA de larvas individuales. La mezcla de PCR fue la misma que para amplificar el cDNA (con partidores distintos descritos en la sección de oligonucleótidos), y con las siguientes condiciones de termociclador: 2 minutos a  $94^{\circ}\text{C}$ ; 45 ciclos de 30 segundos a  $94^{\circ}\text{C}$ , 30 segundos a  $58^{\circ}\text{C}$ , 0.5 minutos a  $72^{\circ}\text{C}$ ; 5 minutos a  $72^{\circ}\text{C}$ .

La mutación introduce un sitio de restricción para Hpy188I (New England Biolabs) en el amplicón mutante, por lo tanto para genotipar los embriones mutantes se realiza PCR/digestión y luego se resuelve en un gel de agarosa al 3% en TBE.

#### **4.2.15 Incorporación de BrdU**

Los embriones fueron incubados en BrdU 10mM en conjunto con 15% DMSO, a 4°C por 30 minutos, y luego se dejaron recuperar en medio E3 a 28.5°C por una hora. Posterior a esto los embriones fueron fijados en PFA al 4%. Después de la incorporación de BrdU, a los embriones se les removió la cabeza para extracción de DNA genómico con el fin de genotípearlos. Los cuerpos fueron tratados para inmunodetección con anti-BrdU. La única diferencia con el protocolo normal de inmunofluorescencia fue que después del tratamiento con proteinasa K se hizo 2 lavados con HCL 2N de 10 minutos cada uno, luego 2 lavados de 5 minutos con PBST, y luego se procedió a bloquear.

#### **4.2.16 Tratamientos con drogas**

Para bloquear la división celular en embriones de pez cebra, se incubó embriones decorionados en una mezcla de afidicolina 150µM (Sigma) e hidroxiiurea 20mM (Sigma) en 2% DMSO en medio E3, de acuerdo a datos de la literatura (Bonner y cols., 2008)

Para activar la vía Wnt, embriones decorionados fueron incubados en el agonista BIO a una concentración de 2.5µM (Sigma) en 2% DMSO en E3.

#### 4.2.17 Microscopía de tiempo interrumpido, fotoconversión y procesamiento de imágenes

Las imágenes de confocal y *time-lapse* fueron llevadas a cabo en un microscopio confocal Leica TCS SPE con una cámara de aire calentada a 28.5°C.

Para los *time lapses*, los embriones vivos fueron inmovilizados en agarosa de bajo punto de fusión 1.2% (Sigma) y anestesiados en tricaina 0.016% (Sigma).

Durante en análisis de imágenes, el conteo de núcleos y distancias fueron hechos usando en software ImageJ.

Los embriones inyectados con mRNA codificante para Kaede fueron montados en agarosa de bajo punto de fusión a las 24hpf y la región líder del primordio fue fotoconvertida con una láser de una longitud de onda de 405nm, en el microscopio confocal, usando un 30% de potencia en el modo de barrido convencional repitiendo 3 veces el barrido en la misma área.

Para los experimentos de ablación celular, embriones decorionados fueron anestesiados y montados en agarosa como se describió antes. Un láser de 2 fotones en un microscopio Zeiss-510 fue usado para identificar la zona escogida y para ablacionar las células GFP positivas del borde líder del primordio. Un único barrido con 180mW de potencia con zoom a 40X fue usado. El experimento se realizó a las 24hpf.

## V. RESULTADOS

El control de la diferenciación celular y morfogénesis involucra una serie de procesos a través de los cuales las células adquieren funciones, formas y reordenamientos específicos mediante una coordinada activación o represión de genes en patrones espaciales y temporales definidos. Esta fina regulación es llevada a cabo en gran parte por factores de transcripción, que se unen a secuencias de DNA en la cromatina y controlan la transcripción de genes blanco en puntos críticos del desarrollo. La identificación de esos genes diana proporciona información acerca de procesos individuales y de cómo esos factores interactúan en una red transcripcional. Luego, esas redes pueden ser usadas para describir procesos celulares particulares u otros tan intrincados como el desarrollo embrionario (Davidson y cols., 2002; Wyrick y Young., 2002).

Con la finalidad de apuntar en esa dirección, la primera parte de esta tesis consistió en identificar genes regulados transcripcionalmente por *atona1a*. Para ello se usó un sistema de expresión heterólogo en levaduras que luego fue aplicado al pez cebra. Al mismo tiempo, como estrategia alternativa, se realizó una búsqueda de secuencias conservadas de unión a DNA para este factor de transcripción (el elemento llamado caja E) mediante una comparación de regiones genómicas regulatorias en algunos genes que, de acuerdo a sus patrones de expresión espacio-temporal durante el desarrollo embrionario, o por evidencia sugerida en la literatura, podrían ser blancos de la familia *atona1*. Finalmente se analizó la capacidad de las secuencias identificadas de dirigir la expresión de un gen reportero en embriones de pez cebra.

## **5.1 Identificación de secuencias de unión de *atonal1a* y de potenciales genes blanco.**

### **5.1.1. Monohíbrido inverso**

La comparación del transcriptoma de dos poblaciones celulares en las cuales un factor de transcripción es diferencialmente expresado, ya sea por ganancia o pérdida de función, ha sido usada como una aproximación para identificar genes activados por estas proteínas, mediante ensayos de microarreglos de DNA (Sumanas y cols., 2005; Lam y cols., 2006; Bergeron y cols., 2008). Sin embargo, para efectos de esta tesis no fue posible usar esta técnica. Una primera limitación es que este tipo de aproximaciones entrega resultados de cambios globales pudiendo abarcar genes que son regulados directa o indirectamente por un factor de transcripción. La segunda limitación (y fundamental), es que *atonal1* es un gen esencial para la diferenciación de las células ciliadas (Bermingham y cols., 1999; Zheng y cols., 2000), lo que imposibilita los análisis sustractivos. Otras aproximaciones, más recientes y efectivas, involucran secuenciación a gran escala acoplada a inmunoprecipitación de cromatina (Robertson y cols., 2007), pero esto requiere anticuerpos de gran calidad para el factor de transcripción de interés. Durante el desarrollo de esta tesis se diseñó un anticuerpo contra un péptido específico de la proteína *atonal1a* de pez cebra, pero éste careció de funcionalidad. Por lo tanto, se debió buscar una alternativa para la identificación de blancos este gen proneural.

Las estrategias experimentales en levaduras pueden ser rápidas, económicas y casi universalmente accesibles, lo que se ha demostrado con el masivo uso de ensayos de doble híbrido (Fields y Song, 1989) y de una amplia gama de otras aproximaciones experimentales adaptadas para ensayos a gran escala (Brachmann y Boeke, 1997; Parsons y cols., 2003; Li y Hertschowitz, 1993; Wang y Reed, 1993; Vizeacoumar y cols., 2009). Al respecto, recientemente en el laboratorio del Dr. Shawn Burgess (NIH, USA) se desarrolló un versátil método en levaduras para realizar ensayos de monohíbrido inverso con el fin de identificar blancos transcripcionales usando librerías genómicas de pez cebra y ratón, y ellos han mostrado exitosamente la validez de esta estrategia (Zeng y cols., 2008). Básicamente el método consiste en que levaduras que expresan el factor de transcripción deseado son apareadas con otras que contienen una librería de fragmentos genómicos clonados río arriba del gen reportero *URA3*. Los fragmentos de DNA con sitios de unión para el factor son identificados porque cuando la interacción factor-DNA ocurre, se activa el reportero y por lo tanto las levaduras pueden crecer en un medio sin uracilo; luego se realiza una ronda de secuenciación masiva de esos clones positivos para identificar los fragmentos genómicos que contienen secuencias blanco del factor de transcripción.

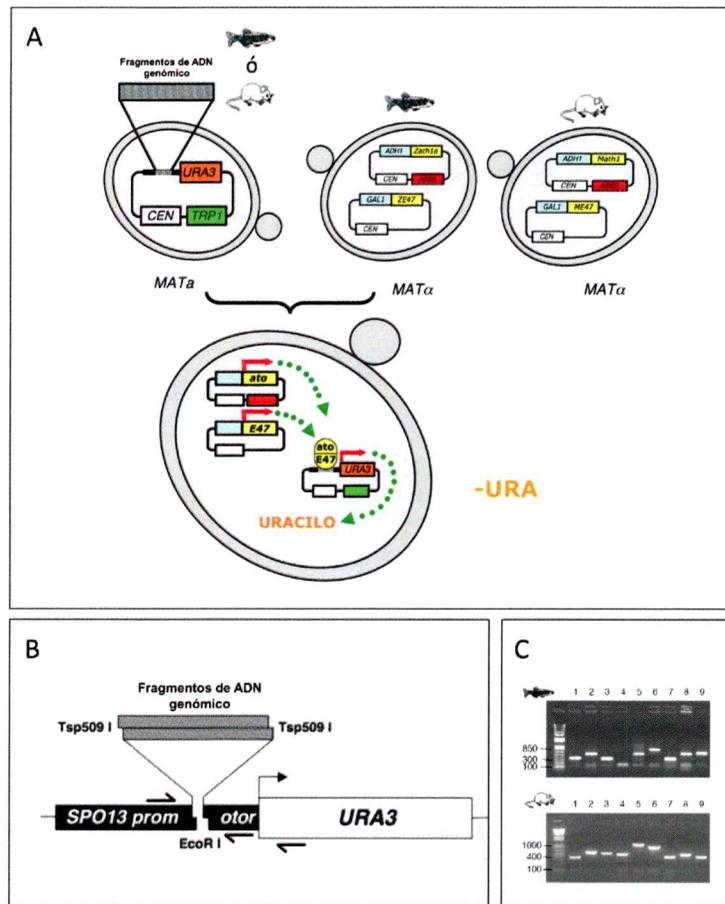
Nosotros usamos esta aproximación para buscar blancos de *atonal1a*. Para ello se clonó los cDNAs codificantes para este gen proneural de pez cebra y su co-factor transcripcional *E47*, en vectores de expresión de levadura y se realizó la selección. El clonamiento de *E47* fue necesario debido a que las proteínas proneurales heterodimerizan con otras proteínas del tipo bHLH

denominadas “proteínas E”, para unirse al DNA (revisado en Kiefer, 2005). En *Drosophila*, Daughterless es una proteína de este tipo y heterodimeriza con Atonal para unirse a las secuencias blanco (Chien *et al*, 1996).

En paralelo realizamos los clonamientos, en los mismos vectores, de los ortólogos para ambos genes de ratón y llevamos a cabo el mismo procedimiento. Es importante destacar que el título de las genotecas usada para el experimento de monohíbrido es tal, que tienen representado varias veces el genoma de las especies en cuestión. Un esquema del ensayo realizado se ilustra en la figura 9A.

Las colonias URA3 positivas obtenidas fueron replicadas en los respectivos medios de selección para asegurar la presencia de los todos los plásmidos necesarios. Luego se realizó reacciones en cadena de polimerasa usando partidores ubicados en la región *spo13* y *ura3* con la finalidad de amplificar específicamente secuencias del plásmido reportero (Figura 9B). Posteriormente se llevo a cabo una ronda de secuenciación usando partidores que flanquean la región genómica aislada. Un ejemplo representativo de los fragmentos amplificados se puede apreciar en la figura 9C, donde se observa que los fragmentos genómicos de pez cebra son de 200 a 600 bases y las de ratón desde 200 a 800, aproximadamente.

Se secuenció el DNA de un total de 768 colonias aisladas, de las cuales 190 fueron de la genoteca de pez cebra y 578 de la de ratón. De este proceso se obtuvo un total de 115 colonias únicas y cuyas secuencias genómicas plasmidiales fueron mapeables a algún lugar del genoma de las especies en cuestión (Figura 10A). Estas 115 secuencias representan un 15% del total de



**Figura 9. Búsqueda genómica en levaduras para identificar sitios de unión para *atona1*.** (A) Estrategia usada. El factor de transcripción Atonal1a de pez cebra (*zath1a*) y su cofactor transcripcional E47 (*ze47*) son expresados en levaduras haploides MAT $\alpha$  que son apareadas con levaduras haploides MATa, que contienen una librería de fragmentos genómicos de pez cebra clonados corriente arriba del gen reportero *ura3*. El mismo procedimiento fue realizado para los genes de ratón usando la librería correspondiente (a la derecha). Si existe interacción entre Atonal/E47 y el fragmento genómico representado en la levadura, se activa el reportero *ura3* y las levaduras pueden crecer en un medio sin uracilo (-URA). (B) Esquema del sitio de clonamiento en el plásmido reportero para los fragmentos genómicos. El promotor *SPO13* reprime la transcripción basal de *ura3*, y los fragmentos genómicos digeridos con Tsp509I fueron ligados en el sitio EcoRI. Las flechas incompletas indican los partidores usados para la amplificación de las secuencias clonadas. Mediante el uso de un partidor en el gen *ura3* y el otro en el promotor *SPO13*, se previene la amplificación de las secuencias endógenas de la levadura; luego se usa el otro partidor del promotor para secuencias el fragmento. (C) Ejemplos representativos de amplificadas en colonias individuales con ambas librerías genómicas, luego del proceso de selección. Los tamaños de los fragmentos son similares en los 2 casos (Zeng y cols., 2008)

reacciones de secuenciación realizadas. Ninguna de las 115 secuencias analizadas se repitió entre sí.

Con las secuencias obtenidas se realizó un análisis comparativo para encontrar elementos comunes. Mediante el uso del algoritmo MEME disponible para acceso libre a través de Internet (<http://meme.sdsc.edu/>), se identificó motivos de 8 a 10 pares de bases, presentes en alta frecuencia en las diferentes secuencias. Como se observa en la Figura 10B, la representación gráfica entregada por la herramienta arrojó dos cajas que coinciden perfectamente con los sitios de unión para proteínas de la familia Atonal reportados en la literatura (Bertrand y cols., 2002). Estas secuencias, conocidas como cajas E están en los promotores de los genes blancos y son específicamente reconocidas. Aunque la proteínas proneurales de diferentes familias reconocen el hexámero común CANNTG, ellas deben reconocer bases diferentes en las 2 posiciones centrales (Bertrand y cols., 2002). Es importante destacar que hay reportes que sugieren que *atonal1* y *atonal5* (las 2 proteínas de la familia *atonal* con mayor homología entre sí) pueden ocupar indistintamente las 2 cajas encontradas y esto es concordante con que ambas proteínas proneurales activan las mismas cascadas genéticas en el ojo y el oído/línea lateral a pesar de que los tipos celulares especificados son diferentes; Atonal5 especifica células retinoganglionares y Atonal1, células ciliadas (Biesel y Fritsch, 2004, Del Bene y cols., 2008).

Interesantemente, el análisis por MEME no arrojó la presencia de otras secuencias repetidas en los fragmentos genómicos aislados por el método del doble híbrido.

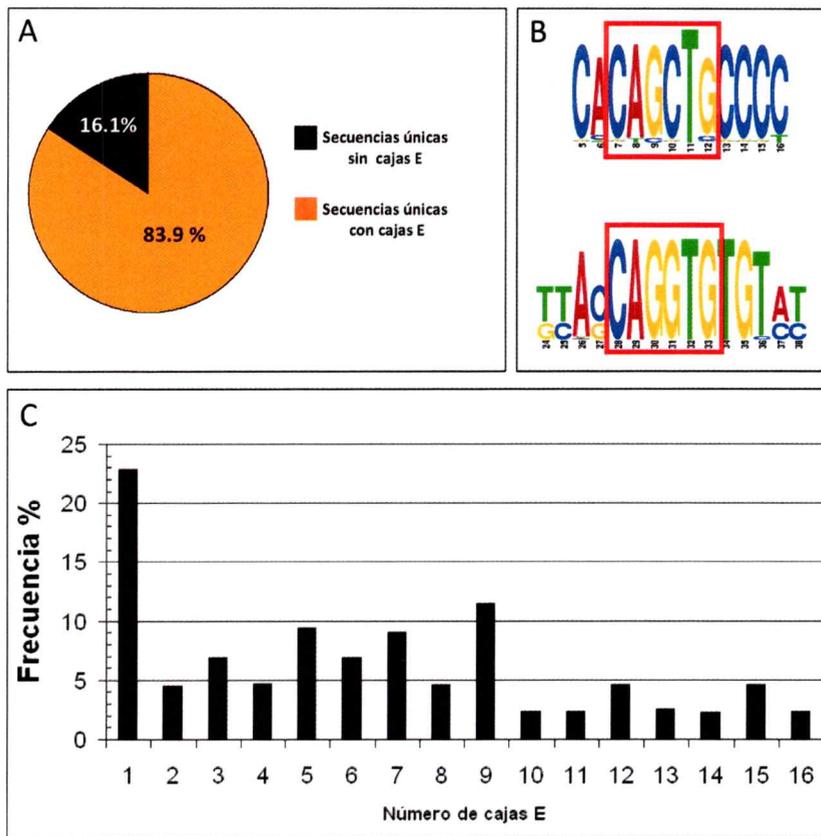
De las 115 secuencias únicas mapeables, se encontró que el 83.9% contiene al

menos una caja E sugiriendo que son putativos sitios de unión reales para proteínas proneurales (Figura 10A-C).

Luego, se llevo a cabo un mapeo de las secuencias identificadas para establecer su posición en el genoma de pez cebra y ratón. El criterio utilizado para considerar que las secuencias son candidatas a ser elementos reguladores, fue que estuvieran dentro de una distancia de 15 kilobases corriente arriba del inicio de la transcripción y 15kb corriente abajo del término de ésta (Krizanhovsky y cols., 2006 ). Sin embargo este criterio arbitrario puede tener limitaciones puesto que existen reportes que indican que regiones de DNA con sitios de unión funcionales para factores de transcripción incluso pueden estar en regiones muy distantes en el genoma , como es el caso de *sox9* o *shh* (Jeong y cols., 2006; Bien-Willner y cols., 2007).

De entre los genes cercanos a las secuencias obtenidas se seleccionó aquellos en los que podría haber alguna relación con neurogénesis o función neuronal, de acuerdo a la literatura. Con ellos se realizaron análisis que serán mostrados más adelante en esta tesis. La lista de genes asociados a las secuencias aisladas por la metodología del mono-híbrido inverso, y que serán testeadas, se muestra en la Tabla 5.

Una aproximación inicial para estimar la validez de estos putativos blancos seleccionados, es la posible relación en los procesos de neurogénesis dependiente de *atonal1*. En cuanto a genes para los que se ha mostrado una relación funcional con el desarrollo de las células ciliadas está *Sobp*. En *Drosophila*, inicialmente se identificó a *Sobp* en un ensayo de doble híbrido donde se encontró que interactuaba con el dominio Six de *Sine oculis* (SO)



**Figura 10. Las secuencias encontradas con el sistema del monohíbrido inverso contienen cajas E.** (A) De las 115 secuencias únicas mapeables, un 83.9% contiene al menos una caja E. (B) Representación grafica de los motivos con mas alta representación en las secuencias introducidas al programa MEME. La altura de las letras es una medida de la probabilidad. En el cuadro rojo se encuentran indicadas las 2 cajas E que aparecieron en la búsqueda. (C) Grafico que indica la frecuencia de secuencias encontradas con el número de cajas E indicadas en el eje X

en el ojo adulto de la mosca y se ha sugerido que *Sobp* forma un complejo con los factores de transcripción *Eya1* y *SO* (Kenyon et al., 2005). En mamíferos y pez cebra *Six1*, un homólogo en vertebrados de *Sine oculis*, y *Eya1* controlan el desarrollo del oído y la diferenciación de las células ciliadas en ese órgano y en la línea lateral (Zheng y cols., 2003; Ruf y cols., 2004; Koslowski y cols., 2005),

proceso que depende de *atonal1* y por lo tanto hace de *Sobp* un candidato plausible a tener una relación directa con este gen proneural. Además, *Jxc1*, el homólogo de *Sobp* en ratón, controla el crecimiento coclear, destino celular, y el patrón en el órgano de Corti (Chen y cols., 2008).

**Tabla 5. Algunos de los genes candidatos putativos a ser regulados por *atonal1* y cuyas secuencias de respuesta se encontraron dentro de 15 kilobases de distancia de la secuencia codificante. Ellos serán probados en ensayos de reportero en embriones de pez cebra.**

*Lhx9* (lim homeobox 9)  
*Ssbp3* (single stranded DNA binding protein 3)  
*Sobp* (*sine oculis* binding protein)  
*Dpp4* (dipeptilpeptidase4)  
*Dynein light chain 4*  
*Rims4* (Regulating synaptic membrane exocytosis 4)  
*Ntrk2* (Neurotrophic tyrosine kinase receptor type 2)  
*Bmp1* (Bone morphogenetic protein 1)  
*Kcng3* (Canal de potasio dependiente de Voltaje)  
*Hydin*  
*Fzd10* (Frizzled 10)

De la misma manera, otro de los blancos putativos encontrados en nuestro ensayo es *Lhx9*, que ha sido propuesto como un efector de *atonal1* en el desarrollo de la médula espinal (Bermingham y cols., 2001).

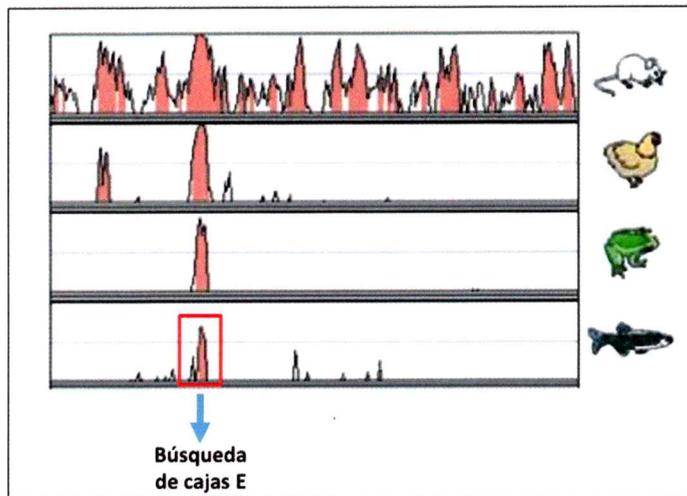
Estos dos datos expuestos sugieren que la búsqueda de genes diana a través del sistema de monohíbrido en levaduras arroja información con relevancia biológica, que valida la metodología empleada.

### 5.1.2 Búsqueda de cajas E conservadas en regiones regulatorias de genes candidatos a ser blanco de *atonal1*

A pesar de que el rastreo realizado en levaduras es un ensayo que puede entregar información útil sobre posibles blancos transcripcionales, en el experimento descrito anteriormente no aparecieron blancos que habríamos esperado, lo que puede tener varias razones que serán analizadas en la discusión. Dada esta limitación en la obtención de secuencias de respuesta a *atonal1*, en paralelo realizamos una búsqueda de secuencias conservadas en la vecindad de genes que, de acuerdo a su patrón de expresión durante el desarrollo, o por evidencia sugerida en la literatura, podrían ser blancos de la familia Atonal, y en esas secuencias de DNA buscamos sitios de unión (cajas E) conservados para este factor de transcripción. El Diagrama de flujo para esta aproximación se muestra en la Figura 11.

La disponibilidad actual de las secuencias del genoma de muchos vertebrados, ha permitido realizar análisis comparativos para precisar la ubicación de posibles elementos *cis* regulatorios ubicados en la vecindad de una secuencia codificante. El uso de la genómica comparativa (*phylogenetic footprinting*) es una estrategia crecientemente poderosa para la identificación de *enhancers* (Allende y cols., 2006).

Actualmente existe una base de datos de libre acceso donde se reúne información experimental y predicciones computacionales sobre putativos *enhancers* distribuidos a través de genoma humano, denominada VISTA Enhancer Browser (<http://enhancer.lbl.gov>, Visel y cols., 2007). Este recurso



**Figura 11.** El conjunto de datos de VISTA enhancer browser consiste en información de secuencia de *enhancers* que es de libre acceso. El diagrama de flujo esquematiza la búsqueda de regiones muy conservadas en la vecindad de genes candidatos a ser regulados por *atonal1*, seleccionado en base a la literatura actual. En las regiones ultra conservadas (nomenclatura de Vista; Penacchio y cols., 2006; Visel y cols., 2007) se buscó la presencia de cajas E donde pudiera unirse *atonal1*. Una vez que se identificaron, las secuencias fueron clonadas y analizadas en ensayos de reporteros en embriones de pez cebra (siguiente sección).

proporciona un set de 145.000 elementos conservados entre diversas especies, obtenidos computacionalmente.

Nosotros usamos esta colección para analizar intervalos de regiones genómicas ubicadas hacia 5', 3', y en los intrones de genes blanco candidatos a ser regulados directamente por *Atonal1*, buscando la presencia de cajas E conservadas. Con esta aproximación, encontramos varios de estos elementos conservados en putativas regiones regulatorias de los genes que se muestran en la Tabla 6.

Existe una amplia gama de técnicas bioquímicas para investigar el potencial para influenciar la expresión de genes por parte de putativos

elementos regulatorios, sin embargo estas son generalmente insuficientes para predecir la especificidad de un elemento regulador particular en un animal, surgiendo la necesidad de validar y caracterizar a estas secuencias mediante ensayos *in vivo*. Esto se analizará en la siguiente sección de esta tesis, combinando las secuencias obtenidas del ensayo de levaduras y las del análisis bioinformático.

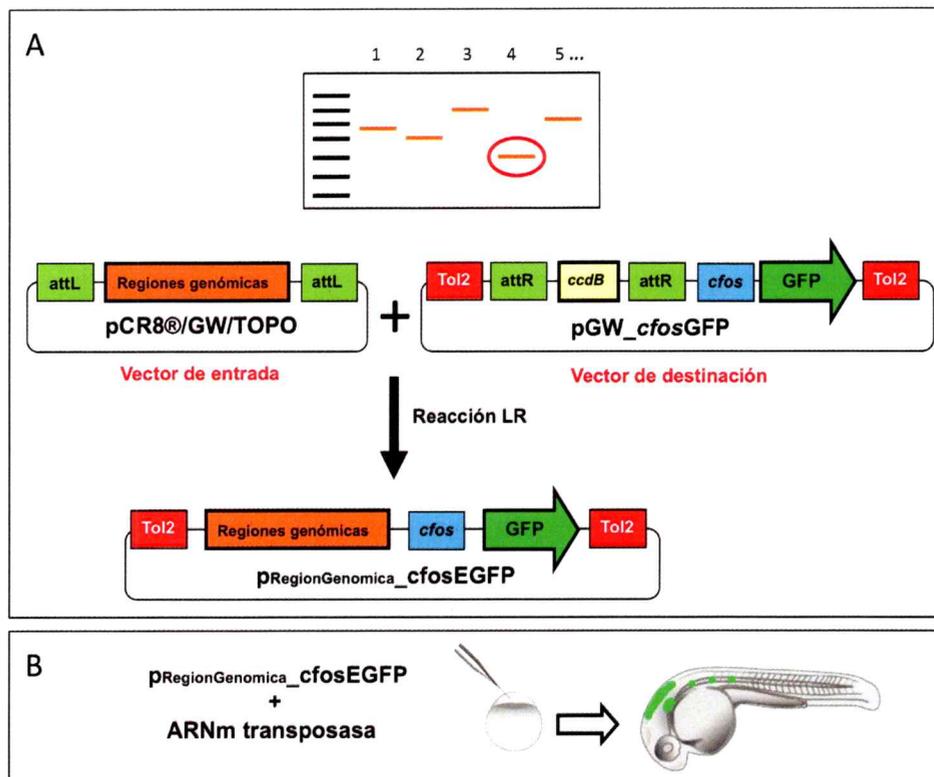
**Tabla 6. Genes blanco candidatos cuyas putativas secuencias regulatorias dependientes de *atonal1* fueron obtenidas con Vista Enhancer Browser**

*Gfi1* (growth factor independent 1)  
*Brn3c* (Brain-specific homeobox/POU domain protein 3c)  
*Atonal1*  
*Barhl1* (BarH-like 1)  
*Cutl1* (Cut like 1)  
*Hes5* (Hairy and Enhancer of Split 6)

**5.1.3 Evaluación *in vivo* de potenciales secuencias de respuesta a *atonal1*.**

Juntando la información de secuencias obtenida de ambas aproximaciones, es decir del monohíbrido inverso y del análisis bioinformático, hemos definido un conjunto de potenciales genes blanco y de elementos reguladores. Para evaluar la posibilidad de que estas secuencias correspondan a *enhancers* que unen al factor *atonal*, realizamos un ensayo *in vivo* en embriones de pez cebra. Para ello clonamos los fragmentos genómicos de pez cebra y ratón y los insertamos en un vector que posee sitios de clonamiento compatibles con Gateway<sup>tm</sup>, corriente arriba de un promotor mínimo y GFP, y que esta basado en secuencias del transposón Tol2 (Kawakami y cols., 2004) como se ve en la figura

12A. Esta herramienta ha sido usada desde hace algún tiempo en pez cebra y se ha validado como una manera confiable y rápida para probar *in vivo* la actividad de elementos *cis*-regulatorios (Allende y cols., 2006; Fisher y cols., 2006). Con las diferentes construcciones realizamos microinyecciones de estos plásmidos para analizar mediante expresión transiente los dominios de expresión de GFP que coincidieran con los de *atonal1a* en embriones de pez cebra (Figura 12,). Mientras el vector carente de secuencias adicionales al promotor basal no induce expresión alguna del reportero, se encontró que algunos de los potenciales *enhancers* dirigen la expresión de GFP en territorios neuronales específicos. Esto demuestra una respuesta transcripcional dependiente del fragmento genómico insertado; más aún, estas regiones genómicas dirigen la expresión del reportero en regiones donde se expresa *atonal1a* (Figura 13E-J). Sin embargo, otro grupo de secuencias son activas en territorios que no coinciden con el patrón de expresión de *atonal1a* (Figura 13A-D). Los plásmidos que fueron generados a partir de las secuencias obtenidas del monohíbrido inverso (de pez cebra y ratón) son los que, aunque con un patrón de GFP específico y reproducible, no parecen ser *atonal*-específicos. Sin embargo, los dominios de expresión del reportero regulado por esas secuencias parecen coincidir con los de otros genes proneurales. En el caso de una secuencia mapeada al primer intrón de Lim homeobox 9 (*lhx9*) se encontró que ésta promueve la expresión de GFP en el ojo en desarrollo, y aunque en ese dominio no hay expresión de *atonal1*, sí se encuentra presente *atonal5* (Figura 14A-B). Lo mismo sucede para la secuencia ubicada a 2.5 kilobases corriente arriba de



**Figura 12. Clonamiento de las secuencias genómicas en el vector reportero basado en el transposón Tol2, y estrategia experimental de análisis.** (A) Las secuencias genómicas aisladas del monohíbrido inverso y el análisis con Vista Enhancer Browser se amplificaron por reacción en cadena de polimerasa y fueron clonadas en un vector de entrada TOPO (Invitrogen) compatible con Gateway. Los constructos resultantes fueron recombinados con el vector de destino pGW\_cfosEGFP mediante una reacción LR, y de esta forma las secuencias genómicas fueron ubicadas corriente arriba en el contexto de un promotor mínimo *c-fos* que dirige la expresión de EGFP. (B) Luego de la purificación y cuantificación, los constructos fueron coinyectados con mRNA codificante para la enzima transposasa que cataliza la inserción de la secuencia Tol2 en el genoma, en huevos fecundados de pez cebra. Posterior a esto se analizó los patrones de expresión obtenidos a distintos estadios del desarrollo.

*dynein light chain 4*, la cual dirige un patrón de GFP muy limpio y específico en el ganglio de la línea lateral posterior, los axones de éste y las proyecciones de ellos hacia los neuromastos (Figura 13A-D). En este caso el patrón de GFP tampoco corresponde a dominios de *atonal1a*, pero es interesante hacer notar que este reportero podría estar siendo activado, al igual que en el caso anterior,



**Figura 13. Patrón de GFP dirigido por 2 enhancers: uno dirige GFP en dominios de expresión de *atonal1a* y otro en un territorio proneural distinto (A, B, C, D)** Análisis de la expresión transiente de GFP bajo el control de una putativa secuencia regulatoria del gen *dynein light chain 4* obtenida del monohíbrido inverso, usando larvas silvestres (A) y el fondo transgénico *atoh1a:dTom* (B, C, D). La expresión transiente (verde) es evidente en el ganglio de la línea lateral posterior (Flecha en A) y en los axones que surgen de éste. Se observa además la expresión de GFP en la innervación de las células *atonal1* positivas (visualizadas en rojo en C y D). En (D) Se observa que el patrón de ambos transgenes es complementario en un neuromasto. (E) Alineamiento de secuencia de las 26 pares altamente conservadas entre diferentes organismos (rectángulo rojo) y que posee un sitio de unión para *atonal1* (caja rosada encerrada en azul) 1.5 kilobases corriente abajo del mismo gen. Estas 26 pares de bases fueron clonadas en un tándem de 6 repeticiones para ser ensayadas en un ensayo de reportero. (F, G) Análisis comparativo a bajo aumento del patrón de expresión de *atonal1a* y un constructo que lleva 6 repeticiones de 26 pares de bases ubicadas 1,5 kb río abajo del mismo gen (*p26pb:GFP*), que recapitula el patrón de expresión de este gen proneural en el cerebro posterior, en la línea lateral y el el oído (sólo se muestra cerebelo en esta imagen). (F) Hibridación *in situ* de *atonal1a* en el cerebelo en desarrollo a las 24 hpf para comparación. (G) Patrón transiente de GFP dirigido por *p26pb:GFP* a las 48 hpf. (H, I, J, K) Imágenes representativas que muestran la colocalización de GFP transiente con el patrón de *atoh1a:dTom*, al hacer la inyección sobre ese fondo transgénico. Las flechas blancas indican células donde hay colocalización (H) Larva de 55 hpf donde el cuadro rojo destaca la zona del cerebelo que se muestra en I, J y K. (I) Expresión de GFP dirigida por *p26pb:GFP*. (J) *atoh1a:dTom*. (K) Superposición de las imágenes G y H evidenciando la colocalización de las marcas.

por otros genes proneurales: la función de *neuroD* o *neurogenina1* podrían estar mediando la expresión de GFP pues el desarrollo del nervio de la línea lateral esta bajo el control de estos genes (Andermann y cols., 2002). Esto es avalado además por la existencia de la línea transgénica *neuroD:eGFP* en la cual la expresión de GFP en el nervio de la línea lateral es prácticamente indistinguible de la del *enhancer* analizado en nuestro caso (Obholzer y cols., 2008).

Estos resultados sugieren que el ensayo de levaduras estaría identificando, en este caso, secuencias de unión para varios miembros de la familia de proteínas proneurales y no sólo específicas para *atonal1a*, lo que

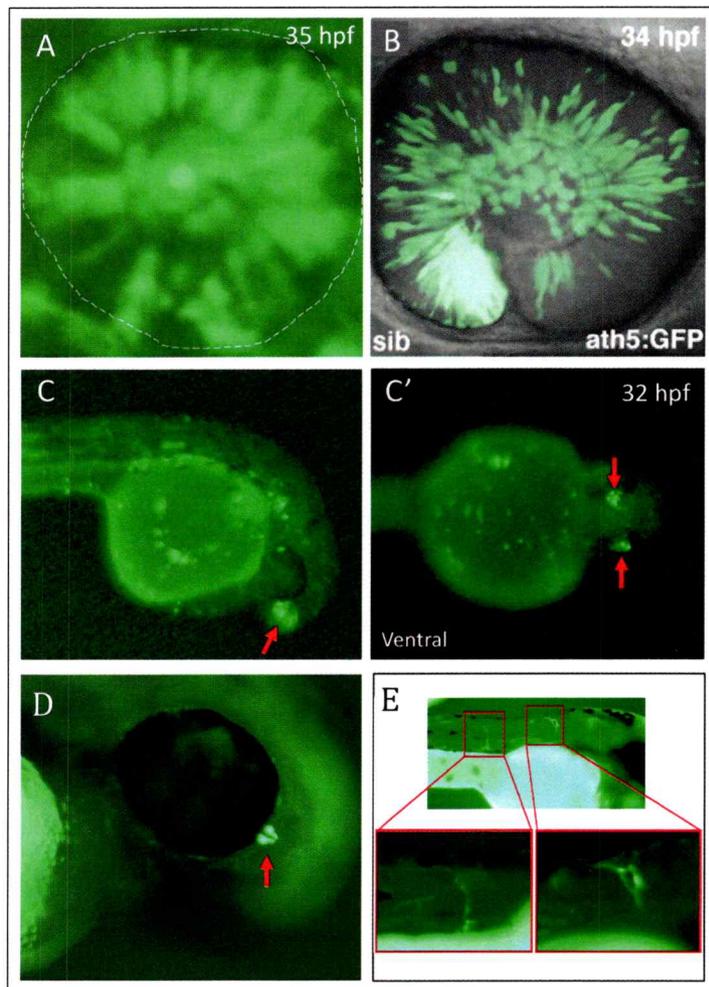
sugiere una flexibilidad en la capacidad de unión al DNA por parte de estas proteínas, al menos en el contexto de *Saccharomyces*. Esta observación es apoyada por evidencia reciente en la literatura en la que se muestra que al intercambiar los locus de genes proneurales de la misma familia y que participan en el desarrollo de la retina en ratón, el ojo en desarrollo no presenta mayores alteraciones y la diferenciación sigue un curso normal, indicando que bajo determinadas condiciones un gen proneural puede activar los genes blanco de otro usando los mismo sitios de unión a DNA (Mao y cols., 2008).

Respecto a las secuencias encontradas por análisis bioinformático, identificamos una región completamente conservada desde mamíferos a peces a 1.5 kilobases corriente abajo de *atonal1a*, que sugería una función importante para tener tal grado de identidad entre especies. Esta es una región muy pequeña de sólo 26 pares de bases (Figura 13E). Ese fragmento de DNA fue clonado en 6 repeticiones en el vector reportero y ensayado *in vivo* en embriones de pez cebra. Esta construcción es capaz de recapitular el patrón de expresión completo de *atonal1a* en este organismo (Figura 13F-K). Si bien es cierto es una condición artificial, el ensayo atribuye un rol esencial a esta secuencia en la autorregulación de este gen proneural durante el desarrollo, lo que ha sido mostrado para *atonal1* en ratón y para *atonal5* en *medaka* (Helms y cols., 2000; Skowronska-Krawczyk y cols., 2004; Del Bene y cols., 2007). Interesantemente, el constructo ensayado no dirige la expresión en otros dominios de genes proneurales, como el de *atonal5* en la retina, lo que sugiere que esta secuencia es específica y además revela experimentalmente un sitio de unión para *atonal1a* en pez cebra, y demuestra el alto grado de conservación de

secuencia con otros vertebrados (Bertrand y cols., 2002). Aunque la idea de que *atonal1* pueda autorregularse no es sorprendente, ya que su contraparte en *Drosophila* y *atona5* en *medaka* han demostrado tener esa capacidad (Sun y cols., 1998; Del Bene y cols., 2007), no deja de ser sorprendente la robusta importancia y especificidad de esa caja E presente en esas 26 pares de bases.

Cuando ensayamos otro putativo *enhancer* de *atona1*, pero ubicado 5 kilobases río abajo del la secuencia codificante, encontramos que éste dirige la expresión en el epitelio olfatorio del pez cebra (14C-C'). Esto es concordante con la expresión de GFP en el transgénico de *atona1* en ratón, donde hay marca en el epitelio olfatorio; esto agrega un componente interesante a la regulación de *atona1*, puesto que con las 6 repeticiones en tándem no fuimos capaces de ver expresión de GFP en la región olfatoria. Por lo tanto esta modularidad de *enhancers* reflejaría una divergencia a nivel de regiones regulatorias para controlar el desarrollo de componentes de los sistemas sensoriales, una de las funciones que se ha atribuido a *atona1* en ratón (Birmingham y cols., 2001), y probablemente el *enhancer* de 26 pares de bases ejemplifique una regulación necesaria para establecer características de estos sistemas de manera exclusiva en vertebradosny dependiente del tipo celular, ya que en *Drosophila* no es posible encontrar homología con esa secuencia.

Finalmente una región de DNA ubicada 1.5 kilobases corriente arriba del inicio de la transcripción de *gfi1* no fue capaz de recapitular un patrón de GFP en dominios donde ésta podría responder al control de *atona1*, en particular las células ciliadas (Figura 14D) (Jafar-Nejad y Bellen, 2004). Esto se debería a que no fuimos capaces de aislar la región responsable de esta respuesta, puesto que



**Figura 14. Patrones de GFP en territorios proneurales y no proneurales.**

(A) Una parte del intrón 1 de *lhx9* dirige la expresión de GFP en la retina en desarrollo, similar al patrón de expresión de *atonal5*. (B) Foto de la línea transgénica de pez cebra *ath5:GFP*, tomada de Yamaguchi y cols., 2005, para mostrar la similitud con el patrón de expresión dependiente del primer intrón de *lhx9*. (C-C'). Patrón de expresión de un *enhancer* putativo ubicado 5 kilobases corriente abajo de *atonal1*. La expresión de GFP se restringe al epitelio olfatorio. (D) Expresión de GFP muy específica dependiente de una región regulatoria ubicada 1.5 kilobases corriente arriba del inicio de la transcripción de *Gfi1*. A pesar de la especificidad del dominio de expresión, desconocemos que tipo de estructura esta marcada con GFP. (E) Expresión de GFP dependiente de una región ubicada 0.6 kilobases corriente arriba del inicio de la transcripción de *cutl1*. La expresión en este caso se restringe a dominios ubicados en el cerebelo y tubo neural.

tenemos evidencia, nuestra y de la literatura, de expresión y un rol funcional para este gen en células ciliadas que indica que *gfi1* actúa río abajo de *atonal*,

aunque una regulación directa no ha sido demostrada. Esto será analizado en la sección siguiente de esta tesis.

Otra secuencia encontrada mediante el uso de Vista Enhancer Browser fue *cutl1*, un factor de transcripción que inhibe la transcripción de *p27kip*, y se expresa en el epitelio auditivo en regeneración en aves (Hawkins y cols., 2007). En *Drosophila*, *cut* es regulado por *atonal* durante la especificación de los precursores de órganos sensoriales (Jarman y Ahmed 1998). En nuestro ensayo de reportero encontramos que una región ubicada 0.6 kilobases río arriba del inicio de la transcripción de *cutl1*, es capaz de dirigir la expresión de GFP en células del cerebelo y el tubo neural que son regiones donde *atonal1* se expresa (14D). Esto sugiere que *cutl1* puede estar bajo el control de *atonal1*, pero la regulación durante el desarrollo de las células ciliadas podría estar dada por otra región regulatoria, lo que es probable debido a la modularidad de los *enhancers*.

Con todas las otras regiones aisladas del monohíbrido y de la búsqueda bioinformática no fuimos capaces de obtener un patrón consistente de expresión de GFP en los embriones.

## 5.2 Relación regulatoria entre *atonal1a* y *gfi1* en el desarrollo de las células ciliadas

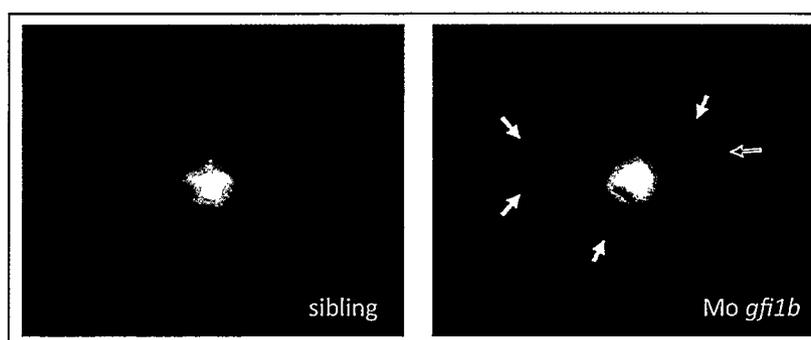
Como se expuso antes, las células ciliadas del oído y la línea lateral son similares en términos genéticos, estructurales y funcionales (Ghysen y Dambly-Chaudière, 2007). En el oído se ha visto que una vez que las células están comprometidas hacia el destino ciliado, comienzan a expresar un grupo de factores de transcripción que son necesarios para la diferenciación final (Revisado en Kelley, 2006). Uno de estos genes codifica para un factor de transcripción con dedos de zinc, llamado *gfi1* (*growth factor independent 1*), cuya delección lleva a una pérdida de las células ciliadas en un periodo post natal y consecuentemente sordera. (Hertzano y cols, 2004).

Nos interesamos en identificar una posible relación regulatoria entre *atonal1* y *gfi1*, puesto que el ortólogo de este gen, *senseless* en *Drosophila* está río abajo en la cascada génica dependiente de *atonal* en ese organismo: *senseless* es activado por *atonal* para suprimir a *rough*, que es un inhibidor del destino a fotorreceptor en el ojo de la mosca (Frankfort y cols., 2001)

En pez cebra se ha mostrado la expresión de *gfi1.1* y *gfi1b*, parálogos de *gfi1*, en las células ciliadas de los neuromastos, lo que sugiere una jerarquía conservada (Dufourcq y cols, 2004; [www.zfin.org](http://www.zfin.org)). Sin embargo ningún ensayo funcional ha sido llevado a cabo en este organismo.

Primero, para determinar la función de *gfi1* durante el desarrollo de este sistema sensorial en el pez cebra nosotros usamos un morfolino antisentido para inhibir la traducción del mRNA de *gfi1b*. Nuestros resultados muestran

que al hacer la inyección en embriones de la línea *tg(brn3c:mGFP)<sup>s356t</sup>* las células ciliadas en estas estructuras se desorganizan, presentan formas aberrantes y se fragmentan perdiendo su estructuración típica en forma de roseta (Figura 15); aunque no hemos hecho un análisis de muerte celular, la morfología y fragmentación de las células ciliadas en este contexto sugiere que están muriendo.



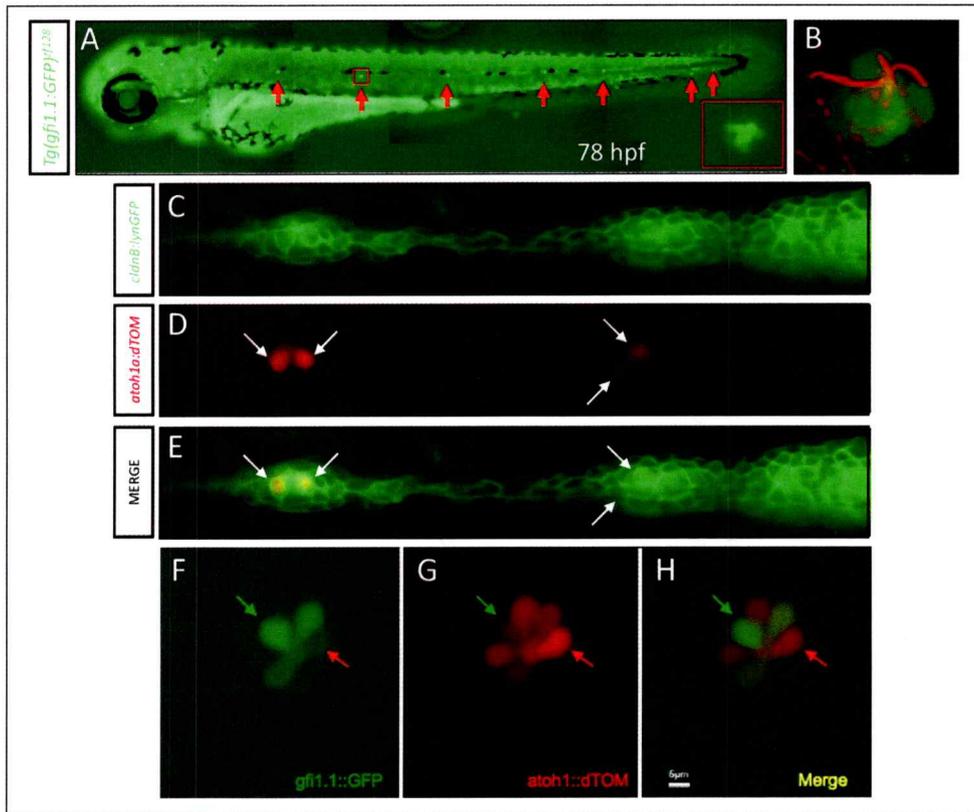
**Figura 15.** La inyección de un morfolino contra *gfi1b* desorganiza y fragmenta las células ciliadas de los neuromastos. A la izquierda se observa un neuromasto control L2 de la línea *tg(brn3c:mGFP)<sup>s356t</sup>* de 4dpf con una morfología característica de roseta. A la derecha un neuromasto morfante L2 evidencia un fenotipo aberrante, con desorganización y fragmentación de las células ciliadas.

Recientemente mediante *enhancer trap* se generó una línea de pez cebra con una inserción de GFP cerca del locus genómico de *gfi1.1*, el cual es importante para la diferenciación del linaje hematopoiético y recapitula completamente el patrón de expresión de este gen durante el desarrollo temprano (Wei y cols., 2008). Dada la alta conservación existente entre los genes *gfi* durante la evolución (Jafar-Nejad y Bellen, 2004), nosotros nos preguntamos si era posible que también recapitulara el patrón en las células ciliadas de la línea lateral. Al hacer un análisis a los 3dpf se puede observar que

todos los neuromastos presentan expresión de GFP (Figura 16A) y la expresión se restringe al centro de ellos (inset en figura 16A). Al hacer un análisis en larvas de 3dpf de la línea *tg(gfi1.1:GFP)* mediante inmunofluorescencia contra tubulina acetilada, que es un marcador confiable de células ciliadas diferenciadas en la línea lateral (Sarrazin y cols, 2006), se encontró que todas las células GFP positivas eran también tubulina acetilada positivas (Figura 16B). Esto nos permite concluir el transgén se expresa específicamente en células ciliadas diferenciadas, lo que es concordante con un posible rol en la mantención de este tipo celular, luego de *atonal1a*.

Existe una línea transgénica en pez cebra generada mediante recombinación con BACs y que tiene el gen reportero *dimer tomato* insertado en el locus genómico de *atonal1a*, lo que permite una recapitulación completa del patrón de expresión de este gen proneural (Kani y cols., 2010). En la línea lateral es el primer marcador de células que ya están comprometidas a un destino ciliado (Figura 16C-E). Es posible ver que la expresión en neuromastos que recién son depositados se restringe a 2 células centrales enfrentadas entre sí, concordante con lo descrito para la aparición de las células ciliadas (López-Schier y cols., 2006)

Al hacer un cruce entre esta línea y el transgénico *gfi1.1:GFP*, se observó que existe una segregación temporal en la expresión de ambas proteínas fluorescentes. Existen algunas células en el neuromasto que coexpresan la proteína roja y la verde, mientras que otras poseen la una o la otra (Figura 16F-H). Este es un fenómeno muy interesante que sugiere un estado transitorio de expresión de *atonal1a*, para especificar las células hacia un destino, pero luego

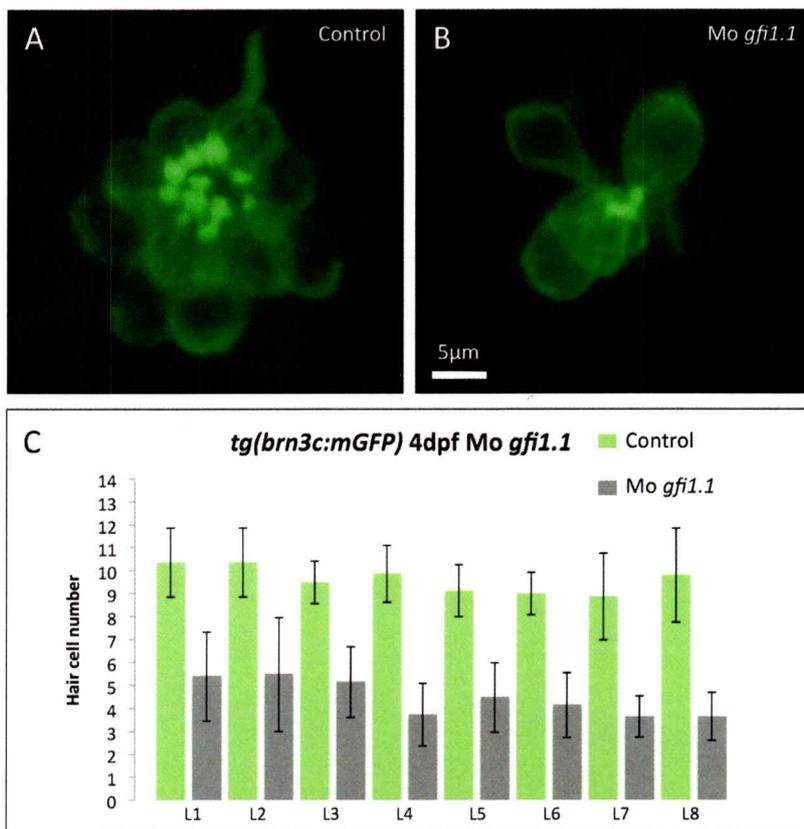


**Figura 16. Expresión y relación de las líneas *tg(gfi1.1:GFP)* y *tg(atoh1a:dTOM)* en la línea lateral.** (A) Larva de la línea *tg(gfi1.1:GFP)* de 78 hpf donde se aprecia la expresión de GFP en los neuromastos de la línea lateral. El inset es la magnificación del segundo neuromasto de la línea lateral posterior donde se aprecian células individuales. (B) Neuromasto de una larva *tg(gfi1.1:GFP)* de 3 días de desarrollo con una inmunotinción contra tubulina acetilada (rojo), donde se aprecia que todas las células GFP positivas son ciliadas diferenciadas. (C, D, E) Expresión del *dimer tomato* de la línea *tg(atoh1a:dTOM)* en el fondo *tg(cldnB:lynGFP)*. Las células rojas que están comprometidas hacia un destino ciliado aparecen enfrentadas en el ultimo proneuromasto del primordio, pero se ven mas claramente en un proneuromasto recién depositado (flechas blancas). (F, G, H) La expresión de los transgenes en *tg(atoh1a:dTOM)* y *tg(gfi1.1:GFP)* es secuencial, donde algunas células son sólo rojas (flecha roja) y otras sólo verdes (flecha verde). Neuromasto de 2.5 dpf. Esto sugiere que *atoh1a* podría especificar las células, pero luego la mantención dependería de otro set de genes, como *gfi1.1*

el proceso de mantención o establecimiento del destino sería relevado a otro grupo de genes, entre ellos *gfi1.1*, similar a lo que se ha mostrado en la relación *atoh1a/senseless* en *Drosophila*, donde *senseless* consolida el destino celular

especificado por *atonal* (revisado en Jafar-Najad y Bellen, 2004). Esto sugiere que en la línea lateral los transgenes de *atonal1a* y *gfi1.1* se expresan de manera secuencial y siguen una tendencia esperada en base a los datos de *Drosophila*.

Si bien es cierto que la región de DNA identificada por alineamiento de secuencias cerca de *gfi1*, y que putativamente podría responder a *atonal1* no dirige la expresión en territorios relevantes para esta tesis, no podemos



**Figura 17. La inyección de un morfolino contra *gfi1.1* desorganiza y reduce el número de células ciliadas en los neuromastos.** (A) Neuromasto L2 de la línea *tg(brn3c:mGFP)<sup>s356t</sup>* a 4dpf donde se observa la morfología característica de roseta. (B) Neuromasto morfante L2 que evidencia un fenotipo de desorganización y reducción en el número de células ciliadas. (C) Cuantificación de las células ciliadas en todos los neuromastos de la línea lateral, donde se observa que en los morfantes hay una marcada reducción en el número de ellas (n=17; p<0.05)

descartar que sí exista una regulación directa de *atona1a* sobre *gfi1.1* vía otro enhancer (Figura 14D).

Finalmente, al inyectar un morfolino contra *gfi1.1* para inhibir su función en el fondo *tg(brn3c:mGFP)<sup>s356t</sup>*, que marca con GFP las membranas de las células ciliadas de la línea lateral y las células retinoganglionares, encontramos que el número de neuromastos es igual a los embriones control, pero las células ciliadas en estas estructuras se desorganizan, presentan formas aberrantes muy similar a lo que vimos en los morfantes de *gfi1b*, y se observan en un número reducido recién al cuarto día de desarrollo (Figura 17).

Dado que la línea *tg(brn3c:mGFP)<sup>s356t</sup>* identifica células ciliadas diferenciadas (Xiao y cols., 2005), hemos concluido que estos genes no son requeridos para el compromiso a la diferenciación, y por lo tanto se sugiere una función de ellos en la mantención del estado diferenciado en este tipo celular, o para la sobrevivencia de ellas.

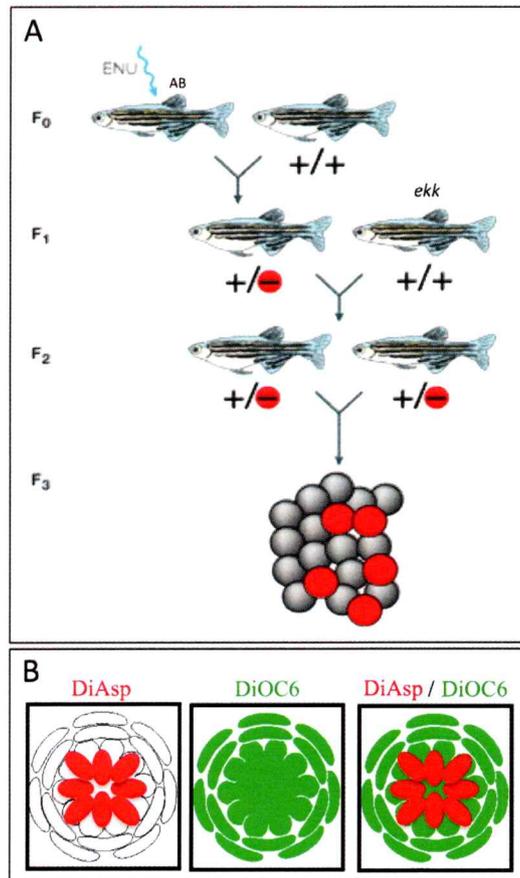
### **5.3 Rastreo e identificación de nuevas mutaciones que afecten el desarrollo de la línea lateral en el pez cebra**

Los rastreos de mutaciones han demostrado ser las aproximaciones más exitosas para identificar genes requeridos para diversos procesos del desarrollo (Revisado en Moens y cols., 2008). Este tipo de aproximación no requiere conocimiento previo a cerca de los genes involucrados en dichos procesos y por lo tanto pueden revelar nuevas vías genéticas responsables de fenómenos biológicos particulares.

Como se discutió en la introducción, una de las ventajas más importantes del pez cebra como organismo modelo vertebrado es la factibilidad de llevar a cabo mutagénesis y rastreos de mutantes. En esta tesis hemos aprovechado esta característica para aislar mutaciones que afecten procesos del desarrollo de la línea lateral e identificar los actores moleculares responsables de dichos fenotipos, para establecer una relación con la morfogénesis de este sistema.

#### **5.3.1.-Identificación de mutantes que revelan fenotipos en la línea lateral: Rastreo de genética directa**

El esquema básico de rastreo en 3 generaciones se muestra en la Figura 18A. Machos adultos mutagenizados de la cepa silvestre AB fueron cruzados con hembras silvestres para generar una progenie F1 heterocigota para un genoma mutagenizado. Individuos de esta generación fueron a su vez cruzados con animales silvestres de la cepa *ekk* que es polimórfica con respecto a AB y es útil



**Figura 18. Esquema de mutagénesis y estrategia de rastreo.** (A) Etilnitrosourea (ENU) fue usado para generar mutaciones puntuales en células germinales premeióticas de machos adultos de la cepa AB. Estos animales son cruzados para producir una progenie heterocigota F1. Peces F1 son luego cruzados con animales silvestres (*ekk*) para crear familias F2, la mitad de las cuales son genótipicamente heterocigotas para una mutación específica. Finalmente animales de las familias F2 son cruzados y la progenie resultante F3 consiste en 25% de silvestres, 50% de heterocigotos, y 25% de homocigotos para una mutación recesiva (círculos rojos). (B) El rastreo de mutantes fue llevado a cabo a los 3dpf mediante uso de una mezcla de tinciones vitales. Dioc6 marca el neuromasto completo (en verde) y DiAsp tiñe las células ciliadas (en rojo).

para clonamiento posicional debido a que es rica en polimorfismos, para producir una progenie F2. Finalmente individuos pertenecientes a las familias F2 generadas fueron apareados aleatoriamente entre sí para producir una generación F3, dentro de la cual se rastrearon las mutaciones. Si ambos padres

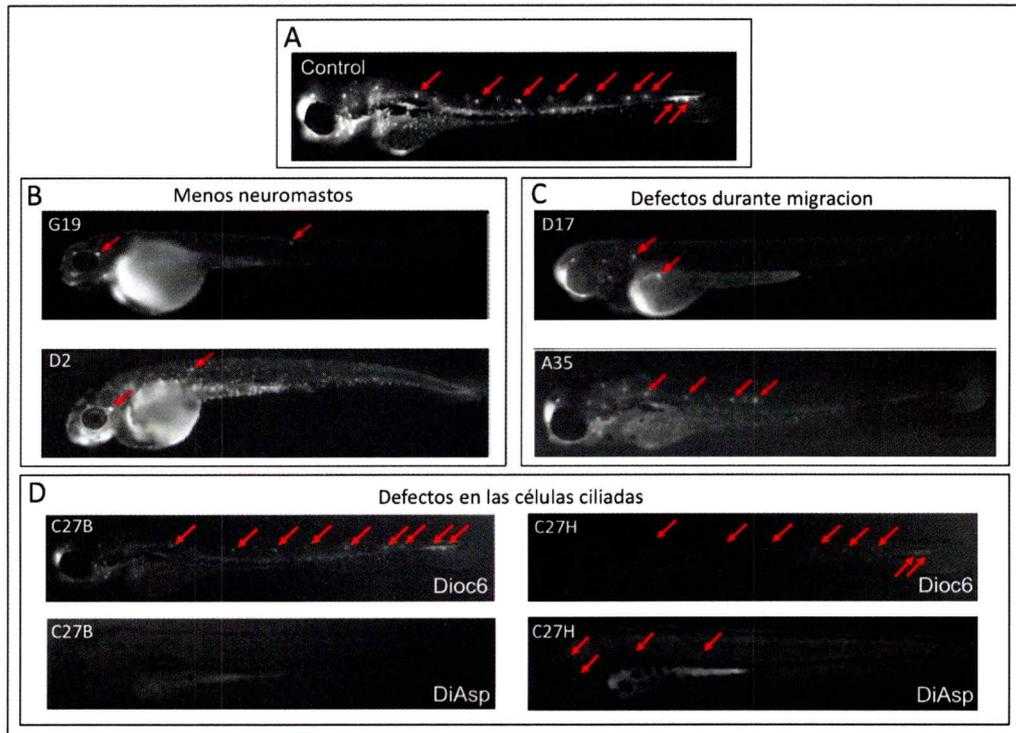
son heterocigotos para una mutación recesiva dada, un 25% de los embriones deben ser homocigotos y evidenciaran un fenotipo.

Se rastreó una total de más de 400 familias F2 con al menos 8 cruces exitosos por familia. Brevemente, larvas de 3dpf fueron incubadas en una mezcla de las tinciones vitales Diasp y DioC<sub>6</sub> que marcan células ciliadas y células accesorias, respectivamente (Collazo y cols., 1994, Koning y cols., 1993; Figura 18B). Estas tinciones, al tener diferentes espectros de emisión, permitieron discriminar entre mutantes que carecían de neuromastos de aquellos que, teniendo neuromastos, presentan defectos en las células ciliadas. Con esta aproximación experimental se aisló 6 mutaciones distintas entre sí.

Los resultados del rastreo se resumen en la Figura 19, donde se clasifican las 6 mutaciones de acuerdo al fenotipo observado.

### **5.3.2 Identificación de la naturaleza molecular de las mutaciones aisladas y caracterización fenotípica.**

Una característica particular de las mutaciones inducidas por ENU es que son de naturaleza aleatoria, y consisten en cambios puntuales de bases en el DNA (Talbot y Schier, 1999) Por lo tanto existe la misma probabilidad de que la mutación responsable de un fenotipo se encuentre en cualquiera de los 25 grupos de ligamiento del pez cebra. Debido a ello, la manera de identificar la lesión genómica en estos casos es mediante un método conocido como clonamiento posicional (Talbot y Schier, 1999). Como el nombre de esta técnica lo sugiere, se basa en identificar la mutación posicionándola en una región



**Figura 19. Imágenes bajo fluorescencia usando tinciones vitales que muestran los fenotipos de línea lateral en mutantes.** (A) Vista lateral de una larva silvestre de 3dpf teñida con DioC6, para comparación con los especímenes experimentales. (B-D) Los 6 fenotipos mutantes encontrados en el rastreo. Los mutantes fueron agrupados en tres categorías: menos neuromastos (B), defectos durante la migración del primordio de la línea lateral (C), y defectos en las células ciliadas (D). En (B) y (C) las larvas fueron teñidas con DioC6, y en (D) con DioC6 y DiAsp. En este ultimo caso es importante notar que las larvas poseen todos los neuromastos de la línea lateral posterior, pero tiene defectos en las células ciliadas. Las flechas rojas indican la posición de los neuromastos de la línea lateral posterior.

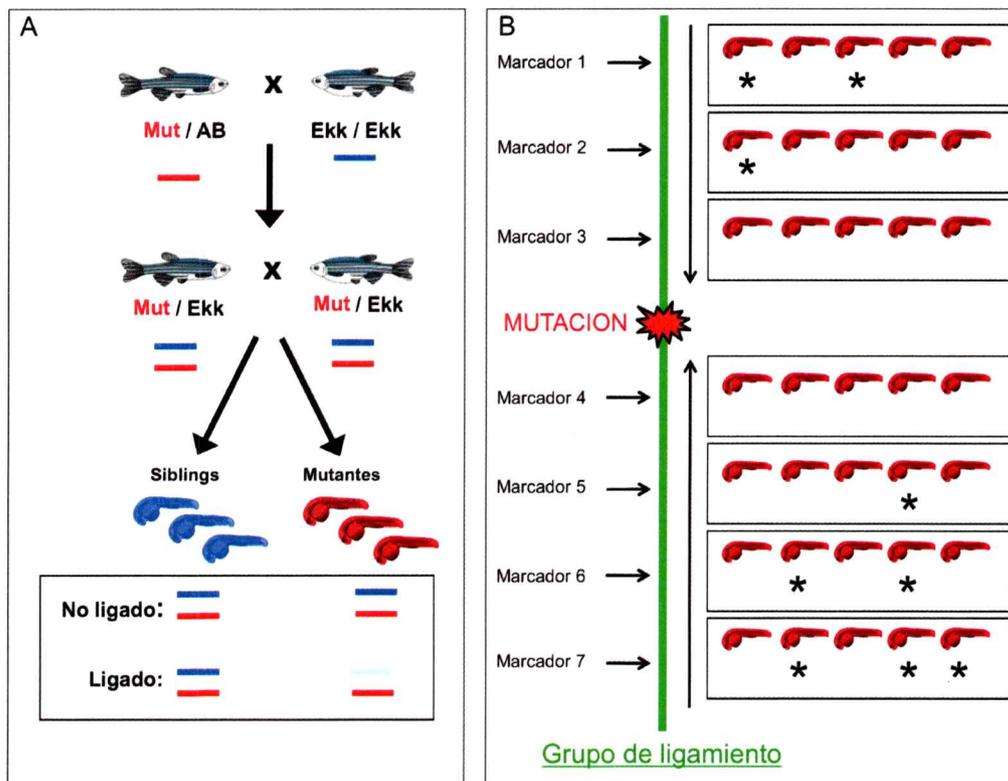
critica dentro de un cromosoma. Esto se lleva a cabo mediante el establecimiento de relaciones recombinantes de marcadores moleculares durante la meiosis, donde ocurre intercambio de segmentos cromosómicos entre cromosomas homólogos. Luego, esto es utilizado para calcular frecuencias de recombinación y por lo tanto una distancia genética comprendida entre 2 loci medida en Centimorgans (cM). El razonamiento que subyace a esto es que a

medida que 2 loci se encuentran más cercanos entre si, tienen una mayor probabilidad mantenerse juntos en un proceso de intercambio de regiones cromosomales (es decir, segregan juntos), y viceversa. De esta forma, el objetivo último del clonamiento posicional es encontrar marcadores moleculares que se encuentren cada vez más cerca de la lesión genómica para reducir al máximo los eventos de recombinación entre ellos y la mutación.

Para llevar a cabo esta aproximación es necesario además contar con un panel de marcadores polimórficos y la introducción de una copia del genoma de una línea enriquecida en polimorfismos en el esquema de rastreo (en este caso *ekk*). En esta tesis, los marcadores polimórficos usados fueron del tipo SSLP (*simple sequence length polymorphisms*), que amplifican microsatélites compuestos de repeticiones de dupletes de bases CA (u otras) en el genoma.

Brevemente, el paso inicial para el mapeo de las mutaciones encontradas fue hacer un análisis de segregantes agrupados, comúnmente usado en pez cebra. Para ello se extrajo DNA genómico de homocigotos mutantes y sus hermanos para determinar si existían marcadores cercanos a la mutación. Una vez que se encuentran marcadores ligados a ésta y se identifica el grupo de ligamiento, se buscan nuevos marcadores y se analiza la tasa de recombinación como se esquematiza en la figura 20. A mayor cercanía entre el marcador y la mutación, menor es la probabilidad de recombinación.

De aquí en adelante sólo me referiré a las líneas mutantes para las que se ha realizado algún avance en el mapeo e identificación del gen responsable del fenotipo.



**Figura 20. Análisis de recombinación por SSLP.** (A) Los SSLP están basados en diferentes números de dupletes de bases CA, lo que es analizable por electroforesis. La lógica de esto se basa en que cuando un marcador se encuentra ligado a una mutación (banda roja), tienden a una segregación conjunta durante la recombinación en la meiosis, y por lo tanto los mutantes son identificables por la presencia de dicho amplificado al tener 2 copias del marcador. (B) El número de embriones en lo que ocurre un evento de recombinación se hace cada vez mas pequeño a medida que su posición se acerca a la mutación. Los recombinantes están marcados por un asterisco.

### 5.3.2.1. C27-B: Un gen requerido para la mecanotransducción en las células ciliadas de la línea lateral

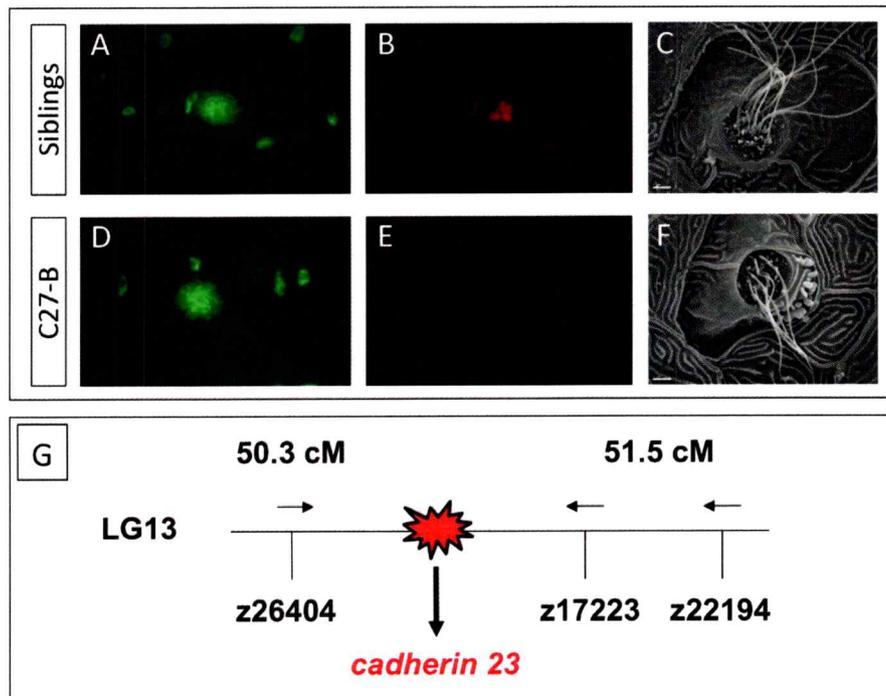
Varios genes involucrados en el desarrollo de las células ciliadas han sido identificados durante los últimos años. Por lo mismo, el conocimiento en esta área se ha incrementado rápidamente gracias a la disponibilidad de mutantes de células mecanosensoriales (Froehlicher y cols, 2009).

Durante nuestro rastreo identificamos una mutación (C27-B) que genera un defecto específico en las células ciliadas de la línea lateral sin afectar el desarrollo de los neuromastos a los 3dpf. Mediante tinciones vitales se encontró que estos mutantes no incorporan Diasp (Figura 21 A, B, D, E). Esta mutación es recesiva, puesto que un 25% de las larvas provenientes de un cruce de heterocigotos presentan este defecto. Sin embargo, la morfología gruesa de estos animales no está afectada. Esta falla en la incorporación de Diasp iba acompañada de defectos en el reflejo de escape de las larvas, similar a lo que sucede a mutantes con defectos periféricos en el sistema auditivo/vestibular (Nicholson, et al., 1998, Granato et al., 1996), lo que sugería 2 posibilidades: las células ciliadas no estaban o eran incapaces de incorporar la tinción.

A través de observación por microscopía electrónica de barrido al cuarto día de desarrollo, se determinó que en los mutantes los neuromastos de la línea lateral tenían células ciliadas en un número y morfología similares a la de los controles del mismo estadio (Figura 21 C, F), y por lo tanto el defecto observado era una deficiencia en la incorporación de la tinción vital de células ciliadas más que un defecto en el desarrollo de estas células mecanosensoriales.

#### **5.3.2.1.1 Mapeo C27-B**

Mediante clonamiento posicional se encontró que la mutación C27-B, se ubicaba en el locus flanqueado por los marcadores polimórficos z26404 y z17223 (z22194 se encuentra en la misma posición) en el grupo de ligamiento



**Figura 21. Caracterización de la mutación C27-B y mapeo del locus.** En condiciones control, bajo iluminación fluorescente, se observa la marca en verde del neuromasto L1 teñido con DioC6 (A) y en rojo las células ciliadas con Diasp(B). (C) En una microfotografía electrónica de barrido, se observa el centro del neuromasto L1 con un grupos de cilios surgiendo desde el centro. En condiciones mutantes la marca de DioC6 es normal en el neuromasto L1 (D), pero la de Diasp esta completamente ausente (E). Un análisis de microscopia electrónica revela que los cilios del neuromasto son normales en mutantes(F). (G) Mediante análisis de segregantes se ubicó la mutación entre los marcadores polimórficos z26404 y z17223 (o z22194) en el grupo de ligamiento 13, y se encontró que el único gen ubicado en esa zona es *cadherin23*.

13 en el genoma del pez cebra (Figura 21G). Dentro de esa región el único gen anotado es *cadherin23*, un componente esencial del aparato mecanotransductor de las células ciliadas (Sollner et al, 2004). Sin embargo para este gen mutado otros autores han descrito a lo menos 6 alelos, siendo el primero de ellos denominado *sputnik* (Söllner et al., 2004).

El desplazamiento de las uniones entre los cilios de las células mecanosensoriales permiten la apertura de canales cuyo funcionamiento es

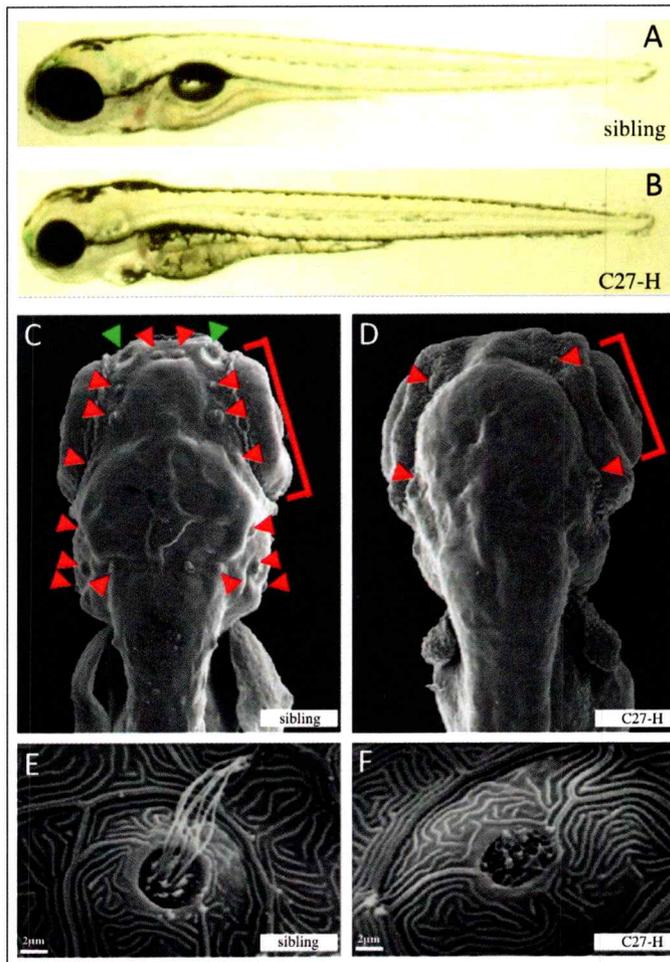
esencial para la mecanotransducción (Howard and Husdpth, 1988). En los diferentes alelos de *cadherin23* reportados (incluyendo el nuestro) los individuos evidencian una mecanotransducción reducida o completamente ausente (Nicholson y cols., 1998; este estudio). En nuestro alelo, la incorporación de DiAsp es completamente nula, lo que sugiere una pérdida de función total del gen. Mutaciones en este gen causan sordera y defectos vestibulares en ratones y humanos (Bolz et al., 2001; Di Palma et al., 2001; Wilson et al., 2001).

Esta mutación fue el primer indicio de que nuestro método de rastreo y clonamiento posicional estaba siendo exitoso, lo que auguraba un buen desempeño con las mutaciones que se describen más adelante en esta tesis.

#### **5.3.2.2. C27-H: un gen requerido para la sobrevivencia de las células ciliadas de la línea lateral.**

La segunda mutación (denominada tentativamente C27-H hasta ahora) que afecta las células ciliadas no produce cambios en el patrón normal de neuromastos, pero evidencia un defecto robusto en la mantención postembrionaria de este tipo celular.

La morfología gruesa de los animales mutantes C27-H es similar a la de larvas silvestres (Figura 22A-B.). Sin embargo el defecto más prominente es la vejiga natatoria no inflada, aunque hemos observado que este defecto esta presente en varias de las mutaciones analizadas durante el rastreo. Además, las larvas mutantes tienen ojos notoriamente más pequeños y un leve defecto de



**Figura 22. Fenotipo de la mutación C27-H.** (A, B) Comparación de larvas de 3 dpf evidenciando diferencias en el tamaño de los ojos y forma de la cabeza entre siblings (A) y mutantes (B). (C, D, E, F) Microscopía electrónica de barrido en larvas de 4 dpf. Vista dorsal de la cabeza de una larva sibling (C) y una mutante (D). Se observan diferencias en el patrón de neuromastos de la LL anterior (probablemente un defecto secundario debido al defecto en el tectum) y un tamaño reducido de los ojos en los mutantes. Las flechas rojas indican la posición de los neuromastos, y las verdes muestran los orificios nasales. (E, F) Magnificación de un neuromasto representativo de la LL posterior que deja en evidencia el robusto fenotipo en las células ciliadas en los mutantes (F).

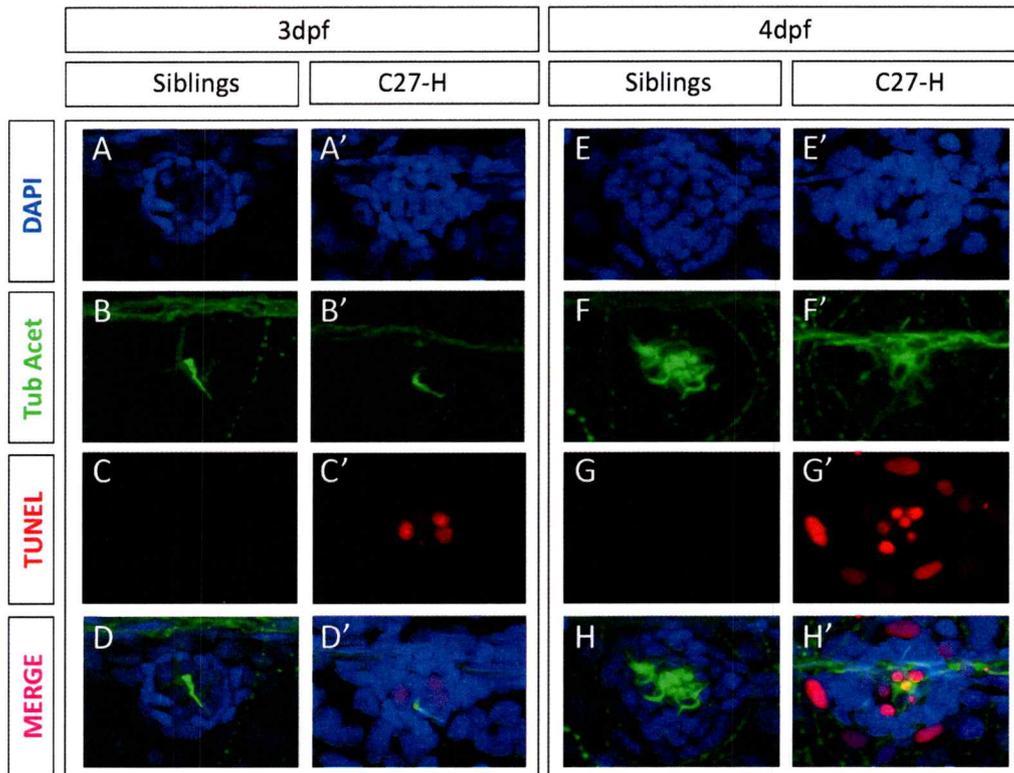
malformación mandibular (Figura 22A, B). Entre el cuarto y quinto día los ojos caen en un proceso degenerativo hasta que las larvas mueren al quinto. Sabemos que un fenómeno apoptótico comienza en los ojos mutantes a los 2 días y medio de desarrollo, lo que podría explicar el fenotipo de la reducción del

tamaño de estas estructuras en los mutantes.

Cada neuromasto en los lados de una larva silvestre puede ser inequívocamente identificado como uno de los 7 a 8 presentes (Raible and Kruse, 2000). Al hacer un análisis durante el desarrollo de la línea lateral, hemos visto que el primordio se desarrolla normalmente y migra en los peces mutantes. Sin embargo, al tercer día de desarrollo, las células ciliadas de los neuromastos son débilmente marcadas, salvo por los dos primeros de la línea lateral posterior y uno de la anterior (Figura 19D, paneles derechos).

Para examinar detalladamente la estructura de los neuromastos, fijamos larvas de 4dpf para microscopía electrónica de barrido. En especímenes silvestres, la estructura en forma de volcán de los neuromastos se observa de manera clara, con múltiples cilios surgiendo desde el centro, provenientes de las células ciliadas (Figura 22C, E). En los mutantes la forma de los neuromastos se preserva, pero los cilios están ausentes. Sin embargo, con esta técnica no pudimos discriminar si era un problema de ciliogénesis y/o degeneración de éstos, o un problema de degeneración de las células ciliadas (Figura 22D, F).

Al hacer análisis por TUNEL hemos visto que las células ciliadas degeneran entre el tercer y cuarto día, evidenciado un robusto aumento en los núcleos apoptóticos comenzando al tercer día en el centro de los neuromastos (células ciliadas) y extendiéndose a las células accesorias al cuarto día (donde se ubican los progenitores de la células ciliadas) (Figura 23). Al hacer un análisis de la mutación sobre el fondo *Tg(brn3c:mGFP)<sup>s356t</sup>*, que dirige la expresión de GFP de membrana en esas células, además de otros componentes sensoriales (Xiao y cols., 2005), observamos que las células ciliadas son correctamente

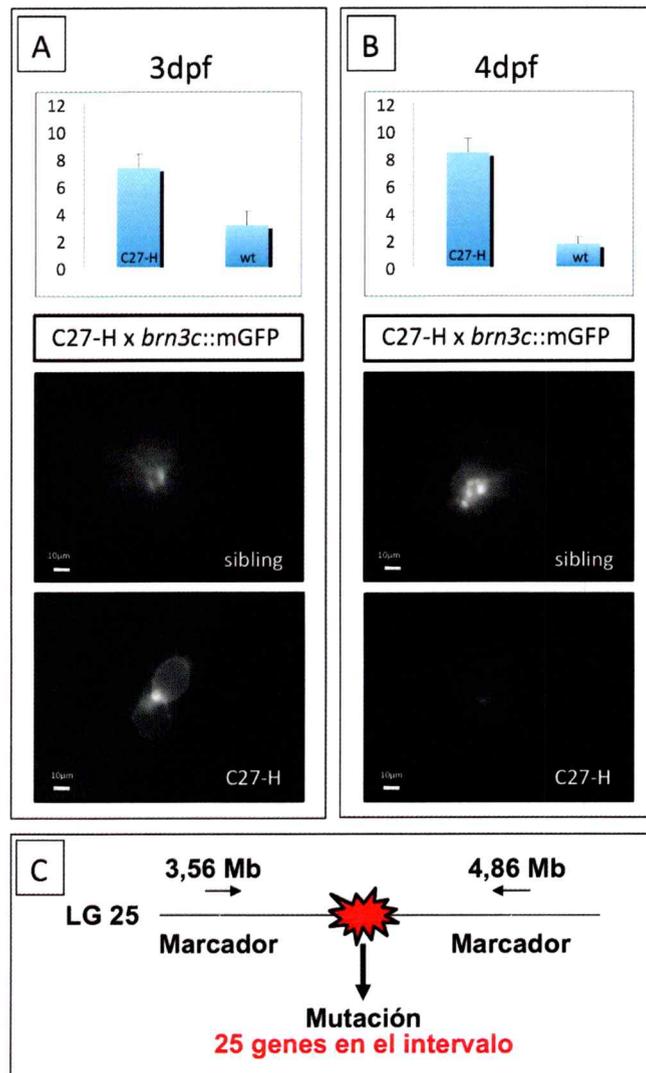


**Figura 23. Las células ciliadas de la línea lateral degeneran en los mutantes C27-H.** (A-D') Mediante el uso de un triple tinción para visualizar núcleos (DAPI), células ciliadas (Tubulina acetilada) y muerte celular (TUNEL) se encontró que a los 3dpf se comienzan a observar núcleos positivos para TUNEL en el centro de los neuromastos en los mutantes C27-H (D'). (E-H') A los 4dpf la muerte celular es vista en un creciente número de células ciliadas y también se extiende a las células de soporte/manto en los neuromastos mutantes (H').

especificadas, pero degeneran entre el tercer y cuarto día, disminuyendo su número (Figura 24 A, B).

### 5.3.2.2.1. Mapeo C27-H

Hasta el momento sabemos que esta mutación está en el grupo de ligamiento 25 del pez cebra entre 2 marcadores del tipo SSLP ubicados en 3,56



**Figura 24. Cuantificación de la degeneración de las células ciliadas de la línea lateral y mapeo inicial del gen C27H.** En el gráfico de la parte superior de (A) y (B) se observa que la mayoría de las células ciliadas degeneraron entre el tercer y cuarto día de desarrollo, lo que fue cuantificado usando la línea transgénica *brn3c::mGFP* (n=15 en cada caso; p<0.05) En la parte media e inferior de (A) y (B) se muestran fotos representativas del neuromasto L2 en controles y mutantes, respectivamente, a 3dpf y 4dpf. (C) El mapeo de la mutación indica que ésta se encuentra entre 2 marcadores en el grupo de ligamiento 25 ubicados a 3,56 y 4,86 megabases. En esta región existen 25 genes anotados.

y 4,86 megabases (Figura 24C). En este intervalo crítico no existe ningún gen previamente involucrado en el desarrollo de las células ciliadas, y por lo tanto

nuestros resultados sugieren que es una nueva mutación degenerativa en el pez cebra. Sin embargo, la identificación del gen mutado escapa al marco temporal de esta tesis. Lo que sí se puede decir es que debido a que en la mutación C27-H las células ciliadas son especificadas normalmente, pero luego degeneran, el producto génico responsable de este fenotipo estaría actuando durante un proceso posterior a la diferenciación de las células ciliadas mediada por *atona1a*, es decir, en la mantención de este tipo celular. Si existe alguna relación directa entre *atona1a* y el producto génico C27-H, deberá ser resuelto en el futuro.

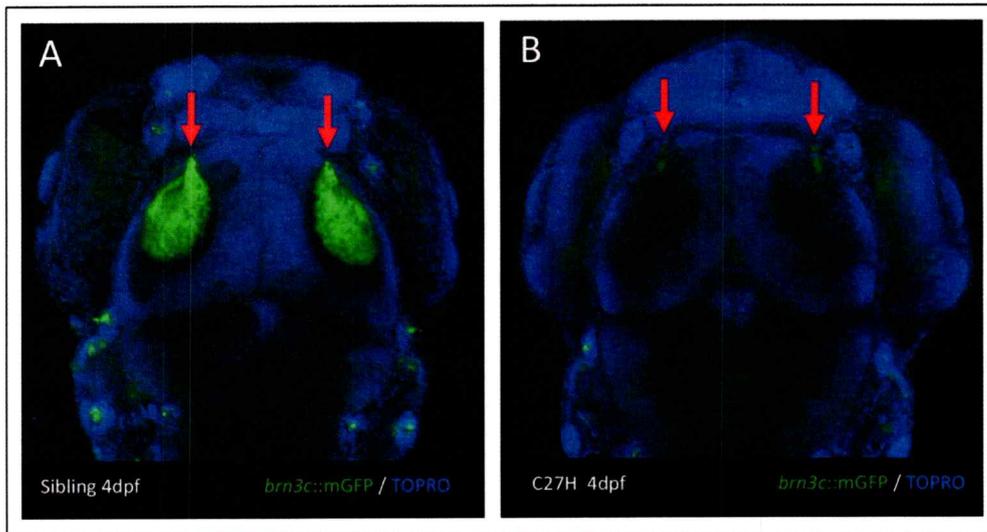
En la literatura, recientemente se ha reportado un mutante de pez cebra para la subunidad p50 de la dinactina (denominando *ale oko*, ubicado en el grupo de ligamiento 6) que presenta un fenotipo de degeneración de fotorreceptores y de las células ciliadas, similar a lo que sucede en la mutación C27-H, haciendo un interesante *link* entre el sistema visual y el sistema de la línea lateral (Jing y Malicki, 2009). Es posible explicar el requerimiento de este motor molecular en los tipos celulares afectados porque ambos presentan una morfología elongada y altamente polarizada y, similar a los epitelios, sus centrosomas son posicionados en la superficie más apical, lejos de las regiones perinucleares biosintéticamente activas (Dowling, 1987). Por lo tanto se necesita el movimiento de *cargos* a través de un robusto mecanismo de transporte citoplasmático dirigido y dependiente de microtúbulos. La similitud en el fenotipo degenerativo en la mutación C27-H, lleva a pensar que es posible que el fenotipo este ligado a un defecto atingente a la citoestructura de esas células y por lo tanto sería posible acotar la búsqueda de genes candidatos en la

región crítica donde se encuentra la mutación a genes que estén ligados al funcionamiento del citoesqueleto y por lo tanto dirigir la secuenciación a candidatos más probables.

Un análisis preliminar de la arquitectura de las proyecciones retinotectales en los mutantes C27-H, usando el fondo *tg(brn3c:mGFP)*, muestra que a 4dpf éstas se encuentran completamente truncas en comparación con larvas control (Figura 25).

### **5.3.2.3. A35-F: un gen requerido para proliferación y responsable de la homeostasis del tejido durante el desarrollo de la línea lateral.**

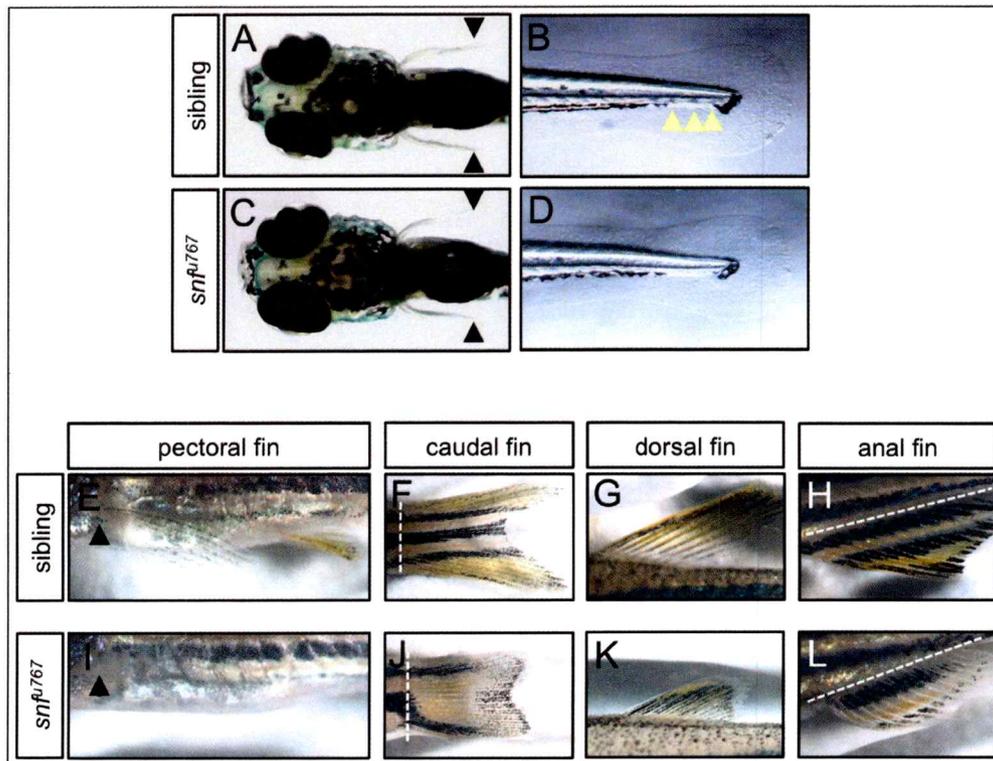
En animales silvestres, las tinciones que fueron usadas en el rastreo de mutantes marcan 7-8 neuromastos en el tronco y cola de la larva a los 3dpf (Figura 19A). Las larvas mutantes A35-F poseen los primeros 4-5 ( $4.6 \pm 0.9$ ) pero carecen de los más caudales (Figura 19C, panel inferior). Los animales A35-F son viables y no se observan otros fenotipos evidentes durante los estadios embrionarios y larvales (Figura 26 A-D). Sin embargo, al mes de desarrollo los peces mutantes carecen de aletas pectorales y todas las demás aletas se observan reducidas, lo que persiste hasta la adultez (Figura 26 E-L). Dado que los animales mutantes se ven normales a los 6 días de desarrollo, sospechamos que la mutación afecta ya sea la capacidad para crecer de las aletas o para mantener la homeostasis del tejido.



**Figura 25. Análisis de las proyecciones de los axones retinales muestra que los mutantes C27-H tienen truncadas las innervaciones al tectum.** (A) En peces larvas silvestres de 4dpf la línea transgénica *brn3c::mGFP* revela la arquitectura de las proyecciones retinotectales (flechas rojas). (B) En los mutantes esas proyecciones están completamente ausentes en el tectum. Los núcleos están contrateñidos en azul.

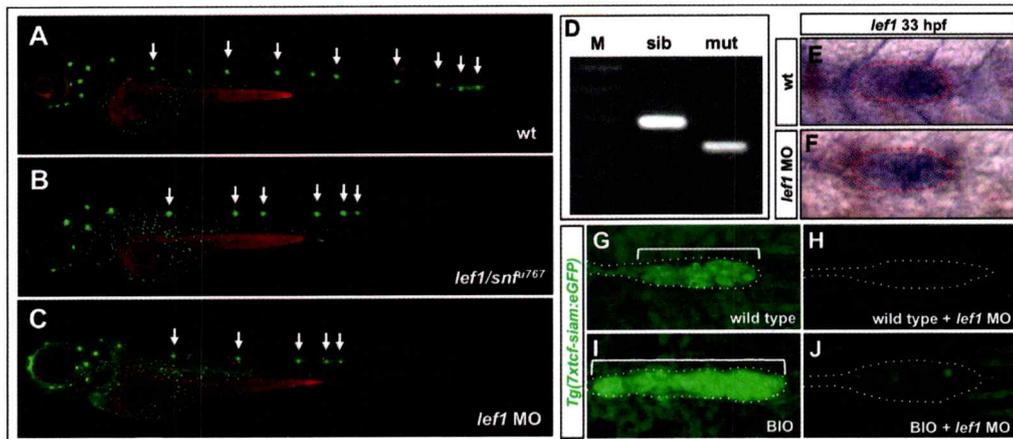
### 5.3.2.3.1 Mapeo A35-F

A través de clonamiento posicional se encontró que la mutación A35-F estaba ubicada en el locus flanqueado por los marcadores z9704 y z11464 en el grupo de ligamiento 1 del genoma del pez cebra (Figura 28A). En este intervalo, se pudo identificar 3 genes que se expresan en la línea lateral posterior en desarrollo: *lef1*, *meis4.1* y *msx3b* (Gallardo y cols., 2010; <http://zfin.org>). Al secuenciar los 3 mRNAs, sólo encontramos que en el caso de *lef1* el cDNA mutante difería del cDNA *sibling* careciendo del segundo exón completo. Esta deleción genera un cambio en el marco de lectura que lleva a la aparición de una secuencia de 19 aminoácidos aberrantes seguidos por un codón de término (Figura 28C). Como resultado, este transcrito mutante produce una proteína



**Figura 26. El desarrollo de las aletas es afectado en los adultos, pero no en los embriones en los mutantes *lef1/sinf<sup>1767</sup>*.** (A-D) Larvas de 6 dpf control (A,B) y mutantes *lef1/sinf<sup>1767</sup>* mostrando ninguna diferencia en las aletas pectorales (A,B) o caudales (B, D). Las flechas negras muestran una longitud similar en las aletas pectorales en controles y mutantes. Las flechas amarillas indican los últimos 3 neuromastos en el embriones control. Los animales mutantes fueron discriminados mediante el uso de Diasp/DioC6 para teñir los neuromastos. (E-L) Animales de 30 dpf silvestres (E-H) y mutantes *lef1/sinf<sup>1767</sup>* (I-L) que muestran diferencias en el desarrollo de las aletas pectorales (E,I), caudales (F,J), dorsal (G,K) y anal (H,L). Las flechas negras muestran el punto de crecimiento de las aletas pectorales. Las líneas blancas entrecortadas muestran el límite entre el cuerpo y las aletas.

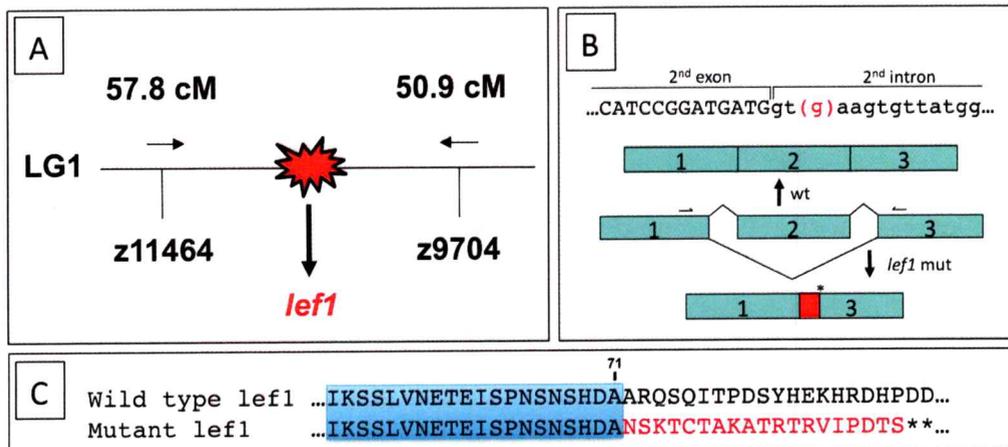
trunca que contiene sólo los primeros 71 aminoácidos de un total de 365 de la proteína silvestre, en los que se encuentra el dominio de unión a  $\beta$ -catenina. RT-PCR usando partidores ubicados en el primer y tercer exón confirmó la completa penetrancia del defecto en el transcrito mutante (Figura 27D). Para identificar la lesión genómica responsable, se secuenció los límites de exones e



**Figura 27. Caracterización de los mutantes *sinfin(sinfn)<sup>u767</sup>* de pez cebra.** (A-C) Vista lateral de larvas de 3dpf silvestre (A), *lef1/sinfn<sup>u767</sup>* (B), y morfantes para *lef1* (C), teñidos con las tinciones vitales DiI/DioC6. Las flechas indican las posiciones de los neuromastos de la línea lateral posterior. (D) RT-PCR realizado con DNA complementario de mutantes y embriones hermanos usando partidores que hibridan en los exones 1 y 3. El carril mutante muestra una banda de 121 nucleótidos que carece de los 67 del exon2. El marcador de DNA muestra bandas de 400, 300, 200 y 10 pares de bases. (E-F) Expresión de *lef1* en embriones silvestres (E) y morfantes para *lef1* (F) de 33 hpf. (G-J) Expresión de GFP a 36hpf en la línea *Tg(Xtcf-siam:eGFP)ia4* en condiciones control (G), morfante para *lef1* (H), incubado con BIO (I), y morfante para *lef1* incubado con BIO (J).

intrones y se encontró que en el límite intrón- exón 2 hay un cambio puntual de base (T a G) que elimina el sitio dador de *splicing* 5' en el segundo exón (Figura 28B). Probablemente esto fuerza a la maquinaria de *splicing* a saltarse el segundo exón. La expresión de *lef1* en el borde líder del primordio en migración (Aman y Piotrowski, 2008; esta tesis) en los morfantes para *lef1* es indistinguible de los animales silvestres (Figura 27 E,F) sugiriendo que no hay *nonsense mediated decay* del transcrito mutante.

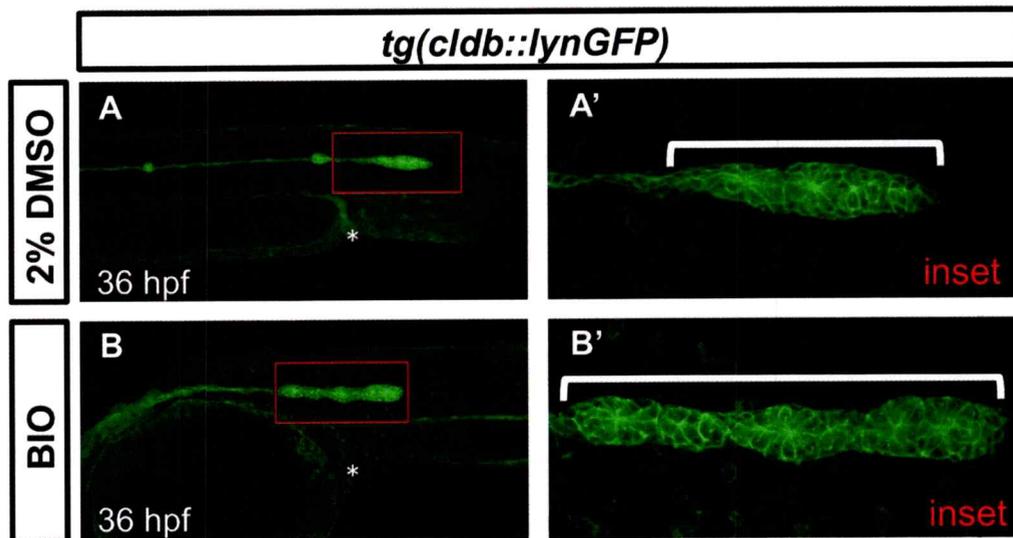
La pérdida de función de *lef1* realizada con un morfolino oligonucleótido antisentido dirigido contra el inicio de la traducción del mRNA de *lef1* fenocopia la mutación A35 en sobre el 90% de los individuos (n>100; Figura 27 A, B, C).



**Figura 28. Mapeo y caracterización molecular de la mutación en *lef1*.** (A) mediante análisis de segregantes usando marcadores polimórficos de longitud de secuencia simple se identificó un intervalo crítico en el grupo de ligamiento 1 entre los marcadores z11464 y z9704. (B) La mutación en *lef1/sin<sup>fu767</sup>* es una transición “t” a “g”(indicada en rojo) en el sitio dador de splicing del segundo intrón. Además se muestra la representación del evento de splicing especulado que lleva al mRNA de *lef1* mutante. La caja roja representa una secuencia de sentido errado seguida por un codón de término prematuro (\*). (C) Alineamiento de las secuencias de proteína Lef1 silvestre y mutante. La caja azul muestra los aminoácidos idénticos codificados por el primer exón. Las letras rojas en la secuencia mutante indican la secuencia de sentido errado después del cambio en el marco de lectura. Los codones de término son mostrados por asteriscos.

Por lo tanto, aunque los mutantes expresan un fragmento de proteína Lef1, su fenotipo es indistinguible del fenotipo de pérdida de función, y de esta manera la mutación A35-F probablemente representa una pérdida de función. Además, indica que no hay contribución materna de *lef1*, y que la función de este gen no es requerida en otros eventos del desarrollo embrionario. Dado que los fenotipos de morfantes y mutantes son indistinguibles, el morfolino es una herramienta confiable para inhibir la función de *lef1* en diferentes fondos mutantes o transgénicos.

Lef1 funciona como un efector transcripcional de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina (Moon y cols., 2004) lo que nos llevó a preguntarnos si los niveles de activación



**Figura 29. Incubación de embriones *Tg(cldnB:lynGFP)*<sup>zf106</sup> en BIO fenocopia el fenotipo observado en el primordio de la línea lateral posterior en los mutantes *apc*. Nótese que en los tratados con BIO (B) el primordio es hipertrófico y se detiene justo al comenzar la extensión del vitelo (asterisco blanco), mientras que el primordio control en 2% DMSO ya ha depositado el tercer neuromasto y está migrando al final de la prolongación del vitelo (asterisco blanco). Insets de (A) y (B) están en (A') y (B').**

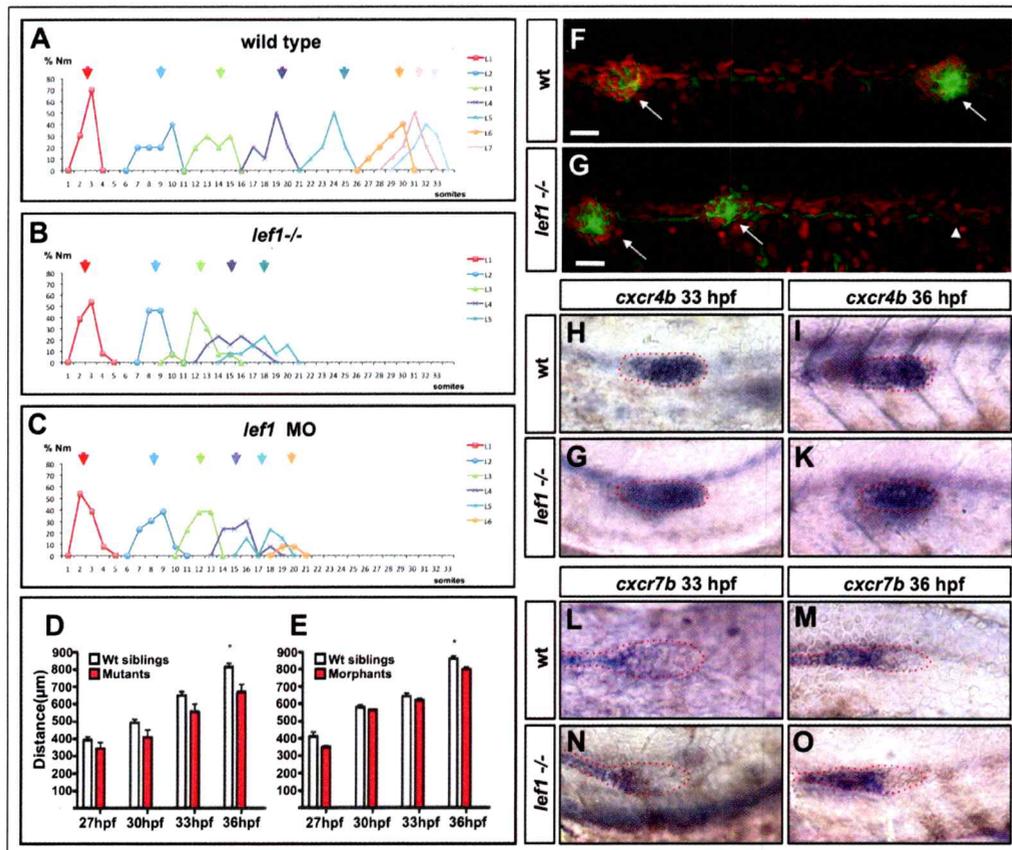
de la vía Wnt podrían estar afectados en el primordio de la línea lateral en los mutantes. Se encontró que *lef1* es requerido para la activación del transgén *tg(7xtcf:eGFP)*<sup>ia4</sup> reportero de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina en el primordio (Moro y Argenton, datos no publicados), pero no en otros tejidos que responden a Wnt. Además, la sobreactivación del transgén reportero mediante el uso del agonista de Wnt BIO desde las 24 a las 36hpf (Polychronopoulos y cols., 2004), genera un fenotipo en la línea lateral comparable al de los mutantes *apc* (Figura 29), y es suprimido al hacer una pérdida de función de *lef1* (Figura 27 G-J). Por lo tanto es probable que toda la activación del transgénico reportero dirigida por Wnt/ $\beta$ -catenina en el primordio dependa de la función de *lef1* y de esta manera *lef1* tiene un rol fundamental en mediar la vía Wnt/ $\beta$ -catenina en este tejido.

Estos resultados muestran que el fenotipo de la mutación A35-F es debido a una pérdida de función de *lef1* y que este factor de transcripción es un efector crítico de la vía Wnt canónica durante el desarrollo de la línea lateral posterior.

#### **5.3.2.3.2. Caracterización fenotípica detallada de la mutación en *lef1***

##### **5.3.2.3.2.1. *Patterning* del primordio, capacidad migratoria, morfogénesis de los neuromastos, y diferenciación no son afectados en los mutantes de *lef1*.**

Para investigar la naturaleza del defecto en la línea lateral posterior en los mutantes *lef1*, estudiamos la posición de los neuromastos respecto al número de somitos en peces silvestres, mutantes para *lef1* y morfantes para el mismo. (Figura 30A-C). Los primeros 3 neuromastos (L1-L3) siempre están presentes en la condición de pérdida de función para *lef1*, pero L4 y L5 están presentes sólo en 92% y 76% de los casos, respectivamente (n=15), y estos neuromastos más caudales son depositados a intervalos de espacio progresivamente más cortos en comparación a los animales silvestres (Figura 30 A-C) La progresiva cercanía de los neuromastos en los mutantes de *lef1* sugiere que habría un incremento en la tasa de depósito o que el primordio podría disminuir su velocidad durante la migración. Para resolver esto, se midió la distancia recorrida por el primordio a diferentes tiempos en relación a la vesícula óptica. La posición del primordio no muestra diferencias significativas

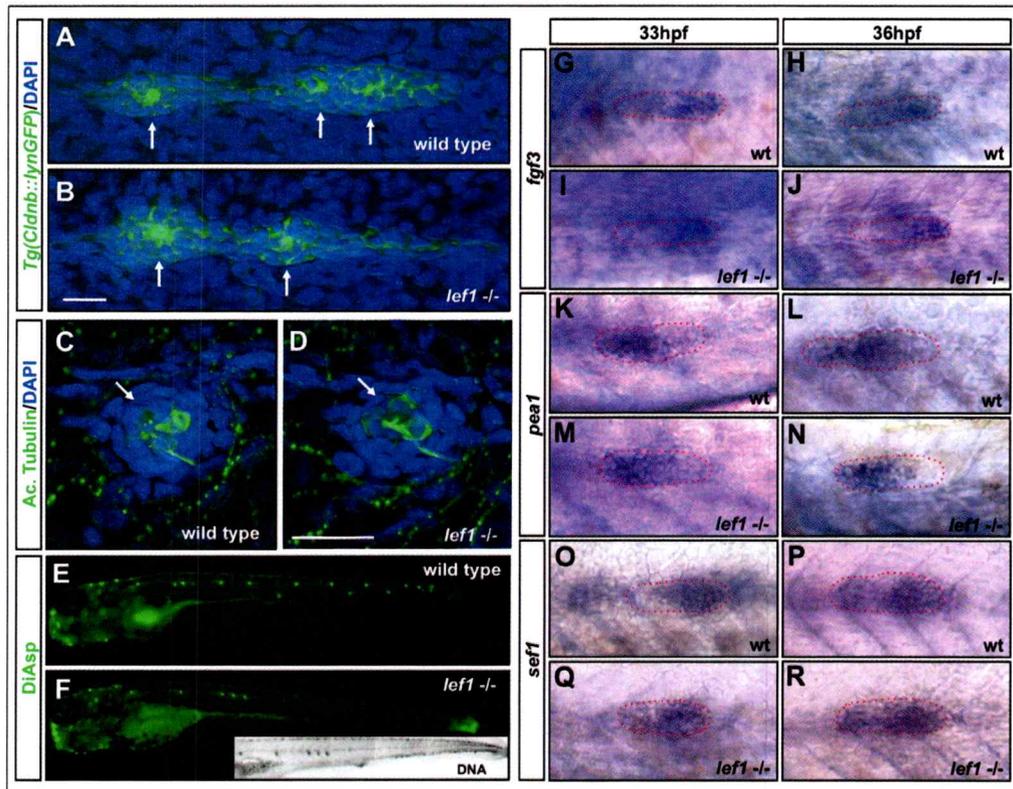


**Figura 30.** El *patterning* de los neuromastos, pero no la capacidad migratoria del primordio y la expresión polarizada de receptores de quimioquina están afectados en la pérdida de función de *lef1*. (A-C) Histogramas mostrando la posición/número de neuromastos en controles (A) mutantes *lef1*(B) y morfantes para *lef1* (C), a los 3dpf. Las flechas marcan la posición promedio de los neuromastos y los colores denotan las diferentes poblaciones secuencialmente depositadas. (D-E) Gráfico de la distancia en micrómetros en mutantes *lef1*(D) y morfantes (E) entre el límite caudal de la vesícula óptica y el borde líder del primordio de la línea lateral posterior a 27, 30, 33 y 36 hpf (n=7 mutantes/morfantes y n=15 embriones silvestres en ambos casos). La única diferencia significativa es observada a 36 hpf (p<0.01). (F-G) Células GFP positivas de la línea *Tg(cldnb:lynGFP)<sup>zf106</sup>* se extienden más allá del último neuromasto depositado en los mutantes *lef1* a las 55hpf (cabeza de flecha). Las flechas indican los neuromastos L4 y L5. Los núcleos fueron contrateñidos con yoduro de propidio. La barra de escala representa 20 μm. (H-O) La expresión de *cxcr4b* (H-K) y *cxcr7b* (L-O) en embriones silvestres (H,I,L,M) y mutantes *lef1*(J,K,N,O) a 33 y 36hpf. En los mutantes no hay un cambio evidente en el patrón.

entre silvestres y mutantes o morfantes a las 27, 30, y 33 hpf, y sólo a las 36hpf se ve una modesta, pero significativa diferencia en la posición relativa (Figura 30D, E). Este punto corresponde al tiempo en el cual el último neuromasto está siendo depositado en los mutantes o morfantes. De esto se desprende que el primordio mutante es capaz de migrar a una velocidad normal y no muestra tendencia a desacelerar hasta el depósito del neuromasto final. Como no vimos cambios en la velocidad del primordio, el progresivo acercamiento de los neuromastos finales sugiere que la tasa de depósito de los proneuromastos está acelerada en los mutantes *lef1* (Figura 30F-G).

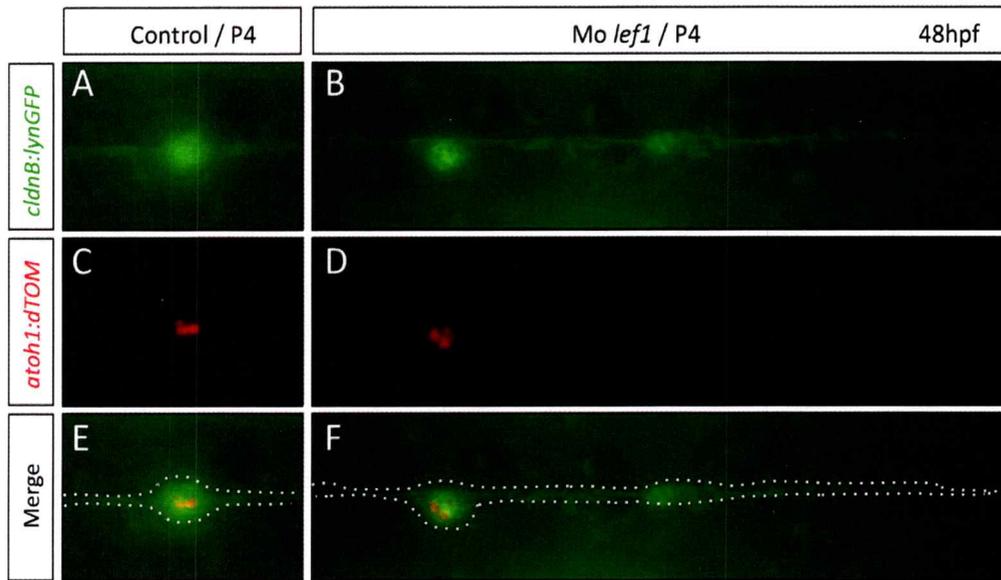
En la literatura se ha reportado que la vía Wnt/ $\beta$ -catenina restringe la expresión de los receptores de quimioquinas *cxcr4b* y *cxcr7b* a las regiones líder y posterior del primordio, respectivamente, y este sistema controla la migración dirigida de esta estructura (Aman y Piotrowski, 2008). Sin embargo la expresión espacialmente restringida de *cxcr4b* y *cxcr7b* es normal en los mutantes *lef1* (Figura 30H-O), lo que es consistente con el hecho de que no se observa una reducción en la capacidad migratoria del primordio en los mutantes.

Aman y Piotrowski (2008) sugieren que la vía Wnt/ $\beta$ -catenina regula la formación de proneuromastos a través de una modulación de la señal FGF, la cual es requerida para la organización de las rosetas y para la diferenciación de los tipos celulares en los neuromastos (Lecaudey y cols., 2008; Nechiporuk y Raible, 2008). Sin embargo la expresión de *fgf3*, *pea3* y *sef1*, que son componentes de la vía FGF y que se expresan en la línea lateral en desarrollo muestran un patrón normal en los mutantes *lef1* (Figura 31G-R). Esto sugiere que *lef1* no es responsable por la inducción, mantención o supresión de la señal



**Figura 31. Organización del primordio, morfología de los neuromastos y la diferenciación de éstos no están afectados en la condición de pérdida de función de *lef1*.** (A-B) Primordio silvestre y mutante en el fondo *Tg(cldnb::lynGFP)*<sup>zfl106</sup> a 38hpf. GFP de membrana revela la polarización de las células y su organización en rosetas (flechas). (C-D) El último neuromasto depositado en un embrión mutante *lef1/sin<sup>fu767</sup>* (D) y uno silvestre (C), inmunomarcado para tubulina acetilada, evidencia una normalidad en las células ciliadas (verde). Los núcleos fueron contrateñidos con DAPI. La barra de escala representa 20  $\mu$ m. (E-F) Tinción vital con DiAsp en larvas silvestres (E) y mutantes *lef1/sin<sup>fu767</sup>*, a los 3dpf. Inset en (F) muestra que no hay mas neuromastos que aquellos teñidos con Diasp en los mutantes. (G-R) Expresión de *fgf3* (G-J), *pea1* (K-N) y *sef1* (O-R) en embriones silvestres (G,H,K,L,O,P) y mutantes *lef1/sin<sup>fu767</sup>* (I,J,M,N,Q,R).

FGF. En apoyo de esta idea, la polaridad apical/basal y la morfología de las rosetas parece no estar afectada en los mutantes (Figura 31A, B); más aun, la expresión de *atona1a*, un gen transcrito en las células destinadas a ser células ciliadas (Itoh y Chitnis, 2001), es también normal en los mutantes visualizado



**Figura 32. La pérdida de función de *lef1* no afecta la neurogénesis mediada por *atoh1a*.** Se inyectó un morfolino contra *lef1* en embriones provenientes de un cruce de *tg(atoh1a:dTOM)* y *tg(cldnB:lynGFP)*. A pesar de que el fenotipo del morfante es evidente en (B,D,F) no hay diferencia en la expresión de dTOM en comparación al control (A,C,E). El Neuromasto visualizado en control y morfante es el cuarto de la línea lateral posterior, a las 48 hpf.

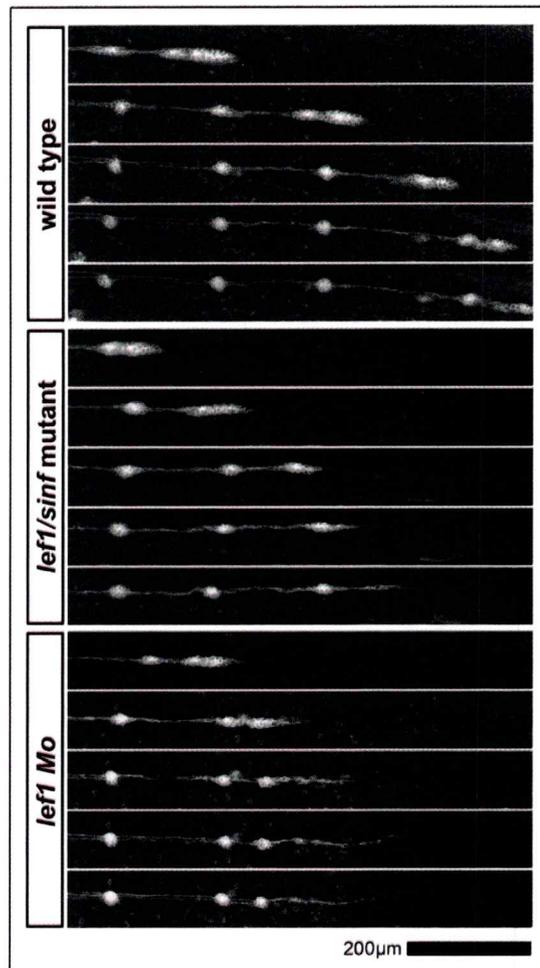
con el uso de la línea *tg(atoh1a:dTOM)* (Figura 32). De la misma forma, inmunohistoquímica para detectar tubulina acetilada y tinción vital con Diasp muestran que las células ciliadas de la línea lateral se diferencian normalmente y son funcionales (Figura 31C-F). Esto sugiere que la vía Wnt mediada por *lef1* no altera la neurogénesis mediada por *atoh1a*.

En resumen, los datos muestran que la vía Wnt mediada por *lef1* no tiene ninguna injerencia sobre la migración del primordio, formación y/o morfología de los neuromastos, o diferenciación de las células ciliadas. Por lo tanto, la falla en el depósito de los neuromastos más caudales en los mutantes de *lef1* se debe a otro tipo de deficiencia en el primordio de la línea lateral.

#### 5.3.2.3.2.2. El primordio de los mutantes *lef1* colapsa debido a una proliferación disminuida y un agotamiento de las células de la zona líder

Para investigar el origen del comportamiento defectuoso del primordio de la línea lateral posterior, se analizó los mutantes y morfantes en el fondo genético *tg(cldnb:lynGFP)<sup>zf106</sup>* que marca con GFP las membranas de todas las células del primordio y neuromastos así como también de las células interneuromásticas (Haas y Gilmour, 2006). En los mutantes, la migración del primordio no es evidentemente afectada hasta después de las 36hpf cuando colapsa y deposita uno o dos neuromastos en una rápida sucesión (Figura 30F,G y Figura 23). Luego de ello, un pequeño número de células que no fueron incorporadas en los proneuromastos continúan migrando caudalmente para formar una delgada línea de células que cubre entre 100 y 200 $\mu$ m (Figura 21F,G y Figura 33). Por lo tanto, la carencia de los neuromastos más caudales no es debido a un defecto en la migración sino que a que el primordio agota sus células luego del prematuro depósito del neuromasto terminal.

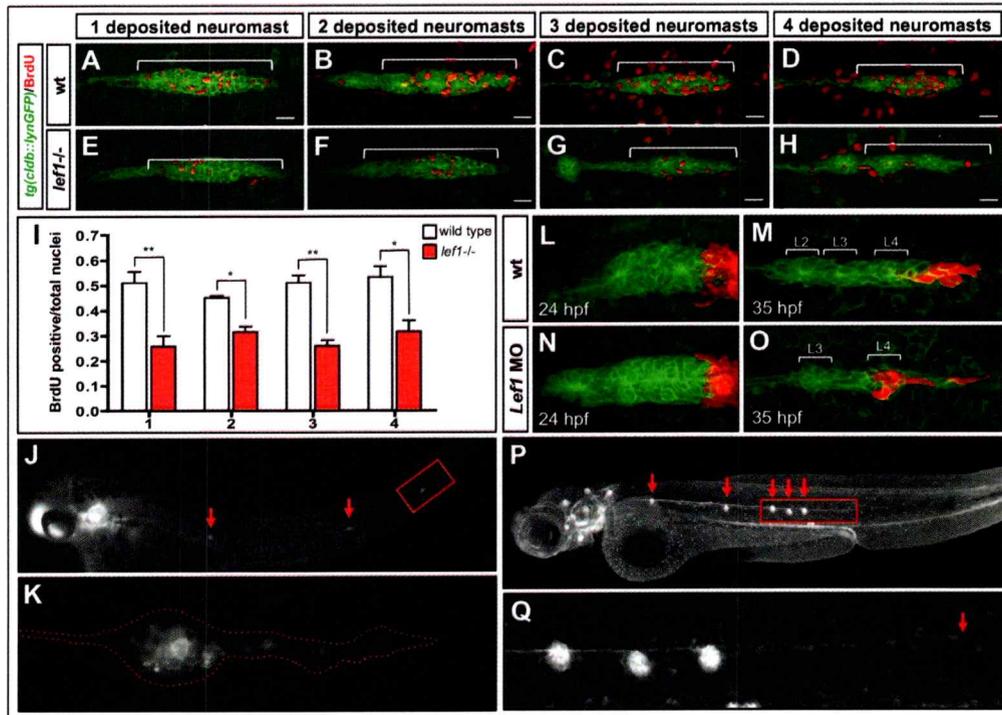
La tasa de proliferación en la zona líder del primordio de la LLP duplica la de la región trasera de esta estructura (Laguerre y cols., 2005, Laguerre y cols., 2009), y, como *lef1* se expresa en la región líder, se decidió explorar si la vía Wnt/ $\beta$ -catenina mediada por este efector transcripcional regula proliferación celular. Los mutantes *lef1* evidencian una reducción en el número de células proliferativas marcadas con BrdU en el primordio a todos los tiempos testeados (Figura 34 A-I). Al analizar los porcentajes de núcleos BrdU positivos



**Figura 33 Análisis de la migración del primordio en embriones de la línea *Tg(cldnB:lynGFP)* por microscopia confocal de tiempo interrumpido.** Los cuadros fueron tomado de películas de embriones silvestres (panel de arriba), Mutantes *lef1sinf<sup>f1767</sup>* (panel del medio) y morfantes para *lef1* (panel de abajo). Los cuadros fueron tomado a intervalos de 2 horas.

en relación a los núcleos totales del primordio, los mutantes mostraron un promedio de  $57.4\% \pm 9.2$  respecto al promedio de núcleos BrdU positivos en los animales silvestres. Cuando se toma en cuenta solo la zona líder del primordio (donde se expresa *lef1*), los mutantes tienen solo un  $40.5\% \pm 4.1$  de los núcleos

BrdU positivos de los silvestres, mientras que no hay diferencias significativas en la tasa proliferativa en la región trasera del primordio. Estos resultados



**Figura 34.** El primordio de la línea lateral posterior en los mutantes *lef1/sinf<sup>u767</sup>* colapsa debido a una disminución en la tasa proliferativa y un agotamiento de las células del borde líder. (A-H) Análisis de proliferación en embriones *Tg(cldnB:lynGFP)<sup>zf106</sup>* silvestres (A-D) y mutantes *lef1/sinf<sup>u767</sup>* (E-H). Después del pulso de BrdU, los embriones fueron fijados después del depósito de los neuromastos L1 (A,E), L2 (B,F), L3(C,G), y L4 (D,H). (I) Gráfico de barra para la razón de núcleos BrdU positivos/Núcleos totales del primordio en embriones silvestres (barras blancas) y mutantes *lef1/sinf<sup>u767</sup>* (barras rojas), después del depósito de 1 a 4 neuromastos. Las células totales fueron contadas después de contrateñir los núcleos con DAPI (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ). (J-K). Embrión silvestre *Tg(cldnB:lynGFP)<sup>zf106</sup>* tratado con afidicolina/hidroxiurea muestra 3-4 neuromastos ampliamente espaciados y una fila de células que se extiende caudalmente (inset K). (L-O) Células del borde líder con fotoconversión de Kaede a las 24hpf en embriones silvestres (L) morfantes para *lef1* (N), y analizadas a las 35hpf (M,O). (P-Q) Eliminación de las células del borde líder a las 24hpf lleva a un fenotipo similar al de los mutantes *lef1/sinf<sup>u767</sup>* con 20%, 33% y 46,6% de las larvas mostrando 3, 5, y 7 neuromastos, respectivamente, a las 52 hpf (n=15). (Q) Inset de (P) con la flecha roja mostrando las células que quedan y se mueven posteriormente.

sugieren que el fenotipo de los mutantes *lef1* es una consecuencia de una proliferación disminuida en la región líder del primordio en migración, con la consecuente falla en la renovación de las células en esa zona y el eventual colapso del primordio. Para testear esta hipótesis de una manera alternativa, se trató embriones *tg(cldnb:lynGFP)* silvestres desde las 24 a 48hpf con una mezcla de afidicolina e hidroxurea, que son inhibidores del ciclo celular, bloqueando la fase S (Bonner et al., 2008). En embriones tratados, el primordio migra, deposita unos pocos neuromastos, no alcanza la punta de la cola y muestra unas pocas células migrando caudalmente más allá del último neuromasto (Figura 34J-K). Aunque esas características evidencian una fenocopia la mutación en *lef1*, los pocos neuromastos depositados en los embriones tratados con las drogas están mas espaciados que en los animales silvestres y más distanciados que en los mutantes *lef1* (ver discusión).

#### **5.3.2.3.2.3. Un progresivo agotamiento de las células que expresan *lef1* en el borde líder del primordio lleva a un colapso del primordio de la LLP.**

La región líder del primordio es una fuente de progenitores que contribuye con células a la región trasera (Nechiporuk y Raible, 2008), ayudando a mantener un estado de equilibrio en el primordio para compensar aquellas células que se pierden cada vez que un proneuromasto es depositado. Como en los mutantes *lef1* la proliferación en la región líder esta disminuida, esto podría afectar la capacidad de las células para moverse desde esa zona a la región trasera del primordio. Para probar si *lef1* influencia ese movimiento, se

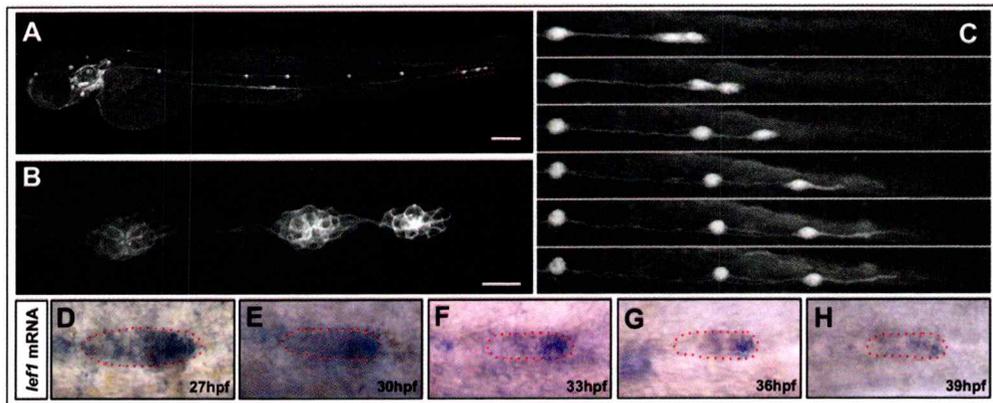
realizó una fotoconversión de células que expresan Kaede en la porción más distal de la región líder en embriones silvestres de 24hpf y en morfantes para *lef1*. Once horas después, se observó que células marcadas contribuyeron a proneuromastos en 9 de 10 morfantes para *lef1*, al igual que en los embriones silvestres (Figura 34 L-O). Por lo tanto en una condición de pérdida de función para *lef1*, las células de la zona líder mantienen su capacidad de moverse hacia la región trasera del primordio, lo que, en conjunto con la proliferación reducida, genera un agotamiento de las células en la región anterior.

Para testear la idea de que el agotamiento de las células de la región líder subyace a los defectos en el primordio de los mutantes, se eliminó con un láser las células putativas que expresan *lef1* en el primordio de embriones *tg(cldnb:lynGFP)* silvestres a las 24hpf y se siguió el comportamiento de esta estructura. Los primordios ablacionados depositan un promedio de  $5.2 \pm 1.8$  neuromastos antes de colapsar, tal como sucede en los mutantes *lef1*. Los neuromastos terminales de los primordios ablacionados muestran una tendencia a estar cada vez más cerca entre sí y se observan unas pocas células extendiéndose caudalmente, de nuevo, como los mutantes *lef1* (Figura 34 P, Q).

En conjunto, estos datos sugieren que *lef1* regula la proliferación en la región líder del primordio, y que la continua producción de células en este nicho es requerida para la homeostasis y organización del primordio durante su migración y morfogénesis.

#### **3.2.3.2.4. El colapso del primordio en los mutantes de *lef1* es análogo al proceso por el cual el primordio silvestre termina su migración.**

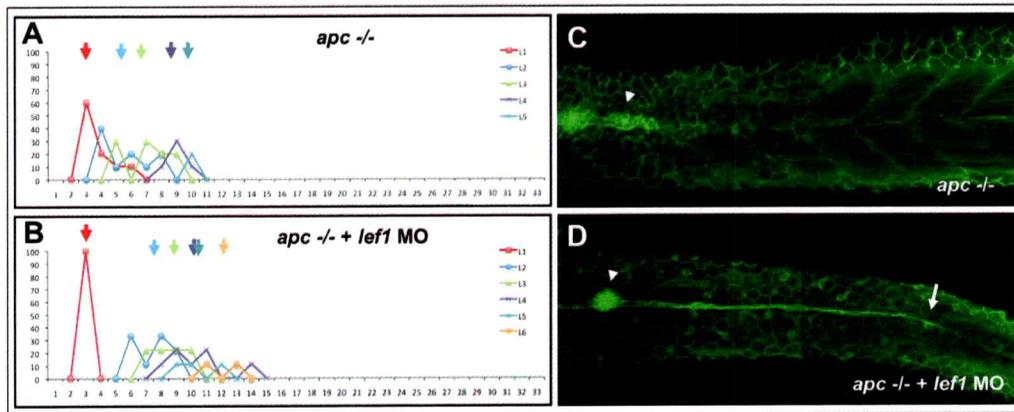
El primordio de la LLP termina su migración en la punta de la cola (Kimmel y cols., 1995) donde deposita 2-3 neuromastos terminales muy cerca entre sí (Figura 35A, B). Mediante microscopía confocal usando la línea *tg(cldnb:lynGFP)<sup>zf106</sup>*, hemos podido observar que a medida que el primordio alcanza la punta de la cola, el primordio se fragmenta y simultáneamente forma los neuromastos terminales con unas pocas células dispersándose posteriormente (Figura 35C). El comportamiento del primordio silvestre en la punta de la cola, recapitula lo que sucede en el primordio más hacia anterior en los mutante de *lef1*. De esta manera, el primordio de los mutantes podría estar cayendo prematuramente en un evento morfogenético que normalmente ocurre al final de su migración. Si esto es cierto, entonces el depósito de los neuromastos terminales en los embriones silvestres debería ir acompañado por una disminución en la expresión de *lef1* y una proliferación reducida. En apoyo de esta idea, está descrito que el primordio gradualmente disminuye su tamaño a medida que se mueve caudalmente (Kimmel y cols., 1995). Nosotros hemos encontrado que esto está asociado con una reducción en la razón de células BrdU positivas en la región líder. Finalmente, la transcripción de *lef1* en esta zona disminuye progresivamente hasta niveles casi indetectables a medida que el primordio se acerca a la cola (Figura 35D-H). Estos resultados muestran que a medida que el primordio silvestre alcanza la punta de la cola, la expresión de *lef1* y por lo tanto la señal Wnt dependiente de *lef1* se reduce, la proliferación disminuye y el primordio se fragmenta en 2 o 3 neuromastos terminales.



**Figura 35. Formación de los neuromastos terminales en el primordio de la línea lateral posterior en larvas silvestres, y patrón temporal de expresión de *lef1*.** (A) Vista lateral de una larva de 72 hpf. (B) Inset de los últimos 3 neuromastos del panel (A). (C) Cuadros de una película que comienza en la formación de los últimos 2 neuromastos de la línea lateral posterior. (D-H) Expresión de *lef1* a 27, 30, 33, 36, y 39 hpf.

#### 5.3.2.3.2.5. La pérdida de función de *lef1* rescata parcialmente los defectos del primordio en los mutantes *apc*<sup>CA50a</sup>

Del análisis de los mutantes *apc* y de experimentos de sobreexpresión de componentes de la vía Wnt, se ha propuesto que la señal Wnt/ $\beta$ -catenina afecta diversos aspectos del desarrollo de la línea lateral posterior, incluyendo la polarización y la capacidad migratoria (Aman y Piotrowski, 2008). Estos datos contrastan con nuestra observación del rol específico que tiene *lef1* en sostener el *pool* de células progenitoras que alimentan el primordio a medida que éste migra, y en la morfogénesis de esta estructura. Es posible que la vía Wnt afecte diferentes procesos en el primordio de la línea lateral a través de distintos factores Lef/Tcf, y que la sobreactivación de la vía lleve a observar fenotipos no relacionados al normal requerimiento de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina, y/o que genes como *apc* puedan tener efectos sobre vías distintas a Wnt/ $\beta$ -catenina (Kroboth



**Figura 36. Lef1 es epistático a Apc en el control el comportamiento de las células de la zona líder del primordio.** (A-B) Histograma mostrando el número/posición de los neuromastos en embriones mutantes *apc*<sup>ca50a</sup> (A) y *apc*<sup>ca50a</sup>/morfantes para *lef1* (B). Las flechas indican la posición promedio de los neuromastos y los colores denotan las diferentes poblaciones de neuromastos secuencialmente depositados. (C-D) Embriones *Tg(cldnB:lynGFP)*<sup>zf106</sup> *apc*<sup>ca50a</sup> (C), y *apc*<sup>ca50a</sup>/morfantes para *lef1* (D) que muestra una fila de células migrando caudalmente después que el primordio se ha detenido (flechas).

y cols, 2007). Para comenzar a explorar esas posibilidades, se investigó si *lef1* podría estar mediando los diversos defectos del primordio de la línea lateral posterior observados en los mutantes *apc*.

La pérdida de función de *apc* lleva a una sobreactivación de la vía Wnt a través de un incremento en la actividad nuclear de  $\beta$ -catenina funcionando en conjunto con factores de transcripción del tipo *lef/Tcf* (Paridaen y cols., 2009).

Adicionalmente, la pérdida de *apc* lleva a una sobreactivación transcripcional de *lef1* (Aman y Piotrowski, 2008), que refuerza la función de la vía en todo el primordio. Los mutantes *apc* muestran defectos en la polarización del primordio y un arresto de la migración, potencialmente debida a la expresión anormal de *cxcr4b* y *cxcr7b* (Aman y Piotrowski, 2008).

La pérdida de función de *lef1* no rescata totalmente el defecto de migración en el primordio de los mutantes *apc*. Sin embargo, la capacidad migratoria del primordio mejora y hay un espaciamiento ligeramente mayor en los neuromastos más rostrales (Figura 36A, B). Además, se observó la aparición de una fila de células del primordio extendidas caudalmente en los mutantes *apc* inyectados con el morfolino contra *lef1*, similar a lo que ocurre en la pérdida de función de *lef1* en un fondo silvestre (Figura 36C, D). Sin embargo, el *patterning* defectuoso del primordio de la línea lateral posterior en los mutantes *apc* no se restaura con la eliminación de *lef1* y concomitantemente no hay una restauración de la expresión polarizada de genes de la vía FGF. De esta manera, la exacerbación de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina mediada por *lef1* sólo contribuye en menor medida al rango de defectos del primordio de la línea lateral posterior observado en los mutantes *apc*.

## VI. DISCUSIÓN

Los eventos que se llevan a cabo durante la morfogénesis son cruciales para el desarrollo embrionario. Con ellos las células deben ordenarse en geometrías tridimensionales y disposiciones precisas para una correcta diferenciación y función. Aunque esto es un proceso fascinante, al mismo tiempo es complejo y no completamente entendido, y por lo mismo es necesario conocer las bases genéticas de comportamientos celulares básicos como migración, proliferación y diferenciación para tener una visión mecanística del proceso (Holley, 2007)

En esta tesis se apuntó a la identificación de genes necesarios en los procesos que dan cuenta del desarrollo de la línea lateral del pez cebra. Este sistema es excepcionalmente accesible a la manipulación experimental, lo que junto a las cualidades genéticas y técnicas moleculares poderosas de este organismo, lo convierten en un modelo muy atractivo para tener pistas sobre el control genético de los eventos que dan cuenta de la morfogénesis en vertebrados (Dambly-Chaudiere y cols., 2003).

Es posible predecir que mediante una combinación de datos sobre expresión de genes, la relación entre ellos, y su función sería posible construir modelos que permitan explicar el desarrollo de este sistema en el pez cebra. Al respecto, en un trabajo reciente de nuestro laboratorio se desarrolló una aproximación robusta para analizar globalmente los perfiles de expresión tejido específica en la línea lateral y se identificó un repertorio de genes expresados en el primordio en migración y neuromastos diferenciados (Gallardo y cols., 2010).

El paso siguiente que debería llevarse a cabo es un análisis de relaciones entre algunos de estos genes. Ello se puede lograr tomando puntos de regulación conocidos donde confluyen varios procesos, como por ejemplo la diferenciación de las células ciliadas. Finalmente es necesario hacer una evaluación funcional de genes en este sistema, para lo cual existen metodologías como el uso de morfolidos o mutantes. Este tipo de aproximaciones multifactoriales permitirían describir los fenómenos que conducen la morfogénesis en la línea lateral y cómo ellos se interconectan para llevar esta tarea a cabo.

Otro estudio reciente enfatiza la importancia de entender la interconexión de diferentes sistemas de señalización dentro la línea lateral en desarrollo, estableciendo un rol fundamental para *atonal1a* en la morfogénesis del primordio (Matsuda y Chitnis, 2010). Este trabajo ilustra cómo cambios en las redes regulatorias dependientes de este gen proneural impactan en la auto organización de neuromastos, agregando información relevante a cerca de este nodo de regulación del destino y comportamiento celular. Para analizar una relación entre *atonal1a* y sus poco conocidos genes regulados, en la primera parte de esta tesis se realizó una búsqueda de secuencias de respuesta a este gen.

### **6.1 Genes blanco de *atonal1a*: monohíbrido inverso.**

*Atonal1a* es un factor de transcripción del tipo *hélice-vuelta-hélice básico* (bHLH; basic Helix-Loop-Helix), los cuales son reguladores positivos críticos de la diferenciación neuronal en una gran variedad de especies y son requeridos

para una diferenciación apropiada de varios subtipos de neuronas (Bertrand y cols., 2002). Aunque los factores bHLH poseen algunas funciones únicas durante el desarrollo neural, ellos comparten la capacidad de regular la diferenciación neuronal probablemente regulando grupos de genes que se sobrelapan (Logan y cols., 2005).

Mediante el ensayo de monohíbrido inverso, nosotros fuimos capaces de aislar varias secuencias putativas de respuesta a *atonal1a*, las cuales fueron mapeadas en la vecindad de secuencias codificantes. Las proteínas de la familia *Atonal* se unen a secuencias regulatorias denominadas cajas E, que son compuestas de 6 nucleótidos cuya estructura básica es CANNTG, donde los 2 centrales son variantes y específicas para cada proteína. Nuestros resultados indican que entre las 115 secuencias únicas mapeables obtenidas en el ensayo, existe un enriquecimiento en la presencia de cajas E, variando desde 1 caja, hasta 16 de ellas (FIGURA 10C). Esto sugiere que existe un reconocimiento de las secuencias de unión por parte de *atonal1a* en un contexto de expresión heterólogo, y por lo tanto podrían ser sitios de unión reales para esta proteína. La región comprendida fueron 15 kilobases corriente arriba y corriente abajo del inicio y termino de la transcripción, respectivamente. Esta zona fue escogida porque trabajos previos a través de un análisis de búsqueda genómica de cajas E en respuesta a genes proneurales en el desarrollo cerebelar, han mostrado que existe un agrupamiento de estas cajas en una vecindad de 10 kilobases corriente arriba y corriente abajo de genes putativamente regulados (Krizhanovski y cols., 2006).

De entre los genes cercanos a las secuencias aisladas con el monohíbrido inverso, se seleccionó aquellos en lo que podría haber alguna relación directa con neurogénesis o fisiología neuronal, en base a datos presentes en la literatura. Así, con esta metodología en levaduras se pudo aislar putativas secuencias de respuesta para *atona1a* (Tabla5), en genes cuya función es conocida en el desarrollo del oído en vertebrados como *sine oculis binding protein* (*Sobp*), *single strand DNA binding protein 3* (*Ssbp3*), y *Bone morphogenetic protein 1* (*Bmp1*). Además otro grupo de genes podrían ser efectores de *atona1* en el cerebro posterior, como *Lim homeobox 9* (*lhx9*) y *Neurotrophic tyrosine kinase receptor type 2* (*Ntrk2*), pues se ha sugerido regulación por parte de *atona1* sobre ellos, pero una relación directa no ha sido demostrada (Saba y cols., 2005). Finalmente un tercer grupo de genes que de acuerdo a su patrón de expresión o función durante el desarrollo neural, podrían ser regulados por *atona1*; este es el caso de *frizzled10*, que se expresa en los dominios de *atona1a* en el sistema nervioso central ([www.zfin.org](http://www.zfin.org)); un canal de potasio dependiente de voltaje (*Kcng3*); un regulador de la exocitosis de membrana sináptica (*Rims4*); y *dynein Light Chain 4* (*Dlc4*). Este último gen es particularmente interesante puesto que existen mutantes de pez cebra con mutaciones en este tipo de motores moleculares que revelan fenotipos en las células ciliadas del oído y la línea lateral, así como también en el ojo en desarrollo, un punto importante que será discutido más adelante (Jing y Malicki, 2009).

Hasta este punto no es posible saber si esas putativas regiones tienen un relevancia biológica, aunque la participación de los genes ubicados en las

vecindades de esas regiones y la presencia de cajas E en ellas, sugieren una posible función para ellas. Por ello al clonar esas secuencias en un vector reportero pudimos evaluar su capacidad *enhancer*.

Encontramos que algunas de las putativas regiones regulatorias obtenidas del ensayo de levaduras, son capaces de dirigir la expresión del reportero en dominios específicos, sin embargo no encontramos que correspondieran a los dominios conocidos de expresión de *atonal1*. Eso sí, son capaces de dirigir la expresión en dominios neurales. Es claro que el ensayo con las levaduras es un experimento fuera de un contexto biológico normal, y esto podría liberar a *atonal1* de restricciones contexto dependiente, haciendo que la unión a las regiones que contienen cajas E sea más permisiva. Además hubo otras regiones que no dirigieron la expresión del reportero en territorios específicos y por lo tanto no se mostraron en esta tesis.

Existe un grado de especificidad en la interacción proneural-DNA que viene dado por la presencia de cofactores tejido específicos, ya que los motivos reconocidos por los proneurales son secuencias pequeñas que pueden estar miles de veces repetidas en el genoma. Esta falta de sensibilidad generaría que *atonal1* en la levadura se uniera a un número mayor de sitios a los que normalmente debe, y por lo tanto el universo de putativas secuencias reguladas se amplía diluyendo los verdaderos blancos. La expresión de GFP dirigida en el nervio de la línea lateral por la región regulatoria de *Dynein Light chain 4*, o en el ojo por la región intrónica de *lhx9*, sugiere que estas regiones son relevantes en un contexto biológico donde existe la expresión de otros genes proneurales como *Neurogenina* o *NeuroD* en el primer caso, y *atonal5* en el segundo. La

presencia de un enriquecimiento de cajas E en las secuencias obtenida, sugiere que se obtuvo algunas regiones regulatorias reales, pero que podrían estar siendo seleccionadas en un contexto del pez cebra para responder a la unión de otros genes proneurales. Dado el pequeño tamaño de las cajas E, esto permite predecir que la especificidad en la regulación de la expresión de blancos de genes proneurales, en un contexto normal depende de más factores que la sola unión a estas secuencias, y por lo tanto este ensayo de levaduras no es útil para encontrar interacciones específicas de *atonal* con sus cajas E. Sin embargo dado que no realizamos una secuenciación a saturación no podemos descartar que en un esfuerzo mayor pudiésemos encontrar un blanco real o control positivo, aunque dado la cantidad de uniones posibles a secuencias que no son sitios de unión con relevancia biológica, la eficiencia sería muy baja.

Este es el primer experimento de este tipo que se ha hecho para buscar blancos transcripcionales de *atonal1*. Sería interesante poder hacer mutagénesis sitio dirigida en las regiones genómicas que son capaces de dirigir expresión de GFP en dominios específicos y demostrar que la eliminación de la secuencia intacta de la o las cajas E elimina o modifica su capacidad de regular *in cis*. De la misma forma se podría analizar la pérdida de función de *atoh1a*, *neuroD*, *atoh5*, o *neurogenina* y su efecto sobre la expresión de los reporteros. Esto afirmaría o descartaría la regulación por parte de otros proneurales

Queda demostrado que es imperativo poder hacer experimentos como ChIP-Seq con un buen anticuerpo contra *atonal1*, para poder determinar en un contexto real cuáles son los verdaderos blancos de este gen. Sin embargo, no podemos descartar que alguna región obtenida en nuestra búsqueda de

levaduras sí corresponda a un verdadero blanco de *atonal1*. Por ejemplo, la región que dirige GFP en el nervio de la línea lateral. Puede ser que en el momento de la segregación de la placoda y el primordio de la línea lateral haya expresión de bajos niveles de *atonal1a* en esa zona y que la expresión de GFP se mantenga durante el desarrollo y extensión del nervio. Esto quedará demostrado al establecer la línea transgénica con ese plásmido e inyectar un morfolino contra *atonal1a*.

## **6.2 Genes blanco de *atonal1a*: Vista enhancer Browser.**

Mediante el uso de este recurso de libre acceso pudimos identificar cajas E conservadas en la vecindad de algunos genes diana putativos de *atonal1*. Esto fue primeramente porque en el ensayo de monohíbrido inverso no obtuvimos algunos genes esperados de acuerdo a la literatura. Seleccionamos algunos candidatos y encontramos cajas conservadas para los genes de la Tabla 6.

De todos los 6 candidatos a ser regulados, se encontró que 2 regiones conservadas en la vecindad de *atonal1a* y una en el gen *cut11* eran capaces de dirigir la expresión del plásmidos reporteros en territorios con relevancia biológica respecto a la función de *atonal1*. La región de *cut11* es capaz de dirigir la expresión en el cerebelo del embrión de pez cebra (Figura 14D). Por otra parte, una región con cajas E conservadas que podría regular a *gfi1*, no dirige la expresión en territorios donde podría ser regulado por *atonal1*, ya que si bien es cierto presenta un patrón reproducible (Figura 14E) desconocemos qué tipo de estructura anatómica es la que está marcada. Sin embargo, a pesar de ello,

encontramos que 2 parálogos de *gfi1* tienen una función en la línea lateral, lo que será discutido más adelante en el texto. Las otras regiones de los genes que están en la Tabla 6 no evidenciaron ningún patrón reproducible (no se muestra).

Encontramos 2 regiones en la vecindad de *atonal1a* que son capaces de regular la expresión de un reportero. Una región que está a 5 kilobases corriente abajo respecto a este gen, es capaz de dirigir la expresión de GFP en la región olfatoria del embrión al primer día de desarrollo (Figura 14C,C'), similar a lo que se ha visto en el transgénico de *atonal1* en ratón, donde también se expresa en esa región en estadio tempranos (Lumpkin y cols., 2003). Interesantemente hemos visto que esa expresión es transitoria y desaparece al segundo día de desarrollo. Este es concordante con la expresión de una proteína fluorescente roja en la línea *tg(atoh1a:dTOM)*, para la cual hemos visto que se enciende para especificar el destino a célula ciliada en la línea lateral, pero que luego baja su expresión para una suerte de "relevo" a otro programa genético. Esto será discutido en la siguiente sección. Por lo tanto parece que la misma situación, dependiente de ese *enhancer* ubicado a 5 kilobases de distancia, sucede para especificar las células del epitelio olfatorio (Lumpkin y cols, 2003).

La otra secuencia con Caja E conservada, es una pequeña región genómica de 26 pares de bases, pero que es completamente conservada desde mamíferos a peces. Justo en medio tiene una Caja E que sería una caja de unión a *atonal1* (Figura 13E). Clonamos esa región en el plásmido reportero en un tándem de 6 repeticiones y encontramos que recapitula el patrón completo de *atonal1a* en el embrión de pez cebra (Figura 13F-K). Esto sugiere que esta

región es importante para la autorregulación de *atonal1a*. De acuerdo con esto, cuando otros autores intentaron hacer el transgénico de ratón y hacían deleciones de distintas regiones cercanas a *atonal1*, al eliminar una región que contenía estas 26 pares de bases la expresión de un reportero bajaba dramáticamente (Helms y cols, 2000). Sin duda esta región es importante para la autorregulación de la expresión de este proneural, una característica conservada desde *atonal* en *Drosophila*, a *atonal1/atonal5* en vertebrados (Biesel y Fritsch, 2004). Es necesario poder establecer la línea transgénica estable para probar definitivamente que esta autorregulación está presente también en teleosteos.

### 6.3 Relación entre *atonal1a* y *gfi1* en el desarrollo de las células ciliadas

Quisimos probar si la relación presente en *Drosophila* en la cual *atonal* regula a *senseless*, el ortólogo de *gfi1* de vertebrados, sucedía en el desarrollo de las células ciliadas de la línea lateral.

Encontramos que la pérdida de función *gfi1.1* y *gfi1b*, parálogos de *gfi1* produce una fragmentación y desorganización de las células ciliadas de los neuromastos, lo que lleva a un fenotipo degenerativo, similar a lo que se ha visto en el *knock out* de ratón (Hertzano y cols, 2004), y por lo tanto no participan en la especificación de las células ciliadas sino que más bien en un proceso de mantención.

Al analizar la línea *tg(gfi1.1:GFP)*, que recapitula por completo el patrón de expresión de *gfi1.1* durante el desarrollo temprano del pez cebra,

encontramos que la expresión de GFP, en la línea lateral, se restringe específicamente a las células ciliadas diferenciadas (Figura 16), lo cual quedo demostrado al hacer una inmunotinción contra tubulina acetilada.

Al hacer un análisis del doble transgénico de *gfi1.1:GFP* y *atoh1a:dTOM*, vimos que existe una segregación temporal de la expresión de ambos transgenes (Figura 16), en la que *atoh1a* se expresaría primero para especificar las células ciliadas, luego existe un periodo de coexpresión de *atoh1a* y *gfi1.1*, para luego apagarse *atoh1a* y quedar sólo la expresión de *gfi1.1*. A pesar de que esta conclusión es basada en la expresión de los transgenes, hace sentido con un relevo funcional donde *atoh1* induce la diferenciación y luego otro *set* de genes mantiene el estado diferenciado y la sobrevivida.

La relación funcional *gfi1.1/atoh1a* en pez cebra sería similar entonces a *senseless/atoh1* en *Drosophila*. Una relación similar también podría existir entre *gfi1* y *atoh15*. La pérdida de función de este gen regulador de la diferenciación de las células retinoganglionares resulta en una reducción severa de *gfi1* en esas células (Revisado en Jafar-Nejad y Bellen, 2004). Esta observación sugiere que *gfi1* podría también ser activado por *atoh15* para asegurar una apropiada diferenciación o sobrevivida de las células retinales. Estos datos concuerdan con la idea de que *senseless/gfi1* estarían involucrados en consolidar y/o mantener los destinos celulares especificados por proteínas proneurales.

#### **6.4 Rastreo e identificación de nuevas mutaciones que afecten el desarrollo de la línea lateral en el pez cebra.**

Una de las características más atractivas del pez cebra como sistema modelo, es la capacidad de realizar rastreos de mutaciones (Driever y cols., 1996; Haffter y cols., 1996). Estas líneas mutantes seleccionadas en base a fenotipos específicos pueden ser usadas como una poderosa herramienta para disectar procesos de interés particulares. Los mutantes generados con el uso del mutágeno ENU presentan cambios puntuales de bases en el genoma, y la manera de identificar el gen mutado es mediante clonamiento posicional.

Este tipo de aproximación fue utilizada en esta tesis para aislar mutaciones que afectan diferentes eventos que conducen la morfogénesis de la línea lateral en el pez cebra. Mediante un rastreo sistemático de fenotipos en este sistema sensorial, con el uso de tinciones vitales, se aislaron 6 mutaciones diferentes (Figura 19). Estas fueron clasificadas en 3 grupos: aquellas con defectos en las células ciliadas, otras con defectos en migración, y finalmente aquellas con menos neuromastos en la línea lateral. Se discutirá sobre las primeras 2 categorías solamente debido a que no se ha realizado trabajo en aquellas líneas que poseen menos estructuras sensoriales.

#### **6.4.1 Mutación C27B: Defectos mecanotransductivos en las células ciliadas de la línea lateral.**

Esta línea fue la primera mutación aislada con defectos específicos en las células ciliadas de la línea lateral durante nuestro rastreo. Su fenotipo es una pérdida completa de incorporación de Diasp en las células ciliadas de los neuromastos, aunque la morfología de éstos no es afectada. Esto queda de manifiesto al analizar larvas mutantes mediante microscopía electrónica de barrido, donde los neuromastos poseen células ciliadas con morfología normal y cilios especificados correctamente (Figura 21). Por lo tanto se concluyó que la mutación en el producto génico C27B se debía a defectos mecanotransductivos debido a que la tinción vital Diasp se acumula en la células ciliadas ingresando directamente a través de canales mecanotransductores (Faucherre y cols., 2009). Esta conclusión además fue apoyada molecularmente, ya que al realizar el mapeo de esta mutación la lesión genómica se encontró dentro de un intervalo crítico entre 2 marcadores polimórficos en el grupo de ligamiento 13 en el genoma del pez cebra donde el único gen anotado es *cadherin23*, un componente esencial de la maquinaria mecanotransductora de las células ciliadas para el que han sido reportados 6 alelos en el pez cebra (Sollner y cols., 2004). La gran cantidad de alelos se debe a que este gen codifica para una proteína extremadamente grande que contiene 3366 aminoácidos (Sollner y cols, 2004). A pesar de que nosotros no hemos intentado identificar el cambio de base puntual en *cadherin23*, sospechamos que es una pérdida de función total de este gen , ya que la incorporación de Diasp es completamente nula.

Aunque no ha sido cuantificado, hemos visto además que el reflejo de escape está prácticamente ausente en larvas mutantes, lo que sugiere que los alelos de *cadherin23* más penetrantes como el nuestro y *sputnik* (Sollner y cols., 2004), recapitulan el fenotipo presentado en ratones deficientes para este gen, los cuales evidencian sordera y defectos vestibulares, al igual que la mutación en humanos (Bolz et al., 2001; Di Palma et al., 2001; Wilson et al., 2001).

El hecho de que la morfología de los neuromastos en los mutantes C27B sea normal y las células ciliadas presenten una especificación correcta, permite concluir que el proceso de diferenciación mediado por *atona1a* en este tipo celular ocurre de manera correcta en los mutantes y que el defecto se hace evidente al tiempo en que las células deberían volverse activas. Si la función de las células ciliadas es importante para su viabilidad, es algo que no ha sido determinado, por lo que estos mutantes pueden ser útiles para tener pistas sobre ello. Además como las células ciliadas de la línea lateral presentan una robusta capacidad regenerativa (Murakami y cols., 2003; Hernández y cols., 2006), sería interesante analizar si en este sistema la regeneración disminuye luego de distintas rondas de de eliminación de estas células cuando no existe una funcionalidad de ellas.

#### **6.4.2 Mutación C27-H: Defecto en la sobrevida de las células ciliadas de la línea lateral**

Los mutantes C27-H evidencian un patrón normal de neuromastos en etapa larval, pero tienen una robusta carencia de células ciliadas en ellos.

Un análisis mediante incorporación de Diasp muestra que los neuromastos a los 4dpf son débilmente marcados salvo por los dos primeros de la línea lateral posterior y anterior, lo que indicaría que a lo menos algunas células ciliadas se especifican normalmente en los mutantes y no sería un proceso que afecte la diferenciación de estas células (Figura 19). Sin embargo no podemos descartar que sea una mutación que afecte un paso al mismo nivel de *atona1a*, pero que no sea completamente penetrante.

Con una inspección por microscopía electrónica de barrido se ha determinado que los neuromastos mutantes poseen una morfología externa normal, aunque presentan una ausencia de los cilios que surgen desde el centro de ellos (Figura 22). Este defecto no es en la ciliogénesis de las células ciliadas, sino que se debe a una ausencia de este tipo celular, lo que se determinó con un análisis de la mutación en el fondo *tg(brn3c:mGFP)<sup>s356t</sup>* que dirige la expresión de GFP en componentes sensoriales como en las células ciliadas de los neuromastos y el oído, y las células retinoganglionares y sus proyecciones hacia el tectum (Xiao y cols., 2005). Con el uso de esta línea transgénica se pudo concluir que las células ciliadas son especificadas normalmente, pero caen en un fenómeno degenerativo (Figura 23, 24). Esto se debe a un fenómeno de muerte celular que se incrementa drásticamente entre el tercer y cuarto día de desarrollo.

Hemos realizado parte del mapeo de esta mutación, y hemos determinado que se encuentra en el grupo de ligamiento 25 flanqueado por 2 marcadores entre los cuales existen 25 genes anotados, donde no hay ninguno que haya sido previamente relacionado al desarrollo de las células ciliadas.

Estos resultados en conjunto indican que C27-H representa una nueva mutación degenerativa en el pez cebra, cuyo producto génico actúa luego de la especificación celular mediada por *atona1a*, que da cuenta de la diferenciación de las células ciliadas.

Otro fenotipo evidente en esta mutación es el tamaño reducido de los ojos y hemos observado que entre el cuarto y quinto día los ojos de los mutantes degeneran, hasta que las larvas mueren al quinto (Figura 22). Usando de nuevo el fondo *tg(brn3c:mGFP)<sup>s356t</sup>*, hemos visto que las proyecciones retinotectales están completamente truncadas en los mutantes (Figura 25). Sabemos que una oleada de muerte celular comienza en los ojos mutantes a los 3 días de desarrollo, lo que explicaría el fenotipo de la reducción del tamaño de estas estructuras observado más tarde, y la falla en la proyección al tectum. Sin embargo, aunque esto no fue analizado en esta tesis, da origen a un punto importante respecto a la relación entre los ojos y la línea lateral. Progreso reciente sobre las bases moleculares de la formación de órganos sensoriales sugiere que hay un set de factores co-utilizados que determinan el destino celular en el ojo y oído/línea lateral, en diferentes especies (Biesel y Fritsch, 2004). El ejemplo más patente incluye la tríada *atona/atona1/atona5*, que controla la diferenciación en mecanosensores y ojos en insectos, y células ciliadas y retinoganglionares en la retina (Beisel y Fritsch, 2004). Esto sugiere que las cascadas de determinación celular son compartidas a través de diferentes *phyla* y a través de los órganos sensoriales. Por lo tanto es posible que mutaciones que afecten el desarrollo de una estructura macroscópica como el ojo, también afecten el desarrollo y diferenciación en la línea lateral y oído. De

esta manera muchas de las mutaciones reportadas fenotípicamente en el sistema visual deberían ser revisitadas con la posibilidad de realizar un rastreo de fenotipos en la línea lateral en un universo más restringido. Ejemplos que apoyan esta hipótesis son los mutantes *ale oko*, donde hay degeneración en la retina y las ciliadas de la línea lateral (Jing y Malicki, 2009), o los mutantes en el gen de la coroideremia (*rep1*) en el pez cebra donde los neuromastos presentan una reducción de casi un 90% de las células ciliadas y un fenotipo de degeneración retinal (Starr y cols., 2004). Esto refuerza la idea de analizar otros mutantes como *mikre oko*, que lleva una mutación puntual en el gen *dinactina-1*, y que presenta defectos en la migración nuclear en el neuroepitelio retinal asociados con el cambio de destinos durante la neurogénesis en el ojo a través de la modulación de la vía Notch-Delta (Del Bene y cols., 2008).

#### **6.4.3 A35-F: defecto en proliferación y organización de tejido durante el desarrollo de la línea lateral.**

Durante el rastreo pudimos identificar 2 mutaciones con defectos durante la migración del primordio de la línea lateral. La primera de ellas es D17, la cual presenta un profundo defecto migratorio, con neuromastos incluso sobre el vitelo (Figura 19). Sin embargo esta línea no fue analizada en esta tesis.

La segunda mutación, tentativamente llamada A35-F, fue agrupada dentro de los defectos durante migración pero ahora sabemos que el fenotipo es en un fenómeno muy particular de la morfogénesis de la línea lateral, independiente de la migración del primordio

Mediante mapeo genético identificamos la mutación, y la hemos caracterizado en profundidad. Hemos visto que la lesión se encuentra en el gen *lef1*, un efector transcripcional de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina, y probablemente esta mutación da origen a un alelo nulo. Pudimos demostrar que *lef1* tiene un rol crítico en la regulación de la proliferación celular homeostática en la región líder del primordio en migración. Importantemente, el rol de *lef1* en este proceso esta desacoplado de la migración y *patterning* del primordio, y del depósito y diferenciación de los neuromastos, lo que representa una herramienta de disección necesaria para poder separar los roles de las diferentes vías que controlan la morfogénesis de la línea lateral.

La mutación en *lef1/sinf<sup>u767</sup>* causa un fenotipo que es indistinguible de la pérdida de función mediante el uso de un morfolino dirigido contra el inicio de la traducción del mRNA (Figura 27). Como consecuencia, la proteína Lef1 truncada, compuesta de sólo 71 aminoácidos, no sería funcional. Considerando que la vía Wnt puede regular la transcripción de *lef1* y que la pérdida de función de *dkk1*, un inhibidor extracelular de esta vía, lleva a una sobreexpresión de *lef1* en el primordio completo (Aman y Piotrowski, 2008; Aman y cols., 2010), fue un poco sorprendente que la expresión de *lef1* se mantuviera en el primordio mutante. Es posible que otros factores TCF expresado en el primordio, tales como *tcf7* (Nagayoshi y cols., 2008), y *tcf3a* o *tcf4* (datos no publicados de nuestro laboratorio), estén mediando la regulación Wnt-dependiente de la expresión de *lef1*. Si esto es así, es probable que haya una redundancia entre diversos factores *tcf*, ya que no hay fenotipo en condiciones de pérdida de función simple de *tcf7* (Aman y cols., 2010) y en los mutantes en *tcf4* (datos no

publicados). Esto sugiere que no hay un control redundante del fenotipo observado en la mutación en *lef1/sin<sup>fu767</sup>*.

Considerando que hay varios genes de la familia TCF que son expresados en el primordio es sorprendente que la expresión de GFP en la línea reportera *tg(7xtcf:GFP)<sup>ia4</sup>* fuera completamente eliminada en los morfantes para *lef1*, teniendo en cuenta que la vía es activada en los peces reporteros mediante el uso de BIO, un agonista de Wnt. Hay varias posibles explicaciones que dan cuenta de estas observaciones, como por ejemplo que otras proteínas del tipo TCF tienen poco o ningún rol en activar la vía Wnt en el primordio o que su actividad depende de *lef1*. Es también posible que el reportero responda específicamente a la vía Wnt mediada por *lef1* y no por otros *tcf*, similar a lo que se ha mostrado para otros reporteros (Dorsky y cols., 2002). El hecho de que manipulaciones que afectan globalmente a la vía Wnt induzcan fenotipos más severos que aquellos en el mutante *lef1/sin<sup>fu767</sup>*, sugiere que efectivamente otros *tcf* podrían estar funcionando en el primordio de la línea lateral. Si este es el caso, entonces el reportero podría estar revelando una interesante sutileza en la relación Wnt/Tcf/ $\beta$ -catenina y, como se discute más adelante, esto resultaría en que distintas ramas de la vía, usando diferentes efectores regulen distintos eventos tales como proliferación y *patterning* en el primordio

Se ha mostrado previamente que la región líder del primordio de la línea lateral tiene el doble de proliferación celular que la región trasera (Laguerre y cols., 2005), y en esa misma zona existe una fuente de progenitores cuyas células hijas se mueven a la región trasera para formar nuevos neuromastos (Nechiporuk y Raible, 2008). La incorporación de BrdU en la región líder de los

mutantes está reducida casi a la mitad de los niveles del primordio silvestre, y las células no pierden su capacidad de moverse hacia la región trasera. Dado que no hay cambio en la tasa proliferativa en la región posterior del primordio, la explicación más plausible para el fenotipo mutante es que la proliferación reducida lleva a un agotamiento de las células en la zona líder y el primordio colapsa y se reduce a neuromastos terminales.

La inhibición global de la vía Wnt a través de la sobreexpresión de *dkk1*, reduce la proliferación en el primordio pero a diferencia de los mutantes *lef1/sin<sup>fu767</sup>*, el primordio se comporta de manera distinta y migra hasta el final de la cola sin depositar neuromastos (Aman y Piotrowski, 2008; Aman y cols., 2010). Sospechamos que la razón de la diferencia es que la sobreexpresión de *dkk1* adicionalmente suprime la formación/depósito de neuromastos. Sin embargo es posible que incluso existan otros fenómenos asociados, ya que se ha demostrado que *dkk1* puede tener una función independiente de Wnt (Caneparo y cols., 2007).

El primordio en mutantes y silvestres muestra una morfología similar cuando ocurre el término de la migración en términos del acortamiento de la distancia entre neuromastos (Figura 33 y 35). Esto sugiere que el primordio mutante cae en un evento de término normal en una posición inapropiada hacia rostral, y que en una condición silvestre la inhibición de la vía Wnt mediada por *lef1* es lo que termina el proceso migratorio en la cola. En apoyo de esta idea, la expresión de *lef1* en el primordio silvestre disminuye a medida que se acerca a la punta de la cola (Figura 35). La actividad reducida de *lef1* inhibiría la proliferación en la región líder, agotando las células con la consecuencia de que

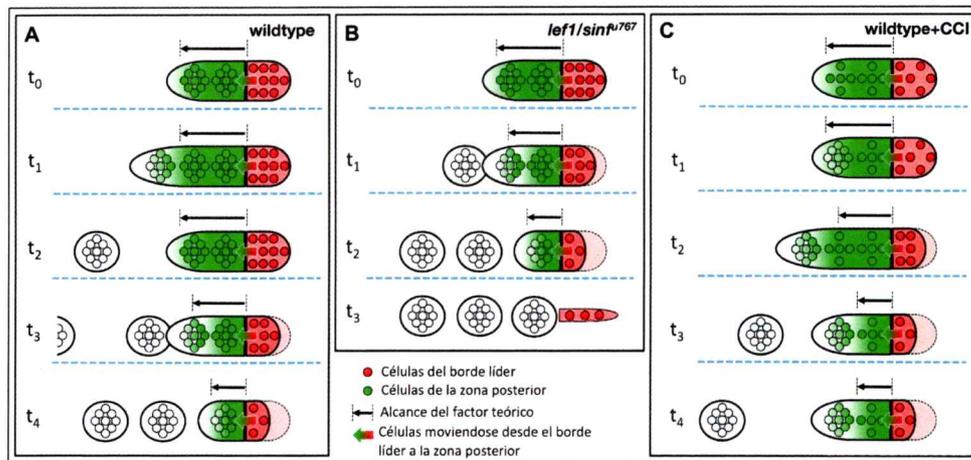
el primordio se fragmente en neuromastos terminales. El mecanismo por el cual *lef1* es gradualmente disminuido se desconoce, pero se sabe que en la cola hay expresión de una gran variedad de moléculas de señalización (Wilson y cols., 2009). Suponemos que esta zona podría producir algún factor que suprime la expresión de *lef1* en la zona líder a medida que el primordio se acerca a esa parte, y de esta forma terminaría la migración en una ubicación apropiada.

Nuestros datos asignan un rol a la proliferación en la región líder sobre la morfogénesis del primordio y el desarrollo de la línea lateral posterior. La proliferación dependiente de *lef1* mantiene la homeostasis de tejido en el primordio durante la migración y la regulación de la expresión de *lef1* proporciona una vía para controlar el término de la migración y, como se discute más adelante, la frecuencia de depósito de los neuromastos.

Los neuromastos son depositados más cerca unos de otros en los mutantes, respecto a los silvestres, y al final de la cola en comparación al tronco. Por otra parte los neuromastos están más espaciados cuando la proliferación es reducida en todo el primordio (Aman y cols, 2010; esta tesis). El término de la migración ocurre prematuramente en los mutantes cuando la proliferación se reduce en todo el primordio y se acaban las células, pero se mantiene cuando la formación de neuromastos es inhibida vía *dkk1* (Aman y cols, 2010). Proponemos que estas observaciones pueden ser explicadas a través de un modelo simple en el cual las células de la región trasera estiman su posición relativa a una "factor X" producido por las células del borde líder. Postulamos además que este factor depende del tamaño de la región líder (Figura 37).

En animales silvestres la proliferación en la región trasera del primordio

acoplado con la adición de células desde anterior progresivamente mueve las células de la región trasera más lejos de la zona líder, permitiendo la formación de proneuromastos y el depósito. *Lef1* es necesario para mantener el tamaño de la región líder hasta que el primordio alcanza la punta de la cola, conservando niveles constantes del "factor X" desde la región líder durante la migración (Figura 37A). Sin embargo, cuando la región líder disminuye su tamaño a medida que se acerca a la punta de la cola, el nivel de X desde esa zona disminuirá también y la formación de neuromastos se verá reforzada en la región posterior del primordio más cercana a la región líder (Figura 37A, fila de abajo), lo que resulta en una fragmentación del primordio y formación de neuromastos terminales. En los mutantes *lef1/sinf<sup>u767</sup>*, la situación es inicialmente como en los animales silvestres, pero a medida que se agotan las células de la región líder, se produce menos X, la formación de neuromastos ocurre más cerca de la región líder, los neuromastos son depositados más cerca unos de otros y el término ocurre prematuramente (Figura 37 B). Si la proliferación es inhibida a través de todo el primordio, la zona trasera del primordio falla en su crecimiento normal, lo que compensaría la reducción del factor desde la región líder (Figura 37 C); en este caso más tiempo se requeriría para que la región trasera acumule células suficientes para formar neuromastos y no habiendo un cambio en la velocidad migratoria, la distancia entre ellos se incrementa. Finalmente si la formación de neuromastos es bloqueada, entonces incluso si la proliferación es reducida, el primordio nunca alcanza un estado en que la fragmentación final ocurra. Este modelo propuesto es consistente con la observación de que la periodicidad del depósito de neuromastos no es



**Figura 37. Modelo que describe el desarrollo del primordio de la línea lateral silvestre, mutante *lef1*, y con la división celular bloqueada.** (A) Las proporciones del primordio silvestre se mantienen constantes a medida que migra desde izquierda a derecha ( $t_0$ - $t_2$ ), debido a la alta proliferación en la región líder (rojo), alimentando con células a la región posterior (verde) y llevando al depósito de los neuromastos. A medida que el primordio alcanza la punta de la cola ( $t_3$ - $t_4$ ), la proliferación y tamaño de la región líder disminuye. Como consecuencia disminuye el alcance del factor X que sería secretado desde la región líder (flecha negra) acelerando el eventual depósito de los neuromastos como en  $t_3$  en (B). (B) En el mutante *lef1*, la proliferación disminuida en la región líder agota las células en esta región ( $t_0$ - $t_3$ ), debido al paso de células a la región trasera y llevando al término prematuro de la migración. (c) Cuando la división celular es bloqueada (CCI, *cell cycle inhibitors*) en el primordio completo la tasa de depósito de neuromastos es reducida porque el tiempo requerido por la región trasera para generar nuevos neuromastos se incrementa. Eventualmente, la región líder también se queda sin células y muestra un fenotipo similar al del mutante *lef1*.

controlada por un mecanismo basado en un *timer* (Aman y cols., 2010)

La señal FGF promueve la formación de proneuromastos: cuando se inhibe, la región trasera no se organiza en rosetas (Lecaudey cols, 2008; Nechiporuk y Raible, 2008), mientras que la sobreexpresión de Fgf causa una formación de rosetas en la región líder (Lecaudey y cols, 2008). La modulación de esta vía en la región trasera del primordio por un factor producido desde la región líder podría proveer un sustento molecular para el modelo que nosotros

proponemos. El antagonista autónomo celular *sef1* (Tsing y cols, 2002; Furthauer y cols, 2008) se expresa en la región líder del primordio (Aman y Piotrowski, 2008), y aunque es poco probable que afecte directamente los niveles de FGF en la región trasera, podría regular la posición del límite entre las 2 regiones.

Matsuda y Chitnis (2010) han propuesto un elegante mecanismo en el cual la señal FGF actúa secuencialmente en el primordio. Primero, la expresión de FGF dependiente de Wnt ocurre en la región líder (aunque la señal es localmente reprimida, y actúa a distancia), y segundo una señal FGF dependiente de *atona1a* surge en los neuromastos en maduración. *Lef1* no es requerido para ninguno de esos eventos, pero nuestro modelo sugiere que regula la posición a la cual el foco de activación de FGF surge con respecto a las células de la región líder.

Dado que la manipulación de la vía Wnt puede afectar el *patterning*, migración, proliferación, formación de neuromastos y periodicidad del depósito, fue inesperado que el fenotipo de *lef1/sin<sup>f</sup>767* se restringiera a un déficit proliferativo. Por ejemplo, la sobreactivación de la vía Wnt en los mutantes *apc* va acompañada de un cese de la migración del primordio sugiriendo que Wnt regula la migración (Aman y Piotrowski, 2008). Sin embargo la pérdida de función de la vía Wnt mediada por *lef1* no interrumpe la migración del primordio y la velocidad del primordio es similar a la de los animales silvestres, así como también la expresión regionalmente restringida de los receptores de quimioquinas. Es más, el *knock down* de *lef1* en los mutantes *apc* restaura el comportamiento migratorio de las células de la región líder en los mutantes *apc*.

APC podría incluso funcionar fuera de la cascada de señalización Wnt (Aoki y Taketo, 2007) así como también puede hacerlo Dkk1 (Caneparo y cols, 2007) y algunos fenotipos ligados a la sobreexpresión podrían ser debidos a efectos sobre otras vías. Sin embargo, como se discutió antes, otros factores TCF son expresados también en el primordio de la línea lateral, haciendo posible que diferentes efectores transcripcionales de la vía Wnt canónica regulen diferentes eventos. De esto se conoce un ejemplo, donde la vía Wnt controla *patterning* y proliferación celular independientemente vía distintos efectores transcripcionales en la espinal dorsal (Bonner y cols, 2008)

Además de línea lateral, el otro fenotipo evidente es la reducción/ausencia de aletas en estadios post embrionarios. Aunque no hemos investigado este fenotipo, es probable que sea debido a una falla en la proliferación del tejido. Sea cual sea el caso, un defecto proliferativo podría ser el responsable del fenotipo lo que sugiere un rol conservado para la vía Wnt/ $\beta$ -catenina mediada por *lef1* en diferentes tejidos.

Una regulación de la proliferación dependiente de Wnt/ $\beta$ -catenina/Tcf ha sido propuesta como sustento para la viabilidad de varios compartimentos de células troncales en tejidos adultos, lo que sugiere un rol comparable en tejidos en crecimiento o desarrollo y en la homeostasis de tejidos maduros. Por ejemplo, la falta de Tcf4 lleva a una pérdida de las células proliferativas en las criptas intestinales (Korinek y cols, 1998; Muncan y cols, 2007). Al revés, en los mutante *apc*, estas zonas en el intestino crecen anormalmente hasta desarrollar cáncer.

La expresión de *lef1* incrementada en líneas de melanomas metastáticos

(Murakami y cols, 2001) y la pérdida de función de *lef1* en líneas de adenocarcinoma metastático lleva a una pérdida de las propiedades invasivas de esas células (Nguyen y cols, 2009). Sería interesante determinar si esto se debe a defectos proliferativos que llevan al cese de la migración colectiva. Paralelos entre células metastásicas y el primordio de la línea lateral han sido propuesto basados en características morfológicas y moleculares (Friedl y Gilmour, 2009; Iliina y Friedl, 2009; Gallardo y cols, 2010). Nosotros proponemos que las células metastásicas no sólo comparten el uso de la vía de las quimioquinas para la migración celular colectiva, sino que también podrían haber un requerimiento de la vía Wnt mediada por *lef1* para la mantención de las propiedades del tejido.

Finalmente, como fenómeno de desarrollo y organización morfogenética, parece haber una delicada complejidad en el primordio de la línea lateral, donde la segmentación y formación de neuromastos en el primordio requiere un cierto tamaño constante en términos de número de células. Es una suerte de automedida del tamaño del órgano a ser depositado, que ocurre de manera invariable y en proporciones normales incluso en un déficit proliferativo como en los mutantes de *lef1*. En otras palabras el primordio "sabe" cuán grande es un neuromasto y cuán grande debería serlo. Esta propiedad podría ser referida como "Entelequia" (García-Bellido y García-Bellido, 1998) en referencia al concepto de Aristóteles para designar la causa final de la perfección. En términos más terrenales la formación de los neuromastos podrían entenderse como cuando un hombre enfarda la alfalfa, a mano, para sus animales: debe juntar suficiente material para poder formar montones de igual tamaño en

espera del invierno...

El primordio de la línea lateral y la formación de los neuromastos serían entonces un buen modelo para estudiar los mecanismos del control del propio tamaño y la proporción de los diferentes tipos celulares.

## VII. CONCLUSIONES

1. El sistema de monohíbrido inverso no sirve para encontrar interacciones específicas de *atonal1* con sus cajas E: las secuencias obtenidas no están restringidas a blancos de *atonal*.
2. Se identificó un enhancer pequeño en la vecindad de *atonal1a* que parece ser fundamental en la autorregulación del mismo gen.
3. Los genes *gfi1.1* y *gfi1b* son importantes para la mantención de las células ciliadas de la línea lateral, la relación *atonal1a/gfi1.1* en pez cebra sería una homologable a la relación *atonal/senseless* en *Drosophila*.
4. La mutación C27-H produce un fenotipo de degeneración en las células ciliadas de la línea lateral, y su función estaría río abajo de la especificación celular mediada por *atonal1a*.
5. La mutación en *lef1* permite disectar por primera vez el rol de la vía Wnt durante el desarrollo de la línea lateral, y atribuye un rol a este factor de transcripción como controlador del motor proliferativo del borde líder del primordio, sin afectar otros procesos.
6. El balance proliferativo dependiente de *lef1* es el sustrato que permite el *patterning* de los neuromastos.

## VIII. BIBLIOGRAFIA

- Allende, M. L., Manzanares, M., Tena, J. J., Feijoo, C. G. and Gomez-Skarmeta, J. L.** (2006). Cracking the genome's second code: enhancer detection by combined phylogenetic footprinting and transgenic fish and frog embryos. *Methods* **39**, 212-9.
- Aman, A., Nguyen, M. and Piotrowski, T.** (2010). Wnt/beta-catenin dependent cell proliferation underlies segmented lateral line morphogenesis. *Dev Biol.*
- Aman, A. and Piotrowski, T.** (2008). Wnt/beta-catenin and Fgf signaling control collective cell migration by restricting chemokine receptor expression. *Dev Cell* **15**, 749-61.
- Amsterdam, A., Burgess, S., Golling, G., Chen, W., Sun, Z., Townsend, K., Farrington, S., Haldi, M. and Hopkins, N.** (1999). A large-scale insertional mutagenesis screen in zebrafish. *Genes Dev* **13**, 2713-24.
- Aoki, K. and Taketo, M. M.** (2007). Adenomatous polyposis coli (APC): a multi-functional tumor suppressor gene. *J Cell Sci* **120**, 3327-35.
- Bertrand, N., Castro, D. S. and Guillemot, F.** (2002). Proneural genes and the specification of neural cell types. *Nat Rev Neurosci* **3**, 517-30.
- Bonner, J., Gribble, S. L., Veien, E. S., Nikolaus, O. B., Weidinger, G. and Dorsky, R. I.** (2008). Proliferation and patterning are mediated independently in the dorsal spinal cord downstream of canonical Wnt signaling. *Dev Biol* **313**, 398-407.
- Brachmann, R. K. and Boeke, J. D.** (1997). Tag games in yeast: the two-hybrid system and beyond. *Curr Opin Biotechnol* **8**, 561-8.
- Caneparo, L., Huang, Y. L., Staudt, N., Tada, M., Ahrendt, R., Kazanskaya, O., Niehrs, C. and Houart, C.** (2007). Dickkopf-1 regulates gastrulation movements by coordinated modulation of Wnt/beta catenin and Wnt/PCP activities, through interaction with the Dally-like homolog Knypek. *Genes Dev* **21**, 465-80.
- Chen, Z., Montcouquiol, M., Calderon, R., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Kelley, M. W. and Noben-Trauth, K.** (2008). Jxc1/Sobp, encoding a nuclear zinc finger protein, is critical for cochlear growth, cell fate, and patterning of the organ of corti. *J Neurosci* **28**, 6633-41.
- Clevers, H.** (2006). Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* **127**, 469-80.

**Coffin, A. B., Ou, H., Owens, K. N., Santos, F., Simon, J. A., Rubel, E. W. and Raible, D. W.** (2010). Chemical screening for hair cell loss and protection in the zebrafish lateral line. *Zebrafish* **7**, 3-11.

**Collazo, A., Fraser, S. E. and Mabee, P. M.** (1994). A dual embryonic origin for vertebrate mechanoreceptors. *Science* **264**, 426-30.

**Curado, S. and Stainier, D. Y.** (2010). deLiver'in regeneration: injury response and development. *Semin Liver Dis* **30**, 288-95.

**d'Alencon, C. A., Pena, O. A., Wittmann, C., Gallardo, V. E., Jones, R. A., Loosli, F., Liebel, U., Grabher, C. and Allende, M. L.** (2010). A high-throughput chemically induced inflammation assay in zebrafish. *BMC Biol* **8**, 151.

**Dambly-Chaudiere, C., Cubedo, N. and Ghysen, A.** (2007). Control of cell migration in the development of the posterior lateral line: antagonistic interactions between the chemokine receptors CXCR4 and CXCR7/RDC1. *BMC Dev Biol* **7**, 23.

**Dambly-Chaudiere, C., Sapede, D., Soubiran, F., Decorde, K., Gompel, N. and Ghysen, A.** (2003). The lateral line of zebrafish: a model system for the analysis of morphogenesis and neural development in vertebrates. *Biol Cell* **95**, 579-87.

**David, N. B.** (2002). Molecular basis of cell migration in the fish lateral line: Role of the chemokine receptor CXCR4 and of its ligand, SDF1. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**, 16297-16302.

**Davidson, E. H., Rast, J. P., Oliveri, P., Ransick, A., Calestani, C., Yuh, C. H., Minokawa, T., Amore, G., Hinman, V., Arenas-Mena, C. et al.** (2002). A genomic regulatory network for development. *Science* **295**, 1669-78.

**Dorsky, R. I., Itoh, M., Moon, R. T. and Chitnis, A.** (2003). Two *tcf3* genes cooperate to pattern the zebrafish brain. *Development* **130**, 1937-47.

**Driever, W., Solnica-Krezel, L., Schier, A. F., Neuhauss, S. C., Malicki, J., Stemple, D. L., Stainier, D. Y., Zwartkruis, F., Abdelilah, S., Rangini, Z. et al.** (1996). A genetic screen for mutations affecting embryogenesis in zebrafish. *Development* **123**, 37-46.

**Dufourcq, P., Rastegar, S., Strahle, U. and Blader, P.** (2004). Parapineal specific expression of *gf1* in the zebrafish epithalamus. *Gene Expr Patterns* **4**, 53-7.

**Faucherre, A., Pujol-Marti, J., Kawakami, K. and Lopez-Schier, H.** (2009). Afferent neurons of the zebrafish lateral line are strict selectors of hair-cell orientation. *PLoS One* **4**, e4477.

**Fields, S. and Song, O.** (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**, 245-6.

**Fisher, S., Grice, E. A., Vinton, R. M., Bessling, S. L., Urasaki, A., Kawakami, K. and McCallion, A. S.** (2006). Evaluating the biological relevance of putative enhancers using Tol2 transposon-mediated transgenesis in zebrafish. *Nat Protoc* **1**, 1297-305.

**Frankfort, B. J., Nolo, R., Zhang, Z., Bellen, H. and Mardon, G.** (2001). senseless repression of rough is required for R8 photoreceptor differentiation in the developing *Drosophila* eye. *Neuron* **32**, 403-14.

**Friedl, P. and Gilmour, D.** (2009). Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 445-57.

**Fritsch, B. and Beisel, K. W.** (2004). Keeping sensory cells and evolving neurons to connect them to the brain: molecular conservation and novelties in vertebrate ear development. *Brain Behav Evol* **64**, 182-97.

**Froehlicher, M., Liedtke, A., Groh, K. J., Neuhauss, S. C., Segner, H. and Eggen, R. I.** (2009). Zebrafish (*Danio rerio*) neuromast: promising biological endpoint linking developmental and toxicological studies. *Aquat Toxicol* **95**, 307-19.

**Furthauer, M., Lin, W., Ang, S. L., Thisse, B. and Thisse, C.** (2002). Sef is a feedback-induced antagonist of Ras/MAPK-mediated FGF signalling. *Nat Cell Biol* **4**, 170-4.

**Gallardo, V. E., Liang, J., Behra, M., Elkahloun, A., Villablanca, E. J., Russo, V., Allende, M. L. and Burgess, S. M.** (2010). Molecular dissection of the migrating posterior lateral line primordium during early development in zebrafish. *BMC Dev Biol* **10**, 120.

**Garcia, M., Derocq, D., Freiss, G. and Rochefort, H.** (1992). Activation of estrogen receptor transfected into a receptor-negative breast cancer cell line decreases the metastatic and invasive potential of the cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 11538-42.

**Gerhard, G. S.** (2007). Small laboratory fish as models for aging research. *Ageing Res Rev* **6**, 64-72.

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

**Ghysen, A. and Dambly-Chaudiere, C.** (2007). The lateral line microcosmos. *Genes & Development* **21**, 2118-2130.

- Giles, R. H., van Es, J. H. and Clevers, H.** (2003). Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochim Biophys Acta* **1653**, 1-24.
- Gillespie, P. G. and Muller, U.** (2009). Mechanotransduction by hair cells: models, molecules, and mechanisms. *Cell* **139**, 33-44.
- Gilmour, D., Knaut, H., Maischein, H. M. and Nusslein-Volhard, C.** (2004). Towing of sensory axons by their migrating target cells in vivo. *Nat Neurosci* **7**, 491-2.
- Gilmour, D. T., Maischein, H. M. and Nusslein-Volhard, C.** (2002). Migration and function of a glial subtype in the vertebrate peripheral nervous system. *Neuron* **34**, 577-88.
- Gompel, N., Cubedo, N., Thisse, C., Thisse, B., Dambly-Chaudiere, C. and Ghysen, A.** (2001). Pattern formation in the lateral line of zebrafish. *Mech Dev* **105**, 69-77.
- Haas, P. and Gilmour, D.** (2006). Chemokine Signaling Mediates Self-Organizing Tissue Migration in the Zebrafish Lateral Line. *Developmental Cell* **10**, 673-680.
- Haffter, P., Granato, M., Brand, M., Mullins, M. C., Hammerschmidt, M., Kane, D. A., Odenthal, J., van Eeden, F. J., Jiang, Y. J., Heisenberg, C. P. et al.** (1996). The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, *Danio rerio*. *Development* **123**, 1-36.
- Hava, D., Forster, U., Matsuda, M., Cui, S., Link, B. A., Eichhorst, J., Wiesner, B., Chitnis, A. and Abdelilah-Seyfried, S.** (2009). Apical membrane maturation and cellular rosette formation during morphogenesis of the zebrafish lateral line. *J Cell Sci* **122**, 687-95.
- Hawkins, R. D., Bashiardes, S., Powder, K. E., Sajan, S. A., Bhonagiri, V., Alvarado, D. M., Speck, J., Warchol, M. E. and Lovett, M.** (2007). Large scale gene expression profiles of regenerating inner ear sensory epithelia. *PLoS One* **2**, e525.
- Helms, A. W., Abney, A. L., Ben-Arie, N., Zoghbi, H. Y. and Johnson, J. E.** (2000). Autoregulation and multiple enhancers control Math1 expression in the developing nervous system. *Development* **127**, 1185-96.
- Hernandez, P. P., Moreno, V., Olivari, F. A. and Allende, M. L.** (2006). Sub-lethal concentrations of waterborne copper are toxic to lateral line neuromasts in zebrafish (*Danio rerio*). *Hear Res* **213**, 1-10.

**Hertzano, R., Montcouquiol, M., Rashi-Elkeles, S., Elkon, R., Yucel, R., Frankel, W. N., Rechavi, G., Moroy, T., Friedman, T. B., Kelley, M. W. et al.** (2004). Transcription profiling of inner ears from Pou4f3(ddl/ddl) identifies Gfi1 as a target of the Pou4f3 deafness gene. *Hum Mol Genet* **13**, 2143-53.

**Holley, S. A.** (2007). The genetics and embryology of zebrafish metamerism. *Dev Dyn* **236**, 1422-49.

**Hoppler, S. and Kavanagh, C. L.** (2007). Wnt signalling: variety at the core. *J Cell Sci* **120**, 385-93.

**Horvitz, H. R. and Sternberg, P. W.** (1991). Multiple intercellular signalling systems control the development of the *Caenorhabditis elegans* vulva. *Nature* **351**, 535-41.

**Iliina, O. and Friedl, P.** (2009). Mechanisms of collective cell migration at a glance. *J Cell Sci* **122**, 3203-8.

**Itoh, M. and 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**, 263-6.

**Jafar-Nejad, H. and Bellen, H. J.** (2004). Gfi/Pag-3/senseless zinc finger proteins: a unifying theme? *Mol Cell Biol* **24**, 8803-12.

**Jarman, A. P. and Ahmed, I.** (1998). The specificity of proneural genes in determining *Drosophila* sense organ identity. *Mech Dev* **76**, 117-25.

**Jing, X. and Malicki, J.** (2009). Zebrafish ale oko, an essential determinant of sensory neuron survival and the polarity of retinal radial glia, encodes the p50 subunit of dynactin. *Development* **136**, 2955-64.

**Kani, S., Bae, Y. K., Shimizu, T., Tanabe, K., Satou, C., Parsons, M. J., Scott, E., Higashijima, S. and Hibi, M.** (2010). Proneural gene-linked neurogenesis in zebrafish cerebellum. *Dev Biol* **343**, 1-17.

**Kawakami, K., Takeda, H., Kawakami, N., Kobayashi, M., Matsuda, N. and Mishina, M.** (2004). A transposon-mediated gene trap approach identifies developmentally regulated genes in zebrafish. *Dev Cell* **7**, 133-44.

**Kelley, M. W.** (2006). Hair cell development: commitment through differentiation. *Brain Res* **1091**, 172-85.

**Kenyon, K. L., Li, D. J., Clouser, C., Tran, S. and Pignoni, F.** (2005). Fly SIX-type homeodomain proteins *Sine oculis* and *Optix* partner with different cofactors during eye development. *Dev Dyn* **234**, 497-504.

**Kim, E., Arnould, T., Sellin, L. K., Benzing, T., Fan, M. J., Gruning, W., Sokol, S. Y., Drummond, I. and Walz, G. (1999).** The polycystic kidney disease 1 gene product modulates Wnt signaling. *J Biol Chem* **274**, 4947-53.

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

**Kishi, S., Slack, B. E., Uchiyama, J. and Zhdanova, I. V. (2009).** Zebrafish as a genetic model in biological and behavioral gerontology: where development meets aging in vertebrates--a mini-review. *Gerontology* **55**, 430-41.

**Koning, A. J., Lum, P. Y., Williams, J. M. and Wright, R. (1993).** DiOC6 staining reveals organelle structure and dynamics in living yeast cells. *Cell Motil Cytoskeleton* **25**, 111-28.

**Korinek, V., Barker, N., Moerer, P., van Donselaar, E., Huls, G., Peters, P. J. and Clevers, H. (1998).** Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4. *Nat Genet* **19**, 379-83.

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

**Krizhanovsky, V., Soreq, L., Kliminski, V. and Ben-Arie, N. (2006).** Math1 target genes are enriched with evolutionarily conserved clustered E-box binding sites. *J Mol Neurosci* **28**, 211-29.

**Kroboth, K., Newton, I.P., Kita, K., Dikovskaya, D., Zumbrunn, J., Waterman-Storer, C.M., and Nathke, I.S. (2007).** Lack of adenomatous polyposis coli protein correlates with a decrease in cell migration and overall changes in microtubule stability. *Mol. Biol. Cell* **18**, 910-918.

**Kwan, K. M., Fujimoto, E., Grabher, C., Mangum, B. D., Hardy, M. E., Campbell, D. S., Parant, J. M., Yost, H. J., Kanki, J. P. and Chien, C. B. (2007).** The Tol2kit: a multisite gateway-based construction kit for Tol2 transposon transgenesis constructs. *Dev Dyn* **236**, 3088-99.

**Laguerre, L., Ghysen, A. and Dambly-Chaudiere, C. (2009).** Mitotic patterns in the migrating lateral line cells of zebrafish embryos. *Dev Dyn* **238**, 1042-51.

**Laguerre, L., Soubiran, F., Ghysen, A., Konig, N. and Dambly-Chaudiere, C. (2005).** Cell proliferation in the developing lateral line system of zebrafish embryos. *Dev Dyn* **233**, 466-72.

- Larue, L. and Delmas, V.** (2006). The WNT/Beta-catenin pathway in melanoma. *Front Biosci* **11**, 733-42.
- Lecaudey, V., Cakan-Akdogan, G., Norton, W. H. and Gilmour, D.** (2008). Dynamic Fgf signaling couples morphogenesis and migration in the zebrafish lateral line primordium. *Development* **135**, 2695-705.
- Li, J. J. and Herskowitz, I.** (1993). Isolation of ORC6, a component of the yeast origin recognition complex by a one-hybrid system. *Science* **262**, 1870-4.
- Li, L., Li, Y., Chen, D., Shao, J., Li, X. and Xu, C.** (2010). Fishing for age-related visual system mutants: behavioral screening of retinal degeneration genes in zebrafish. *Curr Aging Sci* **3**, 43-5.
- Li, Q., Shirabe, K. and Kuwada, J. Y.** (2004). Chemokine signaling regulates sensory cell migration in zebrafish. *Dev Biol* **269**, 123-36.
- Lieschke, G. J. and Currie, P. D.** (2007). Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nat Rev Genet* **8**, 353-67.
- Logan, M. A., Steele, M. R., Van Raay, T. J. and Vetter, M. L.** (2005). Identification of shared transcriptional targets for the proneural bHLH factors Xath5 and XNeuroD. *Dev Biol* **285**, 570-83.
- Lopez-Schier, H. and Hudspeth, A. J.** (2006). A two-step mechanism underlies the planar polarization of regenerating sensory hair cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 18615-20.
- Lopez-Schier, H., Starr, C. J., Kappler, J. A., Kollmar, R. and 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**, 401-12.
- Ma, E. Y. and Raible, D. W.** (2009). Signaling pathways regulating zebrafish lateral line development. *Curr Biol* **19**, R381-6.
- Mao, C. A., Wang, S. W., Pan, P. and Klein, W. H.** (2008). Rewiring the retinal ganglion cell gene regulatory network: Neurod1 promotes retinal ganglion cell fate in the absence of Math5. *Development* **135**, 3379-88.
- Matsuda, M. and Chitnis, A. B.** (2010). Atoh1a expression must be restricted by Notch signaling for effective morphogenesis of the posterior lateral line primordium in zebrafish. *Development* **137**, 3477-87.
- Metcalf, W. K.** (1985). Sensory neuron growth cones comigrate with posterior lateral line primordial cells in zebrafish. *J Comp Neurol* **238**, 218-24.

- Moens, C. B., Donn, T. M., Wolf-Saxon, E. R. and Ma, T. P. (2008).** Reverse genetics in zebrafish by TILLING. *Brief Funct Genomic Proteomic* **7**, 454-9.
- Moon, R. T., Kohn, A. D., De Ferrari, G. V. and Kaykas, A. (2004).** WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies. *Nat Rev Genet* **5**, 691-701.
- Muller, A., Homey, B., Soto, H., Ge, N., Catron, D., Buchanan, M. E., McClanahan, T., Murphy, E., Yuan, W., Wagner, S. N. et al. (2001).** Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* **410**, 50-6.
- Muncan, V., Faro, A., Haramis, A. P., Hurlstone, A. F., Wienholds, E., van Es, J., Korving, J., Begthel, H., Zivkovic, D. and Clevers, H. (2007).** T-cell factor 4 (Tcf712) maintains proliferative compartments in zebrafish intestine. *EMBO Rep* **8**, 966-73.
- Murakami, S. L., Cunningham, L. L., Werner, L. A., Bauer, E., Pujol, R., Raible, D. W. and Rubel, E. W. (2003).** Developmental differences in susceptibility to neomycin-induced hair cell death in the lateral line neuromasts of zebrafish (*Danio rerio*). *Hear Res* **186**, 47-56.
- Murakami, T., Toda, S., Fujimoto, M., Ohtsuki, M., Byers, H. R., Etoh, T. and Nakagawa, H. (2001).** Constitutive activation of Wnt/beta-catenin signaling pathway in migration-active melanoma cells: role of LEF-1 in melanoma with increased metastatic potential. *Biochem Biophys Res Commun* **288**, 8-15.
- Nagayoshi, S., Hayashi, E., Abe, G., Osato, N., Asakawa, K., Urasaki, A., Horikawa, K., Ikeo, K., Takeda, H. and Kawakami, K. (2008).** Insertional mutagenesis by the Tol2 transposon-mediated enhancer trap approach generated mutations in two developmental genes: *tcf7* and *synembryn*-like. *Development* **135**, 159-69.
- Nechiporuk, A. and Raible, D. W. (2008).** FGF-dependent mechanosensory organ patterning in zebrafish. *Science* **320**, 1774-7.
- Nguyen, D. X., Chiang, A. C., Zhang, X. H. F., Kim, J. Y., Kris, M. G., Ladanyi, M., Gerald, W. L. and Massagué, J. (2009).** WNT/TCF Signaling through LEF1 and HOXB9 Mediates Lung Adenocarcinoma Metastasis. *Cell* **138**, 51-62.
- Nusslein-Volhard, C. and Wieschaus, E. (1980).** Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* **287**, 795-801.
- Paridaen, J. T., Danesin, C., Elas, A. T., van de Water, S., Houart, C. and Zivkovic, D. (2009).** Apc1-mediated antagonism of Wnt/beta-catenin signaling is required for retino-tectal pathfinding in the zebrafish. *Zebrafish* **6**, 41-7.

- Parsons, A. B., Geyer, R., Hughes, T. R. and Boone, C.** (2003). Yeast genomics and proteomics in drug discovery and target validation. *Prog Cell Cycle Res* **5**, 159-66.
- Patton, E. E. and Zon, L. I.** (2001). The art and design of genetic screens: zebrafish. *Nat Rev Genet* **2**, 956-66.
- Polychronopoulos, P., Magiatis, P., Skaltsounis, A. L., Myrianthopoulos, V., Mikros, E., Tarricone, A., Musacchio, A., Roe, S. M., Pearl, L., Leost, M. et al.** (2004). Structural basis for the synthesis of indirubins as potent and selective inhibitors of glycogen synthase kinase-3 and cyclin-dependent kinases. *J Med Chem* **47**, 935-46.
- Poss, K. D., Keating, M. T. and Nechiporuk, A.** (2003). Tales of regeneration in zebrafish. *Dev Dyn* **226**, 202-10.
- Renshaw, S. A. and Ingham, P. W.** (2010). Zebrafish models of the immune response: taking it on the ChIn. *BMC Biol* **8**, 148.
- Robertson, G., Hirst, M., Bainbridge, M., Bilenky, M., Zhao, Y., Zeng, T., Euskirchen, G., Bernier, B., Varhol, R., Delaney, A. et al.** (2007). Genome-wide profiles of STAT1 DNA association using chromatin immunoprecipitation and massively parallel sequencing. *Nat Methods* **4**, 651-7.
- Ruf, R. G., Xu, P. X., Silvius, D., Otto, E. A., Beekmann, F., Muerb, U. T., Kumar, S., Neuhaus, T. J., Kemper, M. J., Raymond, R. M., Jr. et al.** (2004). SIX1 mutations cause branchio-oto-renal syndrome by disruption of EYA1-SIX1-DNA complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 8090-5.
- Sarrazin, A. F., Villablanca, E. J., Nunez, V. A., Sandoval, P. C., Ghysen, A. and Allende, M. L.** (2006). Proneural gene requirement for hair cell differentiation in the zebrafish lateral line. *Dev Biol* **295**, 534-45.
- Saba, J.E. Johnson and T. Saito.** (2005). Commissural neuron identity is specified by a homeodomain protein, Mbh1, that is directly downstream of Math1. *Development* **132**, 2147-2155
- Scheffer, D., Sage, C., Plazas, P. V., Huang, M., Wedemeyer, C., Zhang, D. S., Chen, Z. Y., Elgoyhen, A. B., Corey, D. P. and Pingault, V.** (2007). The alpha1 subunit of nicotinic acetylcholine receptors in the inner ear: transcriptional regulation by ATOH1 and co-expression with the gamma subunit in hair cells. *J Neurochem.*
- Skowronska-Krawczyk, D., Ballivet, M., Dynlacht, B. D. and Matter, J. M.** (2004). Highly specific interactions between bHLH transcription factors and chromatin during retina development. *Development* **131**, 4447-54.

- Soellick, T. R. and Uhrig, J. F.** (2001). Development of an optimized interaction-mating protocol for large-scale yeast two-hybrid analyses. *Genome Biol* **2**, RESEARCH0052.
- Starr, C. J., Kappler, J. A., Chan, D. K., Kollmar, R. and Hudspeth, A. J.** (2004). Mutation of the zebrafish choroideremia gene encoding Rab escort protein 1 devastates hair cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 2572-7.
- Streit, A.** (2004). Early development of the cranial sensory nervous system: from a common field to individual placodes. *Dev Biol* **276**, 1-15.
- Sun, Y., Jan, L. Y. and Jan, Y. N.** (1998). Transcriptional regulation of atonal during development of the Drosophila peripheral nervous system. *Development* **125**, 3731-40.
- Talbot, W. S. and Schier, A. F.** (1999). Positional cloning of mutated zebrafish genes. *Methods Cell Biol* **60**, 259-86.
- Thisse, C. and Thisse, B.** (2008). High-resolution in situ hybridization to whole-mount zebrafish embryos. *Nat Protoc* **3**, 59-69.
- Thisse, C. and Zon, L. I.** (2002). Organogenesis--heart and blood formation from the zebrafish point of view. *Science* **295**, 457-62.
- Tsang, M., Friesel, R., Kudoh, T. and Dawid, I. B.** (2002). Identification of Sef, a novel modulator of FGF signalling. *Nat Cell Biol* **4**, 165-9.
- Valentin, G., Haas, P. and Gilmour, D.** (2007). The chemokine SDF1a coordinates tissue migration through the spatially restricted activation of Cxcr7 and Cxcr4b. *Curr Biol* **17**, 1026-31.
- van Eeden, F. J., Granato, M., Odenthal, J. and Haffter, P.** (1999). Developmental mutant screens in the zebrafish. *Methods Cell Biol* **60**, 21-41.
- van Genderen, C., Okamura, R. M., Farinas, I., Quo, R. G., Parslow, T. G., Bruhn, L. and Grosschedl, R.** (1994). Development of several organs that require inductive epithelial-mesenchymal interactions is impaired in LEF-1-deficient mice. *Genes & Development* **8**, 2691-2703.
- Vizeacoumar, F. J., Chong, Y., Boone, C. and Andrews, B. J.** (2009). A picture is worth a thousand words: genomics to phenomics in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **583**, 1656-61.
- Wang, M. M. and Reed, R. R.** (1993). Molecular cloning of the olfactory neuronal transcription factor Olf-1 by genetic selection in yeast. *Nature* **364**, 121-6.

**Wei, W., Wen, L., Huang, P., Zhang, Z., Chen, Y., Xiao, A., Huang, H., Zhu, Z., Zhang, B. and Lin, S. (2008).** Gfi1.1 regulates hematopoietic lineage differentiation during zebrafish embryogenesis. *Cell Res* **18**, 677-85.

**Weidinger, G., Thorpe, C. J., Wuennenberg-Stapleton, K., Ngai, J. and Moon, R. T. (2005).** The Sp1-related transcription factors sp5 and sp5-like act downstream of Wnt/beta-catenin signaling in mesoderm and neuroectoderm patterning. *Curr Biol* **15**, 489-500.

**Westerfield, M. (2000).** The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*).

**Wilson, S. W., Ross, L. S., Parrett, T. and Easter, S. S., Jr. (1990).** The development of a simple scaffold of axon tracts in the brain of the embryonic zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Development* **108**, 121-45.

**Wilson, V., Olivera-Martinez, I. and Storey, K. G. (2009).** Stem cells, signals and vertebrate body axis extension. *Development* **136**, 1591-604.

**Wyrick, J. J. and Young, R. A. (2002).** Deciphering gene expression regulatory networks. *Curr Opin Genet Dev* **12**, 130-6.

**Zheng, W., Huang, L., Wei, Z. B., Silviu, D., Tang, B. and Xu, P. X. (2003).** The role of Six1 in mammalian auditory system development. *Development* **130**, 3989-4000.