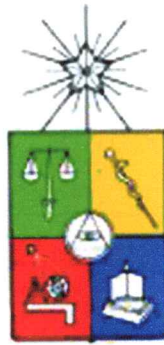


UCH-FC
DOC-BMEN
4681
C.A



CLONAMIENTO, EXPRESION Y ANALISIS DE LA FUNCION DE LAS
VARIANTES DE PROCESAMIENTO DE TCF-4 EN LA ESPECIFICACION
ANTERO-POSTERIOR DEL CEREBRO DE PEZ CEBRA (*Danio rerio*)

Tesis
Entregada a la
Universidad de Chile
En cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al grado de
Doctor en Ciencias con mención en Biología Molecular, Celular y Neurociencias

Facultad de Ciencias

Rodrigo Young Barrueto

Octubre, 2004

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

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION
TESIS DE DOCTORADO

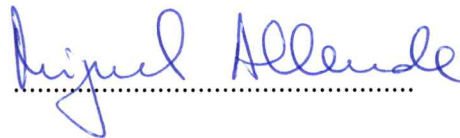
Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato:

RODRIGO MANUEL YOUNG BARRUETO

Ha sido aprobada por al Comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 27 de Septiembre de 2004.

Director de Tesis

Dr. Miguel L. Allende



Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Luis Burzio



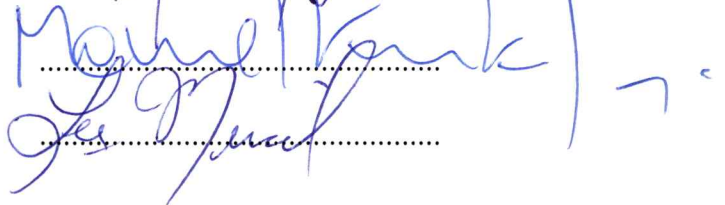
Dr. Miguel Concha



Dr. Christian González-Billault



Dr. Manuel Kukuljan



Dra. Lee Ann Meisel



*Dedico este trabajo a la memoria de
mi tía Paly que me cuidó desde chico
y que fue mi pediatra hasta hace poco.
Un beso pa' ella.*

Agradezco a todos los que de alguna forma contribuyeron directa o indirectamente a que sacara este trabajo adelante.

A Miguel (big fish) por su apoyo y sobretodo por su confianza (o irresponsabilidad), dándome total libertad intelectual para dejarme llevar por completo por mi intuición. Jamás pensé que iba a aprender tanto trabajando con él.

A mis compañeros de laboratorio Ariel Reyes, Eduardo Villablanca, Carmen Feijoo, Claudia d'Alencon, Andrés Sarrazin, Viviana Núñez, Pedro Hernández, Daniver Morales, Marcia Gaete y a la población flotante que no dejó de llevar aires frescos al lab. Todos ellos hicieron que trabajar fuera como estar en una película de Buñuel. En especial a Carmen por las mejores peleas que me ha dado en un lab.

Al Floro Espinoza por su incansable trabajo que permite que el laboratorio funcione, el hombre ancla del lab.

A Juan Silva por mantener todo re-limpio y los saludos matinales.

A Verónica y Victoria, los amores que cambiaron mi vida para siempre. Si no es por tí Vero, de seguro estaría haciendo más experimentos eternamente. Sin mencionar lo alucinante que es despertar junto a ustedes.

A Margarita, Manuel y Andrés, por el buen respaldo que da la familia, siempre.

A Nancy Hopkins y Steve Wilson por recibirme en sus laboratorios y confiar.

A Diego Cosmelli y James Sharpe, mis amigos imaginarios.

Este trabajo no hubiera sido posible sin el apoyo que el gobierno de Chile da a científicos en formación mediante las becas de doctorado CONICYT y los proyectos FONDECYT (el mío 2010058) y Milenio. También contribuyeron al financiamiento de mi trabajo Fulbright Foundation, Company of Biologists Development, IBRO, Boehringer Ingelheim.

Y finalmente a Miguel de nuevo, por permitir todo esto que me pasó en tan poco tiempo, gracias.

INDICE DE MATERIAS

| | |
|---|------|
| Dedicatoria..... | ii |
| Agradecimientos..... | iii |
| Indice de Materias..... | v |
| Lista Tablas..... | viii |
| Lista Figuras..... | viii |
| Lista Abreviaturas..... | x |
| Resumen..... | xi |
| Summary..... | xiii |
| Introducción..... | 1 |
| 1. Especificación antero-posterior del cerebro..... | 1 |
| 2. Vía de transducción de señales Wnt..... | 3 |
| 3. Factores de transcripción Lef/Tcf..... | 8 |
| 4. Vía Wnt y desarrollo del cerebro anterior en pez cebra y otros modelos.. | 11 |
| a. Pez cebra (<i>Danio rerio</i>) como modelo embriológico..... | 11 |
| b. Vía Wnt y el desarrollo del cerebro anterior..... | 12 |
| Hipótesis..... | 17 |
| Materiales y Metodos..... | 18 |
| Materiales..... | 18 |
| Material Biológico y Embriológico..... | 18 |
| Lista de Oligonucleótidos..... | 18 |
| Reactivos de Biología Molecular..... | 19 |

| | |
|---|----|
| Soluciones..... | 21 |
| Lista de Plásmidos..... | 22 |
| Métodos..... | 23 |
| 1. Clonamiento del cDNA de <i>tcf4</i> de <i>Danio rerio</i> | 23 |
| 2. Síntesis de Sonda para hibridación <i>in situ</i> | 25 |
| 3. Hibridación <i>in situ</i> | 26 |
| 4. Síntesis de mRNA para microinyección..... | 27 |
| 5. Mantenición de peces <i>Danio rerio</i> silvestres y líneas mutantes..... | 27 |
| 6. Identificación de peces y embriones mutantes <i>headless</i> | 27 |
| 7. Extracción de DNA genómico de embriones o colas de pez cebra..... | 28 |
| 8. Microinyección de embriones..... | 29 |
| 9. Extracción de proteínas y Western Blot..... | 29 |
| Resultados..... | 31 |
| 1. Clonamiento y expresión de <i>tcf4</i> de pez cebra (<i>Danio rerio</i>)..... | 31 |
| a. Clonamiento de <i>tcf4</i> de pez cebra..... | 31 |
| b. Expresión de variantes de procesamiento de <i>tcf4</i> de pez cebra..... | 35 |
| c. Patrón de expresión de <i>tcf4</i> de pez cebra..... | 36 |
| 2. Inhibición de la traducción de Tcf4 y Tcf3b en mutantes <i>hdl</i> cigóticos..... | 40 |
| a. Análisis de fenotipo a las 24 hpf..... | 40 |
| b. Análisis de fenotipo a las 10 hpf..... | 43 |
| 3. Rescate del fenotipo <i>hdl</i> con variantes de procesamiento de <i>tcf4</i> | 47 |

| | |
|-------------------|----|
| Discusión..... | 49 |
| Conclusiones..... | 63 |
| Bibliografía..... | 64 |

LISTA DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1 Rescate del fenotipo de ausencia de ojos provocado por la inyección de <i>motcf3b</i> en mutantes <i>zhdl</i> de un cruce de hembras <i>hdl</i> heterocigotos y machos <i>hdl</i> homocigotos | 47 |
|---|----|

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 Esquema del tubo neural en el desarrollo embrionario..... | 2 |
| Figura 2 Representación de la vía Wnt..... | 5 |
| Figura 3 Esquema de las regiones de las proteínas Lef/Tcf..... | 9 |
| Figura 4 Comparación de embrión de pez cebra silvestre y mutante <i>masterblind</i> | 14 |
| Figura 5 Alineamiento de secuencia aminoacídica de <i>tcf4</i> | 32 |
| Figura 6 Esquema de las variantes de <i>tcf4</i> clonadas..... | 33 |
| Figura 7 Alineamiento de 5 ^{to} exón y esquema organización genómica de <i>ztcf4</i> | 34 |
| Figura 8 Estudio de la expresión de los exones alternativos de <i>tcf4</i> mediante RT-PCR..... | 36 |
| Figura 9 Detección del mRNA de <i>tcf4</i> en embriones de pez cebra mediante hibridación <i>in situ</i> | 37 |
| Figura 10 Hibridaciones <i>in situ</i> dobles y simples de <i>tcf4</i> a 24 hpf y 48 hpf..... | 38 |
| Figura 11 Hibridaciones <i>in situ</i> dobles y simples de <i>tcf4</i> y <i>tcf3a</i> a 10 hpf..... | 39 |
| Figura 12 Inyección de los morfolidos de <i>tcf3b</i> y <i>tcf4</i> en el fondo mutante <i>zhdl</i> | 41 |
| Figura 13 Genotipeo de embriones <i>zhdl</i> inyectados con los morfolidos de <i>tcf3b</i> y <i>tcf4</i> | 42 |
| Figura 14 Análisis de los marcadores de hipotálamo y cerebro medio posterior..... | 43 |

| | |
|---|----|
| Figura 15 Análisis de marcadores de cerebro anterior y medio por hibridación <i>in situ</i> a 10 hpf en embriones control y <i>zhdl</i> inyectados con mo <i>tcf4</i> o mo <i>tcf3b</i> | 45 |
| Figura 16 Análisis de marcadores de cerebro medio por hibridación <i>in situ</i> a 10 hpf en embriones control y <i>zhdl</i> inyectados con mo <i>tcf4</i> y mo <i>tcf3b</i> | 46 |
| Figura 17 Genotipo del alelo <i>hdl</i> en embriones <i>zhdl</i> inyectados con el mo de <i>tcf3b</i> y rescatados con el mRNA de <i>tcf4-459L</i> | 48 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|------|-----------------------------------|
| APC | Adenomatous Polyposis Coli |
| BMP | Bone Morphogenetic Protein |
| CtBP | C-terminal Binding Protein |
| Dkk | Dickkopf |
| Dsh | Disheveled |
| FGF | Fibroblast Growth Factor |
| Fzd | Frizzled |
| Gro | Groucho |
| GSK | Glycogen Synthase Kinase |
| hdl | headless |
| Hpf | Horas post-fertilización |
| Lef | Lymphoid Enhancer-binding Factor |
| LRP | LDL Receptor-related Protein |
| mb1 | masterblind |
| mo | Morfolino |
| NLK | Nemo-Like Kinase |
| Sfrp | Secreted frizzled-related protein |
| Shh | Sonic Hedgehog |
| TCF | T-Cell Factor |

RESUMEN

La vía de transducción de señales Wnt participa directamente en la definición del patrón antero-posterior del cerebro de vertebrados. En esta vía, el ligando Wnt induce un alza en los niveles citoplasmáticos de β catenina al inhibir su proteólisis. El incremento en los niveles de β catenina permite su translocación al núcleo donde funciona como un co-activador al interactuar con factores de transcripción del tipo Lef/Tcf y así, activar genes de respuesta a Wnt. En ausencia de Wnt, los Tcf interactúan con co-represores del tipo Groucho y CtBP manteniendo los genes de respuesta a Wnt reprimidos. En pez cebra se conoce el gen *tcf3* como un componente importante de esta vía.

En este trabajo hemos clonado *tcf4* de pez cebra y demostramos que se expresa en forma de una serie de variantes de procesamiento. Las regiones reguladas por procesamiento alternativo corresponden a zonas de la proteína que interactúan con co-represores. Mediante hibridación *in situ* observamos que *tcf4* es expresado en el territorio neural que va a originar el cerebro anterior durante el estadio de néurula. Estudios de RT-PCR muestran que la expresión de las variantes de procesamiento es regulada a lo largo del desarrollo embrionario presentándose isoformas específicas en estadios cruciales para la especificación del territorio neural.

Para estudiar la función de *tcf4* en el establecimiento de los territorios del cerebro del pez recurrimos a experimentos de inhibición de la expresión de la proteína mediante oligonucleótidos antisentido y sobreexpresión mRNA de variantes de procesamiento específicas, tanto en embriones silvestres como en mutantes cigóticos *headless/tcf3a*. Los resultados de estos experimentos sugieren que hay al menos una

variante de *tcf4* que tiene ingerencia en la definición del patrón antero-posterior del cerebro del pez cebra.

SUMMARY

Wnt signal transduction pathway participates in anterior to posterior in vertebrate brain patterning. In this pathway, Wnt ligand induces an increase in cytoplasmatic levels of β catenin by inhibiting its proteolysis. The increase in β catenin levels drives its translocation to the nuclei where it interacts with Lef/Tcf transcription factors working as a co-activator, enhancing Wnt responsive genes. In absence of the Wnt ligand, Tcf's interact with Groucho and CtBP co-repressors, keeping Wnt down stream genes repressed. Zebrafish *tcf3* is known as a key player in this signal transduction pathway.

We report the cloning of zebrafish *tcf4* and demonstrate that it is expressed as several splice variant isoforms. The alternative exons codify regions of the protein that interact with co-repressors. In situ hybridisation analysis shows that *tcf4* is expressed in prospective forebrain territory during tailbud stage. Through RT-PCR experiments we demonstrate that *tcf4* splice variant expression is regulated throughout development displaying specific isoforms in stages where neural patterning is established.

In order to address *tcf4* function in early brain patterning in zebrafish we performed morpholino antisense knock down and specific isoform mRNA overexpression experiments, in wild type and zygotic *healdless/tcf3a* mutant embryos. Our results suggest that there is at least one *tcf4* isoform that participates in anterior to posterior brain patterning in zebrafish embryo.

INTRODUCCION

1. Especificación antero-posterior del cerebro.

El cerebro de un vertebrado adulto está compuesto por neuronas agrupadas en estructuras anatómicas de diversa arquitectura celular, que presentan distintas funciones y que, en su conjunto, se asocian para generar un proceso cognitivo completo. Si comparamos el cerebro de distintas especies, en todos se encuentran áreas homologables en anatomía y función, a pesar de que en su tamaño, distribución y aspecto macroscópico pueden parecer muy distintos. A pesar de estas diferencias en el estado adulto, al observar los tejidos embrionarios de los cuales el cerebro se diferencia, los vertebrados de distintas especies presentan la misma estructura y organización morfológica. Temprano en el desarrollo, en el ectodermo neural que origina el sistema nervioso, se pueden reconocer cuatro dominios de anterior a posterior: cerebro anterior (proscéncéfalo) que origina el telencéfalo, ojos y diencéfalo; cerebro medio (mescencéfalo) que se diferencia al tectum; cerebro posterior (romboencéfalo) que da origen al cerebelo, oído, nervios craneales, puente y bulbo; y, por último, médula espinal (Figura 1). El proceso por el cual el tejido ectodérmico, en apariencia homogéneo, se diferencia a las distintas regiones antero-posteriores del sistema nervioso es un evento fundamental del desarrollo embrionario y es el tópico que abordamos en esta tesis.

El proceso de diferenciación antero-posterior del ectodermo neural ha sido sujeto de una serie de estudios en diversos organismos, siendo el modelo de inducción y transformación del neuroectodermo ampliamente aceptado (Nieuwkoop y Nigtevecht,

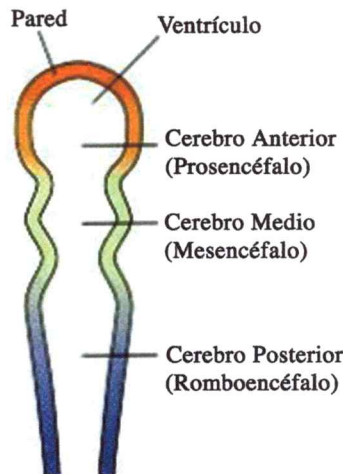


Figura 1. Esquema del tubo neural en el desarrollo embrionario.

1954). Este modelo plantea que en las primeras etapas del establecimiento del territorio neural, el ectodermo es “inducido” a una diferenciación con carácter neural anterior, específicamente prosencefálico, y que luego factores posteriorizantes “transforman” los tejidos caudales a las distintas regiones del sistema nervioso. Diversas líneas de investigación han revelado que las vías de transducción Wnt, FGF, nodal, BMP y del ácido retinóico son capaces de ejercer la función posteriorizante del neuroectodermo (Cox y Hemmati-Brivanlou, 1995; Blumberg y col., 1997; Kiecker y Niehrs, 2001a; Kudoh y col., 2002).

En base a evidencia molecular y genética (Bouwmeester y col., 1996; Glinka y col., 1998; Piccolo y col., 1999; Kim y col., 2000; Heisenberg y col., 2001; van de Water y col., 2001; Houart y col., 2002; Lagutin y col., 2003, Satoh y col., 2004), se ha determinado que el cerebro anterior es especificado mediante la inhibición local de la vía Wnt. Las proteínas Sfrp (*Secreted frizzled-related protein*; Bouwmeester y col., 1996; Piccolo y col., 1997; Houart y col., 2002) funcionan evitando la unión de Wnt a su receptor. Por otro lado Dickkopf (Dkk) inhibe directamente la vía Wnt mediando la

internalización del receptor de Wnt (Glinka et al., 1997; Mao y col., 2001a; Mao y col., 2002). En el embrión esto ocurre por la secreción de Dkk y Sfrp's desde el mesodermo precordal (bajo el cerebro anterior) y desde el margen anterior del neuroectodermo (frente al cerebro anterior), respectivamente. La inhibición local de Wnt evitaría que el cerebro entero se posteriorice, manteniendo las regiones anteriores del neuroectodermo libres de actividad Wnt.

Se ha establecido que el proceso de especificación del cerebro anterior es posible gracias a tres eventos embriológicos: 1. expresión restringida de moléculas posteriorizantes, 2. expresión restringida de antagonistas de moléculas posteriorizantes, y 3. movimientos celulares que alejan el territorio prosencefálico presuntivo de la influencia de factores posteriorizantes (Foley y Stern, 2001; Wilson y Houart, 2004). Luego de la especificación general del territorio prosencefálico las vías Hedgehog, FGF, BMP, Nodal y nuevamente Wnt participan en la definición de sus sub-territorios (Wilson y Rubenstein, 2000; Wilson y Houart, 2004).

2. Vía de transducción de señales Wnt.

La vía de transducción de señales Wnt, denominada así por el ligando secretado Wnt, participa en la diferenciación de diversos tejidos desde el desarrollo temprano así como también en la organogénesis y proliferación de células troncales de metazoos (Logan y Nusse, 2004). Los Wnt son una familia de glico-proteínas palmitoiladas (Willert y col., 2003) que funcionan como morfógenos, es decir que luego de ser secretadas son capaces de inducir distintas respuestas celulares en función de la concentración de ligando a la cual son expuestas las células (Zecca y col., 1996; Cadigan

y col., 1998; Strigini y Cohen 2000; Kiecker y Niehrs, 2001; Nordstrom y col., 2002). Sin embargo, un gradiente de Wnt sólo ha sido constatado en *Drosophila*, permaneciendo aún en duda si es que también funciona así en vertebrados (Zecca y col., 1996; Cadigan y col., 1998; Strigini y Cohen 2000). Se ha demostrado que los Wnt se encuentran asociados a membrana y que su secreción no implica la simple difusión de la proteína, sino que ésta sería transportada por transcitosis mediada por argosomas (Greco y col., 2001) o asociada a proteoglicanos de heparán sulfato en la matriz extracelular (Lin y Perrimon, 1999; Tsuda y col., 1999; Lin y Perrimon, 2000; Baeg y col., 2001).

La vía Wnt canónica funciona en la diferenciación, especificación y proliferación de células regulando los niveles de la transcripción de genes blanco. En un modelo muy simplificado el eje receptor heterodímero Frizzled(Fzd)/LRP, β catenina y factores de transcripción del tipo Lef/Tcf son las piezas fundamentales en la vía de señalización (Figura 2). El resto de las proteínas involucradas en la vía de alguna forma participan regulando en forma positiva o negativa estos tres elementos base (Logan y Nusse, 2004).

Cuando las células no están expuestas a Wnt (Figura 2a), los niveles citoplasmáticos de β -catenina se mantienen bajos por un estricto control mediado por degradación en el proteosoma. La fosforilación de β -catenina por parte de CK1 α (Amit y col., 2002; Liu y col., 2002; Yanagawa y col., 2002) y GSK-3 β (Yost y col., 1996; Behrens y col., 1998) es promovida por un sistema de andamiaje formado por APC y Axina que permite la interacción de las quinasas con β catenina (Hart y col., 1998; Kishida y col., 1998). β catenina fosforilada es reconocida por β -TrCP, el que la destina a

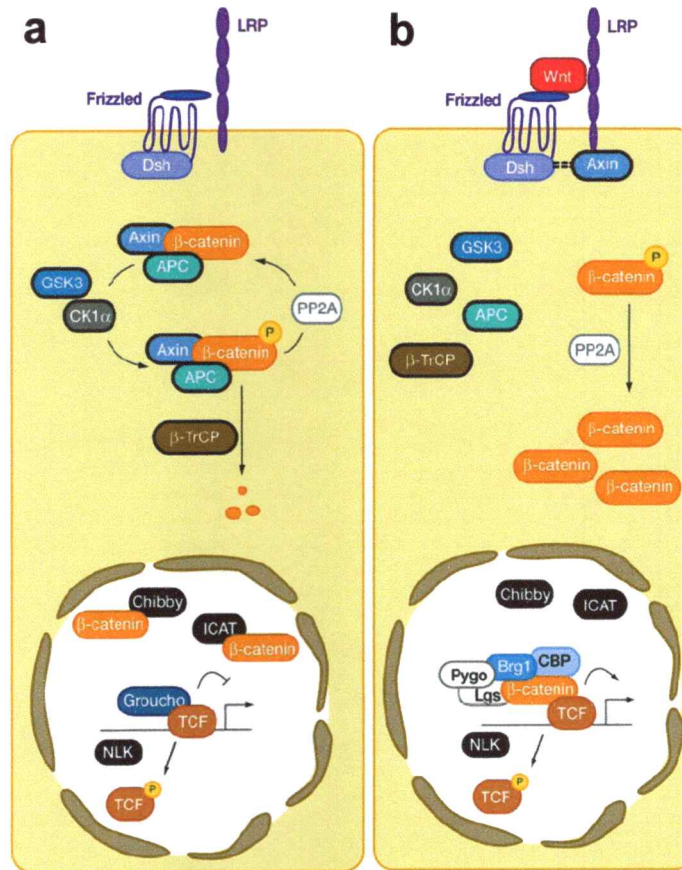


Figura 2. Representación de la vía Wnt (adaptado de Logan y Nusse, 2004).

ubiquitinación y posterior degradación en el proteosoma (Aberle y col., 1997; Latres y col., 1999; Lui y col., 1999). A baja concentración de βcatenina, los factores de transcripción Lef/Tcf interactúan con moduladores de cromatina, Groucho y CtBP, que funcionan como co-represores reclutando histona deacetilasas que mantienen condensada la cromatina, reprimiendo así los genes río abajo de Wnt (Brannon y col., 1997; Cavallo y col., 1998; Rosse y col., 1998; Chen y col., 1999; Brantjes y col., 2001).

Aun no está claro cómo el complejo receptor Fzd/LRP unido a Wnt transduce la señal río abajo, sin embargo, hay una serie de antecedentes que han permitido plantear un modelo de trabajo (Figura 2b). Cuando las proteínas Wnt interactúan con el

heterodímero receptor Fzd/LRP (Bhanot y col., 1996; Pinson y col., 2000; Tamai y col., 2000; Wehrli y col., 2000) ocurre la fosforilación de la proteína Dishevelled (Dsh) (Yanagawa y col., 1995) y de LRP (Tamai y col., 2004). Se ha demostrado que Dsh interacciona con el segmento intracelular de Fzd (Chen y col., 2003; Wong y col., 2003) y que esta región de la proteína es necesaria para la transducción de la señal (Umbhauer y col., 2000). La interacción de Wnt con el receptor también promueve la translocación de Axina a la membrana plasmática, la que a su vez interacciona con la región intracelular de LRP (Mao y col., 2001b; Tolwinski y col., 2003). Axina y Dsh poseen dominios DIX por los cuales se ha postulado que pueden conformar un heterodímero (Itoh y col., 2000). La fosforilación de Dsh se ha relacionado con la inhibición de la actividad quinasa de GSK-3 (Yanagawa y col., 1995), sin embargo, esto podría deberse a que la translocación de Axina a la membrana plasmática desarma el complejo que permite la fosforilación de β catenina y, por ende, evita su ubiquitinación. En resumen, el modelo plantea que la unión de Wnt a su receptor incide en la translocación de Axina a la membrana plasmática en un proceso mediado por Dsh. La redistribución de Axina evitaría el ensamblaje del complejo que permite la fosforilación de β catenina y por ende su ubiquitinación (Logan y Nusse, 2004). Esto explicaría por qué la respuesta estereotipada de una activación de la vía Wnt es la desfosforilación y el aumento de los niveles citoplasmáticos y nucleares de β catenina (Miller y Moon, 1997; Cox y col., 1999; Tolwinski y Wieschaus, 2004).

Se ha encontrado que la vía Wnt está activada constitutivamente en muchas formas de cáncer en que se ha estudiado, siendo la más frecuente el cáncer de colon (Giles y col., 2003). Es muy relevante para el mecanismo de la vía el hecho de que en

ninguno de los casos resulta ser una mutación en la proteína Wnt la que causa la patología, sino que en β catenina, APC y en algunos casos Axina, las últimas dos funcionando como mediadoras en el proceso de ubiquitinación de β catenina. Mutaciones en estas proteínas inciden en un aumento de los niveles citoplasmáticos y nucleares de β catenina, lo que en definitiva se traduce en una transactivación constitutiva del complejo β catenina-Lef/Tcf (Korinek y col., 1997; Morin y col., 1997; Rubinfeld y col., 1997) y por consiguiente la regulación positiva de genes blanco de Wnt como Ciclina D y c-Myc (He y col., 1998; Tetsu y McCormick, 1999).

Al aumentar sus niveles citoplasmáticos, β catenina entra al núcleo en un proceso mediado por Pygopus y Legless (Townesley y col., 2004). Una vez en el núcleo, β catenina interacciona con las proteínas Lef/Tcf revirtiendo la represión de la transcripción y activando los genes de respuesta a Wnt (Behrens y col., 1996; Molenaar y col., 1996; van de Wetering y col., 1997). Para esto, β catenina media la interacción entre los factores de transcripción Lef/Tcf y los coactivadores de la transcripción CBP/p300 (Hecht y col., 2000; Takemaru y Moon, 2000) y Brg-1 (Barker y col., 2001). Ambos co-activadores interaccionan con la región carboxilo terminal de β catenina y modifican la estructura de la cromatina, CBP/p300 acetilando histonas y Brg-1 remodelando la cromatina como parte del complejo SWI/SNF (Barker y col., 2001). Esta misma región de β catenina interacciona con TATA box Binding Protein (TBP), lo que permite el anclaje del complejo regulador a la maquinaria de transcripción (Hecht y col., 1999). De este modo, las proteínas Lef/Tcf participan como un nexo entre la maquinaria de transcripción y los promotores de los genes blanco de regulación, funcionando como

un interruptor transcripcional, el que en ausencia de Wnt reprime y en presencia de Wnt activa genes (Hurlstone y Clevers, 2002).

3. Factores de transcripción Lef/Tcf.

Los factores de transcripción Lef/Tcf (Lymphoid enhancer factor/T-cell factor) participan en la última etapa de la vía Wnt canónica y su unión como monómero a determinados promotores define qué genes serán activados. El primer factor que fue identificado, Lef-1, regula la expresión del gen de respuesta inmune TCR1 α (Travis y col., 1991; Waterman y col., 1991). A la fecha, la familia Lef/Tcf en vertebrados está compuesta por cuatro miembros: Lef-1, Tcf-1, Tcf-3 y Tcf-4; siendo las regiones de interacción con β catenina, Gro/Tle y DNA el común denominador en todos (Figura 3; Hurlstone y Clevers, 2002).

Las cuatro proteínas comparten una zona casi idéntica de interacción con DNA (HMG box) que une la secuencia consenso “AGATCAAAGGG”, lo que sugiere que todos tienen el potencial para regular los mismos genes (Giese y col., 1991; van de Wetering y col., 1991; van Beest y col., 2000). Las proteínas Lef/Tcf no son capaces de modular la transcripción por sí solos, sino mediante su interacción con co-activadores y co-represores (Hurlstone y Clevers, 2002). Así, la trans-activación de genes va a depender de la interacción con β catenina y la trans-represión, de su interacción con los co-represores Gro/Tle y CtBP.

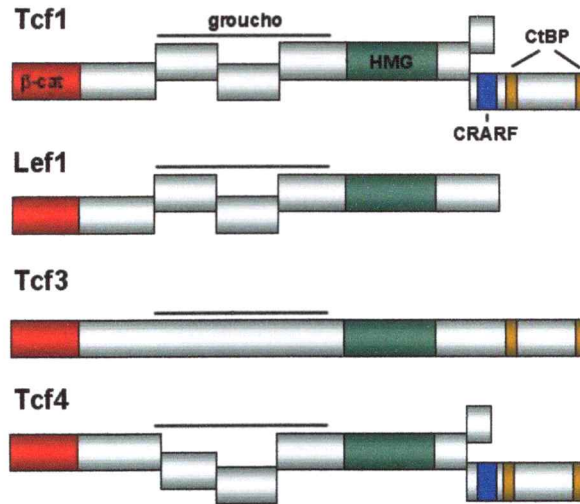


Figura 3. Esquema de las regiones de las proteínas Lef/Tcf. Representados en rojo, región de unión a β catenina; verde, región de interacción con DNA; azul, sitios CRARF; amarillo, sitios de interacción con CtBP. Barra sobre esquema de proteínas indica la zona de interacción con groucho.

La actividad del complejo β catenina-Lef/Tcf es regulada negativamente por NLK (Nemo Like Kinase), una MAP2K que inhibe su unión a DNA mediante fosforilación directa de Lef/Tcf (Ishitani y col., 1999; Ishitani y col., 2003). Las proteínas Chibby e I-cat también inhiben el complejo de transactivación evitando la interacción entre β catenina y Lef/Tcf al generar un impedimento estérico por unión directa a β catenina (Figura 2; Tago y col., 2000; Daniels y Weis, 2002; Takemaru y col., 2003). Este mecanismo podría impedir que β catenina active la transcripción de genes a niveles basales de actividad de la vía Wnt. El ratón KO de I-cat presenta un fenotipo característico de embriones con activación constitutiva de la vía Wnt en tejidos en que la vía esta normalmente reprimida (Sato y col., 2004). Por otro lado, se ha observado que Wnt-1 puede activar la vía Talk1/NLK usando una rama alternativa a la vía Wnt

canónica. Esto podría representar un mecanismo de retroalimentación negativo para contrarrestar la activación de Wnt y modular la intensidad o temporalidad de la respuesta a Wnt (Smit y col., 2004).

La participación de la vía Wnt canónica en distintos programas de diferenciación implica que debe existir una forma en que la señal es destinada a activar la transcripción de grupos de genes específicos para determinadas funciones celulares. Los factores Lef/Tcf interactúan con la misma secuencia de DNA, sin embargo, también poseen variantes transcripcionales producto del uso alternativo de promotores y exones que generan proteínas que carecen de regiones esenciales para su función. Por ejemplo, Lef-1 y Tcf-1 pueden usar un inicio de la transcripción alternativo que da origen a variantes de estos genes sin el dominio de interacción con β catenina (van de Wetering y col., 1996; Hovanes y col., 2000). Estas variantes funcionan antagonizando la actividad de Wnt, manteniendo un estado de represión constitutivo. Mediante el procesamiento alternativo de mRNA, los genes Tcf-1 y Tcf-4 pueden excluir secuencias que codifican para las regiones CRARF, de interacción con CtBP y, en teoría, *gro/tle* (van de Wetering y col., 1996; Duval y col., 2000; Young y col., 2002). Las secuencias CRARF y de interacción con CtBP se encuentran en el extremo carboxilo terminal de estos Tcf (Figura 3). Un evento de procesamiento alternativo en la región 3' de sus mRNA genera dos tipos de variantes con codones de término de la transcripción prematuros, por lo que Tcf-1 y -4 pueden presentar variantes cortas, medianas y largas, siendo estas últimas las únicas que poseen el dominio CRARF y de interacción con CtBP. Esta región de los Tcf ha mostrado ser importante en la discriminación de ciertos promotores y, por lo tanto es una forma de regulación que incide directamente en la selección de distintos programas de

diferenciación (Atcha y col., 2003; Hecht y Stemmler, 2003; Valenta y col., 2003). Se ha establecido que la zona comprendida entre el dominio de interacción con β catenina y DNA es capaz de unir los co-represores Gro/Tle a todos los Lef/Tcf descritos (Figura 3; Cavallo y col., 1998; Roose y col., 1998; Brantjes y col., 2001). En esta misma región se ha observado que Tcf-1 y Tcf-4 presentan exones alternativos, lo que podría incidir en la expresión de variantes que no pueden interactuar con proteínas Gro/Tle. Sin embargo, faltan estudios funcionales y de interacción proteína-proteína que avalen esta hipótesis (van de Wetering y col., 1996; Duval y col., 2000; Young y col., 2002).

Los Lef/Tcf son el último punto susceptible a regulación en la vía Wnt canónica, y por esta razón, toda la información producto de la modulación negativa y positiva por parte de factores y vías de transducción de señales paralelas, será finalmente procesada a nivel transcripcional. Entender cómo operan los factores Lef/Tcf para discriminar y regular la transcripción de distintos grupos de genes es fundamental para dilucidar la forma en que las células interpretan la inducción por parte de las proteínas Wnt ya descritas.

4. Vía Wnt y desarrollo del cerebro anterior en pez cebra y otros modelos.

a. Pez cebra (*Danio rerio*) como modelo embriológico.

El pez cebra es un modelo ya consolidado en el estudio del desarrollo embrionario por las ventajas biológicas y genéticas que presenta respecto a otros modelos vertebrados. Exhibe un desarrollo embrionario externo y rápido de cientos de embriones por cruce que miden aproximadamente 1mm, lo que permite la microinyección y su estudio bajo una lupa de disección. El hecho de que sus tejidos

embrionarios sean transparentes facilita la visualización por simple microscopía de todos los tipos celulares sin la necesidad de hacer cortes o disecciones. En él se han desarrollado las técnicas moleculares de transgénesis, lo que ha permitido generar una completa colección de líneas que expresan GFP bajo el control de promotores tejido específicos. El uso de peces transgénicos combinado con la translucidez de sus tejidos ha permitido el estudio detallado del desarrollo morfológico del embrión vivo mediante microscopía de fluorescencia y confocal. El proyecto genoma del pez cebra está cerca de concluir y ya existe acceso a casi la totalidad de las secuencias genómicas en bases de datos públicas, lo que facilita el clonamiento de genes y secuencias reguladoras. Desde el punto de vista genético, el pez cebra es diploide, característica que ha permitido el desarrollo de proyectos de mutagénesis química y retroviral a gran escala (Driever y col., 1996, Haffter y col., 1996, Amsterdam y col., 1999). Estos proyectos han generado una colección de mutantes de genes esenciales en procesos morfológicos y celulares que participan en el desarrollo embrionario. En particular los mutantes *masterblind/axin1* y *headless/tcf3a* han aportado valiosa información al estudio de la especificación del cerebro anterior a través de la vía Wnt (Kim y col., 2000; Heisenberg y col., 2001; van de Water y col., 2001).

b. Vía Wnt y el desarrollo del cerebro anterior.

Durante la gastrulación el neuroectodermo presenta dos territorios separados por el límite entre el cerebro medio y posterior. La parte anterior de estas zonas va a dar origen al prosencéfalo y mesencéfalo, y la región posterior al romboencéfalo y la médula espinal (Figura 1; Wurst y Bally-Cuif, 2001; Kudoh y col., 2002). Este primer bosquejo del neuroectodermo es establecido por antagonistas de la vía Wnt que permiten la

especificación de la mitad anterior del territorio (Kudoh y col., 2002). Luego, ambos territorios van a ser reespecificados para generar las divisiones finales de los territorios del sistema nervioso, proceso en el que participan las vías Wnt, Nodal, Hedgehog, y FGF (Wurst y Bally-Cuif, 2001; Wilson y Houart, 2004). Se ha propuesto que la secreción local de Wnt desde el límite entre el cerebro medio y posterior participa en la diferenciación del mesencéfalo y que el prosencéfalo es especificado por moléculas que antagonizan estos Wnt, tal como en las primeras etapas de la inducción neural, pero ahora a nivel local (Stern, 2001; Wilson y Houart, 2004).

El tratamiento de embriones de una serie de especies con cloruro de litio genera dramáticos efectos sobre su desarrollo (Kao y Elinson, 1988; Stachel y col., 1993). En los embriones tratados con cloruro de litio luego de iniciada la gastrulación, se observan alteraciones en la diferenciación de regiones del cerebro, específicamente desaparece el telencéfalo y los ojos a expensas del diencéfalo, fenotipo similar al que se observa al sobreexpresar el mRNA de *wnt8* (Figura 4; Fredieu y col., 1997; Kim y col., 2002).

El litio inhibe la actividad de Gsk3 β y como consecuencia provoca una activación constitutiva de la vía Wnt al evitar la fosforilación y posterior degradación de β catenina, situación análoga a la activación de la vía por parte de su ligando (Hedgepeth y col., 1997; Klein y Melton, 1996). Este fue uno de los primeros indicios que relacionaron la especificación del cerebro anterior con una inhibición local de la vía Wnt y también explica la necesidad de inhibir localmente su actividad mediante antagonistas para la diferenciación de esta región del cerebro.

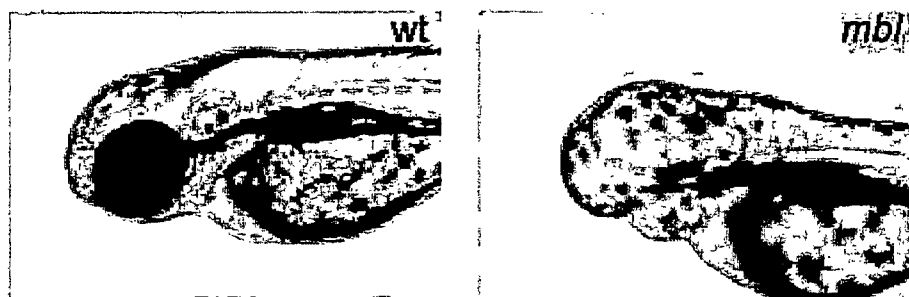


Figura 4. Comparación de embrión de pez cebra silvestre y mutante *masterblind*.

a. Embrión de pez cebra, 48 hpf. B. Embrión mutante *masterblind* de fenotipo similar a embriones tratados con cloruro de litio o sobreexpresión de *wnt8b*. Adaptado de van de Water y col. (2001).

La fuente de las moléculas antagonistas de Wnt es el mesodermo precordial ubicado bajo el neuroectodermo anterior al final de la gastrulación, y el margen anterior del neuroectodermo (Kazanskaya y col., 2000; Kiecker y Niehrs, 2000; Houart y col., 2002; Wilson y Houart, 2004). El tejido análogo al mesodermo precordial en ratón es el AVE (anterior visceral endoderm) y los mutantes que carecen de este tejido son incapaces de especificar el cerebro anterior (Foley y Stern, 2001; Wilson y Houart, 2004). El mesodermo precordial expresa el gen *dkk* que codifica para una proteína secretada que interactúa con las moléculas de trans-membrana Kremen y LRP, promoviendo su internalización y así inhibiendo la vía Wnt al evitar la formación del complejo receptor Fzd/LRP (Glinka y col., 1998; Mao y col., 2001a; Mao y col., 2002). La inhibición de Dkk mediante anticuerpos específicos genera embriones de fenotipo cíclope y carente de telencéfalo (Kazanskaya y col., 2000). Por el contrario, la sobreexpresión de Dkk en embriones provoca un aumento del tamaño del telencéfalo y ojos (Kazanskaya y col., 2000; Shinaya y col., 2000). Resulta interesante que la

aparición de una cabeza con un cerebro anterior elaborado y ojos bilaterales en la evolución de los cordados es contemporánea a la del mesodermo precordial, lo que sugiere que este tejido es requisito para la generación de la “cabeza moderna” (Gans y Northcutt, 1983).

El margen anterior del ectodermo neural ha demostrado ser importante para la especificación del proscencéfalo ya que en ausencia de este tejido los embriones carecen de telencéfalo y ojos (Shiamura y Rubenstein, 1997; Houart y col., 1998). Transplantes de este grupo celular son capaces de inducir un cambio en el destino de diferenciación celular desde diencéfalo a telencéfalo, lo que sugiere propiedades antagónicas a Wnt (Houart y col., 1998). Además, se identificó *tlc1* como una proteína de la familia SFRP que se expresa en este tejido y que da cuenta de todas sus propiedades en la especificación del cerebro anterior (Houart y col., 2002).

En el embrión mutante de *masterblind* (*mbl*) no se especifica el telencéfalo y ojos, territorios que son eliminados a expensas del diencéfalo y mesencéfalo, tal como ocurre al sobreexpresar *wnt8b* o en tratamientos con litio (Heisenberg y col., 1996; Masai y col., 1997). El mutante *mbl* presenta una mutación puntual en el gen *axina1* que evita la interacción entre Axina y el complejo de fosforilación de β catenina, lo que genera un incremento de los niveles de β catenina, efecto análogo a una activación constitutiva de la vía Wnt (Heisenberg y col., 2001; van de Water y col., 2001). Este mismo tipo de fenotipo se observa en ratones KO para los genes *i-cat* y *six3*, siendo ambos genes reguladores negativos de la actividad de Wnt (Lagutin y col., 2003; Satoh y col., 2004).

El mismo fenotipo de ausencia de telencéfalo y ojos ocurre en los mutantes materno-cigóticos de *headless/tcf3a* (*mzhdl*; Kim y col., 2000). La interpretación de este fenotipo no es tan directa como en los otros mutantes descritos, ya que los Tcf funcionan como activadores o represores de la vía dependiendo de la actividad de Wnt y, finalmente, de la concentración celular de β catenina. El fenotipo de este mutante da cuenta de que en ausencia de Tcf habría transcripción de genes río abajo de Wnt en territorios donde normalmente la vía se encuentra inactiva. De esto se concluye que la función represora de Tcf en ausencia de actividad Wnt es necesaria para mantener activamente reprimidos los genes regulados por Wnt y que la ausencia de la actividad de Wnt no es suficiente para evitar la transcripción de estos genes. Sin embargo, no es claro cuánto de este fenotipo es debido a alteraciones en el mesodermo, ya que el mutante cigótico de *hdl* (*zhdl*) no presenta fenotipo alguno (Kim y col., 2000). En ratón, el mutante de *tcf3* no es viable producto de fallas en la especificación dorsoventral del mesodermo (Merrill y col., 2004). En el mutante *mzhdl* la ausencia de componente materna podría incidir en una variación sutil en el patrón dorsoventral del mesodermo, lo que se reflejaría en un efecto profundo sobre la especificación antero-posterior del cerebro en embriones *mzhdl*. Lo anterior implicaría que, probablemente, la componente materna del *tcf3a* es suficiente para evitar un fenotipo más profundo en embriones *zhdl*, cosa que no ha sido estudiada en profundidad. Por otro lado, existe la posibilidad de que otros tcf como *tcf1* o *tcf4* expresados en el cerebro respalden la función de *tcf3* en el mutante *zhdl*, evitando que se genere un fenotipo más profundo (Cho y Dressler, 1998; Koing y col., 2000; Roel y col., 2003).

En base a estos antecedentes proponemos la siguiente hipótesis:

La acción de distintos Tcf en combinación es necesaria para la correcta especificación del cerebro anterior de pez cebra (*Danio rerio*).

Los objetivos son:

1. Clonar el factor de transcripción tcf4 de pez cebra
2. Estudiar el patrón de expresión de tcf4 en pez cebra
3. Estudiar la función de tcf4 en el desarrollo del cerebro del pez cebra.

MATERIALES Y METODOS

MATERIALES

Material Biológico y Embriológico

En el desarrollo de los experimentos se utilizó embriones de *Danio rerio* (pez cebra) obtenidos mediante cruces espontáneos. Los plásmidos utilizados se amplificaron previa transformación con golpe de calor en bacterias *Escherichia coli* DH5 α (Clontech) y JM109 (Promega).

- Capilares para agujas de microinyección (Sutter)
- Pinzas de relojero Dumont N°5

Lista de Oligonucleotidos

TCF4-F1-N (Para RACE 3')

5' CTG AAA GAG AGC GCA GCT ATC AAC C 3'

TCF4-F2-N (Para RACE 3')

5' AAG GTG GCA CGC TCT GTC GCG AG 3'

TCF4-R1-N (Para RACE 5')

5' TCT TTC AGT GTG CAC TCT GCC ACC 3'

TCF4-R2-N (Para RACE 5')

5' AAG CAT GAA CGC GTT CAG AGG TTT C 3'

M13F

5' G TAA AAC GAC GGC CAG 3'

M13R

5' CAG GAA ACA GCT ATG AC 3'

Tcf-5'1F

5' CGT CTC CGG CTT CTG TCT CTG C 3'

Tcf-3'R2

5' GCG ACA GAC GTA CAG ACA GAC AG 3'

Tcf4 5'F2

5' TCA AAA CAGCTC TTC GGA TTC CGA G 3'

Tcf4 F3

5' GCA ATG AGC ACT TCA CGC CTG G 3'

Tcf4 F4

5' AGT GAC ATC GGA TCC CTC AAC AGC 3'

Tcf4 3'F1

5' CAG GAG AGG GCA ATG AAC ACA G 3'

Tcf4 F6

5' CCG TCT TCG AAA GAG TCC AAA CCA C 3'

Reactivos de Biología Molecular

- SP6, T3 y T7 RNA polimerasas (Roche)
- Taq polimerasa (Gibco/Life science)
- Expand Long Polymerase (Roche)
- Enzimas de restricción y T7 ligasa (New England Biolabs)
- Kit de síntesis de mRNA SP6 y T7 (Ambion)
- Columna RNA mini spin (Roche)

-Morpholinos antisentido, Gene Tools

Mo1 Tcf4 5' C ACC ACC GTT CAG CTG CGG CAT TTT 3'

Mo2 Tcf4 5' TTA AAC CCT TGA TCT TGG TGT GAT C 3'

Mo2 Tcf3b 5' CAT GTT TAA CGT TAC GGG CTT GTC T 3'

- Marcador de peso molecular de DNA 1kb (Promega)

- Marcador de masa de DNA EZ-Load (Biorad)

- Marcador de peso molecular de proteínas Rainbow (Amersham)

- Membranas de nylon para Westernblot (Roche)

- UTP-digoxigenina (Roche)

- UTP-fluoresceina (Roche)

- Anticuerpo anti-digoxigenina (Roche)

- Anticuerpo anti-fluoresceina (Roche)

- mix NTP/BCIP Roche

- Rojo fenol (Sigma)

- BMBR-Blocking Reagent (Roche)

- RNA de tórula (Sigma)

- Anticuerpo anti htcf4 N-20 (Santa Cruz Biotech)

- Anticuerpo anti gama tubulina (Sigma)

- Anticuerpo anti mouse IgG (Amersham)

- Anticuerpo anti goat IgG (Santa Cruz Biotech)

Soluciones

- MABT (ácido maleico 100mM, NaCl 150mM, Tween 20 0,1%, pH 7,5)
- MAB/BMBR (BMBR 2% en MABT)
- Solución AP (TRIS 100mM, MgCl₂ 50mM, NaCl 100mM, Tween 20 0,1%, pH 9,5)
- PBST (PBS, tween 0,1%)
- Mezcla digoxigenina (ATP, GTP y CTP 2,5mM; UTP 1,625mM; UTP-dig 0,875)
- Mezcla fluoresceína (ATP, GTP y CTP 2,5mM; UTP 1,625mM; UTP-flu 0,875)
- Soluciones de lavado de sonda para hibridación *in situ*
 1. Formamida 75%, SSC 2X, Tween 20 0,1%
 2. Formamida 50%, SSC 2X, Tween 20 0,1%
 3. Formamida 25%, SSC 2X, Tween 20 0,1%
 4. SSC 2X, Tween 20 0,1%
 5. SSC 0,2X, Tween 0,1%
- Tampón de hibridación (Formamida 50%, SSC 5X, Heparina 50µg/ml, RNA torula 500µg/ml, Tween20 0,1%, ácido cítrico 0,092M)
- Tampón de lisis para extracción de DNA genómico (TRIS 100mM pH 8,0, NaCl 100mM, EDTA 10mM, SDS 0,2%, Proteinasa K 200µg/ml)
- Sample Buffer para extracción de proteínas (TRIS 62,5mM pH6,8, SDS 2%, βmercapto etanol 1%, Glycerol 1%, Azul de Bromofenol 0,01%)
- Ringers+ (NaCl 116mM, KCl 2,9mM, CaCl₂ 1,8mM, Hepes 5mM, PMSF 0,3mM, pH 7,2)

Lista de Plasmidos

| <u>Nombre</u> | <u>Vector</u> | <u>Propósito</u> | <u>Enzima</u> | <u>Polimerasa</u> |
|---------------|---------------|------------------|---------------|-------------------|
| En3 | -- | Sonda | BamHI | T3 |
| Fgf8 | pCSII | Sonda | XhoI | SP6 |
| Fkd3 | -- | Sonda | BamHI | T7 |
| Fkd4 | -- | Sonda | XhoI | T3 |
| Irx1 | BS(KS) | Sonda | BamHI | T7 |
| Krox20 | -- | Sonda | PstI | T3 |
| Nk2.1a | BS(KS) | Sonda | SacI | T3 |
| Pax2.1a | -- | Sonda | BamHI | T7 |
| Rx3 | BS(SK) | Sonda | XbaI | T7 |
| Shh | -- | Sonda | EcoRI | T7 |
| Six3 | BS(SK) | Sonda | BamHI | T7 |
| Tlc | -- | Sonda | XhoI | T7 |
| Tcf4 | BS(SK) | Sonda | KpnI | T3 |
| Tcf4-45L | pSCII-MT | Sobreexpresión | NotI | SP6 |
| Tcf4-4bL | pSCII-MT | Sobreexpresión | NotI | SP6 |
| Wnt1 | -- | Sonda | EcoRI | SP6 |
| Wnt8b | -- | Sonda | HinDIII | SP6 |

METODOS

1. Clonamiento del cDNA de *tcf4* de *Danio rerio*.

Para el clonamiento de los extremos 5' y 3' de *ztcf4* se diseñaron los primers Tcf4-R1-N, Tcf-R2-N y Tcf4-F1-N, Tcf4-F2-N respectivamente. En la primera ronda de PCR se uso el mix1 y usando el siguiente protocolo de amplificación:

1. 2min. 94°C
2. 30seg. 94°C
3. 30seg. 62°C
4. 2 min. 72°C
5. Volver a paso 2. 30 veces
6. 20seg. 94°C
7. 7min. 72°C

Luego se realizó la segunda ronda de PCR usando el mix2 el mismo programa de PCR que en la primera ronda pero subiendo la temperatura del paso 3. a 65°C y volviendo al paso 2. 35 veces.

mix1

2,5µl Buffer 10X
0,5µl Universal Primer mix
1µl Primers F2 o R2 a µM
0,5µl dNTP mix 10mM
0,5µl Taq
0,75µl MgCl₂ 25mM
1µl DNA genoteca 48 hpf RACE
17,75µl H₂O

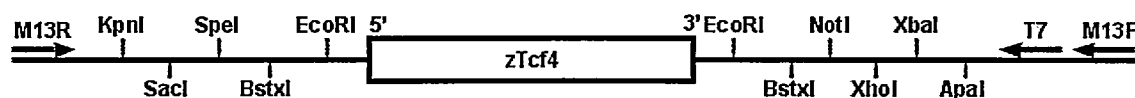
mix2

5µl Buffer 10X
2µl Nested Universal Primer 10µM
2µl Primers F1 o R1 a 10µM
1µl dNTP mix 10mM
1µl Taq
1,5µl MgCl₂ 25mM
1µl DNA PCR primera ronda
35,5µl H₂O

La totalidad del producto de PCR de la segunda ronda fue cargado en un gel de agarosa al 1% para luego cortar trozo que contiene la banda amplificada y limpiar el DNA en una columna Quiaquick gel extraction (Quiagen). El DNA eluido fue clonado en pCR2.1 mediante un kit TA-cloning de Clontech y transformado en bacterias competentes DH5 α . De cada transformación se aisló 20 colonias, extrajo DNA plasmidial el cual fue digerido con EcoRI para comprobar si contenían un inserto del tamaño esperado. Seis clones positivos por digestión fueron secuenciados por triplicado por ambos lados del inserto con los partidores M13F y M13R.

En función de las secuencias obtenidas y estudios de alineamiento contra la base de datos NCBI se generaron partidores Tcf-5'-F1 y Tcf-3'R2 para obtener clones con la secuencia codificante de *tcf4* completa. Para esto se amplificó el DNA de *tcf4* a una temperatura de hibridación de 62°C, 30 ciclos, dos minutos de elongación y se uso como molde cDNA de pez cebra de 48hpf. El producto de PCR amplificado fue clonado al igual que los fragmentos RACE. Se aisló 20 colonias, extrajo DNA plasmidial el cual fue digerido con EcoRI para comprobar si contenían un inserto del tamaño esperado. Ocho clones positivos fueron secuenciados por triplicado con los partidores M13F, M13R, Tcf4 5'F2, Tcf4 F3, Tcf4 F4, Tcf4 3'F1 y Tcf4 F6.

La secuenciación muestra que todos los insertos fueron clonados en la misma orientación según el siguiente esquema:



El fragmento KpnI/XhoI de un clón de *tcf4* que contiene el marco de lectura completo fue subclonado en pBS(SK) para hacer sonda de mRNA.

2. Síntesis de Sonda para hibridación *in situ*

Para la síntesis de sondas se incubó 1µg de DNA digerido con la enzima de restricción correspondiente a 37°C en las siguientes condiciones:

2µl Transcription Buffer (Roche)

2µl RNA polimerasa (T3, T7 o SP6)

8µl Mix Digoxigenina o Fluoresceina

1µl DTT 0,1M

1µg de DNA digerido

H₂O libre de RNAsas hasta 20µl

Luego 18 horas de incubación se agregó 2µl de DNAsa y se incubó 30 minutos a 37°C.

Posteriormente se agregan 30µl de H₂O libre de RNAsas y se pasa la mezcla por una columna RNA mini spin (Roche) centrifugando 4 minutos a 1000g. El eluido es llevado a 1ml con tampón de hibridación.

3. Hibridación *in situ*

Los embriones utilizados fueron fijados en PFA 4% a 4°C durante 24 horas luego de las cuales se decorionaron con pinzas de relojero en PBST. Los embriones de 24 hpf se decorionaron previo a la fijación.

Todos los lavados e incubaciones se realizaron con agitación constante. Se trabajó en condiciones libres de RNAsas hasta completar el último lavado de la sonda.

Luego de la fijación se retiró el PFA se hacen tres lavados de diez minutos cada uno con metanol y rehidratación con tres lavados sucesivos de 5 min en metanol 75%, 50% y 25% v/v en PBST. A continuación se lavó tres veces durante cinco minutos con PBST luego de los cuales se trataron con una solución de proteinasa K 10µg/ml durante 1 min para embriones en estadio de bud y 5 min para embriones de 24 hpf. Inmediatamente después se hizo un lavado rápido con PBST para luego re-fijar los embriones en PFA 4% durante 20 min, luego de los cuales se lavó cinco veces durante cinco minutos con PBST y pasó a tampón de hibridación. Una vez equilibrados los embriones en el tampón, se retiró la solución y se agregó tampón de hibridación fresco hasta cubrir completamente los embriones. En esta etapa de pre-hibridación los embriones se incubaron a 65°C durante un mínimo de tres horas. La ribosonda se agregó luego de previa denaturación a 65°C por 10 min para hibridar durante al menos 16 horas a 65°C. El lavado de la ribosonda también se realizó a 65°C con incubaciones sucesivas de 10 minutos cada una con las soluciones de lavado de sonda 1, 2, 3 y 4. Los últimos dos lavados con solución 5 duran 30 minutos luego de los cuales se continuó con tres lavados de cinco minutos cada uno con PBST para después pasar a bloquear los sitios

inespecíficos para anticuerpos con MAB/BMBR por dos horas a temperatura ambiente. Al término de éste periodo se cambió el medio por anticuerpo anti-digoxigenina 1/5000 en MAB/BMBR incubando a 4°C durante toda la noche. A continuación se realizaron seis lavados de 20 minutos cada uno con PBST para lavar el exceso de anticuerpo. Previo al revelado de la fosfatasa alcalina los embriones se ambientaron en solución AP con dos lavados de 5 minutos, luego de los que se incubaron en solución NBT/BCIP en ausencia de luz a temperatura ambiente o 4°C hasta ver la aparición de marca.

4. Síntesis de mRNA para microinyección

Para sintetizar mRNA para inyección se utilizó el kit Ambion Message Machine SP6 y T7. Los mRNA sintetizados se precipitaron con cloruro de litio según las especificaciones del fabricante del kit para luego resuspender en agua libre de RNAsas. El mRNA fue cuantificado por extrapolación usando como referencia el marcador de masa EZ-Load (Biorad).

5. Mantenimiento de peces *Danio rerio* silvestres y líneas mutantes

Los peces usados en este estudio se mantuvieron en ciclos de luz y oscuridad de 12 horas, 28°C, en agua desionizada tratada con 60mg/L de Instant Ocean a pH 6,5 en el vivero de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile.

6. Identificación de peces y embriones mutantes *headless*

La mutación *headless* (*hdl*) introduce una mutación puntual en el genoma que genera un sitio de restricción MseI que no está presente en el genoma de peces silvestres

(Kim y col., 1999). Para identificar los distintos tipos de alelos presentes en los peces que se usaron se extrajo DNA genómico de peces o embriones el cual fue utilizado para amplificar un fragmento de 200pb por PCR con los partidores P2 y P3 a un tiempo de elongación de 30 segundos a 62°C. Estos partidores ubican el sitio MseI en el medio del fragmento. El producto de PCR es luego digerido con la enzima de restricción MseI. Si el DNA proviene de un pez silvestre se observa una banda de 200pb en un gel de agarosa al 2%; si es un heterocigoto se observa una banda de 200 y una de 100 en un gel al 2% y si el DNA proviene de un homocigoto mutante solo se observa una banda de 100pb (Kim y col., 2000).

7. Extracción de DNA genómico de embriones o colas de pez cebra

Para extraer DNA genómico de peces adultos se procede a anestésiar un pez en una solución de tricafina 4% hasta que permanece inmóvil, luego de lo que se procede a cortar la punta de su cola con un bisturí y depositar el tejido en un tubo eppendorf con 100µl de tampón de lisis. El tubo con la muestra de tejido se incuba a 50°C por un par de horas agitando el tubo cada media hora. Luego se agregan 150µl de etanol, se agita el tubo y centrifuga a 10.000g durante 2 min. Se elimina el sobrenadante y deja secar el precipitado a temperatura ambiente o 37°C. Una vez seco el DNA es resuspendido en 50µl de agua destilada e incubado durante media hora a 70°C para inactivar la proteinasa K remanente. Luego de este proceso la preparación de DNA genómico está lista para utilizar 1µl por reacción de PCR.

Para el "genotipo" de embriones individuales se usa este mismo protocolo pero lisisando un embrión en 50µl de buffer de lisis. Luego en la etapa final el DNA se resuspende en 10µl de agua destilada y se usan 5µl para la reacción de PCR.

8. Microinyección de embriones

Para la microinyección de embriones se usó una tapa de placa de Petri de plástico y sobre ella un portaobjetos de vidrio. Los embriones en estadio de una célula fueron depositados en el borde entre la tapa y el portaobjetos eliminando el exceso de medio, quedando adheridos por tensión superficial. Los embriones fueron inyectados con 10nl de una solución de mRNA y/o morfolino en rojo fenol al 10% en agua usando un inyector de presión de nitrógeno (Narishige).

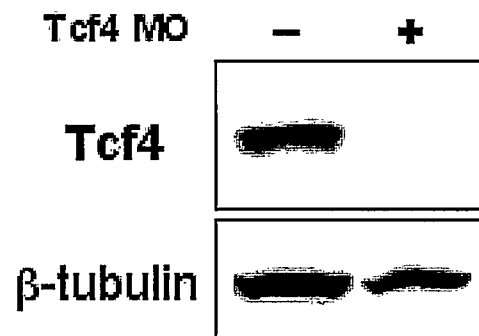
9. Extracción de proteínas y Western Blot

Previo a la extracción de proteínas 50 embriones son decorionados y llevados a 500µl de solución Ringer+ a 4°C. En este medio el vitelo es removido haciendo pasar los embriones por una pipeta Pasteur de un ancho no superior a un milímetro. Luego hay que lavar con Ringer+ un par de veces hasta que la solución de lavado es translúcida. Se centrifuga brevemente y se remueve el exceso de medio para luego agregar 5µl de Sample Buffer por embrión y agitar con vortex hasta homogeneizar. La muestra es luego hervida en agua durante 5 min para luego cargar 20µl por carril o congelar a -80°C.

Los western blot fueron realizados como descrito en el Manual de Biología Molecular (Sambrook y col., 1989) en geles de acrilamida-bisacrilamida al 12%. El gel

fue transferido a membranas de nitrocelulosa en cámara húmeda e incubado en anticuerpos primarios anti htcf4 (1:400) y anti gama tubulina (1:2000). Luego de incubar durante toda la noche y lavar el anticuerpo primario, incubamos en el anticuerpo secundario anti goat IgG (1:4000) para anti htcf4 y anti mouse IgG (1:2000) para anti gama tubulina.

El resultado de la extracción de proteínas de embriones de 24 hpf inyectados con el morfolino contra ztcf4 y análisis mediante western blot usando anticuerpo anti tcf4 humano se muestra a continuación.



RESULTADOS

1. Clonamiento y expresión de *tcf4* de pez cebra (*Danio rerio*)

a. Clonamiento de *tcf4* de pez cebra

Para el clonamiento de *tcf4* de pez cebra se dispuso de la secuencia de un fragmento de 303 pb (numero de acceso a Gene Bank: A136455) de *tcf4* previamente reportada por Dorsky y col.(1999). En base de esta secuencia se diseñaron partidores para realizar RACE (Rapid Amplification cDNA Ends) hacia los extremos 5' y 3' del gen usando como molde una genoteca de pez cebra de 48hpf. El análisis de los alineamientos de las secuencias de los distintos clones demostró que había regiones ausentes en las secuencias, lo que coincide con lo descrito por Duval y col. (1999) para *tcf4* humano. En base a las secuencias obtenidas y estudios de alineamiento contra la base de datos NCBI se generaron partidores para amplificar la secuencia codificante de *tcf4* completa. En función de los alineamientos de proteínas traducidas a partir de los clones secuenciados determinamos que *tcf4* de pez cebra posee una alta homología con *tcf4* de humano y de ratón, especialmente en las zonas de interacción con β catenina, DNA(HMG box), CRARF y CtBP (Figura 5).

En el alineamiento de la Figura 5 sólo se muestran los posibles exones y carboxilo terminal (C-terminal) alternativos identificados. En un análisis de amino carboxilo terminal observamos que la zona de interacción con β catenina sólo difiere en dos aminoácidos de 53 respecto a *tcf4* de humano y ratón. Los aminoácidos no homólogos no son esenciales para la interacción entre ambas proteínas (Omer y col., 1999, Graham y col., 2001; Knapp y col., 2001; Poy y col., 2001).

β-catenin

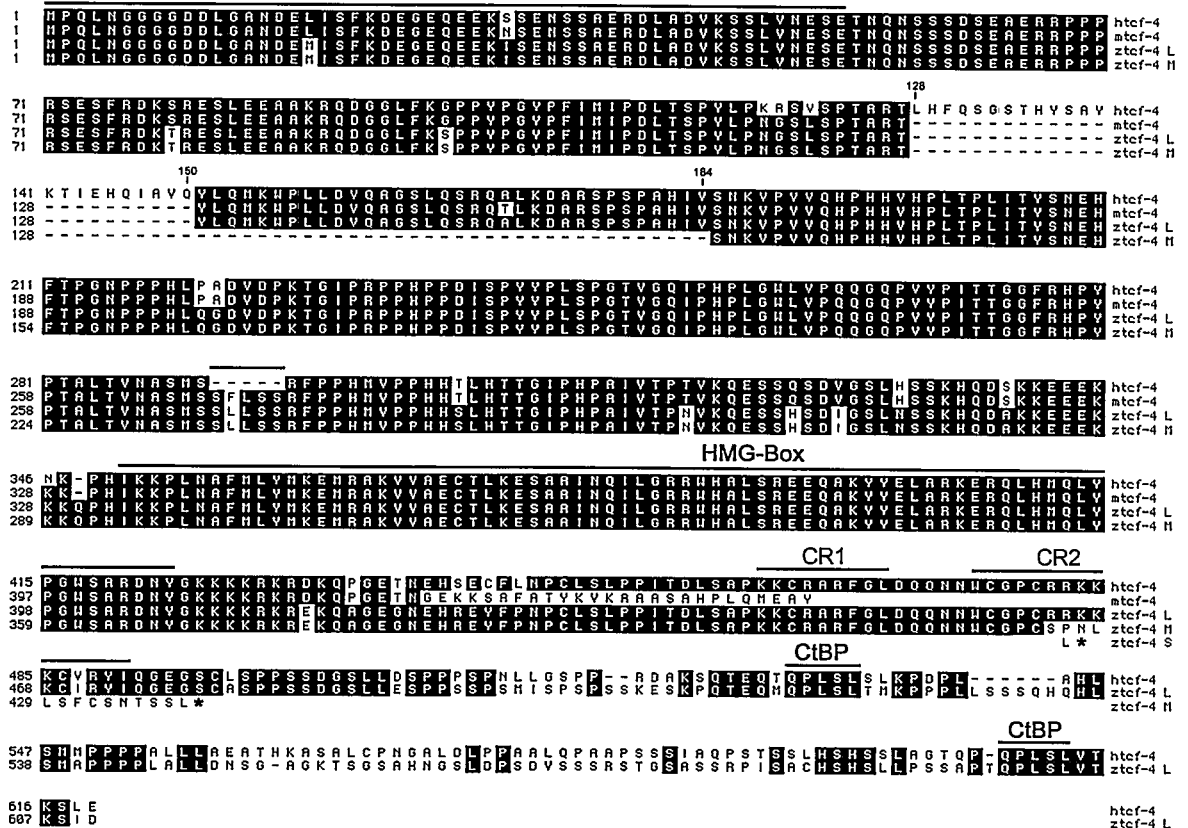


Figura 5. Alineamiento de secuencia aminoacídica de *tcf4* humano, de ratón y variantes larga, mediana y corta de pez cebra. Solo se muestra el último aminoácido de la variante corta, ya que es el único que difiere de la variante mediana.

En ninguna de las variantes de *tcf4* clonadas encontramos el exón que codifica para los aa 128 al 150 (relativo a *htcf4*) y que corresponde al cuarto exón de *htcf4*, el que también es alternativo. El exón comprendido entre las secuencias de aa “YLQM” y “AHIV” exón es alternativo para algunas variantes identificadas (Figura 5, 150-184 relativo a *htcf4*). La Figura 6 muestra una representación de los cinco tipos de variantes de *tcf4* clonadas y su número de acceso a Gene Bank.

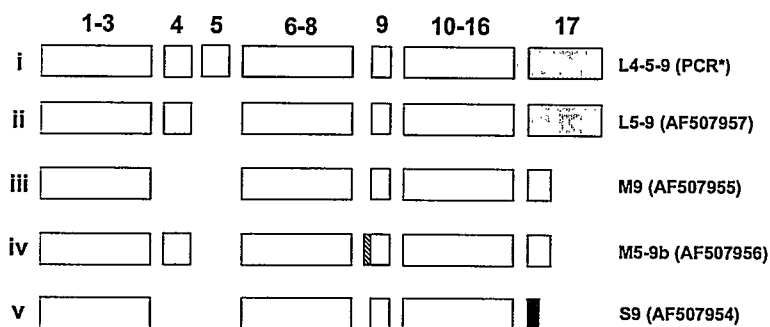


Figura 6. Esquema de las variantes de *tcf4* clonadas. Los números arábigos indican los exones correspondientes. i, variante hipotética deducida por experimentos de RT-PCR (figura 8b).

El análisis de las variantes de procesamiento de *tcf4* humano revela que también posee exones alternativos en esta misma región (Duval y col., 2000). Esta zona de *tcf4* puede ser importante ya que esta misma región de *xtcf3* y *dctf* interactúa con los correpresores *gro/tle* (Cavallo y col., 1998; Roose y col., 1998). Entre la zona de interacción con Groucho y DNA puede ocurrir un evento de procesamiento alternativo en el borde del noveno exón que elimina del mRNA 15nt que codifican para la secuencia “SLLSS” descrita como relevante para la función represora de *tcf4* (Pukrop y col., 2001; Gradl y col., 2002). La zona de interacción con DNA es 100% homóloga en los *tcf4* comparados. Mediante análisis *in silico* identificamos un exón adicional que no clonamos y que es homólogo al exón 15 de *htcf4*, sin embargo, en el genoma del pez corresponde al exón 14 (Figura 7b, exón gris). La región C-terminal de *tcf4* puede presentarse como tres tipo de variantes: larga, mediana y corta. El tipo de variante va a depender del procesamiento alternativo sobre el exón 16 que, al ser integrado al mRNA, genera codones de término prematuros (Figura 7b, cabezas de flecha). En el extremo C-

terminal encontramos que la región CRARF (CR1 y CR2) sólo se encuentra completa en la variante larga de *tcf4*, las variantes mediana y corta sólo tienen CR1. La región CRARF de la variante larga presenta un 100% de homología comparado con *htcf* (Figura 5).

A partir de experimentos de PCR que amplifican la zona que presenta el exon alternativo de la región N-terminal (siguiente sección, Figura 8b, flecha) inferimos que existe una variante de *tcf4* con un exón adicional que no encontramos en las variantes que clonamos. El fragmento que contiene esta región de la proteína fue amplificado por PCR usando los partidores Tcf4 5'F2 y Tcf4 splice R1, y luego clonado por TA-cloning. Tres clones positivos fueron secuenciados encontrándose que el fragmento contenía un exón no descrito previamente (Figura 7a) y que está ubicado a continuación del exón alternativo que identificamos en primera instancia. La posición relativa de estos exones fue confirmada en función de la posición de estas secuencias en el genoma del pez cebra (Figura 7b).

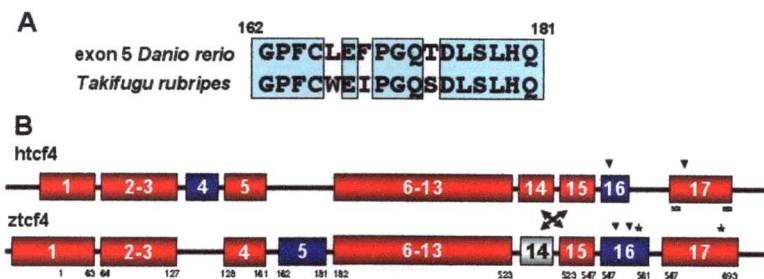


Figura 7. Alineamiento de 5^{to} exón y esquema organización genómica de *ztcf4*. A. Alineamiento de exon 5 de pez cebra y el homólogo de pez fugu. B. Esquema DNA genómico de *tcf4* humano y de pez cebra. Exones alternativos marcados en azul. Exón encontrado *in silico* marcado en gris. Cabezas de flecha indican la posición de aceptores de splicing que generan las variantes mediana y corta. Asterisco marca sitio de codón de término.

El rastreo de un exón homólogo al cuarto exón de *htcf4* en el genoma del pez cebra no ha arrojado resultados positivos, sin embargo, es posible que exista dado que el intrón entre estos exones tiene alrededor de 60 kb en el genoma humano, situación analogable al pez. En un rastreo en las bases de datos genómicas sólo encontramos un fragmento homólogo al quinto exón de *ztcf4* en *Takifugu rubripes* (Figura 7A).

b. Expresión de variantes de procesamiento de *tcf4* de pez cebra

Dada la cantidad de posibles combinaciones de variantes de *tcf4* que pueden generarse en el pez cebra nos interesó conocer cómo se expresan los exones alternativos a lo largo del desarrollo embrionario. Para ello hicimos experimentos de RT-PCR usando partidores que flanquean las regiones que presentan procesamiento alternativo de exones usando cDNA de distintos estadios de desarrollo (Figura 8A, flechas rojas; 8B, flechas azules).

Al estudiar la región que codifica para los exones alternativos 4 y 5 observamos que una banda correspondiente a variantes con el 4^{to} y sin el 5^{to} exón presenta contribución materna de mRNA y que se expresa a lo largo de todos los estadios analizados (Figura 8B). Variantes que presentan ambos exones sólo se expresan después de las 6hpf. Sólo a las 48 hpf observamos una banda correspondiente a variantes que carecen de los exones 4 y 5 (Figura 8B, línea 5, cabeza de flecha). El análisis de un RT-PCR en que estudiamos la región del exón 16 demuestra que *tcf4* se expresa desde las 0 hasta las 24 hpf como variantes C-terminal largas. A las 10 hpf comienza la expresión de variantes que dan origen a isoformas de *tcf4* medianas que se expresan también a las 24 y 48 hpf. Solo a las 48 hpf observamos isoformas cortas para el extremo C-terminal de

tcf4. Esto implica que en estadios tempranos del desarrollo embrionario sólo hay dos variantes de *tcf4* presentes: una con el exón 4 de C-terminal largo (*tcf4*-4L) y una con los exones 4 y 5 de C-terminal largo (*tcf4*-45L).

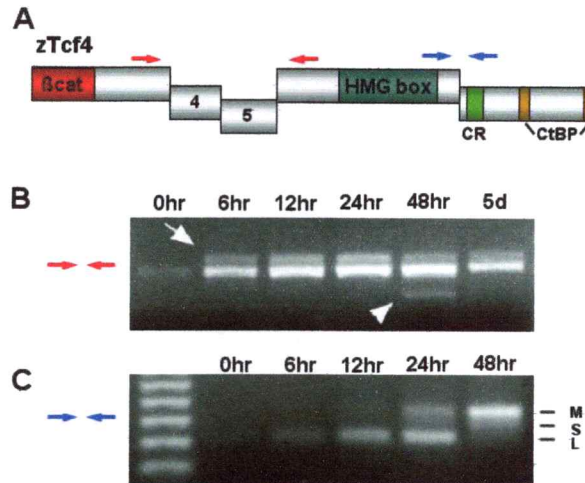


Figura 8. Estudio de la expresión de los exones alternativos de *tcf4* mediante RT-PCR. A. Esquema de la posición de los partidores utilizados en la secuencia de *zTcf4*. B. RT-PCR usando partidores que flanquean el exón 4 y 5 de *tcf4*. C. RT-PCR usando partidores que flanquean la región de procesamiento alternativo del exón 16.

c. Patrón de expresión de *tcf4* de pez cebra

Para analizar el patrón de expresión de *tcf4* en el embrión realizamos hibridaciones *in situ* usando sondas de RNA antisentido marcadas con digoxigenina (Figura 9). El transcrito de *tcf4* comienza a detectarse entre 90% y 100% de epibolía, al final de la gastrulación, en el neuroectodermo anterior. Esta expresión continúa en el estadio de un somito (Figura 9A, B).

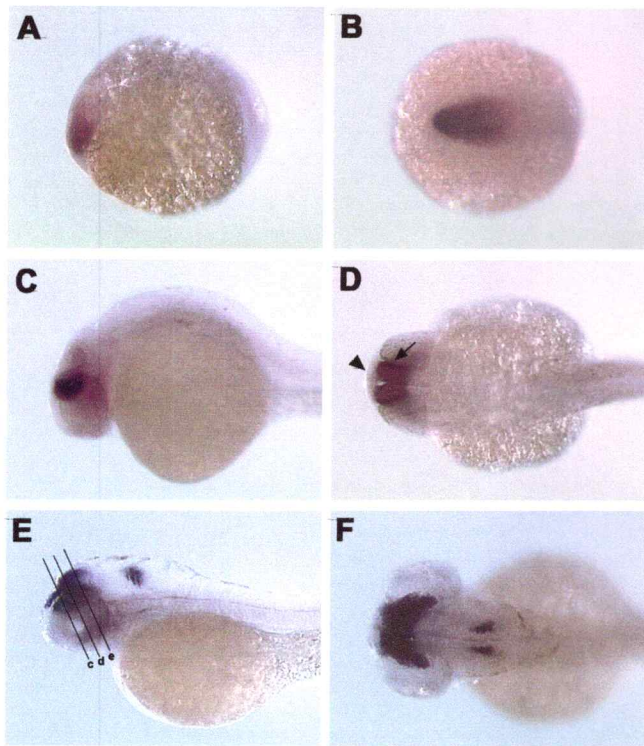


Figura 9. Detección del mRNA de *tcf4* en embriones de pez cebra mediante hibridación *in situ*. A, B, Estadío de 1 somito, C, D, 24 hpf, E, F, 48 hpf. A, C, E, Vista lateral, B, D, F, Vista dorsal. Líneas en figura E indican orientación de cortes coronales en figura 10 C, D y E.

A las 24hpf la expresión de *tcf4* se restringe al diencéfalo dorsal excluyendo el territorio de la epífisis, limitando anterior y ventral con la zona límite intratalámica marcada por la expresión de *shh* (Figura 9 C, D, cabeza de flecha, Figura 10 A, B). La expresión diencefálica se mantiene en el tálamo dorsal a las 48 hpf y se expande al pre-tectum, tectum y torus semicircularis (Figura 9 E, F, Figura 10 C, D, E). El patrón observado en estos territorios sugiere que la expresión de *tcf4* a las 24 hpf podría abarcar parte del cerebro medio (synencéfalo).

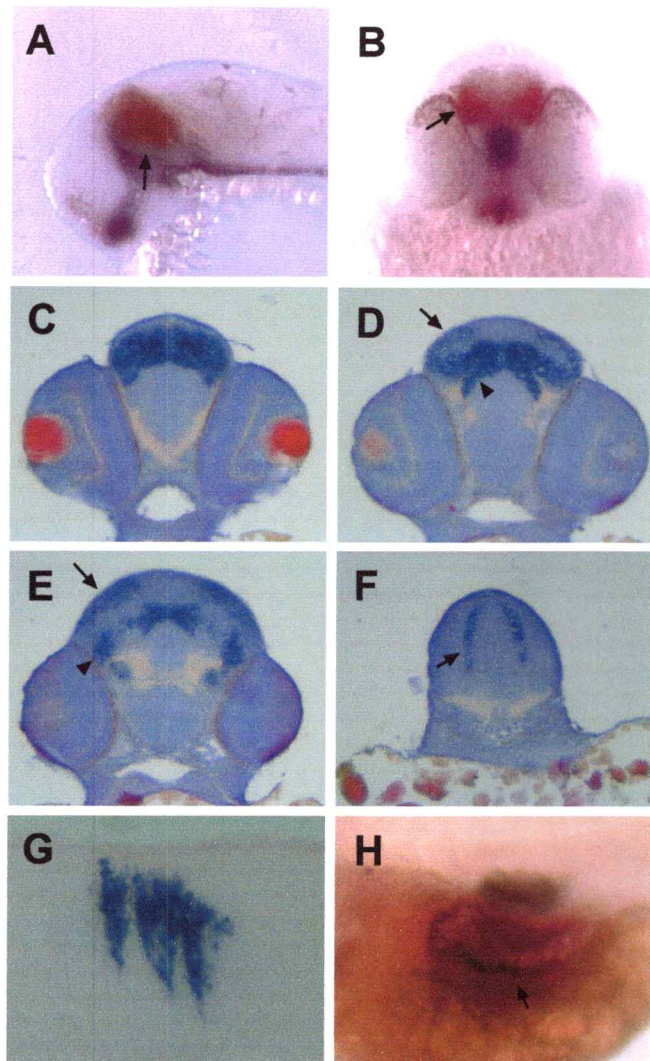


Figura 10. Hibridaciones *in situ* dobles (A, B) y simples (C-H) de *tcf4* a 24 hpf (A, B), 48 hpf (C-G) y 3 dpf (H) *in toto* (A, B, G, H) y cortes de parafina (C-F). La hibridación *in situ* en A y B marca *tcf4* en azul y *shh* en rojo. A, Se aprecia que *tcf4* limita anterior y ventral con el borde posterior de la zona límite intratalámica marcada con *shh* (flecha). En B se observa que la expresión de *tcf4* en el diencéfalo es mas intensa en la región alar (flecha). C-F, Cortes coronales de embriones marcados para *tcf4* a la altura del tálamo (C), pretectum (D, cabeza de flecha), tectum (D y E flecha), torus semicircularis (E, cabeza de flecha) y células de las comisuras del romboencéfalo (F, flecha). H, expresión de *tcf4* en el intestino en desarrollo.

A las 48 hpf comienza la expresión de *tcf4* en un patrón segmentado en el cerebro posterior. En función a la posición relativa a la vesícula óptica establecimos que esta marca corresponde a los rombómeros 1, 3 y 4 del romboencéfalo (Figura 9 E, F, Figura 10 F, G, flecha). A los 3dpf *tcf4* comienza a expresarse en el intestino en desarrollo (Figura 10, G).

Al estudiar el patrón de expresión de *tcf4* en el neuroectodermo de embriones de 10 hpf encontramos que presenta una expresión complementaria a *tcf3* (*tcf3a* y *tcf3b* se expresan igual en el neuroectodermo, Dorsky y col., 2003) salvo en la zona del hipotálamo presuntivo o mesodermo precordial donde son coexpresados (figura 11A, B.). Para determinar los límites de la expresión de *tcf4* en este estadio realizamos hibridaciones *in situ* dobles de *tcf4* con *pax2.1a* (Krauss y col., 2001) o *tlc* (Houart y col., 2002), para el análisis del límite posterior y anterior de la expresión de *tcf4* respectivamente (Figura 11C, D). Observamos que *tcf4* limita anterior con la expresión de *tlc* y posterior con el cerebro medio (espacio entre la expresión de *tcf4* y *pax2.1a*).

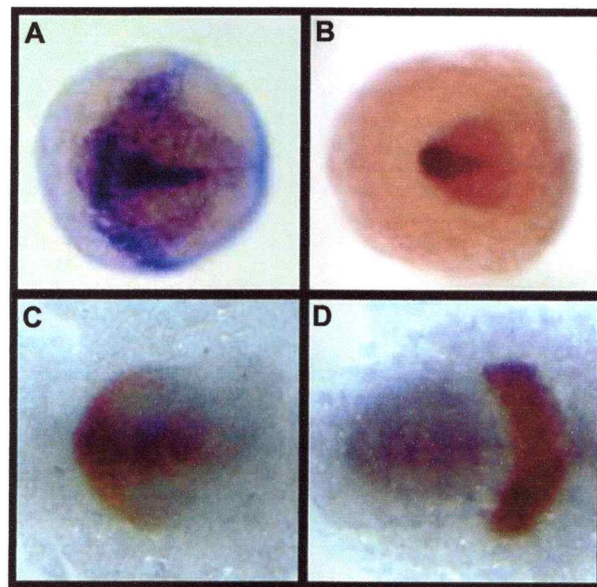


Figura 11. Hibridaciones *in situ* de A. *tcf3a*, B. *tcf4*, C. *tcl*(rojo) y *tcf4* (azul) y D. *pax2.1a* (rojo) *tcf4* azul. A y C, estadio bud, B y D, 1 somito.

2. Inhibición de la traducción de Tcf4 y Tcf3b en mutantes *hdl/tcf3a* cigóticos.

a. Análisis de fenotipo a las 24hpf

Dada la expresión de *tcf4* en el neuroectodermo anterior decidimos estudiar su función en la especificación antero-posterior del cerebro usando morfolinis antisentido para inhibir la traducción del mRNA de *tcf4* a proteína. Los morfolinis son moléculas análogas al RNA que se sintetizan en base a anillos morfolinis en vez de ribosas. Esto impide la degradación del polímero por parte de RNAsas endógenas, mejorando así el rendimiento de la molécula como inhibidor. El morfolino se diseña con una secuencia de 24pb complementaria a la región 5' UTR del gen a inhibir en función de las recomendaciones del fabricante (Gene Tools). La unión del morfolino a esta región del mRNA impide la traducción del gen en los ribosomas por un mecanismo que no se conoce en detalle. Se usaron dos morfolinis contra *tcf4*, uno que pasa sobre el sitio de inicio de la traducción (*tcf4* mo1) y otro ubicado en el -30 relativo al primer codón (*tcf4* mo2). Todas las inyecciones de morfolinis o mRNA descritas en este trabajo se realizaron en el estadio de una célula para asegurar la distribución uniforme del material inyectado. La inyección de 2ng (cantidad usada a lo largo de todo el trabajo) de mo1 o mo2 sólo presentó un fenotipo sutil a las 24 hpf. Se observó que el cerebro y los ojos del embrión eran levemente más pequeños que en la situación control (Figura 12B), fenotipo similar al encontrado al inyectar el mo de *tcf3b* y en la condición cigótica de *hdl/tcf3a* (Kim y col., 2000; Dorsky y col., 2003). El efecto del morfolino fue controlado mediante western blot usando un anticuerpo anti Tcf4 humano que detecta ztcf4 (Materiales y Métodos).

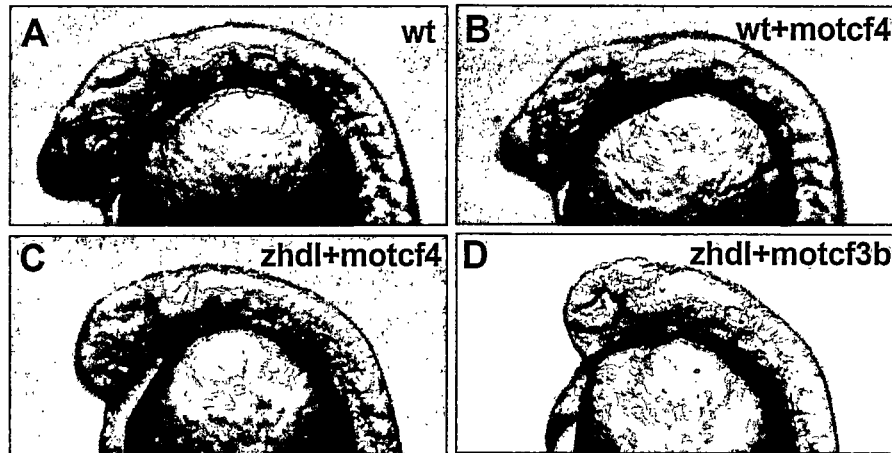


Figura 12. Inyección de los morfolinios de *tcf3b* y *tcf4* en el fondo mutante *zhdl*.

En función de este resultado decidimos inhibir la expresión simultánea de más de un *tcf* mediante coinyección de morfolinios en embriones silvestres y mutantes cigóticos de *hdl*. La coinyección de los morfolinios de *tcf4* y *tcf3b* (1ng por embrión) en embriones silvestres no presentó mayor fenotipo que el observado en la inyección de cada uno por separado (Figura 12B). Sin embargo, la inyección del mo de *tcf3b* o *tcf4* en los embriones producto de un cruce de peces *hdl* heterocigotos dió como resultado un 25% de fenotipo con ausencia de ojos (Figura 12C, D). Esta proporción de embriones aumentó a un 50% al inyectar los mismos mo en embriones provenientes de un cruce entre una hembra heterocigoto y un macho homocigoto para la mutación *hdl*. Estos esquemas de cruce evitan la ausencia de contribución materna de *tcf3a* y por lo tanto sólo afectan procesos relacionados con la especificación del ectodermo y no del mesodermo. Los resultados sugieren que la proporción del fenotipo observado está directamente relacionada a la frecuencia mendeliana de embriones homocigotos *zhdl*

producto del cruce, lo cual fue corroborado al genotipar al azar 10 embriones con ojos y 10 embriones sin ojos (Figura 13).

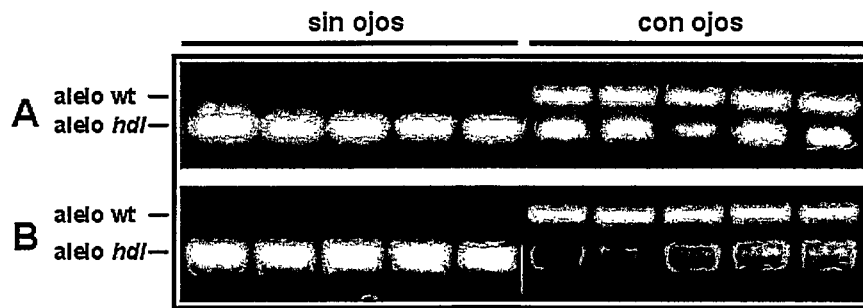


Figura 13. Genotipado de embriones *zhdl* inyectados con los morfolinós de *tcf3b* (A) y *tcf4* (B). En el experimento se genotiparon 10 embriones sin y con ojos de cada condición (en la figura sólo se muestran cinco de cada una).

Todos los embriones sin ojos resultaron homocigotos para la mutación *hdl* y todos los embriones con ojos resultaron ser heterocigotos para esta misma condición, ya sea por la inyección del mo de *tcf3b* o por la de *tcf4* (Figura 13 a y b). De aquí en adelante sólo nos referiremos al 50% de embriones con fenotipo y se mantendrá el esquema de cruce de hembras heterocigoto y machos homocigoto para procurar un alto número de embriones de fondo genético *zhdl* a analizar.

Al estudiar la morfología del fenotipo con detalle se aprecia que los embriones *zhdl* inyectados con el mo de *tcf3b* tienen el cerebro truncado hasta el cerebro medio a diferencia de los inyectados con el mo de *tcf4* que sólo carecen de telencéfalo y ojos (Figura 12 C, D). Al analizar estas estructuras del cerebro mediante los marcadores moleculares *nk2.1a* (diencéfalo ventral, Rohr y col., 2001) y *engrailed3* (*en3*, límite posterior del cerebro medio y cerebelo, Ekker y col., 1992) observamos que en la

inyección del mo *tcf4* en fondo *zhdl* sólo se pierde casi la totalidad de la marca de *nk2.1a* sin alterarse la expresión de *en3* (Figura 14C).

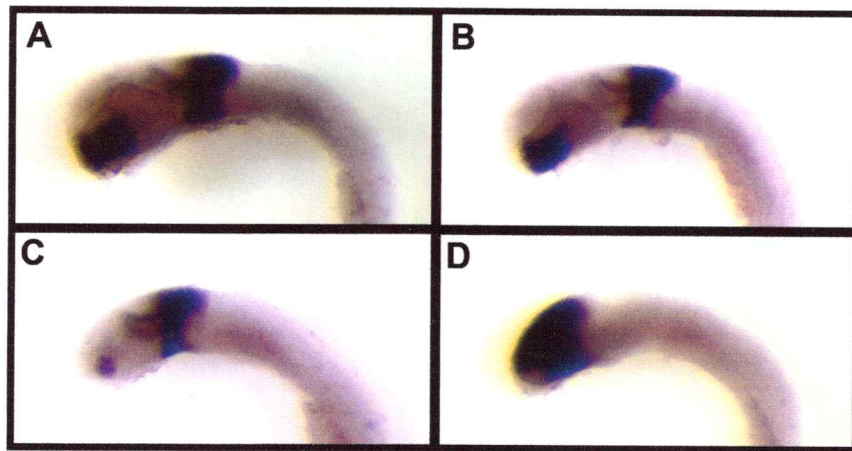


Figura 14. Análisis de los marcadores de hipotálamo y cerebro medio posterior, *nk2.1a* y *engrailed3* a las 24 hpf en embriones silvestres (a), *zhdl* (b), *zhdl+motcf4* (c) y *zhdl+motcf3b* (d).

En los embriones *zhdl* inyectados con el mo *tcf3b* la marca de *en3* está expandida hacia anterior y no se aprecia expresión de *nk2.1a* (Figura 14D, ausencia de expresión de *nk2.1a* fue analizada por hibridación *in situ* simple, datos no mostrados).

Es importante mencionar que la coinyección de mo *tcf3b* y mo *tcf4* en el fondo genético *zhdl* no generó fenotipos más profundos que la inyección del mo *tcf3b* por sí solo en embriones *zhdl*.

b. Análisis de fenotipo a las 10 hpf.

El fenotipo de cerebro truncado a nivel del cerebro anterior es característico de un aumento de la actividad de la vía Wnt (Kim y col., 2000; Heisenberg y col., 2001; van de Water, 2001; Houart y col., 2002; Dorsky y col., 2003; Lagutin y col., 2003). Al final

de la gastrulación (10 hpf) los distintos territorios que van a dar origen al cerebro ya están definidos y pueden distinguirse mediante el uso de marcadores moleculares por hibridación *in situ*. El estudio e interpretación de los cambios en la especificación del cerebro se facilita en este estadio, ya que el neuroectodermo está extendido y compuesto por capas de células que aún no han comenzado los movimientos de la neurulación que transforman este tejido en un tubo vesiculado. Por ello, todo el análisis de marcadores genéticos de los distintos territorios del cerebro de los embriones *zhdl* inyectados con los morfolidos de *tcf3a* y *tcf4* fue hecho a las 10 hpf.

Al analizar marcadores de cerebro anterior que se expresan en telencéfalo presuntivo, *tlc* (Figura 15, A,D) (*fkf4* expresado en el piso del tubo neural se usó como referencia, Odenthal y Nusslein-Volhard, 1998) y *emx1* (no mostrado), territorio del ojo, *rx3* (Loosli y col., 2003) y *six3* (Kobayashi y col., 1998, Figura 15B, E y H, K respectivamente) e hipotálamo presuntivo, *nk2.1a* (Figura 15 G, J), observamos que su expresión está completamente ausente tanto en la inyección de mo *tcf4* como de mo *tcf3b* en embriones *zhdl*. La expresión de *six3* en el mesodermo precordial y de *rx3* en el mesodermo lateral se mantienen y sirven de referencia. Las bandas de expresión de *fkf3* en regiones del cerebro anterior están ausentes, no así las del cerebro medio (Odenthal y col., 1998, Figura 15, C, F). La expresión de los marcadores de diencefalo posterior *wnt8b* (Kelly y col., 1995, Figura 15, I, L) y de cerebro medio *fgf8* (Reifers y col., 1998, Figura 15, G, J) sólo presentan una moderada expansión hacia anterior.

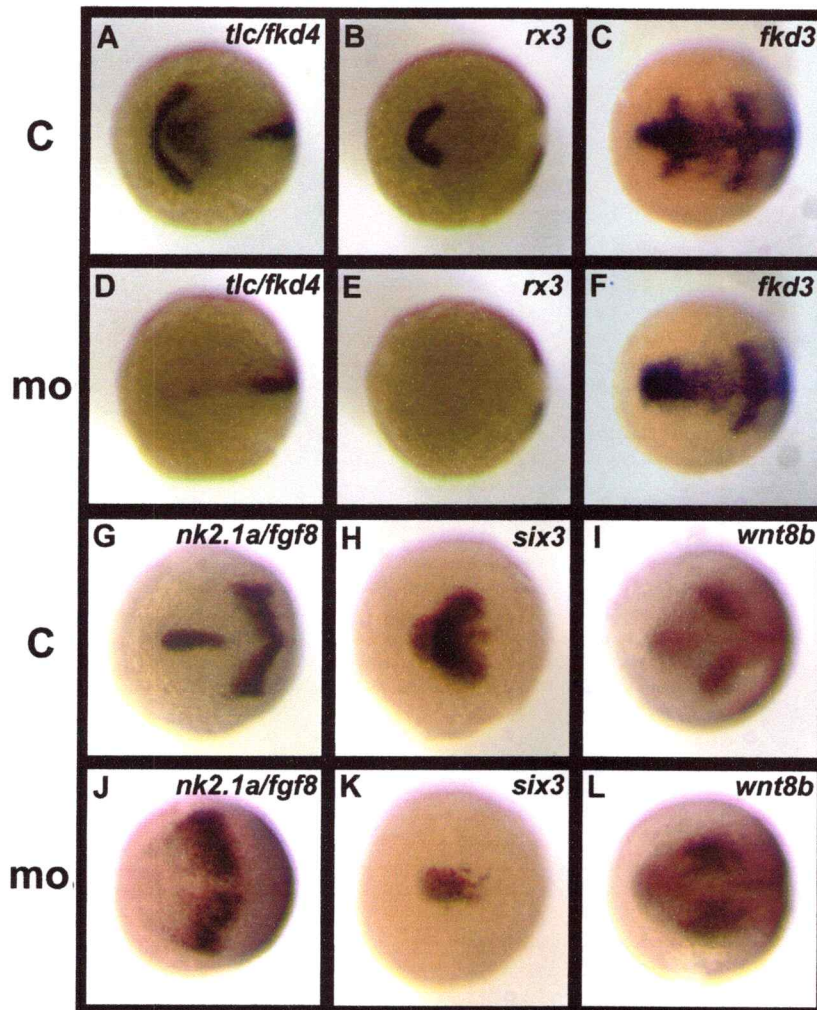


Figura 15. Análisis de marcadores de cerebro anterior y medio por hibridación *in situ* a 10 hpf en embriones control (A, B, C, G, H, I) y *zhdl* inyectados con *mo tcf4* o *mo tcf3b* (D, E, F, J, K, L). A, D, *tlc* y *fkd4*; B, E, *rx3*; C, F, *fkd3*; G, J, *nk2.1a* y *fgf8*; H, K, *six3*; I, L, *wnt8b*.

Para estudiar el efecto de la inyección de los *mo* de *tcf* en embriones *zhdl* sobre el cerebro medio usamos los marcadores *pax2.1a* (Figura 16 A, D, G), *wnt1* (Kelly y Moon, 1995, Figura B, E, H) y *irx1* (Wang y col., 2001, Itoh y col., 2002, Figura 16 C, F, I). En estos casos sí observamos una diferencia en los fenotipos producto de la inyección de los *mo* de *tcf3b* o *tcf4* en embriones *zhdl*. La inhibición de *tcf4* en fondo *zhdl* expande la expresión de los marcadores *pax2.1a* y *irx1* hacia anterior de tal forma que el límite anterior de la marca queda a mitad de camino al frente del neuroectodermo con respecto a su patrón de expresión original (Figura 16, D, F). La expresión de *wnt1*

presenta una leve expansión a anterior (Figura 16 E). La inhibición de *tcf3b* en fondo *zhdl* provoca una severa expansión de los tres marcadores hasta el límite anterior del neuroectodermo (Figura 16, G, H, I). En las hibridaciones *in situ* de *pax2.1a* y *wnt1* se usó también *krox 20* (rombómeros 3 y 5 del cerebro posterior, Woo y Fraser, 1998) como marcador de posición relativa en el eje antero-posterior.

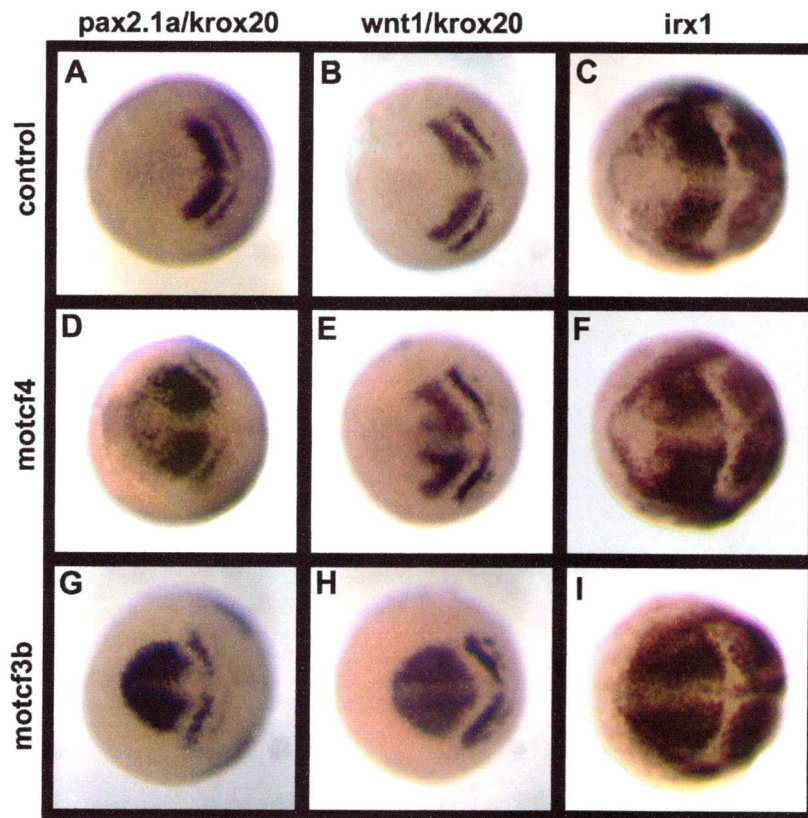


Figura 16. Análisis de marcadores de cerebro medio por hibridación *in situ* a 10 hpf en embriones control (A, B, C) y *zhdl* inyectados con *mo tcf4* (D, E, F) y *mo tcf3b* (G, H, I).

Para todos los marcadores descritos el número mínimo de embriones analizado fue 40, de los cuales alrededor de 20 presentaron fenotipo con una desviación de ± 1 . En base al genotipo de embriones realizado en el punto anterior suponemos que los embriones con fenotipo son de fondo genético *zhdl*.

3. Rescate del fenotipo *hdl* con variantes de procesamiento de *tcf4* de pez cebra.

Para determinar si sólo una o las dos variantes de *tcf4* que se expresan temprano en el desarrollo están ejerciendo una función en la especificación del cerebro anterior, realizamos experimentos de rescate del fenotipo de ausencia de ojos en los embriones *zhdl* inyectados con los mo de *tcf3b* y *tcf4* mediante la coinyección del mRNA de las variantes de *tcf4*. Como control, primero rescatamos el efecto de la inyección de los morfolinos de *tcf3b* en embriones *zhdl* con el mRNA de *tcf3a*, el gen mutado en *hdl*. La coinyección del mRNA de *tcf3a* en los embriones *zhdl* inyectados con los mo *tcf3b* o *tcf4* rescató en un 91% el fenotipo de ausencia de ojos (Tabla 1). Cuando realizamos este mismo experimento usando el mRNA de las variantes 49bL o 459L observamos que sólo el mRNA de la última variante es capaz de rescatar el fenotipo de los mo de *tcf3b* no así el mRNA de la variante 4L (Tabla 1).

Tabla 1. Rescate del fenotipo de ausencia de ojos provocado por la inyección de motcf3b en mutantes *zhdl* de un cruce de hembras *hdl* heterocigots y machos *hdl* homocigotos.

| Zhdl+motcf3b | Con ojos | Sin ojos | #zhdl | %rescate |
|-----------------------------|-----------------|-----------------|--------------|-----------------|
| +mRNA tcf3a | 67 | 3 | 35 | 91% |
| +mRNA tcf4 459bL | 93 | 7 | 50 | 86% |
| +mRNA tcf4 49L | 65 | 46 | 55 | 16% |

Para comprobar que el rescate fue efectivo, se genotipó al azar 20 embriones con ojos de un experimento de rescate a 24hpf y encontramos que 10 presentaban la mutación *hdl* en homocigosis (Figura 17).

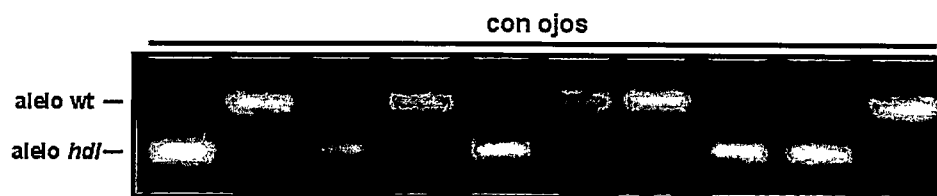


Figura 17. Genotipo del alelo *hdl* en embriones *zhdl* inyectados con el mo de *tcf3b* y rescatados con el mRNA de *tcf4-459L*.

DISCUSION

En este trabajo describimos el clonamiento, expresión y función en la especificación antero-posterior del cerebro de *tcf4* en pez cebra. Tcf4 ya había sido clonado en humano (Korinek y col., 1997), ratón (Cho y Dressler, 1998; Korinek y col., 1998) y *Xenopus* (Konig y col., 2000), por lo que el basarnos en los resultados ya publicados acerca de su secuencia ayudó en el trabajo de análisis de las variantes de splicing de *ztcf4* que se clonaron.

Tal como se ha descrito en otras especies, *tcf4* de pez cebra presenta una región de interacción con β catenina compuesta por los primeros 53 aa del extremo N-terminal. Comparada con la secuencia de ratón y humano, la región de interacción con β catenina de *ztcf4* solo presenta diferencias en los aminoácidos 18 y 31, los que no son esenciales para la interacción entre ambas proteínas (Figura 5, Omer y col., 1999; Poy y col., 2001). Por consiguiente, suponemos que la capacidad de *ztcf4* para interactuar con β catenina es similar a la descrita para *tcf4* de ratón y humano (Korinek y col., 1997; Cho y Dressler, 1998; Korinek y col., 1998).

A continuación, en la secuencia previa a la región de interacción con DNA, encontramos una alta homología entre *tcf4* de ratón, humano y pez cebra. Sin embargo, también se observan variantes que carecen de porciones de 23 (aa 128-150 *htcf4*) y 34 (aa 150-184) aminoácidos correspondientes a los exones 4 y 5 de *htcf4* (Duval y col., 2000). Variantes de *htcf4* sin el exón 4 ya habían sido descritas, pero no variantes que carecieran del exón 5 (Duval y col., 2000). Entre las variantes de *ztcf4* inicialmente identificadas no encontramos clones con ambos exones alternativos presentes, sin

embargo, mediante RT-PCR determinamos que sí existen variantes con ambos exones (Figura 8b, flecha). Posteriormente, clonamos variantes con dos exones en esta zona, pero la secuencia del nuevo exón no corresponde a la del exón 4 de *htcf4* (Figura 7a). La posición de este nuevo exon tampoco corresponde a la del cuarto exon en *htcf4*, sino que se encuentra a continuación del exón de *ztcf4*, homólogo al quinto exón de *htcf4* (Figura 7b). Buscamos este nuevo exón en bases de datos de los genomas disponibles y sólo encontramos un exón homólogo en el genoma de *Takifugu rubripes* (Figura 7a), por lo que este exón podría ser exclusivo de peces. También buscamos el exón 4 de humano en el genoma del pez cebra y, a la fecha, no hemos encontrado un exón homólogo. Esto no descarta que este exón exista en pez cebra, ya que el proyecto genoma del pez todavía está en desarrollo y aún falta el 25% del total por completar.

Mediante experimentos de RT-PCR usando cDNA preparado a partir de mRNA extraído en distintos estadios del desarrollo el pez cebra determinamos que variantes con el cuarto exón de *ztcf* se expresan en forma materna y luego en todos los estadios analizados hasta los 5 días post fertilización (Figura 8b). Variantes con los exones 4 y 5 sólo comienzan a expresarse a partir de las 6 hpf y luego en todos los estadios posteriores (Figura 8b, flecha). Sólo a las 48 horas y en forma transiente encontramos expresión de variantes sin los exones 4 y 5 (Figura 8b, cabeza de flecha).

El único indicio de posibles variantes de *tcf4* con exones alternativos en esta zona fue publicado por Duval y col. (2000) y está basado en estudios de RT-PCR en líneas celulares de cáncer colonorectal. De hecho, no existen estudios en que se describa la función de los exones alternativos presentes en esta zona de *tcf4*. Pensamos que estos exones pueden ser muy relevantes en la determinación de la función de *tcf4* como

represores de la transcripción ya que los correpresores *gro/tle* interaccionan con esta zona en *tcf* de *Drosophila* y *tcf3* de *Xenopus* (Cavallo y col., 1998; Rosse y col., 1998). A pesar que en esta zona *ztcf3* y *ztcf4* sólo tienen una homología de un 70% e identidad de 80%, esta similitud podía ser suficiente para que a través de ella *ztcf4* interactúe con los co-represores *gro/tle*. Los *gro/tle* han demostrado interactuar y co-reprimir los distintos *lef/tcf*, incluyendo *tcf4*, por lo que es muy probable que la región entre el sitio de interacción con β catenina y DNA en *tcf4* sea la que permite su unión a *gro/tle* (Brantjes y col., 2001).

En el borde 5' del noveno exón encontramos un aceptor de procesamiento de mRNA alternativo que condiciona la presencia de los aa "SSLLS" en la secuencia de las variantes de *ztcf* (Figura 5). Esta secuencia, junto con una del borde 3' del séptimo exón descrita en *xtcf4* (LVPQ), ha mostrado ser importante para la función de *tcf4* como represor de la transcripción (Purkoop y col., 2001; Gradl y col., 2002). En estos trabajos sólo se ve una diferencia en la función de *tcf4* cuando ambas regiones están ausentes. Sin embargo, no encontramos variantes sin la secuencia LVPQ por lo que no ahondamos en la función de estas regiones en la actividad de *ztcf4*. Lo que no podemos descartar es la existencia de variantes que carezcan de ambas secuencias, cosa que actualmente estamos investigando.

La región de interacción con DNA (HMG-box) de *ztcf4* es 100% idéntica a las de *tcf4* humano y ratón (Figura 5). Se ha demostrado que *htcf4* interacciona con sitios consenso de unión a Tcf, por lo que suponemos que *ztcf4* tiene la misma capacidad de *htcf4* para interactuar con DNA (Korinek y col., 1998).

A continuación y mediante análisis *in silico* del rastreo del exón 15 de *tcf4* humano encontramos su homólogo en el genoma del pez cebra (Figura 7b). Sin embargo, en el pez este exón se ubica a continuación del 13. En función de los exones que hemos encontrado en el pez determinamos que este es el exón 14 de *ztcf4*. Tal como ocurre en *htcf4*, en el pez este exón también es alternativo (Duval y col., 2000) no obstante no clonamos variantes en que esté presente. La expresión y función de este exón no ha sido descrita en otras especies.

Al igual que en *htcf4*, la presencia del exón 16 de *ztcf4* es fundamental en la expresión de las variantes de procesamiento de mRNA de *ztcf4* que generan extremos C-terminales medianos y cortos. Cuando la maquinaria de splicing inserta este exón íntegro en la secuencia del mRNA, éste se traduce en una variante de tipo mediana (Figura 7b, asterisco sobre exón 16). Sin embargo, este exón posee un aceptor de procesamiento de mRNA alternativo en su secuencia, el que al ser usado, acerca el codón de término en su secuencia a el extremo 3' del exón lo que se traduce en la expresión de una variante C-terminal corta (Figura 7b, cabeza de flecha). Si el exón 16 es saltado por la maquinaria de procesamiento alternativo, el siguiente codón de término encontrado en la secuencia se ubica al final del exón 17, lo que genera variantes de *ztcf4* largas (Figura 7b, asterisco sobre exón 17). El tipo de extremo C-terminal de *ztcf4* es relevante en la función de la proteína ya que las variantes mediana y corta no presentan la secuencia CR2 de la región CRARF (Figura 5). La ausencia de CR2 por sí sola es capaz de inhibir casi por completo la activación de la transcripción por parte del complejo transactivador β catenina/*tcf4* sobre promotores específicos (Hecht y Stemmler, 2003, Atcha y col., 2003). Esto implica que el tipo de C-terminal de *ztcf4* va a incidir en

la discriminación de la expresión de ciertos promotores, proceso que puede ser fundamental en lograr efectos específicos en respuesta a Wnt.

Para saber qué tipo de extremo C-terminal es expresado a lo largo del desarrollo del embrión del pez realizamos experimentos de RT-PCR con partidores que flanquean el exón 16 obteniéndose distintos tamaños de productos de PCR dependiendo de la variante corta, mediana o larga que se está expresando. Usando estos partidores, las variantes medianas, cortas y largas generan productos de PCR de 330, 300 y 270 pares de bases, respectivamente (Figura 8c). Mediante este experimento determinamos que variantes C-terminales largas se expresan entre las 0 y 24 hpf. (Figura 8c). Desde las 12 hpf en adelante se ve expresión de variantes medianas de *tcf4*. Solo a las 48 hpf se observa expresión de variantes cortas.

En resumen clonamos cinco variantes de *ztcf4y* en función de los exones y aceptores de procesamiento alternativos designamos una nomenclatura similar a la utilizada en Duval y col. (2000). El número correlativo del exón alternativo en el genoma es antepuesto al "tcf4". Si el borde del exón nueve está ausente o presente se nombra 9 ó 9b, respectivamente. Según el tipo de variante c-terminal son designados S(short), M(medium) o L(long). La variante con el exón nuevo clonada presenta el borde del exón 9 y es del tipo larga por lo tanto es designada, 459bL-tcf4.

El patrón de expresión de *ztcf4* fue determinado mediante hibridación *in situ* usando sondas de mRNA sustituidas con digoxigenina. Temprano en el desarrollo observamos que *ztcf4* se expresa en el neuroectodermo anterior y lo que parece ser el hipotálamo presuntivo o mesodermo precordial en embriones de estadio 90% de epibolia (estadios según Kimmel y col., 1995). Se ha determinado que en pez cebra el hipotálamo

deriva de tejidos del ectodermo posterior y que está compuesto por un grupo de células que migra por sobre el mesodermo precordial (Mathieu y col., 2002). Ambos tejidos presentan una morfología parecida en una vista dorsal, sin embargo, es posible distinguirlos ya que el mesodermo precordial se encuentra inmediatamente bajo el hipotálamo presuntivo. Lamentablemente en este estadio la marca de *ztcf4* no es tan fuerte como para poder hacer cortes de los embriones y distinguir así el lugar de expresión. El único antecedente que nos permite presumir que la marca corresponde al mesodermo precordial es que en ratón *tcf4* se expresa en el neuroectodermo anterior, como en el pez, pero también en el endodermo anterior, tejido análogo en función y posición al mesodermo precordial (Cho y Dressler, 1998; Foley y Stern, 2001; Wilson y Houart, 2004). Plantear esto resulta interesante ya que existiría una función para la vía Wnt en el mismo tejido que está encargado de secretar moléculas que antagonizan esta misma vía. Esta idea se refuerza al encontrar que *wnt8b* también presenta expresión en el mesodermo precordial y que la expresión de *dkk* (anti vía Wnt) se expresa en el borde exterior de las células que componen el mesodermo precordial en un patrón que parece ser complementario y excluyente al de *ztcf4* y *wnt8b* (Shinaya y col., 2000). La expresión de *ztcf4* en el neuroectodermo anterior comienza luego de finalizada la gastrulación entre los estadios de 100% de epibolia y un somito un poco posterior al comienzo de la expresión de *tcf3a* y *tcf3b* (Figura 9a, b; figura 11a, b). Al comparar la expresión de *ztcf4* con *tlc* y *pax2.1a*, marcadores de telencéfalo y cerebro medio, respectivamente, encontramos que *tcf4* limita anterior con el límite del neuroectodermo y posterior en el diencéfalo dorsal (Figura 11c, d). En esta etapa del desarrollo el diencéfalo dorsal se ubica entre el diencéfalo ventral y el cerebro medio. El espacio entre

las marcas de *tcf4* y *pax2.1a* corresponde al diencéfalo dorsal (Figura 11d). La expresión de *tcf3* (a y b) es fuerte en el cerebro medio, límite posterior de la expresión, y en el frente del neuroectodermo y placodas anteriores (Figura 11a). Este patrón de expresión deja un espacio que parece corresponder a la expresión de *ztcf4*, sin embargo, esto no pudo ser comprobado debido a que la expresión de ambos genes es muy débil como para lograr una hibridación *in situ* doble que permitiera distinguir fehacientemente los límites entre la expresión de ambos genes.

A las 24hpf *ztcf4* se expresa en el diencéfalo dorsal limitando anterior y ventral con la zona límite intratálámica (Figura 10a, b) y posterior con el cerebro medio (Figura 9c, d). La expresión de *tcf4* se excluye del techo del diencéfalo, zona epitalámica (Figura 9d, cabeza de flecha). La expresión diencefálica se manifiesta con mayor intensidad en la región alar (Figura 10b, flecha).

Luego, a las 48 hpf *ztcf4* continúa su expresión en el tálamo, territorio derivado del diencéfalo dorsal, y se le suma expresión en el pretectum, tectum y torus semicircularis, tejidos derivados del cerebro medio anterior (Figura 9e, f, figura 10c, d, e). La expresión en estos últimos tejidos plantea la posibilidad de que la expresión caudal de *ztcf4* a las 24hpf abarque parte del cerebro medio. Sin embargo, no existen marcadores que permitan discriminar esta expresión mediante hibridación *in situ* doble. En ratón está demostrado que el borde caudal de *tcf4* limita y no sobrepasa el cerebro medio (Cho y Dressler, 1998) por lo que la expresión en el pretectum, tectum y torus semicircularis puede ser producto de elementos regulatorios del promotor de *ztcf4* distintos de los que dirigen la expresión al diencéfalo. El embrión de ratón presenta la misma expresión que *ztcf4* en derivados mesencefálicos (Cho y Dressler, 1998;

Korinek y col., 1998). En este estadio y, al igual que en el embrión de ratón, *tcf4* se expresa en un patrón de bandas correspondiente a los rombómeros 1, 3 y 5 del cerebro posterior (Figura 9e, f; figura 10f, g). La sección para sagital permite determinar que la expresión corresponde a los núcleos de las neuronas comisurales del romboencéfalo (Trevarrow y col., 1990).

Por último, al igual que en ratón, al tercer día de desarrollo *ztcf4* se expresa en el epitelio del intestino (Cho y Dressler, 1998; Korinek y col., 1998, Figura 10h). De todos los lugares en que *tcf4* es expresado en ratón éste parece ser el único en el que tiene una función esencial y no redundante con otros *tcf*, ya que el ratón mutante nulo de *tcf4* sólo presenta defectos en la mantención de las células troncales del intestino y en ningún otro tejido (Korinek y col., 1998).

Dado el patrón de expresión de *ztcf4* en el neuroectodermo anterior y las evidencias que han relacionado los mutantes de *tcf3a/hdl* en la especificación antero-posterior del cerebro, decidimos estudiar la función de *tcf4* en este proceso. Para inhibir la expresión de Tcf4 recurrimos al uso de morfolidos antisentido. Este tipo de moléculas han mostrado ser eficientes y específicas en la inhibición de la traducción de mRNA a proteína. En los embriones silvestres inyectados con el mo contra *tcf4* no se observó un fenotipo mas allá de una leve disminución del tamaño de los ojos y el cerebro en general (Figura 12b). Este es el mismo fenotipo que se obtiene al inyectar el mo de *tcf3b* y que se observa en mutantes cigóticos de *headless* (Kim y col., 2000; Dorsky y col., 2003). El efecto del mo de *tcf4* fue controlado mediante Western Blot, observándose que su inyección inhibe casi la totalidad de la expresión de la proteína *tcf4* (ver materiales y métodos). Una explicación a este fenotipo es que otros *tcf* pueden estar supliendo a *tcf4*,

enmascarando su posible función en la especificación antero-posterior del cerebro. Para dilucidar esta alternativa inhibimos sistemáticamente combinaciones de *tcf* en embriones mediante el uso de morfolinos para *tcf3b* y el mutante cigótico de *headless* (*zhdl*). Los resultados de las inhibiciones de los distintos *tcf* descritos en pez cebra se muestran en el siguiente cuadro (signo + y - indican presencia o ausencia del *tcf* respectivamente).

| | | | | | | |
|--------------------------|----|----|----|----|----|----|
| zhdl (<i>tcf3a</i>) | + | + | - | - | - | + |
| <i>tcf3b</i> | + | - | + | - | + | - |
| <i>tcf4</i> | - | + | + | + | - | - |
| Ojos? | Si | Si | Si | No | No | Si |

Sólo la inhibición de *tcf4* o *tcf3b* junto con *tcf3a/zhdl* fue capaz de generar un fenotipo de ausencia de ojos que delata una alteración en la especificación de los territorios del cerebro anterior, característica de un desbalance en la actividad de la vía Wnt. Cuando se inhibió *tcf4* y *tcf3b* no se observó mayor fenotipo que al inhibir ambos genes por separado. Es decir, que la expresión de *tcf3a* es suficiente para suplir la inhibición de *tcf3b* o *tcf4* y no así en sentido opuesto. Esto podría implicar que *tcf3a* y *tcf3b* no son redundantes en su función a pesar de ser altamente homólogos a nivel de secuencia aminoacídica (Dorsky y col., 2003), o bien, que sus promotores no responden frente a los mismos reguladores y enfrentan de forma distinta la condición experimental al bajar los niveles de *tcf*. Una tercera alternativa es que la proteína mutante en *zhdl* tenga la capacidad de sensibilizar al mutante y pronunciar incrementos en la actividad de

la vía Wnt producto de la eliminación de *tcf4* o *tcf3b*. Para dilucidar esta última alternativa estamos estudiando la participación de la proteína truncada de *tcf3a* (*hdl*) en la generación del fenotipo, y por otro lado, usando el morfolino contra *tcf3a* (trabajo en marcha). Cualquiera sea el caso, tanto los morfolinios de *tcf3b* como de *tcf4* generan un fenotipo de ausencia de ojos a las 24hpf y solamente sobre los embriones *zhdl*. Esto fue comprobado al hacer cruces de hembras heterocigotas *hdl* contra machos heterocigotos (cruce #1) u homocigotos (cruce #2) *hdl*. Se usó siempre hembras heterocigotas para evitar un efecto materno que podría incidir sobre la especificación dorsoventral del mesodermo, lo que alteraría como consecuencia el eje antero-posterior del neuroectodermo. El resultado de los cruces #1 y #2 es un 25% y 50% de peces *zhdl*, respectivamente. Al inyectar los mo de *tcf3b* o *tcf4* en los dos tipos de cruce la frecuencia de fenotipo se ligó estrictamente a las frecuencias mendelianas esperadas. Esto fue comprobado mediante el genotipo de los embriones sin ojos (Figura 13).

Observamos una diferencia en los fenotipos obtenidos con el mo *tcf3b* o mo *tcf4* en fondo *zhdl*. El mo *tcf4* produce inhibición de telencéfalo y ojos, pero no estructuras más caudales como diencéfalo posterior y cerebro medio (Figura 12c, figura 14c). El mo *tcf3b* produce un fenotipo más profundo en que el diencéfalo y la porción anterior del cerebro medio está ausente a expensas del cerebro medio posterior (Figura 12c, figura 14c), lo que fue comprobado mediante marcadores moleculares de diencéfalo ventral (*nk2.1a*) y cerebro medio posterior (*en3*). Estos resultados concuerdan con el análisis de los marcadores de distintas regiones del eje antero-posterior del cerebro a las 10 hpf (Figura 15 y 16). El estudio de marcadores anteriores al cerebro medio muestran que el efecto de los mo de *tcf4* y *tcf3b* es el mismo: inhibición de la expresión de *tlc*, *six3*, *rx3* y

nk2.1a (Figura 15). En concordancia con los resultados obtenidos a las 24hpf, al analizar marcadores de cerebro medio se ve que el efecto de *tcf3b* es más profundo que el de *tcf4*. En estos casos el mo *tcf3b* produce una expansión de los marcadores *pax2.1a* y *irx1* hasta el límite anterior del neuroectodermo, no así el mo de *tcf4*, que produce una expansión moderada (Figura 16). La inhibición de marcadores de cerebro anterior a expensas del posterior concuerda con un efecto de aumento de la actividad de la vía Wnt en la región anterior del cerebro y es corroborado por una expansión anterior de la expresión de *wnt8b* y *wnt1* (Figura 15i, l, figura 16b, e, h). En embriones silvestres la vía Wnt está inactiva en estos territorios, lo que permite la especificación de la identidad del cerebro anterior (Foley y Stern, 2001; Wilson y Houart, 2004). Se ha observado que en los mutantes *mbl/axinal* (Heisenberg y col., 2002), *mzhd1/tcf3a* (Kim y col., 2000) y *six3* (Lagutin y col., 2003) el aumento de la actividad de la vía Wnt está acompañado por una expansión a anterior de la expresión de genes *wnt*, lo que da cuenta de un mecanismo de retroalimentación positivo, indicando que algunos genes *wnt* pueden ser activados por la misma vía Wnt. El fenotipo observado al inhibir la expresión de *tcf3b* o *tcf4* en embriones mutantes *zhd1* es el mismo que en mutantes donde la vía Wnt está sobreactivada, lo que indica que en regiones del cerebro en que la vía Wnt está reprimida, la función de los factores de transcripción *tcf* es requerida para una represión activa de genes regulados positivamente por Wnt. Estos resultados sugieren que hay un activador transcripcional de genes regulados por Wnt que funcionaría en ausencia de *tcf*. Un posible candidato son los factores de transcripción Sox, del tipo HMG al igual que los *tcf*, tienen la capacidad de interactuar con en el mismo sitio consenso de unión a DNA (Kamachi y col., 2000). Entre los Sox se han descrito tanto activadores como

represores de la transcripción. De hecho el promotor de *caudal* (*cdx*) que posee elementos de respuesta a Wnt y FGF es regulado positivamente en ausencia de Wnt, en un evento transcripcional mediado por Sox (Haremaki y col., 2003).

La diferencia notoria en el efecto de reprimir *tcf3b* o *tcf4* en embriones mutantes *zhdl* debe analizarse desde dos puntos de vista: 1. la diferencia en el patrón de expresión y 2. el curso temporal de expresión de ambos genes. El patrón de expresión de *tcf3b* cubre hasta el cerebro medio, no así el de *tcf4*, cuyo límite posterior es el diencéfalo dorsal (Figura 11). Si *tcf4* sólo tiene función en la especificación del territorio en el que se expresa, implica que una inhibición de *tcf4* sólo incide en un aumento de la actividad de Wnt en el territorio anterior al diencéfalo dorsal, cambiando exclusivamente la especificación de estos territorios. La inhibición de *tcf3b* en mutantes *zhdl* aumentaría la actividad de Wnt a un territorio más amplio que incluye la expresión de *tcf4*, lo que incide en el cambio de especificación de todo el territorio anterior al cerebro medio anterior. Los resultados que obtuvimos nos indican que *tcf4* y *tcf3b* funcionan especificando distintos territorios del cerebro y que la inhibición de *tcf* no concuerda con un efecto dosis dependiente, ya que la inhibición de ambos *tcf* en embriones mutantes *zhdl* no presenta un fenotipo mas pronunciado que la inyección de *tcf3b* por separado. Desde el punto de vista de la temporalidad, la expresión de *tcf3b* comienza previo a la de *tcf4* y podría especificar el territorio general de la cabeza, lo que permitiría la expresión de *tcf4* el que luego especificaría un sub-territorio dentro del campo de expresión de los *tcf3*.

Para averiguar qué variantes de *tcf4* participan en la función del gen en la especificación del cerebro realizamos experimentos de rescate del fenotipo de ausencia

de ojos coinyectando los mo de *tcf4* o *tcf3b* junto con el mRNA de las variantes que hemos clonado y que se expresan en el estadio de 10 hpf. Sólo obtuvimos un rescate satisfactorio del fenotipo de ausencia de ojos al coinyectar la variante 459L junto con el mo *tcf3b* en mutantes *zhdl*. La variante 49bL no rescató el fenotipo en las mismas condiciones. No hubo rescate del fenotipo al coinyectar estas variantes con mo *tcf4* en mutantes *zhdl*. Por un lado esto implica que la variante de *tcf4* 459L es capaz de reemplazar en función a *tcf3a* o *tcf3b* y por ende concluimos que es capaz de reprimir la transcripción de genes río abajo de Wnt. Proponemos que la región de splicing del exón 4 y del 5 incide en la interacción entre correpresores *gro/tle* y *tcf4*, lo que sería esencial para su actividad como represor de genes río abajo de Wnt. El hecho de que no haya rescate del fenotipo de la inyección del mo de *tcf4* con sus variantes puede radicar en la existencia de nuevas variantes por clonar.

En el presente trabajo describimos que, tal como en otras especies *tcf4* presenta una serie de exones y aceptores de procesamiento alternativos que permiten una diversidad de tipos de variantes de *tcf4* que se pueden manifestar. Clonamos un exón nuevo de *ztcf4* y demostramos que hay una variante específica que es capaz de suplir la función de *tcf3b* lo que nos ha permitido plantear una posible función para una región de exones alternativos que no había sido estudiada en otros sistemas.

En las variantes que clonamos hay dos exones alternativos entre la región de interacción con β catenina y DNA, un aceptor de procesamiento alternativo en el exón nueve, y tres posibles C-terminales de la proteína dependiendo si la maquinaria de splicing entra al exon 16 o se salta al exón 17. También hay un exón alternativo no clonado en ninguna de las variantes de *tcf4*, lo que indica que existen 7 regiones de la

proteína susceptibles a regulación por procesamiento alternativo. Esto quiere decir que hay 128 (2^7) posibles combinaciones de exones presentes en las variantes de *tcf4* de pez cebra. Si el procesamiento alternativo de las variantes no fuese regulado podrían coexistir en un tipo celular 128 variantes de *tcf4*. Nuestros estudios indican que este no es el caso y que el procesamiento alternativo es un fenómeno regulado en el tiempo y, posiblemente también en el espacio. Debido al tamaño pequeño de los exones no se pueden diseñar sondas que permitan resolver el patrón de expresión de variantes específicas, desafío aún pendiente. Entender cuándo y dónde se expresan los exones alternativos es tan importante como conocer el patrón de expresión del mRNA de los genes en cuestión. Mediante estudios *in silico* se ha determinado que el 65% de los genes del ser humano presentan por lo menos un exón alternativo y que el 5% del total tiene más de 100 variantes de procesamiento (Leipzig y col., 2004). El desarrollo embrionario es un proceso de alta complejidad que requiere de una coordinación espacial y temporal de la expresión génica. Hasta hoy, el estudio de la regulación génica en el embrión se limita a la genómica del desarrollo, sin embargo, se ha acumulado suficiente evidencia como para plantear que la respuesta a cómo se forma un ser vivo completo a partir de un repertorio limitado de genes también requiere del estudio del “transcriptoma” expresado durante el desarrollo embrionario.

CONCLUSIONES

1. La ausencia de Tcfs en el cerebro de pez cebra genera un aumento de la actividad Wnt expandiendo el cerebro medio a expensas del cerebro anterior.
2. La función represora de los Tcfs es necesaria para la correcta especificación antero-posterior en el cerebro en desarrollo de pez cebra.
3. En ausencia de señal Wnt, los Tcfs mantienen un estado reprimido que evita la activación de genes de respuesta a Wnt.
4. Unicamente la variante de *tcf4* que contiene los exones 4 y 5 es capaz de rescatar el fenotipo del mo *tcf3b* en embriones *zhdl*.
5. Tcf3a es capaz de suplir la ausencia de otros Tcfs para generar la correcta especificación de los territorios del cerebro.
6. Tcf4 especifica el territorio diencefálico y Tcf3 un territorio más amplio que comprende el diencefalo y el mesencéfalo.
7. Se postula la existencia de un activador de la transcripción de genes regulados por Wnt que funciona en ausencia de actividad represora de Tcfs.

BIBLIOGRAFIA

- Aberle, H., Bauer, A., Stappert, J., Kispert, A. and Kemler, R. (1997). beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *Embo J* **16**, 3797-804.
- Amit, S., Hatzubai, A., Birman, Y., Andersen, J. S., Ben-Shushan, E., Mann, M., Ben-Neriah, Y. and Alkalay, I. (2002). Axin-mediated CKI phosphorylation of beta-catenin at Ser 45: a molecular switch for the Wnt pathway. *Genes Dev* **16**, 1066-76.
- 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.
- Atcha, F. A., Munguia, J. E., Li, T. W., Hovanes, K. and Waterman, M. L. (2003). A new beta-catenin-dependent activation domain in T cell factor. *J Biol Chem* **278**, 16169-75.
- Baeg, G. H., Lin, X., Khare, N., Baumgartner, S. and Perrimon, N. (2001). Heparan sulfate proteoglycans are critical for the organization of the extracellular distribution of Wingless. *Development* **128**, 87-94.
- Barker, N., Hurlstone, A., Musisi, H., Miles, A., Bienz, M. and Clevers, H. (2001). The chromatin remodelling factor Brg-1 interacts with beta-catenin to promote target gene activation. *Embo J* **20**, 4935-43.
- Behrens, J., Jerchow, B. A., Wurtele, M., Grimm, J., Asbrand, C., Wirtz, R., Kuhl, M., Wedlich, D. and Birchmeier, W. (1998). Functional interaction of an axin homolog, conductin, with beta-catenin, APC, and GSK3beta. *Science* **280**, 596-9.
- Behrens, J., von Kries, J. P., Kuhl, M., Bruhn, L., Wedlich, D., Grosschedl, R. and Birchmeier, W. (1996). Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* **382**, 638-42.
- Bhanot, P., Brink, M., Samos, C. H., Hsieh, J. C., Wang, Y., Macke, J. P., Andrew, D., Nathans, J. and Nusse, R. (1996). A new member of the frizzled family from *Drosophila* functions as a Wingless receptor. *Nature* **382**, 225-30.

- Blumberg, B., Bolado, J., Jr., Moreno, T. A., Kintner, C., Evans, R. M. and Papalopulu, N.** (1997). An essential role for retinoid signaling in anteroposterior neural patterning. *Development* **124**, 373-9.
- Bouwmeester, T., Kim, S., Sasai, Y., Lu, B. and De Robertis, E. M.** (1996). Cerberus is a head-inducing secreted factor expressed in the anterior endoderm of Spemann's organizer. *Nature* **382**, 595-601.
- Brannon, M., Brown, J. D., Bates, R., Kimelman, D. and Moon, R. T.** (1999). XCtBP is a XTcf-3 co-repressor with roles throughout Xenopus development. *Development* **126**, 3159-70.
- Brannon, M., Gomperts, M., Sumoy, L., Moon, R. T. and Kimelman, D.** (1997). A beta-catenin/XTcf-3 complex binds to the siamois promoter to regulate dorsal axis specification in Xenopus. *Genes Dev* **11**, 2359-70.
- Brannon, M. and Kimelman, D.** (1996). Activation of Siamois by the Wnt pathway. *Dev Biol* **180**, 344-7.
- Brantjes, H., Roose, J., van De Wetering, M. and Clevers, H.** (2001). All Tcf HMG box transcription factors interact with Groucho-related co-repressors. *Nucleic Acids Res* **29**, 1410-9.
- Cadigan, K. M., Fish, M. P., Rulifson, E. J. and Nusse, R.** (1998). Wingless repression of Drosophila frizzled 2 expression shapes the Wingless morphogen gradient in the wing. *Cell* **93**, 767-77.
- Cavallo, R. A., Cox, R. T., Moline, M. M., Roose, J., Polevoy, G. A., Clevers, H., Peifer, M. and Bejsovec, A.** (1998). Drosophila Tcf and Groucho interact to repress Wingless signalling activity. *Nature* **395**, 604-8.
- Chen, G., Fernandez, J., Mische, S. and Courey, A. J.** (1999). A functional interaction between the histone deacetylase Rpd3 and the corepressor groucho in Drosophila development. *Genes Dev* **13**, 2218-30.
- Chen, W., ten Berge, D., Brown, J., Ahn, S., Hu, L. A., Miller, W. E., Caron, M. G., Barak, L. S., Nusse, R. and Lefkowitz, R. J.** (2003). Dishevelled 2 recruits beta-arrestin 2 to mediate Wnt5A-stimulated endocytosis of Frizzled 4. *Science* **301**, 1391-4.

- Cho, E. A. and Dressler, G. R.** (1998). TCF-4 binds beta-catenin and is expressed in distinct regions of the embryonic brain and limbs. *Mech Dev* **77**, 9-18.
- Cox, R. T., Pai, L. M., Miller, J. R., Orsulic, S., Stein, J., McCormick, C. A., Audeh, Y., Wang, W., Moon, R. T. and Peifer, M.** (1999). Membrane-tethered Drosophila Armadillo cannot transduce Wingless signal on its own. *Development* **126**, 1327-35.
- Cox, W. G. and Hemmati-Brivanlou, A.** (1995). Caudalization of neural fate by tissue recombination and bFGF. *Development* **121**, 4349-58.
- Daniels, D. L. and Weis, W. I.** (2002). ICAT inhibits beta-catenin binding to Tcf/Lef-family transcription factors and the general coactivator p300 using independent structural modules. *Mol Cell* **10**, 573-84.
- 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.
- Duval, A., Rolland, S., Tubacher, E., Bui, H., Thomas, G. and Hamelin, R.** (2000). The human T-cell transcription factor-4 gene: structure, extensive characterization of alternative splicings, and mutational analysis in colorectal cancer cell lines. *Cancer Res* **60**, 3872-9.
- Ekker, M., Wegner, J., Akimenko, M. A. and Westerfield, M.** (1992). Coordinate embryonic expression of three zebrafish engrailed genes. *Development* **116**, 1001-10.
- Foley, A. C. and Stern, C. D.** (2001). Evolution of vertebrate forebrain development: how many different mechanisms? *J Anat* **199**, 35-52.
- Fredieu, J. R., Cui, Y., Maier, D., Danilchik, M. V. and Christian, J. L.** (1997). Xwnt-8 and lithium can act upon either dorsal mesodermal or neurectodermal cells to cause a loss of forebrain in *Xenopus* embryos. *Dev Biol* **186**, 100-14.
- Gans, C. and Northcutt, R.G.** (1983) Neural crest and the origin of vertebrates: a new head. *Science* **220**, 268-274.

- Giese, K., Amsterdam, A. and Grosschedl, R.** (1991). DNA-binding properties of the HMG domain of the lymphoid-specific transcriptional regulator LEF-1. *Genes Dev* **5**, 2567-78.
- 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.
- Glinka, A., Wu, W., Delius, H., Monaghan, A. P., Blumenstock, C. and Niehrs, C.** (1998). Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction. *Nature* **391**, 357-62.
- Gradl, D., Konig, A. and Wedlich, D.** (2002). Functional diversity of Xenopus lymphoid enhancer factor/T-cell factor transcription factors relies on combinations of activating and repressing elements. *J Biol Chem* **277**, 14159-71.
- Graham, T. A., Ferkey, D. M., Mao, F., Kimelman, D. and Xu, W.** (2001). Tcf4 can specifically recognize beta-catenin using alternative conformations. *Nat Struct Biol* **8**, 1048-52.
- Greco, V., Hannus, M. and Eaton, S.** (2001). Argosomes: a potential vehicle for the spread of morphogens through epithelia. *Cell* **106**, 633-45.
- 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.
- Haremaki, T., Tanaka, Y., Hongo, I., Yuge, M. and Okamoto, H.** (2003). Integration of multiple signal transducing pathways on Fgf response elements of the Xenopus caudal homologue Xcad3. *Development* **130**, 4907-17.
- Hart, M. J., de los Santos, R., Albert, I. N., Rubinfeld, B. and Polakis, P.** (1998). Downregulation of beta-catenin by human Axin and its association with the APC tumor suppressor, beta-catenin and GSK3 beta. *Curr Biol* **8**, 573-81.
- He, T. C., Sparks, A. B., Rago, C., Hermeking, H., Zawel, L., da Costa, L. T., Morin, P. J., Vogelstein, B. and Kinzler, K. W.** (1998). Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* **281**, 1509-12.

- Hecht, A., Litterst, C. M., Huber, O. and Kemler, R. (1999).** Functional characterization of multiple transactivating elements in beta-catenin, some of which interact with the TATA-binding protein in vitro. *J Biol Chem* **274**, 18017-25.
- Hecht, A. and Stemmler, M. P. (2003).** Identification of a promoter-specific transcriptional activation domain at the C terminus of the Wnt effector protein T-cell factor 4. *J Biol Chem* **278**, 3776-85.
- Hecht, A., Vleminckx, K., Stemmler, M. P., van Roy, F. and Kemler, R. (2000).** The p300/CBP acetyltransferases function as transcriptional coactivators of beta-catenin in vertebrates. *Embo J* **19**, 1839-50.
- Hedgepeth, C. M., Conrad, L. J., Zhang, J., Huang, H. C., Lee, V. M. and Klein, P. S. (1997).** Activation of the Wnt signaling pathway: a molecular mechanism for lithium action. *Dev Biol* **185**, 82-91.
- Heisenberg, C. P., Brand, M., Jiang, Y. J., Warga, R. M., Beuchle, D., van Eeden, F. J., Furutani-Seiki, M., Granato, M., Haffter, P., Hammerschmidt, M. et al. (1996).** Genes involved in forebrain development in the zebrafish, *Danio rerio*. *Development* **123**, 191-203.
- Heisenberg, C. P., Houart, C., Take-Uchi, M., Rauch, G. J., Young, N., Coutinho, P., Masai, I., Caneparo, L., Concha, M. L., Geisler, R. et al. (2001).** A mutation in the Gsk3-binding domain of zebrafish Masterblind/Axin1 leads to a fate transformation of telencephalon and eyes to diencephalon. *Genes Dev* **15**, 1427-34.
- Houart, C., Caneparo, L., Heisenberg, C., Barth, K., Take-Uchi, M. and Wilson, S. (2002).** Establishment of the telencephalon during gastrulation by local antagonism of Wnt signaling. *Neuron* **35**, 255-65.
- Houart, C., Westerfield, M. and Wilson, S. W. (1998).** A small population of anterior cells patterns the forebrain during zebrafish gastrulation. *Nature* **391**, 788-92.
- Hovanes, K., Li, T. W. and Waterman, M. L. (2000).** The human LEF-1 gene contains a promoter preferentially active in lymphocytes and encodes multiple isoforms derived from alternative splicing. *Nucleic Acids Res* **28**, 1994-2003.
- Hurlstone, A. and Clevers, H. (2002).** T-cell factors: turn-ons and turn-offs. *Embo J* **21**, 2303-11.

- Ishitani, T., Ninomiya-Tsuji, J. and Matsumoto, K.** (2003). Regulation of lymphoid enhancer factor 1/T-cell factor by mitogen-activated protein kinase-related Nemo-like kinase-dependent phosphorylation in Wnt/beta-catenin signaling. *Mol Cell Biol* **23**, 1379-89.
- Ishitani, T., Ninomiya-Tsuji, J., Nagai, S., Nishita, M., Meneghini, M., Barker, N., Waterman, M., Bowerman, B., Clevers, H., Shibuya, H. et al.** (1999). The TAK1-NLK-MAPK-related pathway antagonizes signalling between beta-catenin and transcription factor TCF. *Nature* **399**, 798-802.
- Itoh, K., Antipova, A., Ratcliffe, M. J. and Sokol, S.** (2000). Interaction of dishevelled and Xenopus axin-related protein is required for wnt signal transduction. *Mol Cell Biol* **20**, 2228-38.
- Itoh, M., Kudoh, T., Dedekian, M., Kim, C. H. and Chitnis, A. B.** (2002). A role for *iro1* and *iro7* in the establishment of an anteroposterior compartment of the ectoderm adjacent to the midbrain-hindbrain boundary. *Development* **129**, 2317-27.
- Kamachi, Y., Uchikawa, M. and Kondoh, H.** (2000). Pairing SOX off: with partners in the regulation of embryonic development. *Trends Genet* **16**, 182-7.
- Kao, K. R. and Elinson, R. P.** (1998). The legacy of lithium effects on development. *Biol Cell* **90**, 585-9.
- Kazanskaya, O., Glinka, A. and Niehrs, C.** (2000). The role of Xenopus *dickkopf1* in prechordal plate specification and neural patterning. *Development* **127**, 4981-92.
- Kelly, G. M., Greenstein, P., Erezyilmaz, D. F. and Moon, R. T.** (1995). Zebrafish *wnt8* and *wnt8b* share a common activity but are involved in distinct developmental pathways. *Development* **121**, 1787-99.
- Kelly, G. M. and Moon, R. T.** (1995). Involvement of *wnt1* and *pax2* in the formation of the midbrain-hindbrain boundary in the zebrafish gastrula. *Dev Genet* **17**, 129-40.
- Kiecker, C. and Niehrs, C.** (2001a). A morphogen gradient of Wnt/beta-catenin signalling regulates anteroposterior neural patterning in Xenopus. *Development* **128**, 4189-201.
- Kiecker, C. and Niehrs, C.** (2001b). The role of prechordal mesendoderm in neural patterning. *Curr Opin Neurobiol* **11**, 27-33.

- Kim, C. H., Oda, T., Itoh, M., Jiang, D., Artinger, K. B., Chandrasekharappa, S. C., Driever, W. and Chitnis, A. B.** (2000). Repressor activity of Headless/Tcf3 is essential for vertebrate head formation. *Nature* **407**, 913-6.
- Kim, S. H., Shin, J., Park, H. C., Yeo, S. Y., Hong, S. K., Han, S., Rhee, M., Kim, C. H., Chitnis, A. B. and Huh, T. L.** (2002). Specification of an anterior neuroectoderm patterning by Frizzled8a-mediated Wnt8b signalling during late gastrulation in zebrafish. *Development* **129**, 4443-55.
- 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.
- Kishida, S., Yamamoto, H., Ikeda, S., Kishida, M., Sakamoto, I., Koyama, S. and Kikuchi, A.** (1998). Axin, a negative regulator of the wnt signaling pathway, directly interacts with adenomatous polyposis coli and regulates the stabilization of beta-catenin. *J Biol Chem* **273**, 10823-6.
- Klein, P. S. and Melton, D. A.** (1996). A molecular mechanism for the effect of lithium on development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 8455-9.
- Knapp, S., Zamai, M., Volpi, D., Nardese, V., Avanzi, N., Breton, J., Plyte, S., Flocco, M., Marconi, M., Isacchi, A. et al.** (2001). Thermodynamics of the high-affinity interaction of TCF4 with beta-catenin. *J Mol Biol* **306**, 1179-89.
- Kobayashi, M., Toyama, R., Takeda, H., Dawid, I. B. and Kawakami, K.** (1998). Overexpression of the forebrain-specific homeobox gene *six3* induces rostral forebrain enlargement in zebrafish. *Development* **125**, 2973-82.
- Konig, A., Gradl, D., Kuhl, M. and Wedlich, D.** (2000). The HMG-box transcription factor XTcf-4 demarcates the forebrain-midbrain boundary. *Mech Dev* **93**, 211-4.
- Korinek, V., Barker, N., Morin, P. J., van Wichen, D., de Weger, R., Kinzler, K. W., Vogelstein, B. and Clevers, H.** (1997). Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC^{-/-} colon carcinoma. *Science* **275**, 1784-7.
- Korinek, V., Barker, N., Willert, K., Molenaar, M., Roose, J., Wagenaar, G., Markman, M., Lamers, W., Destree, O. and Clevers, H.** (1998). Two members of the Tcf family implicated in Wnt/beta-catenin signaling during embryogenesis in the mouse. *Mol Cell Biol* **18**, 1248-56.

- Krauss, S., Johansen, T., Korzh, V. and Fjose, A.** (1991). Expression pattern of zebrafish pax genes suggests a role in early brain regionalization. *Nature* **353**, 267-70.
- Kudoh, T., Wilson, S. W. and Dawid, I. B.** (2002). Distinct roles for Fgf, Wnt and retinoic acid in posteriorizing the neural ectoderm. *Development* **129**, 4335-46.
- Lagutin, O. V., Zhu, C. C., Kobayashi, D., Topczewski, J., Shimamura, K., Puelles, L., Russell, H. R., McKinnon, P. J., Solnica-Krezel, L. and Oliver, G.** (2003). Six3 repression of Wnt signaling in the anterior neuroectoderm is essential for vertebrate forebrain development. *Genes Dev* **17**, 368-79.
- Latres, E., Chiaur, D. S. and Pagano, M.** (1999). The human F box protein beta-Trcp associates with the Cull1/Skp1 complex and regulates the stability of beta-catenin. *Oncogene* **18**, 849-54.
- Leipzig, J., Pevzner, P. and Heber, S.** (2004). The Alternative Splicing Gallery (ASG): bridging the gap between genome and transcriptome. *Nucleic Acids Res* **32**, 3977-83.
- Lin, X. and Perrimon, N.** (1999). Dally cooperates with Drosophila Frizzled 2 to transduce Wingless signalling. *Nature* **400**, 281-4.
- Lin, X. and Perrimon, N.** (2000). Role of heparan sulfate proteoglycans in cell-cell signaling in Drosophila. *Matrix Biol* **19**, 303-7.
- Liu, C., Li, Y., Semenov, M., Han, C., Baeg, G. H., Tan, Y., Zhang, Z., Lin, X. and He, X.** (2002). Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell* **108**, 837-47.
- Liu, P., Wakamiya, M., Shea, M. J., Albrecht, U., Behringer, R. R. and Bradley, A.** (1999). Requirement for Wnt3 in vertebrate axis formation. *Nat Genet* **22**, 361-5.
- Logan, C.Y. and Nusse, R.** (2004) The Wnt Signaling Pathway in Development and Disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* Jul 2, epub ahead of print
- Loosli, F., Staub, W., Finger-Baier, K. C., Ober, E. A., Verkade, H., Wittbrodt, J. and Baier, H.** (2003). Loss of eyes in zebrafish caused by mutation of chokh/rx3. *EMBO Rep* **4**, 894-9.
- Mao, B., Wu, W., Davidson, G., Marhold, J., Li, M., Mechler, B. M., Delius, H., Hoppe, D., Stannek, P., Walter, C. et al.** (2002). Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/beta-catenin signalling. *Nature* **417**, 664-7.

- Mao, B., Wu, W., Li, Y., Hoppe, D., Stannek, P., Glinka, A. and Niehrs, C. (2001a).** LDL-receptor-related protein 6 is a receptor for Dickkopf proteins. *Nature* **411**, 321-5.
- Mao, J., Wang, J., Liu, B., Pan, W., Farr, G. H., 3rd, Flynn, C., Yuan, H., Takada, S., Kimelman, D., Li, L. et al. (2001b).** Low-density lipoprotein receptor-related protein-5 binds to Axin and regulates the canonical Wnt signaling pathway. *Mol Cell* **7**, 801-9.
- Masai, I., Heisenberg, C. P., Barth, K. A., Macdonald, R., Adamek, S. and Wilson, S. W. (1997).** floating head and masterblind regulate neuronal patterning in the roof of the forebrain. *Neuron* **18**, 43-57.
- Mathieu, J., Barth, A., Rosa, F. M., Wilson, S. W. and Peyrieras, N. (2002).** Distinct and cooperative roles for Nodal and Hedgehog signals during hypothalamic development. *Development* **129**, 3055-65.
- Merrill, B. J., Pasolli, H. A., Polak, L., Rendl, M., Garcia-Garcia, M. J., Anderson, K. V. and Fuchs, E. (2004).** Tcf3: a transcriptional regulator of axis induction in the early embryo. *Development* **131**, 263-74.
- Miller, J. R. and Moon, R. T. (1997).** Analysis of the signaling activities of localization mutants of beta-catenin during axis specification in *Xenopus*. *J Cell Biol* **139**, 229-43.
- Molenaar, M., van de Wetering, M., Oosterwegel, M., Peterson-Maduro, J., Godsave, S., Korinek, V., Roose, J., Destree, O. and Clevers, H. (1996).** XTcf-3 transcription factor mediates beta-catenin-induced axis formation in *Xenopus* embryos. *Cell* **86**, 391-9.
- Morin, P. J., Sparks, A. B., Korinek, V., Barker, N., Clevers, H., Vogelstein, B. and Kinzler, K. W. (1997).** Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science* **275**, 1787-90.
- Nieuwkoop, P.D. and Nigtevecht, G.V. (1954)** Neural activation and transformation in explants of competent ectoderm under the influence of fragments of anterior notocord in urodeles. *J. of Embryol. Exp. Morphol.* **2**, 175-193.
- Nordstrom, U., Jessell, T. M. and Edlund, T. (2002).** Progressive induction of caudal neural character by graded Wnt signaling. *Nat Neurosci* **5**, 525-32.

- Northcutt, R. G. and Gans, C.** (1983). The genesis of neural crest and epidermal placodes: a reinterpretation of vertebrate origins. *Q Rev Biol* **58**, 1-28.
- Odenthal, J. and Nusslein-Volhard, C.** (1998). fork head domain genes in zebrafish. *Dev Genes Evol* **208**, 245-58.
- Omer, C. A., Miller, P. J., Diehl, R. E. and Kral, A. M.** (1999). Identification of Tcf4 residues involved in high-affinity beta-catenin binding. *Biochem Biophys Res Commun* **256**, 584-90.
- Piccolo, S., Agius, E., Leyns, L., Bhattacharyya, S., Grunz, H., Bouwmeester, T. and De Robertis, E. M.** (1999). The head inducer Cerberus is a multifunctional antagonist of Nodal, BMP and Wnt signals. *Nature* **397**, 707-10.
- Pinson, K. I., Brennan, J., Monkley, S., Avery, B. J. and Skarnes, W. C.** (2000). An LDL-receptor-related protein mediates Wnt signalling in mice. *Nature* **407**, 535-8.
- Poy, F., Lepourcelet, M., Shivdasani, R. A. and Eck, M. J.** (2001). Structure of a human Tcf4-beta-catenin complex. *Nat Struct Biol* **8**, 1053-7.
- Pukrop, T., Gradl, D., Henningfeld, K. A., Knochel, W., Wedlich, D. and Kuhl, M.** (2001). Identification of two regulatory elements within the high mobility group box transcription factor XTcf-4. *J Biol Chem* **276**, 8968-78.
- Reifers, F., Bohli, H., Walsh, E. C., Crossley, P. H., Stainier, D. Y. and Brand, M.** (1998). Fgf8 is mutated in zebrafish acerebellar (ace) mutants and is required for maintenance of midbrain-hindbrain boundary development and somitogenesis. *Development* **125**, 2381-95.
- Roel, G., van den Broek, O., Spieker, N., Peterson-Maduro, J. and Destree, O.** (2003). Tcf-1 expression during *Xenopus* development. *Gene Expr Patterns* **3**, 123-6.
- Rohr, K. B., Barth, K. A., Varga, Z. M. and Wilson, S. W.** (2001). The nodal pathway acts upstream of hedgehog signaling to specify ventral telencephalic identity. *Neuron* **29**, 341-51.
- Roose, J., Molenaar, M., Peterson, J., Hurenkamp, J., Brantjes, H., Moerer, P., van de Wetering, M., Destree, O. and Clevers, H.** (1998). The *Xenopus* Wnt effector XTcf-3 interacts with Groucho-related transcriptional repressors. *Nature* **395**, 608-12.

- Rubinfeld, B., Albert, I., Porfiri, E., Munemitsu, S. and Polakis, P.** (1997). Loss of beta-catenin regulation by the APC tumor suppressor protein correlates with loss of structure due to common somatic mutations of the gene. *Cancer Res* **57**, 4624-30.
- Satoh, K., Kasai, M., Ishidao, T., Tago, K., Ohwada, S., Hasegawa, Y., Senda, T., Takada, S., Nada, S., Nakamura, T. et al.** (2004). Anteriorization of neural fate by inhibitor of beta-catenin and T cell factor (ICAT), a negative regulator of Wnt signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 8017-21.
- Shimamura, K. and Rubenstein, J. L.** (1997). Inductive interactions direct early regionalization of the mouse forebrain. *Development* **124**, 2709-18.
- Shinya, M., Eschbach, C., Clark, M., Lehrach, H. and Furutani-Seiki, M.** (2000). Zebrafish Dkk1, induced by the pre-MBT Wnt signaling, is secreted from the prechordal plate and patterns the anterior neural plate. *Mech Dev* **98**, 3-17.
- Smit, L., Baas, A., Kuipers, J., Korswagen, H., van de Wetering, M. and Clevers, H.** (2004). Wnt activates the Tak1/Nemo-like kinase pathway. *J Biol Chem* **279**, 17232-40.
- Stachel, S. E., Grunwald, D. J. and Myers, P. Z.** (1993). Lithium perturbation and goosecoid expression identify a dorsal specification pathway in the pregastrula zebrafish. *Development* **117**, 1261-74.
- Stern, C. D.** (2001). Initial patterning of the central nervous system: how many organizers? *Nat Rev Neurosci* **2**, 92-8.
- Strigini, M. and Cohen, S. M.** (2000). Wingless gradient formation in the Drosophila wing. *Curr Biol* **10**, 293-300.
- Tago, K., Nakamura, T., Nishita, M., Hyodo, J., Nagai, S., Murata, Y., Adachi, S., Ohwada, S., Morishita, Y., Shibuya, H. et al.** (2000). Inhibition of Wnt signaling by ICAT, a novel beta-catenin-interacting protein. *Genes Dev* **14**, 1741-9.
- Takemaru, K., Yamaguchi, S., Lee, Y. S., Zhang, Y., Carthew, R. W. and Moon, R. T.** (2003). Chibby, a nuclear beta-catenin-associated antagonist of the Wnt/Wingless pathway. *Nature* **422**, 905-9.
- Takemaru, K. I. and Moon, R. T.** (2000). The transcriptional coactivator CBP interacts with beta-catenin to activate gene expression. *J Cell Biol* **149**, 249-54.

- Tamai, K., Semenov, M., Kato, Y., Spokony, R., Liu, C., Katsuyama, Y., Hess, F., Saint-Jeannet, J. P. and He, X. (2000).** LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction. *Nature* **407**, 530-5.
- Tamai, K., Zeng, X., Liu, C., Zhang, X., Harada, Y., Chang, Z. and He, X. (2004).** A mechanism for Wnt coreceptor activation. *Mol Cell* **13**, 149-56.
- Tetsu, O. and McCormick, F. (1999).** Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* **398**, 422-6.
- Tolwinski, N. S., Wehrli, M., Rives, A., Erdeniz, N., DiNardo, S. and Wieschaus, E. (2003).** Wg/Wnt signal can be transmitted through arrow/LRP5,6 and Axin independently of Zw3/Gsk3beta activity. *Dev Cell* **4**, 407-18.
- Tolwinski, N. S. and Wieschaus, E. (2004).** A Nuclear Function for Armadillo/beta-Catenin. *PLoS Biol* **2**, E95.
- Townsley, F. M., Cliffe, A. and Bienz, M. (2004).** Pygopus and Legless target Armadillo/beta-catenin to the nucleus to enable its transcriptional co-activator function. *Nat Cell Biol* **6**, 626-33.
- Travis, A., Amsterdam, A., Belanger, C. and Grosschedl, R. (1991).** LEF-1, a gene encoding a lymphoid-specific protein with an HMG domain, regulates T-cell receptor alpha enhancer function [corrected]. *Genes Dev* **5**, 880-94.
- Trevarrow, B., Marks, D. L. and Kimmel, C. B. (1990).** Organization of hindbrain segments in the zebrafish embryo. *Neuron* **4**, 669-79.
- Tsuda, M., Kamimura, K., Nakato, H., Archer, M., Staatz, W., Fox, B., Humphrey, M., Olson, S., Futch, T., Kaluza, V. et al. (1999).** The cell-surface proteoglycan Dally regulates Wingless signalling in Drosophila. *Nature* **400**, 276-80.
- Umbhauer, M., Djiane, A., Goisset, C., Penzo-Mendez, A., Riou, J. F., Boucaut, J. C. and Shi, D. L. (2000).** The C-terminal cytoplasmic Lys-thr-X-X-X-Trp motif in frizzled receptors mediates Wnt/beta-catenin signalling. *Embo J* **19**, 4944-54.
- Valenta, T., Lukas, J. and Korinek, V. (2003).** HMG box transcription factor TCF-4's interaction with CtBP1 controls the expression of the Wnt target Axin2/Conductin in human embryonic kidney cells. *Nucleic Acids Res* **31**, 2369-80.

- van Beest, M., Dooijes, D., van De Wetering, M., Kjaerulff, S., Bonvin, A., Nielsen, O. and Clevers, H. (2000). Sequence-specific high mobility group box factors recognize 10-12-base pair minor groove motifs. *J Biol Chem* **275**, 27266-73.
- van de Water, S., van de Wetering, M., Joore, J., Esseling, J., Bink, R., Clevers, H. and Zivkovic, D. (2001). Ectopic Wnt signal determines the eyeless phenotype of zebrafish masterblind mutant. *Development* **128**, 3877-88.
- Van de Wetering, M., Castrop, J., Korinek, V. and Clevers, H. (1996). Extensive alternative splicing and dual promoter usage generate Tcf-1 protein isoforms with differential transcription control properties. *Mol Cell Biol* **16**, 745-52.
- van de Wetering, M., Cavallo, R., Dooijes, D., van Beest, M., van Es, J., Loureiro, J., Ypma, A., Hursh, D., Jones, T., Bejsovec, A. et al. (1997). Armadillo coactivates transcription driven by the product of the Drosophila segment polarity gene dTCF. *Cell* **88**, 789-99.
- van de Wetering, M., Oosterwegel, M., Dooijes, D. and Clevers, H. (1991). Identification and cloning of TCF-1, a T lymphocyte-specific transcription factor containing a sequence-specific HMG box. *Embo J* **10**, 123-32.
- Wang, X., Emelyanov, A., Sleptsova-Friedrich, I., Korzh, V. and Gong, Z. (2001). Expression of two novel zebrafish iroquois homologues (ziro1 and ziro5) during early development of axial structures and central nervous system. *Mech Dev* **105**, 191-5.
- Waterman, M. L., Fischer, W. H. and Jones, K. A. (1991). A thymus-specific member of the HMG protein family regulates the human T cell receptor C alpha enhancer. *Genes Dev* **5**, 656-69.
- Wehrli, M., Dougan, S. T., Caldwell, K., O'Keefe, L., Schwartz, S., Vaizel-Ohayon, D., Schejter, E., Tomlinson, A. and DiNardo, S. (2000). arrow encodes an LDL-receptor-related protein essential for Wingless signalling. *Nature* **407**, 527-30.
- Willert, K., Brown, J. D., Danenberg, E., Duncan, A. W., Weissman, I. L., Reya, T., Yates, J. R., 3rd and Nusse, R. (2003). Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature* **423**, 448-52.
- Wilson, S. W. and Houart, C. (2004). Early steps in the development of the forebrain. *Dev Cell* **6**, 167-81.

- Wilson, S. W. and Rubenstein, J. L.** (2000). Induction and dorsoventral patterning of the telencephalon. *Neuron* **28**, 641-51.
- Wong, H. C., Bourdelas, A., Krauss, A., Lee, H. J., Shao, Y., Wu, D., Mlodzik, M., Shi, D. L. and Zheng, J.** (2003). Direct binding of the PDZ domain of Dishevelled to a conserved internal sequence in the C-terminal region of Frizzled. *Mol Cell* **12**, 1251-60.
- Woo, K. and Fraser, S. E.** (1998). Specification of the hindbrain fate in the zebrafish. *Dev Biol* **197**, 283-96.
- Wurst, W. and Bally-Cuif, L.** (2001). Neural plate patterning: upstream and downstream of the isthmus organizer. *Nat Rev Neurosci* **2**, 99-108.
- Yanagawa, S., Matsuda, Y., Lee, J. S., Matsubayashi, H., Sese, S., Kadowaki, T. and Ishimoto, A.** (2002). Casein kinase I phosphorylates the Armadillo protein and induces its degradation in *Drosophila*. *Embo J* **21**, 1733-42.
- Yanagawa, S., van Leeuwen, F., Wodarz, A., Klingensmith, J. and Nusse, R.** (1995). The dishevelled protein is modified by wingless signaling in *Drosophila*. *Genes Dev* **9**, 1087-97.
- Yost, C., Torres, M., Miller, J. R., Huang, E., Kimelman, D. and Moon, R. T.** (1996). The axis-inducing activity, stability, and subcellular distribution of beta-catenin is regulated in *Xenopus* embryos by glycogen synthase kinase 3. *Genes Dev* **10**, 1443-54.
- Young, R. M., Reyes, A. E. and Allende, M. L.** (2002). Expression and splice variant analysis of the zebrafish *tcf4* transcription factor. *Mech Dev* **117**, 269-73.
- Zecca, M., Basler, K. and Struhl, G.** (1996). Direct and long-range action of a wingless morphogen gradient. *Cell* **87**, 833-44.