



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

“Defectos en el desarrollo del sistema nervioso en la mutante del gen *vps18* del pez cebra”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias

PRESENTA:
Samantha Carrillo Rosas

Dr. Ernesto Maldonado Olvera
[Instituto de Fisiología Celular](#)

Dr. Wilhelm Hansberg
[Instituto de Fisiología Celular](#)
Dr. Enrique Reynaud
[Instituto de Biotecnología UNAM. Campus Cuernavaca](#)

MÉXICO, D. F. Octubre, 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

RECONOCIMIENTOS

El presente trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Ernesto Maldonado Investigador del departamento de Biología Celular y del Desarrollo del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El comité Tutor que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo conformado por:

Dr. Wilhelm Hansberg Instituto de Fisiología Celular

Dr. Enrique Reynaud Instituto de Biotecnología

Para la realización de este proyecto fue necesaria la participación y el trabajo de las siguientes personas:

Biol. José Luis Ramos Balderas, Técnico Académico del laboratorio del Dr. Ernesto Maldonado.

M en C. Vladimir Tonatiuh Pelcastre Campos y Biol. Magda Elena Barrera Medina técnicos del acuario encargados del mantenimiento de las colonias de peces utilizadas para nuestra investigación.

Laboratorista María del Rocío Camarillo Villegas.

Los miembros de la unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, UNAM: Dra. Laura Ongay Larios, Biol. María Guadalupe Códiz Huerta y M. en C. Minerva Mora Cabrera.

Los miembros de la Unidad de Microscopía del Instituto de Fisiología Celular, UNAM: Dr. Fernando García Hernández, Med. Cir. Rodolfo Paredes Díaz y Biol. Gabriel Orozco Hoyuela.

Los miembros de la Unidad de Computo del Instituto de Fisiología Celular, UNAM: Gerardo Coello Coutiño, Ana María Escalante Gonzalbo, Juan Manuel Barbosa Castillo, Ivette Rosas Arciniega, Francisco Pérez Eugenio y Michael Cruz Rojas.

El jurado del examen para optar por el grado de Maestro en Ciencias (Bioquímicas) estuvo conformado por:

Presidente Dra. Rocío Salceda Sacanelles

Vocal Dra. Susana Castro Obregón

Vocal Dr. Francisco Fernández de Miguel

Vocal Dra. Diana Escalante Alcalde

Secretario Dr. Jesús Chimal Monroy

Agradecimientos

De manera muy especial quisiera agradecer a todas aquellas personas sin las cuales este trabajo hubiera sido imposible realizar.

A los miembros de mi comité tutor y del jurado evaluador por todos sus comentarios, consejos y su visión que me han ayudado a crecer académicamente.

A Leticia Gutiérrez y M. en C. Norma Trejo, por toda su invaluable ayuda.

Al Dr. López Casillas por toda su ayuda y sus enseñanzas.

A mi tutor Ernesto, por el interesante proyecto que me confió y todo su apoyo para poder desarrollarlo. Por ayudarme a crecer, no hay palabras para agradecerle.

A los estudiantes del laboratorio 225N de la Dra. Marina Macías por su apoyo técnico para la realización de experimentos.

A mi familia académica, ese increíble grupo de personas que tuve la fortuna de conocer. (Gracias Team Mala Copa) : José Luis: Gracias por todas tus enseñanzas técnicas pero sobre todo Gracias por tu amistad. Ceci: Gracias por ser mi amiga, mi cómplice y mi manitens. (Y todo lo que eso ha implicado). Aby: Gracias por tu amistad y por compartir conmigo la forma única que tienes de ver la vida. Rocío: Gracias por el consejo y el abrazo que siempre estuvo dispuesta a darme. Aída: Gracias por compartir conmigo tus conocimientos de vida y técnicos y sobre todo por compartir tu risa.

A los amigos que he encontrado en diferentes laboratorios del Instituto: Paco, Emma, Adrix, Vanesita, Rafa. Gracias por ayudarme, apoyarme, acompañarme y ser parte de esto.

A todos los miembros nuevos, viejos y pasajeros del 125N .

A mi familia:

A Alberto por toda su ayuda directa e indirecta a lo largo de los años. A mi abuela por su apoyo y cariño. A mis tíos: Ana, Paty y Arturo por todo lo que me han enseñado y por hacerme sentir que siempre puedo contar con ustedes. A mis primos: Sebas, Emi, Santi, Naty, Regis y Andrei por ser esos pequeños personajes que me hacen reír en todo momento. A Frank y Totetina.

Quiero dedicar este trabajo a quien me ha apoyado y ayudado en todo momento. Quien ha creído en mí incluso cuando yo dejo de hacerlo. Por todo su cariño y paciencia para que esto se lograra. Gracias Mamá

A Dios.....

“Science without religion is lame, religion without science is blind.”

Albert Einstein

Índice

1. Resumen

2. Introducción

- 2.1. El pez cebra como organismo Modelo
- 2.2. Mutante *vps18*^{hi2499aTg}
- 2.3. Hepatomegalia en la mutante *vps18*^{hi2499aTg}
- 2.4. Hipopigmentación en la mutante *vps18*^{hi2499aTg}
- 2.5. Disminución en la respuesta al ensayo optocinético en la mutante *vps18*^{hi2499aTg}
- 2.6. Vps18 y su función en tráfico vesicular
- 2.7. Vps18 y su relación con Plk2 y SPAR en el sistema nervioso
- 2.8. Las espinas dendríticas
- 2.9. El sistema visual del pez cebra

3. Planteamiento del Problema

4. Hipótesis

5. Objetivos

- 5.1. Objetivo general
- 5.2. Objetivos particulares

6. Materiales y Métodos

- 6.1. Mantenimiento de una colonia de peces y obtención de embriones
- 6.2. Cepas utilizadas
- 6.3. Genotipificaciones
- 6.4. Preparación de RNA total
- 6.5. Preparación de cDNA
- 6.6. Clonaciones de *plk2*
- 6.7. Construcción de arboles filogenéticos
- 6.8. Inmuntinciones en ojos completos
- 6.9. Inmunodetecciones por “western blot”
- 6.10. Microscopia electrónica
- 6.11. Marcajes retinotectales
- 6.12. Ensayo Opto-Motor (OMR)

7. Resultados

- 7.1. Descripción del fenotipo de la mutante *vps18*^{hi2499aTg}
 - 7.1.1. Genotipificación de la cepa *vps18*^{hi2499aTg}
 - 7.1.2. Defectos característicos de embriones y larvas homócigas *vps18*^{hi2499aTg}
 - 7.1.3. Morfología de motoneuronas en la cepa *Tg(isl1:GFP);vps18*^{hi2499a}
- 7.2. Defectos en el sistema visual de la mutante *vps18*^{hi2499aTg}
 - 7.2.1. Morfología del quiasma óptico

- 7.2.2. Estado del epitelio pigmentado de la retina y de los fotorreceptores en la mutante *vps18*^{hi2499aTg}
- 7.2.3. Apoptosis en la retina de la mutante *vps18*^{hi2499aTg}
- 7.2.4. Ensayo Opto-Motor en larvas silvestres y mutantes *vps18*^{hi2499aTg}
- 7.3. Análisis de marcadores de espinas dendríticas y la Interacción entre Vps18 y Plk2, en la mutante *vps18*^{hi2499aTg}
 - 7.3.1. Marcadores de espinas dendríticas en el IPL de la mutante *vps18*^{hi2499aTg}
 - 7.3.2. Expresión de Plk2a y PSD95 en la mutante *vps18*^{hi2499aTg}
 - 7.3.3. Análisis filogenético de los genes *plk2* y *spar*

8. Discusión

9. Conclusiones

- 9.1. Descripción del fenotipo general y defectos en el sistema visual de la mutante *vps18*^{hi2499aTg}
- 9.2. Análisis de marcadores presentes en espinas dendríticas y la interacción entre Vps18 y Plk2, en la mutante *vps18*^{hi2499aTg}

10. Perspectivas

- 10.1 Trasplantes de células WT a mutante y de células mutantes a WT
- 10.2 Rescates por medio de la microinyección de morfolinós para *plk2a* y *plk2b*
- 10.3 Inducción de la fenocopia por sobre-expresión de *plk2a*
- 10.4 Bloqueo de la expresión de *vps18* por silenciamiento de RNA (siRNA) en neuronas hipocampo de rata

11. Apéndice I

- 11.1 Análisis proteómico comparativo entre larvas silvestres y mutantes *vps18*^{hi2499aTg}

12. Bibliografía

Índice de Imágenes

Figura 1 Estadios de desarrollo del pez cebra.

Figura 2 Características Fenotípicas de la mutante *vps18^{hi2499aTg}*.

Figura 3 Características de la proteína de Vps18.

Figura 4 Capas de la retina en una larva de pez cebra WT de 5 días de desarrollo.

Figura 5 Modelo propuesto sobre la participación de Vps18 en la formación de Espinas Dendríticas.

Figura 6 Mantenimiento y crianza de peces cebra.

Figura 7 Genotipificaciones.

Figura 8 Morfología de motoneuronas en larvas WT y *Tg(isl1:GFP);vps18^{hi2499aTg}*.

Figura 9 Comparaciones entre neuronas expresando GFP en el área de la cabeza en larvas WT y *Tg(isl1:GFP);vps18^{hi2499aTg}* de 5 dpf.

Figura 10 Método para el marcaje retinotectal en larvas de pez cebra.

Figura 11 Marcajes retinotectales en larvas WT y *vps18^{hi2499aTg}*.

Figura 12 Microscopia Electrónica del Epitelio Pigmentado de la Retina (RPE) en larvas de pez cebra 5 dpf.

Figura 13 Estado general de los fotorreceptores en ojos de larvas de pez cebra observado por microscopia electrónica y técnica histológica (tinción de “azul de metileno - azure II” en cortes).

Figura 14 Apoptosis en la retina de *vps18^{hi2499aTg}*.

Figura 15 Respuesta al ensayo optomotor de *vps18^{hi2499aTg}*.

Figura 16 Comparación de la morfología de la capa interna plexiforme (IPL) de la retina.

Figura 17 Inmunotinciones en ojos de larvas de pez cebra.

Figura 18 Inmunotinciones en larvas WT y *vps18^{hi2499aTg}* a los 5 dpf.

Figura 19 Plk2 y PSD-95.

Figura 20 Filogenia de las proteínas Plk2 y SPAR.

Figura 21 Proteómica de la mutante *vps18^{hi2499aTg}*.

Figura 22 Proteómica de la mutante *vps18^{hi2499aTg}*.

1. Resumen

Vps18 es una proteína que se ha estudiado principalmente por su participación en tráfico vesicular, aunque estudios “*in vitro*” han mostrado que además tiene actividad de ligasa de ubiquitina tipo E3. La mutante en pez cebra de *vps18* entre otras características fenotípicas presenta una disminución en la respuesta a estímulos visuales. El presente proyecto pretende establecer una explicación a este defecto fenotípico, nuestros resultados sugieren que Vps18 interacciona con la proteína Plk2 (Cinasa tipo polo) y que esto tiene consecuencias en la formación de espinas dendríticas en las células ganglionares de la retina durante el desarrollo embrionario, lo que afecta la función visual.

Se realizó un análisis de la formación del quiasma utilizando el colorante Dil, mostrando una inervación completa y contralateral en la mutante. Por otra parte un análisis más minucioso a la retina mediante cortes histológicos y microscopía electrónica revelaron un desarreglo de los fotorreceptores y mayor presencia de apoptosis en la mutante, lo cual fue corroborado mediante la técnica de TUNEL. La realización de un ensayo de comportamiento en pez cebra basado en la visión (ensayo optomotor) mostró una respuesta positiva de apenas el 10% en la mutante. Por medio de inmunotinciones se mostró una ausencia de un marcador específico de espinas dendríticas en células ganglionares de la retina usando un anticuerpo que marca específicamente proteínas de la densidad post-sináptica y como control se empleó un anticuerpo que marca regiones pre-sinápticas. Esto concuerda con un análisis por western blot en donde se observa de un aumento de expresión de la proteína Plk2a de pez cebra que es homóloga a la proteína Plk2 en mamíferos y que se sabe que al estar presente se disminuye la cantidad de espinas dendríticas. Finalmente proponemos un modelo en el que Vps18 participa en la formación de espinas dendríticas durante el desarrollo embrionario.

2. Introducción

2.1 El pez cebra como organismo Modelo

La mayor parte de nuestros conocimientos sobre biología del desarrollo proviene de un número relativamente pequeño de organismos denominados “*organismos modelo*” entre los cuales se encuentran *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Xenopus laevis*, *Mus Musculus* (1). Entre estos se encuentra el pez cebra (*Danio rerio*), el cual es un pez nativo del sur de Asia que actualmente es común encontrarlo como modelo experimental en laboratorios alrededor del mundo (2-4). En 1981 inician los estudios genéticos en este organismo con una publicación acerca de la generación de clonas homocigas diploides (5). En 1994, durante una conferencia en el centro CSHL (*Cold Spring Harbor Laboratory*), el pez cebra fue establecido formalmente como organismo modelo para el estudio del desarrollo de vertebrados. En 1996, la revista “*Development*”, dedicó un número completo para reportar una mutagénesis en gran escala realizada en forma simultánea e independiente por dos grupos (en Alemania y Estados Unidos), en donde se reportaron aproximadamente 500 mutaciones responsables de defectos en el desarrollo embrionario (6). Actualmente, el pez cebra, se ha vuelto un modelo muy importante para el estudio de desarrollo y enfermedades en humanos (7-9), genómica funcional (10), desarrollo y fisiología de órganos (11, 12), comportamiento (13, 14), toxicología (15) y descubrimiento de fármacos (16). Todo lo anterior gracias a las diversas ventajas que ofrece este organismo modelo, como son: **(I)** una alta fecundidad que permite obtener hasta 200 embriones por pareja por semana; **(II)** un rápido desarrollo que a los 5 días permite contar con larvas completamente formadas con órganos funcionales (17); **(III)** la transparencia de sus embriones, que permite observar durante todo el desarrollo las divisiones celulares, la formación de los tejidos y la organogénesis (2); **(IV)** se han descrito con precisión las etapas del desarrollo embrionario desde la fertilización, la blastulación, gastrulación, somitogénesis y la formación de órganos (17) (figura 1); y **(V)** su genoma se

encuentra secuenciado lo cual le da un gran potencial para investigaciones genéticas y genómicas (18).

2.2 Mutante *vps18*^{hi2499aTg}

Existen varias estrategias para la generación de mutantes en el pez cebra, el primero se basa en la utilización de un químico llamado *N-etil-N-nitrosourea* (ENU), el cual produce aleatoriamente mutaciones puntuales en la línea germinal, lo que resulta en una alta frecuencia de fenotipos mutantes. Sin embargo, a pesar de la alta eficiencia del ENU en la generación de mutaciones puntuales, esta estrategia presenta como limitante la dificultad de identificar a los genes cuyas mutaciones son responsables de un fenotipo en particular (4). El segundo acercamiento es la mutagénesis por inserciones en la que DNA exógeno sirve como mutágeno y al mismo tiempo como marcador del gen cuya interrupción causa un cierto fenotipo.

En 1999, el laboratorio de la Dra. Nancy Hopkins en el instituto de Tecnología de Massachusetts (MIT) realizó una mutagénesis masiva en el pez cebra empleando como mutágeno la inserción de un retrovirus pseudotipificado, lo que significa que está compuesto por DNA del virus de leucemia murina Moloney pero una envoltura glicoproteica del virus de la estomatitis vesicular. En esta mutagénesis se generaron aproximadamente 550 mutantes las cuales representan mutaciones en aproximadamente 400 genes diferentes (19, 20). Una de estas inserciones se localiza en el exón 4 del gen *vps18*, (por sus siglas en inglés *vacuolar protein sorting*) interrumpiendo los nucleótidos 2236 y 2237 dando lugar a la mutante conocida como *vps18*^{hi2499aTg}. Esta mutante es letal recesiva ya que se desarrolla hasta los 9 - 14 días pero no sobrevive hasta la etapa adulta. La mutante presenta varios fenotipos morfológicos predominantes como son: Hepatomegalia, hipopigmentación en la piel y el epitelio pigmentado de la retina (RPE, por las siglas en inglés *Retinal Pigmented Epithelium*) (figura 2) y un defecto en la respuesta al ensayo optocinético (21, 22).

2.3 Hepatomegalia en la mutante *vps18*^{hi2499aTg}

Los hepatoblastos se generan a partir células del endodermo, proliferan en la parte ventral del embrión y se diferencian en un brote que dará lugar al hígado (23). El hígado de la mutante *vps18*^{hi2499aTg} se encuentra aumentado de tamaño lo cual se conoce como hepatomegalia, los hepatocitos de la mutante presentan alargamiento el cual confirmaron mediante la medición cuantitativa del tamaño celular (22). En condiciones normales los hepatocitos de larvas de 5 días post-fertilización (dpf) presentan glucógeno abundante, lo que da al citoplasma un aspecto granuloso, por el contrario en la mutante de *vps18*, se ve poco glucógeno y se han encontrado acumulaciones grandes vesículas o vacuolas unidas a la membrana (22) (figura 2C).

2.4 Hipopigmentación en la mutante *vps18*^{hi2499aTg}

Los precursores de los melanocitos se conocen como melanoblastos y se originan en la cresta neural aproximadamente a las 15 horas post fertilización (hpf) desde donde inician su migración a lo largo del cuerpo del embrión y posteriormente su diferenciación en melanocitos. La mutante de *vps18* muestra una reducción en la pigmentación tanto en melanocitos como en células del RPE, lo cual es aparente a los 2 dpf (figura 2A), persiste a los 5 dpf (figura 2B) y continúa posteriormente. Esta hipopigmentación se causa por la disminución en el número de melanosomas (figura 2D) y la presencia de melanosomas inmaduros en estadios tardíos, los cuales solo están presentes en embriones de pez cebra silvestres de etapas más tempranas del desarrollo (21) (figura 12 C y D).

2.5 Disminución en la respuesta al ensayo optocinético en la mutante *vps18*^{hi2499aTg}

En nuestro grupo de investigación se demostró que la mutante *vps18*^{hi2499aTg} presenta una disminución en la respuesta optocinética (OKR, por sus siglas en inglés *Optokinetic Response*) en un 80% con respecto al control (21). El OKR es una respuesta visual provocada por objetos (en el ensayo utilizamos bandas claras y oscuras) que se encuentran en movimiento a lo largo del campo

visual de la larva, evocando movimientos oculares estereotípicos de seguimiento los cuales pueden ser cuantificados (24). En un inicio se pensó que esta disminución, en la mutante *vps18^{hi2499aTg}*, de la respuesta al OKR se debía a la falta de pigmentación, sin embargo larvas hipopigmentadas artificialmente (empleando el compuesto feniltiourea, PTU, que inhibe la síntesis de melanina) no presentaron una disminución al ensayo OKR como en la mutante, por lo que se propuso que existe algún otro factor que contribuye a la disminución en la respuesta al ensayo optocinético en la mutante *vps18^{hi2499aTg}* (21).

2.6 Vps18 y su función en tráfico vesicular

La proteína Vps18 es soluble, presenta una masa molecular de aproximadamente 113 kDa, cuenta con 970 aminoácidos y está muy conservada presentando ortólogos en diversas especies eucariontes desde levaduras hasta mamíferos (25-29). Vps18 tiene dos dominios conservados, un dominio de “Clatrina (CHCR)” y un dominio “RING finger” de unión a zinc (figura 3A), ambos dominios se encuentran involucrados en establecer interacciones con otras proteínas (30). La proteína Vps18 junto con Vps11, Vps16, Vps33, Vps39 y Vps41 forman el complejo HOPS (por sus siglas en inglés, *Homotypic protein sorting*) (figura 3C y E) el cual participa en el tráfico vesicular, mediando la transferencia de vesículas de cargo desde Golgi a endosomas tardíos; de endosomas tempranos a endosomas tardíos y de endosomas tardíos a lisosomas (30). Mutaciones en Vps18 de *Saccharomyces cerevisiae* tienen como consecuencia un bloqueo en el tráfico vesicular y la acumulación de cuerpos multi-vesiculares (28). Lo anterior también ocurre en la mutante Vps18 de *Drosophila* denominada *deep orange (dor)* cuyo nombre se debe a su fenotipo de coloración naranja en los ojos dada por una disminución de los pigmentos rojos y cafés (27, 29). En esta mutante (*dor*) se encontró que Vps18 se localiza, tanto en la pre-sinapsis como en la post-sinapsis de las uniones neuromusculares de larvas de *Drosophila*. La mutante *dor* presenta una reducción significativa en el número de arborizaciones sinápticas de las uniones neuromusculares (27) lo que sugiere que la respuesta disminuida al

ensayo OKR de la mutante de pez cebra *vps18^{hi2499aTg}* puede estar relacionada con defectos durante el desarrollo del sistema nervioso (21).

2.7 Vps18 y su relación con Plk2 y SPAR en el sistema nervioso

El dominio de RING-finger es común en ligasas de ubiquitina, Vps18 tiene actividad de ligasa tipo E3 (figura 3A), ya que se demostró en ensayos de ubiquitinación *in vitro*, en donde también se encontró que Vps18 es capaz de ubiquitinar a la proteína *Polo like kinase 2* (Plk2 ó SNK). Esto fue reforzado por ensayos de doble híbrido en donde se demostró que Vps18 y Plk2 interactúan (30). Al mismo tiempo se estableció que la sobre-expresión de Vps18, en cultivos de células HeLa, induce la degradación de Plk2 (figura 5B). Todo lo anterior sugiere que Vps18 es la E3 ubiquitina ligasa de Plk2 (31).

Plk2 forma parte de una familia de cinasas de serina-treonina junto con Plk1 y Plk3, esta familia se encuentra definida por dominios conservados, el dominio amino terminal de cinasa de serina-treonina y dos dominios tipo Polo en la región carboxilo terminal. Las proteínas Plk juegan un papel importante durante las diferentes etapas de la mitosis, por lo cual el estudio de esta familia se ha enfocado principalmente a su papel regulatorio en el ciclo celular. Plk2 ha sido la menos estudiada, ya que a diferencia de Plk1 y Plk3, parece carecer de un papel importante en el ciclo celular. Mutantes nulas de Plk2 en ratón muestran solamente un retraso en el desarrollo del embrión y problemas en el desarrollo del esqueleto (32). Plk2 se expresa en células post-mitóticas como las neuronas en el cerebro y no se encuentra en tejidos con alta proliferación como el hígado o el intestino en ratón (33), lo cual sugiere que Plk2 no participa en el ciclo celular. La primera evidencia directa de que Plk2 tiene una función en el sistema nervioso, fue la observación de que sus niveles de mRNA y proteína se elevan cuando hay aumento en la actividad sináptica neuronal (34, 35).

Una función importante de Plk2 en el sistema nervioso tiene que ver con la interacción, por medio de su región carboxilo terminal (dominio tipo Polo), con una proteína RapGap activadora conocida como SPAR (*spine –associated Rap*

guanosine triphosphatase activating protein). SPAR es una proteína de andamiaje de citoesqueleto que se encuentra enriquecida en regiones post-sinápticas en donde promueve la formación de las espinas dendríticas mediante la inhibición de una Rap-GTPasa involucrada en la regulación de la dinámica de actina (36). La sobre-expresión de Plk2 en neuronas del hipocampo causa la eliminación de SPAR, lo que a su vez ocasiona la pérdida de las espinas maduras en neuronas del hipocampo de mamíferos (37). Esta regulación negativa de Plk2 sobre SPAR ocurre cuando Plk2 fosforila a SPAR, lo que induce su interacción con el complejo proteico SCF-Beta-TRCP, el cual a su vez ubiquitina a SPAR fosforilado induciendo su degradación (38) (figura 5E).

2.8 Las espinas dendríticas

Las espinas dendríticas son diminutas protuberancias localizadas a lo largo de las dendritas de neuronas glutamatérgicas, están especializadas en recibir estímulos excitatorios sinápticos y para ello forman un ancho botón post-sináptico en la región más distal de la espina (conocido como densidad post-sináptica o PSD), la cual se conecta a la dendrita por un cuello estrecho (39) (figura 5A). Las espinas tienen una longitud aproximada de 0.5-2 μm de longitud y se han clasificado por la forma en que se presentan; delgada, corta, en forma de hongo o de copa, además presentan un característico comportamiento bioquímico semiautónomo que le permite aislar y amplificar las señales entrantes. El citoesqueleto de las espinas dendríticas es crucial para su función y estabilidad, ambas isoformas de la actina filamentosa (F-actina) se encuentran altamente concentradas en las espinas dendríticas (40), mientras que casi no cuentan con microtúbulos. La forma y estabilidad de la cabeza y cuello de las espinas es probablemente determinado por el citoesqueleto de actina, por lo que las proteínas que se unen a este y lo modifican son posiblemente los reguladores de la morfogénesis de las espinas dendríticas (41). SPAR es una de las proteínas más importantes que determina el arreglo del citoesqueleto de actina (34). En el pez cebra se ha reportado la presencia de espinas dendríticas en las células

ganglionares de la retina de peces adultos, en donde se han clasificado de acuerdo al número de espinas y a los patrones de ramificación que presentan (42).

2.9 El sistema visual del pez cebra

La retina es uno de los mejores ejemplos de ordenamiento celular con sus diferentes tipos celulares en un arreglo que refleja claramente su función, es decir el relevo de la transmisión sináptica con información visual (figura 4). En el pez cebra, la fertilización y el desarrollo embrionario tienen lugar afuera de la madre, existe una presión de selección positiva para un rápido desarrollo de los sistemas sensoriales, de tal manera que se pueda evitar a los depredadores y al mismo tiempo pueda comenzar la captura de presas para alimentación. Los embriones salen del corion aproximadamente a las 48 hpf y una respuesta inicial a estímulos visuales es evidente al finalizar el segundo día de desarrollo. Algunos comportamientos visuales, tales como la respuesta optocinética aparecen durante el tercer día de desarrollo y son bastante robustos para el día cinco (43). En ese momento se infla la vejiga natatoria y el vitelo se ha consumido, por lo que la vida de la larva depende de atrapar su propio alimento (protozoarios y pequeñas larvas de metazoarios).

El ojo es un órgano complejo en el cual diferentes tejidos cooperan para formar una imagen óptica, para transducir esas imágenes en un arreglo de mensajes neuronales, analizar estos mensajes y transmitirlos al cerebro. El cambio en el desarrollo de la retina en el pez cebra es notorio pues pasa de un neuroepitelio proliferativo a una retina funcional en aproximadamente dos días y medio. Aproximadamente a las 12 hpf, el primordio retinal es primeramente evidente como un epitelio plano pseudo-estratificado, y para los 3 días post-fertilización, el ojo, incluidos los fotorreceptores y la red sináptica se encuentra suficientemente desarrollada para que la larva al eclosionar pueda ver y responder a patrones o estímulos en el ambiente.

La vesícula óptica plana se transforma en el ocular semiesférico entre las 16 y las 24 hpf. La vesícula se inclina en relación con el tubo neural, la superficie

dorsolateral se vuelve cóncava y progresivamente va profundizándose en una copa que rodea firmemente la placoda que se encuentra hacia dentro. A las 24 horas la lente se ha desprendido a partir del ectodermo suprayacente y está rodeado por el ocular en todas partes excepto en la pupila y la fisura coroides. La conversión de la vesícula óptica en un ocular se logra con un volumen y número de células esencialmente constante en las dos capas.

La lente se desarrolla como una masa celular sólida que adquiere una forma esférica y surge de la superficie del ectodermo alrededor de las 24 hpf. Las células son inicialmente orientadas radialmente alrededor del centro de la lente, pero se reorganizan en un arreglo de capas después del cual la mayor parte de las células en el centro pierden sus núcleos y dejan atrás un centro proteico que contiene mayormente polipéptidos especializados, los cristalinos (44).

Las células de la retina en los vertebrados se encuentran organizadas de manera precisa y laminar. La mayor característica de este patrón, es la facilidad de distinguir en secciones transversales las tres capas celulares separadas por capas donde ocurren los procesos sinápticos. Así como en otros vertebrados los fotorreceptores ocupan una capa celular adyacente al epitelio pigmentado, mientras que las células ganglionares forman una capa adyacente al lente. Entre estas dos clases celulares, interneuronas retinales forman la capa interna nuclear, delimitada en ambos lados por capas donde ocurren las sinapsis (Figura 4 B)

Las primeras células ganglionares de la retina surgen entre las 27 y 28 hpf, seguidas de células amácrinas y bipolares que aparecen aproximadamente 10 horas después (~38 hpf) y finalmente se forma la capa de fotorreceptores (~48 hpf). Los axones de las células ganglionares abandonan la retina a las 32 hpf para inervar el tectum óptico entre las 45 y las 48 hpf. Como se mencionó antes, la diferenciación de las células ganglionares ocurre poco antes de la aparición de las células amácrinas formando en conjunto la capa interna plexiforme (CIP), que es una capa de la retina carente de células en donde se establece la mayoría de las conexiones sinápticas (figura 4 B). Las conexiones sinápticas dentro del CIP son evidentes a las 60 hpf (45).

Para los 5 días de desarrollo la región más externa de la retina se encuentra compuesta de un mosaico de fotorreceptores consistente de cuatro tipos de conos intercalados con bastones. La retina de pez cebra cuenta con 4 pigmentos visuales incluyendo un pigmento que es sensible a la luz ultravioleta, por eso se considera que este organismo tiene una visión tetracrómica (46). En 5 dpf la retina se encuentra suficientemente madura como para percibir imágenes e inducir comportamientos que requieren del sentido de la visión como son las respuestas optocinética y optomotora.

3. Planteamiento del Problema

En nuestro grupo se demostró que la mutante *vps18*^{hi2499aTg} presenta una disminución en la respuesta optocinética (OKR) en un 80% con respecto al control (21), se han descrito en humano problemas de agudeza visual relacionados con albinismo por lo cual se disminuyó el grado de pigmentación de las larvas en forma artificial y se comprobó que la disminución en la respuesta no era debida únicamente a la falta de pigmentación presente en la mutante. Esto llevó a la conclusión de que posiblemente existe algún otro factor que contribuya a la disminución en la respuesta al ensayo optocinético en la mutante *vps18*^{hi2499aTg}. Al mismo tiempo se ha reportado que la mutante para Vps18 de *Drosophila melanogaster* denominada *deep orange (dor)* presenta una reducción significativa en el número de arborizaciones sinápticas de las uniones neuromusculares (27), lo que sugiere que la respuesta disminuida al ensayo OKR de la mutante de pez cebra *vps18*^{hi2499aTg} puede estar relacionada con defectos durante el desarrollo del sistema nervioso. Existe evidencia de que Vps18 puede regular negativamente la expresión de Plk2 (31) (figura 5 B) y que Plk2 es un inhibidor de la formación de espinas dendríticas en neuronas glutamatérgicas (37).

Con base a esto el presente proyecto se ha destinado a probar la participación de *vps18* en la formación del sistema nervioso en el pez cebra, desde el punto de vista morfológico, funcional y molecular.

4. Hipótesis

Para el presente proyecto la hipótesis se dividió en dos puntos:

- En la mutante *vps18*^{hi2499aTg} hay defectos en el desarrollo del sistema nervioso y esto causa una disminución en la respuesta al ensayo optocinético.
- Como consecuencia de la falta de expresión de *vps18* las células ganglionares de la retina no forman espinas dendríticas.

5. Objetivos

5.1 Objetivo general:

Caracterizar el fenotipo de la mutante *vps18*^{hi2499aTg} con especial énfasis en analizar la morfología y función del sistema visual, además de determinar cómo se afecta la formación de las espinas dendríticas como consecuencia de la falta de expresión de Vps18.

5.2 Objetivos particulares:

1. Describir las características fenotípicas de la mutante *vps18*^{hi2499aTg}.
2. Caracterizar los defectos generales de la retina en la mutante *vps18*^{hi2499aTg} que pueden afectar el desempeño visual.
3. Estudiar la formación de espinas dendríticas y la interacción entre Vps18 y Plk2 en la mutante *vps18*^{hi2499aTg}.

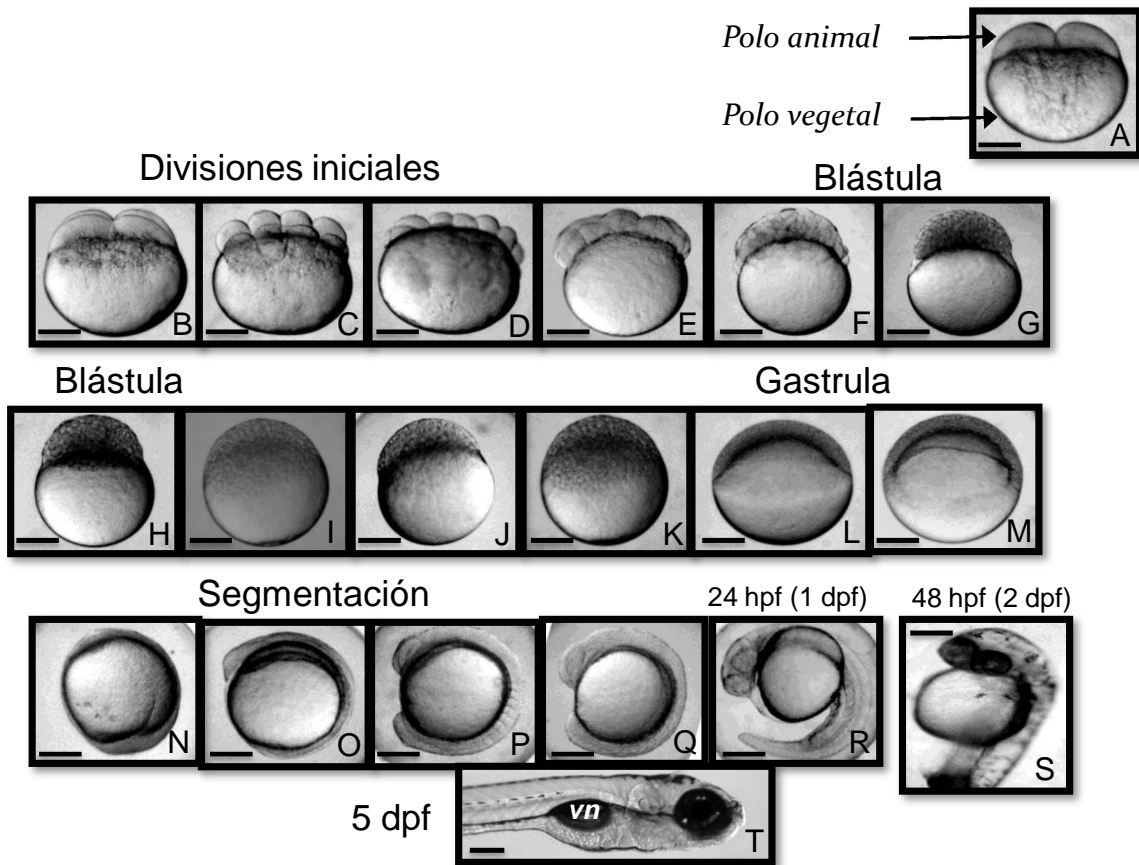


Figura 1. Estadios de desarrollo del pez cebra. **A-E** representan los estadios iniciales del desarrollo con divisiones rápidas y sincrónicas. **F-K** Estadios del periodo de blástula, etapa igualmente rápida con ciclos celulares metasincrónicos y comienza la epibolia (migración celular desde el polo animal al polo vegetal). **L y M** representan el periodo de gastrulación, que se caracteriza por movimientos morfogenéticos de invaginación, convergencia y extensión y en donde se forman las tres capas germinales. **N-Q** La segmentación se caracteriza por la formación de somitos y organogénesis temprana, aparecen igualmente los primeros movimientos del embrión. **R** Representación de la etapa faringula (24 horas post fertilización) comienza a enderezarse el embrión con respecto a su eje, así mismo inicia la circulación sanguínea y la pigmentación del embrión. **S** Es un embrión en la etapa de eclosión, continua la morfogénesis de varios órganos, se desarrolla el cartilago en cabeza y aleta pectoral, ocurre además la ruptura del corión por el embrión (eclosión). **T** representación de una larva de 5 días post fertilización para este momento la larva cuenta con todos sus órganos formados y su vejiga natatoria esta ya inflada, esta larva es capaz de alimentarse. Las barras en **A – T** representan 200 μ m de tamaño, vn; es vejiga natatoria.

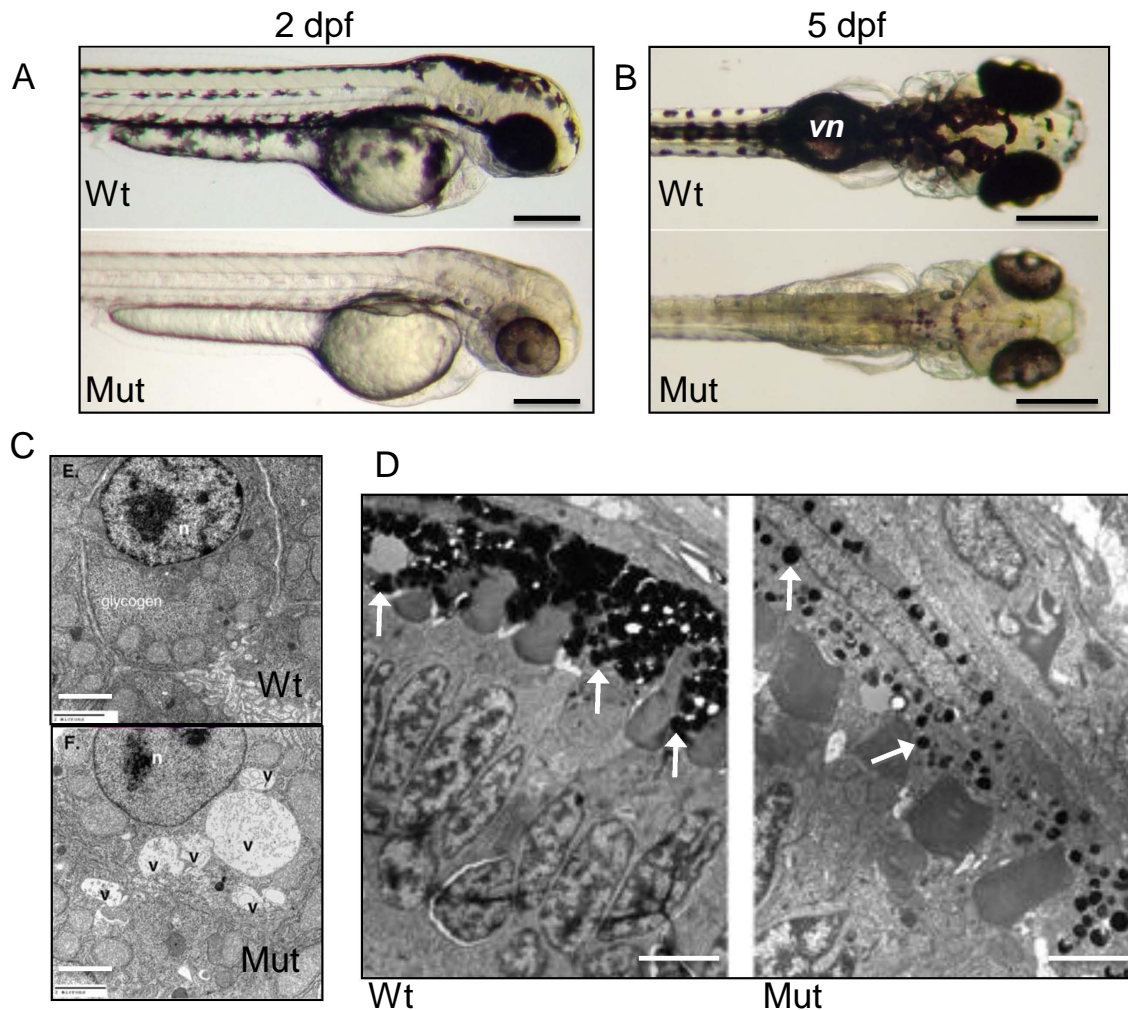


Figura 2. Características Fenotípicas de la mutante *vps18^{hi2499aTg}*. **A** Vista lateral de larvas 2 dpf silvestre y mutante. **B** Vista dorsal de larvas 5 dpf silvestre y mutante, esta última carece de vejiga natatoria lo que es muy común en este tipo de mutantes. En ambos estadios las larvas mutantes tienen hipopigmentación. La abreviación vn es vejiga natatoria. **C** Microscopía electrónica que muestra acumulación de vesículas y glucógeno en el hígado de mutante *vps18^{hi2499aTg}* a los 5 dpf (esta imagen se tomó de Sadler et al. 2005). **D** Microscopía electrónica de larvas de 3 dpf que muestra disminución de los melanosomas maduros en el epitelio pigmentado de la retina en larvas WT (a la izquierda) y de la mutante *vps18^{hi2499aTg}* (a la derecha), las flechas blancas señalan melanosomas maduros. Las barras representan 300 μm (**A**), 2.5 μm (**C**) ó 10 μm (**D**) de tamaño.

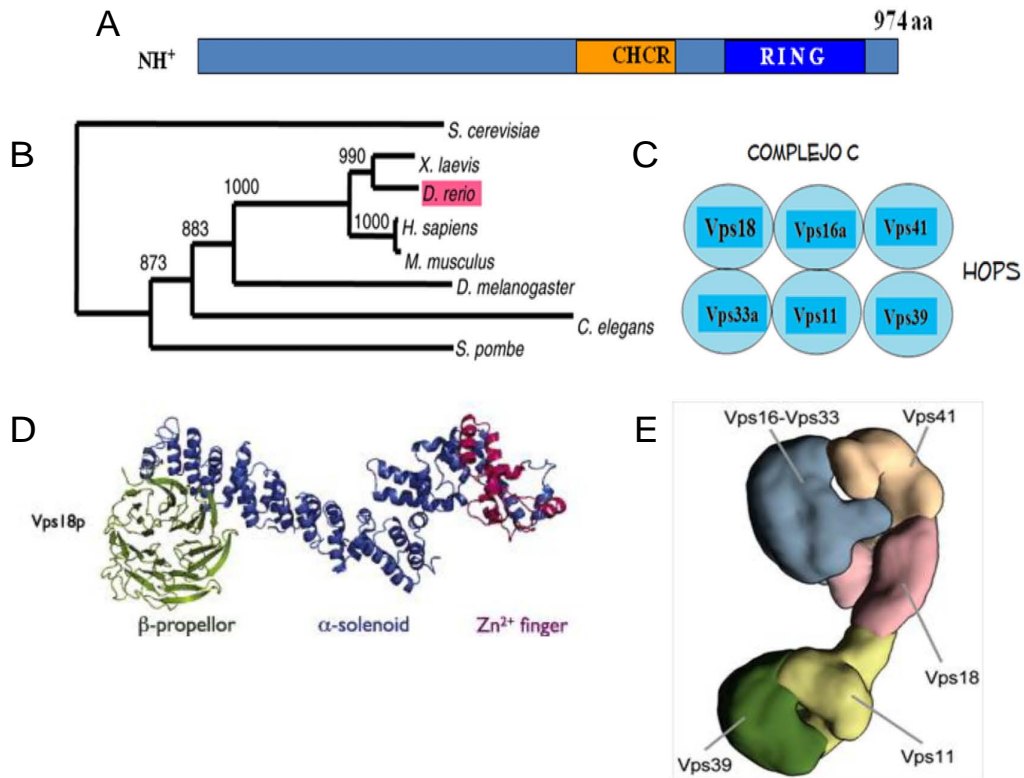


Figura 3. Características de la proteína de Vps18. **A** Representación de los dominios conservados en la proteína Vps18, CHCR representa una repetición del dominio de clatrina y RING del dominio RING-finger. **B** Filogenia de Vps18 utilizando como grupo externo a PEP3 (Vps18 de levadura), método de “Neighbor Joining” con “Bootstrap” de 1000 repeticiones. **C.** Representación de las subunidades que forman el complejo oligomérico HOPS. **D.** Predicción de la estructura tridimensional de Vps18 utilizando el programa ROSSETA, tomado de (Nickerson et al., 2009). **E** Arreglo topológico de las subunidades del complejo HOPS, deducido del análisis de complejos purificados y analizados por microscopía electrónica (Brocker et al., 2012).

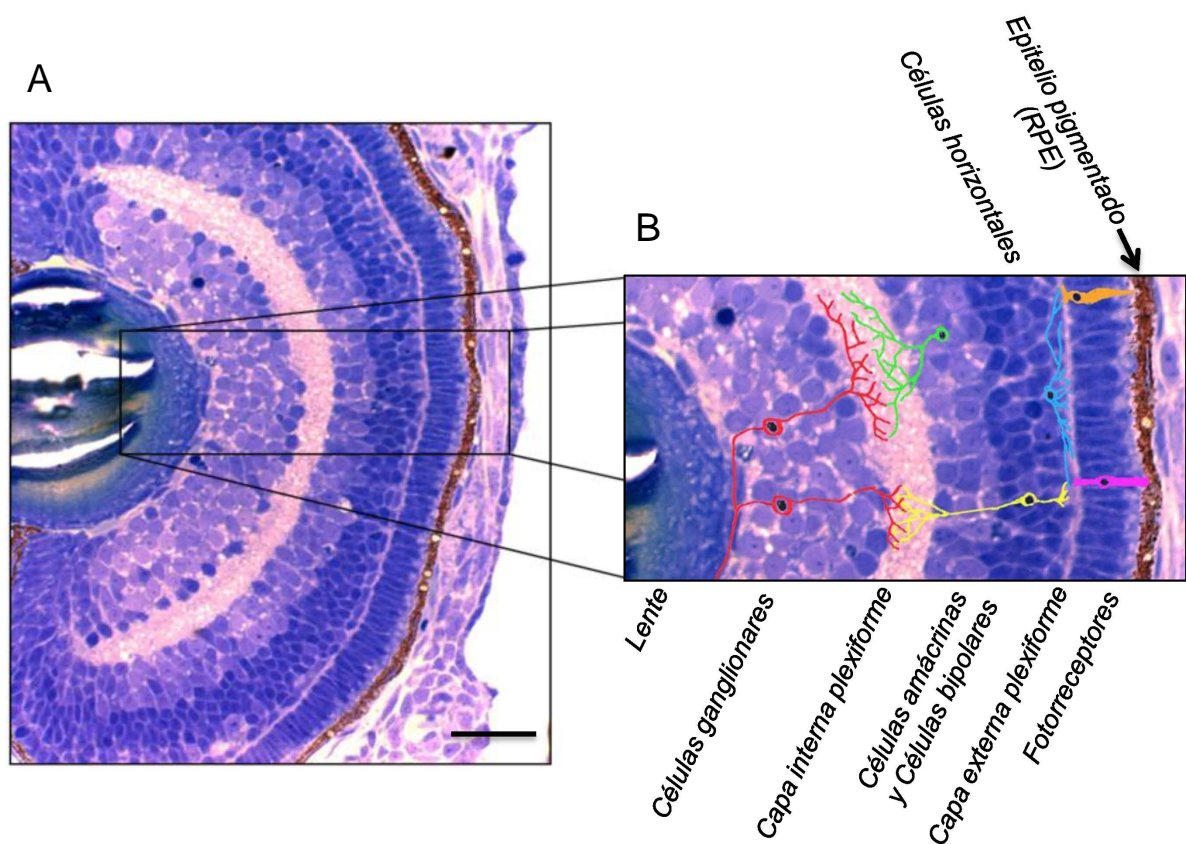


Figura 4. Capas de la retina en una larva de pez cebra WT de 5 días de desarrollo. **A** Corte histológico de 2 micras de espesor, teñido con azul de metileno y azure II. La barra representa 10 micras. **B** Zona ampliada en donde se observan las diferentes regiones de la retina. Sobre la imagen se esquematizaron los diferentes tipos de neuronas de la retina: Células ganglionares (rojo), Células Amácrinas (verde), Células Bipolares (en amarillo), Células horizontales (azul) y Fotorreceptores (magenta). La zona en donde se forman las espinas dendríticas de las Células ganglionares es la capa interna plexiforme y esto ocurre cuando estas células establecen contactos con las Células amácrinas y bipolares.

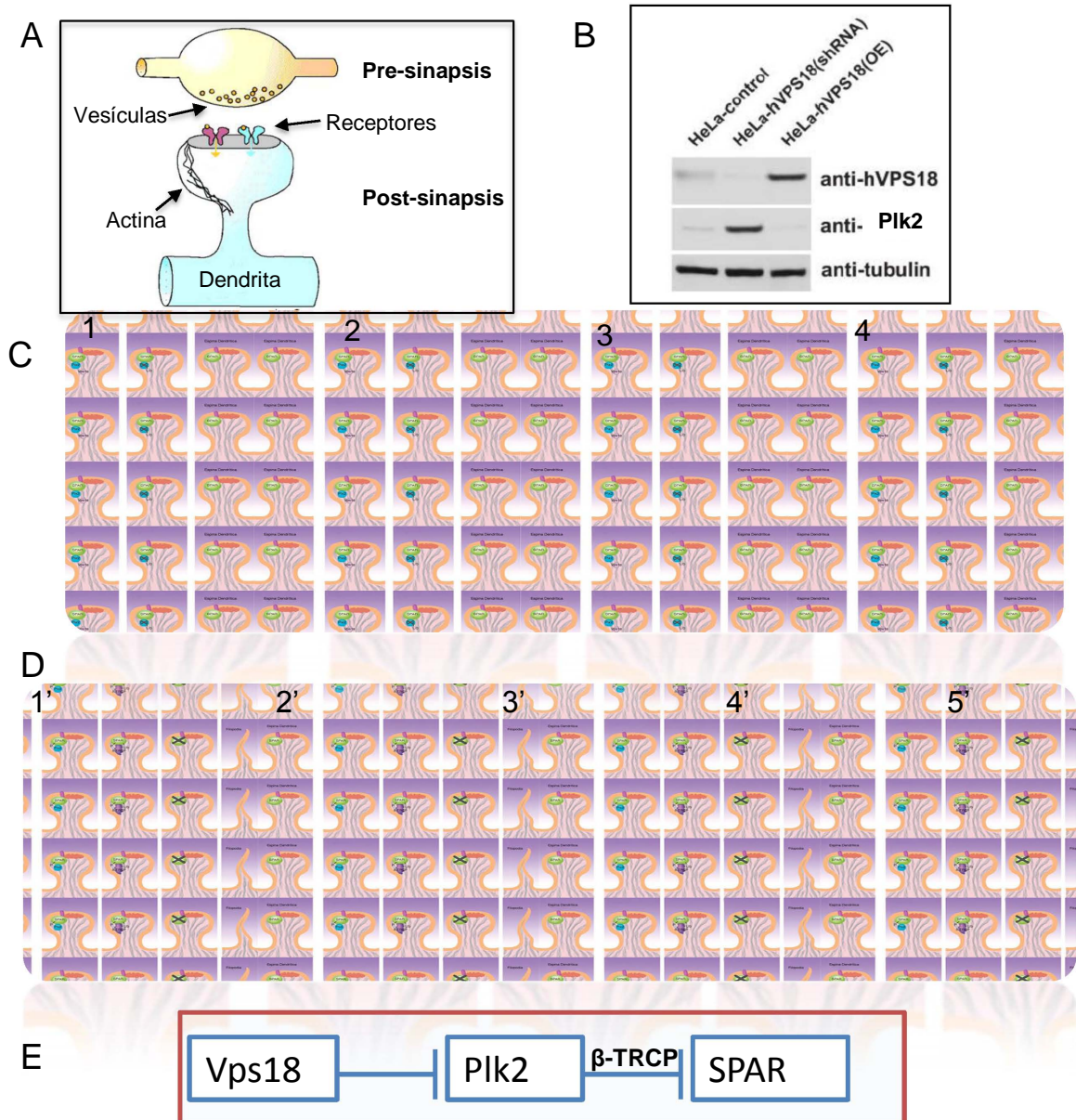


Figura 5. Modelo propuesto sobre la participación de Vps18 en la formación de Espinas Dendríticas. **A** Las espinas dendríticas conforman la post-sinapsis de las neuronas glutamatérgicas. **B** En condiciones “*in vitro*”, Vps18 induce la degradación de PIK2 (tomado de Yogosawa et al. 2005). **C** Condiciones normales y **D** Condición propuesta cuando falta de Vps18. En los pasos 1 y 1': SPAR es indispensable para que se forme la densidad postsináptica y una espina funcional. Pasos 2, 2', 3 y 3': En condiciones normales Vps18 ubiquitina a PIK2 y este se degrada en el proteosoma. En ausencia de Vps18 (mutante *vps18^{hi2499aTg}*) PIK2 no se degrada. Cuando PIK2 está presente fosforila a SPAR y esta fosforilación permite que la ubiquitina ligasa β-TRCP reconozca a SPAR, lo ubiquitine y lo lleve a degradación. Pasos 4, 4' y 5': La espina dendrítica madura permanece mientras SPAR está presente, sin embargo cuando SPAR se degrada la espina se pierde y en su lugar queda un filipodio. **E** Modelo de regulación negativa propuesto en este trabajo.

6. Materiales y Métodos

6.1 Mantenimiento de la colonia de peces y obtención de embriones

Nuestro grupo de investigación cuenta con dos sistemas de recirculación continua modelo AHSAM de la compañía Aquatic Habitats, cada uno con capacidad para albergar 800 peces adultos. Albergamos diferentes cepas de pez cebra que se mantienen a una temperatura constante de 28°C y a un pH de 7.0 (figura 6A). Los embriones son obtenidos mediante cruza naturales (figura 6B) y mantenidos a 28.5° en cajas petri con agua de acuario en una densidad no mayor de 60 embriones por caja (figura 6C). La alimentación de los peces así como su mantenimiento en general se basó en protocolos reportados (47).

6.2 Cepas utilizadas

Para el presente proyecto fueron utilizadas la cepa $vps18^{hi2499aTg}$, la cual se encuentra en el fondo genético TAB-WIK, que a su vez fue creada en nuestro laboratorio con la cruce de las cepas TAB-14 y WIK ambas obtenidas del cepario ZIRC (“zebrafish international resource center” www.zebrafish.org) de los Estados Unidos. Para colocar a esta cepa mutante ($vps18^{hi2499aTg}$) bajo el fondo genético $Tg-is11:GFP$ y obtener la cepa $Tg(is11:GFP);vps18^{hi2499aTg}$ se cruzaron 8 machos de la cepa $Tg-is11:GFP$ con 8 hembras de la cepa $vps18^{hi2499aTg}$, los embriones resultantes fueron criados hasta adultos y genotipificados para buscar peces portadores de la mutación de $vps18$ en heterocigosis, todo estos peces son homócigos para el transgén $is11:GFP$ que se expresa en motoneuronas.

6.3 Genotipificaciones

Una inserción retroviral es la causante de la mutación en $vps18$ en los peces de la cepa $vps18^{hi2499aTg}$, esta misma inserción puede ser utilizada para identificar por PCR a los peces portadores (aquellos que acarrean una sola copia de la inserción). Para la identificación de los peces portadores se realizó la genotipificación de peces de 3 meses de edad, realizando el PCR a partir de extractos de la aleta caudal de los peces. La remoción de la aleta cauda no le

afecta a los peces ya que la aleta se regenera. Los peces se anestesiaron en Tricaína 0.004% y la aleta caudal se cortó con un bisturí, la aleta de cada pez fue colocada en uno de los 48 pozos de una placa para PCR que contenía una solución de lisis (50mM KCl, 200mM NaCl, 0.01% gelatina, 0.45% NP-40, 0.45% Tween-20, 5mM EDTA, 0.2 mg/mL Proteinasa K y 10 mM Tris-HCL, pH 8.0), la placa se incubó durante 4 horas a 55°C y después por 15 minutos a 94° con la finalidad de inactivar a la proteinasa K. Posteriormente la muestra fue diluida (1:20) y utilizada para la reacción de PCR.

En la mezcla de PCR (Tabla I) se utilizan simultáneamente tres oligonucleótidos: EM11, EM67 y Nu3 (Tabla II y figura 7), dos de los cuales se unen al gen (EM11 y EM67) a mas o menos 100bp de la inserción retroviral, mientras que Nu3 se une en el extremo 3' del retrovirus. Como consecuencia de la ubicación de estos oligonucleótidos se amplifica una banda de 266 pb del gen *vps18* cuando no hay una inserción retroviral o se amplifica una banda de 186 pb cuando existe una inserción retroviral, es decir que los peces en que solo se amplifica solo la banda de 266 bp son WT y aquellos en que se amplifican ambas bandas (266 y 186 bp) son portadores o heterócigos (figura 7). Cabe mencionar que durante todo el proceso (3 a 5 días) los peces genotificados se mantuvieron separados individualmente en vasos de precipitado de plástico (previamente numerados) con aproximadamente 200 ml de agua de acuario y una vez identificados si son portadores o no se regresaron a los sistemas de recirculación continua.

Tabla I. Componentes de la Mezcla de Reacción para Genotipificación

Compuesto	Concentración Final
Buffer 10X	1X
MgCl ₂	2mM
dNTPs	0.2mM

Nu3	1 μ M
EM11	1 μ M
EM67	1 μ M
Taq.	0.04 u/ μ L
Agua MiliQ	-----

Tabla II. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados en la genotipificación

Oligonucleótidos	Secuencia
EM11	5' ACGCCATTCCCATCATCCAGGCGAA 3'
EM67	5' TAGAGCAAGATCCACAGCTTCTTC 3'
Nu3	5' GCCAAACCTACAGGTGGGGTCTTTCA 3'

Una vez preparada la mezcla de reacción (Tabla I y II.) se adicionaron 2 μ L de dilución de lisado de aleta caudal y se colocaron en el termociclador bajo las siguientes condiciones: Paso-1 94°C por 1 min, paso-2 94°C por 30 seg, paso-3 60°C por 1 min, paso-4 72°C por 1 min, repetir desde el paso 2 por 35 ciclos, paso-5 72°C por 10 min y paso-6 21°C hasta tomar la muestra.

Una vez terminada la reacción de PCR se le agregaron 4 μ L de Buffer de carga (10 mg/mL de Orange-G (SIGMA 03756) en glicerol al 50%) y se analizaron por electroforesis corriendo las muestras en un gel de agarosa 2% preparado en amortiguador TBE (90 mM Tris-HCl, 90 mM Acido Bórico y 2 mM EDTA) y se corrieron a un voltaje constante de 100 miliVolts durante aproximadamente 1

hora. El resultado fue fotografiado posteriormente utilizando un transiluminador de luz UV.

6.4 Preparación de RNA total

Para la preparación de RNA total a partir de larvas de pez cebra se llevó a cabo el método de trizol-cloroformo. Este método se basa en la homogenización de una muestra biológica y obtención del RNA con trizol (INVITROGEN) cloroformo e isopropanol. Se colocaron de 50 a 100 larvas de 3 dpf en un tubo Eppendorff de 1.5 ml y se anestesiaron por frío, después se retiró, con una pipeta Pasteur, la mayor cantidad de agua posible y se agregaron inmediatamente 800 μ L de trizol. Empleando un pistilo de plástico desechable estéril y libre de RNAsas se homogenizó la muestra. Se agregaron 0.2 ml de cloroformo y se mezcló enérgicamente por 20 segundos empleando un vortex. Posteriormente se incubó a temperatura ambiente por tres minutos y para realizar la separación de proteínas, DNA y RNA se centrifugó a 4°C en la microfuga Minispin (EPPENDORF) a 13,400 rpm por 15 minutos. Una vez separadas las fases orgánica e inorgánica, se utilizó una pipeta para transferir (muy lentamente y con mucho cuidado) la fase acuosa (con el RNA) a un tubo nuevo. El protocolo continúa con una serie de precipitaciones del RNA, para ello se agregó 0.5 ml de alcohol isopropílico, se mezcló por inversión y se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó a 13,400 rpm por 10 minutos a 4°C, y se obtuvo un pellet, se retiró el sobrenadante cuidando el pellet y para lavarlo se agregó 1 mL de Etanol al 75% en dH₂O-DEPC (dietilpirocarbamato inhibe la acción de las RNAsas), posteriormente se centrifugó a 10,500 rpm a 4°C por 5 minutos, se retiró el sobrenadante y se repitió el proceso. Es necesario tratar a la muestra con DNAsa para eliminar cualquier residuo contaminante de DNA, para ello se disolvió el pellet en 26 μ L de dH₂O-DEPC, 1 μ L de Turbo-DNAsa y 3 μ L de buffer 10X del Kit de Turbo DNAsa (AMBION), esta mezcla se incubó por 30 minutos a 37°C en el Termomixer (EPPENDORF). Finalmente se agregó 3 μ L del reactivo de Inactivación del Kit de turbo DNAsa y se incubó en el Termomixer con un poco de agitación (1,000 rpm) a 22°C por 5 minutos. Se realizó una última centrifugación a

temperatura ambiente con la Minispin a 12,200 rpm y se recuperó el sobrenadante en un tubo de 0.5 ml nuevo y marcado.

Se cuantificó la concentración del RNA en la unidad de Biología Molecular del Instituto en el “*Nano-Drop*” y se almacenó a -80°C. La pureza del RNA se determinó por la relación de la absorbancia a 280 nm/260 nm, usualmente se obtuvieron valores cercanos 2 lo que indicó que las muestras empleadas tuvieron un alto grado de pureza.

6.5 Preparación de cDNA

El cDNA o DNA copia se genera a partir de RNA total, antes de iniciar este protocolo, el RNA a utilizar se incubó en el termomixer a 65° por 10 minutos y se colocó en hielo inmediatamente. Se preparó la siguiente mezcla; para un volumen final de 10 µL se agregó 1 µL de mezcla de dNTPs (10mM), 1µL de oligo dT (50µM), RNA (cantidad necesaria para tener 2µg), y H2O-DEPC (cbp 10 µL), esta mezcla se incubó a 65°C durante 5 minutos y se pasó inmediatamente a hielo por un minuto. Se preparó la mezcla de reacción (Tabla III) y como control se utilizó una muestra (control –RT) en la que se omite colocar a la enzima Super Script III, esto funciona para verificar que no haya quedado DNA genómico contaminante.

Tabla III. Mezcla de Reacción para obtener cDNA

Componente	+ RT	Control -RT
10 X Rt Buffer	2 µL	2 µL
25 mM MgCl ₂	4 µL	4 µL
0.1 M DTT	2 µL	2 µL
RNAsa out (40u/µL)	1µL	1µL
SuperScript III Rt (200 u/µL)	1µL	----
Mezcla con el RNA	10µL	10µL

H2O DEPC	----	1µL
----------	------	-----

Una vez colocados los componentes de la mezcla de reacción se incubó a 50°C por 50 minutos y posteriormente a 85°C por 5 minutos, pasados los cuales se añadió 1µL de RNAsa -H (para eliminar el RNA) y se incubó por 20 minutos a 37°C. Cada reacción se colocó en un tubo nuevo de 0.5 ml y se almacenó a -20°. Para comprobar la pureza de el cDNA se realizó una prueba con oligos que amplifican actina, los cuales deben de dar negativos en el control -RT y positivos en las muestras RT.

6.6 Clonaciones de *plk2*

Las clonaciones del gen *plk2* se realizaron empleando a la enzima Platinum® Pfx DNA Polymerase (SIGMA) para la amplificación por PCR ya que presenta una alta fidelidad y un buen rendimiento, por lo cual mantiene cantidad y calidad suficientes del DNA para la clonación. A diferencia de otras polimerasas como la PFU que presenta un bajo rendimiento o la polimerasa Taq que presenta alto rendimiento sin embargo presenta una alta proporción de errores.

El primer paso que se realizó para la clonación de ambas *Plk2* (*Plk2a* y *Plk2b*) fue el diseño de oligonucleótidos (Tabla IV), para lo cual se utilizó el

Tabla IV. Oligonucleótidos empleados en la clonación del *plk2a* y *b* de pez cebra.

Nombre del Oligonucleótido	Nombre del gen	Secuencia
PLK2-1	<i>plk2a</i>	5'ATGGACATACTCAGGACTATAGCAC3'
PLK2-2	<i>plk2a</i>	5'TATTTGTCTTGATTCATCTCTGG3'

PLK2B	<i>plk2b</i>	5' GACATCGTCAGCTCGTGCTGAGTC 3'
PLK2C	<i>plk2b</i>	5' GCACAGTAACACACAGCCATGGAGA 3'

programa MacVector bajo los siguientes criterios: 18 a 25 bases de longitud, Temperatura Media (TM) de 54° C o más y una diferencia de TMs no mayor a 5°C entre ambos oligonucleótidos, contenido de GC entre 40 y 60% y que no formen horquillas o se plieguen entre sí.

Para estas clonaciones se purificó RNA total, a partir de larvas de 3 días de desarrollo, empleando el método del trizol y turboDNAasa (Ambion). Se obtuvo cDNA, empleando transcriptasa reversa (Superscript III de Invitrogen) donde además se utilizó como control tubos con los mismos componentes excepto la enzima superscript III (-RT). Se realizó una curva de concentración de MgSO₄ para obtener un mejor producto, obteniendo que la mejor concentración es 1µM de MgSO₄ para los genes *plk2a* y para *plk2b*. Se utilizó la técnica de RT-PCR empleando los oligonucleótidos PLK2-1 y PLK2-2 para amplificar a *plk2a* y los oligonucleótidos PLK2B y PLK2C para amplificar a *plk2b*, ambos productos de PCR se purificaron por columnas de afinidad (QIAGEN) y se comprobó por medio de un gel de agarosa que el producto amplificado y purificado tuviera el producto de aproximadamente 2Kb, que en ambos casos esto es muy aproximado a la secuencia completa con el marco de lectura abierto. Los productos de PCR se clonaron en el vector pCR4-topo (INVITROGEN) obteniéndose múltiples clonas de bacterias. Se escogieron algunas clonas que se confirmaron por digestión con EcoR1 (que libera el fragmento clonado) y se mandaron a secuenciar a la Unidad de Biología Molecular. Las secuencias obtenidas demostraron que obtuvimos solamente clonas del gen *plk2b*.

6.7 Construcción de árboles filogenéticos

Para el presente proyecto se utilizaron herramientas bioinformáticas en la búsqueda de los genes involucrados en la vía propuesta *vps18*, *plk2* y *SPAR*, así como para la generación y el análisis de árboles filogenéticos.

Para la obtención de las secuencias de los genes *plk2* y *SPAR* en el genoma del pez cebra, se utilizaron las bases de datos de NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) y ENSEMBL (www.ensembl.org/Danio_rerio/Info/Index), las cuales contienen la información anotada de la secuenciación del genoma del pez cebra. Una vez obtenidas las secuencias de pez cebra se utilizó el algoritmo de BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), en su modalidad de tBLASTn para la búsqueda de las secuencias homólogas en otros organismos tales como humano (*H. Sapiens*), ratón (*M. Musculus*), mosca de la fruta (*D. melanogaster*), rana (*X. Laevis*), entre otros. Una vez obtenidas las secuencias para cada uno de los genes propuestos, se utilizó el programa Mac Vector para realizar alineamientos múltiples de secuencias de aminoácidos utilizando la herramienta ClustalW, empleando matrices tipo BLOSUM. Con el programa MacVector también se realizaron arboles filogenéticos utilizando el método “*Neighbor joining*” con 1000 repeticiones de “*bootstrapping*”. Por otra parte, se analizaron las secuencias proteicas con la herramienta ProtParam de ExpASY (<http://expasy.org/>) para determinar características tales como punto isoelectrico (pI) o peso molecular.

6.8 Inmunotinciones en ojos completos

La larva de pez cebra a los 5 días de desarrollo es poco permeable a los anticuerpos y requiere un protocolo con repetidas permeabilizaciones. Para la realización de las inmunotinciones se fijaron larvas completas de 5 dpf, tanto de la cepa silvestre como de la cepa *vps18^{hi2499aTg}*. Como fijador se empleó paraformaldehído 4% en buffer de fosfatos (PBS) pH 7.4 por 4 horas a temperatura ambiente, o bien toda la noche a 4°C. Se lavaron en PBS y se disectaron los ojos empleando agujas de tungsteno electro-afiladas, las muestras se lavaron en PBST

(0.1% de Tween® en PBS) para posteriormente permeabilizar incubando los ojos por 3 horas a temperatura ambiente en una mezcla de tripsina de porcino tipo II 0.025 mg/ ml y hialuronidasa 5 mg/ ml en PBST en agitación suave. Posteriormente se lavó con PBST y se colocó acetona fría a una temperatura de -20°C por 30 min, que ayuda a la permeabilización y se colocó agua desionizada fría en el tubo con las muestras que se retiró inmediatamente, y se lavó en PBST por 10 min a 4°C para posteriormente repetir 2 lavados pero a temperatura ambiente. Este tratamiento de permeabilización se repitió una vez más desde la incubación con tripsina-hialuronidasa en PBST. El paso final de permeabilización consistió en realizar una incubación a 4°C por toda la noche en Tripsina 0.025 mg/ ml y hialuronidasa 5 mg/ ml en PBSTX (El PBSTX es PBS con 1% de Tritón X-100 en vez de Tween). Al día siguiente se transfirió a Tritón X-100 al 1% en PBS y se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente y se cambió por una solución que tiene Tritón -100 al 0.5% y suero de cabra 10% en PBS, después de 15 minutos más de incubación se sustituyó por suero de cabra 10% preparado en PBST y se incubó por 4 horas a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C.

Este protocolo se continuó con un par de lavados en PBST, para después colocar el anticuerpo primario deseado a la concentración requerida (usualmente 1:500) en suero de cabra al 10% en PBST que se incubó durante la noche en agitación suave a 4°C, posteriormente se lavó 4 veces en PBST por media hora cada vez y se colocó el anticuerpo secundario en suero de cabra al 10% en PBST, a la concentración deseada, por 2 horas en agitación suave a temperatura ambiente finalmente se lavó 3 veces con PBST en lavados de 10 minutos de duración y se colocó DAPI (0.03 µM final) para contrastar los núcleos y se lavó 3 veces más con PBST y se montó para su visualización y fotografía.

6.9 Inmunodetecciones por “western blot”

Se obtuvo la proteína total de aproximadamente 200 larvas 3 dpf, silvestres y 200 larvas 3 dpf mutantes *vps18^{hi2499aTg}*. Se colocaron los embriones en una caja petri con amortiguador REP frío (Amortiguador Ringer libre de calcio NaCl 116 mM, KCl 2.9 mM, Hepes 5 mM con EDTA 1 mM y PMSF 0.3 mM como inhibidor

de proteasas, todo ajustado a pH 7.2) y se colocaron las larvas sobre hielo, una vez que las larvas ya estaban anestesiadas (aprox. 5 min) se procedió a retirar el vitelo, succionándolo con ayuda de una pipeta de transferencia. La gran cantidad de lipoproteínas que tiene el vitelo afecta el corrimiento electroforético de la muestra. Los embriones se pasaron a un tubo ependorff de 1.5 ml con REP frío, el cual se colocó en agitación suave por 5 minutos a temperatura ambiente, se cambió el REP y se volvió a repetir la agitación, el cambio de REP se repitió 2 veces más, finalmente se retiró la mayor parte del volumen de manera que los embriones quedaron en aproximadamente 0.2ml de REP, a lo cual se le agregó 25 μ L de SDS 10%. Se colocó el tubo en hielo por 10 minutos, se homogenizó con pistilo de cerámica y se hirvió la muestra en baño María por 5 minutos. Inmediatamente se colocó en hielo por 5 minutos más y se homogenizó nuevamente. Se colocaron los embriones en una microfuga a máxima velocidad (14,000 rpm) durante 5 minutos y se recuperó solo el sobrenadante, del cual se tomaron 30 μ L para medir la concentración final de proteína y al resto se le colocó 100 μ L de Buffer de lisis (SDS 5%, Glicerol 20%, Azul de bromofenol 0.5% y Tris-HCl 100 mM pH 6.7). La concentración de la proteína se determinó por el método del ácido bicinconínico (48).

Una vez determinadas las concentraciones de las muestras, se cargaron 40 μ g de proteína por carril en un gel de acrilamida 15% a un voltaje fijo de 100 miliVolts, posteriormente se realizó la transferencia a membrana Immobilon (BIORAD) a un amperaje fijo de 500 mA en agitación constante durante una hora a 4°C. Para la electroforesis desnaturalizante se utilizó el protocolo de Laemli con acrilamida:bis-acrilamida 30:1 y SDS 10% (49). Después de la transferencia se bloqueó la membrana con leche descremada preparada al 5% en PBS durante una hora y se colocó el anticuerpo primario en una dilución 1:500 (como control de carga se utilizó un anticuerpo primario contra la proteína alfa-tubulina) que se dejó durante la noche en agitación suave a 4°C. Al siguiente día se realizaron lavados a la membrana y se colocó el anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa de rábano en una dilución 1:1000 durante 1 hora. Se realizaron más lavados y se colocó el compuesto Luminol durante 5 minutos y se reveló en cuarto oscuro.

Antes de incubar con el anticuerpo se verificó la presencia de las proteínas, en la membrana, empleando rojo de Ponceau. Para remover el anticuerpo (desnudar) de la membrana se incubó por 1 hora, a 50°C, en una solución de glicina 0.1M y SDS 5%, y se repitió el proceso de anticuerpo primario (Psd95), secundario (ratón) y revelado.

6.10 Microscopia electrónica

Para las observaciones se utilizaron larvas con fenotipo silvestre y larvas con fenotipo mutante *vps18^{hi2499aTg}* de 5 dpf, las cuales se llevaron a la unidad de microscopía del Instituto de Fisiología Celular en donde se les dio el siguiente tratamiento:

- 1) Fijación con glutaraldehído 2.5%
- 2) Lavado con medio de fosfatos (PBS) 3 a 4 veces
- 3) Post-fijación con tetróxido de osmio (OSO₄)
- 4) Lavado con medio de fosfatos (PBS) 3 a 4 veces
- 5) Deshidratación con soluciones de etanol a diferentes graduaciones (30 – 100%) a temperatura de 4°C.
- 6) Deshidratación con etanol al 100% y oxido de propileno
- 7) Como medio de infiltración se uso una mezcla 1 a 1 de oxido de propileno y resina epóxica.

Después de este tratamiento se llevó a cabo la inclusión en resina epóxica fresca, acomodándolas en posiciones: vertical, horizontal e inclinada. Una vez que las larvas se encuentran incluidas en la resina se colocaron en una estufa de polimerización a 60° por un lapso de 48 horas y se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo. En la unidad de microscopía se realizaron los cortes en un ultramicrotomo y una vez listos se procedió a realizar las observaciones con el microscopio electrónico de transmisión JEOL 1200 EXII.

6.11 Marcajes retinotectales

Con el objetivo de realizar una comparación a nivel morfológico de la proyección retinotectal y del quiasma óptico, entre las larvas con fenotipo mutante y con fenotipo silvestre, se empleó la técnica de marcaje retinotectal. A los embriones en el estadio de 1 dpf se les removió el corion y se les mantuvo por varios días en agua de acuario conteniendo 150 μM de 1-fenil-2-tiourea (PTU) que es un compuesto que inhibe la pigmentación y permite realizar observaciones más claras. Las larvas desarrolladas en presencia de PTU (WTs y mutantes) se fijaron a los 5 dpf en PFA 4% pH 7.2 y se montaron en agarosa de bajo punto de fusión al 1.5% en PBS 1X sobre un cubre objetos y en una orientación que permitiera fácil acceso a los ojos (50). A estas larvas se les microinyectó el compuesto Dil (INVITROGEN Molecular Probes) diluido en cloroformo (se colocó en parafilm lo mínimo que una espátula chica puede tomar y se le colocan 15 a 20 μL de cloroformo de la botella con lo que se va cargando el capilar, como se evapora muy rápido se sigue agregando cloroformo). Para la microinyección se utilizó un sistema de pulsos de aire (TRITECH) y empleando microagujas preparadas a partir de jalar capilares de vidrio (1.0 mm O.D. x 0.58 mm I.D.) por medio de un instrumento llamado “*puller*” (SUTTER). La presión de aire para microinyectar consistió de 25 psi y se colocó la microaguja en dos diferentes zonas del ojo para lograr un marcaje completo del tectum. Se microinyectó Dil que es un compuesto lipofílico que se inserta en la fracción lipídica de la membrana plasmática de las células donde se difunde de manera libre (Figura 10D, E y F). Los embriones fijados y marcados se dejaron en la incubadora a 28.5° por la noche en una cámara húmeda, para permitir una completa difusión al tectum. Al día siguiente se observaron y fotografiaron las larvas tratadas utilizando un microscopio Zeiss.

6.12 Ensayo Opto-Motor (OMR)

Este ensayo consiste en la habilidad de las larvas de 5 días o más de nadar en el mismo sentido de franjas oscuras que se desplazan de un lado a otro en la base o piso. Para ello se colocó una caja de petri que albergaba a las larvas de pez cebra sobre un monitor de computador que estaba posicionado en forma

horizontal con la pantalla hacia arriba. Para la realización del ensayo optomotor se utilizaron 50 larvas silvestres de la cepa TAB-WIK y 50 larvas con fenotipo mutante *vps18^{hi2499aTg}* de 5 dpf y 7 dpf. Las larvas se obtuvieron de cruizas naturales y se mantuvieron en la incubadora a 28.5° hasta el momento de su utilización. Algunas de las larvas silvestres se trataron con el compuesto PTU (ver sección anterior) y se mantuvieron en la incubadora a 28.5° C al igual que el resto de las larvas, hasta el momento de su utilización. Se generó en el programa Power Point una plantilla con franjas blancas y negras con un grosor de 1.33cm y 1.39cm respectivamente y se animó su movimiento a una velocidad aproximada de 1 franja/segundo con direccionalidad de derecha a izquierda con respecto al monitor. Empleamos un monitor plano de 17 pulgadas (DELL) y una cámara SONY (DSC-H20) adaptada a un soporte tripie para filmar la respuesta de las larvas. Esta cámara se colocó 16 cm sobre la pantalla. Posteriormente se colocó una caja petri con las larvas silvestres sin PTU sobre la pantalla, se inició la plantilla con 10 segundos en blanco, para que las larvas se acostumbraran al nivel de luz y se realizó el ensayo que consiste en iniciar la animación de las franjas en movimiento mientras se toma video de las respuestas de las larvas. Se repitió el mismo ensayo con las larvas silvestres con PTU y con las larvas con fenotipo mutante. Los videos con la respuesta de los peces se analizaron posteriormente.

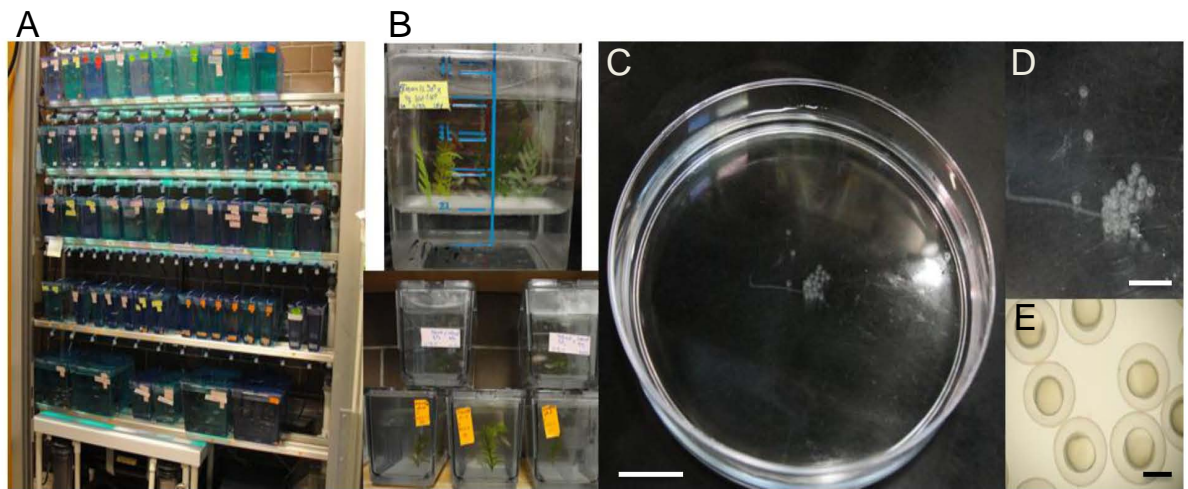


Figura 6. Mantenimiento y crianza de peces cebras **A.** Acuario de nuestro grupo de investigación **B.** Cruzas masivas (arriba) e individuales (abajo) utilizadas para obtención de embriones **C.** Caja petri con embriones una vez colectados **D.** Acercamiento de los embriones colectados **E.** embriones vistos al microscopio estereoscópico. Las barras representan 1.5 cm (**C**), 50 mm (**D**) y 800 μ m (**E**).

7. Resultados

7.1. Descripción del fenotipo de la mutante *Vps18*^{hi2499aTg}

7.1.1 Genotipificación de la cepa *vps18*^{hi2499aTg}

La cepa mutante *Vps18*^{hi2499aTg} se ha mantenido por varias generaciones en el laboratorio. Con la finalidad de identificar a los peces portadores, se realizaron a lo largo de la maestría, cuatro genotipificaciones. Éstas se realizaron cuando los peces tenían aproximadamente 3 meses de edad que es cuando tienen el tamaño adecuado para el procedimiento. Los portadores heterocigos se identifican por medio de PCR a partir de DNA obtenido de una biopsia de la aleta caudal de los peces (figura 7A). Esto no les afecta ya que en aproximadamente 3 semanas la aleta se regenera y crece a su tamaño original. Para genotipificar empleamos una reacción de PCR esta se lleva a cabo con 3 oligonucleótidos (EM11, EM67 y Nu3), (figura 7B) que amplifican al gen de *vps18*. En el caso de los peces WT, ambos alelos (cromosomas) son reconocidos por los oligonucleótidos EM11 y EM67 y amplifican un producto de PCR de 266 bp; sin embargo en el caso de los peces portadores u heterocigos, uno de los alelos produce la banda WT (266 bp) mientras que el otro alelo (con la inserción retroviral) es reconocido por los oligonucleótidos Nu3 y EM67 y produce una banda de 186 bp; en consecuencia en los peces portadores se amplifican dos bandas (266 y 186 bp). Dado que la inserción retroviral es de 6 kb es improbable que el producto entre EM11 y EM67 del alelo mutante sea amplificado (figura 7C y D). Para mantener la línea de peces, en ocasiones se hizo una cruce de progenitores WT versus Heterocigo que debe producir 50% de progenie portadora (como en el caso 1 de la Tabla V), en otras ocasiones se hizo una cruce en que ambos progenitores son Heterocigos en cuyo caso se debe obtener un 75% de progenie portadora (como en los casos 2 y 3 de la Tabla V). Cabe mencionar que los porcentajes obtenidos son cercanos a lo esperado. La razón de realizar estos distintos tipos de cruces tiene que ver con tener un control sobre la variedad genética de la cepa pero evitando posibles efectos de la endogamia.

Tabla V. Resultados de las genotipificaciones

Genotipificación	No. de WT	No. de Portadores	% de WT (esperado)	% de Portadores (esperado)	No. Total
1	47	33	58 (50)	42 (50)	80
2	19	43	30 (25)	70 (75)	62
3	10	17	37 (25)	63 (75)	27

7.1.2 Defectos característicos de embriones y larvas homocigas *vps18*^{hi2499aTg}

Para la obtención de embriones mutantes se realizaron cruza naturales entre peces heterocigos, de las cuales el 25% de los embriones obtenidos eran homocigos. Para la identificación de los embriones homocigos para la mutación en *vps18* se tomaron en cuenta diversas características fenotípicas generales, las cuales ya se habían descrito con anterioridad por nuestro grupo (21, 51). La primera de estas características la hipopigmentación. Las células con pigmentación (melanóforos o melanocitos) se originan de la cresta neural y los precursores de los melanocitos se llaman melanoblastos, los cuales comienzan a expresar el pigmento melanina alrededor de las 18 hpf, frecuentemente antes de completar incluso la migración (52). El patrón básico de pigmentación se establece a las 48 hpf y posteriormente solo ocurren adiciones o pérdidas mínimas de melanocitos.

La mutante de *vps18* muestra una reducción en la pigmentación o hipopigmentación tanto en melanocitos de la piel como en el epitelio pigmentado de la retina (RPE). Se ha descrito que esto se debe a una disminución en el número de melanosomas, que tienen la apariencia de melanosomas inmaduros (21). Esta característica es observable desde las 24 hpf, sin embargo a tan temprana edad puede llegar a confundirse alguna larva con fenotipo silvestre que presente un retraso en el desarrollo. En días posteriores esta diferencia en la

pigmentación se vuelve mucho más marcada (figura 2A). Otra de las características que presentan las larvas de la mutante *vps18^{hi2499aTg}* es la falta de vejiga natatoria (figura 2B). Esta estructura es un saco lleno de gas localizado en la cavidad dorso anterior del cuerpo. La vejiga natatoria surge de una extensión del endodermo intestinal y funciona como un órgano hidrostático el cual permite el control de flotación de la larva. La falta de esta vejiga natatoria conlleva no solo a la pérdida de capacidad de flotación de las larvas mutantes, sino también afecta la estabilidad horizontal óptima aumentando la energía locomotora requerida para contrarrestar los cambios en el cabeceo y balance general de la larva.

Finalmente, otra de las características fenotípicas visible de la mutante *vps18^{hi2499aTg}* es un cambio en la coloración del hígado (Imagen no mostrada). Existe una publicación que describe el fenotipo del hígado para esta misma mutante (22), donde mostraron que en *vps18^{hi2499aTg}* el hígado se encuentra aumentado de tamaño (hepatomegalia). Así mismo el grupo de Saddler mostró que en la mutante *vps18^{hi2499aTg}* se encuentra un número mayor de vesículas (22) (figura 2C). Esto podría ser la causante del cambio de coloración del hígado que en un principio muestra una coloración amarillo intenso que posteriormente cambia a un color café oscuro (posiblemente debido a la necrosis de este tejido). Todas estas características fueron tomadas en consideración para seleccionar a los embriones o larvas homocigas que se emplearon en los experimentos.

Una más de las características de la mutante (mencionadas en la introducción) es que durante un ensayo de desempeño visual que mide el movimiento de los ojos que siguen el desplazamiento de un objeto (ensayo optocinético), se encontró que la mutante en *vps18* solo responde en un 20% de la capacidad normal (21). Esta característica si bien no es utilizada para el proceso de selección de las larvas, consideramos que es de importancia mencionarla pues es una de las bases de la cual parte el presente proyecto.

7.1.3 Morfología de motoneuronas en la cepa Tg(is11:GFP); *vps18^{hi2499aTg}*

Con la finalidad de explicar la disminución en la respuesta al ensayo optocinético que presenta la mutante de pez cebra en *vps18*, planteamos como

una posibilidad que el sistema neuro-motor presente defectos y, aunque el pez perciba las imágenes, no es capaz de responder a ellas con movimiento ocular. Para determinar si la mutante *vps18*^{hi2499aTg} tiene un número normal de motoneuronas y además si estas tienen una morfología normal, se cruzó a la cepa *vps18*^{hi2499aTg} con la cepa *Tg(isl1:GFP)*, la cual expresa GFP bajo el promotor del gen *Isllet-1* (*isl-1*) el cual es un miembro de la familia de proteínas de homeodominio LIM y es un marcador temprano del desarrollo de motoneuronas (53). Los peces descendientes de esta cruce fueron criados hasta los 8 meses de edad, pues aunque el pez cebra es capaz de reproducirse desde los 3 meses de edad, alcanzan su mayor reproducción entre los 6 y los 9 meses. Posteriormente fueron genotipificados (ver sección de Materiales y Métodos) para identificar portadores de la mutación en *vps18*. El transgén *Isllet-1* (*isl-1*) está homocigado, por lo que el 100% de los descendientes de la cruce expresan GFP en sus motoneuronas.

El contar con la cepa *Tg(isl1:GFP);vps18*^{hi2499aTg} nos permitió determinar la formación de las motoneuronas del pez cebra en el fondo genético de la mutación de *vps18*. Este análisis se llevó a cabo “*in vivo*” a los 3, 5 y 7 días de desarrollo, anestesiando a las larvas, montándolas para observaciones en el microscopio comparando la morfología de las motoneuronas de las larvas silvestres y mutantes (figura 8). Las larvas estudiadas fueron mantenidas en pozos individuales (de placas multipozos) y fotografiamos la zona que comprende entre la somita 5 a la 8. Después de múltiples observaciones concluimos que las larvas mutantes presentan un desarrollo de motoneuronas muy similar al silvestre, tanto en tiempo como en estructuras (figura 8). Se ha reportado que el pez cebra cuenta con 6 músculos extraoculares responsables de los movimientos del ojo, 4 músculos rectos y 2 músculos oblicuos (54) intentamos ubicar a las neuronas que los inervan sin éxito. Sin embargo, si logramos observar y fotografiar neuronas en la región de la mandíbula y la región craneal, sin encontrar cambios en el patrón de inervación (figura 9). Aunque morfológicamente pareciera no haber cambios en las motoneuronas, podría haber cambios no detectados a gran escala. Sin embargo para ver si había cambios en la respuesta de las larvas se filmaron videos en

donde se observa que las larvas silvestres presentan movimientos oculares en forma espontánea y que estos movimientos son similares en las larvas mutantes. En conclusión, el grupo de neuronas que marca *islet-1* parece no verse afectado durante su desarrollo en la mutante *vps18^{hi2499aTg}*. Al mismo tiempo se ha reportado la expresión de *islet-1* en la capa ganglionar de la retina, por lo que se realizaron observaciones en larvas 5 dpf en el microscopio confocal de la unidad de Microscopía del Instituto de Fisiología Celular. Sin embargo no se encontró marcaje ni en larvas silvestres ni en mutantes (figura 9E y F) que nos permitiera realizar un análisis de esta región del ojo que es de nuestro interés. La razón de esto la desconocemos sin embargo parece haber una pérdida de expresión de GFP en algunas larvas, podría ser que la falta de marcaje sea debida a una pérdida de expresión parcial en la cepa.

7.2. Defectos en el sistema visual de la mutante *vps18^{hi2499aTg}*

Dada nuestras observaciones previas (21) de que las larvas *vps18^{hi2499aTg}* tienen defectos en su desempeño visual, decidimos analizar el estado general del sistema visual, con énfasis en: i) la conexión retina-tectum (Quiasma óptico), ii) el estado del Epitelio pigmentado de la retina y iii) la presencia de células apoptóticas en la mutante. Al mismo tiempo establecimos el ensayo optomotor que nos permite continuar el estudio funcional del sistema visual en la cepa mutante *vps18^{hi2499aTg}*.

7.2.1 Morfología del quiasma óptico

La retina se conecta al cerebro por medio de la proyección retinotectal (también conocida como nervio óptico), esta se forma de filamentos de axones que provienen de las células ganglionares de la retina. Usualmente la proyección retinotectal de un ojo se conecta con el tectum contralateral, es decir la retina del ojo izquierdo se conecta con el tectum del lado derecho, ambos nervios se cruzan en el quiasma óptico.

El marcaje retinotectal se utiliza para estudiar la formación topográfica entre el ojo y el tectum a través del nervio óptico. Este marcaje permite mapear el área

del cerebro que está encargada de procesar la información visual de las larvas de pez cebra (figura 10). Esta técnica ha sido utilizada para el estudio y clasificación de diversas mutantes de pez cebra (55), también para describir el desarrollo de la vía retinotectal y para examinar diversos mecanismos responsables de la conectividad neural. Los primeros axones ópticos migran de la retina a las 32 hpf y se proyectan hacia la línea media de la larva, en donde cruzan formando el quiasma óptico entre las 34 y las 36 hpf; luego continúa su proyección hasta inervar el tectum óptico a las 48 hpf. El tectum óptico es la estructura primordial del cerebro para el procesamiento visual en el pez cebra. Es un sistema muy similar al de otras especies de peces, se encuentra organizada de manera retinotópica y existe un completo entrecruzamiento de las fibras desde ojo al tectum contralateral (quiasma óptico) (figura 10A y C). Fibras retinales dorsales y ventrales proyectan al tectum ventral y dorsal, respetivamente mientras que las fibras retinales nasal y temporal se proyectan al tectum posterior y anterior, respectivamente (56) (figura 10A y B). Defectos en la proyección retinotectal se pueden ver reflejados en ensayos funcionales de visión como el ensayo optocinético (57). Un ejemplo de esto es la mutante belladona (*bel*) que presenta un error en la ruta de los axones de las células ganglionares hacia el tectum óptico, mostrando una proyección ipsilateral en lugar de contralateral, lo cual conlleva a una respuesta reversa en el ensayo optocinético. Existen otras mutantes que presentan una disminución en las respuesta al ensayos optocinético como consecuencia de defectos en la proyección de sus axones, tal como *dark half (darl)*, *bogus journey (boj)*, *walkabout (walk)* y *missing link (miss)* (58).

Se sabe que en ocasiones en personas con albinismo parte de la retina temporal proyecta de manera anormal al hemisferio contralateral (59). Con la finalidad de determinar si los problemas que presenta la mutante *vps18^{hi2499aTg}* en el ensayo optocinético (21) se deben a alteraciones en la conexión retinotectal similares a las descritas para las mutantes anteriormente mencionadas o bien a una proyección anormal como la que se presenta en ocasiones en el albinismo, se realizó el ensayo de marcaje retinotectal en larvas silvestres y mutantes de 5 dpf.

En este estadio de desarrollo el tectum se encuentra completamente inervado y el quiasma óptico se encuentra ya formado.

Se realizó la inyección del compuesto lipofílico Dil a 10 larvas silvestres y 10 larvas mutantes, ambas de 5dpf. Las silvestres fueron tratadas además, con PTU para inhibir la pigmentación y permitir tanto la inyección del marcador como la visualización de éste. En ambos casos, tanto larvas silvestres como mutantes fueron analizados en diferentes planos permitiendo observar con mayor detalle la conexión, se tomaron diversas fotografías en plano Z aproximadamente cada $.5 \mu\text{M}$, las cuales posteriormente eran analizadas. En todos los casos que se presentaba la marca en las mutantes, se encontró que presentaban una correcta proyección contralateral similar a la que se encuentra en las larvas silvestres (figura 11), por lo que hay una correcta formación del quiasma óptico (Figura 11 D y J).

7.2.2 Estado del epitelio Pigmentado de la retina y de los fotorreceptores en la mutante $vps18^{hi2499aTg}$

El epitelio Pigmentado de la Retina (RPE) es un epitelio plano que rodea la retina y que es necesario para la función visual, el desarrollo y mantenimiento de los fotorreceptores. La coloración del RPE es debida a su contenido de melanina, la cual se encuentra en organelos llamado melanosomas. En peces a diferencia de mamíferos, los melanosomas no se presentan en una posición constante dentro de las células del RPE, si no que realizan movimientos en respuesta a cambios de luz y su asociación con filamentos de actina es importante para estos movimientos. Esta diferencia de migración entre peces y mamíferos es posiblemente un resultado de adaptaciones oculares como la acción de dilatación que afecta el cambio en el tamaño de la pupila, lo que da una protección de la luz al segmento externo de los bastones. Se ha visto en mamíferos que los melanosomas se forman por un proceso denominado melanogénesis que consiste de varias etapas: Primero se forma un pre-melanosoma que es una estructura no pigmentada, ovoide, con una membrana limitante poco definida, en esta etapa es transportada la tirosinasa, ya sea al pre-melanosoma o al melanosoma en etapa I,

y comienza la síntesis de melanina. Esta melanogénesis continua a través de las etapas II y III, hasta que se encuentra completamente lleno de melanina en la IV y el melanosoma se encuentra formado (60). Por medio de la técnica de microscopía electrónica se realizaron observaciones de distintas áreas del ojo de peces cebra a los 3 y 5 dpf tanto WT como mutantes, encontrando defectos en el epitelio pigmentado de la retina mutante. Se encontró un aumento en el longitud del RPE en la mutante con respecto al WT, tomando mediciones desde distintos puntos desde la porción final de los discos membranosos de los fotorreceptores hasta la membrana del RPE se encontró que la longitud promedio del epitelio en la mutante es 3 veces mayor con respecto a las larvas silvestres (figura 12 A, B y G). Por otra parte realizando una amplificación al RPE se encontraron melanosomas en diferentes etapas de melanogénesis en la mutante a los 3dpf (figura 12C y D) lo cual es inusual ya que, en las larvas WT, la mayoría de los melanosomas alcanzan la etapa IV al segundo día de desarrollo (48 hpf). La presencia de melanosomas inmaduros apunta a que en la mutante *vps18^{hi2499aTg}* la biogénesis de los melanosomas está alterada. Se realizó el conteo del número de melanosomas que se encontraban en etapa IV en las mutantes para compararlos con el número presente en esta misma etapa en los silvestres y se encontró que en promedio el número de melanosomas maduros en el epitelio pigmentado de la retina mutante es 10 veces menor que el número presente en larvas silvestres. Finalmente otro de los cambios que se encontró en la mutante fue en referencia al diámetro de los melanosomas, se realizó la medición del diámetro de los melanosomas silvestres y mutantes y se encontró que en promedio el diámetro de los melanosomas presentes en las larvas silvestres es de 0.488 micrómetros (se ha reportado que en promedio en mamíferos es de 0.500 micrómetros (61), mientras que en promedio el diámetro de los melanosomas presentes en larvas mutantes es de 0.347 micrómetros, es decir, los melanosomas en larvas silvestres son en promedio 1.4 veces más grandes que en larvas mutantes (Figura 12C, D y F).

La sobrevivencia de los fotorreceptores depende de un RPE saludable, ya que éste se encuentra involucrado en muchas funciones importantes incluyendo la

toma y recambio de los segmentos externos de los fotorreceptores, así como la biosíntesis del retinol (62). Sin embargo aún se desconoce como el nivel de pigmentación del RPE afecta estas funciones. Se ha visto que en aves, ranas y peces cebra albinos los fotorreceptores se forman de manera normal y así mismo mantienen un número normal (63, 64). Sin embargo en algunas cepas de ratones albinos muestran números reducidos de fotorreceptores (65). Debido a esto, utilizando técnicas de microscopía electrónica e histológicas (figura 13), se estudió el estado general de los fotorreceptores en la cepa mutante *vps18*^{hi2499aTg} a 5 días de desarrollo. Se observó que se encuentran bien morfológicamente (figura 13A y B), sin embargo en cierta medida se pierde su arreglo columnar, lo que es más claro en los cortes histológicos teñidos con azul de metileno/azure II en donde resaltamos los núcleos de los fotorreceptores (figura 13C y D) y en la mutante parecen apelmazados. Es posible que esto se deba a que en condiciones normales el RPE le da soporte a los fotorreceptores y cuando el RPE tiene algún defecto (como en *vps18*^{hi2499aTg}) estos se vean afectados. Estos defectos ocurren progresivamente, ya que en etapas más tempranas a las observadas (5dpf), como 3pf, el estado general de los fotorreceptores es muy parecido entre larvas silvestres y larvas mutantes (imágenes no mostradas).

Las mitocondrias en los fotorreceptores de *vps18*^{hi2499aTg} se ven aumentadas de tamaño en comparación con las presentes en los fotorreceptores de larvas silvestres (figura 13E y F). Se sabe que el homólogo de *vps18* en *Aspergillus nidulans* (*digA*), se requiere para mantener una morfología mitocondrial normal (25). Pensamos que puede existir alguna relación con lo observado. Para ver si el fenotipo que observamos en las mitocondrias de los fotorreceptores se relaciona con la mutación de *vps18*, se realizaron observaciones en mitocondrias en las somitas de la mutante *vps18*^{hi2499aTg}, ya que tienen un gran número de mitocondrias que permiten realizar una buena observación y comparación. Encontramos en efecto una gran cantidad de mitocondrias sin embargo no presentaron un daño morfológico como el que encontramos en las mitocondrias de los fotorreceptores por lo que quedaría por explicar porque vemos solo el fenómeno en los fotorreceptores pero no en las somitas (Imagen no mostrada).

El epitelio pigmentado de la retina juega un papel crucial en el recambio de la membrana fotosensible de fotorreceptores, tanto conos como bastones. El RPE fagocita y degrada a los componentes lipídicos y protéicos de los discos membranosos. Los mecanismos moleculares que causan y conllevan a la pérdida de las puntas de los fotorreceptores son aún desconocidas (66). En el caso de larvas mutantes de 5 dpf observamos la presencia de restos de discos membranosos en el RPE (figura 13G-J).

7.2.3 Apoptosis en la retina de la mutante *vps18*^{hi2499aTg}

Vps18 es parte del complejo HOPS que tiene varias subunidades. Cuando se estudio la mutación en la subunidad Vps39 de pez cebra (67) se encontró que ciertas células de la retina se pierden por apoptosis, lo cual se encontró por medio del ensayo de TUNEL. Por esa razón decidimos evaluar si algo similar le pasa a la mutante de pez cebra en *vps18* que también es una subunidad de HOPS.

Cuando se realizaron observaciones de la morfología del ojo por medio de microscopia electrónica, se encontraron células en estado de degradación en la retina de larvas *vps18*^{hi2499aTg} de 5 dpf, en particular en la zona de células ganglionares de la retina (RGC) (figura 14B). Dado lo anterior se decidió realizar la técnica de TUNEL, ya que es un método que detecta fragmentación de DNA mediante una tinción de los ácidos nucleicos en su porción terminal, lo que ocurre en células en apoptosis, esto se llevó a cabo en ojos de larvas silvestres y mutantes de 5 dpf. Se sabe que para día 5 la apoptosis presente en la retina del pez cebra es prácticamente nula (68), lo cual observamos nosotros también en las larvas silvestres (Figura 14D). Por otro lado en ese mismo estadio se encontró células en apoptosis en la retina de *vps18*^{hi2499aTg} al igual que en la mutante de Vps39 (67) (Figura 14 F-J).

7.2.4 Ensayo Opto-Motor en larvas silvestres y mutantes *vps18*^{hi2499aTg}

El sistema visual del pez cebra se desarrolla de manera muy rápida en su etapa embrionaria. Su desarrollo embrionario es externo y existe una gran presión del entorno para que los sistemas sensoriales sean funcionales rápidamente, de

tal forma que depredadores puedan evitarse y se pueda comenzar con su alimentación (recordando que las larvas cuentan con un vitelo que sirve de fuente de alimento hasta los 5dpf). La respuesta de las larvas *vps18^{hi2499aTg}* al estímulo de respuesta optocinética (OKR) ha sido previamente estudiado en nuestro laboratorio (21) en donde se observó que la mutante solo puede realizar un 16% de lo que se consideraría una respuesta normal. En este trabajo decidimos explorar la respuesta de la mutante *vps18^{hi2499aTg}* al ensayo optomotor (OMR por sus siglas en inglés) este es un comportamiento locomotor inducido en las larvas de pez cebra por un patrón estimulante en movimiento repetitivo, en este caso al movimiento de franjas negras y blancas que se desplazan de un lado a otro. Las franjas se colocan por debajo de las larvas estimulando a que las larvas naden en la misma dirección del movimiento de las franjas (figura 15A). Es interesante que hay mutantes de pez cebra, como es el caso de la mutante *belladonna* (*bel*) que tienen problemas en el ensayo de OKR pero llevan a cabo un OMR normal (57). Para los detalles de cómo se realizó este ensayo ver la sección de Material y Métodos. El ensayo (figura 15) se inició con un periodo de aclimatación a la cantidad de luz de 1 min, se inicia el movimiento de las franjas de derecha a izquierda (tiempo 1) y después de 1 min se detiene el movimiento de las franjas por 10 segundos. Se re-inicia el movimiento de las franjas pero que ahora se desplazan de izquierda a derecha por otro minuto (tiempo 2); nuevamente se detiene el movimiento de las franjas por 10 segundos más, por último se re-inicia el movimiento de las franjas de derecha a izquierda por otro minuto (tiempo 3). Todo se filma en video y al final se analiza el número de larvas que se desplazaron hasta el límite de la caja siguiendo el movimiento (figura 15B –E). A los 10 minutos de haber hecho el análisis el ensayo (ensayo 1) se repite el mismo procedimiento (ensayo 2). El ensayo optomotor puede ser confiable para el día 7 y a partir de ese momento va a persistir durante la etapa adulta. Se probó la respuesta, tanto en 5 dpf como en 7 dpf, a tres tipos de larvas; larvas silvestres (WT), larvas mutantes *vps18^{hi2499aTg}* y larvas silvestres tratadas con el compuesto PTU (WtP) para igualar la hipopigmentación presente en las mutantes para *Vps18*. Se cuantificó el número de larvas que realizaban el ensayo durante el

minuto que duraba. Lo primero que observamos (figura 15F – G) es que las larvas mejoran bastante su respuesta entre el tiempo 1 a tiempo 3 (ya sean Wt, WtP ó Mut), que las larvas de 7 dpf, en general, tienen una mejor respuesta que las de 5 dpf y que las larvas *vps18^{hi2499aTg}* casi fallan por completo en tener una respuesta. Entre las larvas *vps18^{hi2499aTg}* la mejor respuesta es entre 4 a 6% (figura 15F - G). Esto es en cierta medida similar a lo observado con el ensayo de OKR (21), en el que la respuesta está muy disminuida pero aún está presente en algunas larvas. Dado que la respuesta al OMR es más robusta a los 7 dpf y que los ensayos de OKR fueron todos realizados en larvas de 5 dpf, valdría la pena repetir los ensayos de OKR en *vps18^{hi2499aTg}* a los 7 dpf.

7.3 Análisis de marcadores de espinas dendríticas y la Interacción entre Vps18 y Plk2, en la mutante *vps18^{hi2499aTg}*

7.3.1 Marcadores de espinas dendríticas en el IPL de la mutante *vps18^{hi2499aTg}*

Las espinas dendríticas son diminutas protuberancias localizadas a lo largo de las dendritas de neuronas glutamatérgicas, que están especializadas en recibir estímulos excitatorios sinápticos y para ello forman un ancho botón post-sináptico en la región más distal de la espina, la cual se conecta a la dendrita por un cuello estrecho (39). En el pez cebra se ha reportado la presencia de espinas dendríticas en las células ganglionares de la retina de peces adultos, en donde se han clasificado de acuerdo al número de espinas y a los patrones de ramificación que presentan (42). Debido a múltiples evidencias (ver sección de Introducción y Planteamiento del problema) creemos que Vps18 se requiere para la formación de espinas dendríticas en neuronas glutamatérgicas. Dado que *vps18^{hi2499aTg}* falla en responder óptimamente en los ensayos de visión (OKR y OMR) podría reflejar una falta de espinas dendríticas en la retina. Células ganglionares de la retina (RGC's) establecen conexiones con otras neuronas por medio de espinas dendríticas en la zona de la retina llamada Capa plexiforme interna (IPL), esta se encuentra entre dos capas celulares, la de RGC's y la de células amácrinas y bipolares (69). Por medio de microscopía electrónica, comparamos la morfología del IPL entre larvas silvestres y mutantes *vps18^{hi2499aTg}* (figura 16). No existen cambios dramáticos en

la morfología del IPL entre larvas silvestres y $vps18^{hi2499aTg}$ como se aprecia en una vista panorámica (figura 16A - B). A mayores ampliaciones no fuimos capaces de identificar conexiones sinápticas en el IPL silvestre ni en el IPL mutante. Para nuestras observaciones nos basamos en la figura 2 del artículo de Nimchinsky del 2002 (39), donde se presentan imágenes hechas por microscopia electrónica de diversos tipos morfológicos de espinas.

Debido a lo anterior decidimos entonces utilizar marcaje con anticuerpos que marquen proteínas asociadas a las espinas dendríticas y permitan precisar si estas se afectan por la ausencia de Vps18. Se escogió un anticuerpo para marcar la pre-sinapsis (llamado SV2) y otro para marcar la post-sinapsis (llamado MAGUK). SV2 es un anticuerpo monoclonal que marca vesículas sinápticas y MAGUK es un anticuerpo que marca varias proteínas conocidas como PSD por las siglas en inglés de “*Post-synaptic density*”.

Se realizó una prueba inicial de ambos anticuerpos en ojos de larvas de 3 y 5 dpf (figura 17), con ello pudimos ver que ambos anticuerpos para día 3 se ven principalmente en el IPL (figura 17B y H), mientras que para el día 5 ambos anticuerpos se encuentran tanto en el IPL como en la capa externa plexiforme (OPL) (figura 17E y K). Tanto en el IPL como el OPL son regiones en donde se establecen las conexiones sinápticas y por tanto hay pre-sinapsis y post-sinapsis. El marcaje tardío del OPL tiene que ver con el orden en que aparecen las diferentes capas de la retina durante el desarrollo del pez cebra. La diferenciación de las RGC's se da muy cercana a la diferenciación de las células amácrinas. Estas dos poblaciones celulares forman la capa interna plexiforme entre las 40 y 60 hpf. Escogimos el estadio de 5 dpf para comparar el marcaje de los anticuerpos SV2 y MAGUK en larvas WT y $vps18^{hi2499aTg}$ (figura 18), mientras que SV2 marca, tanto en larvas WT como en $vps18^{hi2499aTg}$, las regiones de conexión sináptica IPL y OPL, el anticuerpo de MAGUK da un marcaje positivo en larvas WT pero negativo en larvas $vps18^{hi2499aTg}$ (figura 18A - H). Estas observaciones fueron hechas en el microscopio confocal Olympus FV1000, como se observaron

diferentes secciones ópticas de la muestra sabemos que este resultado refleja lo que pasa en toda la retina.

7.3.2 Expresión de Plk2a y PSD95 en la mutante *vps18*^{hi2499aTg}

Nuestra hipótesis de trabajo se describe en el modelo que se presentó al principio de este trabajo (figura 5E), básicamente propone que Vps18 es necesario para la formación de espinas dendríticas en el sistema nervioso, esto se debe a que Vps18, además de participar en el tráfico vesicular, tiene actividad de ligasa de ubiquitina tipo E3 y su blanco es la proteína *Polo like kinase 2* (Plk2 ó SNK) (31). Plk2 se encuentra expresada en el sistema nervioso (34) y los niveles de su mRNA se regulan por la actividad eléctrica de las neuronas. El experimento reportado en la literatura científica que muestra que Vps18 induce la degradación de Plk2 consistió en que observaron los niveles de la proteína Plk2, por la técnica de inmunodetección de “*western blot*”, en extractos de células HeLa y cuando se sobre-expresó a Vps18 desapareció la marca de Plk2. Al mismo tiempo al bloquear la expresión de Vps18 por medio de shRNA (silenciamiento de RNA) aumentó la expresión de Plk2 (31). Con este experimento en mente llevamos a cabo un ensayo de inmunodetección de Plk2 por “*western blot*” a partir de extractos de larvas de 3 dpf tanto de larvas WT como de larvas *vps18*^{hi2499aTg} homocigas (figura 19A). Los anticuerpos contra Plk2 que existen comercialmente están hechos contra las Plk2s de mamíferos. Se adquirió un panel que contenía 4 anticuerpos que reconocen regiones diferentes de Plk2 de humano (*BETHYL AbVanced Panel of PLK2*). Los anticuerpos probados fueron: Anticuerpo BL1692 que reconoce el fragmento 1 – 50, el anticuerpo BL1693 es específico por la región 350 – 400, el anticuerpo BL1694 reconoce los aa 575 – 625 y el BL1695 reconoce la región carboxilo terminal (aa 625 – 685), de ellos solo el anticuerpo BL1694 reconoce a Plk2 de pez cebra. En pez cebra hay dos genes de Plk2 llamados Plk2a y Plk2b (lo cual revisaremos con detalle más adelante) con un peso molecular de 77.3 y 74.4 kDa respectivamente, al realizar el “*western blot*” observamos que el anticuerpo BL1694 reconoce 2 bandas del peso molecular esperado para ambos genes Plk2 de pez cebra (figura 19A) tanto en extractos de

larvas de 3 dpf WT y homocigotas *vps18*^{hi2499aTg}. En el caso de larvas WT observamos que la banda de mayor peso molecular (probablemente Plk2a) es mucho menos abundante que la banda de menor peso molecular (probablemente Plk2b). Un comportamiento diferente fue observado en los extractos de proteína de larvas *vps18*^{hi2499aTg} homocigotas en las que hay un aumento importante en la expresión de Plk2a mientras que Plk2b se mantiene igual o aumenta ligeramente. Nuestro control de carga se realizó sobre la misma membrana y se utilizó un anticuerpo que reconoce a la alfa-tubulina que tiene un peso molecular de 50 kDa.

El notable aumento en la cantidad de Plk2a en las larvas mutantes que carecen de Vps18 respalda nuestro modelo (figura 5E) de que en el pez cebra la ubiquitina ligasa de Plk2a es Vps18. Sin embargo Plk2b no se ve afectada, por esa razón realizamos una comparación de los posibles sitios de ubiquitinación entre la Plk2 de rata y Plk2a y b de pez cebra (figura 19D). Para ello empleamos el programa “*UbPred*” (www.ubpred.org) (70) que, según sus autores, predice hasta con un 80% de certeza la posición de los sitios de ubiquitinación de una proteína. Utilizamos la secuencia de Plk2 de rata (*rattus norvegicus*) debido a que en esta proteína en particular se describió la ubiquitinación por Vps18 (31). Como se observa en la figura 19C existen 3 sitios posibles de ubiquitinación que están conservados entre rata y pez cebra, estos son los aminoácidos en las posiciones 384, 387 y 435 de Plk2 de rata que corresponden a los aminoácidos 366, 369 y 420 de Plk2a de pez cebra y 359, 362 y 410 de Plk2b de pez cebra. Es interesante que mientras que solo la lisina 387 de rata se conserva tanto en Plk2a y Plk2b de pez cebra, las lisinas 384 y 435 de Plk2 de rata son también lisinas en Plk2a de pez cebra. En Plk2b de pez cebra son arginina y prolina, respectivamente. Nuestro experimento de “*western blot*” (figura 19A) sugiere que Vps18 puede ubiquitinar a Plk2a pero no a Plk2b, lo cual nos hace pensar en las lisinas 384rata-Plk2/366pez-Plk2a ó 435rata/420pez-Plk2a como candidatas en Plk2a para ser reconocidas y ubiquitinadas por Vps18 de pez cebra ya que en las respectivas posiciones de Plk2b no hay lisinas. Otra posibilidad es que la lisina 387rata/369pez-Plk2a/362pez-Plk2b sea el aminoácido ubiquitinado pero Vps18 solo ubiquitina a Plk2a mientras que Plk2b es el blanco de otra E3 ubiquitina ligasa.

La segunda parte del modelo propuesto sobre la participación de Vps18 en la formación de espinas dendríticas (figura 5E) consiste en que la degradación de Plk2 permite que SPAR se mantenga en las neuronas (Plk2 induce la ubiquitinación de SPAR), dado que no existe ningún anticuerpo comercial contra SPAR compatible con pez cebrá, seleccionamos probar la abundancia de PSD95 con un anticuerpo comercial (NeuroMab). Se sabe que PSD-95 es una proteína de andamiaje que organiza la densidad post sináptica regulando la señalización de los receptores a un complejo que también tiene F-actina. Nuestra lógica es que si hay un número menor de espinas dendríticas debe de haber una reducción en la abundancia de PSD95. El análisis tipo “*western blot*” mostró que PSD95 disminuye en larvas homocigas *vps18^{hi2499aTg}* con respecto a larvas WT (figura 19C). Aunque el cambio no es dramático, pensamos que los niveles de PSD95 en la mutante no son los normales. Cabe mencionar que para estos “*western blots*” se emplearon extractos de larvas completas y que un mejor análisis sería realizar estos ensayos solo con tejido de la retina, lo que permitiría un análisis más preciso de lo que le pasa a las espinas dendríticas en la retina.

7.3.3 Análisis filogenético de los genes Plk2 y SPAR

Las dos copias de Plk2 en el genoma del pez cebrá se encontraron por medio de búsquedas por homología en la base de datos ENSEMBL (www.ensembl.org/danio), mientras que *plk2a* se encuentra en el cromosoma 10 (4,318,090 – 4,327,311), *plk2b* se localiza en el cromosoma 8 (17,598,092 – 17,605,595) entre ellos tienen una alta identidad (67%). Búsquedas de Plk2 en las bases de datos de otros peces teleostos, como Fugu (*Takifugu rubripes*) o Medaka (*Oryzias latipes*) arrojó como resultado una sola copia de Plk2 que esta filogenéticamente más cercana a Plk2a que a Plk2b como muestra nuestro análisis filogenético (figura 20A). El que Plk2a está más conservada que Plk2b lo respalda también el hecho de que cuando se realizó la filogenia de Plk2 de varios organismos invertebrados y vertebrados se encontró que Plk2a de pez cebrá está en la misma rama que Plk2 de anfibios y mamíferos, mientras que Plk2b queda fuera de este grupo (figura 20B). SPAR tiene también dos copias que llamamos;

spar a en el cromosoma 20 (28,675,798 – 28,724,187) y *spar b* en el cromosoma 11 (32,205,623 – 32,269,516). Al parecer SPARa es más similar a SPAR de mamíferos que SPARb ya que la primera se agrupa en el mismo clado, mientras que SPARb no lo hace (figura 20C). Esta información es importante para nosotros ya que nuestro modelo (figura 5 E) contempla que la función de Vps18 va a influir sobre la abundancia de Plk2 y SPAR y en consecuencia participar en la formación de espinas dendríticas.

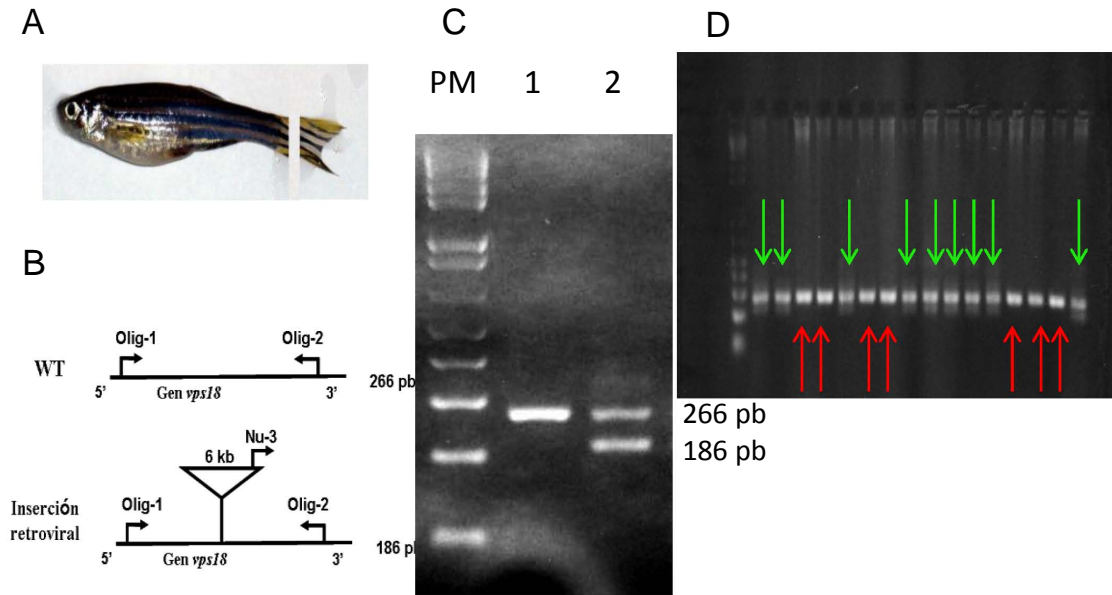


Figura 7. Genotipificaciones **A.** Biopsia de aleta caudal que se utiliza para genotipificar a los peces **B.** Esquema representando la posición del virus y de los oligonucleótidos en el gen *vps18* **C.** Electroforésis de DNA (gel) que muestra los marcadores de peso molecular y en el carril 1 una banda de 266 pares de bases, que representa a un pez WT (amplificación entre el Oligo-1 y el Oligo-2) y en el carril dos con las dos bandas de 266 y 186 pares de bases (amplificación entre el Nu-3 y el Oligo-2) que representan a alelo WT y el alelo mutado en el pez portador o heterócigo. **D.** Un gel de genotipificación, flechas verdes superiores portadores (+/-), flechas rojas inferiores no portadores (WT +/+). Al Oligo-1 y Oligo-2 también los llamamos EM11 y EM67 respectivamente.

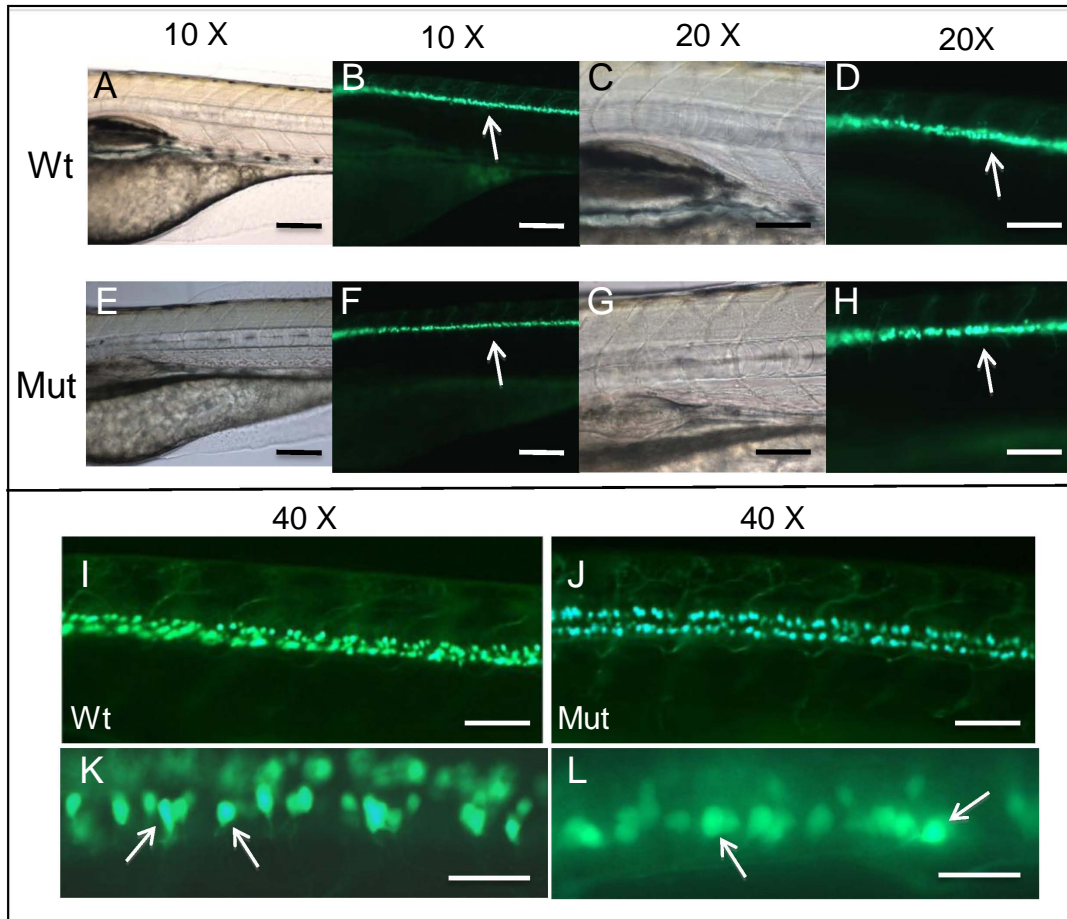


Figura 8. Morfología de motoneuronas en larvas WT y *Tg(isl1:GFP);vps18^{hi2499a}Tg*. **A, B, C, D** e **I** muestran larvas WT, mientras que **E, F, G, H** y **J** muestran larvas *Tg(isl1:GFP);vps18^{hi2499a}Tg*. Se tomaron fotografías a 3 aumentos: 10X (**A, B, E, F**), 20X (**C, D, G** y **H**) y 40X (**I** y **J**). Las motoneuronas se observan expresando a la proteína verde fluorescente (GFP) bajo el control del promotor *islet-1* (**B, D, F, H, I, J, K** y **L**). Las larvas se fotografiaron también en campo claro para mostrar la región en el tronco del pez en donde se realizaron las observaciones (**A, C, E** y **G**). En **K** y **L** se presenta una amplificación de las motoneuronas en donde se distinguen los cuerpos neuronales señalados por flechas blancas. Todas son larvas de 5 dpf excepto en **I - L** que son de 7 dpf. Las barras representan 150 μ m (**A, B, E** y **F**), 100 μ m (**C, D, G** y **H**), 30 μ m (**I** y **J**) y 10 μ m (**K** y **L**).

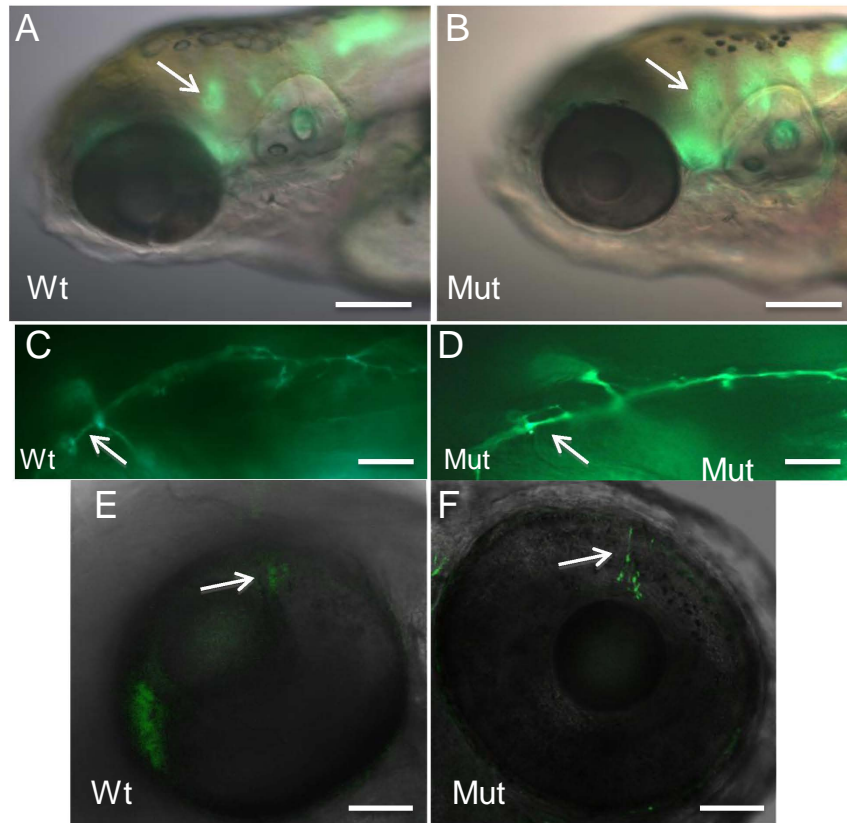


Figura 9. Comparaciones entre neuronas expresando GFP en el área de la cabeza en larvas WT y *Tg(isl1:GFP);vps18^{hi2499a}Tg* de 5 dpf. **A, C y E** son larvas WT y **B, D y F** son larvas mutantes *Tg(isl1:GFP);vps18^{hi2499a}Tg*. En **A y B** el ojo se señalan neuronas expresando GFP por un flecha blanca. En **C y D** se muestran neuronas que observamos inervando los músculos de la mandíbula. Además se observaron algunas neuronas de la retina (**E y F**). Las barras son de 150 μm (**A, B, E y F**) y de 30 μm (**C y D**).

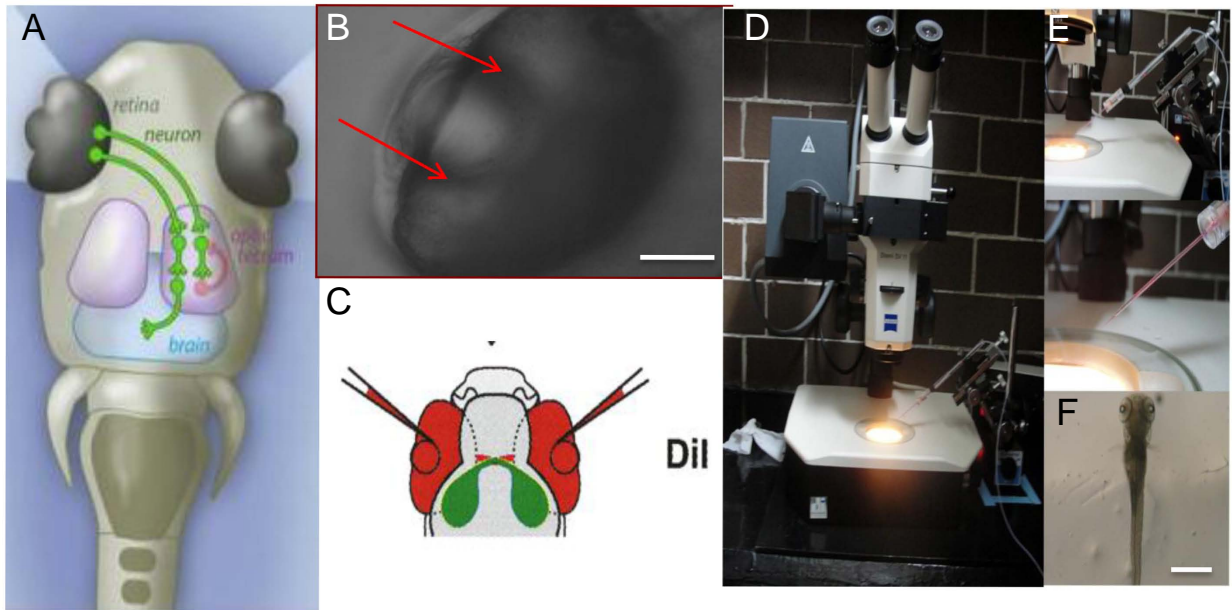


Figura 10. Método para el marcaje retinotectal en larvas de pez cebra. **A.** Esquema del sistema visual del pez cebra, en donde se observa como la retina, en un lado del pez, se conecta con el tectum del lado opuesto. **B.** Ojo de pez cebra de 5 dpf con flechas indicando las regiones nasodorsal (flecha superior) y ventrolateral (flecha inferior) en donde se realizan las microinyecciones. **C.** Diagrama de trayectoria de la microinyección del fluoroforo Dil. **D y E.** Microscopio estereoscópico Stemi-SV6 en donde por medio de un microinyector y capilares que sirven como agujas se realizaron los marcajes retinotectales. **F.** Las larvas fijadas previamente se embeben en agarosa en una posición que facilita el procedimiento. La barras representan 150 μm (**B**) y 1 mm (**F**).

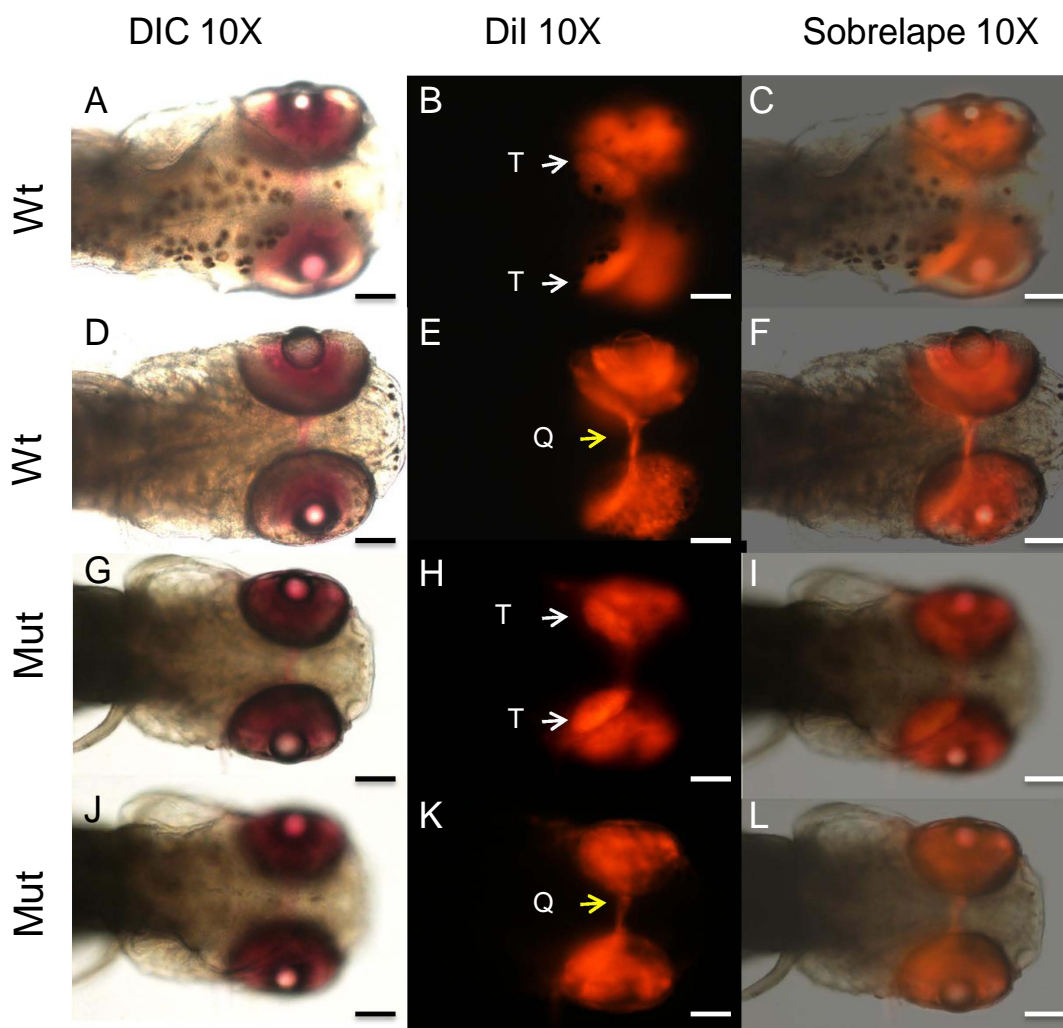


Figura 11. Marcajes retinotectales en larvas WT y *vps18^{hi2499aTg}*. **A – F** son larvas WT, mientras que **G – L** son larvas mutantes de la cepa *vps18^{hi2499aTg}*, todas las larvas son de 5 dpf. Los marcajes se realizaron en ambos ojos tal como se explica en la sección de metodología y se fotografiaron en un microscopio de epifluorescencia con un filtro para Dil (*excitación 550 y emisión 580 nm*). En **B** y **H** se puede observar la localización del tectum (flechas blancas), mientras que en **E** y **K** se señala con flechas amarillas el sitio en donde se cruzan los nervios ópticos de ambos ojos formando el quiasma óptico. Los ojos de las larvas mutantes son un poco más chicos que los de las larvas WT, sin embargo no notamos ninguna diferencia importante del marcaje retinotectal, entre peces WT y mutantes. T= Tectum Óptico, O= Ojo, Q= Quiasma óptico. Las barras representan 100 μ m.

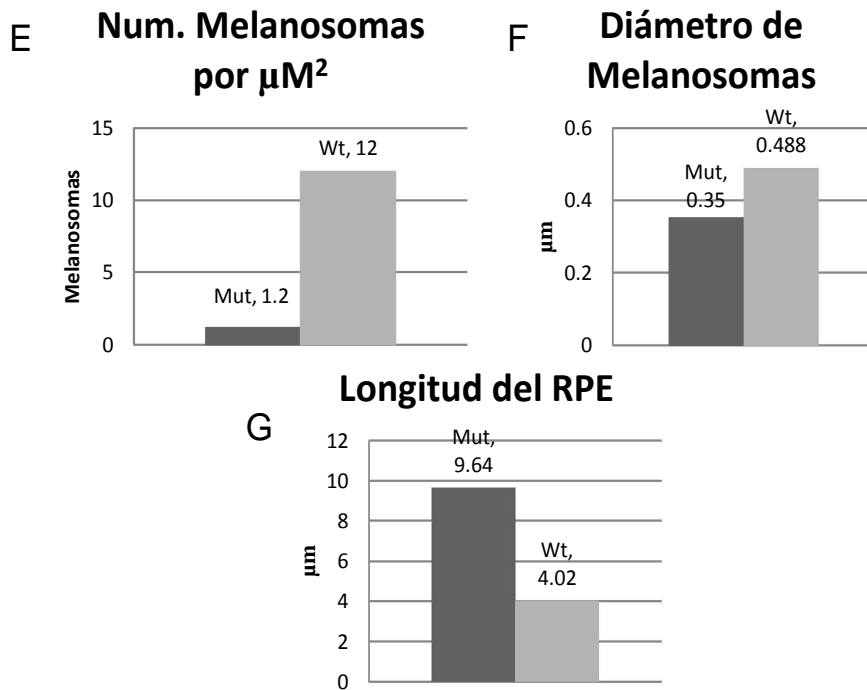
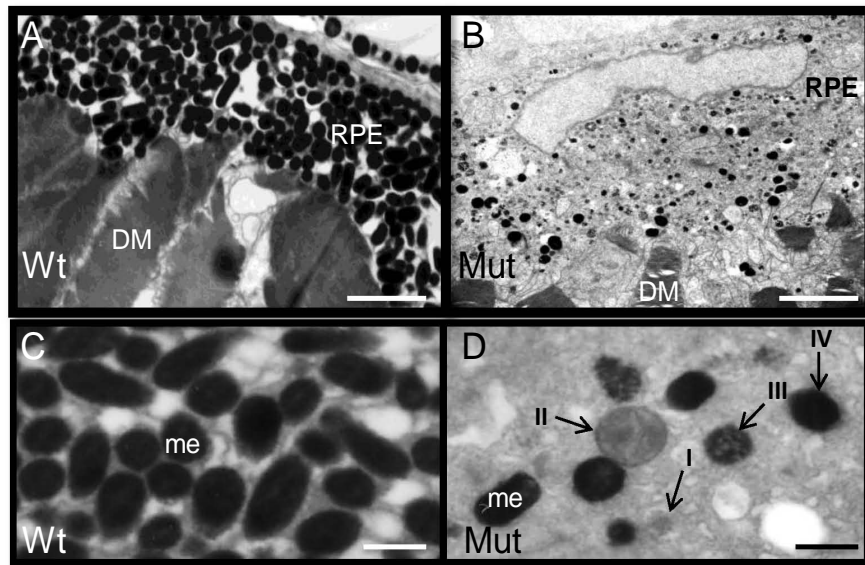


Figura 12. Microscopia Electrónica del Epitelio Pigmentado de la Retina (RPE) en larvas de pez cebra 5 dpf. En **A** y **C** se muestran larvas WT y en **B** y **D** larvas *vps18^{hi2499aTg}*. Las flechas blancas en **A** y **B** muestran el área del RPE. En **B** se aprecia una reducción en el número de melanosomas en la mutante de Vps18 y aquellos presentes se encuentran en diferentes etapas de melanogénesis (**D**), lo cual es inusual en este estadio de desarrollo en larvas WT (**C**). **E** Gráfica del número de melanosomas por μM^2 , **F** Gráfica del Diámetro promedio de los melanosomas. **G** Longitud del RPE. Las barras representan 5 μm (**A** y **B**) y 1 μm (**C** y **D**). DM= Disco Membranoso. RPE=Epitelio Pigmentado de la Retina. me = melanosoma.

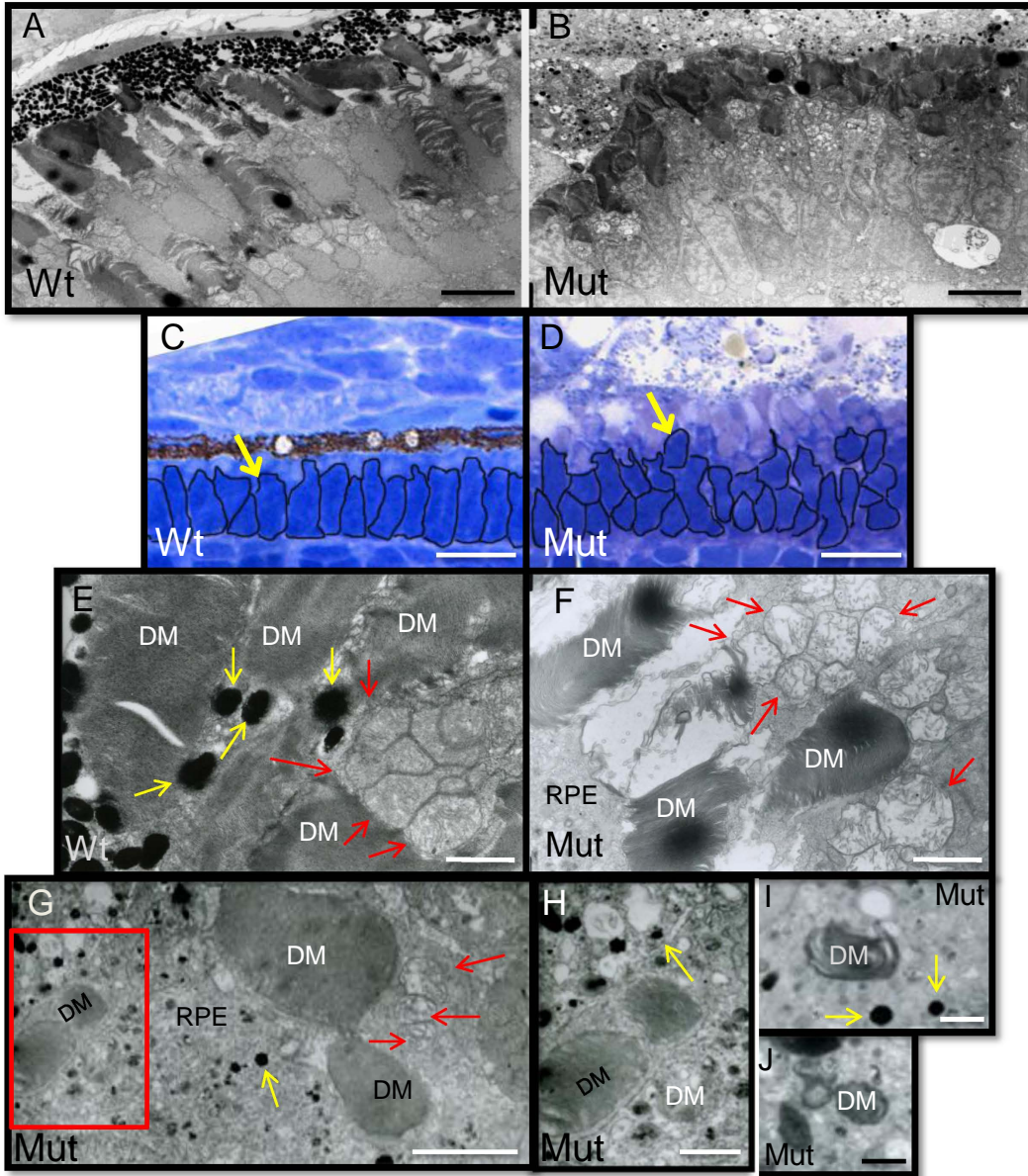


Figura 13. Estado general de los fotorreceptores en ojos de larvas de pez cebra observado por microscopía electrónica y técnica histológica (tinción de “azul de metileno - azure II” en cortes). Larvas WT de 5 dpf en **A**, **C** y **E**. Larvas mutantes *vps18^{hi2499aTg}* en **B**, **D**, **F**, **G**, **H**, **I** y **J**. En **A - D** se puede apreciar que los fotorreceptores de *vps18^{hi2499aTg}* no tienen el mismo arreglo columnar ordenado de los WT. En **C** y **D** se realizó una tinción de “azul de metileno - azure II” en cortes de 2 μm de larvas embebidas en metacrilato, los núcleos de los fotorreceptores se delimitaron en color negro. **E** y **F** Algunas mitocondrias (flechas rojas) se ven de mayor tamaño en las larvas *vps18^{hi2499aTg}*. Los melanosomas se señalan con flechas amarillas. En **G** se presentan restos de discos membranosos en el RPE de la mutante, el recuadro rojo representa la zona ampliada en **H**. En **I** y **J** se muestran otros ejemplos de discos membranosos. DM= Disco Membranoso. RPE=Epitelio Pigmentado de la Retina. Flechas Rojas: Mitocondrias. Flechas Amarillas= Melanosomas. Las barras representan 15 μm (**A** y **B**), 10 μm (**C** y **D**), 2 μm (**E**, **F** y **H**), 5 μm (**G**) y 1 μm (**I** y **J**).

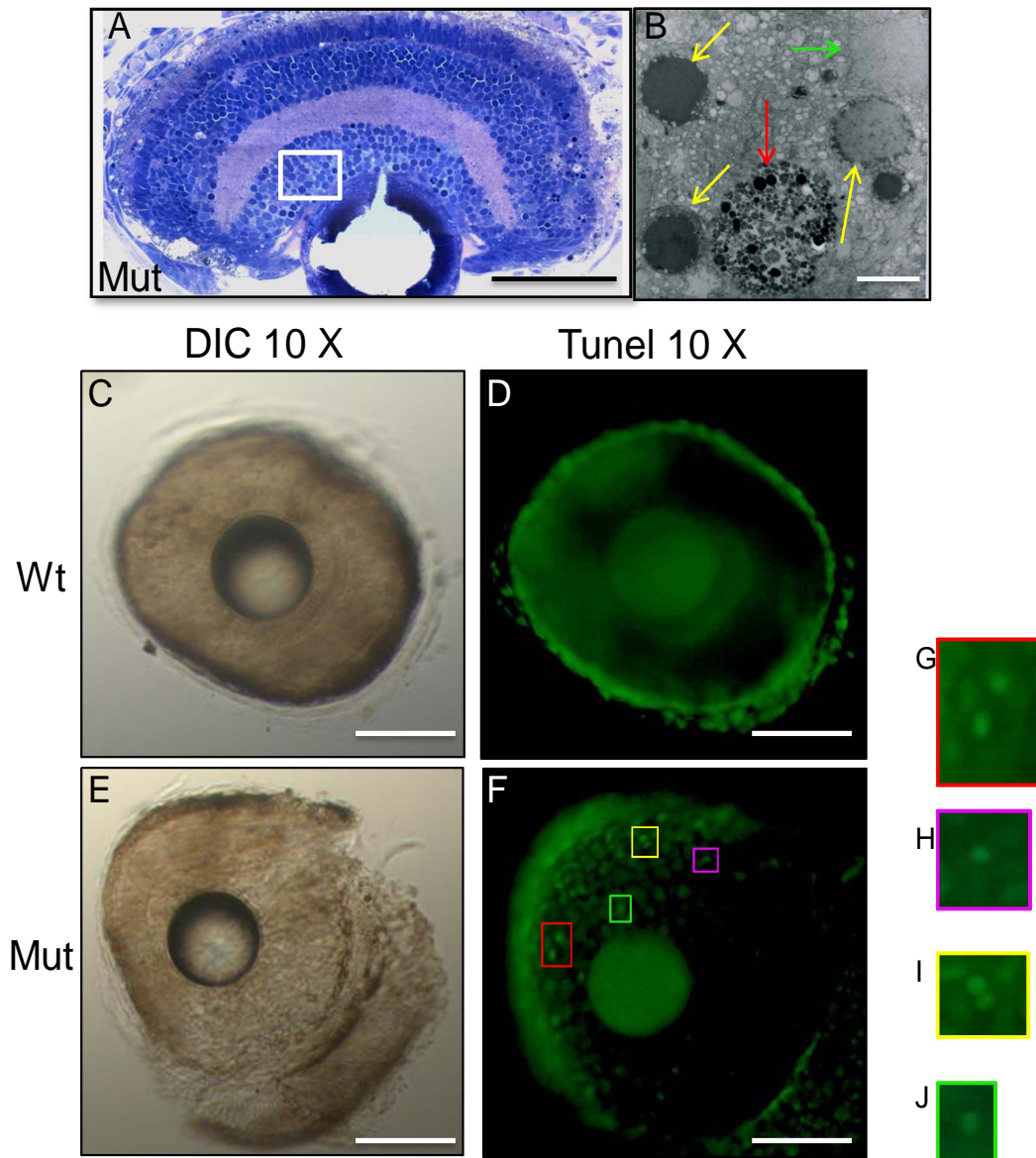
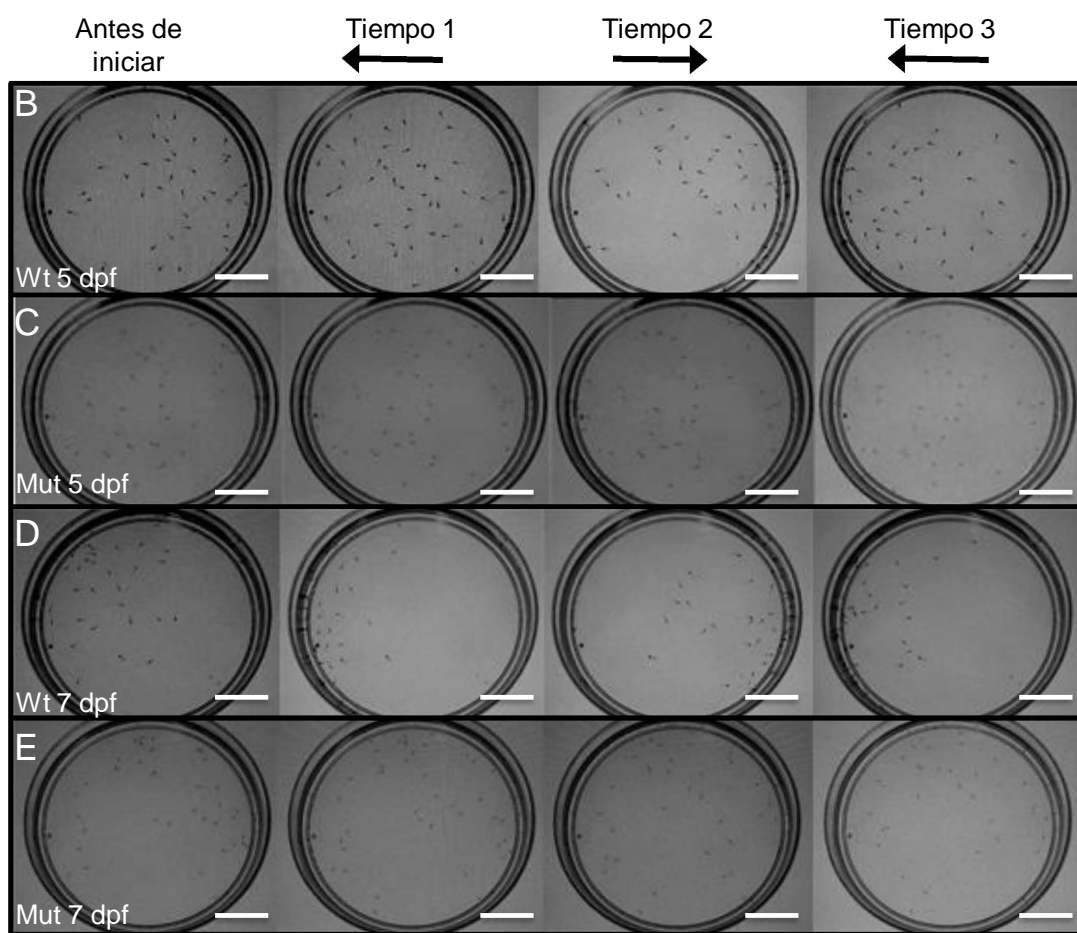
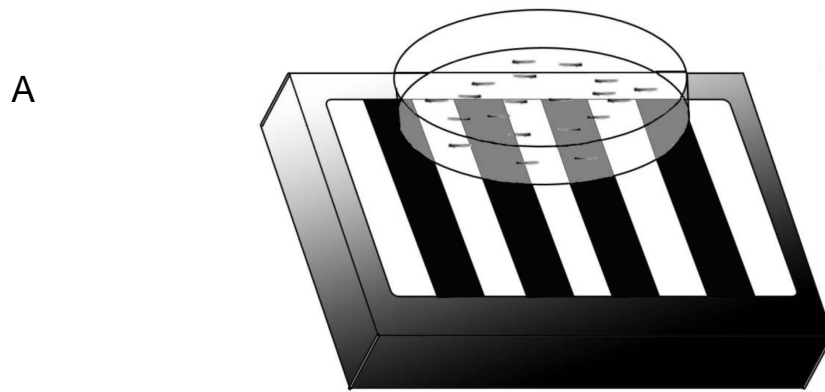


Figura 14. Apoptosis en la retina de *vps18^{hi2499aTg}*. **A** En una retina de pez cebra 3 dpf mutante se muestra la zona (ver recuadro blanco) de células ganglionares de la retina (RGC's), la muestra se embebió en metacrilato, se cortaron secciones de 2 μm de espesor y se llevo a cabo una tinción de "azul de metileno - azure II". **B** Microscopia electrónica de células en estado de degradación, avanzado (flecha roja) o intermedios (flecha amarilla), célula en buen estado (flecha verde). Ojo WT 5 dpf (**C** y **D**) y Ojo de la mutante *vps18^{hi2499aTg}* 5 dpf (**D**, **F**, **G**, **H**, **I** y **J**) tratados por la técnica de TUNEL. En la mutante *vps18^{hi2499aTg}* observamos, por fluorescencia un aumento de células en apoptosis (ver ampliaciones **G** – **J**) en la retina. Las barras represntan 50 μm (**A**), 5 μm (**B**) y 100 μm (**C** – **F**).



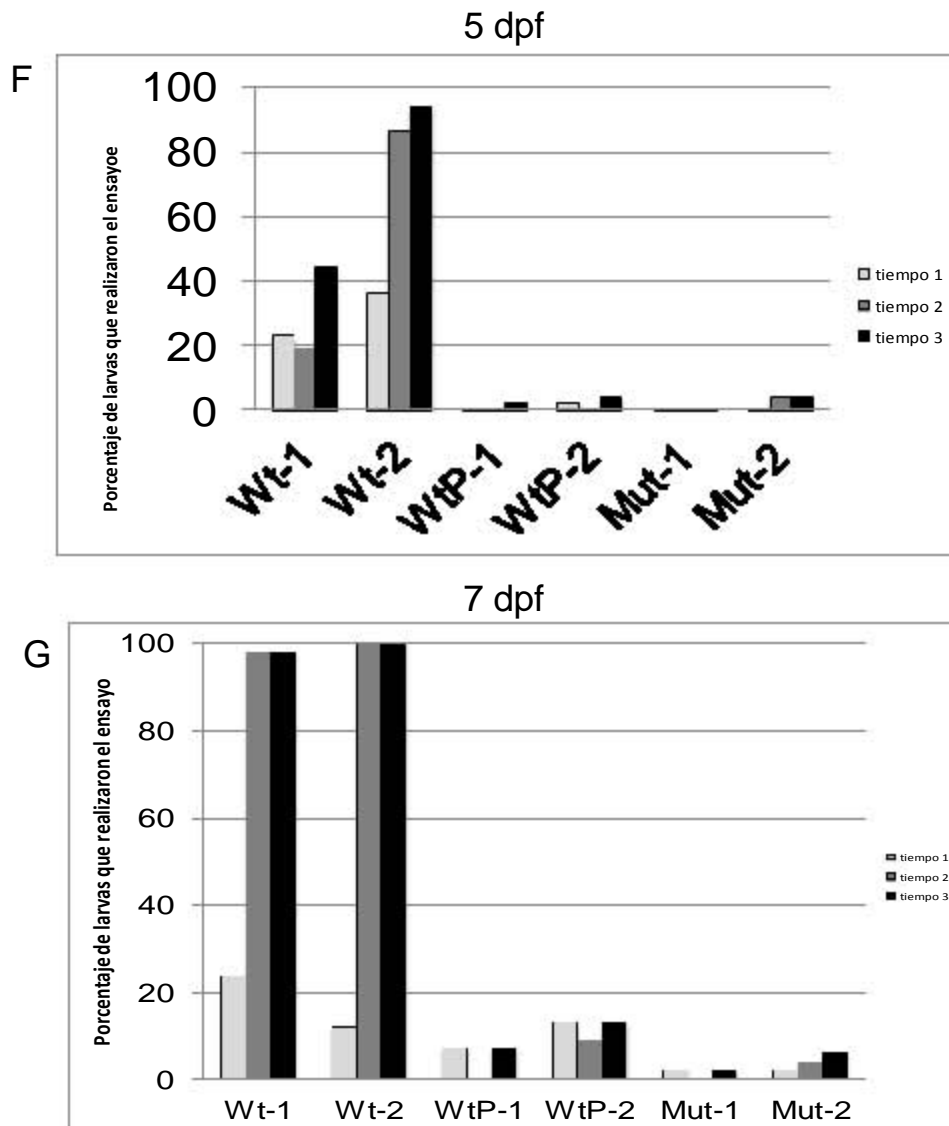


Figura 15. Respuesta al ensayo optomotor de *vps18^{hi2499aTg}*. En **A** se muestra un diagrama del dispositivo utilizado para el ensayo optomotor. Se registra el movimiento de nado de las larvas sobre franjas negras que se desplazan de un lado a otro. El ensayo se realizó en larvas de 5 dpf (**B**, **C** y **F**) y de 7 dpf (**D**, **E** y **G**), tanto WT (**B**, **D**) como mutantes *vps18^{hi2499aTg}* (**C** y **E**). **B** – **E** fotos de las cajas con las larvas antes de iniciar el ensayo y al terminar 3 recorridos (c/u de 1 min) de las franjas negras en direcciones opuestas (tiempo 1 – tiempo 3). Los resultados se resumen en **F** y **G**: Por cada grupo de peces se realizaron 2 ensayos separados por 10 min (por ejemplo Wt-1 y Wt-2), cada ensayo consistió de 3 estímulos (tiempo 1 – tiempo 3) cambiando la dirección del movimiento de las franjas negras cada vez (**A**). Las barras en las gráficas (**F** y **G**) representan el porcentaje de larvas que realizaron el estímulo correctamente. WtP corresponde a larvas WT tratadas con PTU y que inhibe la pigmentación en los peces y Mut se refiere a las larvas mutantes *vps18^{hi2499aTg}*. Las barras en **B** – **E** representan 2 mm.

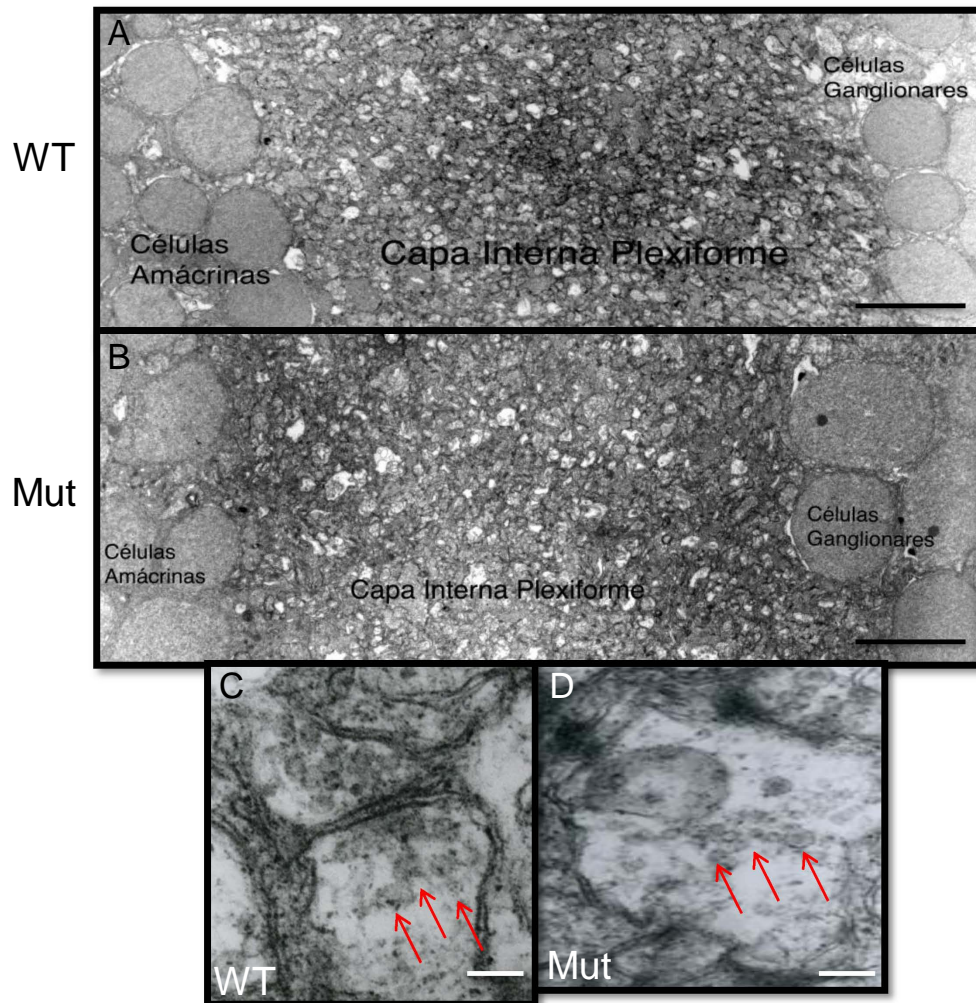


Figura 16. Comparación de la morfología de la capa interna plexiforme (IPL) de la retina. Por microscopía electrónica se observó la región de la retina del IPL de larvas WT (A) y *vps18^{hi2499aTg}* (B). A baja amplificación no se ven diferencias entre larvas Wt y mutantes, cuando se observaron las muestras a mayor amplificación no logramos detectar sinapsis, ni en las muestras WT ni las mutantes (C y D respectivamente). Si encontramos algunas vesículas sinápticas que se señalan con flechas rojas. Las barras representan 5 μm (A y B) y 100 nanómetros (C y D).

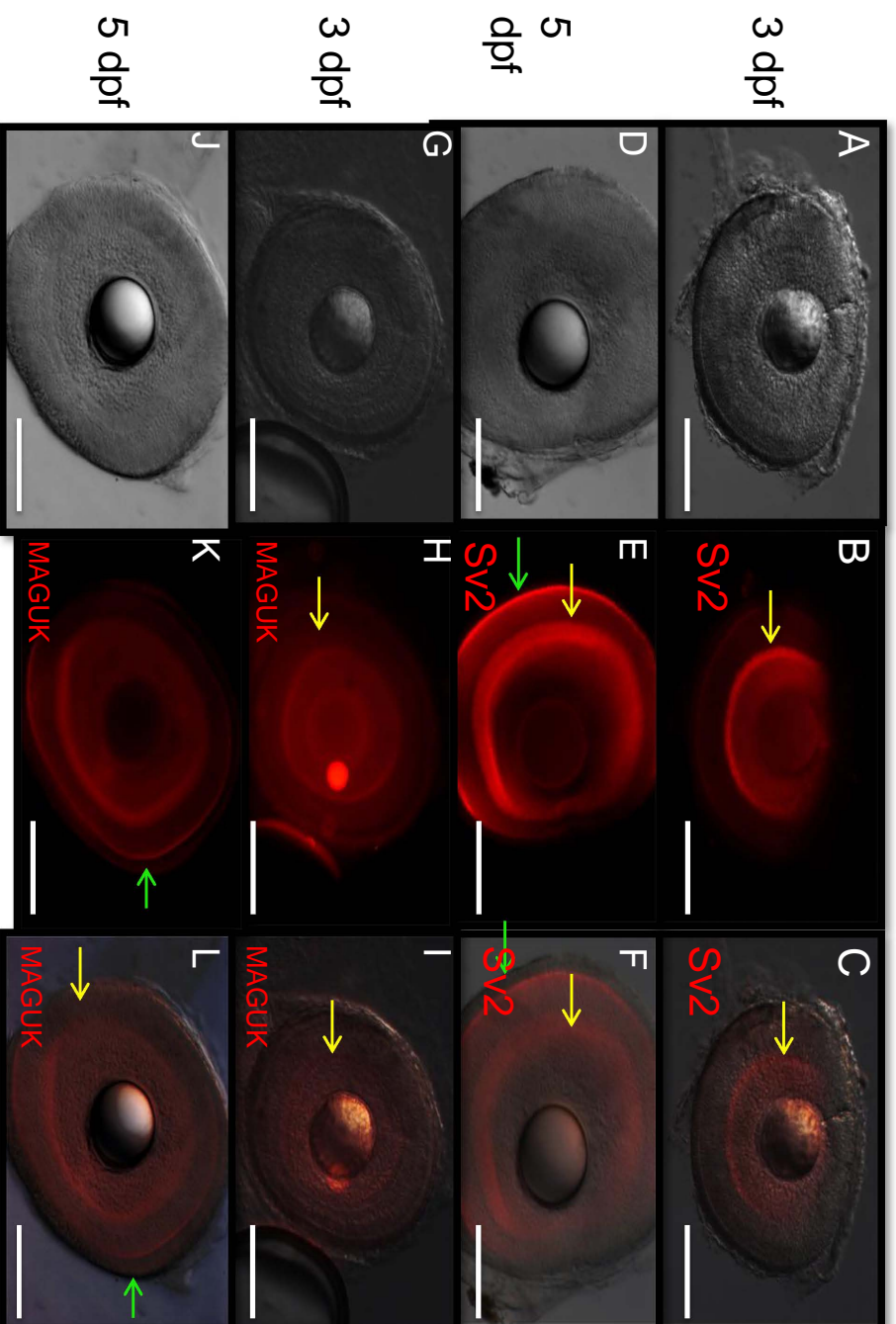


Figura 17. Inmunotinciones en ojos de larvas de pez cebra. Los ojos fueron disectados a los 3 dpf (**A – C** y **G – I**) y 5 dpf (**D – F** y **J – L**) todos provenientes de larvas WT. Se probaron los anticuerpos llamados SV2 que marcan la presinapisis (**B** y **E**) y los anticuerpos llamados MAGUK que marcan la postinapisis (**H** y **K**). Los ojos se muestran con iluminación DIC (**A**, **D**, **G** y **J**), con fluorescencia (**B**, **E**, **H** y **K**) y superponiendo DIC y fluorescencia (**C**, **F**, **I** y **L**) lo que ayuda a establecer la región del marcado con los anticuerpos. Las flechas amarillas marcan la Capa interna plexiforme (IPL) y las flechas verdes la Capa externa plexiforme (OPL por sus siglas en inglés). Las barras representan 100 μm .

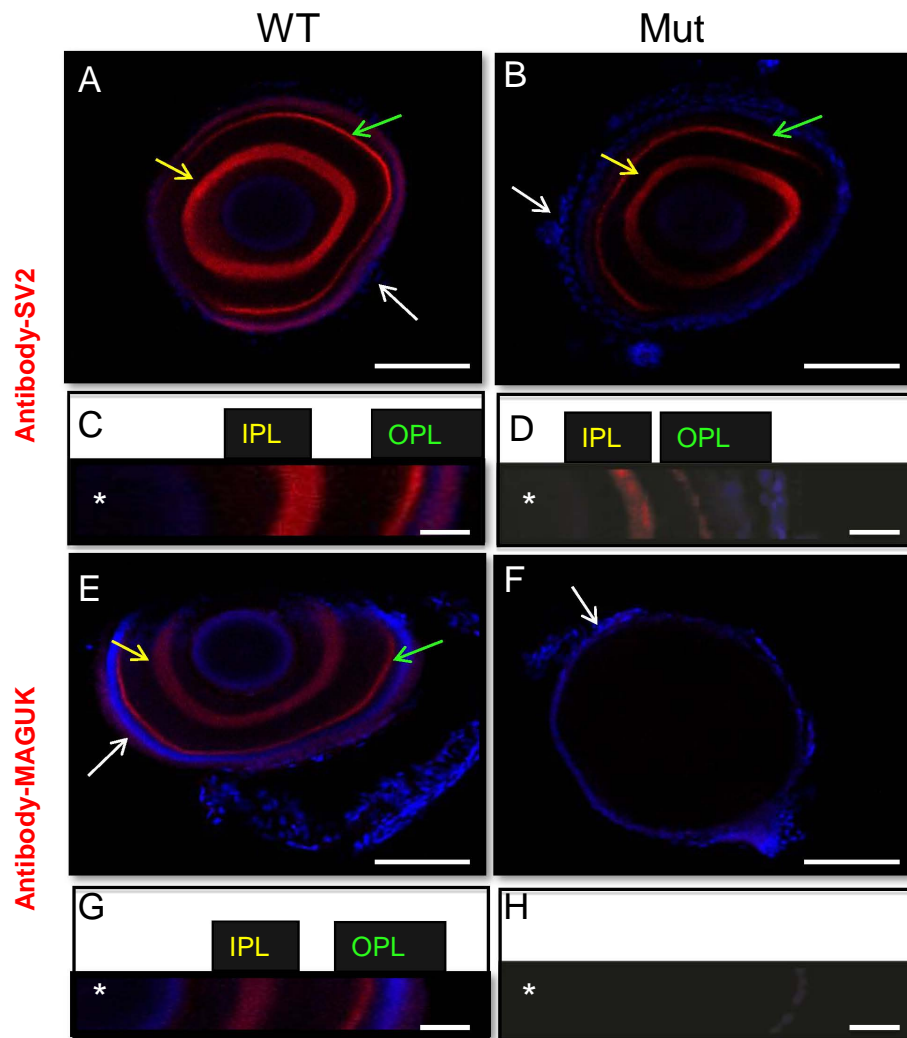


Figura 18. Inmunotinciones en larvas WT y *vps18^{hi2499aTg}* a los 5 dpf. Empleando el microscopio confocal Olympus FV1000 se obtuvieron imágenes de inmunotinciones de ojos empleando el anticuerpo SV2 (A – D) que marca la pre-sinapsis, y el anticuerpo MAGUK (E – H) que marca la post-sinapsis. El ensayo se realizó en ojos obtenidos de larvas WT (A, C, E y G) y de mutantes *vps18^{hi2499aTg}* (B, D, F y H). El IPL (*siglas en ingles de capa interna plexiforme*) se señala con flechas o letreros amarillos y el OPL (*siglas en ingles de capa externa plexiforme*) con flechas o letreros verdes. La flecha blanca marca la región de los fotorreceptores como la resalta el colorante de núcleos DAPI. El asterisco indica la posición del lente. El anticuerpo SV2 (pre-sináptico) marca el IPL y el OPL tanto en larvas WT como en *vps18^{hi2499aTg}*, sin embargo el anticuerpo MAGUK (post-sináptico) marca el IPL y el OPL en las larvas WT pero no en las larvas mutantes. C, D, G y H son ampliificaciones de A, D, E y F respectivamente. Las barras representan 100 μm (A, B, E y F) y 20 μm (C, D, G y H).

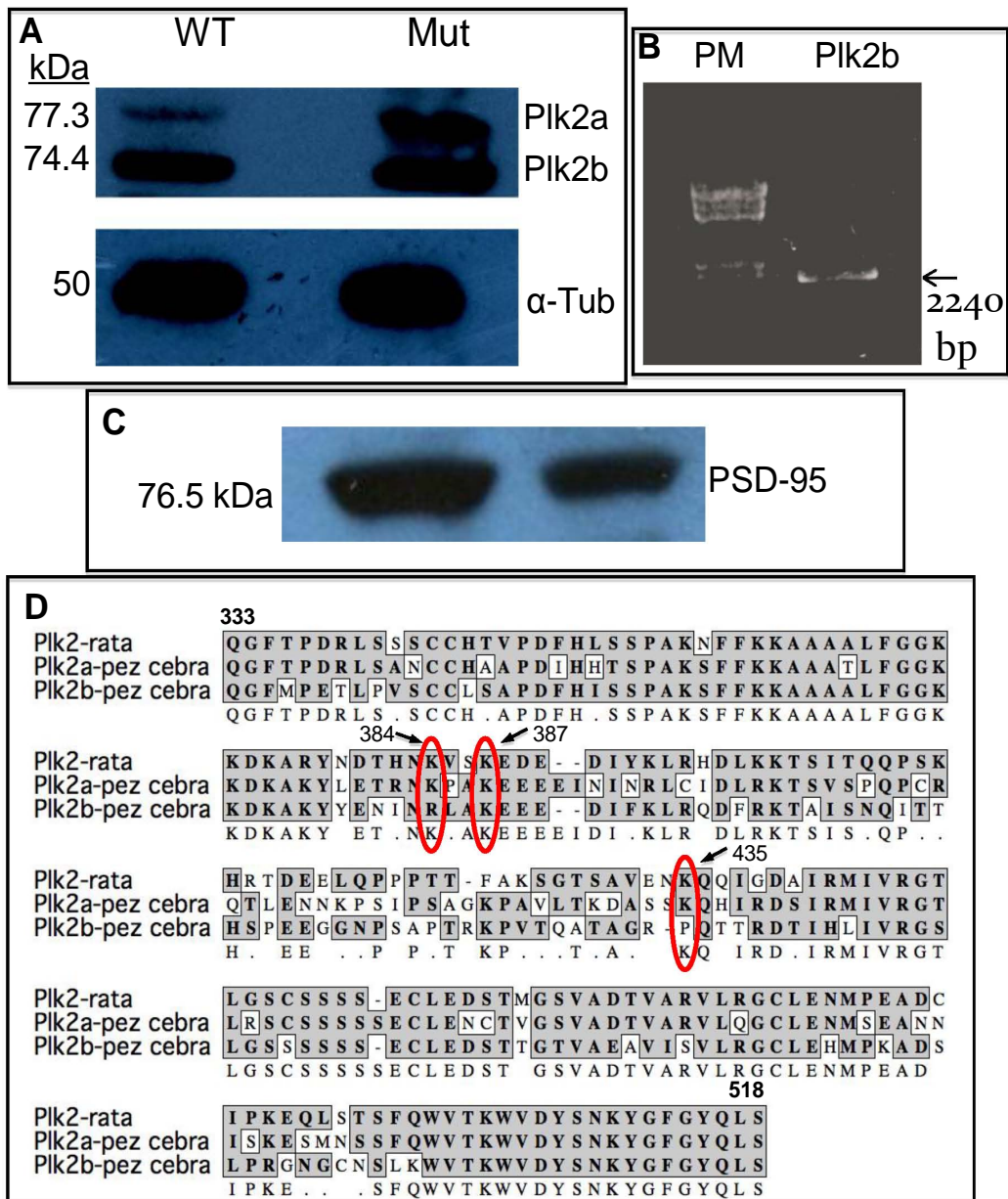


Figura 19. Plk2 y PSD-95. **A.** “western blot” con extractos de larvas 3 dpf WT y *vps18^{hi2499aTg}* en donde se muestra un aumento de expresión de Plk2a en la mutante de *vps18*, pero no así de Plk2b. Control de carga alfa-tubulina (α-tub). **B.** Clonación de los genes *plk* de pez cebra, se muestra un fragmento amplificado de *plk2b*. **C.** La mutante también tiene un disminución en la expresión de la proteína de densidad post-sináptica PSD95. **D.** Alineamiento múltiple de la región central de las proteínas Plk2 de rata y pez cebra que muestra los posibles sitios de ubiquitinación por Vps18. Se muestra la numeración de aminoácidos de la secuencia de rata.

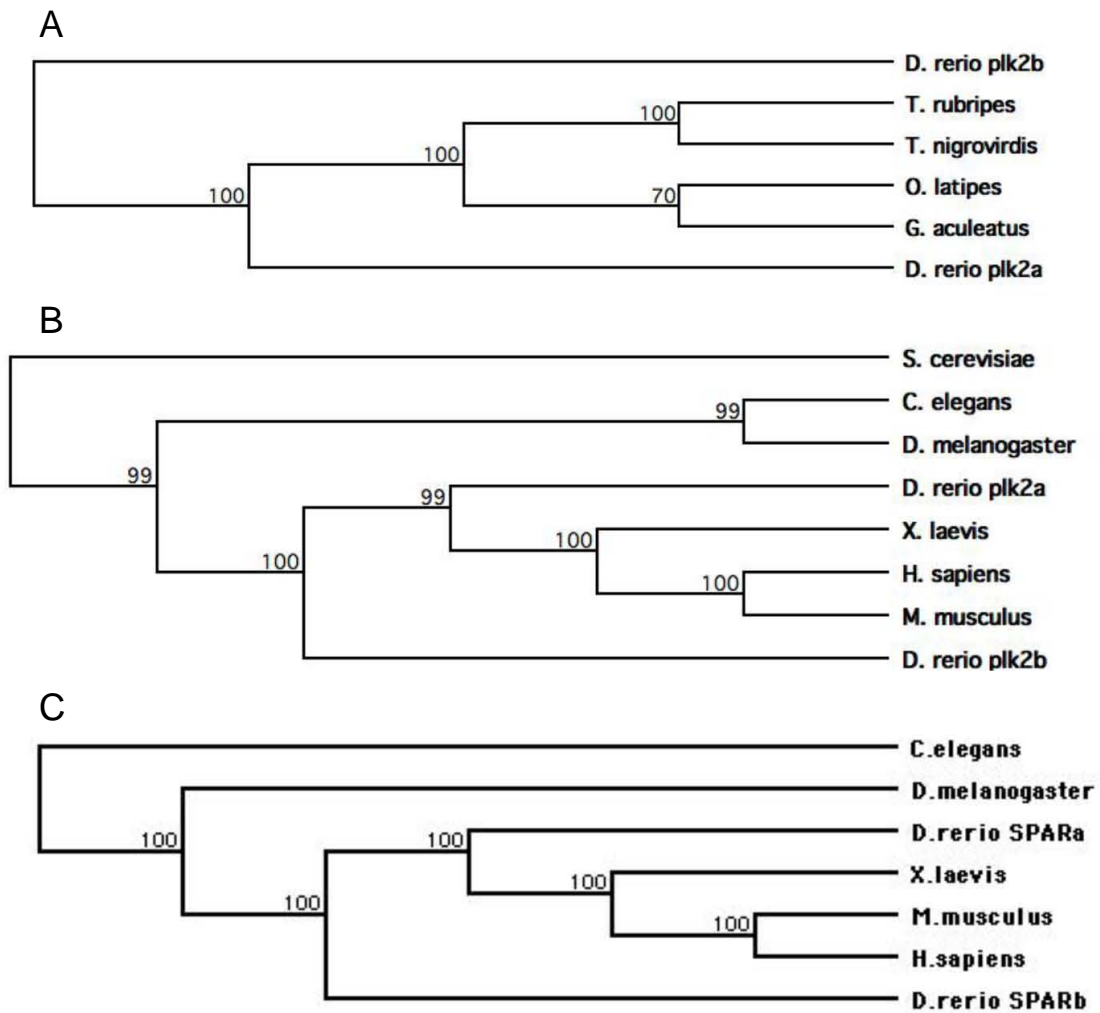


Figura 20. Filogenia de las proteínas Plk2 y SPAR. Los arboles se construyeron con el programa MacVector (versión 12.7.4) utilizando secuencias de aminoácidos y el método de “*Neighbor Joining*” comprobando cada nodo con “*Bootstrap*” de 1000 repeticiones. Los números en cada nodo reflejan el porcentaje de confianza. En **A** y **B** se presenta la filogenia de Plk2 y en **C** la de SPAR. **A.** En el grupo de peces teleosteos solo pez cebra tiene dos copias llamadas Plk2a y Plk2b, la posición de estas dos copias (**B**) refleja que Plk2a es más similar a Plk2 de vertebrados que Plk2b. **C.** La proteína SPAR también se presenta en dos copias en pez cebra, la copia SPARa es mas similar a la proteína de vertebrados que la copia SPARb.

8. Discusión

El presente trabajo tuvo como objetivo analizar la mutante de *vps18* desde los puntos de vista morfológico, funcional y molecular.

Desde el punto de vista morfológico se analizó el estado de las motoneuronas, la formación del quiasma óptico y el estado general de la retina.

Inicialmente se planteó como una posibilidad que el sistema neuro-motor de la mutante pudiera presentar defectos y, aunque el pez perciba las imágenes, no es capaz de responder a ellas con movimiento ocular, lo cual podría explicar la disminución de la larva mutante al ensayo optocinético. Para determinar si la mutante *vps18^{hi2499aTg}* tiene un número normal de motoneuronas y además si estas tienen una morfología normal, se cruzó a la cepa *vps18^{hi2499aTg}* con la cepa *Tg(isl1:GFP)*, la cual expresa GFP bajo el promotor del gen *Islet-1 (isl-1)* el cual es un miembro de la familia de proteínas de homeodominio LIM y es un marcador temprano del desarrollo de motoneuronas. Se realizó un seguimiento de larvas silvestres y larvas mutantes, realizando observaciones y tomando fotografías en días 3, 5 y 7. Durante estas observaciones no se encontraron anomalías ni en la forma ni en el desarrollo de las motoneuronas expresando GFP. Lo cual nos permite pensar que en particular este tipo de motoneuronas no se ven afectadas en la mutante del gen *vps18*. Sin embargo existen otro grupo de motoneuronas que no son marcadas por *islet-1* que podrían estar involucradas (figuras 8 y 9).

Se encontró que el marcaje del nervio óptico utilizando el compuesto lipofílico Dil, mostró que se presenta una formación adecuada quiasma óptico, al haber una correcta proyección contralateral en las larvas mutantes. En base a esto pensamos que parece no haber un cambio que pudiera explicar el comportamiento de la larva mutante *vps18^{hi2499aTg}* en el ensayo optocinético, como en el caso de otras mutantes o en el caso de personas albinas que presentan parte proyecciones anormales (58, 59). Por otra parte encontramos que las diferencias que en algunas ocasiones se llegaban a encontrar (intensidad de marca), eran producto de artefactos por la técnica, ya que ésta depende de el sitio de marcaje y

la correcta difusión del compuesto. Como se mencionó la inyección debe hacerse en dos sitios del ojo de la larva para una marca completa y adecuada del tectum por lo que cualquier cambio en estos sitios conlleva a una marca distinta, sin embargo todas aquellas larvas en las que se encontraba marca completa tanto en mutantes como en silvestres morfológicamente no presentaban diferencias entre ellas que pudieran indicar que esta inervación es causal de alteraciones en las respuestas ópticas de la larva mutante (figura 11).

El estado general de la retina, mostró que el RPE en la mutante se encuentra agrandado casi al doble de tamaño que en el silvestre, aun no sabemos la causa de esto, buscando en la bibliografía no encontramos alguna situación similar en albinismo o bien problemas de tráfico vesicular. Por otro lado se encontró que el número de melanosomas maduros por μM^2 es diez veces menor en la mutante y presentan en promedio un tamaño 1.3 veces más pequeño que los silvestres (los cuales presentan casi el tamaño promedio de melanosomas en mamíferos), estos datos nos permiten pensar que *vps18* se encuentra involucrado en una correcta biogénesis de los melanosomas (figura 12).

Imágenes de los fotorreceptores mostraron que los fotorreceptores parecen perder de manera progresiva su arreglo columnar, esto podría ser debido a que el RPE es el responsable de darle soporte. Por otra parte las mitocondrias que se observaron en la mutante presentaban morfología o tamaño diferente al presente en las larvas silvestres, por lo que se buscó si esto era directamente relacionado con la mutación o bien un efecto indirecto. Para ello se realizó una búsqueda de mitocondrias en músculo en la mutante encontrando que presentaban una morfología normal (Imagen no mostrada).

Se sabe que el RPE es responsable del recambio de los fotorreceptores (71), en la mutante se encontraron diversos restos de discos membranosos a lo largo del RPE. Se ha visto en la mutante de *vps18* de *C. elegans* que fagosomas que contienen cuerpos celulares internalizados son incapaces de fusionarse con lisosomas para su degradación (71). Por lo que es posible que estos restos

presentes en el RPE de la mutante sean discos membranosos incapaces de degradarse.

Por medio de microscopía electrónica se encontró la presencia de cuerpos celulares en degradación, lo cual fue confirmado mediante la técnica de TUNEL, la cual mostro que el ojo de la mutante presenta un mayor número de cuerpos en apoptosis comparado con el silvestre. Sabemos que para día 5 post fertilización la retina de larvas silvestres presenta una apoptosis casi nula (68), lo cual también pudimos corroborar nosotros. La presencia de apoptosis en diferentes zonas del ojo pudiera ser debida tanto a fallas producto de problemas en el tráfico vesicular como bien de problemas en el sistema nervioso.

Desde el punto de vista funcional se analizó la respuesta al ensayo optomotor. El ensayo optomotor reveló una respuesta máxima de entre 4 a 6% en larvas mutantes, a diferencia del casi 100% observado en larvas silvestres (ambos ensayos en larvas de 7 dpf; figura 15 D, E, y G).

En el 2005 se presentó una colección de mutantes, las cuales presentaban fenotipos variados en su morfología ocular, a estas mutantes se le sometió a la prueba tanto optomora como optocinética. En este ensayo se encontró que morfologías que van desde ausencia de fotorreceptores o de células ganglionares de la retina hasta desarreglo de los fotorreceptores o errores en la proyección retinotectal mostraban defectos en ambas pruebas (58).

Tomando en cuenta esto y las observaciones morfológicas que realizamos (ver apartado 7.2.2), la baja respuesta de la mutante *vps18^{hi2499aTg}* al ensayo optomotor podría deberse a una combinación entre el desarreglo que se encuentra presente en los fotorreceptores y la disminución de espinas dendríticas que encontramos reflejada en la disminución marca de anticuerpos (ver Western Blot e Inmunotinciones en ojos).

Finalmente desde el punto de vista molecular se analizó a los marcadores presentes en Espinas Dendríticas y la Interacción entre Vps18 y Plk2, en la Mutante *vps18^{hi2499aTg}*.

Los resultados mostrados en las inmunotinciones de ojos mostraron una disminución en la marca del anticuerpo post-sináptico MAGUK en la mutante de *vps18*, al ser MAGUK un marcador de las proteínas de densidad post sináptica este resultado sugiere que en la mutante de *vps18* las espinas dendríticas (post-sinapsis) se encuentran afectadas y no así la pre-sinapsis al mostrar una marca normal de SV2, en el caso del IPL esas espinas deben de provenir de las RGC's y las pre-sinapsis de células amácrinas o bipolares (69). En el OPL las regiones post-sinápticas deben de provenir de células horizontales y las parte pre-sináptica de fotorreceptores (72).

El presente proyecto ha tenido como objetivo el probar una vía de regulación negativa de *vps18* sobre *plk2* (Figura 5 C, D y D'). En la cual proponemos que la falta de *vps18* conllevaría a un incremento de la proteína de *plk2*, este aumento de *plk2* a su vez presentaría una disminución de la proteína de andamiaje SPAR dando como resultado final la falta de espina dendrítica madura (37). Las inmunotinciones reflejan esta vía propuesta al ser MAGUK marcador de la familia PSD, siendo que PSD-95 se encuentra en directa interacción con la proteína SPAR. Algo que también se vio reflejado mediante el ensayo de Western Blot para PSD-95 (figura 19 C).

Aunque estos resultados deberán confirmarse con otros marcadores similares nuestros resultados sugieren que *Vps18* es necesario para la formación de espinas dendríticas en neuronas glutamatérgicas.

Aunado a esto por Western Blot se encontró un aumento de una de las copias de *Plk2*, *Plk2a* (figura 19A y D) que creemos se debe a que es la copia que conserva los posibles sitios de ubiquitinación presentes en rata. Ensayos de ubiquitinación "*in vitro*" combinados con variantes de *Plk2* de pez cebra con mutaciones puntuales ayudaría a entender mejor estos mecanismos de regulación.

9. Conclusiones

9.1 Descripción del fenotipo general y defectos en el sistema visual de la mutante *vps18^{hi2499aTg}*

Buscando una posible explicación a la disminución de la respuesta al ensayo optocinético en la mutante, se analizaron las motoneuronas que marca *islet-1* lo cual nos llevó a la conclusión que las motoneuronas marcadas parecen no presentar problemas, durante su desarrollo en la mutante *vps18^{hi2499aTg}*, ya que morfológicamente pareciera no haber cambios en las motoneuronas marcadas por este gen (figura 8). Sustentando esto se encuentra la evidencia de videos de movimientos oculares espontáneos muy similares entre mutantes y silvestres, sin embargo para un estudio más minucioso se podría realizar el análisis de motoneuronas con el anticuerpo Znp1 que es capaz de marcar los tres tipos de motoneuronas presentes en el pez cebra, en vista de que el transgén de *islet-1-GFP* solo marca un solo tipo de motoneuronas. Y por otra parte la realización de registros de las motoneuronas para comprobar su actividad.

Además de esto se realizó un análisis del quiasma óptico encontrando que los axones de las células ganglionares de la mutante se encuentran formando el quiasma óptico con una conexión contralateral correcta, sin embargo existe un cambio en el ángulo de los axones que lo conforman, dado que este cambio parece no ser significativo no pensamos que puedan explicar la disminución en la respuesta al ensayo optocinético que tienen los peces cuando no expresan a *vps18* (figura 11).

Realizando un análisis aún más minucioso de diversas capas celulares presentes en la retina del pez cebra encontramos que en larvas mutantes en estadios tardíos existe una presencia de melanosomas en diferentes etapas de melanogénesis en el epitelio pigmentado de la retina, lo cual se presenta en silvestres pero en etapas tempranas (figura 12). Por otra parte los fotorreceptores van perdiendo el arreglo columnar de manera progresiva a lo largo del desarrollo y las mitocondrias presentes en los fotorreceptores de la mutante se encuentran

agrandadas de tamaño, sin embargo esto no es un fenómeno general ya que mitocondrias presentes en somitas no presentan esta característica (figura 13).

Por otra parte se encontró que hay un mayor número de cuerpos en apoptosis, sin embargo no sabemos si hay un aumento en la apoptosis en nuestra mutante o bien hay un problema de degradación de estos cuerpos en apoptosis lo que hace que se vayan acumulando y por ende se ve el incremento en el número de marca positiva de cuerpos apoptóticos. Aunque cabe resaltar que este mismo fenotipo se encuentra presente en otra mutante del complejo al que pertenece *vps18 HOPS* (figura 14).

Finalmente tomando en cuenta que solo contábamos hasta el momento con un ensayo de respuesta visual de las mutantes se realizó el ensayo optomotor donde encontramos una respuesta muy baja de las larvas mutantes (>90% menor con respecto a las silvestres) aunque mejoran su respuesta entre el tiempo 1 y el tiempo 3 al igual que lo observado en las larvas silvestres y silvestres tratadas con PTU (figura 15).

9.2 Análisis de marcadores presentes en Espinas Dendríticas y la Interacción entre Vps18 y Plk2, en la Mutante *vps18^{hi2499aTg}*

De las capas de la retina realizamos un enfoque especial en la capa interna plexiforme al ser este el sitio de interacción entre células ganglionares y amácrinas o bipolares, donde encontramos que la morfología de la capa interna plexiforme es muy similar entre larvas silvestres y mutantes. Sin embargo a mayor acercamiento encontramos una acumulación de vesículas en la capa interna plexiforme de la mutante (figura 16). Tomando en cuenta que nuestro proyecto tiene un enfoque importante hacia la formación de espinas dendríticas (figura 5D) se realizó una búsqueda de estas estructuras mediante la técnica de microscopía electrónica, sin embargo al no encontrar estas estructuras claramente definidas, se optó por realizar inmuno-marcajes. Para ello se utilizaron dos marcadores, un marcador pre-sináptico que, SV2 el cual mantiene su marcaje entre silvestres y

mutantes (figura 18 A y B) y un marcador post-sináptico, MAGUK, el cual presentó un decremento significativo en la señal del anticuerpo en ambas capas plexiformes en el ojo de la larva mutante. MAGUK es un marcador de la familia de PSD-95, la proteína PSD-95 forma complejo con SPAR una de las proteínas propuestas en la vía (figura 5 C). Dado este resultado inferimos que Vps18 es necesario para la formación de espinas dendríticas. Lo cual se ve reflejado en el decremento de la proteína post-sináptica MAGUK (figuras 5D y 18E-F).

Continuando con la comprobación de la vía propuesta, realizamos la técnica de “western blot” para la proteína Plk2, esperando encontrar un aumento en la expresión de Plk2 en la mutante carente de vps18 (figura 5 C) y encontramos que por una parte nuestro anticuerpo detectaba ambas copias de Plk2 presentes en pez cebra (Plk2a y Plk2b) y que por otra parte el ensayo mostraba un aumento de la expresión de la proteína Plk2a en la mutante, lo cual parcialmente habíamos predicho (figuras 19A y 5C). En la búsqueda de una posible causa de porque Plk2b no presentaba cambios entre WT y mutante, realizamos un análisis en la secuencia de ambas Plk’s encontrando que Plk2b carece de dos posibles sitios de ubiquitinación que se encuentran presentes en Plk2a (figura 19C), los cuales concuerdan con lo predicho para la secuencia de rata (modelo utilizado para comprobar degradación de plk2 por vps18).

Finalmente realizando el ensayo de Western blot para ver variaciones en la proteína PSD-95 (ya que no contamos con un anticuerpo para SPAR) se encontró una disminución en la expresión de la proteína PSD95 en la mutante, lo cual esperábamos en concordancia a la vía que planteamos como hipótesis (figuras 19B y 5C).

En base a esta evidencia consideramos que la falta de vps18 conlleva a un aumento de una de las copias de Plk2, y que la falta de vps18 resulta en una disminución en la expresión de PSD95 lo cual concuerda parcialmente con la vía propuesta (figura 5C) y por otra parte, esto se ve reflejado en las inmunotinciones de ojos donde encontramos un decremento importante en la marca del anticuerpo MAGUK concordando nuevamente con nuestra hipótesis (figuras 5D- D’ y 18 E-F)

10. Perspectivas

10.1. Trasplante de células WT a mutante y de células mutantes a WT.

Con la finalidad de determinar si el efecto observado es autónomo y además si es posible rescatar de manera parcial o total la respuesta a los ensayos optocinético y optomotor, se propone trasplantar células WT (marcadas previamente para su identificación con algún colorante) en embriones mutantes (en estadios tempranos) de tal forma que las células trasplantadas tengan como destino final ser células ganglionares en los embriones receptores. Una vez que se tienen estos embriones mutantes con células ganglionares silvestres se someterían a las mismas pruebas que se han hecho con anterioridad (ensayos visuales optomotor, optocinético e inmunotinciones). Por otra parte se pretende realizar el mismo ensayo utilizando como células donadoras las mutantes y el embrión receptor es WT. En el caso de las células silvestres donadoras en un receptor mutante, si el efecto es autónomo se esperaría una recuperación parcial en los ensayos visuales. Mientras que si el efecto no es autónomo se esperaría que no se viera mejoría. En caso contrario siendo donadoras las células mutantes en receptores silvestres, en caso de ser autónomo se podría fenocopiar parcialmente la respuesta al ensayo optocinético, en caso de no ser autónomo no se vería cambio alguno en la respuesta a los ensayos visuales.

10.2 Rescates por medio de la microinyección de morfolidos para *plk2a* y *plk2b*

Se podría intentar rescatar el fenotipo en sistema nervioso de las mutantes inhibiendo la expresión de Plk2 (a y/o b), se inyectará el morfolino de *plk2* en embriones mutantes, esto, de acuerdo a la vía propuesta permitiría la formación de espinas dendríticas y se recuperaría tanto el marcaje con anticuerpo MAGUK como la expresión de PSD95 en la mutante. Se deberá inyectar morfolino para *plk2a*, *plk2b* y en ambos casos determinar la participación de cada uno en el fenotipo mutante a nivel sistema nervioso. Además se podrían realizar las pruebas optomotoras y optocinéticas para determinar si existe una mejora en la respuesta a ambas pruebas.

10.3 Inducción de la fenocopia por sobre-expresión de *plk2a*

Inyectando el mRNA de *plk2* en larvas silvestres se pretende fenocopiar el defecto a nivel sistema nervioso de los mutantes, al igual que en el caso de los morfolinós, al inyectar ambos mRNAs (*plk2a*, *plk2b*) se podría determinar la participación de cada uno en el fenotipo mutante a nivel de sistema nervioso, cada uno se probaría la tinción con el anticuerpo MAGUK, la expresión de PSD95 y la realización de pruebas visuales.

10.4 Bloqueo de la expresión de *vps18* por silenciamiento de RNA (siRNA) en neuronas de hipocampo de rata

Para ampliar las predicciones de nuestro modelo a otros organismos se propone realizar silenciamiento de RNA de *vps18* (siRNA) en neuronas de hipocampo de rata y después evaluar el número de espinas dendríticas empleando el anticuerpo MAGUK. Cabe mencionar que ya tenemos algunos resultados preliminares de este enfoque experimental que se han realizado en colaboración con el grupo de investigación de la Dra. Herminia Pasantes y del Dr. Gerardo Ramos, aquí en el IFC, UNAM.

11. Apéndice I

11.1 Análisis Proteómico Comparativo entre Larvas silvestres y mutantes

vps18^{hi2499aTg}

Con la finalidad de realizar un análisis global de como afecta la mutación del gen *vps18* el desarrollo del pez cebra realizamos una comparación por proteómica de las proteínas cuya expresión se modifica a los 5 dpf. Este experimento se realizó en colaboración con la Maestra Teresa Gutiérrez Espíndola y del Dr. José Luis Gallegos Pérez del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN). Para analizar los geles de segunda dimensión se utilizó el programa DIGE que estableció diferencias en las intensidades de los puntos (manchas en el gel que representan a las proteínas) entre larvas silvestres y mutantes, y en base a esto se seleccionaron los puntos con mayor diferencia para determinar por

medio de espectrometría de masas la identidad de dichas proteínas. Obteniendo los resultados mostrados en la tabla VI a VIII y además figuras 21 y 22.

Encontramos un aumento en la expresión de varias proteínas en las larvas mutantes e incluso la aparición de algunas proteínas que no se detectaban en larvas WT. Entre las proteínas que aumentan se encontró a la Vitelogenina 1 (Tablas VI y VII) la cual forma parte de una gran familia de proteínas, las vitelogeninas, las cuales constituyen las mayores proteínas del vitelo del pez cebra. Proveen al embrión de nutrimentos esenciales incluyendo aminoácidos, lípidos, iones metales, fosfatos y carbohidratos. Por lo cual la síntesis y degradación de vitelogenina es un proceso importante durante la embriogénesis. La síntesis de vitelogeninas es dependiente del tejido, estadio y del sexo y se encuentran bajo regulación hormonal. El gen *vtg1* codifica para una fosfoglicoproteína de unión a calcio. La vitelogenina es sintetizada hepáticamente en el pez inducida por la hormona femenina estradiol (73). Lo más probable es que el aumento de vitelogenin-1 se deba a que existe un ligero retraso en el desarrollo de las larvas *vps18^{hi2499aTg}* con respecto a las larvas WT que para los 5 dpf han consumido todas las reservas de vitelogenina y el vitelo ya no es aparente. Sin embargo dado que es una proteína que se sintetiza en el hígado, su aumento de expresión se puede también deber a una acumulación de vitelogenina en el hígado.

Entre las proteínas que se encuentran aumentadas en la mutante es el polipéptido pesado 1.2 de la Miosina de musculo esquelético (gen *myhz1.2*) (Tabla VI). Las miosinas son proteínas motoras altamente conservadas y ubicuas. La molécula se puede dividir en dos dominios funcionales un dominio amino terminal globular que contiene sitios de unión a ATP y a actina y un dominio carboxilo terminal tipo alfa hélice que tiene la capacidad de formar filamentos. La miosina se forma por seis subunidades, dos cadenas pesadas llamadas MYHs (200 kDa) y cuatro cadenas ligeras (MYLs de 20 kDa c/u) (74). Se ha encontrado que el genoma humano cuenta con 15 MYHs mientras que en los peces teleostos este número parece ser mucho mayor. En particular *myhz1.2* este forma parte de un

complejo de miosinas que además puede mover vesículas u otras cargas fijas en los filamentos de actinas. Por lo anterior podría pensarse que *myhz1.2* se encuentra aumentado en la mutante debido a su relación con el movimiento de vesículas, ya que se conoce que Vps18 se encuentra involucrado en el tráfico vesicular, y se ha visto que mutantes de *vps18* tanto en pez cebra como en *Drosophila* y en levadura presentan una acumulación de vesículas (27, 75), este aumento de vesículas podría provocar un aumento en la expresión de *myhz 1.2* pues más vesículas requieren ser transportadas.

La Tubulina β -5 (gen *tubb5*) también se encuentra aumentada en la mutante (Tabla VI), es una de las subunidades principales a partir de las cuales se polimerizan los microtúbulos. Tubb5 se expresa en ratones de manera ubicua presentando mayor abundancia en el timo, bazo y cerebro, y durante el desarrollo se presenta en los primeros estadios del desarrollo del cerebro, por lo que posiblemente Tubb5 sea principalmente neuronal (76), también se piensa que Tubb5 participe en el crecimiento axonal (77). En ratas lesionadas en la médula espinal se ha observado un aumento en la expresión de Tubb5 (78) y en pez cebra se encontró que después de daño al nervio óptico los niveles de Tubb5 en las células ganglionares de la retina aumentan (79). Recientemente se ha encontrado que los microtúbulos se encuentran presentes en la espina dendrítica ya que interaccionan con EB3 (una proteína característica de espinas dendríticas) (80). Esto sugiere que el aumento de Tubb5 en la mutante *vps18^{hi2499aTg}* se puede deber a su relación en la formación de espinas dendríticas las cuales se afectan en la ausencia de Vps18.

En los geles de la segunda dimensión también se observó que la proteína actina α -1 de músculo esquelético (gen *acta1*) aumenta su expresión en la mutante *vps18^{hi2499aTg}* (fig. 21 y Tablas VI y VII). Las actinas están altamente conservadas y se conocen tres isoformas, la alfa, la beta y la gamma, y se ha mostrado que la Actina α es un constituyente mayor del aparato contráctil del músculo esquelético (81). Se han encontrado más de 60 mutaciones en la Actina α que conllevan a miopatías congénitas que se caracterizan por presentar

debilidad muscular y en algunos casos una alta mortandad (82). Se cree que en algunos de estos casos las mutaciones en *acta1* causan alteraciones en la interacción actina con alfa-actinina (83). Se sabe que 12% de las proteínas de una espina dendrítica corresponden a citoesqueleto de actina (40).

De acuerdo al ensayo proteómico la proteína betaina-homocisteina S-metiltransferasa 1 (BHMT) se pueden detectar en la mutante *vps18*^{hi2499aTg} pero no en las larvas silvestres (figura 22), cabe la posibilidad que solo aumenten sus niveles de expresión y que en sus niveles normales de expresión sea indetectable por este método. Esta enzima citosólica cataliza la conversión de betaina y homocisteína a dimetilglicina y metionina respectivamente (84). Estudios de actividad y expresión han mostrado que los principales órganos donde se encuentra localizado BHMT son el riñón y el hígado, llevando a cabo en este último su actividad principalmente (85), previamente se ha reportado que la mutante de *vps18* tiene daño hepático (22), al ser BHMT una proteína hepática, su presencia puede deberse a un daño en el hígado.

Tabla VI. Proteínas cuya expresión aumenta en la mutante *vps18*^{hi2499aTg} Las letras representan los puntos encontrados en los geles (figura 21)

A1	Actina α -1 de músculo esquelético
A2	Tubulina β 5
A8	Miosina, polipéptido pesado 1.2, de músculo esquelético
A11	Actina α -1, de músculo esquelético
1a	Miosina, polipeptido pesado 1.2, de músculo esquelético
2a	Miosina, polipeptido pesado 1.2, de músculo esquelético

7a	Vitelogenina 1
8a	Proteína similar a la vitelogenina
10a	Vitelogenina 1

Tabla VII. Proteínas que aparecen en la mutante *vps18^{hi2499aTg}* pero no en la silvestre. Las letras representan los puntos encontrados en los geles (figura 22)

A3	Vitelogenina 1
A4	Vitelogenina 1
A10	Vitelogenina 1
A15	Betaina- homocisteina S- metiltransferasa 1
A6	Actina α -1, de músculo esquelético

Tabla VIII. Proteínas que disminuyen en la mutante *vps18^{hi2499aTg}* con respecto al silvestre. La letra representa punto encontrado en el gel (Imagen no mostrada)

NA6	Tubulina β -2
-----	---------------------

Finalmente el análisis proteómico también reveló una disminución en la mutante *vps18^{hi2499aTg}* de la Tubulina β 2, la cual se le ha encontrado en células ganglionares de la retina de ratas, siendo sus niveles de expresión mayores en la retina de ratas recién nacidas que de adultos (86). Por lo anterior pensamos que es probable que la disminución de la expresión de esta proteína se puede deber a

un cambio en las células ganglionares de la retina. Por otra parte a pesar de que esta proteína comparte características de la proteína TBB5, la cual aumenta su expresión (Tabla VI), se han encontrado casos en los cuales la expresión de uno de los miembros de la familia de tubulinas β aumenta mientras que otro miembro disminuye (87).

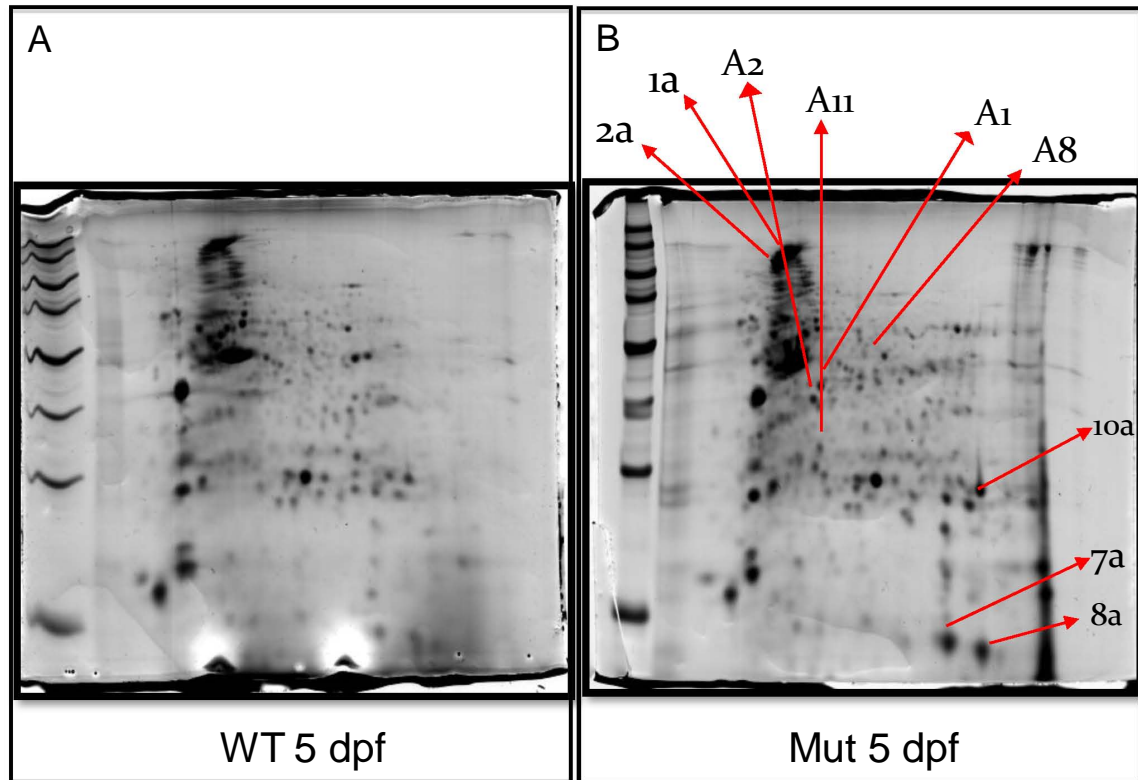


Figura 21. Proteómica de la mutante *vps18^{hi2499aTg}*. En **A** se aprecia el corrimiento electroforético de segunda dimensión (2D) de extractos de larvas WT y en **B** de larvas homocigas *vps18^{hi2499aTg}*, ambas de 5 dpf. En **B** se indican aquellas manchas que están presentes en ambos geles pero que aumentan en la muestra de larvas mutantes. La identidad de estas fue determinada posteriormente por espectrometría de masas, la mayor parte corresponde a proteínas de citoesqueleto.

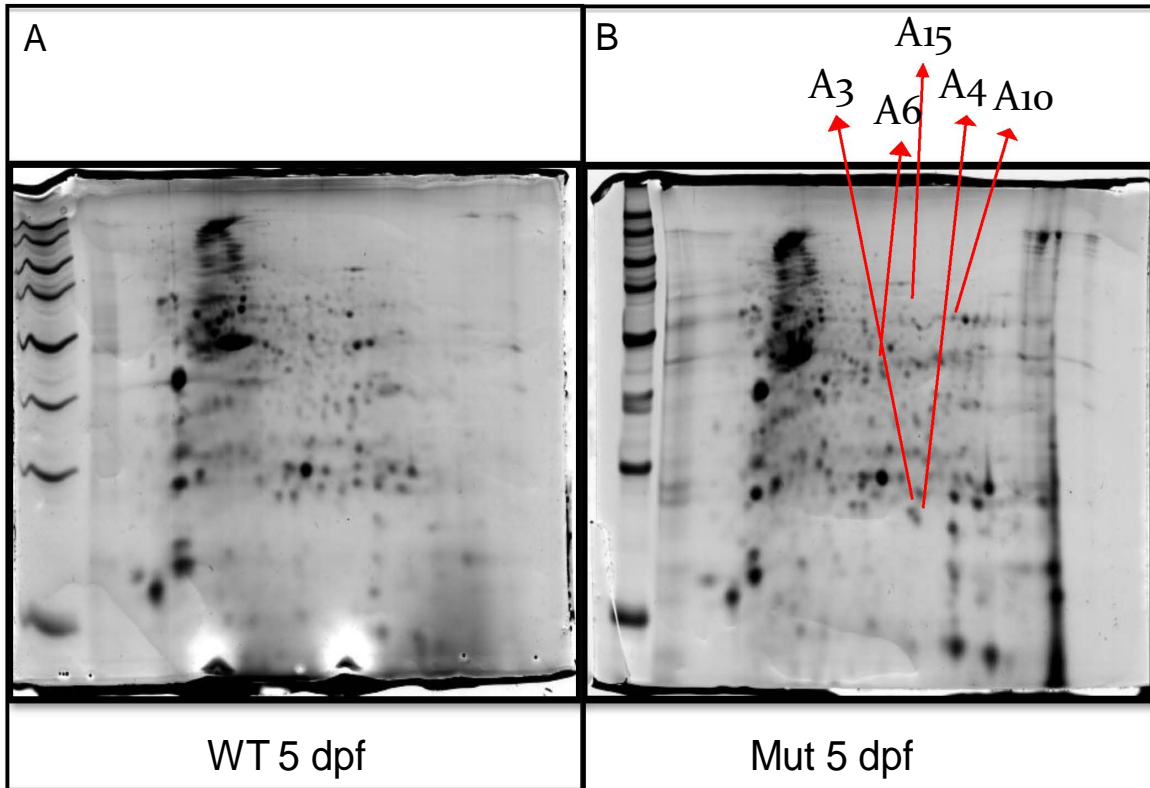


Figura 22. Proteómica de la mutante *vps18^{hi2499aTg}*. Cuando se compara la abundancia de proteínas entre muestras WT (A) y de larvas mutantes (B) ambas de 5 dpf, encontramos algunas manchas que corresponden a proteínas que no se encontraban en las larvas WT pero están presentes en las larvas homocigas *vps18^{hi2499aTg}*. Por espectrometría de masas logramos identificar a estas proteínas las cuales se describen en el texto.

Bibliografía

1. Muller B & Grossniklaus U (2010) Model organisms--A historical perspective. *Journal of proteomics* 73(11):2054-2063.
2. Beis D & Stainier DY (2006) In vivo cell biology: following the zebrafish trend. *Trends Cell Biol* 16(2):105-112.
3. Liu S & Leach SD (2011) Zebrafish models for cancer. *Annual review of pathology* 6:71-93.
4. Patton EE & Zon LI (2001) The art and design of genetic screens: zebrafish. *Nat Rev Genet* 2(12):956-966.
5. Streisinger G, Walker C, Dower N, Knauber D, & Singer F (1981) Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*). *Nature* 291(5813):293-296.
6. Haffter 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.
7. Lieschke GJ & Currie PD (2007) Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nat Rev Genet* 8(5):353-367.
8. Newman M, Verdile G, Martins RN, & Lardelli M (2011) Zebrafish as a tool in Alzheimer's disease research. *Biochim Biophys Acta* 1812(3):346-352.
9. Sullivan C & Kim CH (2008) Zebrafish as a model for infectious disease and immune function. *Fish & shellfish immunology* 25(4):341-350.
10. Parinov S & Emelyanov A (2007) Transposable elements in fish functional genomics: technical challenges and perspectives. *Genome biology* 8 Suppl 1:S6.
11. Bakkers J, Verhoeven MC, & Abdelilah-Seyfried S (2009) Shaping the zebrafish heart: from left-right axis specification to epithelial tissue morphogenesis. *Dev Biol* 330(2):213-220.
12. Tiso N, Moro E, & Argenton F (2009) Zebrafish pancreas development. *Molecular and cellular endocrinology* 312(1-2):24-30.
13. Mueller KP & Neuhauss SC (2010) Behavioral neurobiology: how larval fish orient towards the light. *Curr Biol* 20(4):R159-161.
14. Norton W & Bally-Cuif L (2010) Adult zebrafish as a model organism for behavioural genetics. *BMC neuroscience* 11:90.
15. Sukardi H, Ung CY, Gong Z, & Lam SH (2010) Incorporating zebrafish omics into chemical biology and toxicology. *Zebrafish* 7(1):41-52.

16. Crawford AD, Esguerra CV, & de Witte PA (2008) Fishing for drugs from nature: zebrafish as a technology platform for natural product discovery. *Planta medica* 74(6):624-632.
17. Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, & Schilling TF (1995) Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn* 203(3):253-310.
18. Howe K, *et al.* (2013) The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*.
19. Amsterdam A & Hopkins N (2004) Retroviral-mediated insertional mutagenesis in zebrafish. *Methods Cell Biol* 77:3-20.
20. Golling G, *et al.* (2002) Insertional mutagenesis in zebrafish rapidly identifies genes essential for early vertebrate development. *Nat Genet* 31(2):135-140.
21. Maldonado E, Hernandez F, Lozano C, Castro ME, & Navarro RE (2006) The zebrafish mutant *vps18* as a model for vesicle-traffic related hypopigmentation diseases. *Pigment Cell Res* 19(4):315-326.
22. Sadler KC, Amsterdam A, Soroka C, Boyer J, & Hopkins N (2005) A genetic screen in zebrafish identifies the mutants *vps18*, *nf2* and *foie gras* as models of liver disease. *Development*.
23. Chu J & Sadler KC (2009) New school in liver development: lessons from zebrafish. *Hepatology* 50(5):1656-1663.
24. Schoonheim PJ, Arrenberg AB, Del Bene F, & Baier H (2010) Optogenetic localization and genetic perturbation of saccade-generating neurons in zebrafish. *J Neurosci* 30(20):7111-7120.
25. Geissenhoner A, Sievers N, Brock M, & Fischer R (2001) *Aspergillus nidulans* DigA, a potential homolog of *Saccharomyces cerevisiae* Pep3 (*Vps18*), is required for nuclear migration, mitochondrial morphology and polarized growth. *Mol Genet Genomics* 266(4):672-685.
26. Kim BY, *et al.* (2001) Molecular characterization of mammalian homologues of class C Vps proteins that interact with syntaxin-7. *J Biol Chem* 276(31):29393-29402.
27. Narayanan R, Kramer H, & Ramaswami M (2000) *Drosophila* endosomal proteins hook and deep orange regulate synapse size but not synaptic vesicle recycling. *J Neurobiol* 45(2):105-119.
28. Rieder SE & Emr SD (1997) A novel RING finger protein complex essential for a late step in protein transport to the yeast vacuole. *Mol Biol Cell* 8(11):2307-2327.
29. Sriram V, Krishnan KS, & Mayor S (2003) deep-orange and carnation define distinct stages in late endosomal biogenesis in *Drosophila melanogaster*. *J Cell Biol* 161(3):593-607.

30. Nickerson DP, Brett CL, & Merz AJ (2009) Vps-C complexes: gatekeepers of endolysosomal traffic. *Curr Opin Cell Biol* 21(4):543-551.
31. Yogosawa S, *et al.* (2005) Ubiquitylation and degradation of serum-inducible kinase by hVPS18, a RING-H2 type ubiquitin ligase. *J Biol Chem* 280(50):41619-41627.
32. Ma S, Charron J, & Erikson RL (2003) Role of Plk2 (Snk) in mouse development and cell proliferation. *Mol Cell Biol* 23(19):6936-6943.
33. Simmons DL, Neel BG, Stevens R, Evett G, & Erikson RL (1992) Identification of an early-growth-response gene encoding a novel putative protein kinase. *Mol Cell Biol* 12(9):4164-4169.
34. Pak DT, Yang S, Rudolph-Correia S, Kim E, & Sheng M (2001) Regulation of dendritic spine morphology by SPAR, a PSD-95-associated RapGAP. *Neuron* 31(2):289-303.
35. Seeburg DP, Pak D, & Sheng M (2005) Polo-like kinases in the nervous system. *Oncogene* 24(2):292-298.
36. McLeod SJ, Shum AJ, Lee RL, Takei F, & Gold MR (2004) The Rap GTPases regulate integrin-mediated adhesion, cell spreading, actin polymerization, and Pyk2 tyrosine phosphorylation in B lymphocytes. *J Biol Chem* 279(13):12009-12019.
37. Pak DT & Sheng M (2003) Targeted protein degradation and synapse remodeling by an inducible protein kinase. *Science* 302(5649):1368-1373.
38. Ang XL, Seeburg DP, Sheng M, & Harper JW (2008) Regulation of postsynaptic RapGAP SPAR by Polo-like kinase 2 and the SCFbeta-TRCP ubiquitin ligase in hippocampal neurons. *J Biol Chem* 283(43):29424-29432.
39. Nimchinsky EA, Sabatini BL, & Svoboda K (2002) Structure and function of dendritic spines. *Annu Rev Physiol* 64:313-353.
40. Matus A (2000) Actin-based plasticity in dendritic spines. *Science* 290(5492):754-758.
41. Allison DW, Gelfand VI, Spector I, & Craig AM (1998) Role of actin in anchoring postsynaptic receptors in cultured hippocampal neurons: differential attachment of NMDA versus AMPA receptors. *J Neurosci* 18(7):2423-2436.
42. Mangrum WI, Dowling JE, & Cohen ED (2002) A morphological classification of ganglion cells in the zebrafish retina. *Vis Neurosci* 19(6):767-779.
43. Easter SS, Jr. & Nicola GN (1996) The development of vision in the zebrafish (*Danio rerio*). *Dev Biol* 180(2):646-663.
44. Easter SS, Jr. & Malicki JJ (2002) The zebrafish eye: developmental and genetic analysis. *Results and problems in cell differentiation* 40:346-370.

45. Schmitt EA & Dowling JE (1999) Early retinal development in the zebrafish, *Danio rerio*: light and electron microscopic analyses. *J Comp Neurol* 404(4):515-536.
46. Morris AC & Fadool JM (2005) Studying rod photoreceptor development in zebrafish. *Physiology & behavior* 86(3):306-313.
47. Lawrence C (2011) Advances in zebrafish husbandry and management. *Methods Cell Biol* 104:429-451.
48. Smith PK, *et al.* (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150(1):76-85.
49. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259):680-685.
50. Hutson LD, Campbell DS, & Chien CB (2004) Analyzing axon guidance in the zebrafish retinotectal system. *Methods Cell Biol* 76:13-35.
51. Navarro RE, Ramos-Balderas JL, Guerrero I, Pelcastre V, & Maldonado E (2008) Pigment dilution mutants from fish models with connection to lysosome-related organelles and vesicular traffic genes. *Zebrafish* 5(4):309-318.
52. Raible DW, *et al.* (1992) Segregation and early dispersal of neural crest cells in the embryonic zebrafish. *Dev Dyn* 195(1):29-42.
53. Ericson J, Thor S, Edlund T, Jessell TM, & Yamada T (1992) Early stages of motor neuron differentiation revealed by expression of homeobox gene *Islet-1*. *Science* 256(5063):1555-1560.
54. Bohnsack BL, *et al.* (2011) Development of extraocular muscles requires early signals from periocular neural crest and the developing eye. *Archives of ophthalmology* 129(8):1030-1041.
55. Karlstrom RO, *et al.* (1996) Zebrafish mutations affecting retinotectal axon pathfinding. *Development* 123:427-438.
56. Trowe T, *et al.* (1996) Mutations disrupting the ordering and topographic mapping of axons in the retinotectal projection of the zebrafish, *Danio rerio*. *Development* 123:439-450.
57. Neuhauss SC, *et al.* (1999) Genetic disorders of vision revealed by a behavioral screen of 400 essential loci in zebrafish. *J Neurosci* 19(19):8603-8615.
58. Muto A, *et al.* (2005) Forward Genetic Analysis of Visual Behavior in Zebrafish. *PLoS Genet* 1(5):e66.
59. Morland AB, Hoffmann MB, Neveu M, & Holder GE (2002) Abnormal visual projection in a human albino studied with functional magnetic resonance imaging and visual evoked potentials. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 72(4):523-526.

60. Raposo G & Marks MS (2007) Melanosomes--dark organelles enlighten endosomal membrane transport. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(10):786-797.
61. Wasmeier C, Hume AN, Bolasco G, & Seabra MC (2008) Melanosomes at a glance. *J Cell Sci* 121(Pt 24):3995-3999.
62. Strauss O (2005) The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiological reviews* 85(3):845-881.
63. Grant S, *et al.* (2001) Rod photopigment deficits in albinos are specific to mammals and arise during retinal development. *Vis Neurosci* 18(2):245-251.
64. Jeffery G & Williams A (1994) Is abnormal retinal development in albinism only a mammalian problem? Normality of a hypopigmented avian retina. *Experimental brain research. Experimentelle Hirnforschung. Experimentation cerebrale* 100(1):47-57.
65. Donatien P & Jeffery G (2002) Correlation between rod photoreceptor numbers and levels of ocular pigmentation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43(4):1198-1203.
66. Tombran-Tink J & Barnstable CJ (2008) *Visual transduction and non-visual light perception* (Humana, Totowa, N.J.).
67. Schonthaler HB, *et al.* (2008) The zebrafish mutant *lbk/vam6* resembles human multisystemic disorders caused by aberrant trafficking of endosomal vesicles. *Development* 135(2):387-399.
68. Biehlmaier O, Neuhauss SC, & Kohler K (2001) Onset and time course of apoptosis in the developing zebrafish retina. *Cell and tissue research* 306(2):199-207.
69. Mumm JS, *et al.* (2006) In vivo imaging reveals dendritic targeting of laminated afferents by zebrafish retinal ganglion cells. *Neuron* 52(4):609-621.
70. Radivojac P, *et al.* (2010) Identification, analysis, and prediction of protein ubiquitination sites. *Proteins* 78(2):365-380.
71. Xiao H, *et al.* (2009) Lysosome biogenesis mediated by *vps-18* affects apoptotic cell degradation in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Biol Cell* 20(1):21-32.
72. Klooster J, Yazulla S, & Kamermans M (2009) Ultrastructural analysis of the glutamatergic system in the outer plexiform layer of zebrafish retina. *Journal of chemical neuroanatomy* 37(4):254-265.
73. Lazier CB, Langley S, Ramsey NB, & Wright JM (1996) Androgen inhibition of vitellogenin gene expression in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *General and comparative endocrinology* 104(3):321-329.
74. Berg JS, Powell BC, & Cheney RE (2001) A millennial myosin census. *Mol Biol Cell* 12(4):780-794.

75. Peterson MR & Emr SD (2001) The class C Vps complex functions at multiple stages of the vacuolar transport pathway. *Traffic* 2(7):476-486.
76. Lewis SA, Lee MG, & Cowan NJ (1985) Five mouse tubulin isotypes and their regulated expression during development. *J Cell Biol* 101(3):852-861.
77. Mitchison T & Kirschner M (1988) Cytoskeletal dynamics and nerve growth. *Neuron* 1(9):761-772.
78. Castro-Dias E, *et al.* (2010) Proteome analysis of lumbar spinal cord from rats submitted to peripheral lesion during neonatal period. *Journal of neural transmission* 117(6):689-693.
79. Veldman MB, Bembien MA, Thompson RC, & Goldman D (2007) Gene expression analysis of zebrafish retinal ganglion cells during optic nerve regeneration identifies KLF6a and KLF7a as important regulators of axon regeneration. *Dev Biol* 312(2):596-612.
80. Jaworski J, *et al.* (2009) Dynamic microtubules regulate dendritic spine morphology and synaptic plasticity. *Neuron* 61(1):85-100.
81. Nowak KJ, *et al.* (2009) Rescue of skeletal muscle alpha-actin-null mice by cardiac (fetal) alpha-actin. *J Cell Biol* 185(5):903-915.
82. Feng JJ & Marston S (2009) Genotype-phenotype correlations in ACTA1 mutations that cause congenital myopathies. *Neuromuscular disorders : NMD* 19(1):6-16.
83. Sparrow JC, *et al.* (2003) Muscle disease caused by mutations in the skeletal muscle alpha-actin gene (ACTA1). *Neuromuscular disorders : NMD* 13(7-8):519-531.
84. Pajares MA & Perez-Sala D (2006) Betaine homocysteine S-methyltransferase: just a regulator of homocysteine metabolism? *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 63(23):2792-2803.
85. McKeever MP, Weir DG, Molloy A, & Scott JM (1991) Betaine-homocysteine methyltransferase: organ distribution in man, pig and rat and subcellular distribution in the rat. *Clinical science* 81(4):551-556.
86. Hoffman PN, Pollock SC, & Striph GG (1993) Altered gene expression after optic nerve transection: reduced neurofilament expression as a general response to axonal injury. *Experimental neurology* 119(1):32-36.
87. Huang QY, Huang L, & Huang HQ (2011) Proteomic analysis of methyl parathion-responsive proteins in zebrafish (*Danio rerio*) brain. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP* 153(1):67-74.