



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas
Instituto de Biotecnología

**Determinación de la expresión del gen *zimp10* en el
embrión del pez cebra y generación de una línea
mutante nula.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Q.F.B Francisco Javier Castillo Castellanos

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Hilda María Lomelí Buyoli

Instituto de Biotecnología UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Ernesto Maldonado Olvera

Instituto de fisiología celular UNAM

Dra. Martha Verónica Vázquez Laslop

Instituto de Biotecnología UNAM

Cuernavaca, Mor. Septiembre, 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

El presente trabajo se realizó en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la dirección de la Dra. Hilda María Lomelí Buyoli.

Durante la realización de éste proyecto se recibió una beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

Se agradece a Conacyt proyecto #128353 y a DGAPA/UNAM proyecto PAPIIT IN204712 por los fondos aportados para la realización de este proyecto

Gracias a la Dra. Martha Verónica Vázquez Laslop por conformar parte del comité tutorial que asesoró el desarrollo de la presente tesis.

Gracias a nuestra compañera y técnica del laboratorio la M.C. Laura Socorro Ramírez Ángeles por su asistencia durante varios puntos de este proyecto, en especial para realizar los cortes de los embriones.

Gracias a Dulce Pacheco por encargarse del cuidado de los peces, al igual en ayudarnos para crecer los alevines.

Finalmente quiero agradecer al Dr. Luis Covarrubias Robles, Dr. Leandro David Hernández García, Dra. Verónica Narváez Padilla, Dr. Mario Enrique Zurita Ortega y Dr. Takuya Nishigaky Shimizu, los cuales fungieron como miembros de mi jurado de examen, por las aportaciones hechas a éste manuscrito.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Dra. Hilda María Lomelí Buyoli por haberme dado la oportunidad de trabajar en su laboratorio y sacar un proyecto de investigación adelante.

A la Dra. Martha Verónica Vázquez Laslop por los comentarios y observaciones certeras que ayudo a salir adelante a este proyecto.

Al Dr. Ernesto Maldonado por haberme permitido hacer una estancia en su laboratorio para aprender a fenotipicar a los peces.

A mis padres Francisco y Yanina, que si no hubiera sido por sus enseñanzas, hoy no seria ni la mitad de la persona que soy hoy, y también les agradezco que siempre me apoyaron en mis decisiones.

A mis hermanos Jorge y José Miguel les agradezco esos momentos de convivencia y discusiones que nos enriquecen la vida, el apoyo incondicional y la ayuda mutua.

A mi abuela Irma y a mi tía Claudia, que siempre estuvieron cerca para apoyarnos en lo que fuera necesario. Las quiero mucho.

A Roberto, Jorge, Héctor, Jerónimo, Laura, Marieli y demás miembros que han pasado por el laboratorio, les agradezco la compañía, el apoyo y los comentarios que nos hemos hecho para mejorar el diseño de los experimentos y dar puntos de vista que ayudaron a salir de los baches que tanto frustran.

A mis senseis Víctor Ángel y Marco Antonio, que me enseñaron que en la vida te vas a caer seguidamente, pero siempre hay que levantarse e intentar de nuevo, que eso diferencia al que logra las cosas del que se queda a la mitad del camino.

A Edson, Israel, Armando, Rodrigo y Ramses, por todos esos momentos compartidos de desastres en las fiestas y noches de catan. Sin ustedes esto hubiera sido bastante más monótono.

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	2
a. La proteína Zimp10.....	2
b. Generalidades de las proteínas de la familia PIAS.....	5
c. El pez cebra como modelo de estudio del desarrollo embrionario.....	7
d. Desarrollo embrionario del pez cebra.....	9
e. Genética reversa en el pez cebra.....	12
3. ANTECEDENTES.....	16
4. JUSTIFICACIÓN.....	19
5. HIPÓTESIS.....	19
6. OBJETIVOS.....	19
a. Objetivo general.....	19
b. Objetivos específicos.....	19
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
a. Determinación del momento de expresión.....	20
b. Hibridación <i>in situ</i> (HIS) para <i>zimp10a</i>	20
c. Cortes de embriones.....	22
d. Disección de los primordios de las aletas pectorales.....	22
e. Edición del genoma mediante el sistema CRISPR-Cas.....	22
f. Detección de mutación en DNA genómico.....	23
g. Cruzas y cuidado de los peces.....	24
8. RESULTADOS.....	26
a. Análisis de la secuencia de <i>zimp10</i> en pez cebra.....	26
b. Comparación mediante <i>Blast</i> de proteína entre Zimp10a y Zimp10b de pez cebra contra ZIMP10 humano.....	26
c. Análisis de sintenia usando como referencia ZIMP10 humano.....	27
d. Determinación del patrón de expresión espacio-temporal de <i>zimp10</i>	27
i. Diseño de oligonucleótidos para amplificar <i>zimp10a</i> y <i>zimp10b</i>	27
ii. Determinar el momento de expresión de <i>zimp10a</i> y <i>zimp10b</i>	28
iii. Diseño de una sonda para hibridación <i>in situ</i>	31

iv.	Determinación del patrón de expresión de <i>zimp10a</i> durante el desarrollo embrionario del pez cebra mediante HIS.....	31
e.	Generación de mutaciones en <i>zimp10</i>	42
i.	Diseño del RNA guía para <i>zimp10a</i>	42
ii.	Control de mutación con <i>tyr</i>	44
iii.	Mutación de <i>zimp10a</i>	45
iv.	Generación de la F0 mutante.....	47
9.	Discusión	52
a.	Organización genómica de <i>zimp10</i> en el pez cebra.....	52
b.	Expresión de <i>zimp10</i> en el pez cebra.....	53
c.	Expresión de <i>zimp10a</i> en las aletas pectorales.....	54
d.	Especulaciones sobre la función de <i>zimp10a</i>	55
e.	Generación de la línea knockout de <i>zimp10a</i>	56
10.	Conclusiones	58
11.	Anexo	59
12.	Referencias	60

RESUMEN

ZIMP10 es una proteína que contiene un dedo de zinc llamado SP-RING que se encuentra conservado en las proteínas de la familia PIAS. Las proteínas PIAS participan en un proceso de modificación postraduccional que se conoce como sumoilación, que consiste en la adición covalente de un pequeño péptido llamado SUMO a proteínas específicas. La actividad de las PIAS las define en términos generales como co-reguladoras de la actividad transcripcional. Por otra parte, se sabe que Zimp10 interacciona con p53 y Smad3 y estimula la transcripción mediada por éstos. Además podría participar en la remodelación de la cromatina o regular directamente la expresión genética, según lo indican otras evidencias de interacción bioquímica, así como el análisis de su secuencia.

Previamente se reportó una extensa y dinámica expresión de *Zimp10* en embriones de ratón, y se demostró que la pérdida de función de este gen causa letalidad embrionaria debido a defectos vasculares. Este trabajo tuvo tres objetivos principales:

- Identificar el o los genes homólogos a *Zimp10* de humano en el genoma del pez cebra
- Determinar el patrón de expresión de *zimp10a* en embriones de pez cebra durante el desarrollo

-Generar mutaciones específicas en el genoma de pez cebra para establecer una línea mutante.

Mediante una serie de hibridaciones *in situ* encontramos que de manera similar a lo reportado en el ratón, *zimp10a* se observa a partir de la gastrulación, principalmente en el tejido neural, circulatorio y en los primordios de las aletas pectorales. Un aspecto que analizamos con mayor detalle fue la localización de *zimp10a* en los primordios de las aletas pectorales durante la determinación del patrón antero-posterior. A diferencia de lo reportado en ratón, *zimp10a* no se expresa en gradiente a lo largo del eje anterior-posterior, sin embargo también muestra una distribución interesante, ya que se expresa principalmente en la parte proximal de la aleta pectoral. Por último, usando el sistema CRISPR-Cas9, generamos mutaciones específicas en el gen *zimp10a*, con las que nos será posible establecer una línea mutante nula que en el futuro, permitirá realizar estudios de pérdida de función y rescate.

Introducción

La proteína ZIMP10

La proteína ZIMP10, también conocida como ZMIZ1, fue originalmente identificada en células humanas y se describió como un co-regulador del receptor de andrógenos. Estructuralmente se caracteriza por la presencia de dos dominios ricos en prolinas, una secuencia de localización nuclear NLS (del inglés “Nuclear Localization Signal”) y un dominio dedo de zinc conocido como SP-RING/MIZ (del inglés “Siz/PIAS RING” y “Msx Interacting Zinc finger”) (Figura 1) (1).

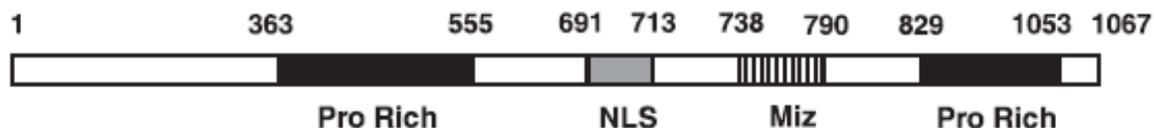


Figura 1.- Dominios caracterizados de la proteína ZIMP10 humana. Se muestran los dos dominios ricos en prolina en 363-555 y 829-1053 respectivamente, la secuencia de localización nuclear en 691-713 y el dedo de zinc SP-RING en 738-790 (imagen tomada y editada de (2)).

El dominio SP-RING fue originalmente identificado en las proteínas de la familia de las PIAS (del inglés “Protein Inhibitor of Activated Stat”). Este dominio muestra similitud con el dominio RING, el cual define a la subfamilia más grande de ligasas de ubiquitina. El dominio SP-RING fue considerado como un dominio diferente debido a que carecía de dos cisteínas altamente conservadas en el dominio RING (3). Al dominio SP-RING se le ha asociado con actividad de ligasa en una reacción post-traducciona conocida como SUMOilación (ver más adelante) (4).

El gen *ZIMP10* se encuentra conservado en diversas especies. Al compararlo a nivel proteínico con las proteínas homólogas de otras especies, *ZIMP10* presenta homología en una región más extensa que el SP-RING. Dicha región se conoce como XSPRING (Extended SP-RING), la cual fue originalmente descrita en TnaA de *Drosophila*, la cual es una proteína con un dominio XSPRING producida por el gen *tonalli* (*tna*) que interacciona genéticamente con *brahma* (*brm*), el gen que codifica para la subunidad de ATPasa del complejo remodelador de cromatina Brahma TnaA que se cree (5). En función de este dominio se identificó otra proteína homóloga a *ZIMP10* en vertebrados conocida como *ZIMP7*. Por estas razones, se cree que TnaA sea el ortólogo de *ZIMP10* y *ZIMP7* (Figura 2) (5). *ZIMP10* ha sido identificado como una proteína que interacciona físicamente con proteínas implicadas en diferentes rutas de transducción de señales. Entre ellas se encuentra el receptor de andrógenos. Esta interacción involucra al XSPRING (556-790) para la interacción física y al extremo carboxilo-terminal de *ZIMP10* para aumentar la actividad mediada por el receptor de andrógeno. *ZIMP10* colocaliza con SUMO-1 y el receptor de andrógenos en *foci* específicos en el núcleo. Esto ocurre en el núcleo de células prostáticas durante la fase S (síntesis de DNA) del ciclo celular, por lo que se presume que juega un papel en la síntesis de DNA durante la replicación (7). También se ha reportado que *ZIMP10* participa en la vía de TGF- β /Smad. En este caso se demostró que *ZIMP10* interacciona físicamente con Smad3 y Smad4 mediante la región que involucra parte del dominio XSPRING (556-790), aumentando la actividad transcripcional de las Smad de manera directamente proporcional a la concentración de *ZIMP10* (8). De manera similar se ha reportado a *ZIMP10* ejerciendo regulación de la actividad transcripcional mediada por P53. Al respecto se ha demostrado la formación de un complejo entre *ZIMP10* y p53. Esta interacción física también involucra al XSPRING (451-753) de *ZIMP10* y tiene como consecuencia un aumento de la actividad transcripcional mediada por p53 (9).

```

495
Tonalli SHQGFYFGSGQSAGMQQAGGMCAPAGVATTGNPYQNGGFQONYPQHSVPVGNPTPLTPACSV-PY 518
KIAA1224 APNPPRPLTSPNYPGQRMPSPSSGQYPPPTVNMGQYYKPEQFNGQNTTSSGSSYSNYSQGNVNRPPRPVVPVANYPHSPVPGNPTPPMTPTGSSIPPY
KIAA1886 SV-PY 595

566
Tonalli SP PD KP E RLTFPVRDG L PFRL HNL VSNHVF L V TL R DLELQ KC H DRQMNTNW
KIAA1224 VSPN-----PDIKPPMDNSE-----EMRLTFPVRDGIILAPFRLHNLVSNHVFHLKQNVYNTLMCRNDLELQKCFHQDDRQMNTNW
KIAA1886 LSPSQDVKPPFPDIKPNMSALPPPPANHND--ELRLTFPVRDGVVLEPFRLHNLAVSNHVFHLRPTVHQTLMWRSDLELQFKCYHHEDRQMNTNW
KIAA1886 MSPNQEVKSPFLPDLKPNLNSLHSSPSGSGPCDELRLTFPVRDGVVLEPFRLQHNLA VSNHVFQLRDSVYKTLIMRPDLELQFKCYHHEDRQMNTNW

P V VS NATPL IER N T L LK VCQGRNT Q T CCCSHLFLVLQVHRPSVR VLQ L K LLP EH KIKRN S 692
Tonalli PHTVTVSANATPLNIERSEKNSTALRPLYLKAVCQGRNTLQITASSCCCSHLFLVLQVHRPSVRVLQTLHKNLLPLEHSVOKIKRNLSPQPEANA
KIAA1224 PASVQVSVNATPLTIERG-DNKTSHKPLHLKHVCQGRNTIQITVTACCCSHLFLVLQVHRPSVRSVLQGLLKKRLLPAEHCITIKRNFSSVAASA
KIAA1886 PASVQVSVNATPLTIERG-DNKTSHKPLYLKHVCQGRNTIQITVTACCCSHLFLVLQVHRPSVRSVLQGLLKKRLLPAEHCITIKRNFSSVAASA

*****
Q K SLKCPIT RI LPARGH C H QCFDLE YLM N ERG WRCP C K A LE DQY IL S E 789
Tonalli GPDATPQQQQQGGGQCAKISLKCPITKSRIRLPARGHECKHVQCFDLEAYLMINSERGSWRCPECSKSAITDLEIDQYIWAAILNTLGNSDVDEV
KIAA1224 G---NTTLNGEDGVEQTAKVSLKCPITFRRIQLPARGHDCRHIQCFDLESYLQNCERGTWRCFVCKNTALLEGLEVDQYMWILNAIQHSEFEV
KIAA1886 IP-GTPGPNGEDGVEQTAKVSLKCPITFRRIQLPARGHDCRHIQCFDLESYLQNCERGTWRCFVCKNTALLEGLEVDQYMLGILIYIQNSDYEEI

ID W P D G884
Tonalli IIDSSANWRALQHNGGMPNAPPPSNVPSNPSGGSGNSGNSGVNPTLPVIKQELCDDI-AKVMSPGSTQLPTWDSQAQAMSPYNNHDMNSIASGNMM
KIAA1224 TIDPTCSWRPVPIKSDLHIKDDPDGIPSKRFKTMSPSQMIMPVNMEMIAALGPGPSY-PLPPPPGGT-----NSNDYSS--QGNNY
KIAA1886 TIDPTCSWKPVVVKPDMHIKEEPPGALKRCRTVSPAHVLMPSVMEMIAALGPGAAPFAPLQPPSVP-----APSDYPG--QGSSS

G G G EK M H 972
Tonalli -GNGGNTNQHGNRSSYDGFSGNHS DGGGLPGDGGVNSLDQLNAMEKSLSDQ----MPHTPHTPGAASHPMT--GGPPSVSSSHMEPISGGTP
KIAA1224 QGHGNFDFFHGNPGGTSMNDFMH--GPPQLSHPPDMPNMAA---LEKPLSH-PMQETMPHAGSSDQP--HPSIQQGLHVHPSSQSGPPLHHSGA
KIAA1886 LGPGTFPESFPPTTPTPLAEFTPGPPPISYQSDIPSSLLT---SEKSTACLPQ--MAPAGHLDEPT--HNPQGLHSTNLGAPPQGLHHSNP

PS G L 1066
Tonalli NANGSGSATNGSGNNS-SSTGHNSPQTPGT-PSRMGGMGSGSADSQQQQQQLNLSLMSQTQLKPFSESDLSAELQSFDAAAAINDTAHDLNL
KIAA1224 PPPPPSQPPRQPPQAAPSSPHSDLTFN---PSSALEGQAGAQQASDMPEPSI-----NL
KIAA1886 PPAS-RQSLGQASLGPTGELAFSPATGVMPGPPSMSGAGEA-----PEPAL-----DL

L P E LSYL P PDL P N DDLL 1109
Tonalli LQDVD-PMEILSYLDPQPDNLNTPSSGSSNNNASDDLLATLFD
KIAA1224 LPELTNPDELLSYLDP-PDL---PS-----NSNDLLSLFENN
KIAA1886 LPELTNPDELLSYLGP-PDL---PT-----NNDDLLSLFENN

```

Figura 2.- Comparación de la secuencia del dominio XSPRING de tonalli. Se muestra la alineación del dominio XSPRING con KIAA1224 (ZIMP10) y KIAA1886 (ZIMP7). En asteriscos se marca el dominio SP-RING. En tonalli se subraya la secuencia de localización nuclear. Se logra apreciar una conservación de los dominios (Imagen editada y tomada de 5).

Generalidades de las proteínas de la familia PIAS:

Como se mencionó previamente, la presencia del dominio SP-RING en las proteínas ZIMP7 y ZIMP10 sugiere una asociación funcional con las proteínas de la familia PIAS. Las proteínas de la familia PIAS fueron originalmente identificadas como reguladores negativos de la vía JAK-STAT, sin embargo, actualmente se sabe que tienen funciones en diversos procesos celulares y moleculares. Por ejemplo: la regulación negativa donde PIASy inhibe la capacidad de p53 de activar a p21 y BAX; la regulación positiva en el caso de los receptores de andrógenos; el control de la localización subcelular de LEF1 que es un miembro importante vía debajo de Wnt, entre otras (10).

Las PIAS intervienen en un proceso postraduccional conocido como SUMOilación, el cual consiste en la adición covalente de un péptido llamado SUMO (por sus siglas en inglés de “Small Ubiquitin-like Modifier”) a proteínas. Las consecuencias de la SUMOilación son diversas: por ejemplo, una proteína sumoilada puede adquirir la capacidad de interactuar con proteínas nuevas, o bien, la SUMOilación de una proteína puede impedirle la interacción normal con otro factor proteico. En el particular caso de la enzima Timina DNA glicosilasa, que tiene una muy alta afinidad por el DNA con el apareamiento erróneo G-T, la SUMOilación causa un cambio conformacional de la enzima, que permite que se libere del DNA. Las PIAS actúan como E3-ligasas de SUMO facilitando la unión de SUMO al sustrato, para lo cual requieren del dominio SP-RING (Figura 3) (11).

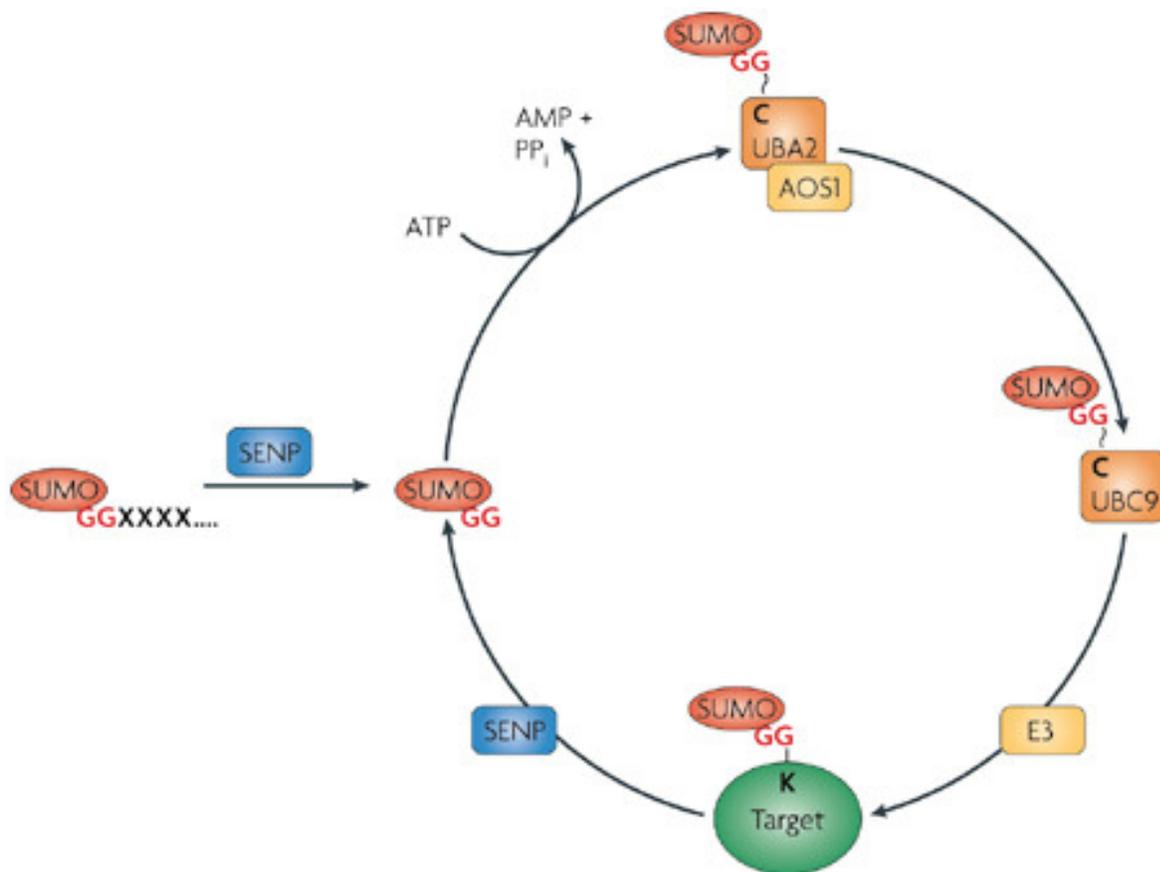


Figura 3. La SUMOilación comienza con la maduración de SUMO mediante un corte del C-terminal, que deja expuesto una terminación glicina-glicina (G-G). Una vez maduro, SUMO es activado por la E1-ligasa AOS1-UBA2, formando de manera dependiente de ATP, un enlace tioéster entre la glicina C-terminal de SUMO y UBA2. En seguida, SUMO es transferido a la E2-ligasa UBC9. Finalmente SUMO es transferido a la lisina del sustrato. Normalmente en este último paso, una E3-ligasa de SUMO ayuda a que se de la transferencia entre la E2-ligasa y el sustrato. Normalmente la SUMOilación es una alteración transitoria, donde el péptido SUMO es removido del sustrato por acción de una proteasa (imagen tomada de 11).

Si bien las PIAS, comparten con las proteínas ZIMP7 y ZIMP10 el dominio SP-RING, tienen otros dominios estructurales que están ausentes en las proteínas ZIMP. Por ejemplo, el dominio SAP (del inglés “Scaffold Attachement Factor”) que se encuentra en proteínas que interactúan con la cromatina; el dominio PINIT (que posiblemente esté involucrado con la

localización subcelular); o en algunos casos, un dominio rico en serina/treonina (Figura 4). Debido a estas diferencias se considera que las proteínas ZIMP no son estrictamente parte de la familia PIAS (12).



Figura4.- Características estructurales de las PIAS. Estructura de la PIA ARIP3, una proteína de la familia de las PIAS, mostrada como de ejemplo para señalar la distribución de los dominios conservados característicos de esta familia (imagen tomada y editada de 12).

El pez cebra como modelo de estudio del desarrollo embrionario

El pez cebra (*Danio rerio*) fue propuesto como modelo de estudio del desarrollo de vertebrados originalmente en 1984 por Streisinger en un trabajo donde demuestra la mínima variabilidad genética, además de proponer distintas técnicas para inducir mosaicos somáticos (13). En 1989, después del fallecimiento de Streisinger, el grupo de Kimmel presentó un estudio comparativo de los mecanismos del desarrollo embrionario del pez cebra con otros modelos del desarrollo de vertebrados, como *Xenopus*, el pollo y el ratón (14).



Figura 5.- Pez cebra. Se pueden apreciar sus características bandas horizontales. En el extremo superior izquierdo se aprecia el macho y en el extremo inferior derecho la hembra (15)

Entre las ventajas que presenta el uso del pez cebra en el laboratorio se encuentra que son de mantenimiento fácil, los peces son pequeños lo que permite su crianza en espacios reducidos, su desarrollo es relativamente rápido (a las 12 horas es posible observar el plan de desarrollo del organismo) y quizás, la más importante, que los embriones son translúcidos y se desarrollan fuera de la madre, lo que permite seguir el desarrollo sin detenerlo (14, 16). En 1996 se publicó una edición especial de la revista *Development*, donde muestran el trabajo colectivo del grupo de Nusslein-Volhard y Driever, donde generan y clasifican por fenotipo cientos de mutantes de pez cebra, como mutantes con defectos en la epibolia y mutantes que afectan el eje dorso-ventral, dando un paso decisivo para la validación del uso de este organismo como modelo de estudio del desarrollo embrionario de vertebrados (17).

Desarrollo embrionario del pez cebra

El desarrollo del pez cebra se puede clasificar en los siguientes períodos (Figura 6) (18):

- Período de cigoto: abarca desde la fertilización del embrión, hasta la formación de la primera célula (45 minutos). Se caracteriza por la formación de la primera célula y por la presencia de corrientes citoplasmáticas que van desde el punto del vitelo más alejado de la célula (polo vegetal) en dirección hacia el sitio donde se forma dicha célula (polo animal).
- Período de división o *cleavage*: este período abarca desde la primera hasta la sexta división o 64 células (2.25 horas). Se caracteriza por que todas las células del embrión se dividen de manera sincrónica cada 15 minutos, de tal forma que es posible determinar el número de células en un momento dado. Los estadios que componen a este período se basan en el número de células que contiene el embrión en dicho momento y son: 2-células (45 minutos post fertilización (mpf)), 4-células (1 hora post fertilización (hpf)), 8-células (1.25hpf), 16-células (1.5hpf), 32-células (1.75hpf) y 64-células (2hpf).
- Período de la blástula: abarca desde que comienza la asimetría en las divisiones (2.25 horas) hasta que inicia la gastrulación (5 horas). Durante esta etapa, suceden dos eventos de importancia: el primero es la transición de la blástula media (MBT por sus siglas en inglés Mid Blastula Transition), que sucede en la etapa de 512 células y es cuando comienza la transcripción cigótica. El segundo evento de importancia, llamado epibolia, consiste en una serie de movimientos donde las células comienzan a extenderse sobre el vitelo. Las etapas que comprenden este período son: 128-células (2.25hpf), 256-células (2.5hpf), 512-células (2.75hpf), 1k-células (3hpf), high (3.3hpf), oblongo (3.6hpf), esfera (4hpf), domo (4.3hpf) y 30% de epibolia (4.6hpf).
- Período de la gástrula: abarca desde el inicio de la gastrulación (5.25 hpf), hasta que culmina la epibolia (10 hpf). En esta etapa suceden una serie de movimientos celulares que dan origen a las tres capas germinales: el ectodermo, el mesodermo y el endodermo. También se define la orientación del embrión. Las etapas que comprenden

este período son: 50% de epibolia (5.25hpf), escudo (6hpf), 75% de epibolia (8hpf), 90% de epibolia (9hpf) y Bud (10hpf).

- Período de segmentación: abarca desde el inicio (10.3 hpf), hasta el final de la somitogénesis (22 hpf). En este período se van dando tres procesos de importancia. Ocurre la somitogénesis, la neurogénesis y la vascularización primaria, donde se forma la aorta dorsal y la vena posterior cardinal. Las etapas que comprenden este período reciben el nombre con base al número de somitas que contiene el embrión. Las somitas son estructuras segmentadas con forma de “cabeza de flecha” localizadas a lo largo del embrión que dan origen a las vértebras, entre otras partes. Algunas de las etapas son: 1-somita (10.3hpf), 5-somitas (11.6hpf), 14-somitas (16hpf), 20-somitas (19hpf) y 26-somitas (22hpf).
- Período de la faríngrula: inicia aproximadamente a las 24 hpf. Los cuatro eventos más importantes de este período son: la formación de las aletas, la formación de los melanocitos, el inicio del funcionamiento del sistema circulatorio y por último, los movimientos espasmódicos del embrión que se vuelven más sincronizados en un movimiento de “nado”. Las etapas que comprende este período reciben su nombre de acuerdo a la localización del primordio lateral con respecto a los miotomos (parte de las somitas en donde se encuentran los precursores del músculo esquelético). Algunas de las etapas son: prim-5 (24hpf), prim-15 (30hpf), prim-25 (36hpf) y High-pec (42hpf).
- Período de eclosión: este período abarca el último día de lo que se considera como embrión (48 hpf a 72 hpf). A pesar de ser el momento donde sucede la mayoría de las eclosiones, no es posible utilizar el evento de eclosión como una característica de la etapa, debido a que varios embriones del mismo grupo y bajo las mismas condiciones, pueden eclosionar en diferentes momentos. El cambio más notable es el desarrollo de la mandíbula. Aparte, se forman los arcos branquiales, las agallas y el cartílago de soporte. Las etapas de este período son: Long-pec (48hpf), Pec-aleta (60hpf) y boca sobresaliente (72hpf).

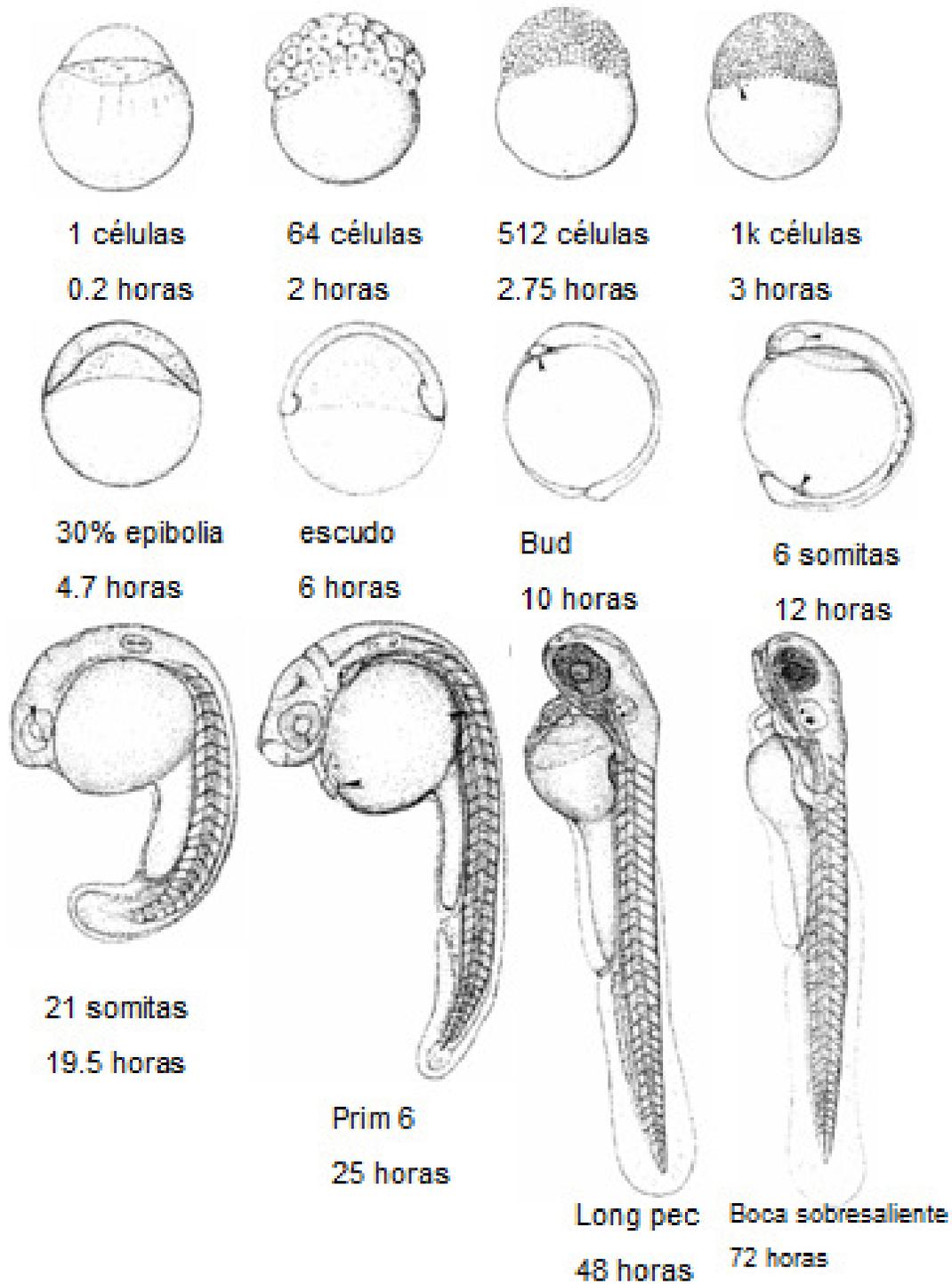


Figura 6.- Diferentes etapas del desarrollo del pez cebra acorde a Charles Kimmel. Los tiempos para cada etapa, corresponden a condiciones de incubación óptimas (28.5C con 5-10 embriones/ml) (imagen tomada de 18).

Genética reversa en el pez cebra.

Para el estudio de la función de un gen es necesario lograr la pérdida de su expresión. Para esto existen varias herramientas que pueden generar la pérdida temporal como son los morfolidos o el RNA de interferencia cuya función es localizar el RNA blanco y evitar su traducción o alterar el proceso de *splicing*. Aparte se puede lograr la pérdida de función de manera estable y definida mediante técnicas de edición del genoma como son la recombinación homóloga o el uso de endonucleasas dirigidas, donde se logra deletar parte del gen de interés, permitiendo tener organismos completamente libres del gen. La posibilidad de lograr la edición del genoma directamente en el embrión presenta múltiples ventajas muy evidentes, tanto en especies donde se ha logrado hacer *knock-outs* como en el caso de mamíferos como el ratón, así como en otros vertebrados, en donde no existen líneas celulares pluripotentes y por ello, no había sido posible hacer mutaciones dirigidas (19).

De manera general la idea que se ha explotado hasta el momento es el uso de endonucleasas que hacen cortes en secuencias específicas. Esto se ha logrado mediante el uso de nucleasas dirigidas que se basan en el acoplamiento de una endonucleasa con moléculas capaces de identificar a una secuencia blanco en la cual se producen cortes. El sistema de reparación no homóloga (NHEJ del inglés “Non-Homologous End Joinning”) al intentar reparar los cortes es deficiente y tiende a introducir mutaciones como inserciones o deleciones en el sitio de interés. Entre estas técnicas, se encuentra el uso de los ZFN (del inglés “Zinc Finger Nuclease”), los cuales consisten en construcciones sintéticas que incluyen varios dedos de zinc en tándem, donde cada dedo de zinc reconoce de manera específica tres pares de bases y la nucleasa FokI, que se une de manera selectiva a una secuencia blanco de 9-18pb y la corta. Como segunda generación surgieron los TALENs (del inglés “Transcriptor Activator Like Effector Nuclease”), los cuales son una construcción compuesta de una serie de repeticiones unidas a una endonucleasa. Cada repetición consiste de 33-35 aminoácidos y puede reconocer de manera selectiva a un nucleótido específico, permitiendo que la endonucleasa ataque de manera específica una secuencia blanco. Los TALENs permiten una mayor especificidad que los ZFN, pero requieren un mayor esfuerzo técnico en su construcción. A principios del 2013

surgió una nueva técnica, el sistema CRISPR (del inglés “Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats”) Cas (del inglés “Crispr Asociated”) basada en guiar una endonucleasa mediante un RNA guía (19).

El sistema CRISPR-Cas es usado por bacterias de manera natural como defensa adaptativa contra DNA exógeno de virus y plásmidos. El sistema consiste en que la secuencia invasora se integra al genoma bacteriano en regiones específicas denominadas “espaciadores” (Figura 7 fase 1). Posteriormente estas secuencias se transcriben y producen un RNA precursor pre-crRNA (CRISPR RNA) y posteriormente al ser cortado, se convierte en un RNA maduro crRNA. El crRNA actúa en conjunto con otro RNA llamado RNA transactivador (tracrRNA) para reclutar una nucleasa llamada Cas. El conjunto procede a localizar la secuencia blanco invasora y por acción de la Cas, la destruye. La presencia de una secuencia llamada PAM que se caracteriza por ser una secuencia específica de tres nucleótidos localizada en el 3´ de la secuencia blanco (ej. NGG, donde N es cualquier nucleótido en el caso de la Cas9) es esencial, de lo contrario no se genera ningún corte (20). Esto se cree que se debe a que es un mecanismo mediante el cual el sistema CRISPR-Cas logra diferenciar el nuevo DNA invasor del DNA integrado al genoma, que sirve de templado para producir al crRNA (21) (Figura 7 fase 2).

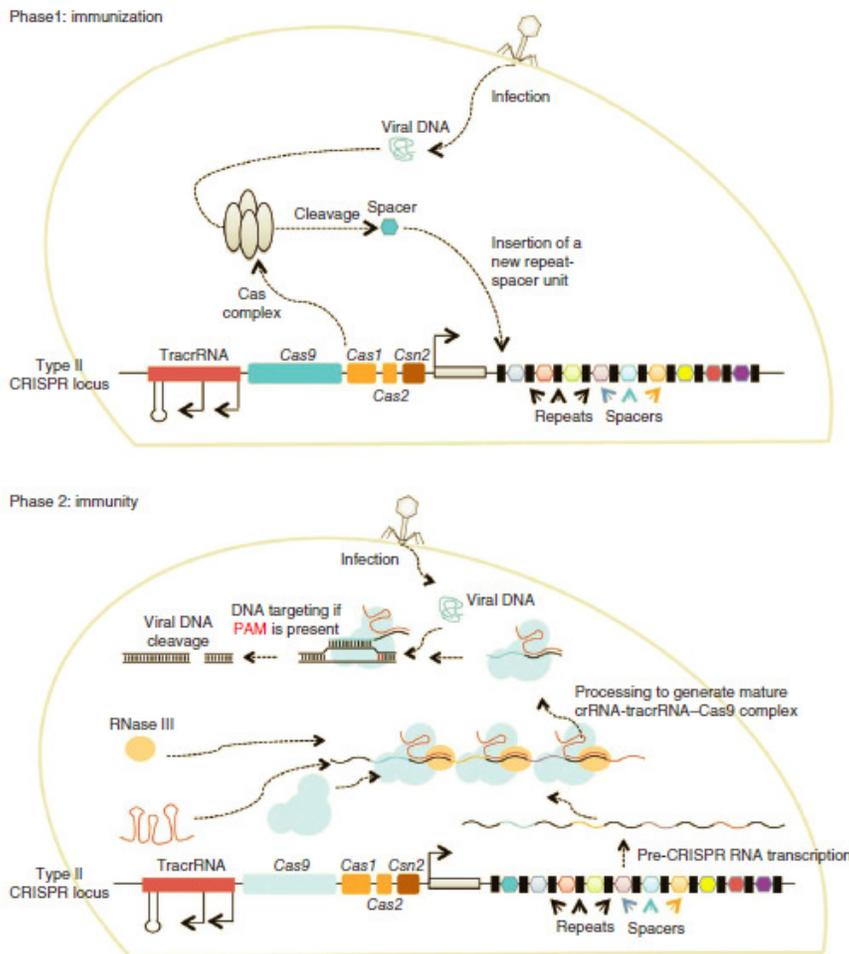


Figura 7.- Estructura del sistema de inmunidad bacteriana CRISPR-Cas.- Se muestran las dos fases que compone el sistema de inmunidad bacteriano. La primera fase consiste en la incorporación de la secuencia invasora, donde se forma un complejo de Cas que digiere el DNA invasor y lo incorpora al genoma. La segunda fase se da como respuesta inmune, donde se transcribe un pre-crRNA, el cual contiene los espaciadores con las secuencias invasivas incorporadas durante la fase 1. Posterior el pre-crRNA forma un complejo con el tracrRNA y es digerido para formar el crRNA maduro, el cual forma un complejo con la Cas y procede a hibridar con la secuencia invasiva y a generar cortes en ella (imagen tomada y editada de 21).

La técnica de edición del genoma mediante CRISPR-Cas consiste en el uso de las moléculas previamente descritas para modificar el genoma de células eucariotas de otras especies. El sistema CRISPR-Cas se ha adaptado de tal forma que se producen *in vitro* un RNA guía (sgRNA) que es la fusión del crRNA y el tracrRNA; y un transcrito para la

endonucleasa Cas9 con una señal de localización nuclear (NLS) (Figura 8 B y C). En el sgRNA se introduce la secuencia complementaria a la secuencia de la zona que se desea mutar. Tanto el sgRNA como el transcrito para la Cas9 se introducen a la célula mediante microinyección, o en el caso de tratarse de células de cultivos celulares, se introducen los plásmidos mediante transfección.

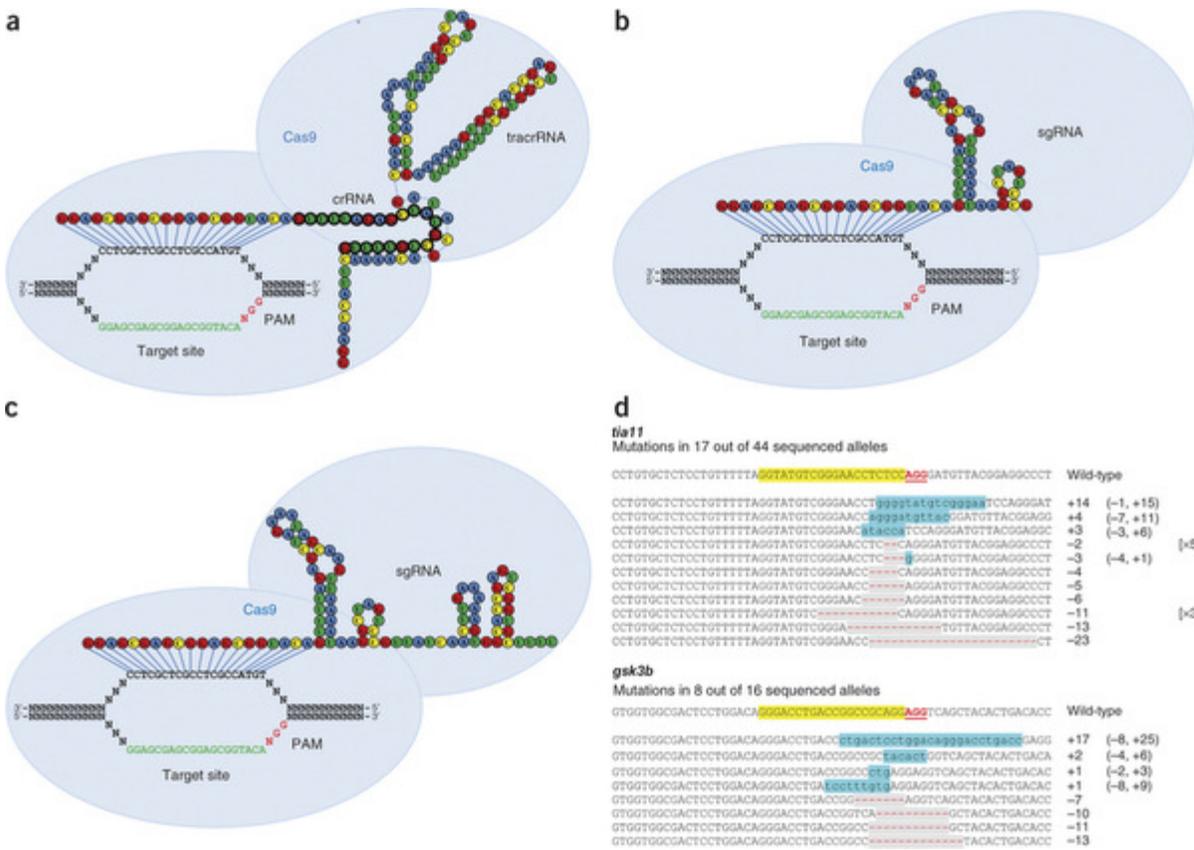


Figura 8.- Estructura del sistema CRISPR-Cas.- Se muestra la estructura del sistema CRISPR-Cas en la defensa adaptativa en bacterias, donde existe un crRNA, un tracrRNA y una Cas9 (A). Sistema CRISPR-Cas utilizado en la edición de genoma en cultivos celulares. Nótese que un sgRNA sustituye el crRNA y el tracrRNA (B). Sistema CRISPR-Cas utilizado para la edición del genoma del pez cebra. La diferencia con B es una extensión del 3' del sgRNA para ayudar con el plegamiento (C). Mutaciones in-del generadas en dos genes del pez cebra editados con el sistema CRISPR-Cas. En rojo se marca el dominio PAM (D) (imagen tomada de 22).

El sistema CRISPR-Cas cuenta con una alta especificidad, presentando una baja tolerancia a alineaciones inespecíficas en los primeros 10 nucleótidos anteriores al PAM o inclusive es incapaz de aparearse con un blanco donde existan tres nucleótidos seguidos alineados inespecíficamente en los nucleótidos mas alejados del PAM (23). Originalmente, esta técnica fue utilizada en cultivos celulares, pero últimamente se ha usado para editar el genoma del pez cebra, inclusive en genes donde no se había logrado mediante las técnicas de ZFN o TALENs (22). En un trabajo más reciente se generó una alteración a la Cas9, en donde se le agregó una segunda NLS, de forma que tiene una NLS en el amino terminal y en el carbonilo terminal. Esta Cas9 se reportó con una mayor eficiencia, al grado que se logró generar la edición bialélica, aunque aún existió mosaicismo (24).

ANTECEDENTES

En un estudio previo por parte de nuestro laboratorio (6), se estableció mediante hibridación *in situ* el patrón espacio-temporal de expresión del gen *Zimp10* en el desarrollo embrionario de ratón (*Mus musculus*). A los 8.5 días post-coito (dpc), se observó una expresión principalmente concentrada principalmente en el neuroectodermo, la notocorda y la aorta dorsal (Figura 9 A). A los 9.5 dpc, la señal se concentra en la vesícula óptica, el tejido neural y los arcos branquiales (Figura 9 B). A los 10.5 dpc, la señal se concentra en la vesícula óptica, óptica y la telencefálica, al igual que en los arcos branquiales y los componentes mandibulares (Figura 9 C). A los 11.5 dpc, la señal se limitó a la región del cerebro y los brotes de las extremidades y la cola (Figura 9 D) A los 12.5 dpc, se observa concentrado exclusivamente en las extremidades y la cola (Figura 9. E). En la extremidad se observó la presencia de señal en gradiente con la máxima concentración en el extremo posterior de la extremidad y conforme avanza el desarrollo la señal desaparece del espacio interdigital (Figura 9 F y G) (6).

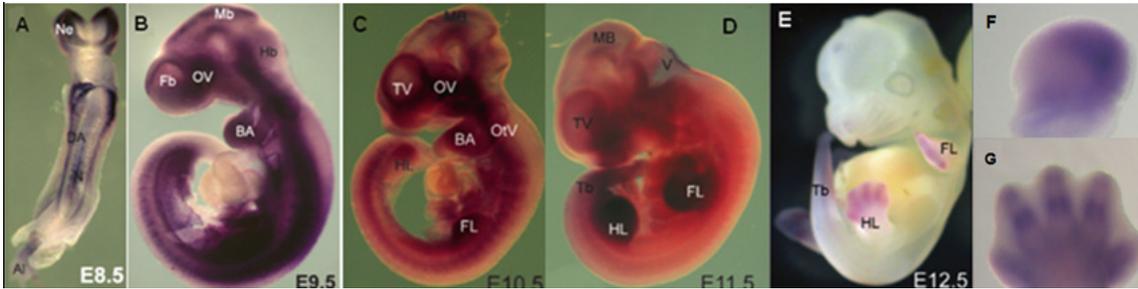


Figura 9.- Hibridación *in situ* de *Zimp10*. Distribución de la señal de *Zimp10* en embriones en distintas etapas del desarrollo (A-E). A los 8.5 dpc (A), a los 9.5 dpc (B), a los 10.5 dpc (C), a los 11.5 dpc (D) y a los 12.5 días (E). Expresión de *Zimp10* en las extremidades, 10 dpc (F) y 13 dpc (G). Ne, neuroectodermo; DA, aorta dorsal; N, notocorda; FB, cerebro anterior; OV, vesícula óptica; MB, cerebro medio; HB, cerebro posterior; BA, arcos branqueales; HL, extremidades posteriores; FL, extremidades anteriores; OtV, vesícula ótica; TV, vesícula telencefálica; TB, primordio de la cola. (Imágenes tomadas y editadas de 6).

En un trabajo posterior de otro grupo (2), se determinó el fenotipo resultante en ratón de la pérdida de función de *Zimp10*. Se observó un efecto letal a los 10.5 dpc donde, en concordancia con el patrón de expresión observado, se presentaban severos defectos en la vascularización, siendo de principal importancia la incapacidad de remodelar la vascularización del saco vitelino y dar origen a los vasos sanguíneos funcionales (Figura 10) (2).

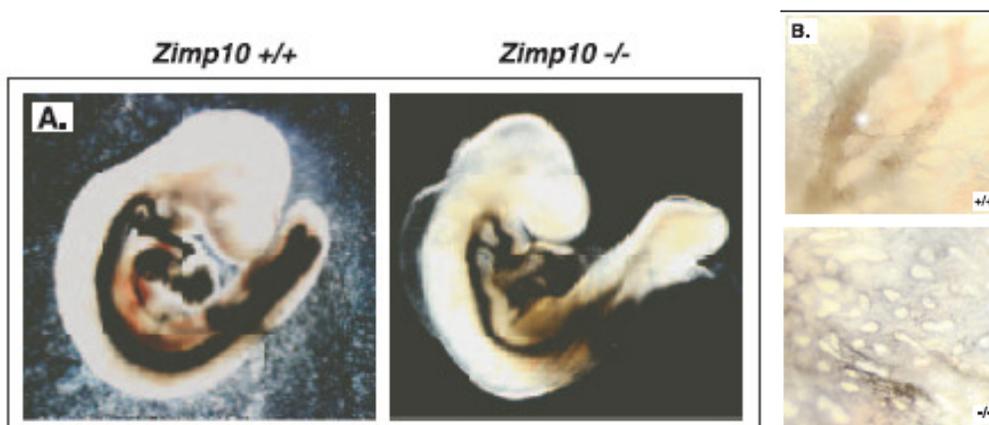


Figura 10.- Defectos de la pérdida de función de *Zimp10*. Se observa el defecto general de la vascularización en embriones con pérdida de función de *Zimp10* (A). Corte de saco vitelino, se muestra la falta de vascularización en el caso de los embriones “knockouts” (B) (Imágenes tomadas y editadas de 2).

En un trabajo más reciente por parte de nuestro laboratorio (25), se observó la expresión de *Zimp10* en el las gónadas masculinas de ratón, durante la etapa de determinación sexual. Este patrón denota un aspecto dimórfico, ya que las gónadas femeninas carecen de expresión de *Zimp10* durante la diferenciación sexual. El pico de expresión se observó en el día 12 dpc que es cuando las células germinales se rodean por las células de Sertoli para formar los cordones testiculares. En esa etapa se observa la señal principalmente fuera de los cordones testiculares, por lo que se encontró en las células intersticiales (Figura 11) (25).

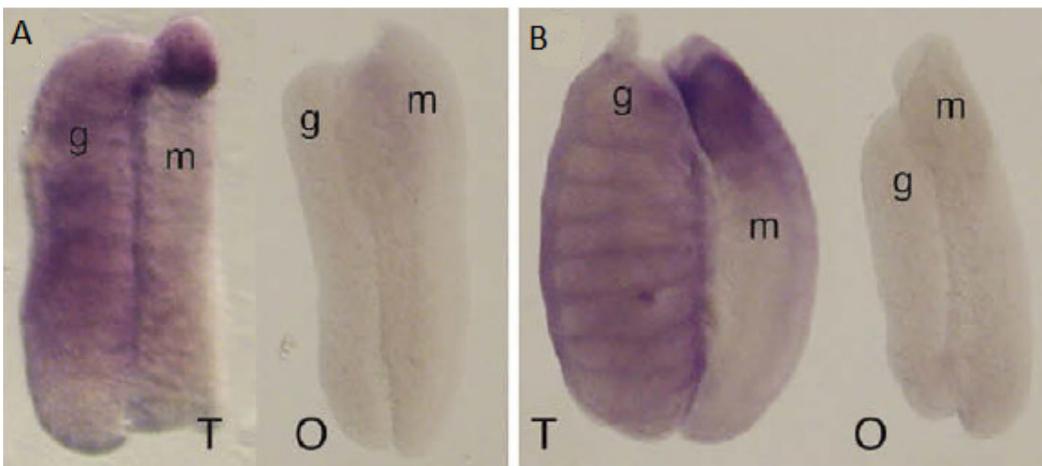


Figura 11.- Comparación de expresión de *Zimp10* en gónadas masculinas y femeninas. A los 12.5 dpc (A). A los 13 dpc (B). En ambos casos se observa la presencia de *Zimp10* exclusivamente en testículo (B). T, testículo; O, ovario; G, gónada; M Mesonefro. (Imágenes tomadas y editadas de 25)

Estas observaciones nos permiten suponer que *Zimp10* es un gen importante en el desarrollo embrionario, por lo que es necesario estudiarlo para poder comprender más a fondo su función.

JUSTIFICACIÓN

Por los datos anteriores, se puede concluir que *Zimp10* es un gen de importancia en el desarrollo embrionario del ratón. Al estar conservado, se puede predecir que participa en el desarrollo de varias especies. Por esta razón, *ZIMP10* es un gen que merece ser estudiado a mayor profundidad para entender su función. El pez cebra, al presentar diversas ventajas como modelo de desarrollo embrionario en vertebrados, puede ser utilizado para conocer los linajes celulares, tejidos y órganos donde se expresa *zimp10* y así obtener una idea sobre en qué procesos puede estar involucrado.

HIPÓTESIS

Durante el desarrollo embrionario del pez cebra, el gen *zimp10* podría estar presente durante la organogénesis y/o durante el establecimiento del eje anterioposterior de las aletas pectorales.

OBJETIVOS

Objetivo General:

- Analizar el patrón de expresión espacio-temporal a lo largo del desarrollo embrionario del pez cebra.
- Generar mutaciones en el gen *zimp10* del genoma del pez cebra con el fin de obtener un modelo que permita hacer estudios funcionales.

Objetivos específicos

1. Hacer una comparación de los dominios de *zimp10* en el pez cebra respecto a los reportados en humano mediante una búsqueda en las bases de datos.
2. Determinar el patrón de expresión espaciotemporal de *zimp10* en el desarrollo del pez cebra.
3. Generar una mutante de pérdida de función de *zimp10* mediante CRISPR-Cas9.

Materiales y Métodos

Determinación del momento de expresión.- Se diseñaron los pares de oligonucleótidos para amplificar a *zimp10*, utilizando las secuencias reportadas en Ensembl para los cDNAs de pez cebra. Para *zimp10a* se usó para el 5' CCTTCGAGCAAAGCCTTATGG y para el 3' CAGGGTTCATGGGATTGTTGG. Para *zimp10b* se usó para el 5' GGAATGTGAGTGTGAACCAG y para el 3' ATACGGCTGACCCATAACCA. De cada estadio reportado, se recolectaron 30 embriones de pez cebra y se dejaron al menos 12 horas en RNA-later (Life Technologies) a 4°C. Se procedió a extraer el RNA de embriones mediante extracción fenol-cloroformo con TRIZOL (Life Technologies) siguiendo las indicaciones del proveedor. A partir de los RNAs se sintetizó el cDNA mediante retrotranscripción con oligonucleótidos azarosos ("Random Primers") (Termo Scientific) y M-MLV transcriptasa reversa (Invitrogen) siguiendo las indicaciones del proveedor. Con los oligonucleótidos diseñados para ambos *zimp10*, se realizaron las PCRs con las siguientes condiciones, 1 ciclo a 95 grados centígrados por 4 minutos, 30 ciclos de 95 °C 30 seg, 57 °C 30 seg y 72 °C 30 seg, 1 ciclo de 72 °C 7 min y mantener a 4 °C hasta que se corran las muestras en geles de agarosa al 1%.

Hibridaciones *in situ* (HIS) para *zimp10a*.- Se diseñó la sonda de *zimp10a* sentido y antisentido digiriendo el plásmido pzimp10-sport (Dr.77379 I.M.A.G.E consorcium) con las enzimas de restricción *XbaI* y *XhoI* para liberar el inserto codificante para *zimp10a* y clonarlo en el plásmido pCS2+. El plásmido con *zimp10* en pCS2+ se digirió con *KpnI* y se autoligó para eliminar el 3' del inserto y posteriormente se realizó una digestión con *BamHI* y se autoligó para eliminar el 5' y dejar solo el fragmento de interés para la sonda. La sonda sentido se obtuvo digiriendo el plásmido con *KpnI* y posteriormente se transcribió con la enzima RNA transcriptasa SP6 (Roche) y la sonda antisentido se obtuvo digiriendo el plásmido con *BamHI* y posteriormente se transcribió con RNA transcriptasa T3 (Roche) utilizando nucleótidos marcados con Digoxigenina "DIG" (Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante. La HIS se realizó siguiendo el protocolo propuesto por Thise (26). Se recolectaron embriones de pez cebra de diversos estadios y se decorionaron de manera manual utilizando pinzas de relojero para después ser fijados por lo menos 12 horas y no más de 48 horas en paraformaldehído

(PFA) al 4% a 4 grados centígrados. Posteriormente, se pasaron a buffer salino de fosfatos con tween (PBST) y se deshidrataron gradualmente pasando a metanol al 25% en PBST, metanol al 50% en PBST, metanol al 75% en PBST y se dejaron en metanol, donde se almacenaron a -20 °C hasta realizar la HIS. Los embriones, se rehidrataron de manera gradual pasando por metanol al 75%, 50%, 25% y se dejaron en PBST. Se trataron con 10 ug/ml de proteinasa K (Sigma-Aldrich) por aproximadamente 30 seg (1 célula-1 somita), 1 min (1-8 somitas), 3 min (9-18 somitas), 10 min (18 somitas- Prim 5) y 30 min los estadios posteriores. Se inactivó la proteinasa K incubando 20 min los embriones con PFA al 4%, para después pasar los embriones a la solución de hibridación a 70 °C por 3 h y posteriormente se agregaron las sondas sentido (200 ng) o antisentido (200 ng), colocándose a hibridar a 70 °C por lo menos 12 horas. Después de hibridar, se lavaron con soluciones graduales de solución de hibridación y buffer de citrato sodico salino (SSC) 2X (75%, 50% y 25%) 20 min a 70 °C cada una y después se procedió a pasar los embriones a PBST pasando por soluciones graduales de 25%, 50%, 75% de PBST en SSC 0.2X, para al final dejarlo en PBST. Se bloquearon en la solución de bloqueo y a incubar con el anticuerpo anti-DIG (Roche) a una concentración de 1:5000 a 4 °C por lo menos 12 h. Después de remover el anticuerpo, se lavaron al menos seis veces en PBST y se pasaron a solución buffer de fosfatasa alcalina (AP-) y posteriormente a la solución buffer de fosfatasa alcalina con magnesio (AP+) para poder proceder a revelarlos. Las HIS de los embriones se reveló con “Nitroblue Tetrazolium” (NBT) y 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP) (Roche), los cuales al reaccionar con la peroxidasa del anticuerpo anti-DIG, se tiñen de color azul, lo que permite visualizar la localización de los anticuerpos que interactúan con la sonda marcada con DIG que hibridó con el RNA de interés. Se dejó reaccionar hasta que se observó una señal intensa, lo que fue por aproximadamente 1 h o hasta que los controles sentido presentaran señal de fondo. Posteriormente se procedió a transferir a los embriones a glicerol para ser fotografiados.

Cortes de embriones.- Los embriones tratados con las hibridaciones fueron tratados para fijar en parafina acorde al protocolo descrito por Cheng (27) una vez que se pasan a la parafina, se ubicaron los embriones para poder realizar los cortes en el sentido deseado y se deja endurecer la parafina por lo menos 12 h a 4 °C. Los cortes fueron realizados de 15 um en un microtomo

(Leica RM2145). Los cortes fueron posteriormente organizados en portaobjetos, desparafinados y fotografiados.

Diseción de los primordios de aletas pectorales.- Los embriones hibridados de 32 hpf-48 hpf fueron colocados en glicerol y se ubicaron bajo un microscopio de disección para ubicar las aletas pectorales. Se usó una jeringa para insulina de 1 ml (BD) para separar la aleta pectoral del embrión y se ubicó el ángulo para fotografiarla.

Edición del genoma mediante el sistema CRISPR-Cas.- Se adquirió el plásmido DR274 para clonar los RNAs guías (22), el plásmido pCS2-nCas9n para la expresión de la nCas9n (24) y para tener un control, se adquirió el plásmido pT7tyrgRNA que codifica para el RNA guía contra la tirosinasa (24). Se diseñó el RNA guía de *zimp10a* buscando los posibles blancos con el programa zifit (28 y 29), se escogió el blanco GGACCTCGGCTACCGGCTTC y se diseñaron los oligonucleótidos para clonar el RNA guía TAGGACCTCGGCTACCGGCTTC y AAACGAAGCCGGTAGCCGAGGT mencionados en la figura 25. Los oligonucleótidos se alinearon en buffer de hibridación, usando 2 ug de cada oligonucleótido y se calentó a 95 °C y se dejó enfriar a temperatura ambiente la muestra. Se procedió a clonar los oligonucleótidos en el plásmido DR274 digerido con *BsaI*. Se digirió el plásmido con la construcción para el RNA guía con *DraI* y se transcribió con la T7 RNA transcriptasa (Roche). El RNA guía de *tyr* se produjo digiriendo con *BamHI* el plásmido pT7tyrgRNA y se transcribió con T7 RNA transcriptasa (Roche). Para generar el RNA mensajero para la nCas9n, se digirió el plásmido pCS2-nCas9n con *NotI* y se transcribió con el kit mMESSAGING mMACHINE SP6 (Ambion) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los RNAs se purificaron mediante columnas de Sefarosa siguiendo las indicaciones del fabricante (Roche). Los RNAs se verificaron mediante un gel de agarosa con formamida y se cuantificaron mediante densidad óptica en un nanodrop (Thermo scientific). Las muestras se alicuotaron y se congelaron a -70 °C hasta que se inyectaran. Se inyectó 71 pg de RNA guía y 145 pg de RNA de nCas9n en un volumen de 2 nl de 100 mM de KCl con 0.05% de rojo de fenol directamente en la célula de embriones recién recolectados en el estadio de una célula.

Detección de mutaciones en DNA genómico.- Se extrajo el DNA tanto de embrión individual como de grupos de 10 embriones de una sola inyección, mediante digestión en buffer Blobel a 55 °C por lo menos 4 h, se agregó acetato de potasio 8 M para llevarlo a una concentración final de 1.12 M y se centrifugó para remover los restos de los embriones. Posteriormente, del sobrenadante en un tubo nuevo se hace una precipitación con isopropanol y se disuelve en 20 ul de agua desionizada. De esta solución se usó 1 ul directamente para amplificar por PCR en una reacción de 15 ul. Se realizaron PCRs con los oligonucleótidos 5´ TTCTCCACAGGTTGTAAGCC y 3´ GACTGCTGGAAAGTGAAGTC con la siguiente condición: 1 ciclo a 95 °C por 4 min, 30 ciclos de 95 °C 30 seg, 60 °C 30 seg y 72 °C 30 seg, 1 ciclo de 72 °C 7 min y mantener a 4 °C; posteriormente se purificó el amplificado mediante una columna para productos de PCR genejet (Thermo scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante. El amplificado ya purificado se cuantificó mediante densidad óptica en un equipo nanodrop (Thermo scientific), y se sometió 200 ng a un programa de hibridación de la siguiente manera: se llevó a un volumen final de 20 ul en buffer 2.1 (New England Biolabs) y se calentó a 95 °C 10 min, reduciendo 10 °C por minuto hasta los 25 °C en un termociclador Geneamp 9700 (Applied Bioscience). Posteriormente se analizó mediante digestión por T7 endonucleasa I (30) (New England Biolabs), digiriendo de los 200 ng, 100 ng con 5 U de enzima por 30 min a 37 °C. De forma paralela se analizó la muestra hibridada corriéndola en un gel de acrilamida al 8% no desnaturizante con TBE según describe Chen (31) donde se buscó la presencia de bandas de mayor tamaño que corresponden a un heterodúplex. Se seleccionó una muestra con resultado positivo y se clonó en el vector pJet 2.1 (Thermo scientific). Se seleccionaron cuatro clonas positivas y se mandaron a secuenciar a la unidad de secuenciación del IBT.

Cruzas y cuidado de los peces.- Los peces utilizados fueron de la cepa Tab-Wik y se mantuvieron separados los machos de las hembras en tanques de 1.5 y 3 l (Aquatic habitats) respectivamente con una densidad de ocho peces por tanque. Las cruzas se realizaron en tanques de diez litros, donde las hembras se colocaron dentro de una red y los machos en una caja dentro de la red una noche antes de cruzar y se dejó el tanque sin flujo, al día siguiente se sacaron los machos de la caja y se redujo el espacio de la red para reducir la profundidad al mínimo posible que deje a los peces nadar. Se dejaron aproximadamente 15 minutos para que

cruce y se prosiguió a recolectar los huevos del fondo del tanque mediante un sifón. De manera similar, también se realizaron cruces individuales, donde se colocaron en tanques de cruces (Aquatic habitats) separados con una barrera un macho y una hembra un día previo, y al momento de realizar la cruce, se removió la barrera y se retiró agua del tanque para dejar el mínimo volumen posible que permita a los peces nadar y se dejaron aproximadamente 15 minutos para que crucen. Los embriones se recolectaron decantando el tanque por una malla colador. Para establecer la línea mutante, en particular la F0, se tomaron de grupos de inyección donde se observó mediante un gel de acrilamida al 8% la formación de un heterodúplex. Las larvas se crecieron en tanques de 1.5 lts con 300 ml de agua para embrión y se alimentaban acorde a lo especificado en el protocolo para crecimiento de larvas del ZIRC, basado en el libro del pez cebra (32):

Día 0-4: se mantuvieron en cajas *petri* con una densidad de sesenta embriones por caja con agua de embrión a 28⁰C. No se alimentaron durante estos días, cada día se retiraban los embriones muertos o con defectos severos.

Día 5-9: se pasaron los embriones a tanques de 1.5 lts con 300 ml de agua para embrión, se alimentaron tres veces al día, dos de esas con 15 ml de paramecio y otra con alimento en polvo en base de rotíferos (Azoo), donde con una espátula se agregó lo que pudiera cargar con la punta y se dejó que comieran por 15 min. Al cabo de ese tiempo, con una hoja de papel para imprimir, se limpió lo que sobró de la superficie. Se cambió $\frac{3}{4}$ partes del agua cada día y con un trozo de papel absorbente, se limpió el fondo del tanque con cuidado de no dañar a los peces.

Día 10-21: se dejó de alimentar con paramecio, se siguió alimentando tres veces por día, dos de ellas con alimento a base de rotíferos siguiendo los pasos del día 5-9, y una tercera con 10 gotas de artemia viva. Se siguió cambiando $\frac{3}{4}$ partes del agua cada día y se limpió el fondo del tanque con un papel absorbente.

Día 22-80: se pasaron los tanques al sistema del estante donde se tienen los peces adultos. A los tanques se les colocaron las mallas para alevines de 400 um (aquatic habitats). Se llevó el

volumen de los tanques a 1.5 l y se dejó con flujo constante. Se alimentaron con mezcla de artemia viva y Tetramín en polvo, empezando con 10 gotas y aumentando la cantidad de alimento en futuras alimentaciones si es que se acababan el alimento en menos de 15 min, hasta llegar a alimentar 1 ml por pez.

Día 81: los peces se tomaron y se determinó el fenotipo mediante un corte de aleta de la cola, poniéndolos en agua para pez con triclaína (sigma) hasta que se duerma el pez (aproximadamente 30 seg), con mucho cuidado de no exceder el tiempo, ya que puede resultar letal para el pez. Con el pez dormido, se colocó sobre un pedazo de papel parafilm colocado sobre una hoja de papel absorbente humedecido con agua de acuario y con una navaja para microtomo nueva, se procedió a cortar la cola a la mitad entre la punta de la cola y la zona donde comienzan las escamas. El fragmento cortado se trató para extraer el DNA de la manera mencionada previamente. El pez se dejó en un vaso de precipitado de 250 ml con agua de acuario por cinco días sin alimentar ni cambiar el agua para que se recupere y empiece a regenerar la aleta. Una vez determinado el fenotipo, o pasado 5 días desde el inicio del procedimiento, los peces se separaron en positivos y negativos y se colocaron en un tanque de 3 l. Se siguieron alimentando de la misma manera mencionada para los días 22-80.

Resultados

- **Análisis de la secuencia de *zimp10* en pez cebra**

Se realizó una búsqueda en bases de datos del genoma del pez cebra. Se encontró que hay dos genes homólogos a *zimp10*, uno localizado en el cromosoma 13 (referido en este trabajo como *zimp10a*) y el otro localizado en el cromosoma 12 (referido como *zimp10b*).

- **Comparación mediante *Blast* de proteína entre Zimp10a y Zimp10b de pez cebra contra ZIMP10 humano**

Con el fin de determinar el nivel de conservación entre las proteínas Zimp10a y Zimp10b, se realizó una alineación y comparación contra la proteína ZIMP10 humana. Al comparar Zimp10a con ZIMP10 humano, se observa una identidad global del 81%, lo que habla de una elevada conservación. En el caso de Zimp10b con relación a la proteína ZIMP10 de humano, se observa una identidad global del 72%. Las identidades de los diferentes dominios conservados de Zimp10a y Zimp10b se presentan en la tabla 1. A partir de esta comparación se concluyó que en todos los dominios Zimp10a presenta mayor homología a ZIMP10 en todos los dominios y por ende es el más conservado.

genes comparados	Identidad proteína	
	Zimp10a	Zimp10b
Primer dominio rico en prolinas	80%	42%
XSP-RING	96%	75%
NLS	100%	88%
SP-RING	100%	84%
Segundo dominio rico en prolinas	63%	36%
Identidad global	81%	72%

Tabla 1.- Comparación de la conservación de los diferentes dominios de ZIMP10 humano con el equivalente de Zimp10a y Zimp10b en pez cebra. Se observa una mayor identidad de Zimp10a a lo largo de los diferentes dominios.

- **Análisis de sintenia usando como referencia al *ZIMP10* humano**

Se realizó un análisis de sintenia con el fin de determinar que tan conservada está la ubicación de *zimp10a* y *zimp10b* en el genoma del pez cebra en comparación con la localización de *ZIMP10* humano. Para esto se compararon 15 genes abajo y 15 genes arriba de los cromosomas donde se ubican *zimp10a* y *zimp10b* en el pez cebra con el cromosoma de *ZIMP10* humano. Se observó la existencia de dos genes cercanos a *zimp10a* que conservan una cercanía similar a la presente entre sus ortólogos y *ZIMP10* humano. En el caso de *zimp10b* se observó una mayor sintenia, dando un total de seis genes cercanos a *zimp10b* que conservan una cercanía similar a la presente entre sus ortólogos y *ZIMP10* humano, lo que nos habla de que es más probable que *zimp10b* se encuentre en la localización genómica del ancestro común. Estos datos nos sugieren que es más probable que *zimp10a* se haya generado por duplicación, pero debido a la conservación de la secuencia de proteína es más probable que *zimp10a* sea el que se adaptó para mantener la función equivalente a la reportada para *ZIMP10* de ratón.

- **Determinación del patrón de expresión espacio-temporal de *zimp10***

- Diseño de los oligonucleótidos para la amplificación de una región de *zimp10a* y *zimp10b*

Se diseñaron un par de oligonucleótidos para amplificar un fragmento de *zimp10a* y un par para amplificar un fragmento de *zimp10b*. Con el fin de evitar ruido por DNA genómico, se buscó que cada oligonucleótido quedara en un exón diferente. Los oligonucleótidos para amplificar *zimp10a* se diseñaron en los exones 14 y 17 (Figura 12), mientras que los oligonucleótidos para amplificar *zimp10b* se diseñaron en los exones 6 y 8 (Figura 13).

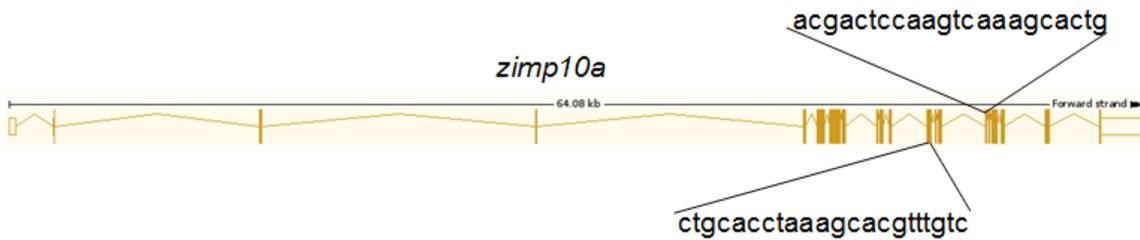


Figura 12.- Diseño de oligonucleótidos para *zimp10a*. Se muestra el diseño en diferentes exones y la localización de los exones a lo largo del gen.

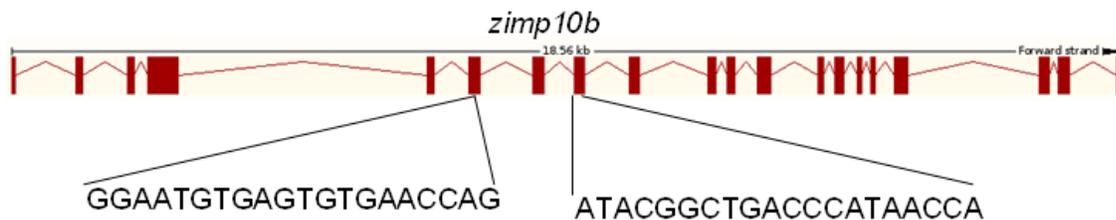


Figura 13.- Diseño de oligonucleótidos para *zimp10b*. Se muestra el diseño en diferentes exones y la localización de los exones a lo largo del gen.

- Determinación del momento de expresión de *zimp10a* y *zimp10b* mediante PCR durante el desarrollo embrionario del pez cebra.

Se analizó la presencia de los transcritos de *zimp10a* y *zimp10b* mediante RT-PCR usando los *oligonucleótidos* descritos en embriones de los estadios de 64 células, 30% de epibolia, Escudo, 3 somitas, 24 hpf y 48 hpf. En general hubo cierta dificultad para amplificar *zimp10a* a partir de etapas tempranas, es decir que en varias repeticiones ciertas muestras no generaban producto. Sin embargo, tomando en cuenta diversos intentos, se pudo observar expresión en todos los estadios previamente mencionados al menos en alguna ocasión. (Figura 14), si bien en estadios previos a la transición de la blástula media, la banda generada por la reacción de PCR por lo general fue tenue, dando la impresión de que si se expresa en esas etapas, lo hace débilmente (Figura 14).

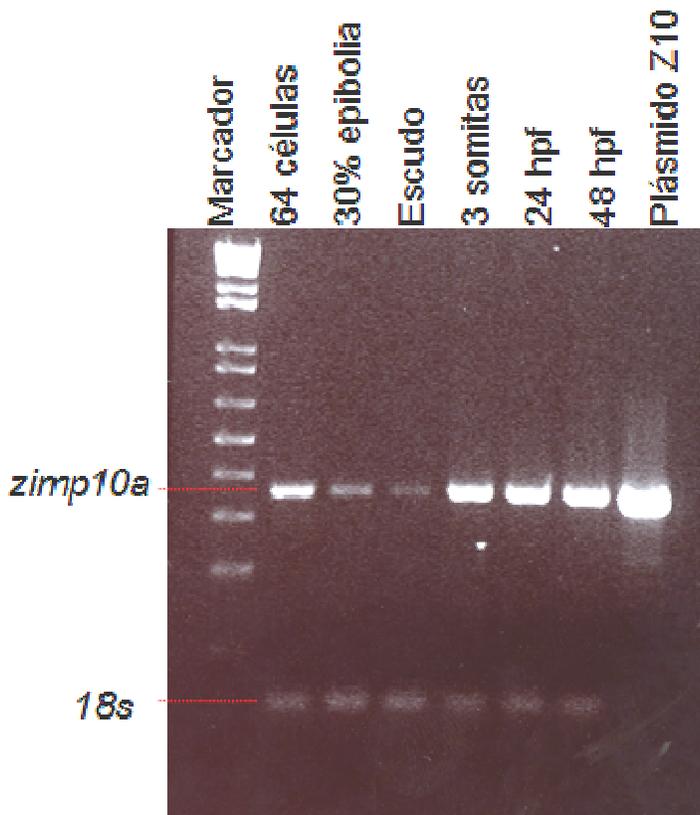


Figura 14.- PCR de los cDNAs de diferentes estadios para *zimp10a*. Se muestra la banda esperada de 350pb y como control se amplificó con oligonucleótidos para la subunidad ribosomal 18s. Se puede observar que existe amplificación en todas las etapas, aunque en general la expresión fue menor en etapas previas a la de 3 somitas, por lo que se aparenta que *zimp10a* es un gen que principalmente se ha de expresar en etapas más tardías del desarrollo.

Para comprobar la expresión de *zimp10a* en adulto, se obtuvo RNA de distintos órganos. Para esto se incluyeron muestras de piel, testículo, hígado, ojo, cerebro y corazón. En esta etapa se logró amplificar con mayor facilidad *zimp10a* de todos los órganos, lo que sugiere que se encuentra presente en mayor concentración (Figura 15). En contraste los experimentos realizados con oligonucleótidos para *zimp10b* nos llevó a creer que este gen no se expresa durante el desarrollo embrionario ya que no se logró amplificar en ningún caso, aunque estas pruebas no son concluyentes.

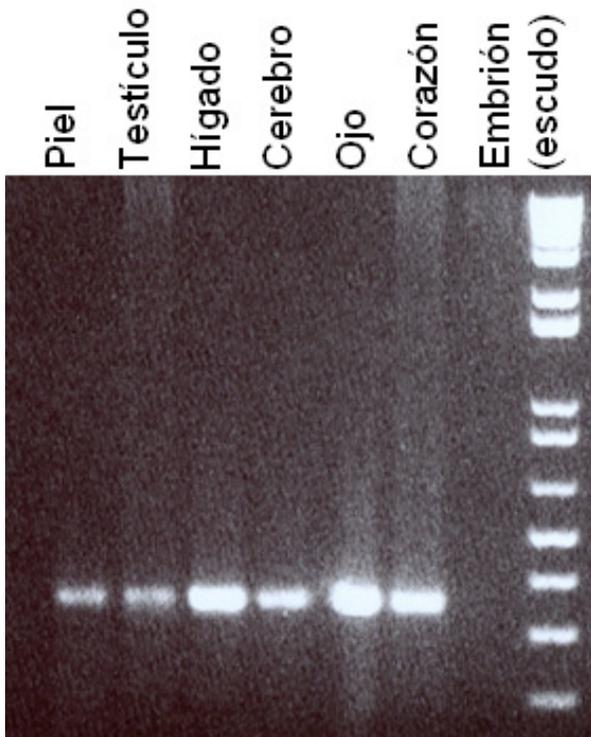


Figura 15.- PCR para *zimp10a* de los cDNAs de distintos órganos del pez cebra adulto. Se incluyó en el mismo gel una repetición de cDNA de embrión del estadio escudo.

Con base en estos resultados, se estipula que existe expresión de *zimp10a* en el embrión en todas las etapas, y la expresión aumenta después de las 3 somitas, para mantenerse hasta el adulto. Sin embargo la dificultad para amplificar los transcritos de este gen en los estadios embrionarios previos a las 3 somitas, sugiere que el transcrito se produce escasamente en estas etapas encontrándose en el límite de detección, por lo que solamente las reacciones más eficientes dan positivo. Debido a que no se encontró expresión de *zimp10b* y considerando que *zimp10a* presenta una mayor similitud a Zimp10 humano, se decidió continuar este trabajo con *zimp10a*.

- Diseño de la sonda para HIS

Se adquirió el cDNA completo de *zimp10a* de la librería del consorcio I.M.A.G.E (33). A partir de éste se construyó una sonda única para *zimp10a*, conteniendo una región localizada antes del XSPRING (Figura 16).

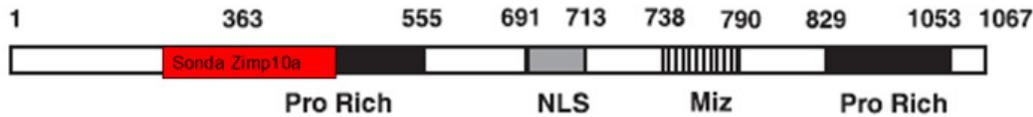


Figura 16.- Diseño de la sonda de *zimp10a*. Mapa de *zimp10a* con dominios conservados de *zimp10a*. Se muestra la localización de la secuencia seleccionada para la sonda en relación a los dominios conservados (Imagen tomada y editada de 2).

- Determinación del patrón de expresión de *zimp10a* durante el desarrollo embrionario del pez cebra mediante HIS.

Se analizaron los estadios de 64 células, domo (no mostrada), escudo, 75% de epibolia, bud, 14 somitas, 21 somitas, 26 somitas, 24 hpf, 34 hpf, 48 hpf y 72 hpf con sonda sentido o antisentido *zimp10a*. La señal sólo se detectó a partir del estadio de 75% de epibolia (Figura 17 A-D y A'-D'), lo que contrasta con lo observado en la RT-PCR, donde la expresión se muestra en todos los estadios, por lo que se sugiere que la expresión de *zimp10a* a de ser menor en las etapas previas a la gastrulación. El hecho de que se detecte un poco más tarde en experimentos de HIS en comparación con el RT-PCR, es explicable porque el PCR es un método más sensible a la detección. Sin embargo en 75% de epibolia el transcrito de *zimp10a* se detecta con claridad, si bien concentrado en la región precursora del neuroectodermo (Figura 17 C y D).

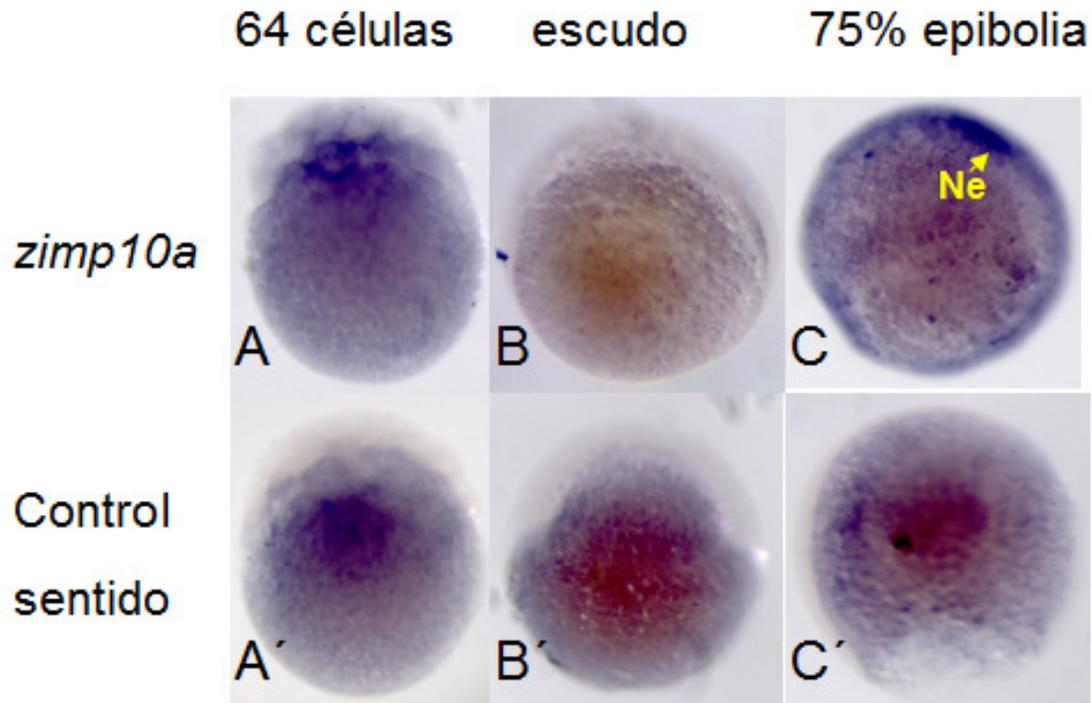


Figura 17.- Expresión temprana de *zimp10a*. Sonda antisense (A-C), control sentido (A'-C'). Se muestra el estadio 64 células, un estadio previo a la transición de la blástula media, en donde la señal observada es el ruido de fondo ya que también se encuentra en el control sentido (A y A'); escudo, el último estadio que no presentó señal (B y B'). El transcrito se pudo detectar a partir del estadio de 75% de epibolia en el neuroectodermo (C y C'). NE, neuroectodermo.

Al concluir la epibolia, el transcrito se localiza en dos frentes, el primero en el polo animal del embrión, en donde se formará la cabeza y el segundo, en el polo posterior, en donde se localiza el primordio de la cola (Figura 18 A). Este patrón fue detectado durante casi toda la somitogénesis. A partir del inicio de la somitogénesis, se observa una tenue expresión localizada entre el vitelo y la parte ventral del embrión, misma que se observa en todos los estadios hasta las 48 hpf (Figura 18 B y C). A las 14 somitas, se empezó a divisar la señal concentrada en la vesícula óptica (Figura 18 B). Durante las 21 somitas, uno de los últimos estadios de la somitogénesis, el transcrito se localizó principalmente en el cerebro posterior, abarcando la región donde se localiza la vesícula óptica, por lo que no se puede precisar si esta expresado en la vesícula óptica o no (Figura 18 C).

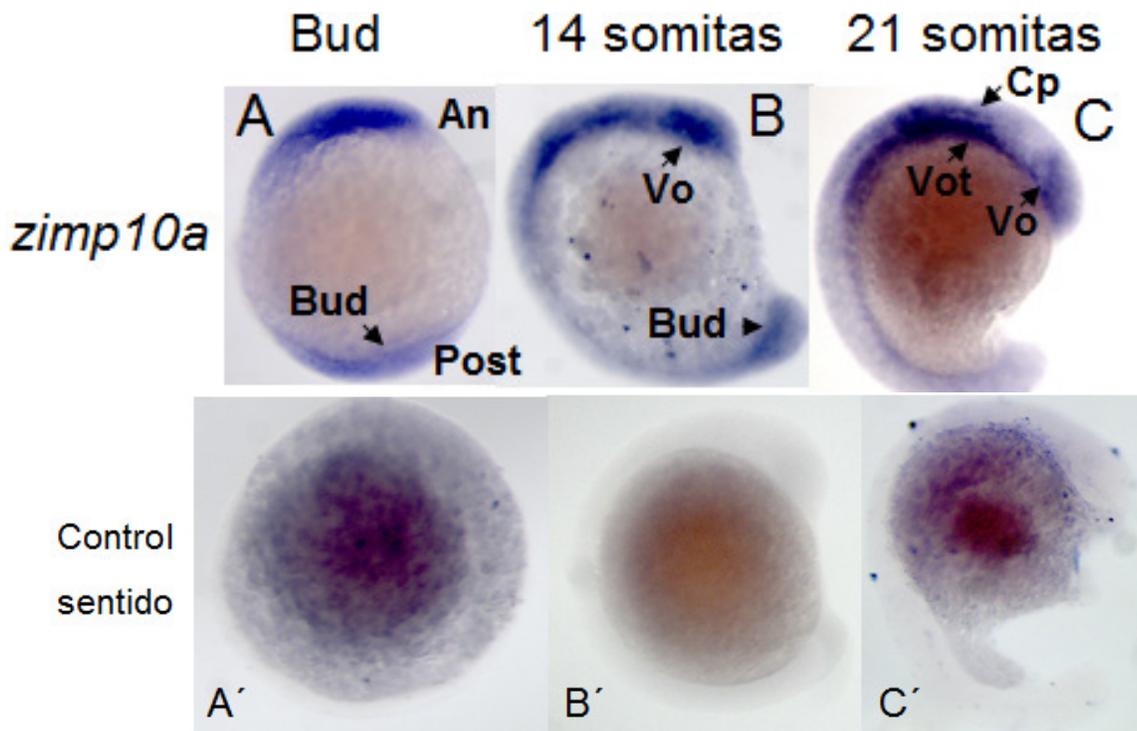


Figura 18.- Expresión de *zimp10a* durante la somitogénesis. Vista lateral (A-C), control sentido (A'-C'). Se muestra un embrión en el estadio Bud, el cual marca el final de la epibolia y el inicio de la somitogénesis. La señal se localiza en el primordio de la cabeza y en el primordio de la cola (A); embrión en el estadio de 14 somitas, que es un estadio intermedio de la somitogénesis. Aquí la señal se localiza en la vesícula óptica, en el primordio de la cola y en la zona donde se junta el embrión con el vitelo (B); embrión en el estadio de 21 somitas, uno de los últimos estadios de la somitogénesis. En este embrión la señal se mantiene en la vesícula óptica, la zona donde se une el embrión al vitelo y la zona del cerebro posterior (C). An, polo animal; Post, polo posterior; Bud, primordio de la cola; Vo, vesícula óptica; Vot, vesícula ótica; Cp, cerebro posterior.

Al concluir la somitogénesis, se observó expresión en el cordón espinal, que es donde se encuentra el tejido neural a lo largo de las somitas (Figura 19 A). Desde una vista dorsal, se observó el transcrito en una delgada línea justo a la mitad del cordón espinal, que puede ser la placa de piso o los vasos sanguíneos primarios. Además se puede identificar la señal localizada en el cerebro medio, la cual mostró un patrón definido donde se aprecian los 2 ventrículos

(Figura 19 A´). En los embriones de 36 hpf, el transcrito se observó en la vesícula óptica con una localización alrededor de la lente y se logra observar la expresión concentrada con mayor intensidad en el cerebro posterior (Figura 19 B). Desde una vista dorsal, se logró observar la expresión localizada en todo el cerebro, con una señal ligeramente más intensa en el cerebro posterior, y de forma comparable con el desarrollo embrionario del ratón, se logró observar el transcrito de *zimp10a* en los primordios de las aletas pectorales. Esta señal fue aparente a partir del estadio 34 hpf, pero se volvió más intensa a las 36 hpf (Figura 19 B´).

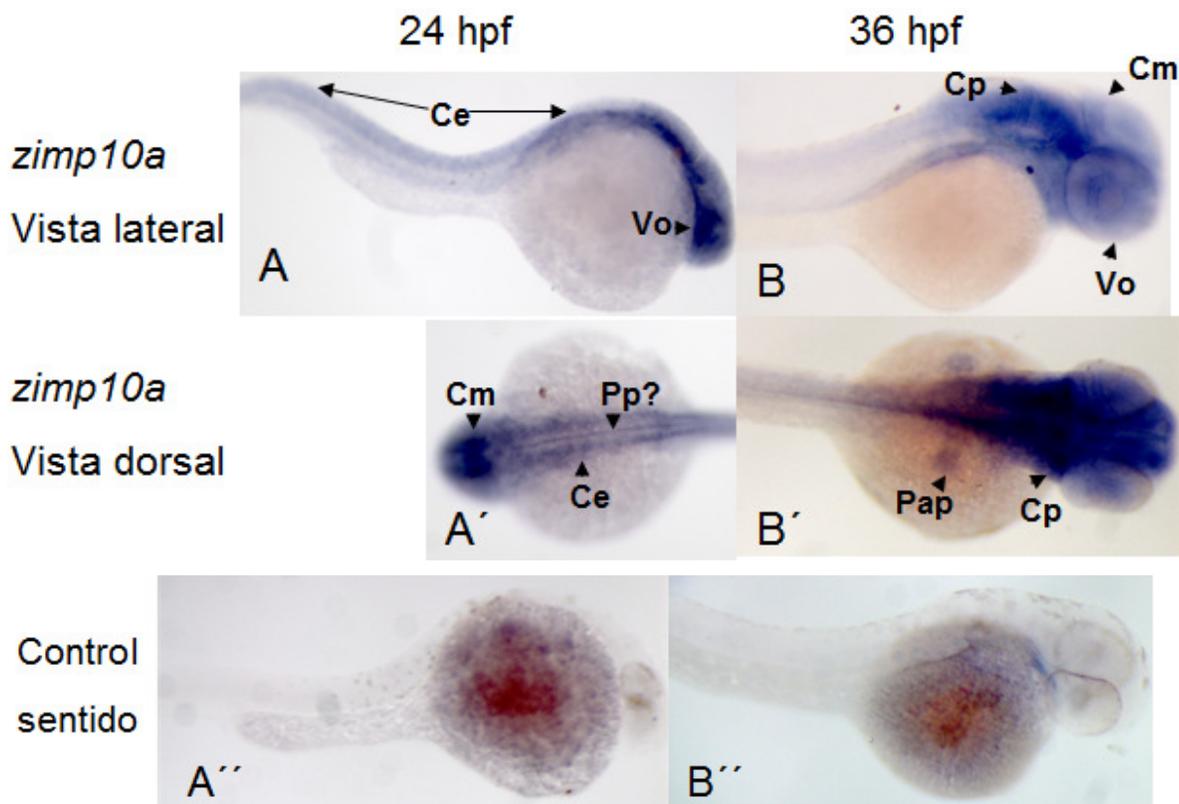


Figura 19.- Expresión de *zimp10a* durante el segundo día de desarrollo. Vista lateral (A-B), vista dorsal (A´-B´), control sentido (A´´ y B´´). Se muestra el embrión a las 24 hpf, el cual es uno de los primeros estadios posteriores al fin de la somitogénesis. En éste embrión la señal se encuentra en el cordón espinal, la placa de piso o vasos sanguíneos primarios, en la vesícula óptica y en el cerebro en general (A y A´); a las 36 hpf, que es una etapa donde el primordio de la aleta pectoral comienza a crecer en tamaño, la señal se logró identificar en el cerebro medio, en cerebro posterior, en la vesícula óptica y en los primordios de la aleta pectoral (B y B´). Ce, Cordón espinal; Vo, Vesícula óptica; Pp, placa de piso; Cm, cerebro medio; Cp, cerebro posterior; Pap, primordio de las aletas pectorales.

A la 48 hpf, la expresión se limita casi en su totalidad a todo el cerebro y el ojo, en especial en la retina neural (Figura 20 A). Desde una vista dorsal, la señal desaparece en los primordios de las aletas (Figura 20 A´). Finalmente al cumplir las 72hpf, que se considera el último estadio de desarrollo embrionario, la señal se encuentra restringida principalmente al cerebro y la retina neural (Figura 20 B y B´).

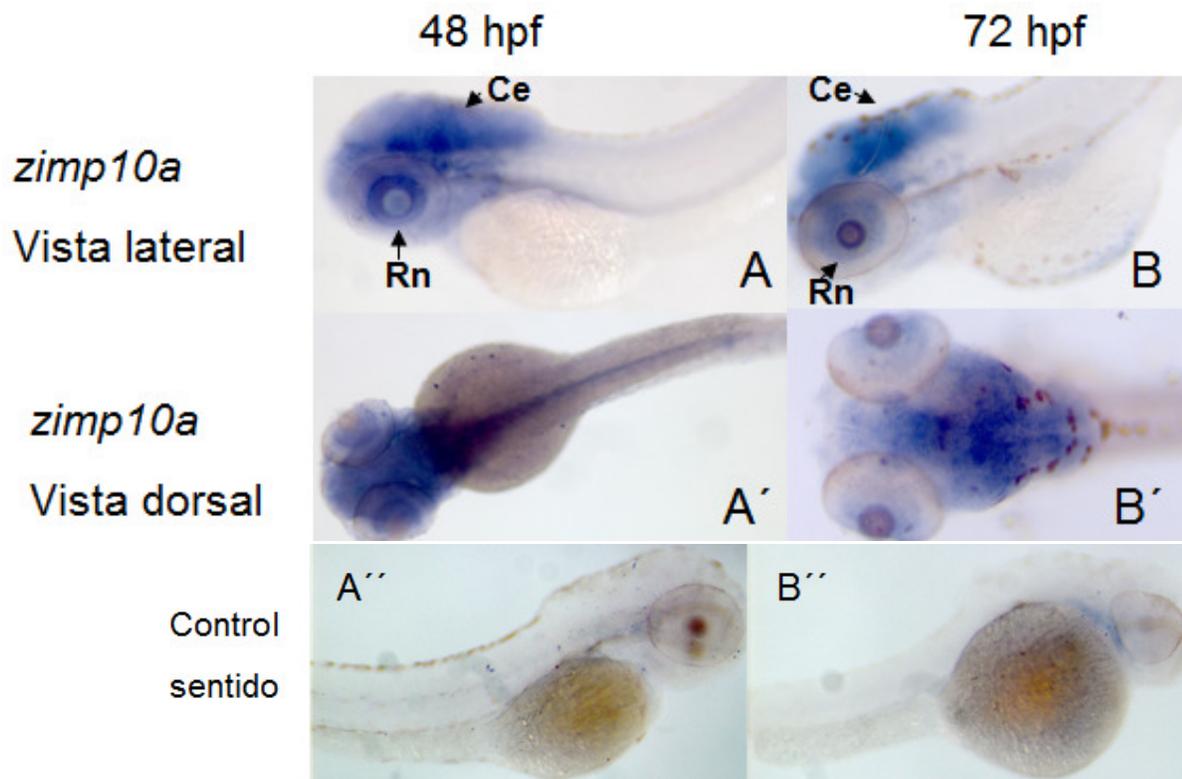


Figura 20.- Expresión de *zimp10a* durante el último día de desarrollo embrionario. Vista lateral (A-B), vista dorsal (A´-B´), control sentido (A´´ y B´´). Se muestra el embrión a las 48 hpf. La señal se encuentra en la retina neural, en el cerebro en general y se mantiene en lo que puede ser la placa de piso o la notocorda y desapareció de las aletas pectorales (A y A´); a las 72 hpf, que es el último estadio de desarrollo embrionario, la expresión se limitó al cerebro en general y a la retina neural (B y B´). Ce, cerebro; Rn, retina neural.

Con el fin de determinar la localización de la expresión de *zimp10a* con una mayor exactitud, se realizaron una serie de cortes transversales y laterales en embriones de 24 hpf, 48 hpf y 72 hpf tratados en la HIS para *zimp10a*. A las 24 hpf se confirmó la expresión de *zimp10a*

localizada en el cerebro y la vesícula óptica de manera generalizada, aunque la coloración que forma la línea media en el cerebro, es muy probable que sea atrapamiento inespecífico (Figura 21 A). En cortes posteriores, se observa que la señal permanece en el cerebro posterior (Figura 21 B) y en el tubo neural (Figura 21 C). Se observó transcrito a lo largo del cordón espinal y se observó que la señal localizada en la unión al vitelo, corresponde con la localización de la aorta dorsal y la vena posterior cardinal, por lo que se cree que *zimp10a* se ha de expresa en el tejido vascular (Figura 21 B, C y D).

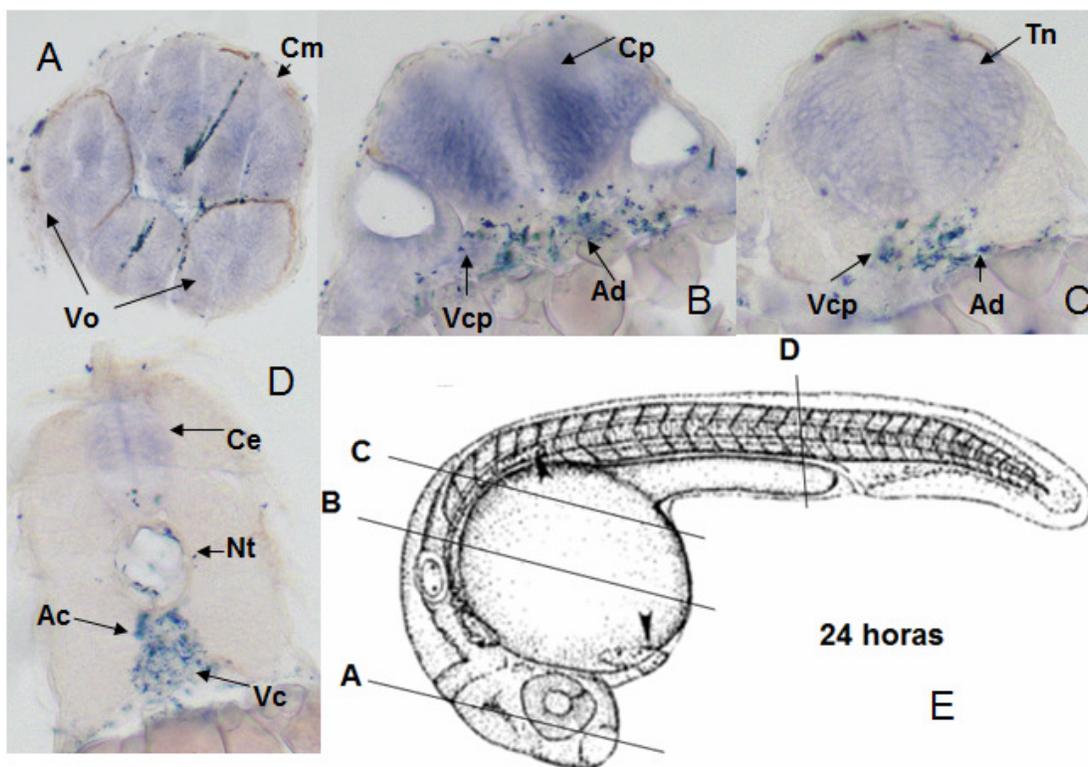


Figura 21.- Cortes transversales en un embrión de 24 hpf. Se muestra un corte en el cerebro medio (A), cerebro posterior (B), mitad del embrión (C) y cola del embrión (D). Cada imagen corresponde a un corte realizado a la altura marcada en la caricatura (E). Vo, vesícula óptica; Cm, cerebro medio; Vcp, vena cardinal posterior; Ad, aorta dorsal; Cp, cerebro posterior; Tn, tubo neural; Ce, cordón espinal; Nt, notocorda, Ac, aorta cardinal, Vc, vena cardinal.

En cortes de embriones de 48hpf, se detectó una señal específica en los ojos, en lo que corresponde a la retina neural, pero no en la lente del ojo (Figura 22 B, C e I). A la altura de los primordios de las aletas pectorales, el transcrito se encuentra entre los primordios y el vitelo, pero está ausente en el primordio en sí (Figura 22 D). Se observó que *zimp10a* se sigue expresando alrededor de la notocorda, en lo que corresponde al tubo neural y la vascularización secundaria en la parte dorsal, y la vena cardinal posterior en la parte ventral (Figura 22 D y E). En cortes laterales, se observó un patrón en forma de punta de flecha, el cual está localizado muy cerca de la notocorda, lo cual coincide con la localización de los vasos sanguíneos intersegmentales (Figura 22 H).

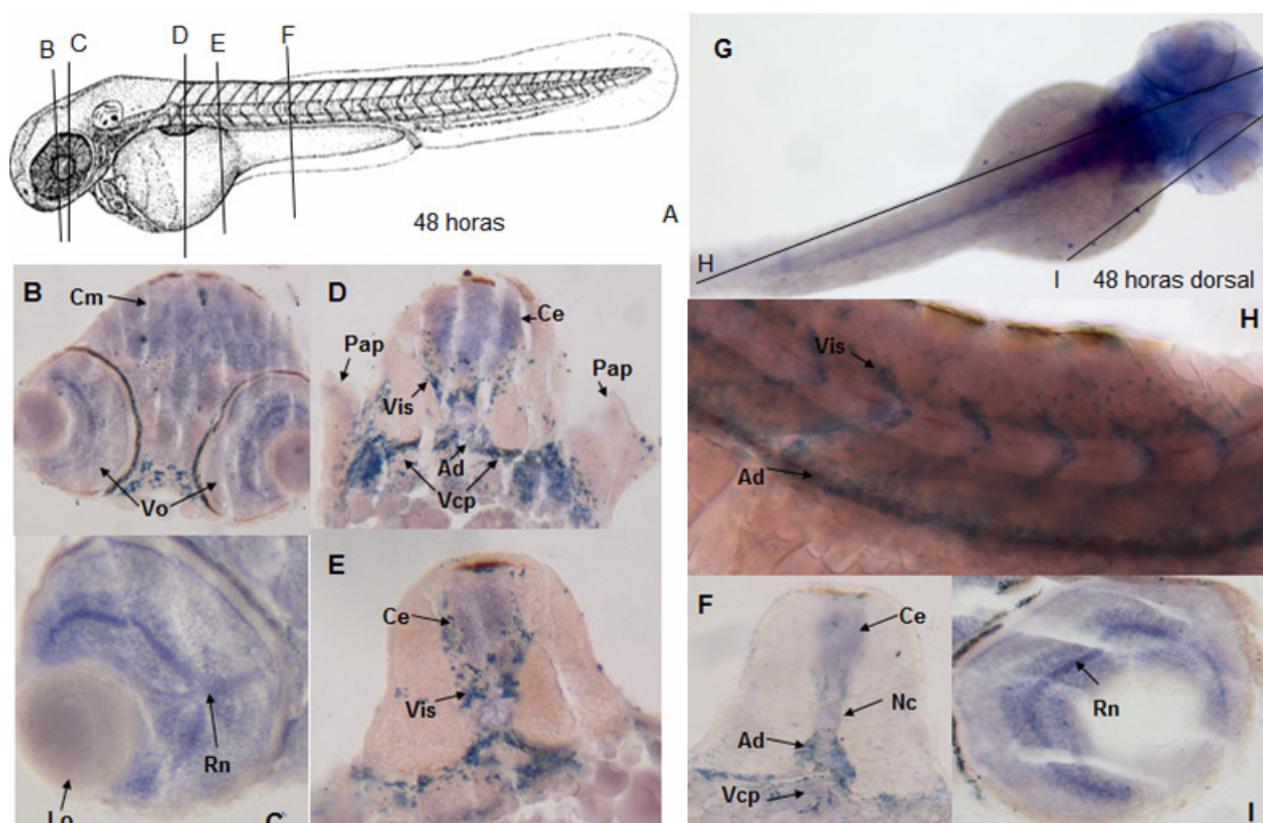


Figura 22.- Cortes de embriones de 48 hpf transversales (A-E) y laterales (F y G). Se muestra en la caricatura (A) y en la foto de vista dorsal (G), la altura a la que se realizó cada corte. Se muestra el ojo (B, C e I), los primordios de las aletas pectorales (D), el cordón espinal (D, E y F) y el sistema vascular (D, E, F y H). Vo, vesícula óptica; Cm, cerebro medio; Lo, lente del ojo; Rn, retina neural; Pap, primordio de la aleta pectoral; Ce, cordón espinal; Vis, vasos intersegmentales; Ad, aorta dorsal; Vcp, vena cardinal posterior.

A las 72 hpf en cortes transversales, se observó la señal en la retina neural, donde la señal permanece en el límite de esta región, el cerebro anterior, medio y posterior (Figura 23 D y F). A la altura de las aletas pectorales, se observa la señal en el cordón espinal, manteniendo la ausencia de señal en la aleta (Figura 23 C). Se detectó una señal definida directamente debajo de la vesícula de nado, la cual correspondía al epitelio del intestino (Figura 23 B). En los cortes laterales, se observa señal en lo que parece ser los arcos branquiales (Figura 23 F). La señal se observó a lo largo del cerebro, sin detectarse ninguna regionalización (Figura 23 G-I). En un corte lateral realizado en la parte central del embrión, se observó expresión formando una estructura muy similar a la de la arteria primaria sinodal (figura 23 H). Se observó una señal localizada a lo largo del epitelio del tubo digestivo (Figura 23 I).

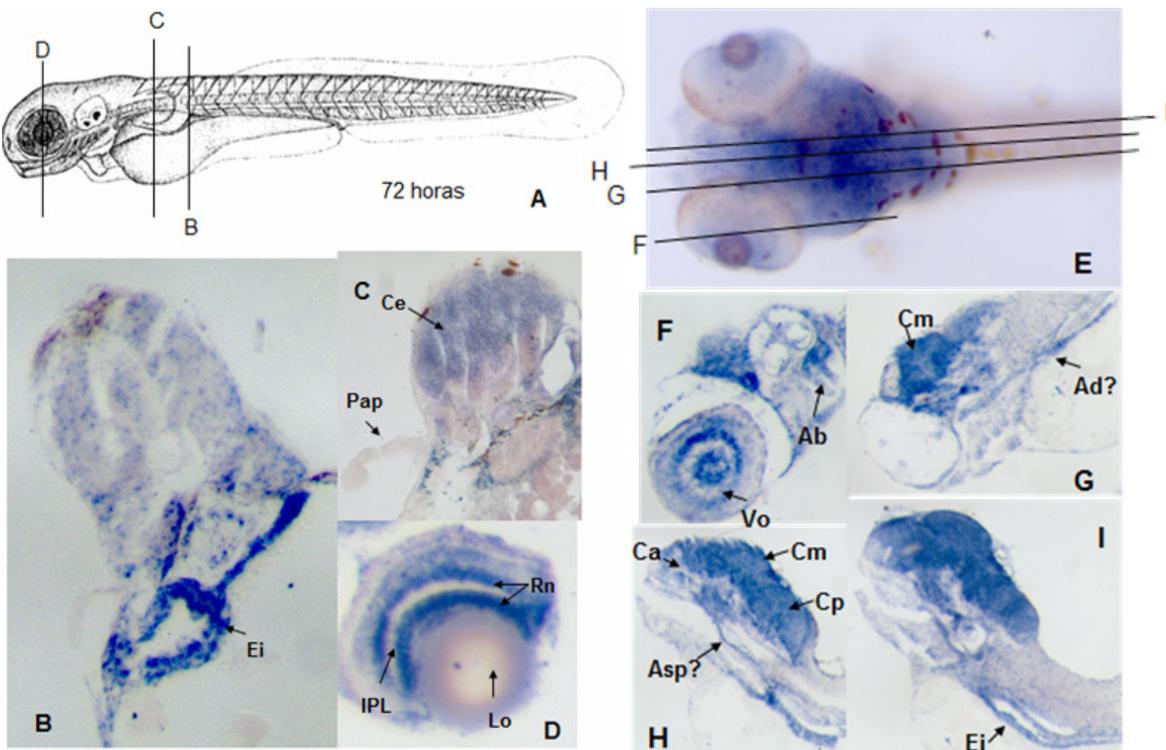


Figura 23.- Cortes de embriones de 72 hpf transversales (A-D) y laterales (E-I). Se muestra en la caricatura y en la foto de vista dorsal (A), la altura a la que se realizó cada corte. Se muestra el intestino (B, I), las aletas pectorales (C), el tubo neural (C), el ojo (D), el cerebro (G, H, I) y el posible sistema vascular (H). Ei, epitelio intestinal; Ce, cordón espinal; Pap, primordio de la aleta pectoral; Rn, retina neural; Cpi, capa plexiforme interna; Vo, vesícula óptica; Ab, arcos branquiales; Cm, cerebro medio; Ad, aorta dorsal; Ca, cerebro anterior; Cm, cerebro medio; Cp, cerebro posterior; Asp, arteria sinodal primaria.

El transcrito de *zimp10a* se detectó también en los primordios de las aletas pectorales. Como se describió anteriormente, en las extremidades embrionarias de ratón *Zimp10* se encuentra localizado en el extremo posterior de la extremidad. Esto ocurre en la etapa en que se está definiendo el patrón anterior-posterior y su expresión sobrelapa con los de otros factores que son relevantes para la determinación de dicho patrón tales como *Hand2* o *HoxD13* (34). Igualmente el morfógeno Sonic Hedgehog (*Shh*) se expresa en la línea más posterior de la extremidad en esta etapa y se ha demostrado que juega un papel importante en la determinación de la identidad de los dígitos (35). Por esa razón se prosiguió a analizar en mayor detalle el patrón de expresión de *zimp10a* en las aletas a través del desarrollo. Para este análisis, se tomaron embriones que van desde las 32hpf, que es cuando se logró identificar la región de los primordios de las aletas pectorales y es cuando se inicia el pico de expresión de *Shh* (36). En embriones completos la expresión de *zimp10a* en los primordios de las aletas se observó desde las 34hpf hasta las 48hpf, que fue el primer estadio desde la aparición de la señal, en donde ya no se detectó expresión en los primordios (Figura 24).

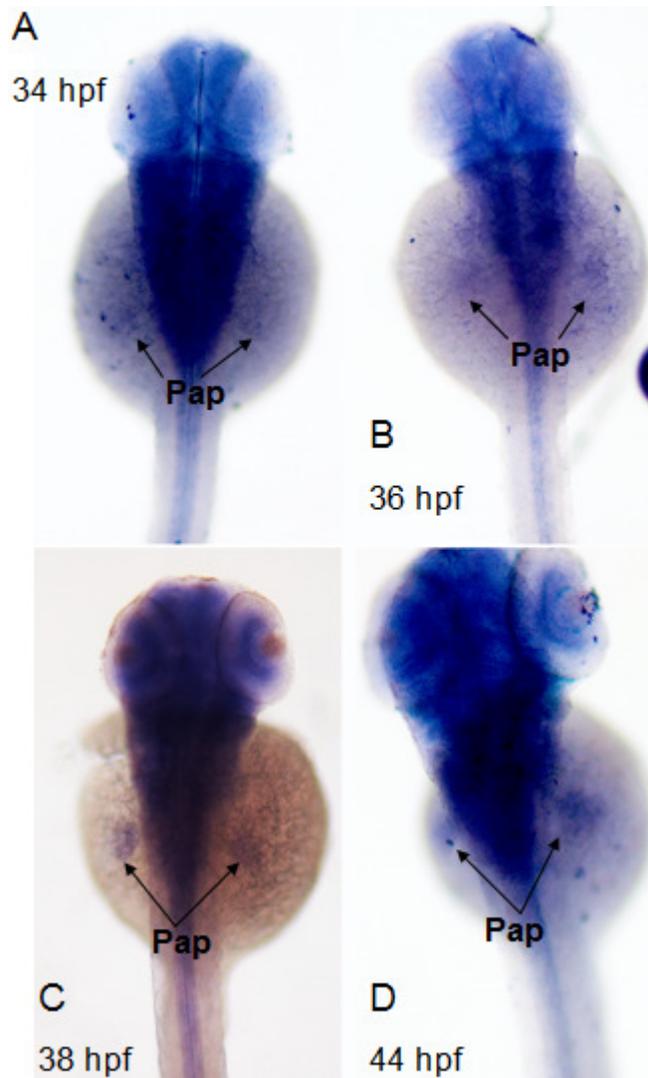


Figura 24.- Expresión de *zimp10a* en las aletas pectorales durante el desarrollo embrionario. 34 hpf (A), 36 hpf (B), 38 hpf (C) y 44 hpf (D). Se observa la señal a partir de las 34 hpf, hasta las 46 hpf. Desde este ángulo, la expresión de *zimp10a* se ve en todo el primordio de la aleta.

Posteriormente se hicieron fragmentaciones para separar las aletas de los embriones y obtener fotografías con mayor acercamiento observando así las regiones de los primordios de las aletas con mayor detalle (Figura 25). En ellas se confirma que no hay expresión a las 32 hpf (Figura 25 A) y que la expresión inicia a partir de las 34 hpf donde se detecta el transcrito en casi todo el primordio de la aleta pectoral con una mayor concentración en la parte proximal del primordio; esta distribución se mantiene hasta las 40 hpf (Figura 25. B y C). A las 44 hpf se

detectó la expresión de *zimp10a* con un patrón más generalizado en toda la aleta pectoral (Figura 25 D). Finalmente, a las 48 hpf no se observa señal en ninguna parte de la aleta.

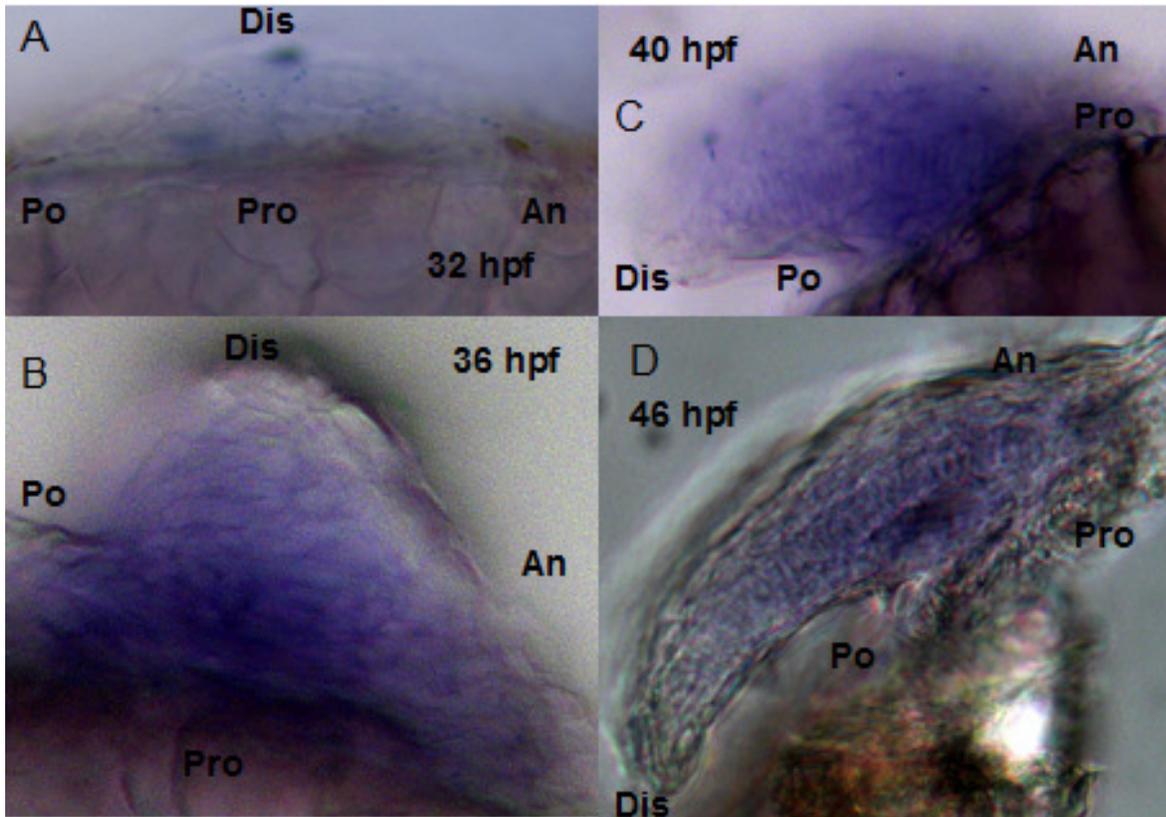


Figura 25.- Expresión de *zimp10a* en fragmentaciones de las aletas pectorales durante el desarrollo embrionario. Se observa la señal a partir de las 34 hpf, hasta las 46 hpf. Po, lado posterior; An, lado anterior; Pro, lado proximal; Dis, lado distal.

Debido a que no se encontró un patrón anterior-posterior evidente, se hicieron cortes transversales de los embriones a la altura de las aletas pectorales durante los estadios embrionarios de 36 hpf y 38 hpf con el fin de observar si hay alguna localización de la expresión de *zimp10a*. Se observó la señal localizada en toda la aleta por igual exceptuando en el pliegue apical, donde no hay expresión (Figura 26 A y B).

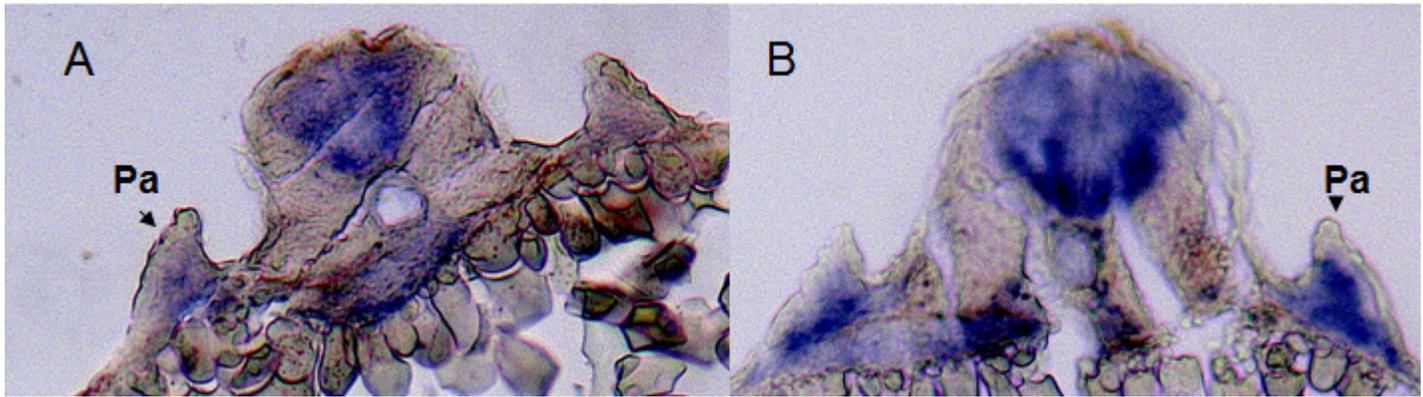


Figura 26.- Cortes transversales a la altura de la aleta pectoral. Se muestra la expresión de *zimp10a* en embriones a las 36 hpf (A) y 38 hpf (B), donde la señal se ve en todo el primordio de la aleta exceptuando el pliegue apical. Pa, pliegue apical.

Tomando en cuenta estos datos y los observados en los primordios completos, *zimp10a* no tiene una localización exclusiva de un polo en la determinación anterior-posterior o dorsoventral de las aletas pectorales, lo que si presenta es una localización en casi toda la aleta pectoral a excepción del pliegue apical, lo que sugiere que puede estar teniendo alguna actividad en el mesénquima, pero para afirmar esto, se requerirán hacer más pruebas.

- **Generación de mutaciones en *zimp10* utilizando el sistema CRISPR-Cas9**
- Diseño del RNA guía para *zimp10a*.

Con el fin de generar una mutación en *zimp10a* y establecer una línea mutante que no exprese *zimp10a* funcional, se diseñó el RNA guía para el sistema CRISPR-Cas. Se buscó una secuencia blanco lo más cercana al codón de inicio que fuera única en el genoma del pez cebra y se diseñó un par de oligonucleótidos para generar el RNA guía (Figura 27).

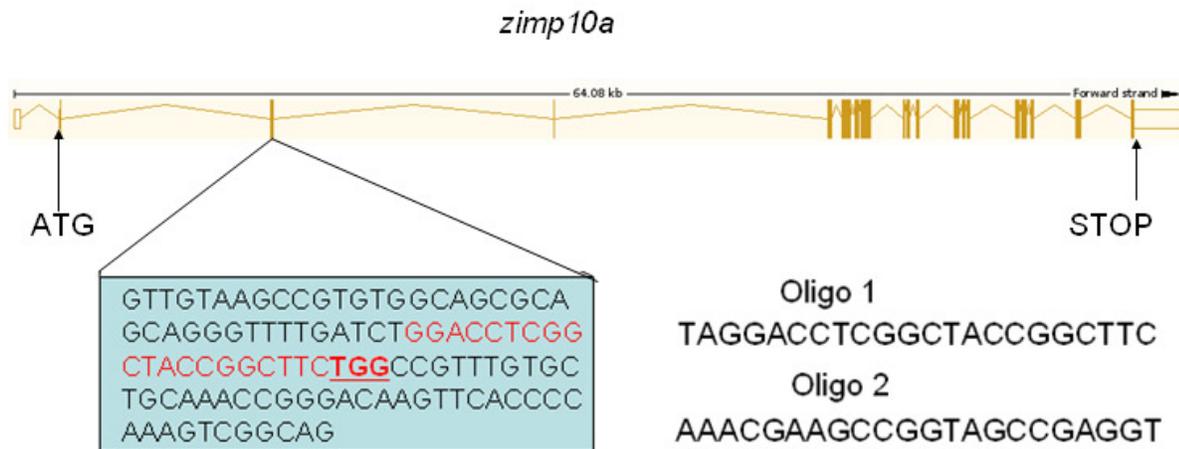


Figura 27.- Diseño del RNA guía. Se muestra la estructura general del gen *zimp10a*, con el codón de inicio y terminación marcados. Se especifica la secuencia del exón donde se localiza la secuencia blanco marcada en rojo y con el sitio PAM subrayado. Se muestran los oligonucleótidos utilizados para clonar la secuencia guía (Oligo 1 y Oligo 2).

Para corroborar de que el RNA guía sea específico para *zimp10a*, se buscó en el genoma del pez cebra las secuencias más similares a la secuencia del RNA guía. Se encontró que no hubo suficiente similitud entre la secuencia guía diseñada y las secuencias ajenas a *zimp10a* para que puedan ser identificadas y cortadas por el sistema CRISPR-Cas, ya que de la secuencia PAM (Figura 28 A) o carecen de una similitud mayor de once pares de bases (Figura 28 B) (37).

A

RNA guía <i>zimp10a</i>	8	GGCTACCGGCTTCTG	22
Secuencia cromosoma 5	316857	GGCTACCGGCTTCTG	316843

B

RNA guía <i>zimp10a</i>	11	TACCGGCTTCTGG	23
Secuencia cromosoma 25	281262	TACCGGCTTCTGG	281250

Figura 28.- resultados de la alineación del RNA guía con los blancos inespecíficos más probables. Se muestra el blanco de mayor similitud total, el cual carece de secuencia PAM (A). Blanco de mayor similitud que cuenta con secuencia PAM (B). La secuencia PAM se muestra en rojo.

- Control de mutación con *tyr*

Debido a que esta técnica no se había utilizado previamente en nuestro laboratorio, se utilizó como control positivo el plásmido para el RNA guía de la *tirosinasa (tyr)*, el cual es un gen que codifica para una enzima involucrada en la conversión de la tirosina en melanina, por lo que su ausencia da como fenotipo la ausencia de la pigmentación, lo que es fácil de detectar (24).

Se prosiguió a transcribir e inyectar el RNA guía de *tyr* y el RNA de la nCas9n. A las 48hpf se revisaron los embriones y se observaron diferentes grados de pérdida de pigmentación, desde una leve pérdida donde se tienen más del 50% de los melanocitos (Figura 29 B), otros donde la pérdida fue moderada, pero aún retienen varios melanocitos que son menos del 50% (Figura 29 C) y otros más severos donde la pérdida fue casi completa donde hay entre 10 y 30 melanocitos (Figura 29 D) o ausencia completa de melanocitos (Figura 29 E). Esto nos indica que el sistema CRISPR-Cas está funcionando y que se puede intentar utilizarlo para la edición de *zimp10a*.

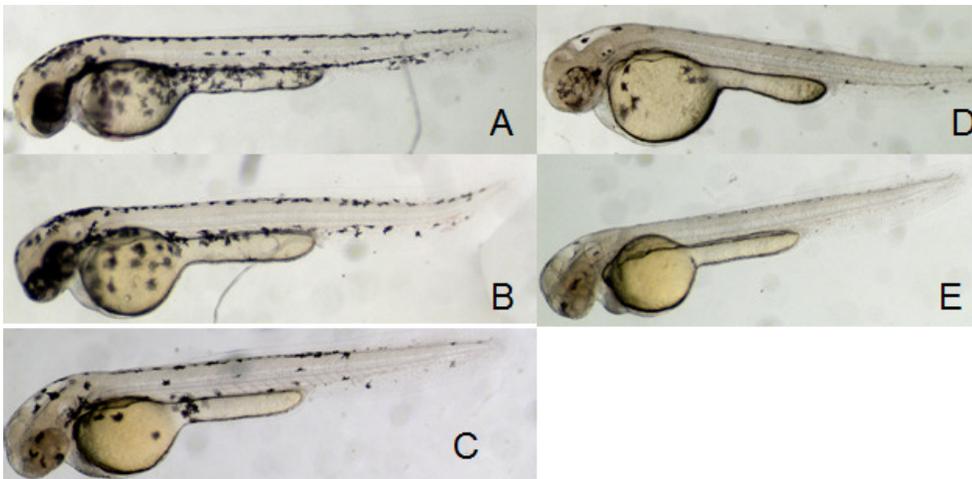


Figura 29.- Embriones de 48hpf inyectados para la edición de *tyr*. Se muestra un control sin inyectar (A), y los embriones con diferentes grados de efecto en la pérdida de melanocitos (B-E); efecto leve, donde el embrión mantiene más del 50% de los melanocitos (B); efecto intermedio, donde el embrión posee menos del 50% de los melanocitos (C), efecto severo, donde el embrión tiene sólo entre 10 y 30 melanocitos (D) y fenotipo “Sandy”, donde el embrión tiene la pérdida total de todos los melanocitos (E).

- Mutación de *zimp10a*.

Una vez determinado que se están generando mutaciones específicas con el sistema CRISPR-Cas9, se prosiguió a transcribir e inyectar el RNA guía de *zimp10a* y el RNA de la nCas9n. A las 24hpf se recolectaron los embriones inyectados y sin inyectar como control y se extrajo el DNA genómico. Se amplificó mediante PCR un fragmento de *zimp10a* que incluye la secuencia blanco a partir de los DNAs. El fragmento de PCR se analizó para la detección de heteroduplexes. Los heteroduplexes se forman únicamente en los casos en que ocurren mutaciones ya que provienen de un apareamiento inespecífico que ocurre al desnaturalizar y renaturalizar el DNA (producto del PCR), donde al alinearse una hebra con la cadena complementaria, existe una probabilidad alta de que una de las hebras tenga una mutación de inserción o deleción, mientras que la otra no la tenga, lo que forma un “loop” en la zona del apareamiento erróneo. Se procedió a visualizar los heteroduplexes mediante un análisis de T7 endonucleasa I (T7 E1). Esta enzima tiene la capacidad de detectar y cortar los “loops” formados por los heteroduplexes, lo que permite detectar la presencia de mutaciones. Otra técnica que utilizamos para visualizar los heteroduplexes, fue correr la muestra en un gel de acrilamida al 8%. En este tipo de gel, un heteroduplex tarda más en migrar que un homoduplex de cualquiera de ambas secuencias, por lo que es posible diferenciar la presencia de estos heteroduplexes en una muestra (30, 31). Se logró observar la presencia de la formación de un heteroduplex y en la digestión con la T7 E1, se observó que los fragmentos corresponden con el tamaño esperado en caso de existir la mutación, por lo que se cree que se logró mutar la secuencia de *zimp10a* (Figura 30).

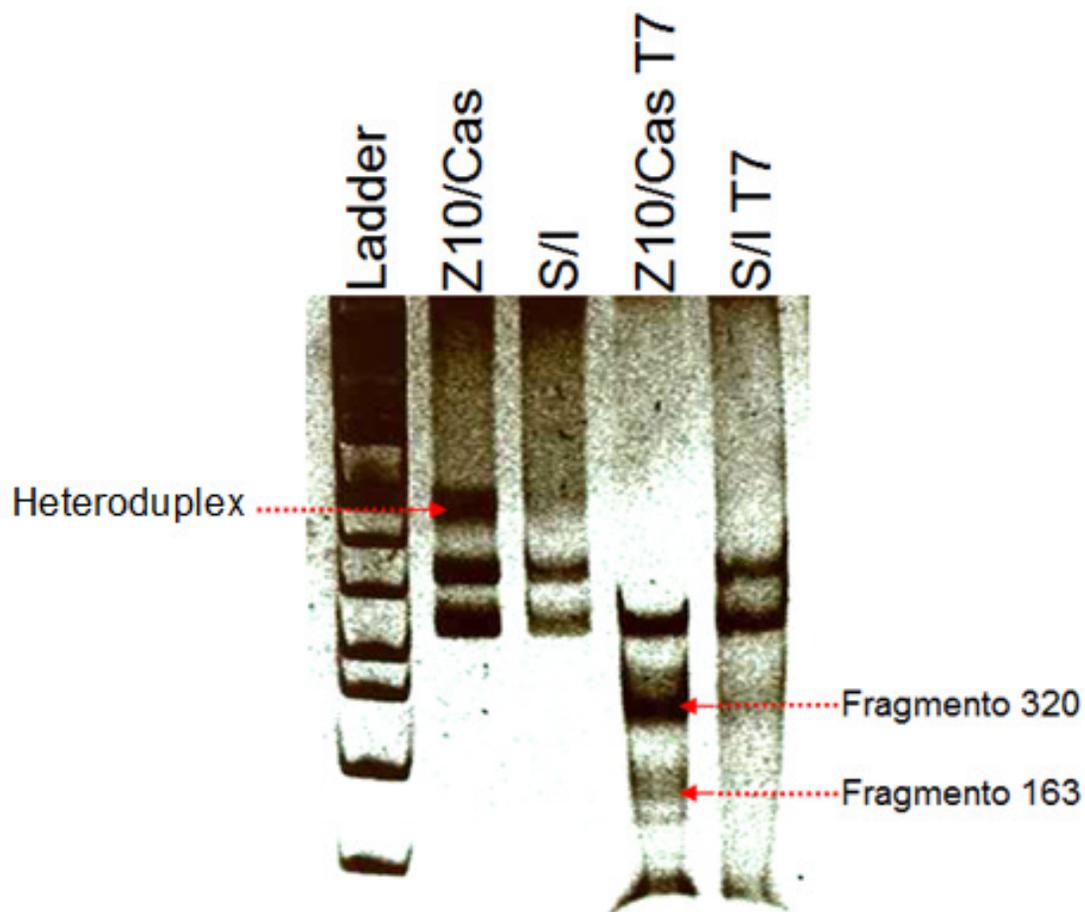


Figura 30.- Detección de la mutación en *zimp10a* en DNA genómico. Se analizaron los amplificadores de DNA obtenidos a partir de un embrión individual. Se observa la presencia del heteroduplex en el embrión inyectado con *zimp10a/Cas9* y no en el que no fue inyectado. En la muestra digerida con la T7 E1 se observan las bandas esperadas de 320 y 163 nucleótidos, correspondientes a lo esperado, por lo que lo más probable es que se tenga una mutación específica para *zimp10a*. Z10/Cas, embrión inyectado; S/I, embrión sin inyectar; Z10/Cas T7, muestra de embrión inyectado tratada con T7 E1; S/I T7, muestra de embrión sin inyectar tratada con T7 E1.

El DNA amplificado de un embrión individual se procedió a clonar en el plásmido pJet 2.1 y se secuenció. En dos de las muestras secuenciadas se detectó una misma mutación, la cual consistió en una inserción de dos nucleótidos, lo que genera un cambio en el marco de lectura (Figura 31). Con lo observado, podemos concluir que sí logramos introducir mutaciones

específicas en el gen *zimp10a* en embriones de pez cebra y se procedió a crecer peces para establecer la línea mutante.

```
zimp10a      GTTGTAAAGCCGTGTGGCAGCGCAGCAGGGTTTTGATCTGGACCTCGGCTACCGGC--TTCTGGCCGTTTGTGCTGCAAA
secuenciación GTTGTAAAGCCGTGTGGCAGCGCAGCAGGGTTTTGATCTGGACCTCGGCTACCGGCCGTTCTGGCCGTTTGTGCTGCAAA
```

Figura 31.- Secuenciación del fragmento de zimp10a mutagenizado, amplificado por PCR y clonado en pJet 2.1. Se muestra la comparación del resultado de la secuenciación del plásmido obtenido de dos colonias diferentes en el mismo proceso de clonación (Z10/CAS9) en comparación con la secuencia no mutada reportada (zimp10a). En negro se muestra la secuencia blanco donde se generó la mutación; encerrado en un círculo rojo se muestra la inserción de los dos nucleótidos y en letras rojas se muestra la secuencia PAM.

- Generación de la F0 mutante.

Una vez determinado que se logró introducir una mutación en el gen *zimp10a*, se procedió a inyectar doscientos embriones con el RNA mensajero de nCas9n y el RNA guía correspondiente. Estos embriones inyectados se dejaron crecer hasta la etapa de adultos (aproximadamente tres meses), de los cuales solo sobrevivieron dieciocho. De cada uno de los peces sobrevivientes, se disectó un fragmento de la aleta caudal y se procedió a extraer el DNA genómico. De las muestras obtenidas, se amplificó la región de *zimp10a* donde se espera la mutación. Posteriormente analizaron los fragmentos de PCR en un gel de acrilamida al 8% para buscar la presencia del heterodúplex. De ocho muestras, observamos que cuatro mostraron la presencia del heterodúplex, los cuales clasificamos como posibles positivos (Figura 32).

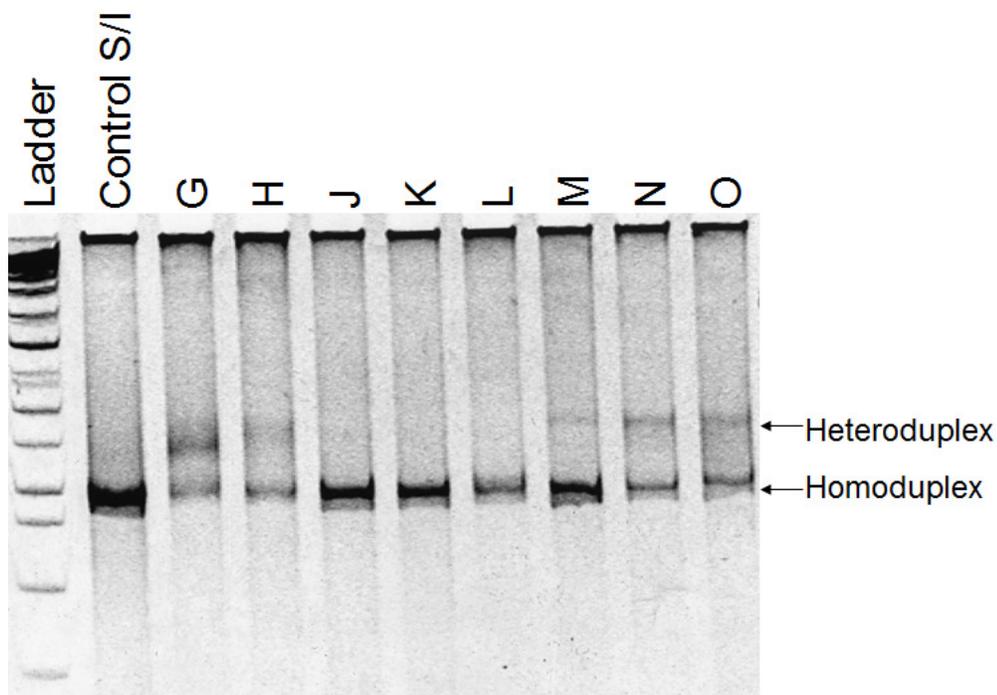


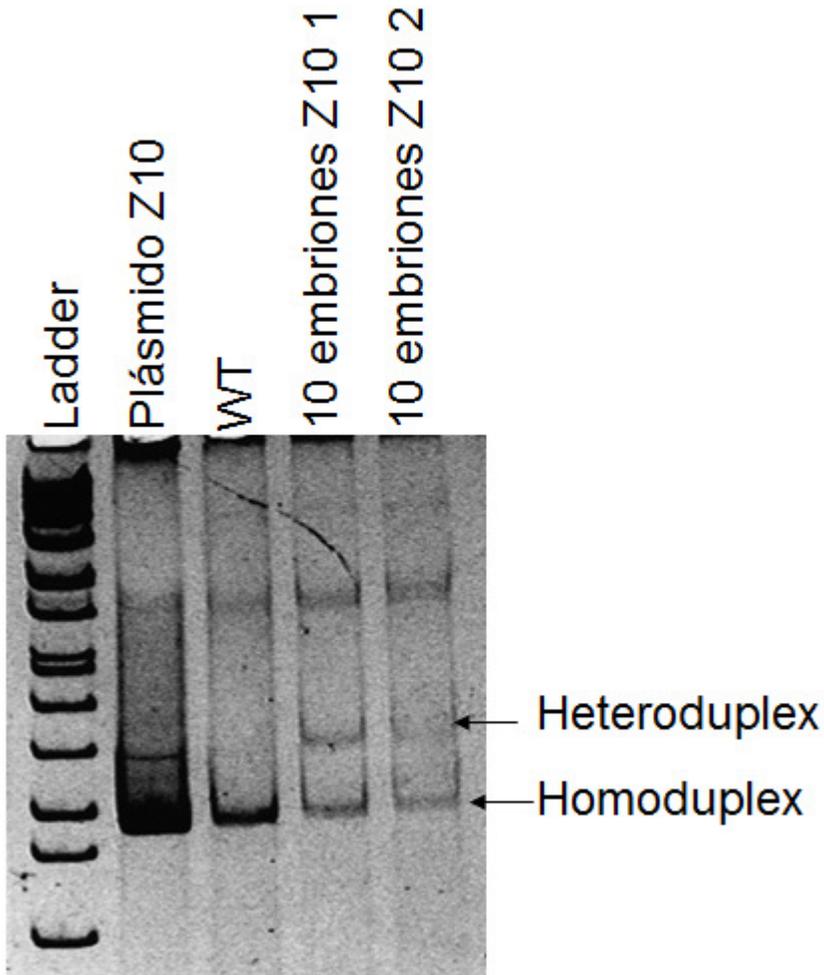
Figura 32.- Detección de la mutación en *zimp10a* en DNA genómico. A cada pez se le asignó una letra para identificación. Se analizaron los amplificados de DNAs obtenidos a partir de los cortes de cola. Se observa la presencia del heterodúplex en cinco muestras de los peces inyectados con *zimp10a*/Cas9 y no en el que no fue inyectado. Los peces que dieron positivo para la presencia del heterodúplex se separaron de los demás peces. Control S/I, DNA de pez silvestre.

Utilizando el programa “image J”, cuantificamos la intensidad de las bandas correspondientes para el heterodúplex y el homodúplex de cada carril y determinamos a que porcentaje corresponde la intensidad de la banda del heterodúplex en comparación a la sumatoria de la intensidad de ambas bandas. Este porcentaje indica de manera preliminar el posible porcentaje de mutación (Tabla 2). Con este criterio reportamos que en los peces que podrían ser positivos obtuvimos en la mayoría de los casos cerca del 35% de eficiencia, con lo cual pensamos que hay una elevada posibilidad de que al menos un pez tenga la mutación heredable.

Pez	Porcentaje de mutación
G	73%
H	35%
J	0%
K	0%
L	0%
M	8%
N	39.50%
O	32%

Tabla 2.- Cuantificación de los heterodúplex mostrados en el gel de la figura 30. Se muestra el porcentaje de la banda del heterodúplex como posible porcentaje de mutación para cada pez analizado.

Por último, se intentaron cruzar los peces que clasificamos como posibles positivos; para esto colocamos cada pez en cruza individuales con un pez silvestre de la misma cepa del sexo opuesto. De los cuatro peces que se intentaron cruzar, solo se obtuvieron embriones de la cruza del pez “G” el cual mostró un porcentaje aproximado de mutación del 73% en el gel de acrilamida (Tabla 2). De estos embriones tomamos 2 grupos de diez embriones y extrajimos el DNA y analizamos el amplificado en un gel de acrilamida. En este gel observamos que ambos grupos presentan la banda correspondiente al heterodúplex (Figura 33). Con estos datos se procederá a clonar el amplificado para mandar a secuenciar y determinar si se tiene una mutación heredable, con lo que se podrá obtener la generación F1.



*Figura 33.- Detección de la mutación en *zimp10a* en DNA genómico de la progenie. Se analizaron los amplificados de DNAs obtenidos a partir de los embriones. Se observa la presencia del heterodúplex en las dos muestras analizadas. Plásmido Z10, amplificado de plásmido de *zimp10a*; WT, amplificado de DNA de pez silvestre; 10 embriones Z10, amplificado de DNA proveniente de 10 embriones de la progenie del pez “G” con uno silvestre.*

El amplificado del grupo de embriones se procedió a clonar en el plásmido pJet 2.1 y se secuenció. Se mandaron a secuenciar siete de las veinte muestras picadas, de las siete muestras secuenciadas se detectó tres muestras con mutación, dos de ellas consistían de una deleción de siete nucleótidos (Figura 34. A), y la tercera muestra secuenciada contenía una deleción de 22 nucleótidos (Figura 34. B). Estas mutaciones generan un cambio en el marco de lectura, lo que nos lleva a esperar que se genere una pérdida de función. Con lo observado, podemos concluir

que sí logramos obtener al menos un pez adulto que transmite la mutación en *zimp10a*. Con este pez se comenzó a generar la generación F1 de la línea mutante.

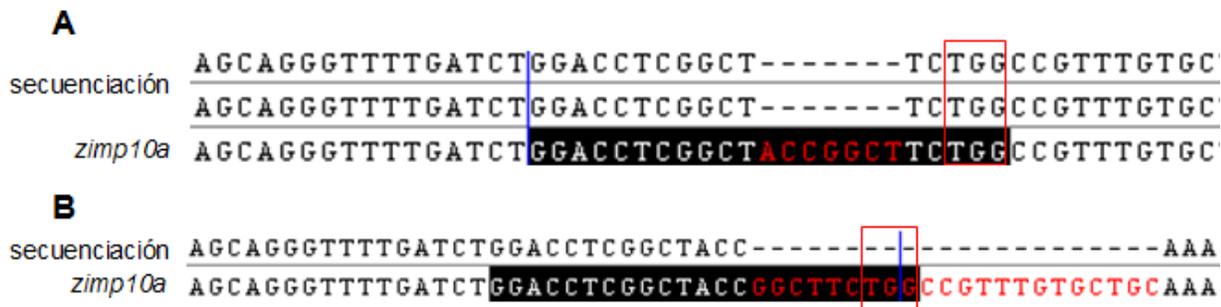


Figura 34.- Secuenciación del fragmento de *zimp10a* de los embriones recolectados de la cruce del pez “G” con un silvestre, amplificado por PCR y clonado en pJet 2.1. Se muestra la comparación del resultado de la secuenciación del plásmido obtenido de tres colonias diferentes en el mismo proceso de clonación (Z10/CAS9) en comparación con la secuencia no mutada reportada (*zimp10a*), se puede apreciar la delección de 7 pares de bases (A) y 22 pares de bases (B). En negro se muestra la secuencia blanco donde se generó la mutación; los espacios marcados con una línea representan la delección de un nucleótido, las letras rojas muestran los nucleótidos que deberían encontrarse en esos espacios en la secuencia silvestre y encerrado en un rectángulo rojo se muestra la secuencia PAM.

Discusión

ZIMP10 fue originalmente descrito como un co-regulador del receptor de andrógenos, ya que se demostró que aumenta la actividad transcripcional mediada por éste. Además, por sus características estructurales, particularmente la presencia del SP-RING, y su colocalización en el núcleo de células prostáticas con el péptido SUMO, se ha sugerido que *ZIMP10* está actuando como una E3-ligaza de SUMO (7).

Por otra parte, se ha demostrado que *ZIMP10* promueve positivamente la actividad de otras vías de importancia como P53 y Smad3/4 en cultivos celulares, por lo que es posible creer que es un gen que tiene un papel importante en la regulación de la expresión de diversos genes (8 y 9). Durante el desarrollo embrionario del ratón, se ha reportado que *Zimp10* se comienza a expresar poco después de la gastrulación, en el tejido que da origen al neuroectodermo, y se mantiene a lo largo del desarrollo teniendo una expresión muy característica en el cerebro, la aorta dorsal y en los primordios de las extremidades. En estas últimas, se demostró que existe una localización de la expresión de *Zimp10* en el extremo posterior de la extremidad durante sus primeras etapas de su formación, por lo que se sugirió que puede estar teniendo una actividad en la determinación del eje anterior-posterior de la extremidad (6). En otro trabajo se demostró que la pérdida de *Zimp10* genera embriones de menor tamaño y que morían a los 10.5dpc, debido a una vascularización defectuosa del saco vitelino (2), lo que demostró que *Zimp10* juega un papel durante la vascularización y la angiogénesis. En este trabajo encontramos evidencia de que el patrón de expresión de *zimp10a* en el pez cebra tiene coincidencias significativas con las reportadas en ratón. Por ello suponemos que tendrá también una importante participación en el desarrollo embrionario del pez cebra.

- **Organización genómica de *zimp10* en el pez cebra.**

En este trabajo se recopiló la información disponible del genoma del pez cebra sobre *zimp10* y se comparó con lo reportado en humano. Lo que se encontró es que como ocurre con la mayoría de los genes del pez cebra, *zimp10* se encuentra duplicado dando lugar a *zimp10a* y *zimp10b*. Por un análisis de sintenia se observó que *zimp10b* tiene una mayor conservación en

lo que respecta a la localización del genoma comparado con lo reportado en humano, lo cual indica que lo más probable es que la localización de *zimp10* en el ancestro común sea la correspondiente a la localización de *zimp10b* para el pez cebra. Sin embargo, cuando se compararon los dominios con los de ZIMP10 humano (6), observamos que *zimp10a* muestra una mayor conservación, por lo que creemos que *zimp10a* es el homólogo de ZIMP10 humano, es decir, el gen que mantuvo la función a lo largo de la evolución, a pesar de que lo más probable sea que *zimp10a* se haya generado durante la duplicación debido a su localización en el genoma, por lo que creemos que es el candidato que más vale la pena estudiar para tratar de entender la función de Zimp10 en el desarrollo de vertebrados. Por otro lado, *zimp10a* fue el único de los dos genes para el que logramos demostrar actividad transcripcional en este trabajo, aunque esto último no significa que *zimp10b* no se exprese, por lo que se debería realizar un trabajo más a fondo para confirmarlo.

- **Expresión de *zimp10* en el pez cebra.**

Tomando en cuenta estos datos genómicos, se procedió a demostrar en este trabajo el momento y la localización de expresión de *zimp10a* en embriones de pez cebra a lo largo de su desarrollo. Se demostró que la expresión se logra detectar mediante PCR aunque débilmente, desde antes de la transición de la blástula media, por lo que puede haber un poco de expresión materna, pero al realizar las HIS, sólo se logró observar expresión poco después de la gastrulación, aproximadamente en la etapa de 75% de epibolia. Esta aparente discrepancia en los resultados la atribuimos a la sensibilidad de las técnicas utilizadas, donde la más sensible es la reacción de PCR, pero al no ser cuantitativa, no se puede determinar si uno de los estadios observados mediante esta técnica expresa una mayor cantidad de *zimp10a*. En cualquier caso el hecho de que los resultados de PCR fueran más variables en las etapas tempranas, sugiere que en éstas el RNA mensajero de *zimp10a* está debajo del límite de detección de la HIS. Por el otro lado con la HIS, que no es tan sensible como el PCR, solo se logró detectar la expresión cuando la cantidad de transcrito se concentra en una región en particular o si la expresión es lo suficientemente alta. Por estas mismas razones creemos que aunque *zimp10a* se logró observar mediante PCR en todos los estadios analizados, la expresión ha de jugar un rol de mayor importancia después de la gastrulación, al igual que lo reportado en el ratón. En esta etapa la

diferenciación celular se encuentra más marcada y ya es posible diferenciar las células que dan origen al endodermo, el mesodermo o el ectodermo.

La expresión primeramente aparece en la zona que da origen al neuroectodermo para posteriormente expresarse en tejido neural a lo largo de todos los estadios observados, lo que puede significar que *zimp10a* juegue un papel en la diferenciación o mantenimiento del tejido neural. Durante la somitogénesis reportamos que la expresión de *zimp10a* se encontraba en la punta de la cola, por esto, creemos que *zimp10a* puede jugar un rol en el crecimiento del embrión durante la formación de las somitas.

Un dato interesante que demostramos, fue la expresión de *zimp10a* durante el desarrollo del ojo, en particular entre las 48 hpf y las 72 hpf. En estas etapas observamos que el transcrito se limitaba a la retina neural, y conforme avanzaba el desarrollo se observó un espacio sin señal en la retina neural que corresponde a la capa plexiforme interna, la cual corresponde a las uniones dendríticas. Esto nos lleva a pensar que *zimp10a* puede jugar un papel en la diferenciación neuronal o en la neurotaxis en la retina neural, aunque estos resultados son muy preliminares como para proponer algún mecanismo de acción.

Por otro lado, se logró demostrar la expresión de *zimp10a* en el tejido circulatorio durante la angiogénesis, lo cual es comparable con lo reportado en el ratón (2, 6), por lo que se puede esperar un fenotipo vascular en el caso de la pérdida de *zimp10a*, y considerando las ventajas proporcionadas por el modelo del pez cebra, quizás se lograría conseguir que el organismo sobreviva aún con los defectos vasculares y se logre intentar observar si existe algún defecto adicional.

- **Expresión de *zimp10a* en las aletas pectorales**

Otro dato que se aportó en este trabajo, es la expresión de *zimp10a* en los primordios de las aletas pectorales durante la primera etapa de su formación, en particular durante el periodo de 32hpf a 48 hpf. Está reportado que durante la primera etapa de formación de la aleta pectoral (durante las 32hpf y 72hpf), se forma una “aleta funcional”, la cual mantiene su estructura con ligeros cambios en su tamaño hasta la tercera semana de etapa larval, donde la aleta madura a su forma adulta (38). Debido a este proceso de desarrollo, es más difícil encontrar un estadio que sea comparable con el reportado en el desarrollo de las extremidades de un tetrápodo como

es el caso del ratón; por esta razón se escogió comparar los estadios donde se expresa *shh* en el pez cebra. En el ratón, durante estos estadios, se ha reportado que *shh* actúa en la zona polarizante, que es un grupo de células localizadas en el mesénquima posterior que se encarga de establecer el eje anterior-posterior, definiendo el extremo posterior del primordio, mediante un gradiente de factores entre los que se encuentran Hand2 y HoxD3 (35). Debido a que previamente se había reportado la expresión de *zimp10* en el extremo posterior de la extremidad del ratón durante los 10 y 11 *dpc*, se propuso como una hipótesis la posible función de *zimp10* en la determinación del eje anterioposterior trabajando en conjunto con la vía de *shh* (6). Lo que reportamos en este trabajo es que la expresión de *zimp10a* abarca casi toda la aleta durante los estadios de 32hpf a 46hpf, expresándose en las mismas etapas de la expresión de *shh* (32hpf-38hpf) (36), pero a diferencia de lo reportado en ratón, no se encuentra principalmente en el extremo posterior (6). La expresión de *zimp10a* se observó en casi todo el primordio de la aleta, con una mayor expresión en la parte proximal y estando ausente en la cresta epitelial apical, por lo que creemos que *zimp10a* debe de estar jugando un rol distinto a la de definir el eje anterior-posterior en el desarrollo de las aletas en el pez cebra. Aun así no se descarta que pueda estar interaccionando directa o indirectamente con algún miembro río arriba o río debajo de *shh*, facilitando que ejerza su función.

- **Especulaciones sobre la función de *zimp10a*.**

Como se había mencionado previamente, existen evidencias de que ZIMP10 humano tiene actividad en la co-regulación de la transcripción (7, 8, 9) y que en el caso del receptor de andrógenos, el aumento de su actividad la puede realizar en conjunto con subunidades como BRG1 y BAF57 que forman parte del complejo remodelador de cromatina conocido como SWI/SNF (39). Además se sabe que BRG1 es de importancia para la remodelación de la vasculatura del saco vitelino en ratón, ya que embriones de 9.5 *dpc* con mutaciones en este gen, tienen vasos sanguíneos anormalmente pequeños. De hecho es interesante que los fenotipos reportados en ratón de la pérdida de ZIMP10 y BRG1 aunque no sobrelapan completamente, tienen en común que en ambos casos los embriones mueren a los 10.5 *dpc* por

problemas en la remodelación de la vasculatura del saco vitelino, lo cual sugiere una posible interacción de ZIMP10 y BRG1 durante la angiogénesis. Todo lo anterior permite proponer que *zimp10a* de pez cebra podría estar involucrado en las vías de la angiogénesis mediante la interacción con factores remodeladores de la cromatina, en especial con algún factor perteneciente al complejo SWI/SNF. Hasta la fecha no se ha evidenciado si existe una interacción física de Zimp10a con Brg1 ni en el pez ni en otros vertebrados, por lo que sería importante realizar experimentos de coimmunoprecipitación de Brg1 y Zimp10a (40).

Por otro lado, existe evidencia de la actividad de ZIMP10 en la vía de Notch. Se ha reportado la participación de ZIMP10 en conjunto con NOTCH1, en la regulación mediante una vía indirecta, de C-MYC en células T de linfoblasto. En este caso se ha visto que en cultivos de células T de linfoblasto con ausencia de función de ZIMP10, se genera un decremento del tamaño celular, específicamente en el paso de la fase G1 a S (41).

Por el lado de NOTCH se ha reportado en ratón la interacción de NOTCH1 activado con BRG1 y que está es de importancia para que NOTCH1 se una a su receptor nuclear, RBP-J (42). Esto en conjunto con la evidencia de que en pez cebra, distintas proteínas Notchs participan en los procesos de vascularización y angiogénesis (43, 44), hace más relevante la especulación de que Zimp10 podría tener un papel en la vascularización a través de interaccionar con SWI/SNF y quizá indirectamente con proteínas Notch.

- **Generación de la mutación para generar una línea *knockout* de *zimp10a***

Por último, en este trabajo generamos mutaciones específicas en el gen *zimp10a*, con el fin de generar una línea de peces nula que permita estudiar la función del gen sin los problemas que presenta usar técnicas de pérdida parcial. Para esto se generaron mutaciones específicas en *zimp10a* mediante el uso del sistema CRISPR-Cas9. Las mutaciones que observamos se encontraban en la secuencia guía al 5' del PAM, justo donde se esperaría generar una mutación específica. Estas mutaciones obtenidas se presentaron en forma de inserciones, las cuales generan un cambio en el marco de lectura, lo que producen una proteína trunca en caso de ser traducido el transcrito de *zimp10a*. Debido al tiempo requerido para establecer una línea, en

este trabajo solo se realizó la selección hasta tener adultos de la generación F0. A pesar de que en este trabajo no se mostró ningún efecto de la pérdida de función, se dejaron los primeros pasos para establecer un modelo que será de mucha utilidad para poder continuar estudiando la función de *zimp10a* en el desarrollo embrionario, y en caso de considerarse conveniente, observar los efectos de alterar la expresión de otro gen en un fondo sin expresión de *zimp10a*. Cabe señalar que aún no sabemos si los peces que se crecieron tienen el quimerismo suficiente para que las mutaciones se hereden a la progenie. Sin embargo en ejemplos descritos recientemente se ha reportado un éxito cercano al 90% en la transmisión de las mutaciones a la siguiente generación (24). A diferencia de usar los morfolinós para el estudio de la función, esta mutante permitirá estudiar la función de *zimp10a* sin el inconveniente de que exista, aunque reducida, proteína funcional. A pesar de que *zimp10a* se expresa de manera muy general en el embrión, no creemos que sea un problema estudiar su función al generar la pérdida total de la proteína, esto lo atribuimos a que la expresión más notable se observó en estadios posteriores a la gastrulación, aparte si se considera lo reportado en el ratón donde la muerte sucede en estadios tardíos por problemas vasculares, se esperaría la presencia del fenotipo después de las 18hpf. Por otro lado si se consideran las ventajas de usar al pez cebra como modelo, permitirá seguir su desarrollo a pesar de tener una fuerte reducción de vasos sanguíneos, esto se debe a que su pequeño tamaño le permite tener una oxigenación suficiente para sobrevivir por difusión.

La generación de embriones mutantes implicó que superáramos algunos obstáculos. Entre los principales problemas se encontró ajustar la cantidad de RNAs de Cas9 y guía por inyectar, ya que muy poco no generaba mutaciones detectables, por lo que en caso de haberlas, sería muy improbable de que se encontrarán en las células germinales y por ende no servirían para establecer la mutante. Por otro lado, inyectar demasiado RNA guía y/o Cas9, causaban defectos en la formación de los embriones, los cuales no caracterizamos si son específicos por la deficiencia de *Zimp10a* o si se produce por toxicidad por la cantidad de RNA inyectado. Estos embriones no sobrevivían el desarrollo y por lo tanto tampoco servían para establecer la línea deficiente en *zimp10a*. Otra dificultad presentada fue durante el crecimiento de los peces, donde se logró crecer el 20% de los que se tenían al comenzar, lo cual vuelve más complicado

obtener peces adultos que tengan un alto porcentaje de mutación y que sean candidatos óptimos para establecer la línea mutante. A pesar de estas dificultades, se mostró en este trabajo que ya se está estableciendo la mutante *knockout* de *zimp10a* utilizando esta herramienta de última generación, a pesar de que se reportó muy recientemente. Además a través del uso del RNA guía de la tiosinasa, demostramos que logramos introducir mutaciones con una alta eficiencia, incluso de manera bialélica. El manejo de esta herramienta representa un avance de la mayor importancia para el laboratorio.

Conclusiones

- *zimp10* en pez cebra está duplicado, el más conservado a nivel de secuencia es *zimp10a*.
- *zimp10a* se expresa en todos los estadios embrionarios, pero el patrón solo es detectable a partir de la gastrulación, y se expresa en el tejido neural y circulatorio de forma muy similar a lo reportado en ratón.
- *zimp10a* se expresa en las aletas pectorales durante su formación, pero a diferencia de lo reportado en ratón, no presenta una distribución anterior-posterior o dorsal-ventral.
- Se introdujeron mutaciones específicas en *zimp10a*, y se crecieron peces que tienen mutaciones similares. De esta manera estamos en camino de establecer una línea transgénica con pérdida de función de *zimp10a*.

ANEXO

Soluciones

PBS 1x 100 ML

NaCl 8 g

KCl 0.2 g

NaHPO₄ 1.44 g

KH₂PO₄ 0.24 g

Agua 100 ml

Ajustar pH a 7.4

PBST 1X 100 ml

PBS 1X 100 ml

Tween 20 100 ul

Solución de hibridación para HIS 50 ml.

Formamida 25 ml

SSC 20% pH 4.5 12.5ml

SDS 20% 2.5 ml

RNA_t 0.230 ml

Heparina 10mg/ml 0.250 ml

Agua DEPC cbp 50 ml

Buffer de Hibridación

Tris pH7.5-8.0	1.21 g
NaCL	2.92 g
EDTA 0.5M	2 ul
Agua MiliQ	1 L

Buffer Blobel

Tris HCl ph 8	0.605 g
EDTA	2.92 g
NaCl	0.59 g
SDS	1 g
Protainasa K 20mg/ml	3 ul
Agua MiliQ	100 ul

Anestésico para peces

Tricaína	0.250 g
Agua para peces	500 ml

Referencias

1. Beliakoff, J. Sun, Z. (2006). ZIMP7 and ZIMP10, two novel PIAS-like proteins, function as androgen receptor coregulators. *Nuclear Receptor Signaling*. 4. e017.
2. Beliakoff, J. Lee, J. Ueno, H. Aiyer, A. Weissman, I L. Barsh, G S. Cardiff, R D. Sun, Z. (2008). The PIAS-like protein ZIMP10 is essential for embryonic viability and proper vascular development. *Molecular and Cellular Biology*. 28. 1. 282-292
3. Hochstrasser, M. (2001). SP-RING for SUMO: new functions bloom for a ubiquitin-like protein. *Cell*. 107. 1. 5-8.

4. Kahyo, T. Nishida, T. Yasuda, H. (2001). Involvement of PIAS1 in the sumoylation of tumor suppressor p53. *Molecular cell*. 8. 3. 713-718
5. Gutierréz, L. Zurita, M. Kennison, J A. Vázquez, M. (2003). The *Drosophila* trithorax group gene tonalli(tna) interacts genetically with the Brahma remodeling complex and encodes an SP-RING finger protein. *Development*. 130. 2. 343-354.
6. Rodriguez, H. Merino, E. Schnabel, D. Ramírez, L. Lomelí, H. (2008). Spatial and temporal expression of Zimp7 and Zimp10 PIAS-like proteins in the developing mouse embryo. *Gene Expression Patterns*. 8. 3. 206-213.
7. Sharma, M. Li, X. Wang, Y. Zarnegar, M. Huang, C. Palvimo, J J. Lim, B. Sun, Z. (2003). hZIMP10 is an androgen receptor co-activator and forms a complex with SUMO-1 at replication foci. *EMBO Journal*. 22. 22. 6101-6114.
8. Li, X. Thyssen, G. Beliakoff, J. Sun, Z. (2006). The novel PIAS-like protein hZimp10 enhances Smad transcriptional activity. *The Journal of Biological Chemistry*. 281. 33. 23748-23756.
9. Lee, J. Beliakoff, J. Sun, Z. (2007). The novel PIAS-like protein hZIMP10 is a transcriptional co-activator of the p53 tumor suppressor. *Nucleic Acids Research*. 35. 13. 4523-4534.
10. Schmidt, D. Müller, S. (2003). PIAS/SUMO: new partners in transcriptional regulation. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 60. 12. 2561-2574.
11. Geiss-Friedlander, R. Melchior, F. (2007). Concepts in sumoylation: a decade on. *Nature reviews. Molecular Cell Biology*. 8. 12. 947-956.
12. Palvimo, J J. (2007). PIAS proteins as regulators of small ubiquitin-related modifier (SUMO) modifications and transcription. *Biochemical Society Transactions*. 35. 6. 1405-1408.
13. Streisinger, G. (1984) Attainment of minimal biological variability and measurements of genotoxicity: production of homozygous diploid zebra fish. *Natl. Cancer Inst. Mono.*65:53-58.
14. Kimmel, C B. (1989). Genetics and early development of zebrafish. *Trends in genetics*. 5. 8. 283-288.
15. <http://news.stanford.edu/news/2007/october17/med-fishsleep-101707.html> foto por Philippe Mourrain

16. (1996). development. 123. 1.
17. Lele, Z. Krone, P.H. (1996). The zebrafish as a model system in developmental, toxicological and transgenic research. *Biotechnology Advances*. 14. 1. 57-72.
18. Kimmel, C B. Ballard, W W. Kimmel, S R. Ullmann, B. Schilling, T F. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics*. 203. 3. 253-310.
19. Gaj, T. Gersbach, C. Barbas, C. (2013). ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends in biotechnology*. 31. 7. 397-405.
20. Mali, P. Yang, L. Esvelt, K. Aach, J. Guell, M. DiCarlo, J. Norville, Julie E. Church, G. (2013). RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*. 339. 6121. 823-826.
21. Mali, P. Esvelt, K. Church, G. (2013). Cas9 as a versatile tool for engineering biology. *Nature methods*. 10. 10. 957-963.
22. Hwang, W. Fu, Y. Reyon, D. Maeder, M. Tsai, S. Sander, J. Peterson, R. Yeh, J. Joung, J. (2013). Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nature biotechnology*. 31. 3. 227-229.
23. Hsu, P. Scott, D. Weinstein, J. Ran, F. Konermann, S. Agarwala, V. Li, Y. Fine, E. Wu, X. Shalem, O. Cradick, T. Marraffini, L. Bao, G. Zhang, F. (2013) DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Trends in biotechnology*. 31. 9.
24. Jao, L. Wente, S. Chen, W. (2013). Efficient multiplex biallelic zebrafish genome editing using a CRISPR nuclease system. *PNAS*. 110. 34. 13904-13909
25. Rodríguez, H. Ramírez, L. Schnabel, D. Vázquez, M. Lomelí, H. (2010). Sexually dimorphic gene expression of the *Zimp7* and *Zimp10* genes in embryonic gonads. *Gene Expression Patterns*. 10. 1. 16-23.
26. Thisse, C. Thisse, B. (2008). High-resolution in situ hybridization to whole-mount zebrafish embryos. *Nature methods*. 3. 1. 59-69.
27. Sabaliauskas, N. Foutz, C. Mest, J. Budgeon, L. Sidor, A. Gershenson, J. Joshi, S. Cheng, K. (2006). High-throughput zebrafish histology. *Methods*. 39. 3. 246-254.
28. Sander, J. Zaback, P. Joung, K. Voytas, D. Dobbs, D. (2007). Zinc Finger Targeter (ZiFiT): an engineered zinc finger/target site design tool. *Nucleic acids research*. 35.

29. Sander, J. Maeder, M. Reyon, D. Voytas, D. Joung, K. Dobbs, D. (2010). ZiFiT (Zinc Finger Targeter): an updated zinc finger engineering tool. *Nucleic acids research*. 38. 462-468.
30. Babon, J. Mckenzie, M. Cotton, R. (2003). The use of Resolvase T4 Endonuclease VII and T7 Endonuclease I in Mutation Detection. *Molecular biotechnology*. 23. 1. 73-81
31. Chen, J. Zhang, X. Wang, T. Li, Z. Guan, G. Hong, Y. (2012). Efficient detection, quantification and enrichment of subtle allelic alterations. *DNA research*. 19. 5. 423-433.
32. Zebrafish Information Network (ZFIN), the Zebrafish International Resource Center, University of Oregon, Eugene, OR 97403-5274;
33. <http://www.imageconsortium.org/>
34. Galli, A. Robay, D. Osterwalder, M. Bao, X. Bénazet, J. Tariq, M. Paro, R. Mackem, S. Zeller, R. (2010). Distinct roles of Hand2 in initiating polarity and posterior Shh expression during the onset of mouse limb bud development. *PLoS genetics*. 6. 4. 901.
35. Zhu, J. Nakamura, E. Nguyen, M. Bao, X. Akiyama, H. Mackem, S. (2008). Uncoupling Sonic hedgehog control of pattern and expansion of the developing limb bud. *Developmental cell*. 14. 4. 624-632.
36. Neumann, C. J. Grandel, H. Gaffield, W. Schulte-Merker, S. Nüsslein-Volhard, C. (1999). Transient establishment of anteroposterior polarity in the zebrafish pectoral fin bud in the absence of sonic hedgehog activity. *Development*. 126. 21. 4817-4826.
37. Hsu, P. Scott, D. Weinstein, J. Ran, F. Konermann, S. Agarwala, V. Li, Y. Fine, E. Wu, X. Shalem, O. Cradick, T. Marraffini, L. Bao, G. Zhang, F. (2013). DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nature biotechnology*. 31. 9. 827-832.
38. Grandel, H. Schulte-Merker, S. (1998). The development of the paired fins in the zebrafish (*Danio rerio*). *Mechanisms of development*. 79. 1-2. 99-120.
39. Li, X. Zhu, C. Tu, W. Yang, N. Qin, H. Sun, Z. (2011). ZMIZ1 preferably enhances the transcriptional activity of androgen receptor with short polyglutamine tract. *PloS one*. 6. 9. e25040.
40. Griffin, C. Brennan, J. Magnuson, T. (2008). The chromatin-remodeling enzyme BRG1 plays an essential role in primitive erythropoiesis and vascular development. *Development*. 135. 3. 493-500.

41. Rakowski, L. Garagiola, D. Li, C. Decker, M. Caruso, S. Jones, M. Kuick, R. Cierpicki, T. Maillard, I. Chiang, M. (2013). Convergence of the ZMIZ1 and NOTCH1 pathways at C-MYC in acute T lymphoblastic leukemias. *Cancer research*. 73. 2. 930-941.
42. Takeuchi, J. Lickert, H. Bisgrove, B. Sun, X. Yamamoto, M. Chawengsaksophak, K. Hamada, H. Yost, H. Rossant, J. Bruneau, B. (2007). Baf60c is a nuclear Notch signaling component required for the establishment of left-right asymmetry. *PNAS*. 104. 3. 846-851.
43. Quillien, A. Moore, J. Shin, M. Siekmann, A. Smith, T. Pan, L. Moens, C. Parsons, M. Lawson, N. (2014). Distinct Notch signaling outputs pattern the developing arterial system. *Development*. 141. 7. 1544-1552.
44. Wang, Y. Pan, L. Moens, C. Appel, B. (2014). Notch3 establishes brain vascular integrity by regulating pericyte number. *Development*. 141. 2. 307-317.