



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

ESTUDIOS SOBRE EL ORGANIZADOR CAUDAL: UN NICHU DE CÉLULAS QUE
ESTABLECE EL PATRON CORPORAL BASICO DURANTE EL DESARROLLO DEL
PEZ CEBRA

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

MARYANA TINOCO CUÉLLAR

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. ERNESTO MALDONADO OLVERA
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA, UNAM
COMITÉ TUTOR: DRA. BERENICE GARCÍA PONCE DE LEÓN
INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM
DRA. MARINA MACÍAS SILVA
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM

MÉXICO, D.F. Noviembre, 2015



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**ESTUDIOS SOBRE EL ORGANIZADOR CAUDAL: UN NICHOS DE CÉLULAS QUE
ESTABLECE EL PATRON CORPORAL BASICO DURANTE EL DESARROLLO DEL
PEZ CEBRA**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

MARYANA TINOCO CUÉLLAR

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. ERNESTO MALDONADO OLVERA
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA, UNAM
COMITÉ TUTOR: DRA. BERENICE GARCÍA PONCE DE LEÓN
INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM
DRA. MARINA MACÍAS SILVA
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM

MÉXICO, D.F. Noviembre, 2015

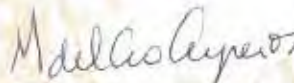
Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina en su sesión ordinaria, celebrada el día 03 de agosto de 2015, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna, **MARYANA TINOCO CUELLAR** con número de cuenta **304196186** con la tesis "**Estudios sobre el organizador caudal: un nicho de células que establece el patrón corporal básico durante el desarrollo del pez cebra**", realizada bajo la dirección del **DR. ERNESTO MALDONADO OLVERA**:

Presidente: DR. LUISA ALVARINA ALBA LOIS
Vocal: DR. FERNANDO LÓPEZ CASILLAS
Secretario: DRA. BERENICE GARCÍA PONCE DE LEÓN
Suplente: DRA. ROSA ESTELA NAVARRO GONZÁLEZ
Suplente: DRA. LAURA KAWASAKI WATANABE

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 12 de octubre de 2015.



DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



c.c.p. Expediente del (la) interesado (a)

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM, por darme la oportunidad de seguir mis estudios y culminarlos de manera exitosa.

Al apoyo recibido por CONACYT (con número CVU/Becario 5086998/290019), quien me otorgó la beca para ser posible el desarrollo de mi maestría.

Este trabajo se realizó bajo la asesoría del Dr. Ernesto Maldonado Olvera, a quien agradezco por su confianza y la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo.

A los miembros de mi Comité Tutor, la Dra. Berenice García y la Dra. Marina Macías, por sus consejos, paciencia y alientos que en todo momento me brindaron, así como la confianza para llevar a cabo mi proyecto hasta el final. Son un ejemplo de excelentes científicas y personas.

AGRADECIMIENTOS A TITULO PERSONAL

A mis padres

- ❖ En primer lugar, y como siempre presente en mis pequeños y grandes logros están mis padres, Ana María Cuéllar Pazarán y José Tinoco Sánchez, quienes me han enseñado a través del ejemplo lo que es el trabajo duro y honesto. Me han brindado una confianza y apoyo insuperables, los quiero y admiro. Esto es por ustedes.

A mi familia

- ❖ A la familia Ceceña-Tinoco, mi prima-hermana Yaczilth, que a pesar de los años y circunstancias ha estado siempre a mi lado, igualmente a mis tíos Luz María y Ernesto y a mi ahijado Chucho.
- ❖ A la familia Cuéllar-Pazarán, por el impulso y alicientes que en todo momento me han brindado, soy muy afortunada por ser parte de esta familia.
- ❖ A mis padrinos Inés Mercado y Hernán Sánchez[†] por su ejemplo y apoyo.

A mis compañeros del laboratorio a quienes tengo la dicha de llamarles amigos

- ❖ A la M. en C., Cecilia Zampedri, quien fue mi maestra y me inició en la biología del desarrollo, gracias por tus enseñanzas y tus palabras. Fue un placer compartir la experiencia del Congreso en Chile con vos.
- ❖ Al Biól. José Luis Ramos por tantas cosas; enseñanzas en las técnicas del laboratorio, en el acuario y por la ayuda en la revisión del presente trabajo, gracias José.
- ❖ A la Dra. Aida Guzmán, a quien admiro sobre todo por su calidez como persona y porque nunca niega el conocimiento a nadie, al contrario, inspira a los que la rodean.
- ❖ A la Dra. Rebeca López, una mujer fuerte y con unos sentimientos preciosos, gracias por tu ejemplo de vida y por tu amistad en todo momento.
- ❖ A la Señora Rocío Camarillo, que nos consciente tanto y quien siempre tuvo un abrazo y una palabra de apoyo, no sabe cuanto la queremos Señora.
- ❖ A la Biomédica Abigail Téllez, personita que me sorprendió mucho al conocerla, gracias Aby además de las enseñanzas académicas, por tu confianza y las experiencias en Puerto Morelos que nunca olvidaré, y con las cuales tuve la oportunidad de crecer.

- ❖ A la Biól. Ana Santacruz por tantas experiencias y risas compartidas fuera y dentro del laboratorio, gracias por tu apoyo y amistad en momentos cruciales.
- ❖ Al Biól. Oscar por tu amistad, por la ayuda y experiencias en Puerto Morelos, sobre todo en los últimos meses y por ser un excelente alumno salsero, gracias.
- ❖ A la pequeña Gaby con quien compartí micro-pipetas hasta el último segundo de la mudanza, gracias por tus consejos, tu amistad y experiencias que para ambas fueron nuevas, un placer haberlas pasado a tu lado.

No en todas las maestrías se tiene la oportunidad de tener dos laboratorios y por consiguiente el doble de personitas que fueron parte de esta historia.

- ❖ A la Dra. Paty Thomé, es un ejemplo para mí por su calidad como investigadora y tutora pero más aún como persona.
- ❖ Al M. en C. Luis Parmenio Suescún por esas horas hasta la madrugada en el laboratorio, pero sobre todo por esa inspiración para siempre ser el mejor.
- ❖ A la Biól. Nancy Pérez, personita con quien llevas un día de conocerla y sabes que será una amistad duradera, gracias por tu apoyo, fue increíble conocerte y tener siempre tu apoyo y amistad, gracias Nancy.
- ❖ Al Dr. Fernando López Casillas, por permitirme realizar una parte de mi proyecto en su laboratorio, así como a la Bióloga Lizbeth Ramírez y al M. en C. Gilberto por la ayuda en dicha estancia.

A mis amigos que a través de los años y mis locuras siguen acompañándome

- ❖ A la Biól. Priscila Torres, a mi orgullosa amiga. Tanto que decirte y agradecerte pero puedo resumirlo en que hemos caminado, hemos caído pero sobre todo nos hemos levantado durante este interesante camino hacia la investigación y lo mejor es que aún nos falta recorrer muchos tramos pero lo haremos juntas.
- ❖ Al Biól. Francisco Mendoza, por regresar en una etapa crucial, recordándome que no importa el tiempo o la distancia una amistad sincera siempre estará ahí, gracias por brindarme tu apoyo y tus palabras.
- ❖ Al Dr. Bartolomé Reyes por siempre creer en mí y alentarme día con día, eres un gran amigo y ejemplo, además de la ayuda en la revisión del presente trabajo.
- ❖ Al M. en C. Josué Solís, por sus consejos y su paciencia, gracias por estar en momentos cruciales.
- ❖ Al M. en C. Juan Hernández por tu calidez como persona, tus consejos y también por ayudarme con la revisión de este trabajo.

A mis amigos salseros

- ❖ Biól. Rubén Galicia, Lic. Dave Escalera, M. en C. Helga López, Ing. Orlando Balcazar, Lic. Ximena Sandoval, Lic. Francisco Aguilar, Lic. Lorena López y al Matemático José Juan López, a cada uno tengo que agradecerle por tantas cosas, pero me encanta saber que una pasión compartida trajo consigo momentos que además de reír, disfrutar y bailar, me demostraron una amistad muy valiosa. Los quiero chicos.

A mi Jurado para examen de Grado

- ❖ Dra. Luisa Alvarina Alba Lois
- ❖ Dr. Fernando López Casillas
- ❖ Dra. Berenice García Ponce de León
- ❖ Dra. Rosa Estela Navarro González
- ❖ Dra. Laura Kawasaki Watanabe

Por la ayuda y los comentarios realizados en el presente trabajo, los cuales me permitieron crecer y culminar de manera satisfactoria mi trabajo.

A mis padres

Estamos ante la presencia de acertijos,
pero no sin la esperanza de resolverlos.
Y los acertijos con la esperanza de ser resueltos.
¿Qué más puede desear un científico?

Hans Spemann

INDICE

LISTA DE FIGURAS Y CUADROS	12
ABREVIATURAS	14
RESUMEN	15
ABSTRACT	17
1 INTRODUCCIÓN	19
1.1 El pez cebra como modelo de estudio	19
1.2 El organizador de Spemman y organizador caudal	20
1.3 Vías de señalización en el organizador caudal posterior a la gastrulación	23
1.4 Las proteínas RNA helicasas y la superfamilia de las DEAD-box helicasas	26
1.5 La RNA helicasa P54	28
2 ANTECEDENTES	31
3 HIPOTESIS	32
4 OBJETIVOS	32
5 METODOLOGIA	33
5.1 Mantenimiento de los peces cebra y obtención de embriones	33
5.2 Extracción de RNA total	33
5.3 Preparación de cDNA	34
5.4 Clonación de los genes <i>floating head</i> , <i>nogina1</i> , <i>nogina2</i> y <i>nogina5</i>	35
5.5 Obtención de la sonda mediante transcripción <i>in vitro</i>	37
5.6 Microinyección de morfolinós (MOs)	38
5.7 Hibridación <i>in situ</i>	39
6 RESULTADOS	41
6.1 Las RNA helicasas p54a y p54b participan en la morfogénesis de las partes caudales del pez cebra.	41
6.1.1 Los morfantes de la RNA helicasa p54a muestran defectos en la formación de estructuras caudales.	41
6.1.2 Los morfantes para la RNA helicasa p54b muestran mayor heterogeneidad en los fenotipos pero menor severidad.	43
6.1.3 Los dobles morfantes para la RNA helicasa p54a+p54b muestran un fenotipo más severo y pérdida de algunas estructuras posteriores.	44
6.2 Clonación de los genes <i>floating head (flh)</i>, <i>nogina1 (nog1)</i>, <i>nogina2 (nog2)</i> y <i>nogina5 (nog5)</i>.	45
6.2.1 Clonación del gen <i>floating head (flh)</i> el cual es esencial para la formación de la notocorda y un marcador de la misma.	45
6.2.2 Clonación de los genes <i>nogina1 (nog1)</i> , <i>nogina2 (nog2)</i> y <i>nogina5 (nog5)</i> , los cuales son inhibidores en la vía de Bmp.	48
6.3 Caracterización de los morfantes de la RNA helicasa p54a y p54b	52
6.3.1 La expresión del gen <i>bmp4</i> se pierde en la epidermis de la parte dorsal de los morfantes de p54b y en los dobles morfantes.	52
6.3.2 El patrón de expresión para los marcadores <i>fgf8a</i> y <i>shha</i> muestran alteraciones únicamente en la región caudal de los dobles morfantes para la RNA helicasa p54.	54

6.3.3 Los morfantes para la RNA helicasa no muestran alteraciones en la formación de la notocorda	56
7 DISCUSION	58
8 CONCLUSIONES	63
9 PERSPECTIVAS	63
10 LITERATURA CITADA	64
11 ANEXO 1	72
12 ANEXO2	73

LISTA DE FIGURAS Y CUADROS

- Figura 1** Etapas de desarrollo embrionario en el pez cebra.
- Figura 2** Formación de un segundo eje embrionario mediante el trasplante del labio dorsal del blastoporo, conocido como “Organizador de Spemann”.
- Figura 3** Contribución de tejidos axiales y no-axiales en la formación de la cola del pez cebra.
- Figura 4** Participación de las vías de señalización de BMP, Nodal y Wnt en el desarrollo del pez cebra.
- Figura 5** Modelos propuestos para la formación de la cola a través de las vías de señalización de Bmp y de Wnt en etapas posteriores a la gastrulación.
- Figura 6** Fenotipos de la expresión ectópica de Bmp durante la formación de la cola del pez cebra.
- Figura 7** Núcleo de las helicasas de las proteínas SF1 y SF2.
- Figura 8** Arquitectura de la superfamilia DEAD-box helicasas.
- Figura 9** Fenotipo de la doble morfante de p54a+p54b a las 24hpf.
- Figura 10** Electroforesis de los plásmidos sin digerir y tratados con diferentes enzimas de restricción de cada uno de los plásmidos extraídos y clonados.
- Figura 11** Electroforesis de las sondas para hibridación *in situ*.
- Figura 12** Fenotipos observados a las 24hpf en los embriones microinyectados con el morfolino para la RNA helicasa p54a (6.25µg/µl) .
- Figura 13** Fenotipos observados a las 24hpf en los embriones microinyectados con el morfolino para la RNA helicasa p54b (3.75µg/µl).
- Figura 14** Fenotipos en los embriones co-inyectados a las 24hpf con los MO para la RNA helicasa p54a+p54b (15ng/3.5nl y 9ng/3.5nl, respectivamente).
- Figura 15** Clonación del gen *floating head (flh)*.
- Figura 16** Hibridación *in situ* del gen *floating head (flh)* en embriones WT.
- Figura 17** Clonación de los genes *nogina1 (nog1)*, *nogina2 (nog2)* y *nogina5 (nog5)*.

- Figura 18** Sonda para el gen *nogina1 (nog1)*.
- Figura 19** Hibridación *in situ* del gen clonado *nogina1 (nog1)* en embriones WT.
- Figura 20** Hibridación *in situ* de marcadores relacionados con la vía de Bmp en los morfantes de la RNA helicasa p54a, p54b y dobles morfantes (p54a+p54b) a las 24hpf.
- Figura21** Hibridación *in situ* de los marcadores *krox20*, *fgf8a* y *shha* en los morfantes de la RNA helicasa p54a, p54b y dobles morfantes (p54a+p54b) a las 24hpf.
- Figura 22** Hibridación *in situ* de las sondas *flh* y *no tail* en los morfantes de la RNA helicasa p54a, p54b y dobles morfantes (MOp54a+p54b) a las 24hpf.
- Cuadro 1** Primers utilizados para los genes *floating head (flh)*, *nogina1 (nog1)*, *nogina2 (nog2)*, y *nogina5 (nog5)*.
- Anexo1** Soluciones utilizadas en la técnica de hibridación *in situ*.
- Anexo2** Alineamiento de las secuencias para los genes *floating head (flh)* y *nogina5 (nog5)*.

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ATP	Adenosín trifosfato
A/P	Antero-posterior
BMP	Bones Morphogenetics Proteins
chd	cordino
dpf	días post-fertilización
fgf8a	fibroblast growth factor 8a
flh	floating head
hpf	horas post-fertilización
MO	Morfante
<i>nog</i>	nogina
ntl	no tail
NTP	Nucleótidos trifosfato
PSM	Mesodermo presomítico
RA	Ácido retinoico
RNA	Ácido ribonucleico
shha	Sonic hedgehog a
SFs	Superfamilias
SNC	Sistema Nervioso Central
TILLING	Targeting Induced local lesions in genomes
TALLEN	Transcription activator-like effector nuclease
WNT	Wingless

RESUMEN

Anteriormente se creía que durante el desarrollo embrionario las decisiones de destino celular se especificaban exclusivamente durante la gastrulación. Sin embargo, se ha encontrado que existe una población de células que permanece multipotente hasta etapas tan tardías del desarrollo como la somitogénesis. Estas células provienen del llamado organizador caudal, un nicho de células que se especifica durante la gastrulación y participa en la formación de estructuras caudales no axiales, como somitos, epidermis y vasos sanguíneos durante el desarrollo del pez cebra. Se ha comprobado que este nicho actúa independientemente, ya que existen diversos fenotipos en los cuales únicamente las estructuras caudales están alteradas, mientras que las anteriores permanecen sin ningún cambio, indicando que existe una regulación temporal y espacial. Un fenotipo que mostraba estas características se observó en nuestro grupo de trabajo, en la doble morfante de la proteína RNA helicasa P54, durante el desarrollo del pez cebra. En el pez cebra, existen dos homólogos de la RNA helicasa P54 a las que se les denominó P54a y P54b. Sorprendentemente al disminuir la expresión de ambos homólogos ya sea solos o en combinación mediante el uso de Morfolinos, se presentaron alteraciones únicamente en la formación de la cola con distintos grados de severidad. Se ha observado que la familia de las RNA helicasas participa en casi cualquier paso del metabolismo celular del mRNA, contribuyendo a la regulación de la traducción, almacenamiento y degradación del mismo por lo que nos preguntamos como podría estar participando en la formación de las estructuras caudales en el pez cebra. El fenotipo obtenido en el laboratorio, es muy similar al de los defectos que se observan cuando se altera la vía de Bmp y de Wnt en etapas pos-gastrulación. Estas vías de señalización son las involucradas en mantener el nicho celular proveniente del organizador caudal, y son restringidas solo en este grupo celular por la acción de inhibidores como Cordino y proteínas de familia de Noginas. Sin embargo, no se ha reportado algún tipo de regulación a nivel traduccional. En el fenotipo encontrado no se observan cambios aparentes durante la gastrulación, hasta etapas posteriores, durante la somitogénesis y formación de la cola, siendo más evidente a las 24hpf. En el presente trabajo, describimos el fenotipo de los tres tipos de morfantes para la proteína RNA helicasa p54, (MOp54a y MOp54b) y dobles morfantes (MOp54a+MOp54b), observando la expresión de distintos transcritos por medio de hibridación *in situ* utilizando diferentes marcadores. Algunos de los marcadores (*nogina1*, *nogina5* y *flh*) fueron clonados durante el desarrollo del estudio. Comenzamos por conocer si se alteraba la vía de señalización mayormente estudiada; la vía de Bmp. La expresión del gen de *nogina1* no mostró diferencia en ninguno de los morfantes. Sin embargo, la expresión de *bmp4* disminuye en la parte dorsal en los morfantes de p54b y los dobles morfantes. Así mismo, se estudió si existían cambios en la formación de la notocorda, que es una estructura axial, utilizando los marcadores *flh* y *no tail*, genes importantes en el desarrollo de la misma. Ningún marcador mostró un cambio de expresión en los morfantes. Sorprendentemente, al estudiar cambios en estructuras anteriores con los marcadores *krox20*, *fgf8a* y *shha*, observamos que los dos últimos marcadores mostraban únicamente diferencia en las partes caudales o posteriores, pero exclusivamente en los dobles morfantes. Para el caso de *fgf8a*, se observó un

desplazamiento de la expresión hacia las partes ventrales del embrión en el 65% de los casos, mostrando alteraciones en los somitos, mientras que en el 25% que se perdía completamente la expresión, los somitos no se formaban, el 10% restante presentó una expresión normal. Igualmente expresión del gen *shha* se pierde únicamente en las partes caudales de los dobles morfantes. Ambos genes están involucrados en la formación de somitos, actuando con la vía de Wnt y de RA (ácido retinoico). Debido a que únicamente la expresión de los genes *fgf8a* y *shha* se altera en los dobles morfantes, proponemos que la función de los homólogos de la RNA helicasa P54 en el pez cebra es redundante. Así mismo, este trabajo abre las posibilidades de estudiar si la RNA helicasa está actuando directamente sobre los mRNA de *fgf8a* y *shha*, o indirectamente a través de otras vías. Sin embargo, aún permanece la pregunta de la causa en los fenotipos de un solo homólogo de la RNA helicasa, ya que estos presentan una expresión normal para los marcadores *fgf8a* y *shha*.

ABSTRACT

Previously it was believed that during the embryonic development cell fate decisions were specified only during gastrulation. However, it has been found that there is a population of multipotent cells that remains until as late as developmental stages somitogenesis. These cells come from the tail organizer, a niche of cells specified during gastrulation and participates in the formation of non-axial caudal structures, such as somites, epidermis and blood vessels during the zebrafish development. There has been verified that these niche acts independently, since there exist diverse phenotypes in which only the caudal structures are altered, whereas the anterior structures remain without any changes, indicating that exists a spatial and temporary regulation. A phenotype that showed these characteristics was observed in our working group, in the double morphant of P54 RNA helicase during zebrafish development. In the zebrafish there are two homologous that were called p54a and p54b. However by decreasing the expression of the two homologous, either alone or in combination using Morpholinos, alterations occurred in the formation of the tail with different degrees of severity. It has been observed that the family of RNA helicases are involved in almost any step in the cellular metabolism of the mRNA, thus contributing to the regulation of translation, storage and degradation of it, so asked how it could be involved in the formation of the caudal structures in zebrafish. The obtained phenotype is very similar to the defects that are observed when the pathways of Wnt and BMP are altered in post-gastrula stages. These signaling pathways involved in maintaining the cell niche from the tail organizer and are restricted only in this cell group by the action of inhibitors such as Cordino and Noggin protein family. However, it has not been report some type of regulation at the translational level. In the found phenotype, apparent changes are not observed during gastrulation, until later posterior stages, during somitogenesis, and the tail formation, being more evident at 24hpf. In the present work, we described the phenotype of the three kinds of morphants for the protein RNA helicase P54, (Mop54a and Mop54b) and the double morphants (MOp54a+Mop54b), observing the expression of different transcripts by *in situ* hybridization using different probes. Some of these probes (*noggin1*, *noggin5* and *flh*) are cloning during the course of the study. We begin to know if the more studied signaling pathway is altered; the Bmp pathway. The *noggin1* gene expression showed no difference in any of the morphants. However, *bmp4* expression in the dorsal part decreases in morphants of p54b and double morphants. Likewise, we study if there are changes in the formation of the notochord, which is an axial structure, using *flh* and *no tail* probes, important in the development of the same. No marker showed a change of expression in the morphants. Surprisingly, by studying changes in anterior structures, with *krox20*, *fgf8a* and *shha* probes we noted that the last two probes showed differences in their expression exclusively in caudal or posterior parts, but only in the double morphants. In the case of *fgf8a*, we observed a shift in expression to the ventral parts of the embryos in the 65% of the cases, showing changes in the somites, while in the 25%, which was completely lost expression, somitos were not formed, and the remaining 10% had a normal expression. The expression of *shha* is lost in the caudal parts of double morphants. Both genes are involved in the somite formation together with the

Wnt and RA (retinoic acid) pathways. Because only the gene expression of *fgf8a* and *shha* is altered in double morphants, we propose that the function of the homologous of the RNA helicase P54 in zebrafish is redundant. Also, this work opens the possibility of studying if the RNA helicase is acting directly on the mRNA of *fgf8a* and *shha*, or indirectly through other ways. Also, there remains the question of the cause in the phenotypes of one homologous of the RNA helicase P54, as these had a normal expression for the probes *fgf8a* and *shha*.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 El pez cebra como modelo de estudio

El pez cebra (*Danio rerio*) surge como un organismo modelo para estudiar el desarrollo embrionario de los vertebrados después de los trabajos del Dr. George Streisinger en 1981. Esto es debido a que la embriogénesis ocurre externamente y sus embriones son completamente transparentes (Fig1). Cada pareja de peces produce una cantidad abundante de embriones (entre 100 y 200 embriones por semana), a los cuales les toma 3 meses convertirse en adultos con capacidad reproductiva. Son organismos diploides y su genoma esta secuenciado (http://www.sanger.ac.uk/Projects/D_rerio/).

A las 24 horas post-fertilización (hpf) ya se aprecia la segmentación del cerebro y estructuras como el tubo neural, la notocorda y los somitos. A las 72hpf, la embriogénesis está completa y la mayoría de sus órganos están totalmente desarrollados y son funcionales. A los 5 días post-fertilización (dpf) se han formado los sistemas circulatorio, digestivo, nervioso y órganos como los ojos, oídos, riñones, el corazón, el hígado y el páncreas. La larva es capaz de responder a estímulos visuales, olfativos y mecánicos (Kimmel *et al.*, 1995; Mushtaq *et al.*, 2013,).

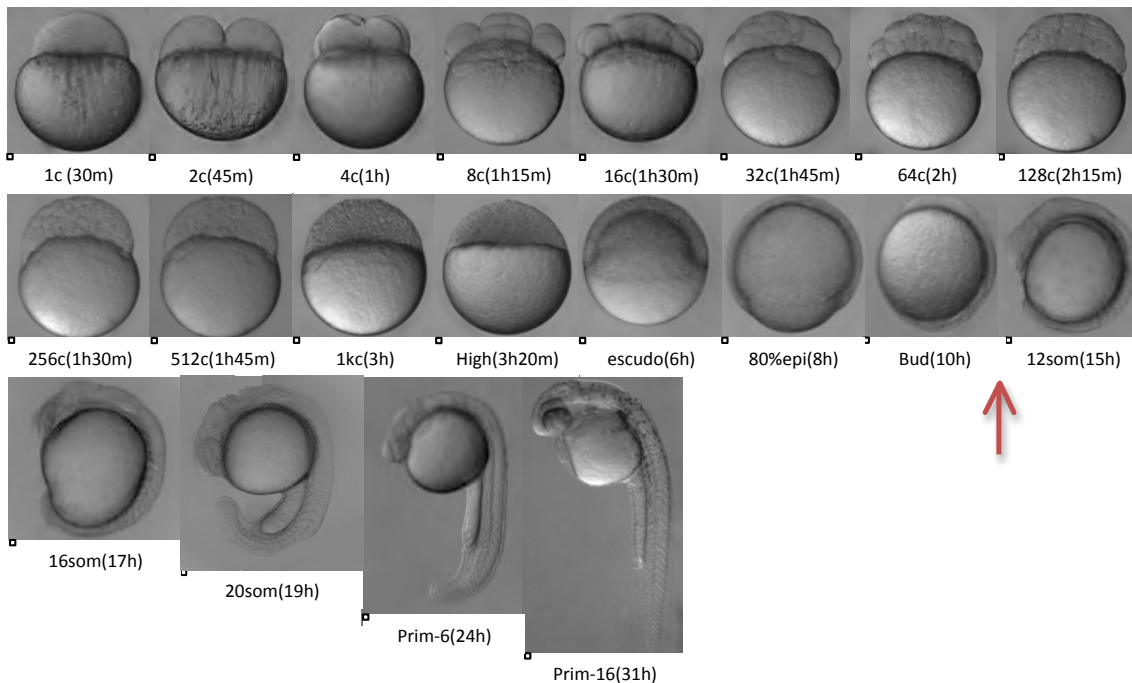


Figura 1. Etapas de desarrollo embrionario en el pez cebra. Debajo de cada figura se nombra la etapa de desarrollo y el tiempo en el que ocurre (tiempos basados en Kimmel *et al.* 1995. c: célula; h: hora; m: minutos; epi: epibolia; som: somitos; prim; primordio. La flecha indica en final de la gastrulación, para futura referencia.

Existen distintas metodologías en el pez cebra utilizadas actualmente en diferentes áreas biológicas. Su transparencia y su sencilla manipulación genética, permiten la producción de líneas transgénicas para diferentes tipos de bioensayos, pudiendo observar en tiempo real órganos y otros sistemas durante el desarrollo embrionario, especialmente con proteínas de fluorescencia (Higashijima *et al.*, 1997). Así mismo, distintas cepas están ahora disponibles y los métodos para obtenerlas están ya establecidos (<http://zfin.org/>). Además, el modelo nos permite la ablación y el trasplante de células (Li 2011), mutagénesis a gran escala e insercional (Golling *et al.*, 2002), TILLING (“*Targeting Induced local lesions in genomes*”, Moens 2008), nucleasas TALEN (“*Transcription activator-like effector nuclease*”) o CRISPR/Cas9. (Gaj *et al.*, 2013). Otras técnicas importantes que fueron utilizadas en este trabajo son la detección de la expresión de mRNAs por medio de hibridación “*in situ*” y el abatimiento de la expresión de genes específicos empleando morfolinós (Nasevicius y Ekker, 2000, Sullivan y Kim, 2008).

1.2 El organizador de Spemann y organizador caudal

Durante el desarrollo embrionario, el destino de una célula depende de las interacciones con las células vecinas, proceso conocido como “inducción” (Curtis, 2008). En los vertebrados, a la parte de un embrión capaz de inducir a las células indiferenciadas a seguir un curso específico de desarrollo, se le conoce como “organizador” (Curtis, 2008). El organizador fue descubierto en 1924 mediante experimentos con injertos, publicados por Hans Spemann y Hilde Mangold. Utilizando embriones de tritón pigmentados diferencialmente, demostraron que un grupo de células localizadas en la parte dorsal del embrión durante la fase de gástrula, podían inducir la formación de un plan corporal completo al ser trasplantados (Fig.2). Este grupo de células es el labio dorsal del blastoporo. Spemann lo nombró “El organizador” por dos razones: 1) inducía a los tejidos ventrales del huésped a cambiar sus destinos para formar un tubo neural y tejido mesodérmico dorsal, y 2) organizaba al huésped para formar un embrión secundario, mediante la formación de los ejes antero-posterior y dorso-ventral (Agathon *et al.*, 2003; Gilbert *et al.*, 2010).

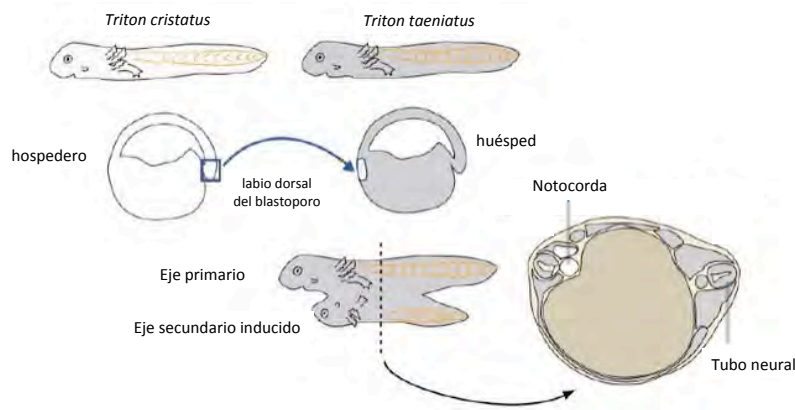


Figura 2. Formación de un segundo eje embrionario mediante el trasplante del labio dorsal de blastoporo, conocido como “Organizador de Spemann” . Modificada de <http://es.slideshare.net/BpScienceMeetup/varga-mt-halak-htn-a-zebradni-dorsoventralis-dv-tengelyt-kialakt-gnek-vizsglata-budapest-science-meetup-december-6637958>

Fu

nciones equivalentes a las del organizador de Spemann han sido identificadas en otros vertebrados, incluyendo el “nodo” en ratón y pollo, así como el “escudo embrionario” en el pez cebra y en otros teleósteos. En el pez cebra, el organizador o escudo está localizado en la parte dorsal durante la gástrula (Fig.3a en azul), el cual da lugar a estructuras axiales como la notocorda, hipocorda y tubo neural ventral.

En el 2003, Agathon y col. demostraron la existencia de un nuevo organizador, derivado del margen ventral del embrión del pez cebra (Fig.3a en rojo), al que nombraron “organizador caudal” y es independiente del organizador dorsal de Spemann. El organizador caudal es el responsable de formar tejido no axial en la parte posterior del tronco y la cola del pez cebra, tales como somitos, epidermis, células de la sangre, tubo neural, aletas ventrales y caudales (Fig3c).

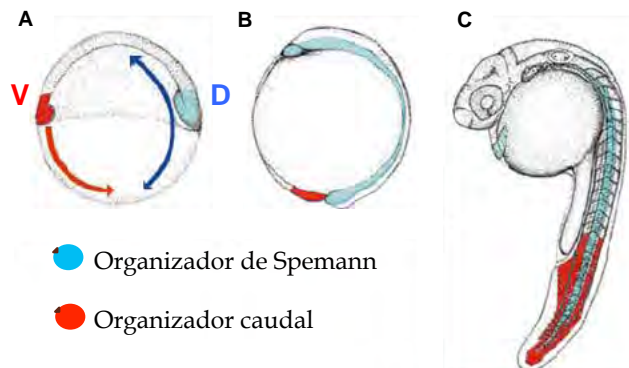


Figura 3. Contribución de tejidos axiales y no-axiales en la formación de la cola del pez cebra. A y B indican la posición y movimiento de células ventrales (rojo) y dorsales (azul) en el estadio de escudo y bud respectivamente. C. muestra la contribución del margen dorsal para la formación de las estructuras axiales, mientras que el margen ventral forma estructuras no-axiales. V; ventral, D; dorsal. Modificado de Agathon et al., 2003.

Las señales presentes en el organizador caudal son temporal y espacialmente reguladas por medio de morfógenos, como es el caso de la señalización de las Proteínas Morfogenéticas del hueso (BMP, *por sus siglas en inglés*) y de las vías de señalización de Wnt y Nodal (Agathon *et al.*, 2003; Niehrs *et al.*, 2004; Kondo, 2007; Row y Kimelman 2009; Fig.4 en rojo). Análisis moleculares han mostrado que el organizador de Spemann secreta tanto antagonistas como represores transcripcionales, previniendo la actividad y la expresión de los morfógenos ventrales. Actúa secretando antagonistas de BMP, como Cordino, Nogina y Folistatina (Dal-Para *et al.*, 2006), inhibidores de la vía de Wnt como Frzb, Dickkopf1 e inhibidores transcripcionales como Goosecoid y FoxA3 (Fig. 4B, Thisse y Thisse, 2015).

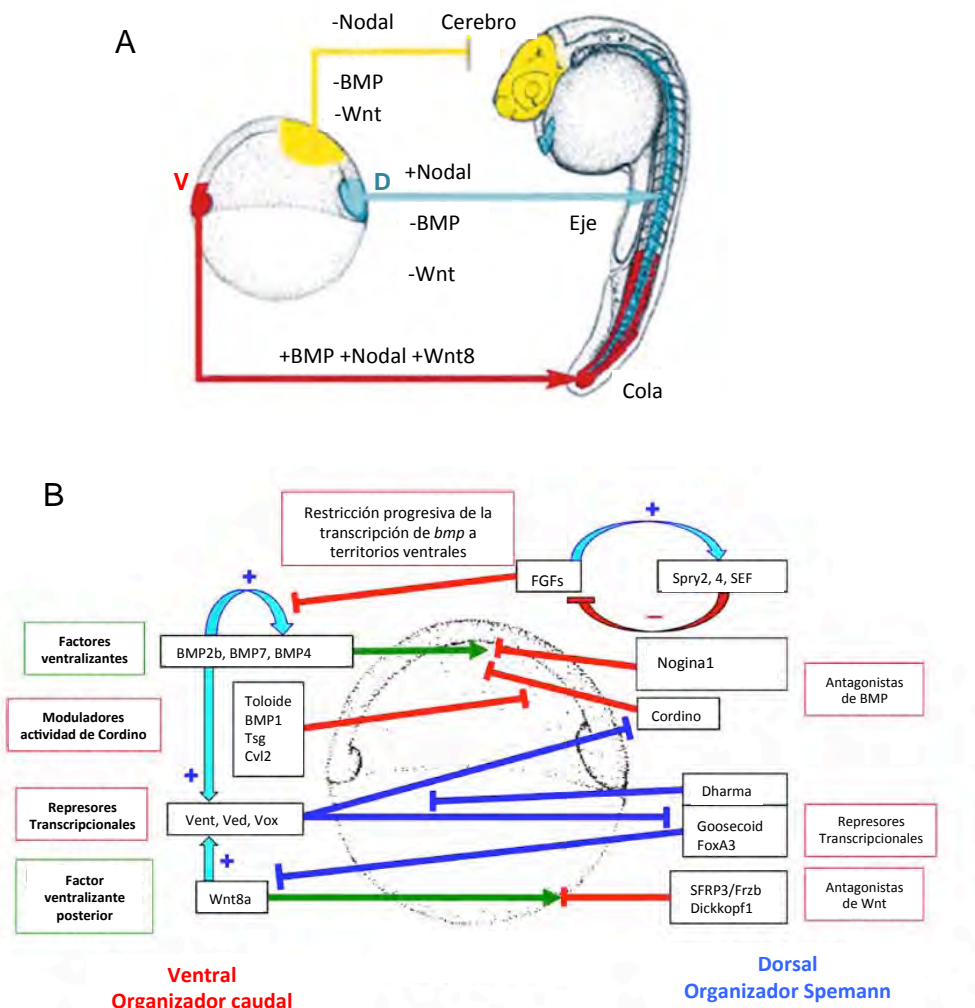


Figura 4. Participación de las vías de señalización de BMP, Nodal y Wnt8 en el desarrollo del pez cebra. La formación de la cola depende de la triple estimulación de las vías de señalización de BMP, Nodal y Wnt8; ventral, D; dorsal. *Modificado de Agathon et al., 2003.* B. Principales interacciones entre el Organizador de Spemann y el organizador caudal durante la gastrulación. *Modificado de Thisse y Thisse, 2015.*

Hasta el 2009, se habían descrito dos organizadores en el pez cebra: el organizador dorsal o de Spemann y el organizador caudal (Agathon *et al.*, 2003). Sin embargo Fauny y col. en el 2009 describen que todas las partes del margen blástula-gástrula poseen funciones organizantes y que la posición de estos distintos territorios marginales define el eje A/P (antero-posterior). En el mismo estudio, a nivel molecular se observó que más que la actividad de centros discretos, la organización del embrión de pez cebra depende de la actividad de todo el margen actuando como un organizador continuo donde existe una continua variación en el cociente de BMP/Nodal, el cual es decreciente del margen ventral hacia el dorsal (Fauny *et al.*, 2009).

Sin embargo, el organizador caudal resultó ser muy interesante debido a que rompe un paradigma que existió gran parte del siglo pasado. Se creía que durante la formación del cuerpo de los vertebrados en la gastrulación, se formaban las tres capas germinales y que la construcción de todo el cuerpo se originaba únicamente a partir de esta especificación. Esto fue cambiado por estudios en linaje celular en rana (Davis y Kirschner, 2000) y más recientemente en ratón, los cuales mostraron que existe una región en el brote de la cola que continuamente está llevando a cabo decisiones de destino celular que solamente se habían observado en la especificación de las capas germinales durante la gastrulación, como la decisión neural/mesodermo (Tzouanacou *et al.*, 2009). Recientemente se han descubierto algunas vías de señalización que regulan la actividad de la región en el brote de la cola posterior a la gastrulación (Row y Kimelman, 2009; Martin y Kimelman, 2012).

1.3 Vías de señalización en el organizador caudal posterior a la gastrulación

En el 2009, Row y Kimelman dieron seguimiento a la región del brote de la cola proveniente del organizador caudal, encontrando que las vías de señalización de Wnt y de Bmp permanecen regulando la actividad en etapas posteriores a la gastrulación (Fig. 1). Ellos mismos, propusieron un modelo en el cual los inhibidores de Bmp que actuaban en el organizador de Spemann, ahora en la somitogénesis son esenciales para la correcta formación de la cola del pez cebra, restringiendo la actividad de esta vía a una zona. Bmp por su parte bloquea inhibidores de Wnt, los cuales restringen los niveles de la vía de señalización canónica y no-canónica de Wnt en el brote de la cola (Fig. 5A). Por la tanto, este grupo de células se mantiene gracias a la interacción de las vías de señalización de

Bmp y Wnt expresadas únicamente en el brote de la cola, debido a la restricción causada por sus inhibidores alrededor de este nicho.

Por otro lado, Martin y Kimelman en el 2012 demostraron que existe una población de células en el brote de la cola que son células madre multipotentes, sugiriendo que factores locales especifican el destino celular (Martin y Kimelman, 2012). Ellos mismos en el 2008 muestran que éstas células se mantienen por medio de un nicho molecular de señalización de Wnt canónico y bajas concentraciones de ácido retinoico. En el 2012, reportan que la vía canónica de Wnt regula la especificación celular en dos eventos de decisión de destino celular en etapas tan tardías como la somitogénesis. Inicialmente la vía de señalización de Wnt especifica, a partir de una célula madre bipotencial neural/mesodermal, el destino hacia mesodermo el cual dará origen a los somitos. Después de que el mesodermo ha sido especificado, la vía de Wnt regula una segunda decisión de destino celular entre somitos y células vasculares (Fig. 5B).

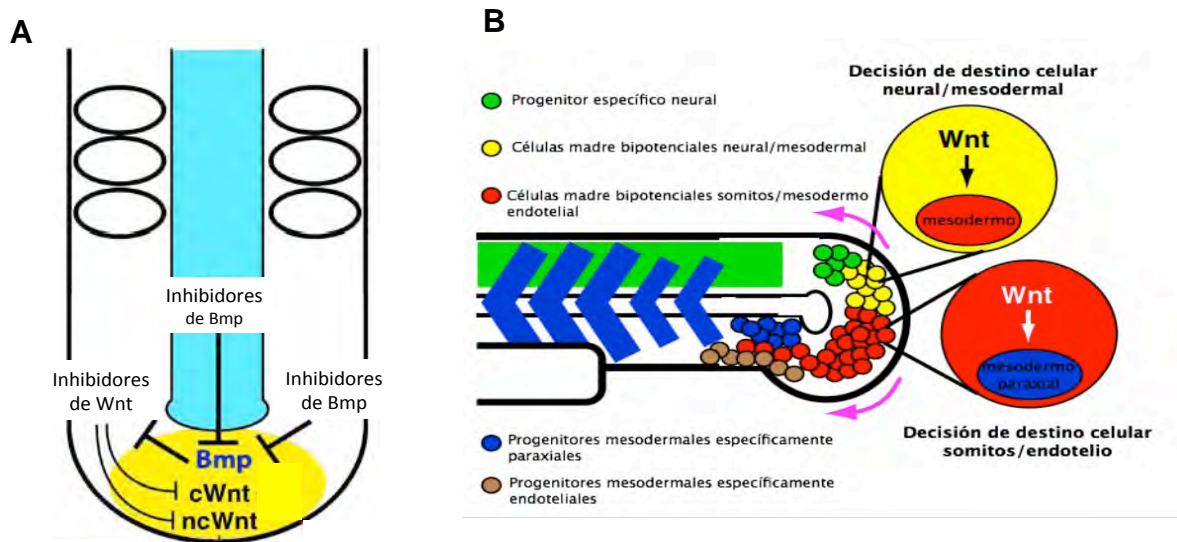


Figura 5. Modelos propuestos para la formación de la cola a través de las vías de señalización de Bmp y de Wnt en etapas posteriores a la gastrulación. A. Modelo que representa la restricción necesaria de la vía de Bmp en el brote de la cola, así mismo Bmp reprime la expresión de los inhibidores de Wnt, los cuales son requeridos para modular los niveles de la vía canónica de Wnt (cWnt) manteniendo los progenitores mesodermales, mientras que la vía no Canónica (ncWnt) regula la morfogénesis. **B.** Modelo de la función de la vía de Wnt en la especificación del destino celular de las células madre en el brote de la cola. *Modificado de Martin y Kimelman, 2012.*

Modificado de Row y Kimelman 2009

Para demostrar la importancia de esta restricción en el brote de la cola, Row y Kimelman en el 2009 llevaron a cabo la expresión ectópica de Bmp con una línea transgénica Tg(HSE:cBmpr1b) que mantiene activo al receptor de Bmp (Alk6) cuando se somete a un choque térmico, activándola en la somitogénesis temprana. En esta etapa del desarrollo observaron defectos severos en la cola, como el eje corporal más corto, los límites de los somitos son irregulares y no alcanzan su tamaño original (Fig.6A), además presentaron expresión génica alterada. El grupo de Esterberg en el 2008, observaron el efecto de expresar Bmp4 en el organizador de Spemann, colocando perlas embebidas con esta proteína, encontrando alteraciones en la formación de la parte caudal del pez cebra únicamente (Fig. 6B).

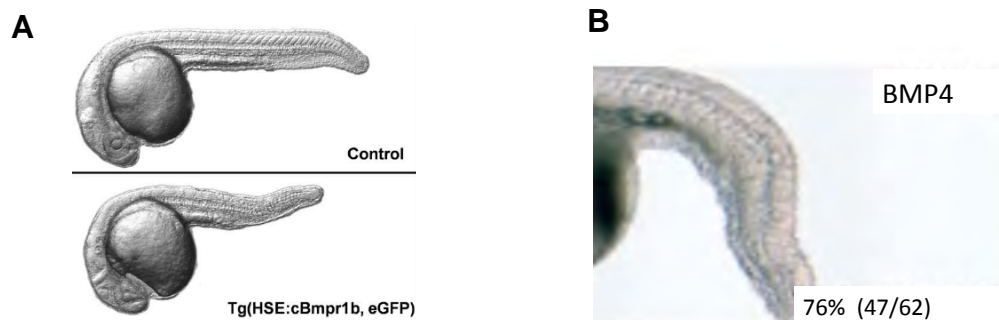


Figura 6. Fenotipos de la expresión ectópica de bmp durante la formación de la cola del pez cebra.
A. A las 42hpf los embriones transgénicos muestran un eje del cuerpo más corto y la epidermis muestra alteraciones *Modificado de Row & Kimelman, 2009*. B. Embrión a las 24hpf expuesto a Bmp ectópico mostrando alteraciones en la formación de la cola en un 76% de los casos. *Modificado de Esterberg 2008*.

Los fenotipos observados al alterar la vía de Bmp son muy similares al fenotipo que nuestro grupo de trabajo ha encontrado al estudiar la participación de la RNA helicasa p54 durante el desarrollo del pez cebra, la cual pertenece a la superfamilia de las DEAD-box helicasas.

Además de la separación del dúplex, las RNA helicasas muestran distintas actividades adicionales, varias de ellas han mostrado desplazar directamente proteínas del RNA de una manera dependiente de ATP, (Jankowsky y Bowers, 2006). Recientemente, se observó que la RNA helicasa RIG-1 funciona en el sistema inmune como un receptor de reconocimiento para la identificación de RNA virales en el citoplasma (Myong *et al.*, 2009).

Las proteínas DEAD-box helicasas son la familia más amplia de las RNA helicasas y pertenecen a la SF2. El nombre proviene de la secuencia de aminoácidos D-E-A-D (Asp-Glu-Ala-Asp), implicada en la unión a ATP, característico de esta familia (Linder *et al.*, 1989). Se ha hipotetizado que estas proteínas son parte de una maquinaria basal para el control traduccional de mRNA específicos y generales, en bacterias, arqueas y eucariontes (Linder *et al.*, 2006; Presnyak y Collier, 2013).

Todas las proteínas DEAD-box comparten un núcleo que está entre los dominios enzimáticos más conservados (Fig.8A, Linder y Jankowsky, 2011). El núcleo está flanqueado por extremos amino y carboxilo, los cuales pueden variar en el largo, desde menos de cinco a varios cientos de residuos de aminoácidos y que le confiere la especificidad de unión a sustrato mediante interacciones proteína-proteína o puede contribuir a la separación del dúplex (Strohmeier *et al.*, 2011; Tsu *et al.*, 2001).

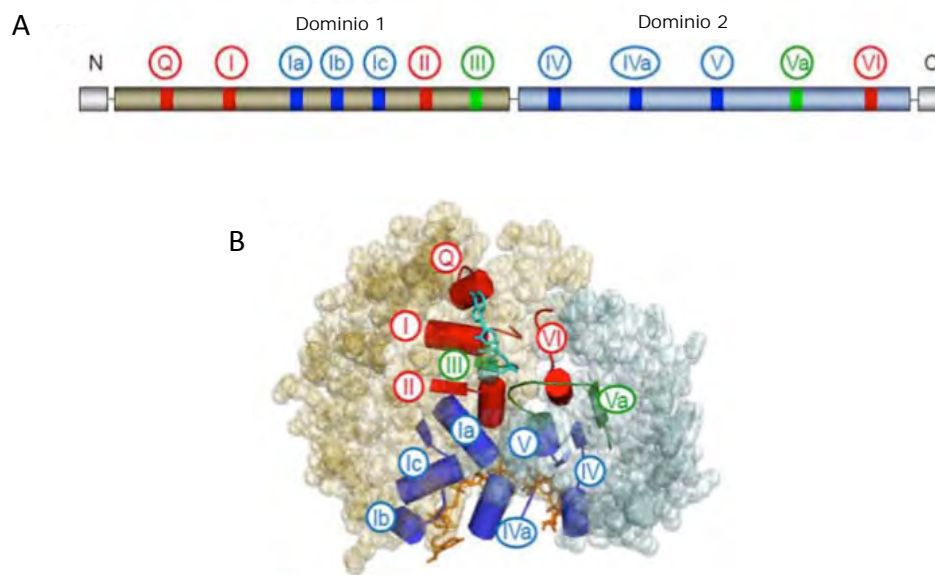


Fig.8 Arquitectura de la superfamilia de las proteínas DEAD-box helicasas. **A.** Esquema de la estructura primaria del núcleo de la DEAD-box helicasa. Los colores indican su función bioquímica (rojo, unión a ATP e hidrólisis; azul, unión a RNA, verde, coordinación entre unión a ATP y RNA). **B.** Posición de los motivos característicos en una estructura tridimensional de la DEAD-box helicasa VASA. La unión de un análogo de ATP y de un ión Mg^{2+} se muestran de color verde azulado; el ácido nucleico está en color naranja (Modificado de Putnam y Jankowsky, 2013).

El sitio de unión al RNA es solamente con el esqueleto de fosfato y azúcar del RNA (Cordin *et al.*, 2006; Fairman-Williams *et al.*, 2010), esto también permite la unión a un dúplex de RNA (Collins *et al.*, 2009). Estructuras cristalizadas muestran una sola hebra de RNA usualmente unida a través de ambos dominios de la helicasa, por lo tanto promoviendo la conformación cerrada (Fig.8B) y en consecuencia la formación del sitio activo para la hidrólisis de ATP (Sengoku *et al.*, 2006). Sin embargo, estudios recientes han demostrado que algunas enzimas muestran mayor afinidad por ADP que por ATP, estas dos moléculas podrían estar compitiendo en ciertas condiciones y así modular la actividad de la helicasa (Henn *et al.*, 2008).

En las últimas dos décadas, además de la ya bien conocida función del desenrollamiento del RNA y de sus correspondientes actividades de ATPasa, las proteínas DEAD-box han mostrado participación en promover la formación de dúplex y en el desplazamiento de proteínas del RNA, pero también pueden funcionar como plataformas para grandes complejos de ribonucleoproteínas, como abrazaderas de RNA y se ha reportado recientemente que pueden actuar como sensores de metabolitos (Parvatiyar *et al.*, 2012; Ballut *et al.*, 2005; Fairman *et al.*, 2004; Grifo *et al.*, 1984; Rössler *et al.*, 2001). Miembros de esta familia también han mostrado funciones involucradas en cada paso del procesamiento del RNA, como biogénesis de ribosomas, empalme alternativo, así mismo, pueden actuar como represores o activadores de la transcripción, participar en el transporte del RNA, en la traducción y degradación del mismo (Cordin *et al.*, 2006; Presnyak y Coller, 2013; Putnam y Jankowsky, 2013).

1.5 La RNA helicasa P54

Como parte de la familia de las proteínas DEAD-box, la proteína p54 de pez cebra, con homología en *Saccharomyces cerevisiae* (Dhh1), *Caenorhabditis elegans* (CGH-1), *Drosophila* (Me31B) y *Xenopus* (Xp54), poseen 9 motivos conservados, que han sido reconocidos por homología del miembro fundador de la familia eIF4A, factor de transcripción identificado por su actividad de desenrollamiento de dúplex de RNA en una manera dependiente de ATP, involucrado en el inicio de la traducción (Presnyak y Coller, 2013). La helicasa P54 se encuentra en todas las células y su función se ha visto involucrada dentro de grandes complejos citoplásmicos donde existe una agregación de proteínas y de RNA. Estos complejos son llamados gránulos y suelen dividirse en cuatro clases: cuerpos-P, que son áreas de procesamiento o almacenaje para RNAs silenciados

en células somáticas; los gránulos germinales, los cuales son complejos formados durante la ovogénesis que llevan mRNA materno dentro del embrión; gránulos de estrés, quienes secuestran mRNAs durante cambios severos en la transcripción en respuesta a estrés; y los gránulos especializados, tales como los gránulos neuronales (Presnyak y Collier, 2013).

En levadura, la primera función asociada a Dhh1 fue modular la eliminación de la caperuza 5' del mRNA, proceso conocido como “decapping”, (Coller *et al.*, 2001; Fischer y Weis 2002). Desde entonces se le han adscrito muchas funciones como regulación en el ciclo celular (Westmoreland *et al.*, 2003; Bergkessel *et al.*, 2004), facilitador en la formación de cuerpos-P (Coller y Parker, 2005), degradación del mRNA (Luo *et al.*, 2011), represión traduccional mediante el impedimento de la elongación ribosomal (Sweet *et al.*, 2012).

En *C. elegans*, varias funciones de cgh-1 han sido reportadas, mostrando claras diferencias en células somáticas y en células germinales. En las células somáticas, parece ser un constituyente de gránulos citoplásmicos consistentes con los cuerpos-P, los cuales contienen otros factores de degradación (Navarro *et al.*, 2001; Boar *et al.*, 2008). En las células germinales, sin embargo, es esencial para la gametogénesis, así como en el desarrollo del ovocito (Navarro *et al.*, 2001).

En *Drosophila* fue identificado por primera vez el gen para la proteína p54 como Me31b (maternally expressed from chromosomal locus 31b, por sus siglas en inglés), un gen importante para el desarrollo embrionario (Valoir *et al.*, 1991). En *Drosophila*, Me31B, ha mostrado varias funciones. Una de ellas es el silenciamiento traduccional del mRNA *oskar*, siendo por lo tanto determinante en definir el polo posterior de los embriones de la mosca durante el desarrollo (Nakamura *et al.*, 2001), así mismo, se observó su participación en el silenciamiento de RNAs involucrados en el transporte del citoplasma del ovocito (Nakamura *et al.*, 2001). Recientemente, Weil y col. en el 2012, mostraron una relación entre la formación de patrones durante el desarrollo de *Drosophila* y la presencia de Me31b a través de la regulación de la traducción de los genes *gurken (grk)* y *bicoid (bcd)*. El gen *grk* es traducido en etapas iniciales del desarrollo únicamente en la parte dorso-anterior del ovocito y no co-localiza con Me31b, en contraposición de *bcd*, el cual es

silenciado y co-localiza con la helicasa hasta el momento de su activación en donde se disocia de los cuerpos-P permitiendo su activación (Weil *et al.*, 2012).

En *Xenopus*, Xp54 es el principal componente asociado a moléculas de mRNA materno y parece importarse y exportarse entre el núcleo y el citoplasma del ovocito, asociándose al RNA recién sintetizado en el núcleo y participando en la formación de cuerpos de almacenamiento en el citoplasma, de tal forma que se arresta la transcripción mientras ocurre la maduración del ovocito (Ladomery *et al.*, 1997, Weston y Sommerville., 2006).

En humanos la helicasa p54 o también llamada RCK, se ha estudiado con un enfoque más hacia procesos de enfermedad. Fue descrito en 1992 en una línea celular de linfoma RC-K8, de ahí su nombre. En el 2010, se observó que esta proteína es requerida durante el desarrollo de los eritrocitos; almacenando el mRNA hr15-LOX, desde el punto de enucleación, hasta las últimas etapas de desarrollo, en el cual el producto de este mRNA destruye la mitocondria del eritrocito maduro (Naarman *et al.*, 2010). Así mismo, se ha observado que la proteína RCK interactúa físicamente con la maquinaria miRNA, especialmente con Ago2 (Chu y Rana, 2006).

Aunque se les ha otorgado muchas funciones, en varios tipos celulares, en distintos organismos y en diferentes etapas del desarrollo embrionario, Presnyak y su grupo proponen un modelo unificante en el que todas las funciones recaen en un papel más general que es la represión traduccional, incluyendo aquella mediada por miRNAs (Chu y Rana, 2006, Presnyak y Coller, 2013).

2 ANTECEDENTES

En nuestro grupo se identificaron dos homólogos de la proteína p54, nombrados como p54a (cromosoma 18) y p54b (cromosoma 16) . Por medio de RT-PCR se observó que ambos homólogos se expresan en distintas etapas del desarrollo del pez cebra, desde 32 células hasta 5dpf tanto en hembras como en machos, y en adultos su expresión se encuentra en diversos órganos (Castillo y Ramos, datos aún no publicados). Mediante RT-PCR y Western Blot, se comprobó que bajas dosis de Morfolinos (3ng para p54a y 6ng para p54b) abaten su expresión (Fig. 9A y B) y al micro-inyectarlos, ya sea solos o en combinación, los embriones presentaban un fenotipo con defectos únicamente en las partes posteriores siendo más notorio a las 24hpf (Fig. 9; Zampedri, datos aún no publicados), siendo muy parecidos a los fenotipos donde se alteran las vías de señalización de Wnt y Bmp, presentes en el organizador caudal (Esterberg *et al.*, 2008; Row y Kimelman 2009). Con base a estas observaciones, nosotros proponemos que P54 podría estar involucrada en la regulación de las vías de señalización presentes en el organizador caudal.

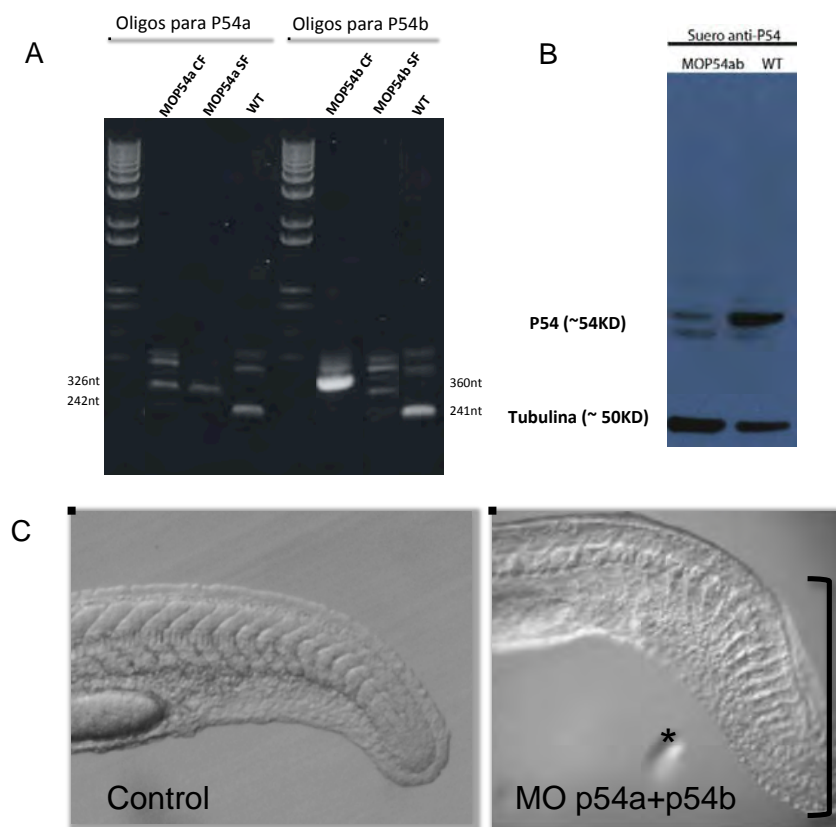


Figura 9. Fenotipo de la doble morfante p54a+p54b a las 24hpf. A. RT-PCR mostrando que los morfantes para P54a y P54b aumentan el peso molecular de 242nt a 326nt y de 241nt a 360nt respectivamente, siendo evidente que el Morfolino impide el empalme alternativo, tanto embriones con fenotipo (CF) como sin fenotipo (SF). B. Western Blot indicando que existe abatimiento de la proteínas P54ab (54KD). C. Fenotipo de la doble morfante p54a+p54b al as 24hpf donde se observa curvatura de la cola (asterisco) y alteración en la forma de los somitos posteriores (corchete).

3 HIPOTESIS

- 1) Las RNA helicasas P54a y P54b están involucradas en la formación de estructuras caudales a través de regular la vía de BMP.

4 OBJETIVOS

Objetivo General

- ✚ Estudiar la participación de las RNA helicasas P54a y P54b en la función del organizador caudal durante el desarrollo del pez cebra.

Objetivos Particulares

- 1) Analizar la expresión de los mRNAs que participan en la vía de BMP (*bmp4* y *nog1*) en los morfantes para la RNA helicasa P54a y P54b.
- 2) Descartar que los morfantes para la RNA Helicasa P54a y P54b, presenten alteraciones en estructuras anteriores a través de los marcadores *shha*, *fgf8a* y *krox20*, y alteraciones en estructuras axiales con los marcadores *shha*, *flh* y *ntl*.

5 METODOLOGIA

5.1 Mantenimiento de los peces cebra y obtención de embriones

El laboratorio cuenta con dos sistemas de recirculación continua (Aquatic Habitats, modelo AHSAM), cada uno con capacidad de albergar 800 peces adultos. Los peces se mantienen a una temperatura entre 22-25°C con un fotoperiodo de 14 horas de luz y 10 de oscuridad y un pH entre 6.8 y 7.2. La alimentación de peces adultos es una vez al día, con larvas de Artemia (*Artemia franciscana*) junto con hojuelas maceradas de alimento comercial de peces (TetraminPRO).

Los embriones de pez cebra utilizados en el presente estudio, son de la cepa silvestre TAB-WIK, la cual se cruzó en el laboratorio a partir de las cepas: TAB-14 (Tubingen más AB cruza 14) y la cepa WIK, ambas obtenidas del Zebrafish International Resource Center.

Los embriones son obtenidos mediante cruza naturales, esto es, colocando una hembra y un macho en cajas de cruza con separación por la tarde (entre las 15:00 y 17:00hrs.), y en la mañana se retira la separación obteniéndose los huevos fecundados y mantenidos a 28.5°C en cajas Petri con una mezcla de agua de acuario y azul de metileno (0.01%) en una densidad no mayor a 60 embriones por caja. El agua usada en el sistema (agua de acuario) es agua purificada con un sistema Elix (MILLIPORE), a la cual se le agregó una mezcla de sales (*Instant Ocean*) a una concentración final de 0.25 g/L y bicarbonato de sodio a una concentración final de 4.1 mg/L. La conductividad es mantenida entre 400 y 550 microOhms.

5.2 Extracción de RNA total

Para extraer el RNA total de diferentes estadios se utilizó el método con Trizol (tiocianato de guanidinio-fenol-cloroformo, Invitrogen). Se colocaron entre 40 y 50 embriones en 0.8ml de Trizol. Por medio de un pistilo estéril y libre de RNAsas (VWR) se homogeneizaron las muestras. Se agregaron 0.2ml de cloroformo y se vortexeo por 20s. Se dejó a temperatura ambiente por tres minutos. Posteriormente se centrifugó a 4°C por 15min. a 13,400rpm o 12,000xg (Eppendorf, Minispin). Se tomó únicamente la fase superior acuosa con el RNA. Se precipitó con 0.5ml de isopropanol mezclando por

inversión y se dejó a temperatura ambiente por 10min. Se realizó una segunda centrifugación a 4°C por 10min. a 13,400rpm. El precipitado se lavó con 1ml de etanol al 75% preparado con dH₂O-DEPC. Se realizó una última centrifugación a 4°C por 5 min. a 10,500rpm o 7,500xg. La pastilla se dejó secar por 5min. Para eliminar el DNA genómico 44µl de dH₂O-DEPC. Se agregaron 5µl de Buffer 10X del estuche de "Turbo DNAsa" (Ambion, AM2238) y se mezcló por pipeteo suave. El tubo se colocó a 37°C y a los 30min. se agregó otro µl de Turbo DNAsa mezclando por pipeteo y colocándolo a 37°C otros 30min. para un total de una hora. Se le agregaron 6µl de "Reactivo Inactivador del estuche de Turbo DNAsa". Se incubó por 5min. mezclando suavemente para inactivar el remanente de la Turbo DNAsa. Se centrifugó a temperatura ambiente por 5min. a 12,200rpm. Se tomó el sobrenadante y se almacenó a -80°C.

5.3 Preparación de cDNA

Para la preparación de cDNA, el RNA se calentó a 65°C por 10min. Se colocó en hielo durante 5min. y se centrifugó otros 5min. (Eppendorf, Minispin) a 12,200rpm. Se preparó la siguiente reacción por duplicado, para una utilizarla como control: Oligo dT 0.5 µl, dNTP'S 0.5µl, RNA cantidad necesaria para 1.5µg, DEPC cantidad necesaria para 5µl. Se dejó incubar 65°C durante 5min.

A su vez se prepara la mezcla de síntesis con el estuche Superscript III First-Strand (Invitrogen, 18080-051):

	+RT	-RT
10X RTBuffer	1µL	1µL
25mn MgCl ₂	2µL	2µL
0.1mM DTT	1µL	1µL
RNAse OUT	0.5µL	0.5µL
Superscript III	0.5µL	-
dH ₂ O DEPC	-	0.5µL
	5µL	5µL

Se agregó la mezcla de síntesis a la primera reacción y se colocaron a 50°C por 50min. y posteriormente a 85°C por 5min. Se adicionaron 0.6µL de RNasa H y la reacción se incubó a 37°C durante 20min. Se almacenó a -20°C.

5.4 Clonación de los genes *floating head*, *nogina1*, *nogina2* y *nogina5*

Una mezcla RNA de diferentes estadios de embriones de pez cebra (16 somitos, d1 y d3) fue utilizada como templado de RT-PCR. En el cuadro 1 se muestran los primers utilizados para los genes *flh*, *nog1*, *nog2*, *nog5*. Preparados en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular.

GEN		PRIMER
<i>flh</i> (forward)		5´ CTATCCGCCCTACAACCTCCAAAC 3´
<i>flh</i> (reverse)		5´ AGAGCAATGGCGTGTGTAAGTGAC 3´
<i>nog1</i> (forward)	Primer1 en texto	5´ GCTCCTTCAATCGTGATGCTTTCT 3´
<i>nog1</i> (reverse)	Primer2 en texto	5´ GCTTCACATCAGAGTCCAGAAACG 3´
<i>nog2</i> (forward)	Primer7 en texto	5´ CCAACTCCACTCCGTAGACAGACA 3´
<i>nog2</i> (reverse)	Primer8 en texto	5´ GCTGAAGTGCTCCTCGTGAGAATA 3´
<i>nog5</i> (forward)		5´ CCTTCACCTCGTCATTGCTCAG 3´
<i>nog5</i> (reverse)		5´GACTGCACCGGTTTACAGAACATC 3´

Las condiciones de la reacción para un volumen final de 25µL fueron: un ciclo de 95°C por 1min y 35 ciclos de 95°C por 15seg de desnaturalización, 58°C por 15seg durante hibridación y 72°C por 1min para la extensión, seguido por un único ciclo de extensión final a 72°C por 5min. El producto de PCR fue clonado en el vector PCR4-TOPO (TOPO TA Cloning Kit for sequencing, Invitrogen, 45-0030) por medio de la siguiente reacción: Producto de PCR fresco, 4µL, solución de sal 1µL, vector TOPO 1µL. La reacción se mezcló suavemente y se dejó incubar por 30min. a temperatura ambiente y se colocó en hielo.

La transformación se llevó a cabo con 100µL de células competentes DH5α, y 2µL de la reacción del vector clonado con el producto de PCR. Como control (-) se utilizó 2µL de agua MiliQ estéril y como control (+) se agregó 2µL del plásmido pUC18. La mezcla se incubó en hielo por 30min. y las células se expusieron a un choque térmico por 30seg. a 42°C, e inmediatamente se colocaron en hielo por 5min. Se agregó 250µL de medio SOC y se dejó incubar 1hr a 37°C a 250rpm. Se realizó una centrifugación por 1min a 13,000rpm, se retiraron 250µL y se resuspendió la reacción en el volumen sobrante. Se plaquearon dos cajas para cada plásmido colocando 10µL y 90µL de la reacción en cajas Petri con medio LB y carbencilina (50µg/ml). Se dejó a 37°C durante toda la noche. Al día siguiente se picaron 6 colonias para el gen *flh*, 4 colonias para uno de los genes *nog1* y

nog2, y 7 colonias para el gen *nog5*, para realizar una PCR en colonias. Este protocolo permite conocer si el inserto está presente en el vector. Para esto, se picaron las colonias obtenidas y se realizó una reacción de PCR utilizando los mismos primers para cada gen. Las condiciones del ciclo fueron: 2min a 94°C, 32X (30seg a 94°C, 1min a 60°C, 1min a 72°C) y 10seg a 72°C. Se extrajeron los plásmidos por medio del Mini Kit Prep (Invitrogen) de los genes clonados (*flh*, *nog1*, *nog2* y *nog5*) y los plásmidos que ya se tenían en el laboratorio y se realizó una digestión enzimática para linealizarlos y poder llevar a cabo la transcripción *in vitro*. La figura 10, muestra todos los plásmidos tanto clonados como los que ya se tenían en el laboratorio, sin digerir y tratados con diferentes enzimas de restricción, sin embargo no se contaba con la información sobre el peso esperado pero todos mostraron un peso entre 4 y 6kb. La digestión de los genes clonados se observan en la figuras 10E y F, con los pesos esperados, *flh* 4,522pb, *nog1* 4,809pb, *nog2* 4,856pb y *nog5* 4,457pb.

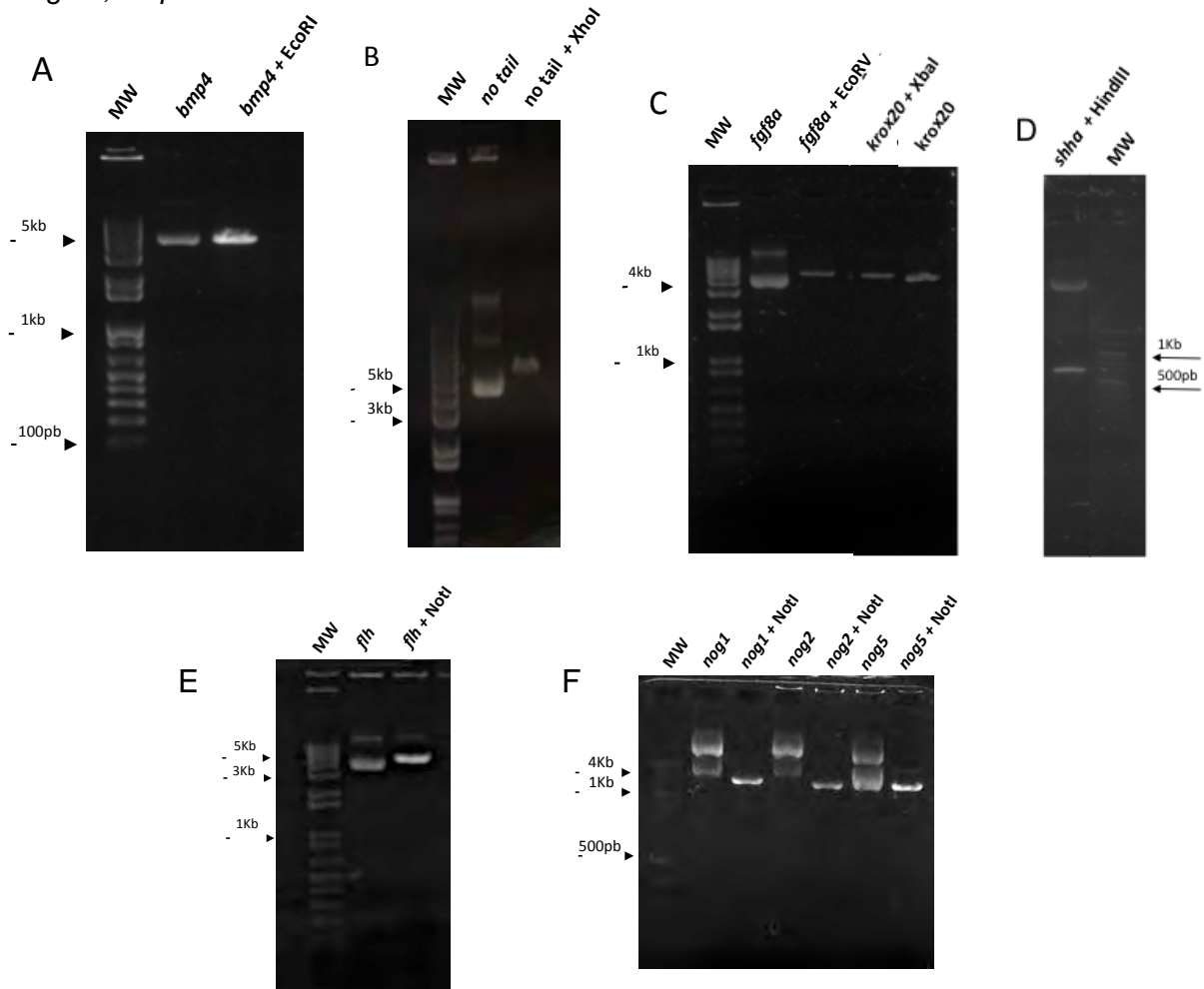


Figura 10. Electroforesis de los plásmidos sin digerir y tratados con diferentes enzimas de restricción de cada uno de los plásmidos extraídos y clonados. A. *bmp4* B. *no tail* C. *fgf8a* y *krox20*. D. *shha*. E. *flh*. F. *nog1*, *nog2* y *nog5*. Gel de agarosa 1%. MW, marcador de peso molecular 1kb.

5.5 Obtención de la sonda mediante transcripción *in vitro*

Una vez que se obtuvieron los plásmidos linearizados, se llevo a cabo la transcripción *in vitro* para obtener la sonda de nucleótidos marcados con digoxigenina, preparando la siguiente mezcla (con un volumen máximo de 7µl); 2µl de buffer de transcripción “in vitro” 10X (Roche, 11031163001); 8µl de NTP-DIG 2.5X; 1µl de “Rnase Inhibitor” (Invitrogen): 20 unidades de RNA polimerasa: 1µl de T3 (Roche, 11031163001) para el caso de *flh nog2* y *krox20*, 2µl de T7 (Roche, 10881767001) para los genes *bmp4*, *shha*, *no tail nog1* y *nog5*, 3µl de SP6 para el gen *fgf8a* (Roche, 10810274001). Se resuspendió con micropipeta y se incubaron a 37°C por 3horas para T3 y T7 y 3horas y media para SP6. Se agregaron 5µl de DNAsa (TurboDNAsa, Ambion, AM2238). Se incubó a 37°C por 15 minutos y se agregaron 2µl de EDTA (Sigma-Aldrich, ED2SS) 200mM pH 8.0 (preparado con dH₂O-DEPC y filtrado) para detener la reacción. Se incubó la reacción por 10min. en hielo y se agregaron 23µl de dH₂O-DEPC (Para llevarlo a un volumen final de 50µl).

Se preparó una columna Quick spin (ROCHE 1274015), sacándola de 4°C y mezclando por inversión una vez. Para retirar el buffer de las columnas, se colocó en un tubo eppendorf de 1.5ml y se centrifugó a 1100xg (2.2rpm en minispin, Eppendorf) por 2min. a temperatura ambiente y se cambió a un tubo nuevo. Se colocaron los 50µl de la reacción en el centro de la columna. Se eluyó a 1100xg por 4min. a temperatura ambiente. Se precipitó agregando 0.1 volúmenes de acetato de amonio pH5.2 y 2.5 volúmenes de etanol 100% y se colocó a -70°C toda la noche.

Al día siguiente, se centrifugó a máxima velocidad a 4°C por 30min., se decantó el sobrenadante y se lavó agregando 1ml de etanol 70% (dH₂O-DEPC) e inmediatamente se realizó una última centrifugación a máxima velocidad a 4°C por 5 min. Se removió el sobrenadante y se dejó secar por 5 min. resuspendiendo en 50µl de HYB+ (atemperada a temperatura ambiente).

En la figura 11A se muestran la sonda para *shha*, *no tail* y *krox20*. La sonda para *bmp4* y *fgf8a* se observa en la figura 11B y 11C respectivamente. No se conocían los pesos esperados de estas sondas sin embargo en todas se obtuvo un peso entre 800 y 1500pb, correspondiendo al tamaño promedio de las sondas.

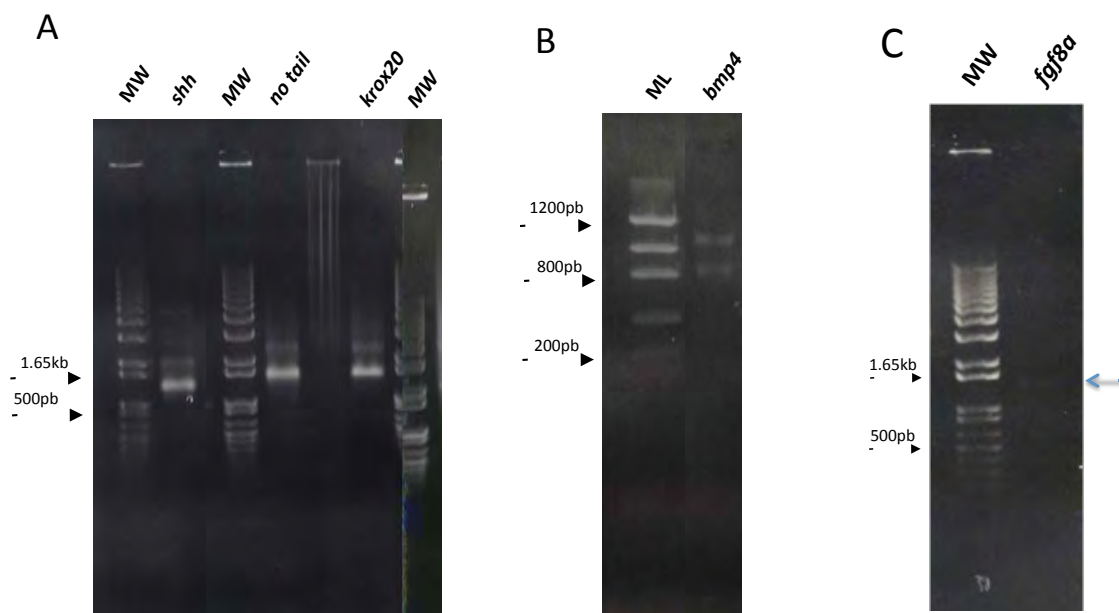


Figura 11. Electroforesis de las sondas para hibridación *in situ*. A. *shha*, *no tail* y *krox20*. B. *bmp4*. C. *fgf8a*. Geles de agarosa 0.5%. MW. Marcador de peso molecular 1kb, ML DNA Mass Ladder.

5.6 Microinyección de morfolinos (MOs)

Los Morfolinos (MOs) son oligómeros de 25pb que se unen por complementariedad al pre-RNA de interés para impedir su correcta traducción o empalme alternativo. Los MOs de las RNA helicasas p54a y p54b se unen entre el primer exón y el primer intrón, impidiendo el empalme alternativo. Fueron sintetizados por la compañía “Gene Tools” con las siguientes secuencias:

Nombre: P54a

Secuencia: CGGCATTTGCAAGGACTTACTTGAT

Nombre: P54b

Secuencia: TTACATGAAGATTACCTGATACCGC

Para micro-inyectar se utilizaron capilares de borosilicato de 1.0mm OD y 0.58mm ID. Para formar la aguja, estos capilares fueron estirados con un equipo “Puller” (Sutter Instruments Inc.). El equipo calienta la parte central del capilar y es jalado por ambos extremos a una fuerza constante. El largo de la aguja se ajusta a 9cm y se coloca 1µl del

MO. Las micro-agujas se colocan en un porta-agujas sujeto a un micro-manipulador y conectado a un sistema de micro-inyección (Tritech Research, MINJ-1).

Los huevos recién fertilizados se colocan en unas cajas de agarosa al 2%, las cuales contienen unos surcos para inmovilizar a los embriones. Los embriones fueron micro-inyectados en el vitelo únicamente en estadio de una célula. Las concentraciones de los morfolinós fueron las siguientes: MOp54a, 6.25µg/µl y MOp54b, 3.75µg/µl. La cantidad y volumen final a las que se micro-inyectó fue de 15ng/2.4nl y 9ng/2.4nl respectivamente. En los dobles morfantes, se micro-inyectó la misma cantidad de 15 y 9ng pero en un volumen final de 3.5nl. Los morfolinós se disolvieron con 10% Danieú, 4% de rojo de fenol y agua MiliQ filtrada. Posteriormente, se colocaron en una caja Petri con medio para embriones y se mantuvieron en una incubadora a 28.5°C, con un recambio de medio aproximadamente a las 18:00hrs, y los embriones se fijaron PFA 4% a las 24hpf, deshidratándolos con un tratamiento de metanol, que son lavados de 15 min. con las siguientes soluciones: metanol 30% en PBST, metanol al 60% en PBST y metanol absoluto. Los embriones se observaron en microscopio estereoscópico NIKON SMZ645 a 5x, con cámara digital marca SONY modelo DSC-H20 y se guardaron a -20°C.

5.7 Hibridación *in situ*

En el anexo1 se muestra la composición de cada uno de los buffers utilizados en esta técnica. Los embriones fijados se hidrataron con tratamiento de metanol 60% (en PBST), en agitación suave durante 10min, igualmente con metanol al 30% (en PBST) y por último se realizaron 3 cambios de 5min cada uno, en PBST. Se adicionó proteinasa K (10µg/µl), agitándose por inversión y se colocaron en hielo por 5min. Inmediatamente se lavó con PBST, mezclando por inversión dos veces. Se repitió lo anterior y se colocaron en agitación suave por 5min. Los embriones se sometieron a una re-fijación con PFA 4% (en PBST) durante 30min en agitación suave. Se realizaron tres lavados de 5min cada uno con PBST. Para la pre-hibridación, se retiró la solución de PBST y se realizaron dos lavados con el buffer HYB- en agitación suave durante 5min. Se volvió a hacer un recambio con el buffer HYB- pero esta vez colocando a los embriones a 65°C en un horno de hibridación (MiniDizer HB-500) durante 10min. Se intercambió por el buffer HYB+

precalentado a 65°C en agitación por 2hrs. Se agregó 80ng de cada una de las sondas y se incubó por 12hrs. en el horno de hibridación a 65°C.

En el segundo día se realizaron los siguientes lavados con todas las soluciones precalentadas a 65°C y en agitación suave: 75%HYB-/25%SSC2X por 15min, 50%HYB-/50%SSC2X por 10min, 25%HYB-/75%SSC2X por 10min, SSCT2X por 10min, SSCT0.2X por 30min. Los embriones se colocaron a temperatura ambiente por 10min y se agregó 50%SSCT0.2X y 50%PBST por 30min, PBST por 20min, buffer de maleico por 2min y por último se dejaron en solución bloqueadora por 2hrs. Se agregó el anticuerpo (Anti-digoxigenina-AP disuelto en solución bloqueadora 1X de ROCHE 1:2000) y se dejó en agitación suave toda la noche a 4°C. Se retiró la solución con anticuerpo y se recambió tres veces con PBST, mezclando por inversión cada vez. Se volvieron a realizar cuatro lavados más con PBST de 15min. cada uno. Los embriones se colocaron en una placa con pozos excavados tratando de dejar la menor cantidad de PBST y se adicionó 300µL de la mezcla de BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato) (3.2µl/ml de buffer, Promega, S351) y NBT (nitro-blue) (1.6µl/ml de buffer Promega, S380C) diluido en buffer alcalino pH 9.0 (100mM Tris-HCl, 150mM NaCl y 1mM MgCl₃). Al momento de parar la reacción, se intercambió el revelador por PBST y se agitó suavemente por 1min y posteriormente se realizó otro lavado de 5min. Se aclararon con glicerol al 50% en PBST y se observaron en microscopio estereoscópico NIKON SMZ645 a 5x, con cámara digital marca SONY modelo DSC-H20. Se fijaron en PFA 4%/PBST y se guardaron a -20°C.

6 RESULTADOS

6.1 Las RNA helicases p54a y p54b participan en la morfogénesis de las partes caudales del pez cebra.

6.1.1 Los morfantes de la RNA helicasa p54a muestran defectos en la formación de estructuras caudales.

El pez cebra presenta dos homólogos de la RNA helicasa p54; p54a y p54b. Para conocer la función de cada una de ellas en su desarrollo embrionario, se utilizó el método de micro-inyección de morfolinós, basado en la tecnología antisentido para interferir con el procesamiento del mRNA de estos genes, (Nasevicius y Ekker, 2000). Los embriones fueron micro-inyectados en el estadio de una célula (6.25µg/µl, ver metodología), concentración a la cual ya se había reportado en el laboratorio que causaba un defecto en la formación de las partes caudales del embrión a las 24hpf (Zampedri, datos aún no publicados).

Los embriones micro-inyectados presentaron una sobrevivencia del 74% (n=261). Del total de embriones que sobrevivieron el 22% no muestra un cambio aparente respecto al control (Fig. 12B), sin embargo el 52% presenta un fenotipo que se caracteriza por una curvatura en la parte más caudal del embrión a la altura del ano (Fig. 12C, flecha).

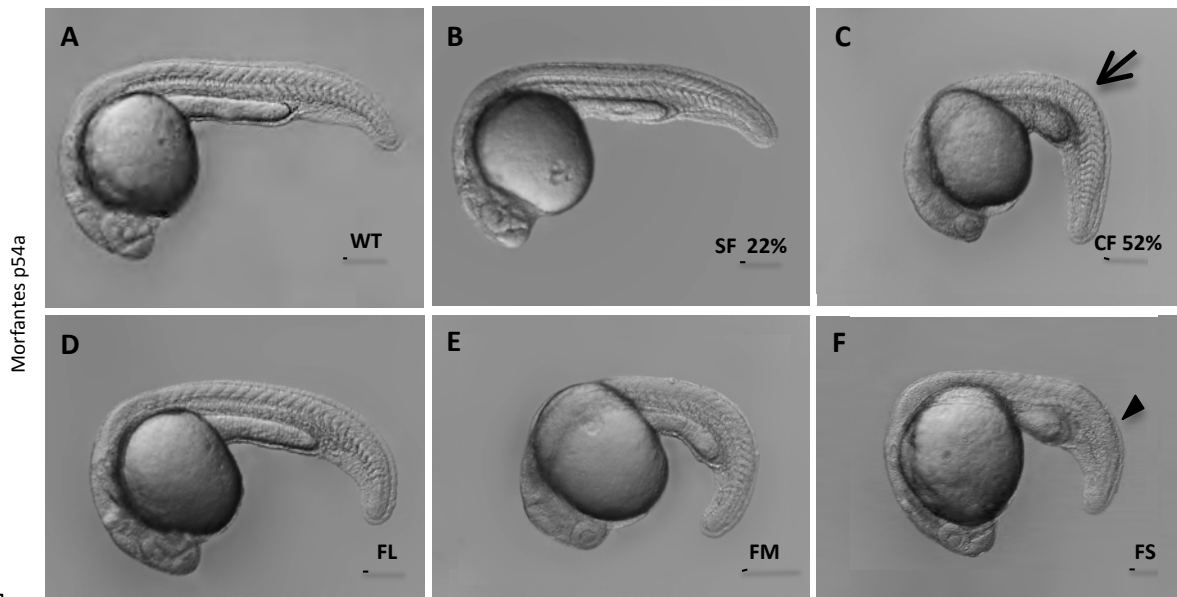


Figura 12. Fenotipos observados a las 24hpf en los embriones micro-inyectados con el morfolino para la RNA helicasa p54a (6.25µg/µl). A Embrión WT no inyectado. B. El 22% de los embriones micro-inyectados no presentan un fenotipo aparente. C. Fenotipo que presenta el 52% de los morfantes. D-F. Grados de severidad en el fenotipo. SF sin fenotipo aparente, CF con fenotipo, FL, fenotipo leve, FM fenotipo medio y FS, fenotipo severo. Barra de escala 250µm.

El fenotipo mostró distintos grados de severidad desde un fenotipo leve con una ligera curvatura en la cola (Fig. 12D), otros mostraron un fenotipo medio indicando disminución en el tamaño de la cola a lo largo del eje anteroposterior, así como un engrosamiento de la misma (Fig. 12E), hasta alteraciones en los somitos y epidermis en un fenotipo severo (Fig.12F, punta de flecha). La región anterior de los embriones no mostró ningún cambio aparente y las partes axiales, que incluyen a la notocorda, hipocorda y la placa ventral mesencefálica, tampoco mostraron cambios evidentes.

6.1.2 Los morfantes para la RNA helicasa p54b muestran mayor heterogeneidad en los fenotipos pero menor severidad.

El fenotipo de los embriones micro-inyectados para la RNA helicasa p54b (3.75µg/µl, ver metodología), muestran igualmente alteraciones a las 24hpf en las regiones caudales del embrión. La sobrevivencia de los embriones micro-inyectados fue de 77% (n= 276). Del total de embriones que sobrevivieron el 45% no presenta ningún fenotipo aparente respecto al control (Fig. 13B) y únicamente el 32% muestran el fenotipo anteriormente mencionado (Fig. 13C-F).

Los fenotipos mostraron mayor heterogeneidad desde una pequeña curvatura en la cola (Fig. 13D), un fenotipo medio donde es claramente mas pronunciada (Fig. 13E) y un fenotipo severo en donde se puede observar engrosamiento de la cola y distintas formas de curvatura (Fig. 13C y F, flecha). Sin embargo, aunque existe mayor heterogeneidad, los somitos y la epidermis se ven menos afectados en comparación con los morfantes de p54a (Fig. 13C-F).

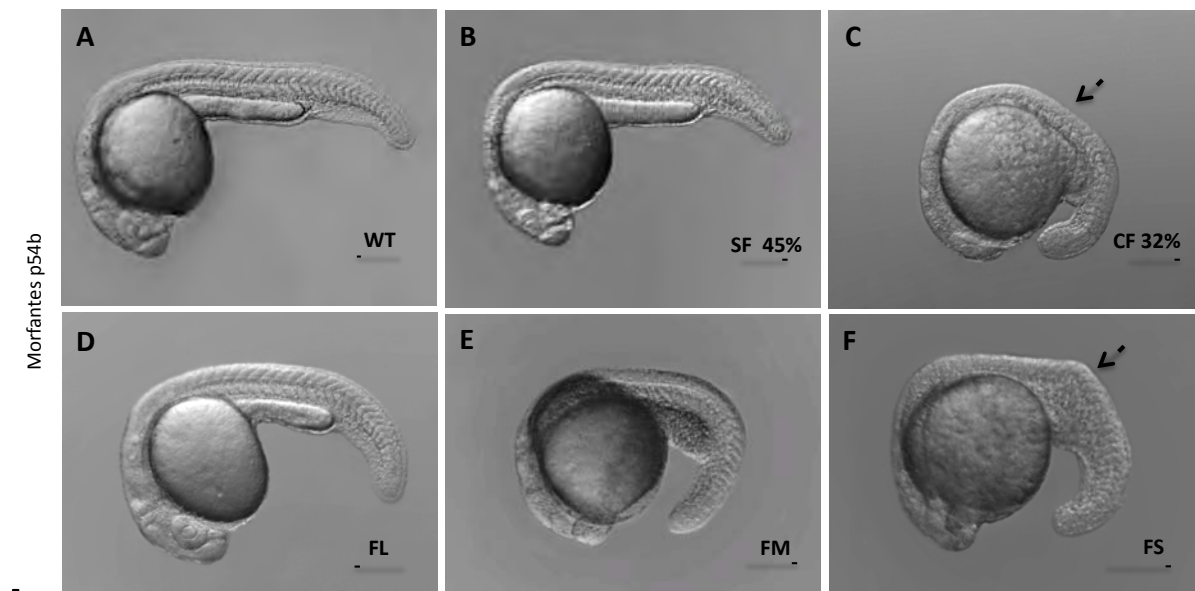


Figura 13. Fenotipos observados a las 24hpf en los embriones micro-inyectados con el morfolino para la RNA helicasa p54b (3.75µg/µl). A Embrión WT no inyectado. B. El 45% de los embriones micro-inyectados no presentan un fenotipo aparente. C. Fenotipo que presenta el 32% de los embriones micro-inyectados. D-F. Grados de severidad en el fenotipo. SF sin fenotipo aparente, CF con fenotipo, FL , fenotipo leve, FM fenotipo medio y FS, fenotipo severo. Barra de escala 250µm.

6.1.3 Los dobles morfantes para la RNA helicasa p54a+p54b muestran un fenotipo más severo y pérdida de algunas estructuras posteriores

Se micro-inyectaron los morfolininos de la RNA helicasa p54a y p54b juntos (6.25µg/µl y 3.75µg/µl, respectivamente). La sobrevivencia de estos embriones co-inyectados fue menor que al micro-inyectarlos por separado, siendo esta del 54% (n=182). De los embriones que sobrevivieron, el 16% no mostraron un fenotipo evidente (Fig. 14B) y el resto en el que si se observó, 38%, fue claramente más severo que los embriones micro-inyectados con solo un morfolino. En estos embriones, desde el fenotipo leve se empezó a notar que la región anterior comienza a verse afectada y aunque la curvatura de la cola es pequeña ya se empieza a perder la estructura de los somitos (Fig. 14D, punta de flecha). El fenotipo medio muestra una curvatura más pronunciada, en algunos de ellos los somitos pierden la forma y la epidermis no muestra un borde continuo (Fig. 14E). El fenotipo severo presentó una completa pérdida de los somitos posteriores y la epidermis se ve claramente afectada (Fig. 14F, flecha).

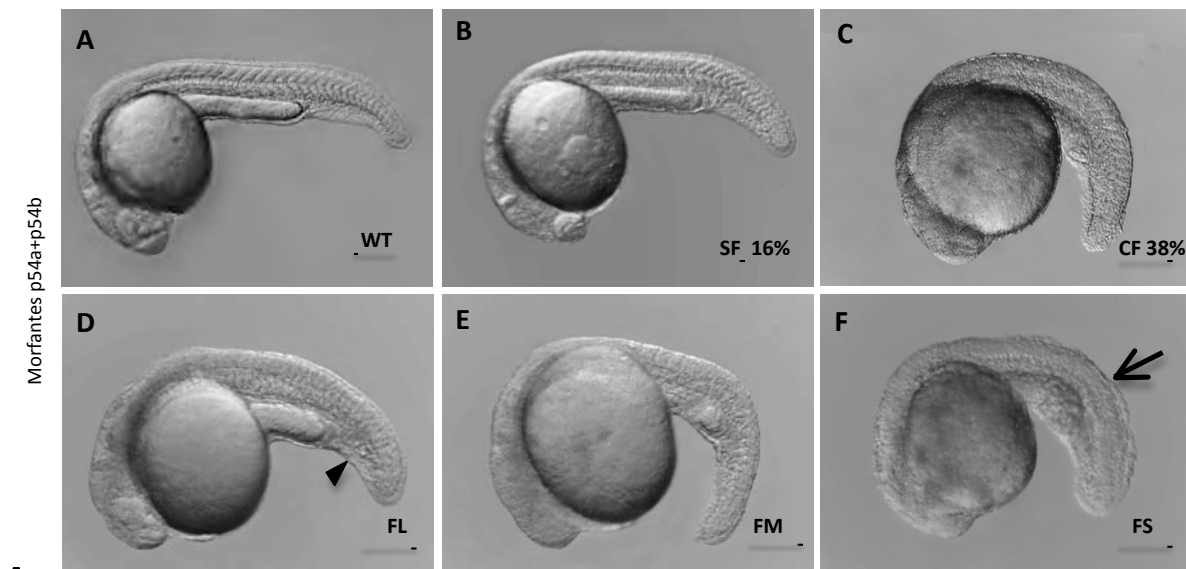


Figura 14. Fenotipos en los embriones co-inyectados a las 24hpf con los MO para la RNA helicasa p54a+p54b (15ng/3.5nl y 9ng/3.5nl, respectivamente). A Embrión WT. **B.** En el 17.56% de los embriones microinyectados no se observa un fenotipo aparente. **C.** Fenotipo que presenta el 36.48% de los embriones microinyectados. **D-F.** Grados de severidad en el fenotipo. SF sin fenotipo aparente, FL, fenotipo leve, FM fenotipo. Barra de escala 250µm.

6.2 Clonación de los genes *floating head (flh)*, *nogina1 (nog1)*, *nogina2 (nog2)* y *nogina5 (nog5)*.

6.2.1 Clonación del gen *floating head (flh)* el cual es esencial para la formación de la notocorda y un marcador de la misma.

El organizador caudal forma estructuras no-axiales en la parte posterior del pez cebra (Agathon *et al.*, 2003), y para comprobar que las estructuras axiales no se ven afectadas se clonó el gen *floating head (flh)*. Este es un gen homeobox que se expresa específicamente en los precursores de la notocorda, la cual es una estructura axial, y es el principal tejido derivado del organizador de Spemann (Talbot *et al.*, 1995; Melby *et al.*, 1997).

Durante la clonación del gen *flh*, se aislaron seis clonas y se liberó el inserto del plásmido pCR4-TOPO por medio de la digestión con la enzima EcoRI, obteniendo un inserto con el peso esperado de 566pb. Únicamente se observó una tenue banda en la clonall (Fig. 15A, marcado en azul y mandado a secuenciar, Anexo2). El inserto podía encontrarse en dos orientaciones (5'-3' o 3'-5'), ejemplificado en la figura 15B y C, respectivamente. Para conocer dicha orientación se realizó una doble digestión con las enzimas BamHI y NotI. Si el inserto se encontraba en una dirección 5'-3', entonces el peso esperado sería de 231pb, si por el contrario fuera de 3'-5' el peso sería de 367pb (Fig.15B-C). El resultado de la doble digestión se muestra en la figura 15D, obteniendo una banda que se encuentra cercano a 400pb, por lo que la posición del inserto en el plásmido es 3'-5'. Conociendo la orientación, se llevo a cabo la transcripción *in vitro* con la enzima de transcripción T3 y se obtuvo la sonda con el peso molecular esperado de 566pb (Fig.15E), aunque es complicado observarla en el gel.

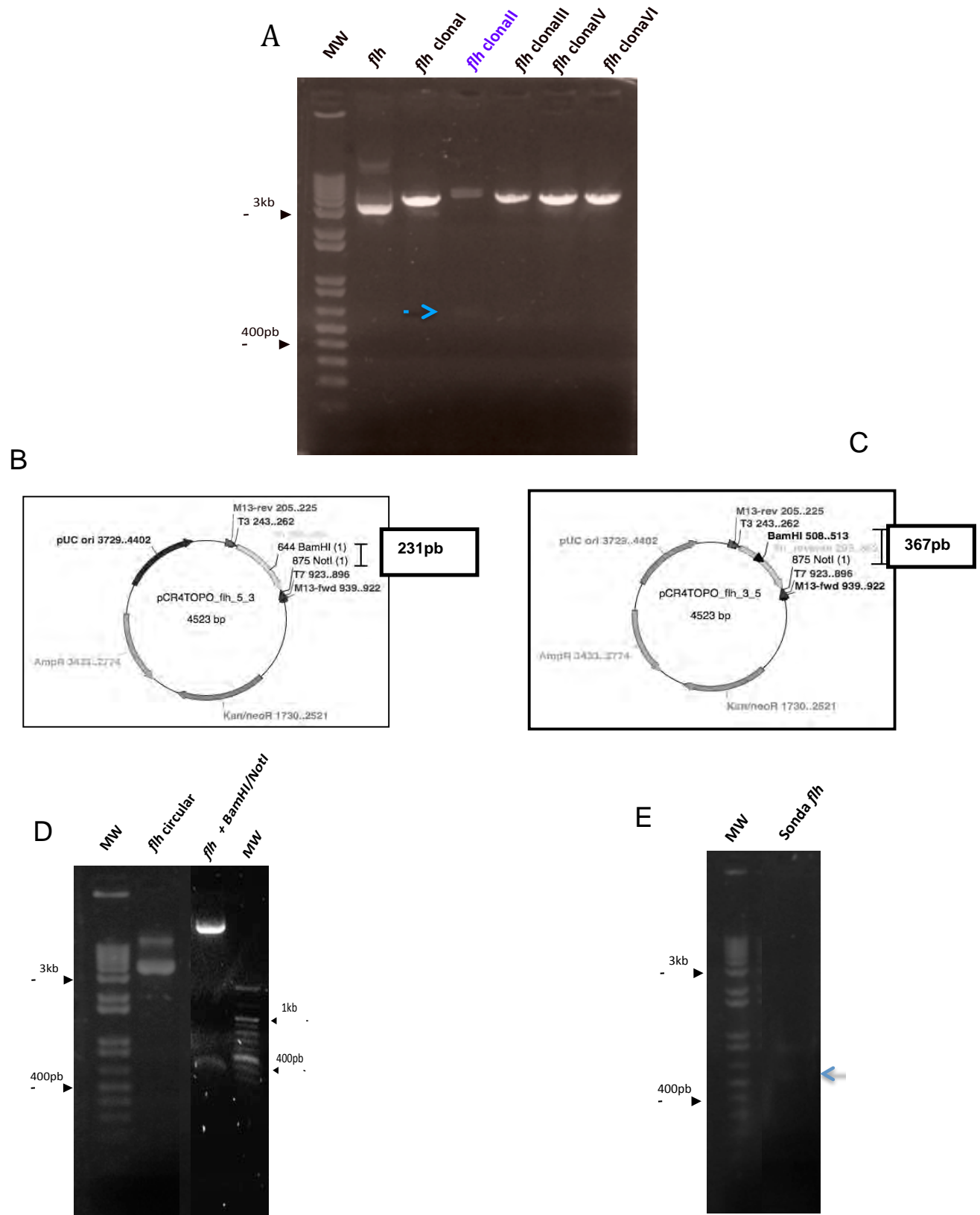


Figura 15. Clonación del gen *floating head* (*flh*). **A.** Liberación del inserto de *flh* con la enzima EcoRI, la clona II (en azul), es la única que presenta una banda con el peso esperado de 566pb. **B. C.** Posibles formas de inserción en el vector PCR4TOPO, 5'-3' y 3'-5' respectivamente, mostrando los pesos esperados en la doble digestión. **D.** Plásmido de *flh* circular y doble digestión con las enzimas BamHI y NotI para conocer la orientación, mostrando un peso de alrededor de 367pb. **E.** Obtención de la sonda para HIS del gen *flh* con un peso de alrededor de 566pb.

Por último, se llevó a cabo la hibridación *in situ* en embriones de WT de pez cebra para el gen *flh* en dos etapas del desarrollo, a los 10 somitos y a las 24hpf. La expresión del gen se observó en la parte más caudal de la notocorda, así como en la epífisis (Fig. 16A y B), concordando con la literatura (Melby *et al.*, 1997).

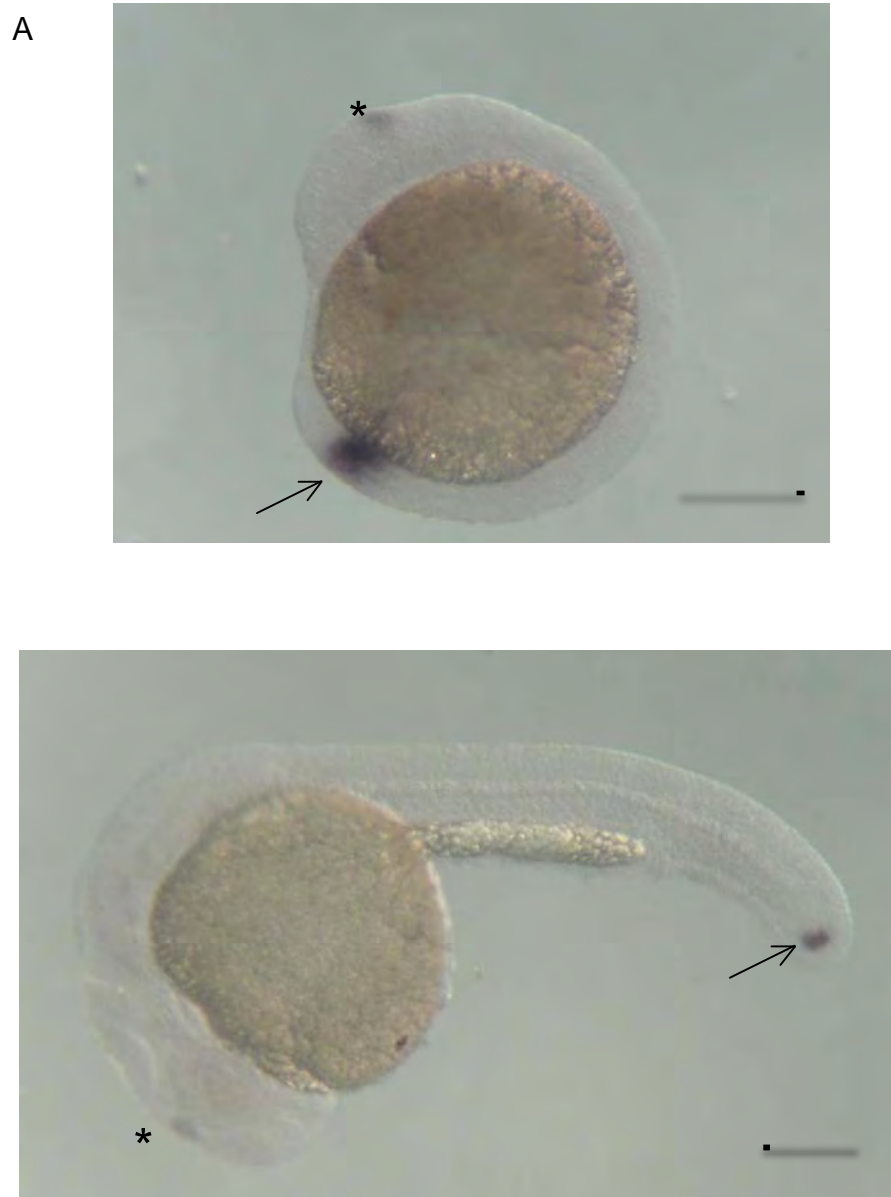


Figura 16. Hibridación *in situ* del gen *floating head (flh)* en embriones WT. A. Embrión en etapa de 10 somitos y B. 24hpf, la sonda para el gen *flh* mostró tinción en la epífisis (asterisco) y la punta de la notocorda (flecha). Barra de escala 250µm.

6.2.2 Clonación de los genes *nogina1 (nog1)*, *nogina2 (nog2)* y *nogina5 (nog5)*, los cuales son inhibidores en la vía de Bmp.

Con los primers diseñados, se realizó una PCR sobre el cDNA obtenido de embriones de días 1, 2 y 5. Para el caso de *nog1* y *nog2* se diseñaron 2 pares de primers para cada uno, y se probaron con dos distintas concentraciones de cDNA. En la figura 17A en azul, se destacan los primers y la concentración elegidas para iniciar con la transformación. En el caso de *nog1* se eligieron los primers1-2 (ver metodología), y la concentración de 5µl ya que mostraron una banda específica con el peso esperado de 853pb, mientras que para el gen de *nog2*, el par de primers que nos arrojó la banda esperada de 900pb fue el par 7-8 a una concentración de 5µl (mostrados igualmente en azul en la Fig.17A).

En el caso de *nog5*, únicamente se diseñaron un par de primers. En el cDNA de embriones de pez cebra la banda esperada de 471pb no era notoria (dato no mostrado), por lo que se realizó la PCR de distintos tejidos (Fig. 17A, últimos ocho carriles), obteniendo en hígado la mayor expresión de *nog5*, por lo que se eligió esta muestra para comenzar la transformación. Así mismo se observó en corazón y en ojo, pero en muy pequeña cantidad.

Posteriormente, se realizó una PCR en colonias para los tres genes. En la figura 15B, se observa los pesos esperados para los genes de *nog1* y *nog2*. De los carriles 2 al 4 se muestra la prueba de colonias para cuatro clonas del gen *nog1*, en donde únicamente la clonall mostró la banda del peso esperado (853pb). Los cuatro siguientes carriles muestran cuatro clonas para el gen *nog2*, todas presentando la banda en el peso esperado de 900pb, sin embargo se eligieron las clonas I y II, (mostradas en azul).

Para el gen *nog5*, mostrado en la figura 17C, se aislaron siete clonas y se realizó igualmente la PCR en colonias. En este caso, cinco clonas mostraron el producto de 471pb. Se eligió la clona II, para la posterior elaboración de la sonda y realizar la hibridación *in situ*.

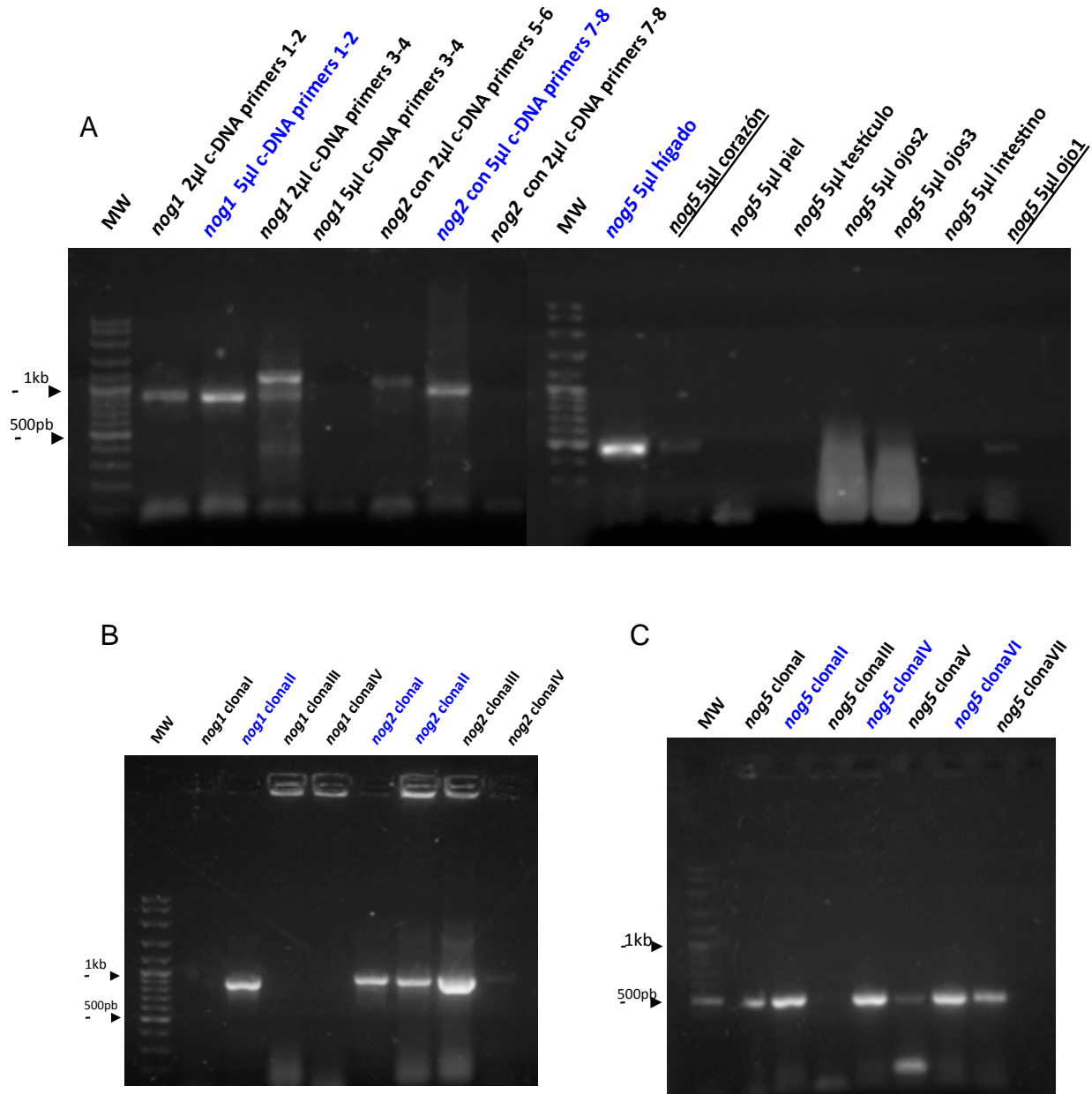


Figura 17. Clonación de los genes *nogina1* (*nog1*), *nogina2* (*nog2*) y *nogina5* (*nog5*). A. PCR de los genes *nog1*, *nog2* y *nog5* con dos pares distintos de primers para *nog1* y *nog2*. En azul se muestran los primers y concentraciones elegidos. Para el gen de *nog5* (últimos ocho carriles) se utilizó un par de primers en distintos tipos de tejido adulto. B. Prueba de PCR en colonias para los genes *nog1* y *nog2*, donde únicamente se obtuvo una banda del peso esperado en la clonalI para el gen *nog1*. Las cuatro clonas mostraron tener el inserto del gen *nog2*. C. PCR en colonias de las siete clonas con el inserto de *nog5*.

Posteriormente se obtuvo la sonda de cada uno de los genes, sin embargo, la secuencia del gen *nogina2* no fue la deseada (datos no mostrados). En el caso del gen *nogina5*, su expresión no se ha reportado hasta el momento. En el presente trabajo se mandó secuenciar obteniendo una identidad del 99% (Anexo2), sin

embargo, se probó la sonda en tres etapas del desarrollo (escudo, 10 somitos y 24hpf) y no se obtuvo una tinción (datos no mostrados). Posiblemente el gen de *nog5* no se exprese en embriones, ya que al tratar de clonarlo y tomar RNA de los mismos, no se obtuvo una banda, sino hasta que se utilizaron muestras de diferentes tejidos de pez adulto (Fig. 17A).

La sonda de *nogina1* mostró el peso esperado de 853pb (Fig.18) y se llevo a cabo la hibridación *in situ* en dos etapas del desarrollo, a los 10 somitos y a las 24hpf (Fig. 19A y B). La expresión del gen se observó en el campo posterior del ojo, telencéfalo dorsal, tubo neural, somitos segmentados, placa de piso mesencefálico y la punta posterior de la notocorda, concordando con la literatura (Fürthauer *et al.*, 1999).

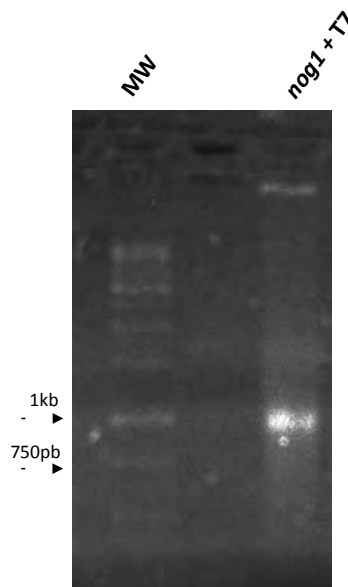


Figura 18. Sonda para el gen *nogina1* (*nog1*). Electroforesis de la sonda del gen *nog1*, mostrando el peso esperado de 853pb utilizando la enzima T7.

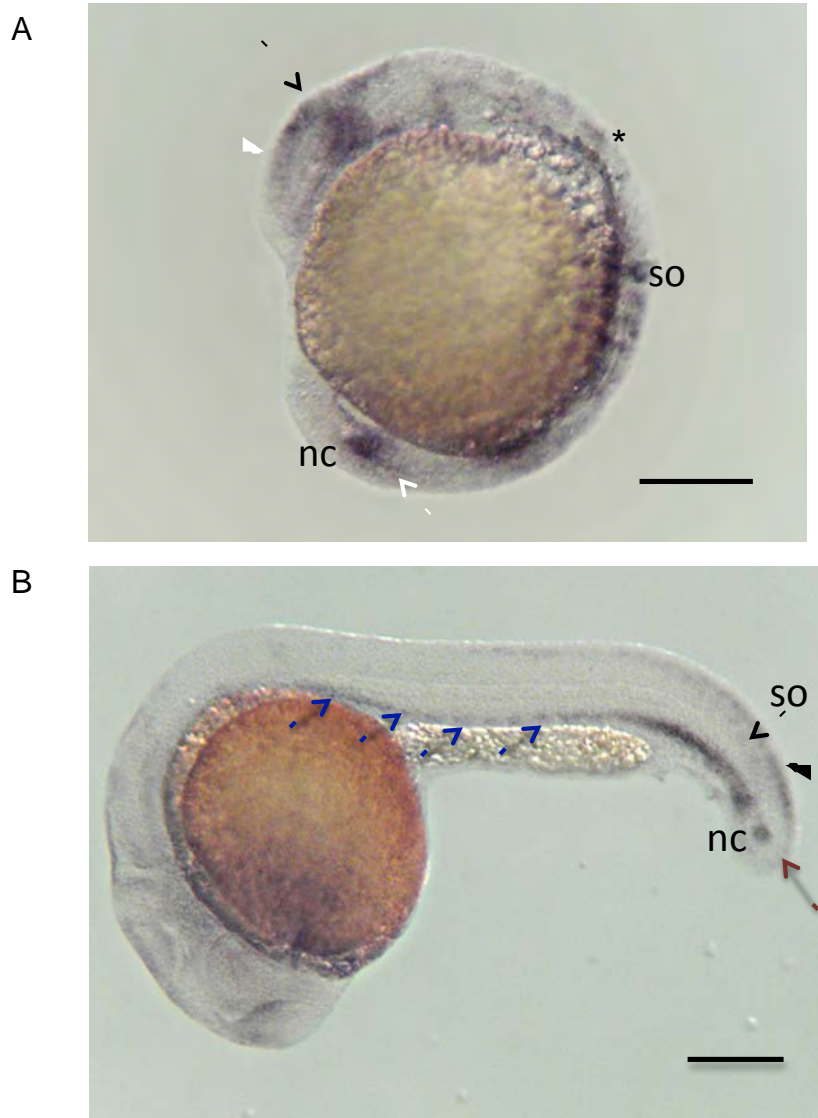


Figura 19. Hibridación *in situ* del gen clonado *nogina1* (*nog1*) en embriones WT. A. Embrión en etapa de 10 somitos. La sonda para el gen *nog1* mostró tinción en el telencéfalo dorsal (punta de flecha blanca) campo posterior del ojo (flecha negra), tubo neural dorsal (asterisco), somitos (so), y la placa de piso mesencefálica caudal (flecha blanca) y punta de la notocorda (nc). **B.** A las 24hpf, la tinción se observa en pequeñas zonas dorsales y ventrales de los somitos más caudales recién formados (so), en somitos más maduros que son los anteriores, solamente se expresa en partes ventrales (flechas azules), medula espinal dorsal (punta de flecha negra), punta de notocorda (nc), mesénquima que recubre el brote de la cola (flecha roja). Barra de escala 250μm.

6.3 Caracterización de los morfantes de la RNA helicasa p54a y p54b

6.3.1 La expresión del gen *bmp4* se pierde en la epidermis de la parte dorsal de los morfantes de p54b y en los dobles morfantes.

Para comenzar a conocer como es que la inhibición de la transcripción de la RNA helicasa p54 afecta el desarrollo embrionario del pez cebra, se eligieron distintos marcadores para evaluar el patrón de expresión por medio de hibridación *in situ*. Debido a que los morfantes para la RNA helicasa p54 muestran cambios en la región caudal, como primer paso se observó el patrón de expresión de genes involucrados en una de las vías más importantes presentes en el organizador caudal, la vía de Bmp. Para esto, se utilizaron dos marcadores; el primero es *bmp4*, y el segundo es su inhibidor *nogina1* (*nog1*).

El marcador de *bmp4* muestra tinción en el primordio del corazón, parte posterior de la retina y epidermis (Fig. 20A). En las partes anteriores no se observó diferencia en el patrón de expresión en ninguno de los morfantes (Fig. 20B-D), sin embargo la tinción de la epidermis se pierde en los morfantes para p54b y los dobles morfantes únicamente en la parte dorsal (Fig. 20C y D, corchetes).

El gen *nog1* a las 24hpf se expresa en la parte ventral de los somitos mas anteriores, en la punta de la notocorda, en la médula espinal dorsal y existe una ligera tinción en la parte dorsal de los somitos más caudales (Fig. 20E). Ninguno de los morfantes mostraron cambios en el patrón espacial de dichas estructuras (Fig. 20F-H), a pesar de que se ha observado que al inhibir los antagonistas de *bmp* (Row y Kimelman 2009), se obtienen defectos en las estructuras caudales del pez cebra.

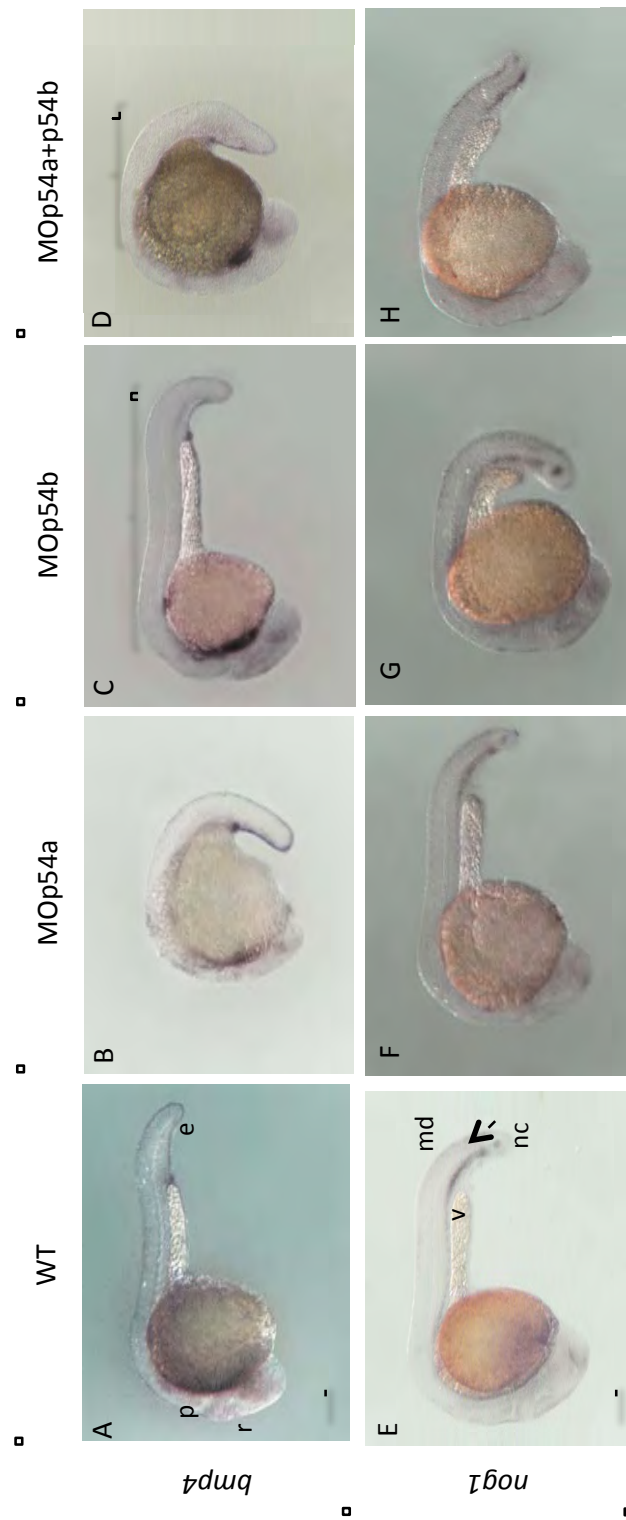


Figura 20. Hibridación *in situ* de marcadores relacionados con la vía de Bmp en los morfantes de la RNA helicasa p54a, p54b y dobles morfantes (p54a+p54b) a las 24hpf. A,E, Embriones WT de las sondas *bmp4* y *nog1* respectivamente. **B.** *bmp4* no muestra cambio en el patrón de expresión en los morfantes de p54a. **C y D.** La tinción del marcador *bmp4* se pierde en la epidermis dorsal en los morfantes de p54b y los dobles morfantes (corchetes). **F-H.** Expresión del gen *nog1* en los tres tipos de morfantes. p, primordio del corazón, r, parte posterior de la retina, e, epidermis, md, medula espinal dorsal, nc, notocorda. Barra de escala 250µm.

6.3.2 El patrón de expresión para los marcadores *fgf8a* y *shha* muestran alteraciones únicamente en la región caudal de los dobles morfantes para la RNA helicasa p54.

Para descartar alteraciones de regiones anteriores en los morfantes de la RNA helicasa p54, se realizaron hibridaciones *in situ* con sondas que marcan distintas zonas en el embrión a las 24hpf, momento en el que es más evidente el fenotipo. La sonda de *Krox20* es un marcador de los rombómeros 3 y 5 del rombencéfalo (Fig. 21A). Los embriones microinyectados con la RNA helicasa p54a, p54b y el doble morfante de p54a+p54b, no muestran cambios en el patrón de expresión de *krox20* (Fig. 21B-D).

En el caso del gen *fgf8a*, el cual marca tallo óptico, diencéfalo dorsal y el límite entre el cerebro medio y el rombencéfalo, no se observan cambios en ninguna de estas regiones. Sin embargo *fgf8a*, también es un marcador de los últimos somitos y el pliegue de la aleta caudal (Fig. 21E). En las partes caudales, los embriones que solo fueron microinyectados con un homólogo de la RNA helicasa p54 no muestran cambios (Fig. 21F y G), pero el doble morfante presenta la marca situada más ventralmente en el 65% de los casos (Fig. 21H), el 25% no se observa dicha expresión y el 10% presentó una expresión normal.

El gen *sonic hedgehog (shha)*, también se expresa en regiones anteriores y posteriores. En el caso de las primeras, marca el hipotálamo, la placa basal y la zona limitante intratálámica. En la región posterior marca la parte más caudal de la notocorda y la placa de piso mesencefálica (Fig. 21I, flecha). En los morfantes de la RNA helicasa p54a y p54b por separado, el patrón de expresión se pierde en la región de la placa de piso mesencefálica en la región del tronco (Fig. 21J-K flecha blanca), sin embargo en los dobles morfantes, no se observa expresión en las regiones caudales (Fig. 21L).

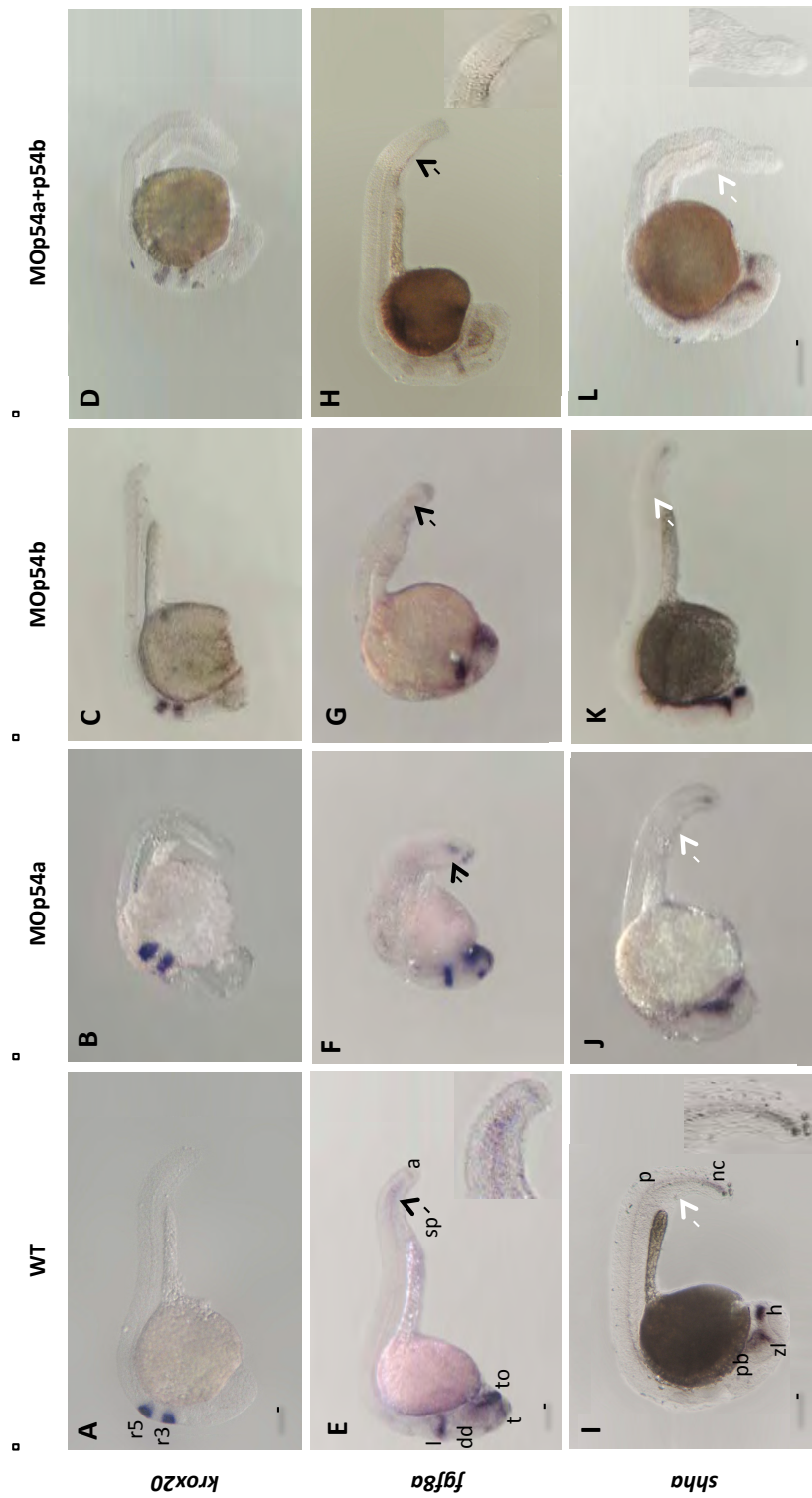


Figura 21. Hibridación *in situ* de los marcadores *krox20*, *fgf8a* y *shha* en los morfantes de la RNA helicasa p54a, p54b y dobles morfantes (p54a+p54b) a las 24hpf. **A** *krox20* es expresado en los rombómeros 3 y 5 (r3 y r5, respectivamente) en los embriones WT. **B-D**. *Krox20* no muestra cambio en el patrón de expresión en los ninguno de los morfantes. **E**. Expresión del gen *fgf8a* en embriones WT. **F-H**. De los tres tipos de morfantes, únicamente el doble morfante (65% de los casos) muestran un corrimiento en el patrón de expresión hacia la parte ventral del embrión (indicado con la flecha negra). **I**. Expresión del gen *Sonic hedgehog* (*shha*) en embriones WT. **J y K**. La expresión del gen *shha* se pierde en la placa de piso mesencefálica a la altura del tronco en los morfantes de p54a y p54b. **I**. Los dobles morfantes pierden completamente la tinción posterior en todos los casos. dd., diencéfalo dorsal, to, tallo óptico, t, telencéfalo, l, límite entre el cerebro medio y el rombencéfalo, sp, somitos posteriores, a, pliegue de la aleta caudal, pb, placa basal, zl, zona linmitante intratálámica, h, hipotálamo, p, placa de piso mesencefálica, nc, notocorda
Barra de escala 250µm.

6.3.3 Los morfantes para la RNA helicasa no muestran alteraciones en la formación de la notocorda

El organizador caudal forma estructuras posteriores no axiales en el desarrollo del pez cebra, por lo que esperaríamos que estructuras axiales no presenten cambios en los morfantes de la RNA helicasa p54. Decidimos analizar si la formación de la notocorda se ve afectada, la cual es la principal estructura axial formada a partir del organizador de Spemann, además de ser importante para la formación de otras estructuras como somitos adyacentes y tejido neural (Talbot *et al.*, 1995; Melby *et al.*, 1997). Se ha reportado que los genes *floating head (flh)* y *no tail (ntl)* actúan como factores de transcripción para el desarrollo de la notocorda y mutantes para cada uno de estos genes no llegan a formar la notocorda, en su lugar se generan células musculares en el mutante de *flh* y mesénquima en los mutantes de *ntl*. (Melby *et al.*, 1996).

El marcador de *flh* muestra tinción en la punta de la notocorda y en la epífisis (Fig.22A), sin embargo ninguno de los morfantes mostró diferencia en el patrón de expresión con respecto al control (Fig. 22B-D). El otro marcador, *no tail*, también muestra tinción en la punta de la notocorda (Fig. 22E). Ninguno de morfantes para la RNA helicasa p54 mostraron diferencia en la expresión de *ntl* con respecto a los embriones no inyectados (Fig. 22F-H).

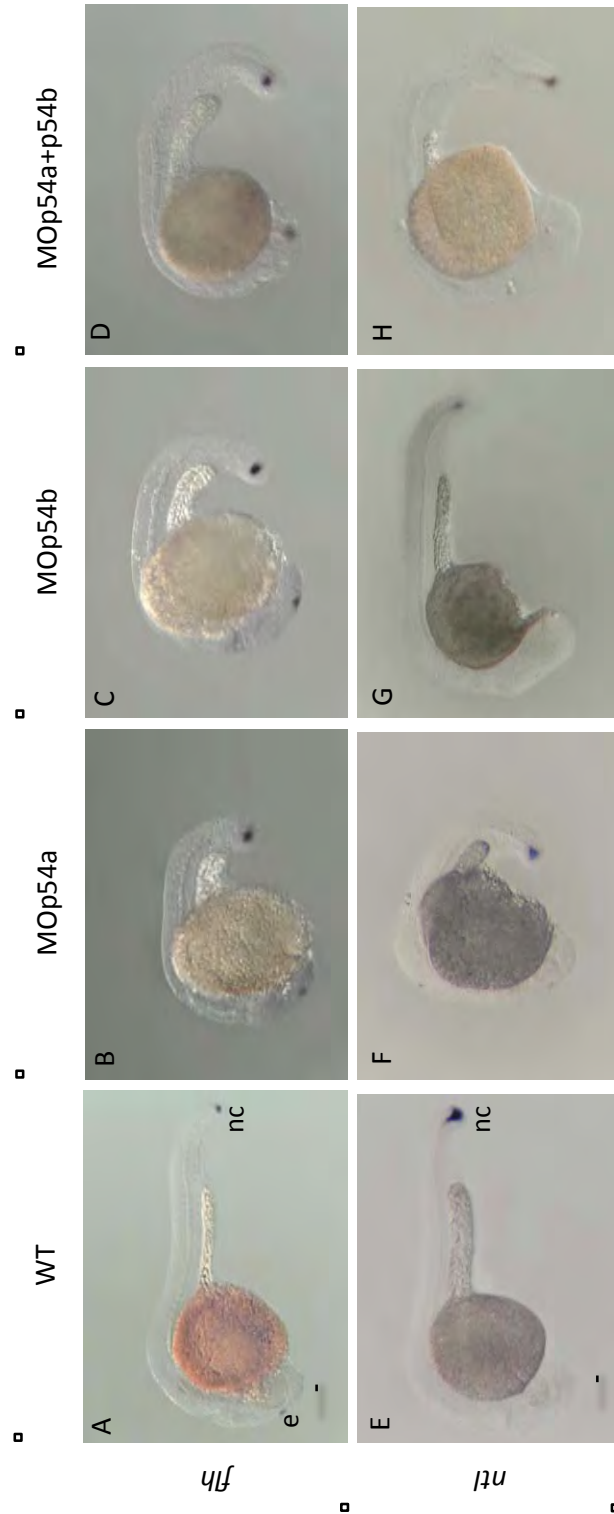


Figura 22. Hibridación *in situ* de las sondas *filh* y *no tail* en los morfantes de la RNA helicasa p54a, p54b y dobles morfantes (MOP54a+p54b) a las 24hpf. A y E. Patrón de expresión en embriones WT de los genes *filh* y *no tail* respectivamente. B-D. El patrón de expresión del gen *filh* no presenta alteraciones en los embriones micro-inyectados. F-H. En ninguno de los embriones micro-inyectados se observan diferencias en la expresión del gen *no tail*. nc, notocorda, e, epífisis. Barra de escala 250µm.

7 DISCUSION

La versatilidad de la RNA helicasa p54 en modular el metabolismo de mRNAs la convierte en un regulador clave de expresión génica post-transcripcional. En nuestro laboratorio se reportó por primera vez un fenotipo por pérdida de función de esta proteína en el pez cebra (Zampedri, datos aún no publicados). En el presente trabajo, mediante el uso de morfolinós para cada uno de los homólogos de P54 en pez cebra (P54a y P54b), inyectándolos solos o en combinación (MOp54a, MOp54b y MOp54a+p54b), se describen los fenotipos de cada uno de los morfantes y observamos que los embriones no presentan anomalías hasta la gastrulación, sino durante la formación de la cola, la cual muestra distintos grados de curvatura, siendo más evidente a las 24hpf. Los dobles morfantes son los que presentan el fenotipo más severo incluyendo pérdida de formación de somitos posteriores. A través de la técnica de hibridación *in situ* con diferentes marcadores se determinó que las estructuras anteriores y la notocorda no se ven afectados en ninguno de los morfantes. Sin embargo, los patrones de expresión de los marcadores *fgf8a* y *shha*, muestran cambios o completa pérdida de tinción únicamente en los dobles morfantes, por lo que se propone que las RNA helicasas P54a y P54b tienen una función redundante en la regulación de ambos genes. Por otro lado, la expresión de *bmp4* se pierde en la epidermis dorsal únicamente en los morfantes de p54b y los dobles morfantes.

Se ha reportado la participación de la RNA helicasa P54 durante el desarrollo en distintos organismos, principalmente en cuatro procesos: en el control de mRNA maternos (Boag *et al.*, 2008; Rajyaguru *et al.*, 2008); en la formación de ovocitos y espermatozoides (Valoir *et al.*, 1991; Ladomery *et al.*, 1997; Navarro *et al.*, 2001; Minshall y Standart, 2001; Matsumoto *et al.*, 2005); en la reproducción, donde Navarro y col. demuestran que al inhibir *cgh-1* (homólogo de p54 en *C. elegans*) por medio de RNAi, los adultos jóvenes muestran esterilidad desde las primeras 24 horas de desarrollo; y por último en la embriogénesis temprana, donde ratones que carecen de P54 presentan letalidad (Matsumoto *et al.*, 2005). Aunque en ninguno de estos trabajos se reporta un fenotipo aparente. Sin embargo, los morfantes de pez cebra para cada uno de los homólogos de P54, presentan un fenotipo en el cual solamente se observan alteraciones en las partes caudales.

Griffin y col. en 1995 propusieron que existen mecanismos separados para la formación del tronco y la cola, con respecto a las partes anteriores durante el desarrollo embrionario

del pez cebra. Pero fue hasta el 2003, que se encontraron las células responsables de llevar a cabo la formación de las partes caudales (Agathon *et al.*, 2003). Este grupo de células llamadas conjuntamente como organizador caudal, se especifican durante la gástrula, y en etapas post-gástrula se mantienen como una población de células madre en el brote de la cola, las cuales darán origen a las estructuras posteriores no axiales incluyendo los últimos somitos, epidermis, vasos sanguíneos y aletas ventrales posteriores. Se han reportado varios fenotipos en pez cebra, donde únicamente se ven afectadas las partes posteriores, principalmente al alterar las vías de señalización de Bmp y de Wnt; ejemplos de ellos: sobre-expresión de Bmp (Kondo *et al.*, 2007; Esterberg *et al.*, 2008; Row y Kimelman, 2009; O'Neil y Thorpe 2013), sobre-expresión Frzb-1, el cual es antagonista de Wnt (Leyns *et al.*, 1997), o al inhibir la vía de Wnt8 (Lekven *et al.*, 2001), o mutantes con pérdida de función para Wnt3a y *Brachyury* (Takada *et al.*, 1994; Schulte-Merker 1994).

Para conocer si existen alteraciones en la expresión génica en la vía de Bmp en los morfantes para la RNA helicasa p54, se analizó la expresión de *nogina1*, uno de sus principales inhibidores de esta vía, el cual evita la activación ectópica de *bmp*, la cual se ha visto que genera efectos severos en el brote de la cola en etapas de post-gastrulación (Row y Kimelman, 2009), sin embargo no se observó ningún cambio en el patrón de expresión para *nog1* en ningún morfante. Por otro lado, el marcador de *bmp4*, el cual se le atribuye una función en la regulación de la morfogénesis de la cola controlando la migración celular dentro del brote de la cola (Yang y Thorpe, 2011), mostró pérdida de expresión en la epidermis dorsal solamente de los morfantes para p54b y los dobles morfantes. La vía de señalización de Bmp se activa entre las 4 y 5hpf, mostrando cambios temporales en su función. Por un lado, durante la blástula y la gástrula temprana participa en la especificación del mesodermo ventral y está involucrado en la formación de la cola, mientras que durante la mitad de la gastrulación participa en la formación de la cloaca y la aleta ventral, y su pérdida durante la gástrula tardía genera una cola secundaria que contiene tanto músculo somítico como notocorda, mostrando funciones opuestas en el desarrollo de la cola a lo largo del desarrollo embrionario (Pyati *et al.*, 2005; Pyati *et al.*, 2006; Yang y Thorpe, 2011).

Además de observar si existen alteraciones en la vía de Bmp, quisimos crear una alternativa para conocer como se lleva a cabo la regulación a través de una RNA helicasa

para obtener fenotipos afectados únicamente en la parte caudal. Primeramente se eligieron marcadores para descartar que las estructuras anteriores están siendo afectadas. Los marcadores *krox20*, *fgf8a*, *shha* y *flh*, no mostraron ningún cambio en el patrón de expresión en estructuras anteriores a las 24hpf, tiempo en el que es más evidente el fenotipo en los tres tipos de morfantes. Así mismo, quisimos observar si estructuras axiales las cuales se diferencian a partir del organizador de Spemann, se ven afectadas. La notocorda, que es el ejemplo más claro de estructura axial, parece no mostrar ninguna alteración, ya que los marcadores de *flh* y *no tail*, que son genes involucrados en la correcta formación de dicha estructura (Melby *et al.*, 1997) tampoco muestran cambios en ninguno de los morfantes para P54.

Sin embargo, identificamos cambios en la expresión espacial de dos genes. Cuando estudiábamos alguna alteración en la regiones anteriores con los marcadores de *fgf8a* y de *shha*, observamos que no eran las estructuras anteriores las que estaban siendo afectadas, sino que el patrón de expresión de las partes caudales era el que estaba cambiando, pero únicamente en los dobles morfantes (MOp54a+p54b), esto podría indicar que los homólogos de la RNA helicasa p54 tienen actividad redundante en el desarrollo del pez cebra.

En los dobles morfantes (MOp54a+p54b) la expresión del marcador para el gen *fgf8a* se observó desplazada hacia la parte ventral del embrión en el 65% de los casos, en estos embriones se forman los somitos aunque no mantienen su forma original, el 25% de los casos en el que no se observa expresión de *fgf8a*, tampoco se observan somitos desde la altura del ano hasta la parte posterior. La vía de señalización de FGF ha mostrado tener un papel clave durante la segmentación y la elongación del eje embrionario. El papel más estudiado de esta vía es en la formación de somitos a partir del mesodermo presomítico (PSM) (Dubrulle *et al.*, 2001). El papel de *fgf8* directamente no se había podido estudiar ya que mutantes para este gen no eran capaces de terminar la gastrulación, sin embargo cuando se eliminó la expresión de *fgf8* en etapas posteriores a la gastrulación en ratones, no se observaron defectos en la formación de somitos (Perantoni *et al.*, 2005). Boulet y col. en el 2012, a través de una doble mutante condicional en ratón para los genes *fgf4* y *fgf8*, muestran que en etapas post-gastrulación (E9.5), ambas actúan para formar la cola y el número correcto de somitos. Ellos demuestran que es por una reducción en la cantidad de PSM, aunque en los ratones en etapas más avanzadas (E15.5) pierden

completamente la cola. Este fenotipo es muy parecido al que obtuvimos, debido a que los somitos anteriores se forman normalmente, únicamente los más posteriores reducen su tamaño o no se forman. Por esta razón sería interesante conocer si también en los dobles morfantes para la RNA helicasa p54 se ve afectada la expresión de *fgf4*. Así mismo mediante la expresión de un dominante negativo del receptor de FGF (FGFR) durante el desarrollo de *Xenopus* se ocasiona la pérdida del tronco y la cola sin causar defectos severos en la cabeza, indicando que estos dos regiones del cuerpo utilizan distintos mecanismos de regulación (Amaya *et al.*, 1991; Kimelman *et al.*, 2006).

El otro gen que muestra diferencia en su expresión en los dobles morfantes para la RNA helicasa p54 es *shha*. La expresión no muestra cambios en la parte anterior del embrión, sin embargo se pierde completamente en las partes caudales en todos los casos. Shh es un factor de crecimiento secretado por la notocorda principalmente y la placa del piso mesencefálico, estructuras que al parecer no se ven afectadas en los morfantes para P54. Se reportó un fenotipo en el cual solamente se observa expresión de *shha* en la parte anterior del embrión de pez cebra, debido a una compleja organización de potenciadores intrónicos. Regiones activadoras fueron identificadas en los intrones 1 y 2, los cuales regulan la expresión de la notocorda y en la placa de piso mesencefálico, más no en la parte anterior (Müller *et al.*, 1999; Ertzer *et al.*, 2006).

Los tres genes que mostraron cambios en su expresión (*bmp4*, *fgf8a* y *shha*) únicamente lo hicieron en ciertas partes del embrión. Esto sugiere que la proteína P54 pudiera estar participando en otros procesos asociados a la transcripción. La familia de las proteínas DEAD-box es multifuncional y se ha visto que participan en la regulación de la transcripción, usualmente actuando como co-activadores o co-represores de factores de transcripción en una manera que en muchos casos no requiere de una actividad de helicasa (Fuller-Pace, 2013; Fuller-Pace y Nicol 2012). Por lo que sería necesario conocer si P54 se asocia a factores de transcripción necesarios para la expresión de estos genes.

Se ha reportado la participación de la vía de señalización de Shh en etapas post-gastrulación durante el control de la periodicidad para la formación de somitos y en la adecuada proliferación de las células de los somitos y por lo tanto del tamaño de estos (Resende *et al.*, 2010). En los dobles morfantes al no haber la expresión de *shha*, y por lo tanto disminución de la proliferación de células somíticas podría explicar el que no se

lleguen a formar somitos o pierdan su tamaño y forma original. Marcelle y col. en 1999, reportan que Shh no actúa en todas las células presentes en cada somito, sino únicamente en dos de las tres porciones en las que se ha dividido el somito. La primera porción es el esclerotomo que es la parte más ventral, la parte media conocida como miotomo y la parte dorsal es el dermatomiotomo. Marcelle y col. en 1999, observaron *in vivo* que Shh es necesario para la expresión del marcador Pax-1, localizado en el esclerotomo, porción que dará origen al cartílago y huesos de la columna vertebral. También Shh participa junto con algunos miembros de la familia de Wnt, en el mantenimiento de MyoD, marcador para el miotomo, porción progenitora de los músculos (Münsterberg *et al.*, 1995).

Marcelle y col. en 1999, demuestran en pollo que la pérdida de expresión de Shh, provoca una baja expresión de *fgf8* en el PSM, mostrando que la vía de señalización de Shh es requerida para preservar el gradiente de *fgf8a* fundamental para la formación de somitos. Se han asociado algunas anomalías congénitas vertebrales con la vía de señalización de Shh, incluyendo la diagnosis más frecuente de este tipo, VATER o VACTERL, la cual involucra anomalías esofágicas, duodenas o atresia anal (Kim *et al.*, 2001), así como el síndrome de Feingold, el cual presenta microcefalia y malformaciones en extremidades, pulgares hipoplásicos y braquimesofalangia con clinodactilia de los segundos y quintos dedos, y sindactilia variable, que involucra el cuarto y quinto dedos de los pies (Celli *et al.*, 2003).

El fenotipo obtenido al inhibir la expresión de cada una de los homólogos de la RNA helicasa p54, aún no se puede explicar por la pérdida de expresión de los genes *fgf8a* y de *shha*, ya que los morfantes de un homólogo, aunque presentan el fenotipo, muestran un patrón de expresión génica normal para dichos genes. Sin embargo, en la doble morfante se observa claramente un mayor efecto en la formación de los somitos caudales, y ambos genes tienen participación en el correcto desarrollo y proliferación de los mismos. Sumado a esto, no conocemos si la RNA helicasa está actuando directamente sobre los mRNAs de *shha* y de *fgf8a*. Para esto, debemos ver si existe alguna interacción entre estas moléculas durante el desarrollo de las partes caudales del pez cebra. Esto nos acercará a saber cómo es que RNA helicasas están participando en la regulación de la formación de distintas estructuras durante el desarrollo embrionario.

8 CONCLUSIONES

La RNA helicasa p54 participa en la formación de las partes caudales durante el desarrollo del pez cebra.

La notocorda y estructuras anteriores no muestran alteraciones en los morfantes para la RNA helicasa p54.

La proteína p54b participa en la regulación del gen *bmp4* en la parte dorsal del embrión.

La actividad de las proteínas p54a y p54b es redundante en la regulación de los genes *fgf8a* y *shha* al no observarse alteraciones en el patrón de expresión en los morfantes para un homólogo de p54 sino únicamente en los dobles morfantes.

9 PERSPECTIVAS

En los últimos años, se ha observado que existen profundas diferencias entre los fenotipos causados por mutaciones genéticas y aquellos causados por "knockdown", por lo que sería necesario observar el fenotipo de los morfantes para la RNA helicasa P54a y P54b, con otra técnica como CRISPRs.

Sumado a esto, faltaría conocer si la RNA helicasa p54 está participando en la regulación de las otras vías presentes en el organizador caudal, comenzando por la vía de Wnt, debido a que la vías de señalización FGF y Shh interactúan con la dicha vía en diversos procesos, para la correcta formación de la cola en distintos organismos (Münsterberg *et al.*, 1995; Deschamps 1999; Del Corral *et al.*, 2003; Kimelman *et al.*, 2006; Olivera-Martínez y Storey, 2007; Wilson *et al.*, 2009; Stulberg *et al.*, 2012; Cruciat *et al.*, 2013).

Conocer si existe una interacción directa de la proteína P54 con los genes de *shha* y *fgf8a*, mediante inmunoprecipitación de mRNA (IP).

Analizar con que proteínas forma complejo P54, principalmente identificando proteínas asociadas al emplame alternativo, mediante inmunoprecipitación de complejos de proteínas (Co-IP).

10 LITERATURA CITADA

Abdelhaleem, M., 2005. RNA helicases: Regulators of differentiation. *Clinical Biochemistry*, 38(6), p.499-503.

Agathon A., Thisse C., and Thisse B. 2003. The molecular nature of the zebrafish tail organizer. *Nature* 424, 448-52.

Anantharaman, V., Koonin, E.V. & Aravind, L. 2002. Comparative genomics and evolution of proteins involved in RNA metabolism. *Nucleic acids research* **30**, 1427-1464.

Ayache, J., Bénard, M., Ernoult-Lange, M., Minshall, N., Standart, N., Kress, M., & Weil, D. 2015. P-body assembly requires DDX6 repression complexes rather than decay or Ataxin2/2L complexes. *Molecular biology of the cell*.

Ballut, L., Marchadier, B., Baguet, A., Tomasetto, C., Séraphin, B., and Le Hir, H. 2005. The exon junction core complex is locked onto RNA by inhibition of eIF4AIII ATPase activity. *Nature structural & molecular biology* 12, 861-869.

Bergkessel, M., and Reese, J.C. 2004. An essential role for the *Saccharomyces cerevisiae* DEAD-box helicase DHH1 in G1/S DNA-damage checkpoint recovery. *Genetics* 167, 21–33.

Boag, P. R., Atalay, A., Robida, S., Reinke, V., and Blackwell, T. K. 2008. Protection of specific maternal messenger RNAs by the P body protein CGH-1 (Dhh1/RCK) during *Caenorhabditis elegans* oogenesis. *Journal of Cell Biology* 182, 543-557.

Boulet, A.M. & Capecchi, M.R., 2012. Signaling by FGF4 and FGF8 is required for axial elongation of the mouse embryo. *Developmental Biology*, 371(2), p.235-245.

Caruthers, J.M. & McKay, D.B., 2002. Helicase structure and mechanism. *Current Opinion in Structural Biology*, 12(1), p.123-133.

Celli, J., Bokhoven, H. van & Brunner, H.G., 2003. Feingold syndrome: clinical review and genetic mapping. *American journal of medical genetics. Part A*, 122A(4), p.294-300.

Chu, C. Y., and Rana, T. M. 2006. Translation repression in human cells by MicroRNA-induced gene silencing requires RCK/p54. *PLoS Biology* 4, 1122-1136.

Coller, J. and Parker, R. 2005. General translational repression by activators of mRNA decapping. *Cell* 122, 875–876.

Coller, J. M., Tucker, M., Sheth, U., Valencia-Sanchez, M. A., and Parker, R. 2001. The DEAD box helicase, Dhh1p, functions in mRNA decapping and interacts with both the decapping and deadenylase complexes. *RNA* 7, 1717-1727.

Collins, R., Karlberg, T., Lehtiö, L., Schütz, P., Berg, S. van den, Dahlgren, L. G., Hammarström, M., Weigelt, J., and Schüler, H., 2009. The DEXD/H-box RNA helicase DDX19 is regulated by an α -helical switch. *Journal of Biological Chemistry* 284, 10296-10300.

Cordin, O., Banroques, J., Tanner, N. K., and Linder, P. 2006. The DEAD-box protein family of RNA helicases. *Gene* 367, 17-37.

Curtis H, Barnes S, Schnek A. 2008. *Biología*. Séptima edición. Madrid, España. Ed. Médica Panamericana. 1160p

Dal-Pra, S., Fürthauer, M., Van-Celst, J., Thisse, B., and Thisse, C. 2006. Noggin1 and Follistatin-like2 function redundantly to Chordin to antagonize BMP activity. *Developmental Biology* 298, 514-526.

Davis, R.L. and Kirschner, M.W., 2000. The fate of cells in the tailbud of *Xenopus laevis*. *Development (Cambridge, England)*, 127(2), 255-267.

Del Corral, R. D., Olivera-Martinez, I., Goriely, A., Gale, E., Maden, M., and Storey, K. 2003. Opposing FGF and retinoid pathways control ventral neural pattern, neuronal differentiation, and segmentation during body axis extension. *Neuron* 40, 65-79.

Deschamps, J., Akker, E. van den, Forlani, S., De Graaff, W., Oosterveen, T., Roelen, B., and Roelfsema, J. 1999. Initiation, establishment and maintenance of Hox gene expression patterns in the mouse. *The International journal of developmental biology* 43, 635-650.

Deutscher, M.P., 2006. Degradation of RNA in bacteria: Comparison of mRNA and stable RNA. *Nucleic Acids Research*, 34(2), 659-666.

Dubrulle, J., McGrew, M.J. & Pourquié, O., 2001. FGF signaling controls somite boundary position and regulates segmentation clock control of spatiotemporal Hox gene activation. *Cell*, 106(2), p.219-232.

Esterberg, R., Delalande, J.M. & Fritz, A., 2008. Tailbud-derived Bmp4 drives proliferation and inhibits maturation of zebrafish chordamesoderm. *Development* 135, 3891-3901 (2008).

Ertzer, R., Müller, F., Hadzhiev, Y., Rathnam, S., Fischer, N., Rastegar, S., and Strähle, U. 2007. Cooperation of sonic hedgehog enhancers in midline expression. *Developmental Biology* 301, 578-589.

Fairman, M. E., Maroney, P. A., Wang, W., Bowers, H. A., Gollnick, P., Nilsen, T. W., and Jankowsky, E. 2004. Protein displacement by DExH/D "RNA helicases" without duplex unwinding. *Science* 304, 730-734.

Fairman-Williams, M.E., Guenther, U.P. & Jankowsky, E., 2010. SF1 and SF2 helicases: Family matters. *Current Opinion in Structural Biology*, 20(3), p.313-324.

Fauny, J.-D., Thisse, B. & Thisse, C., 2009. The entire zebrafish blastula-gastrula margin acts as an organizer dependent on the ratio of Nodal to BMP activity. *Development*, 136(22), p.3811-3819.

Fischer, N. & Weis, K., 2002. The DEAD box protein Dhh1 stimulates the decapping enzyme Dcp1. *The EMBO journal*, 21(11), p.2788-2797

Fuller-Pace, F.V. 2013. The DEAD box proteins DDX5 (p68) and DDX17 (p72): Multi-tasking transcriptional regulators. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms* **1829**, 756-763.

Fuller-Pace, F.V. & Nicol, S.M. 2012. DEAD-box RNA helicases as transcription cofactors. *Methods in Enzymology* **511**, 347-367.

Gaj, T., Gersbach, C.A. & Barbas, C.F., 2013. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends in Biotechnology*, 31(7), p.397-405.

Gilbert S., 2010. *Developmental Biology*. Novena edición. Massachusetts EUA. Ed. Sinauer Associates. 711p.

Graff, J.M., 1997. Embryonic patterning: to BMP or not to BMP, that is the question. *Cell*, 89(2), p.171-174.

Griffin, K., Patient, R. & Holder, N., 1995. Analysis of FGF function in normal and no tail zebrafish embryos reveals separate mechanisms for formation of the trunk and the tail. *Development*, 121(9), p.2983-2994.

Grifo, J.A., Abramson R.D., Satler C.A, and Merrick W.C., 1984. RNA-stimulated ATPase activity of eukaryotic initiation factors. *The Journal of biological chemistry*, 259(13), p.8648-8654.

Golling, G., Amsterdam, A., Sun, Z., Antonelli, M., Maldonado, E., Chen, W., Burgess, S., Haldi, M., Artzt, K., Farrington, S., et al. 2002. Insertional mutagenesis in zebrafish rapidly identifies genes essential for early vertebrate development. *Nature genetics* 31, p.135-140.

Groppe, J., Greenwald, J., Wiater, E., Rodriguez-Leon, J., Economides, A. N., Kwiatkowski, W., Baban, K., Affolter, M., Vale, W. W., Izpisua Belmonte, J. C., 2003. Structural basis of BMP signaling inhibition by Noggin, a novel twelve-membered cystine knot protein. *The Journal of bone and joint surgery. American volume* 85-A Suppl 3, p.52-58.

Hardwick, S.W. & Luisi, B.F., 2013. Rarely at rest: RNA helicases and their busy contributions to RNA degradation, regulation and quality control. *RNA biology*, 10(1), p.56-70.

Henn, A., Cao, W., Hackney, D. D., and De La Cruz, E. M. 2008. The ATPase Cycle Mechanism of the DEAD-box rRNA Helicase, DbpA. *Journal of Molecular Biology* 377, p.193-205.

Higashijima, S., Okamoto, H., Ueno, N., Hotta, Y., and Eguchi, G. 1997. High-frequency generation of transgenic zebrafish which reliably express GFP in whole muscles or the whole body by using promoters of zebrafish origin. *Developmental biology* 192, p.289-299.

Jankowsky, E. & Bowers, H., 2006. Remodeling of ribonucleoprotein complexes with DExH/D RNA helicases. *Nucleic Acids Research*, 34(15), p.4181-4188.

Jankowsky, E., 2011. RNA helicases at work: Binding and rearranging. *Trends in Biochemical Sciences*, 36(1), p.19-29.

- Kim, P.C.W., Mo, R. & Hui, C.-chung, 2001. Murine models of VACTERL syndrome: Role of sonic hedgehog signaling pathway. *Journal of Pediatric Surgery*, 36(2), p.381-384.
- Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B., and Schilling, T. F. 1995. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental dynamics* : an official publication of the American Association of Anatomists 203, p.253-310.
- Kimelman, D., 2006. Mesoderm induction: from caps to chips. *Nature reviews. Genetics*, 7(5), p.360-372.
- Kimelman, D. & Kirschner, M., 1987. Synergistic induction of mesoderm by FGF and TGF-beta and the identification of an mRNA coding for FGF in the early *Xenopus* embryo. *Cell*, 51(5), p.869-877.
- Kondo, M., 2007. Bone morphogenetic proteins in the early development of zebrafish. *FEBS Journal*, 274(12), p.2960-2967.
- Ladomery, M., Wade, E. and Sommerville, J., 1997. Xp54, the *Xenopus* homologue of human RNA helicase p54, is an integral component of stored mRNP particles in oocytes. *Nucleic Acids Research*, 25(5), p.965-973.
- Lebreton, S. and Jones, C.M., 2006. Emergence of Organizer function: A lot of “stuff” involved. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 17(1), p.110-116.
- Lekven, A. C., Thorpe, C. J., Waxman, J. S., and Moon, R. T. 2001. Zebrafish wnt8 Encodes Two Wnt8 Proteins on a Bicistronic Transcript and Is Required for Mesoderm and Neurectoderm Patterning. *Developmental Cell* 1, 103-114.
- Leyns, L., Bouwmeester, T., Kim, S. H., Piccolo, S., and De Robertis, E. M. 1997. Frzb-1 is a secreted antagonist of Wnt signaling expressed in the Spemann organizer. *Cell* 88, p.747-756.
- Li, P., White, R.M. and Zon, L.I., 2011. Transplantation in Zebrafish. *Methods in Cell Biology*, 105, 403-417.
- Lin, F., Wang, R., Shen, J.-J., Wang, X., Gao, P., Dong, K., and Zhang, H.-Z. 2008. Knockdown of RCK/p54 expression by RNAi inhibits proliferation of human colorectal cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer biology & therapy* 7, 1669-1676.
- Linder, P., Lasko, P.F., Ashburner, M., Leroy, P., Nielsen, P.J., Nishi. 1989. Birth of the D-E-A-D box. *Nature* 337, 121–122.
- Linder, P., 2006. Dead-box proteins: A family affair - Active and passive players in RNP-remodeling. *Nucleic Acids Research*, 34(15), p.4168-4180.
- Linder, P. & Jankowsky, E., 2011. From unwinding to clamping - the DEAD box RNA helicase family. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 12(8), p.505-516.

- Luo, X., Talarek, N. & De Virgilio, C.. 2011 Initiation of the yeast G0 program requires Igo1 and Igo2, which antagonize activation of decapping of specific nutrient-regulated mRNAs. *RNA biology*, 8(1), 14-17.
- Marcelle, C., Ahlgren, S., and Bronner-Fraser, M. 1999. In vivo regulation of somite differentiation and proliferation by Sonic Hedgehog. *Developmental biology* 214, 277-287.
- Martin, B.L. & Kimelman, D., 2008. Regulation of canonical Wnt signaling by Brachury is essential for posterior mesoderm formation. *Dev Cell*. 15(1), p.121-133.
- Martin, B.L. & Kimelman, D., 2012. Canonical Wnt Signaling Dynamically Controls Multiple Stem Cell Fate Decisions during Vertebrate Body Formation. *Developmental Cell*, 22(1), p.223-232.
- Matsumoto, K., Kwon, O. Y., Kim, H., and Akao, Y. 2005. Expression of rck/p54, a DEAD-box RNA helicase, in gametogenesis and early embryogenesis of mice. *Developmental Dynamics* 233, 1149-1156.
- Melby, A.E., Kimelman, D. and Kimmel, C.B., 1997. Spatial regulation of floating head expression in the developing notochord. *Developmental Dynamics*, 209(2), p.156-165.
- Minshall, N. & Standart, N., 2001. A conserved role of a DEAD box helicase in mRNA masking. *RNA* 7(12) 1728–1742.
- Minshall, N. & Standart, N., 2004. The active form of Xp54 RNA helicase in translational repression is an RNA-mediated oligomer. *Nucleic Acids Research*, 32(4), 1325-1334.
- Moens, C. B., Donn, T. M., Wolf-Saxon, E. R., and Ma, T. P. 2008. Reverse genetics in zebrafish by TILLING. *Briefings in Functional Genomics and Proteomics* 7, 454-459.
- Müller, F., Chang, B., Albert, S., Fischer, N., Tora, L., and Strähle, U. 1999. Intronic enhancers control expression of zebrafish sonic hedgehog in floor plate and notochord. *Development* 126, 10: 2103-16.
- Mushtaq, M. Y., Verpoorte, R., and Kim, H. K. 2013. Zebrafish as a model for systems biology. *Biotechnology & genetic engineering reviews* 29, 187-205.
- Münsterberg, A. E., Kitajewski, J., Bumcrot, D. A., McMahon, A. P., and Lassar, A. B. 1995. Combinatorial signaling by Sonic hedgehog and Wnt family members induces myogenic bHLH gene expression in the somite. *Genes and Development* 9, 2911-2922.
- Myong, S., Cui, S., Cornish, P.V., Kirchhofer, A., Gack, M.U., Jung J.U., Hopfner, K.P., Ha, T., 2009. Cytosolic viral sensor RIG-I is a 5' triphosphate-dependent translocase on double-stranded RNA. *Science* 323, 1070–1074.
- Naarmann, I. S., Harnisch, C., Müller-Newen, G., Urlaub, H., Ostareck-Lederer, A., and Ostareck, D. H. 2010. DDX6 recruits translationally silenced human reticulocyte 15-lipoxygenase mRNA to RNP granules. *RNA* 16, 2189-2204.
- Nasevicius, A. & Ekker, S.C., 2000. Effective targeted gene “knockdown” in zebrafish. *Nature genetics*, 26(2), p.216-220.

- Nakamura, A., Amikura, R., Hanyu, K., and Kobayashi, S. 2001. Me31B silences translation of oocyte-localizing RNAs through the formation of cytoplasmic RNP complex during *Drosophila* oogenesis. *Development* 128, 3233-3242.
- Navarro, R. E., Shim, E. Y., Kohara, Y., Singson, A., and Blackwell, T. K. 2001. cgh-1, a conserved predicted RNA helicase required for gametogenesis and protection from physiological germline apoptosis in *C. elegans*. *Development* 128, 3221-3232.
- Niehrs, C., 2003. A tale of tails. *Nature* 424, 375-376.
- Packard, S., 1976. The influence of axial structures on chick somite formation. *Dev Biol* 53:36-48.
- Parvatiyar, K., Zhang, Z., Teles, R. M., Ouyang, S., Jiang, Y., Iyer, S. S., Zaver, S. a, Schenk, M., Zeng, S., Zhong, W., *et al.* 2012. The helicase DDX41 recognizes the bacterial secondary messengers cyclic di-GMP and cyclic di-AMP to activate a type I interferon immune response. *Nature immunology* 13, 1155-61.
- Perantoni, A. O., Timofeeva, O., Naillat, F., Richman, C., Pajni-Underwood, S., Wilson, C., Vainio, S., Dove, L. F., and Lewandoski, M. 2005. Inactivation of FGF8 in early mesoderm reveals an essential role in kidney development. *Development* 132, 3859-3871.
- Presnyak, V. & Coller, J., 2013. The DHH1/RCKp54 family of helicases: An ancient family of proteins that promote translational silencing. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1829(8), p.817-823.
- Putnam, A.A. & Jankowsky, E., 2013. DEAD-box helicases as integrators of RNA, nucleotide and protein binding. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1829(8), p.884-893.
- Rajyaguru, P. & Parker, R. 2009. CGH-1 and the control of maternal mRNAs. *Trends in Cell Biology* 19, 24-28.
- Resende, T. P., Ferreira, M., Teillet, M.-A., Tavares, A. T., Andrade, R. P., and Palmeirim, I. 2010. Sonic hedgehog in temporal control of somite formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 12907-12912.
- Rössler, O.G., Straka, A. & Stahl, H., 2001. Rearrangement of structured RNA via branch migration structures catalysed by the highly related DEAD-box proteins p68 and p72. *Nucleic acids research*, 29(10), p.2088-2096.
- Row, R., Kimelman, D., 2009. Bmp inhibition is necessary for post-gastrulation patterning and morphogenesis of the zebrafish tailbud. *Dev Bio* 329, 55-63.
- Sengoku, T., Nureki, O., Nakamura, A., Kobayashi, S., and Yokoyama, S. 2006. Structural Basis for RNA Unwinding by the DEAD-Box Protein *Drosophila* Vasa. *Cell*, 125(2), p.287-300.

Schulte-Merker, S., Eeden, F. J. van, Halpern, M. E., Kimmel, C. B., and Nüsslein-Volhard, C. (1994). no tail (ntl) is the zebrafish homologue of the mouse T (Brachyury) gene. *Development* 120, 1009-1015.

Schier, A.F. & Talbot, W.S., 2005. Molecular genetics of axis formation in zebrafish. *Annual review of genetics*, 39, p.561-613.

Singleton, Martin R, Mark S Dillingham, and Dale B Wigley. 2007. Structure and mechanism of helicases and nucleic acid translocases. *Annual review of biochemistry* 76: 23-50.

Smith, W.C. & Harland, R.M., 1992. Expression cloning of noggin, a new dorsalizing factor localized to the Spemann organizer in *Xenopus* embryos. *Cell*, 70(5), p.829-840.

Streisinger, Walker, Dower, Knauber & Singer., 1981. Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*). *Nature*, 291, p. 293-296.

Strohmeier, J., Hertel, I., Diederichsen, U., Rudolph, M.G. & Klostermeier, D., 2011. Changing nucleotide specificity of the DEAD-box helicase Hera abrogates communication between the Q-motif and the P-loop. *Biological chemistry* **392**, 357-369.

Story, R.M., and Steitz, T.A., 1992. Structure of the RecA protein-ADP complex. *Nature* 413, 648-652.

Sullivan, C. & Kim, C.H., 2008. Zebrafish as a model for infectious disease and immune function. *Fish & shellfish immunology*, 25(4), p.341-350.

Sweet, T., Kovalak, C. & Collier, J., 2012. The dead-box protein dhh1 promotes decapping by slowing ribosome movement. *PLoS Biology*, 10(6).

Szeto, D.P. & Kimelman, D., 2006. The regulation of mesodermal progenitor cell commitment to somitogenesis subdivides the zebrafish body musculature into distinct domains. *Genes and Development*, 20(14), p.1923-1932.

Talbot, W., Trevarrow, W., Halpern, M.E., Melby, A.E., Farr, H., Postlethwaite, J.H., Jowett, T., Kimmel, C.B., and Kimelman, D. 1995. Requirement for the homeobox gene floating head in zebrafish notochord development. *Nature* 378:150–157.

Tanner, N.K. & Linder, P., 2001. DExD/H box RNA helicases: From generic motors to specific dissociation functions. *Molecular Cell*, 8(2), p.251-262.

Thisse, B. & Thisse, C., 2015. Formation of the vertebrate embryo: Moving beyond the Spemann organizer. *Seminars in Cell & Developmental Biology*.

Tsu, C.A., Kossen, K. & Uhlenbeck, O.C., 2001. The Escherichia coli DEAD protein DbpA recognizes a small RNA hairpin in 23S rRNA. *RNA (New York, N.Y.)*, 7(5), 702-709.

Tuteja, N. & Tuteja, R., 2004. Prokaryotic and eukaryotic DNA helicases: Essential molecular motor proteins for cellular machinery. *European Journal of Biochemistry*, 271(10), p.1835-1848.

Tzouanacou, E., Wegener, A., Wymeersch, F. J., Wilson, V., and Nicolas, J. F. 2009. Redefining the Progression of Lineage Segregations during Mammalian Embryogenesis by Clonal Analysis. *Developmental Cell* 17, 365-376.

Urist, M.R., 1965. Bone: formation by autoinduction. *Science (New York, N.Y.)*, 150(698), p.893-899.

Valoir, T. de 1991. A second maternally expressed *Drosophila* gene encodes a putative RNA helicase of the "DEAD box" family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(6), 2113-2117.

Rooijen, C. van, Simmini, S., Bialecka, M., Neijts, R., Ven, C. van de, Beck, F., and Deschamps, J. 2012. Evolutionarily conserved requirement of Cdx for post-occipital tissue emergence. *Development* 139, 2576-2583.

Tzouanacou, E., Wegener, A., Wymeersch, F.J., Wilson, V. & Nicolas, J.F. 2009 Redefining the Progression of Lineage Segregations during Mammalian Embryogenesis by Clonal Analysis. *Developmental Cell* 17, 365-376.

Westmoreland, T. J., Olson, J. A., Saito, W. Y., Huper, G., Marks, J. R., and Bennett, C. B. 2003. DHH1 regulates the G1/S-checkpoint following DNA damage or BRCA1 expression in yeast. *Journal of Surgical Research*, 62-73.

Weston, A. & Sommerville, J., 2006. Xp54 and related (DDX6-like) RNA helicases: Roles in messenger RNP assembly, translation regulation and RNA degradation. *Nucleic Acids Research*, 34(10), 3082-3094.

Wilson, V., Olivera-Martinez, I. & Storey, K.G., 2009. Stem cells, signals and vertebrate body axis extension. *Development*, 136(10), p.1591-1604.

Yang, Y. & Thorpe, C., 2011. BMP and non-canonical Wnt signaling are required for inhibition of secondary tail formation in zebrafish. *Development (Cambridge, England)*, 138(12), p.2601-2611.

Yu, S. F., Lujan, P., Jackson, D. L., Emerman, M., and Linial, M. L. 2011. The DEAD-box RNA helicase DDX6 is required for efficient encapsidation of a retroviral genome. *PLoS Pathogens* 7(10) .

Zabolotskaya, M. V., Grima, D. P., Lin, M.-D., Chou, T.-B., and Newbury, S. F. 2008. The 5'-3' exoribonuclease Pacman is required for normal male fertility and is dynamically localized in cytoplasmic particles in *Drosophila* testis cells. *The Biochemical journal* 416, 327-335.

11 ANEXO 1

Soluciones utilizadas en la técnica de hibridación *in situ*.

PBS (10X) Phosphate Buffer Saline (EN AGUA-DEPC)

1.37M de NaCl

27mM de KCl

100mM de Na₂HPO₄

20mM de KH₂PO₄

PBST

PBS con Tween 20 al 0.1%.

SSC (20X) Saline Sodium Citrate

3.0M NaCl

0.3M Citrato de sodio, pH 7.0

HYB-

Formamida 50%

SSC5X

Tween-20 0.1%

HYB+

HYB- con 500µg/ml torula RNA (yeast) (ROCHE 10 109 223 001)

50µg/ml Heparina (SIGMA H-3393)

Buffer de Maleico

100mM ácido maleico

150mM NaCl

0.1% Tween 20

Llevar a pH 7.5 con NaOH

Solución bloqueadora 5X

Blocking Reagent (Roche 11 096 176 001), disueltos en el buffer de maleico al 10%.

12 ANEXO2

Alineamiento de las secuencia del gen *floating head* (*flh*) con el fragmento clonado (*flh_c*), mostrando una identidad del 514/514 (100%).

```

flh      53      GATGCAGTACTGGCGAAAGCAGCAGTTCATTCTCATTATAAACACAAATCTGGGAAATCA 112
flh_c    1       GATGCAGTACTGGCGAAAGCAGCAGTTCATTCTCATTATAAACACAAATCTGGGAAATCA 60
flh     113      AAGCGAATGCGTACAAGTTTTACCAACGATCAGCTGTCCAGACTGGAGAAAGAGTTTCGGG 172
flh_c   61       AAGCGAATGCGTACAAGTTTTACCAACGATCAGCTGTCCAGACTGGAGAAAGAGTTTCGGG 120
flh     173      CGGCAGCAATACATGGTGGGATCTGAACGCTTTCGTGTGGCATCTGCTCTCCAACACTACT 232
flh_c  121       CGGCAGCAATACATGGTGGGATCTGAACGCTTTCGTGTGGCATCTGCTCTCCAACACTACT 180
flh     233      GAAGCTCAGGTTAAAGTCTGGTTCAGAACAGGGCCATCAAATGGAGAAAGCAGAGTCTT 292
flh_c  181       GAAGCTCAGGTTAAAGTCTGGTTCAGAACAGGGCCATCAAATGGAGAAAGCAGAGTCTT 240
flh     293      GAGCAACAACAAGCCAAACTTGCCAAACTGGGACTGACCGTTCACCAAAAAGCCCTGGA 352
flh_c  241       GAGCAACAACAAGCCAAACTTGCCAAACTGGGACTGACCGTTCACCAAAAAGCCCTGGA 300
flh     353      TCCCAGGGCAGAGAGGATGAGGAGAGGGATTCACAGAAGAGTCTGATGTAGACATTGAC 412
flh_c  301       TCCCAGGGCAGAGAGGATGAGGAGAGGGATTCACAGAAGAGTCTGATGTAGACATTGAC 360
flh     413      ATTGACGATTCACTGCAAGACTGAGACTTCTCACAATGTGTTTTGTACATACTTTTCC 472
flh_c  361       ATTGACGATTCACTGCAAGACTGAGACTTCTCACAATGTGTTTTGTACATACTTTTCC 420
flh     473      ATGATTTCCCCAGATTGTTACTCCTCTCTATTTGTACAAATATTTAATTAATAGAAATA 532
flh_c  421       ATGATTTCCCCAGATTGTTACTCCTCTCTATTTGTACAAATATTTAATTAATAGAAATA 480
flh     533      TATTTAAGGCGTCACTTACACACGCCATTGCTCT 566
flh_c  481       TATTTAAGGCGTCACTTACACACGCCATTGCTCT 514

```

Alineamiento de la secuencia del gen *nogina5* (*nog5*) con el fragmento clonado (*nog5_cl*), mostrando una identidad del 417/420 (99%).

```

nog5      1      CGACCACCTCCCGGTACCGGACCTGCACGAGGACCCGGACCCCTGCGCTGCAACCGGGAGA      60
          |||
nog5_cl   52      CGACCACCTCCCGGTACCGGACCTGCACGAGGACCCGGACCCCTGCGCTGCAACCGGGAGA      111
          |||
nog5      61      GCGGGATTATCCCGCCCGGCTGCTGCGGCGGAAACTCGGCAGCAGTTTTGACCCCGTTTT      120
          |||
nog5_cl   112     GCGGGATTATCCCGCCCGGCTGCTGCGGCGGAAACTCGGCAGCAGTTTTGACCCCGTTTT      171
          |||
nog5      121     CTCGCTATATCGGTCCACCGACTCGAGGAAACGGCTCCGAAATCCCCCGTGAGGATGACCC      180
          |||
nog5_cl   172     CTCGCTATATCGGTCCACCGACTCGAGGAAACGGCTCCGAAATCCCCCGTGAGGATGACCC      231
          |||
nog5      181     TGGTGCACCCGGAGCGATTCCCCGTGAGTTCCAGCAGCTGAATTTCACTGCTCTCAAAGT      240
          |||
nog5_cl   232     TGGTGCACCCGGAGCGATTCCACGTGAGTTCCAGCAGCTGAATTTCACTGCTCTCAAAGT      291
          |||
nog5      241     GGCAGCAAGACAGAGCGCAGGATCCGCCGGTGGATGTGGTCCGTACACCCGGTGCCAGT      300
          |||
nog5_cl   292     GGCAGCAAGACAGAGCGCAGGATCCGCCGGTGGATGTGGTCCGTACACCCGGTGCCAGT      351
          |||
nog5      301     GCTGTCCATGTGGAAAGACCTGGGCGTGCGTTTCTGGCCGCGATACGTCAAAGAGGGACA      360
          |||
nog5_cl   352     GCTGTCCATGTGGAAAGACCTGGGCGTGCGTTTCTGGCCGCGATACGTCAAAGAGGGACA      411
          |||
nog5      361     ATGCTCGACCGAACGCTCGTGCTCTTTACCGGAGGGGATGTTCTGTAAACCGGTGCAGTC      420
          |||
nog5_cl   412     ATGCTCGACCGAACGCTCGTGCTCTTTACCGGAGGGGATGTTCTGTAAACCGGTGCAGTC      471
          |||

```