



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

INSTITUTO DE FISIOLÓGIA CELULAR/INSTITUTO DE

CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA

**“Scarb2a una glicoproteína de membrana involucrada
en la formación de la notocorda durante el desarrollo
embrionario del pez cebra”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

ABIGAIL DÍAZ TÉLLEZ

DIRECTOR DE TESIS

DR. ERNESTO MALDONADO OLVERA

INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., Junio 2019



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.

RECONOCIMIENTOS

El presente trabajo se realizó en el laboratorio 125 Norte del departamento de Biología Celular y del Desarrollo del Instituto de Fisiología Celular, y en el laboratorio de EvoDevo del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), bajo la dirección del Dr. Ernesto Maldonado Olvera.

El comité tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dr. Fernando López Casillas	Instituto de Fisiología Celular
Dr. Víctor Julián Valdés Rodríguez	Instituto de Fisiología Celular
Dra. Mariana Benítez Keinrad	Instituto de Ecología
Dra. Norma Angélica Moreno Mendoza	Instituto de Ciencias Biomédicas
Dr. Ernesto Maldonado Olvera	Instituto de Ciencias del Mar

Se reconoce el gran apoyo y la invaluable asesoría académica y técnica del Dr. Fernando García Hernández en la Unidad de Imagenología.

Se reconoce la invaluable asistencia técnica constante del Biol. José Luis Ramos Balderas, en el Instituto de Fisiología Celular.

Se reconoce la evaluación, seguimiento y retroalimentación académica del Comité Tutor por parte del: Dr. Juan Riesgo y el Dr. León Islas.

Se reconoce la colaboración y asesoría de: la Dra. Samantha Carrillo Rosas y de la Dra. Cecilia Zampedri.

Se reconoce el apoyo con el mantenimiento y la alimentación de los peces por parte de la laboratorista María del Rocío Camarillo Villegas y la Dra. Rebeca López.

Se reconoce el servicio de las distintas unidades del Instituto de Fisiología Celular: Unidad de Biología Molecular, Unidad de Videoconferencia, Unidad de Cómputo, Biblioteca y Taller de Mantenimiento.

Se agradece al personal de la unidad de biología molecular, en especial a la Dra. Laura Ongay-Larios.

Se agradece al personal de la Biblioteca "Armando Gómez-Puyou, en especial a su coordinadora la M. en B. Sandra Moncada Hernández.

Se agradece al personal de la unidad de cómputo Gerardo Coello Coutiño, Ana María Escalante Gonzalbo, Ivette Rosas Arciniega, Juan Manuel Barbosa Castillo y Francisco Pérez Eugenio.

Se agradece la atención y el seguimiento de mi situación académica de parte de la Dra. Soledad Funes y Sara Méndez en la Coordinación de Enseñanza del Instituto de Fisiología Celular.

Abigail Díaz Téllez agradece al "Programa de doctorado en Ciencias Biomédicas", así como al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, México) por la beca de posgrado otorgada (número de becario 104429). Este trabajo fue posible gracias al financiamiento otorgado al grupo del Dr. Ernesto Maldonado (CONACYT Ciencia Básica 166046).

A α y Ω

A mis padres, Lety y Roger,
¡Gracias por enseñarme a volar y nadar!

A mis hermanas Arely y Asarel,
Mis compañeras de ADN~ADT, aprendizajes y juegos.

Al Dr. Ernesto Maldonado Olvera

Por darme la oportunidad de hacer ciencia a su lado, por hacerme descubrir nuevas perspectivas, por generar en mis nuevas interrogantes, por enseñarme a evolucionar y adaptarme ante los cambios del medio ambiente.

Al Dr. Oscar Solís Salgado

Por enseñarme la complejidad del cerebro humano

A la Mtra. Sintia Ceballos Vermont

Por enseñarme que la cocina también es un laboratorio muy interesante, donde la psicología juega un papel importante

A la Dra. Cecilia Zampedri

Por tu amistad y compañía a lo largo del Doctorado

A mis compañeras de aventuras en Puerto Morelos

Gaby, Mariana, Ana, gracias por todos nuestros días en el labo y por esas historias inolvidables y únicas

INDICE

1. ABREVIATURAS.....	11
2. RESUMEN.....	14
3. ABSTRACT.....	16
4. INTRODUCCIÓN.....	19
4.1 El pez cebra como organismo modelo.....	19
4.2 Mutagénesis por retrovirus en el pez cebra.....	21
4.3 La mutante del pez cebra en el gen <i>scarb2a</i>	22
4.4 La expresión y función de Scarb2.....	22
4.5 Enfermedades asociadas a la deficiencia de Scarb2.....	25
4.6 La formación de la notocorda durante el desarrollo embrionario...	27
4.7 La membrana basal de la Notocorda.....	29
4.8 Mutante de pez cebra que afectan la formación de la notocorda...	32
5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	34
6. HIPOTESIS.....	34
7. OBJETIVOS.....	35
7.1 Objetivo general.....	35
7.2 Objetivos particulares.....	35

8. MATERIAL Y METODOS	35
8.1 Mantenimiento de la colonia de peces, obtención de embriones, cepas utilizadas.....	35
8.2 Genotipificaciones.....	36
8.3 Hibridación <i>in situ</i> (ISH) de embriones completos.....	38
8.4 Microscopía Electrónica.....	40
8.5 Inmunofluorescencia.....	40
9. RESULTADOS y DISCUSION	41
9.1 CAPITULO 1.....	41
9.1.1 Una inserción retroviral interrumpe la expresión del gen <i>scarb2a</i>	41
9.1.2 El transcrito de <i>scarb2a</i> se expresa en la notocorda.....	45
9.1.3 La pérdida de expresión de <i>scarb2a</i> previene la correcta formación de la notocorda.....	48
9.1.4 <i>Scarb2a</i> se requiere para el correcto ensamblaje de la membrana basal de la notocorda.....	51
9.1.5 Discusión del Capítulo 1	59
9.2 CAPITULO 2.....	63

9.2.1 Análisis de la expresión del mRNA de <i>no tail</i> por Hibridación in situ en embriones de la crucea <i>scarb2a/ scarb2a^{hi1463}</i> x <i>scarb2a/ scarb2a^{hi1463}</i>	63
9.2.2 Análisis de la expresión del mRNA de <i>myoD</i> por Hibridación in situ en embriones de la crucea <i>scarb2a/ scarb2a^{hi1463}</i> x <i>scarb2a/ scarb2a^{hi1463}</i>	65
9.2.3 Análisis de la expresión del mRNA de <i>krox20</i> por Hibridación in situ en embriones de la crucea <i>scarb2a/ scarb2a^{hi1463}</i> x <i>scarb2a/ scarb2a^{hi1463}</i>	67
9.2.4 Inmunofluorescencias de laminina en embriones WT y MUT de 1 dpf..	68
9.2.5 Discusión del Capítulo 2.....	69
9.3 CAPITULO 3.....	70
9.3.1 Discusión adicional.....	70
10. CONCLUSIONES.....	71
11. LITERATURA CITADA.....	72

ARTICULO

“Zebrafish *scarb2a* insertional mutant reveals a novel function for the Scarb2/Limp2 receptor in notochord development”.

Diaz-Tellez, A., Zampedri, C., Ramos-Balderas, J.L. Garcia-Hernandez, F and Maldonado, E.

Developmental Dynamics 245, 508-519. (2016)

DOI: 10.1002/dvdy.24383

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Figura 1. Estadios de desarrollo del pez cebra.....	20
Figura 2. Notocorda del pez cebra y sus capas celulares.....	29
Figura 3. Genes que participan en la formación de la notocorda.....	33
Tabla 1	37
Tabla 2	38
Figura 4. La inserción retroviral del gen <i>scarb2a</i>	44
Figura 5. Expresión del mRNA de <i>scarb2a</i> de pez cebra.....	47
Figura 6. Defectos en la notocorda en la mutante <i>scarb2a</i>	50
Figura 7. Análisis de microscopía electrónica de la membrana basal de la notocorda de mutantes para <i>scarb2a</i> de 1 día desarrollo.....	53
Figura 8. Membrana basal de la notocorda en embriones mutantes y silvestres de 3 dpf analizados por microscopía electrónica.....	56
Figura 9. Comparación del grueso de la membrana basal ventral y dorsal en pez cebra silvestre y mutantes.....	58
Figura 10. Análisis de la expresión de <i>no tail</i> en embriones de la crucea <i>Scarb2a</i> heteróciga X <i>Scarb2a</i> heteróciga en estadio de 10 somitos y 24 hpf.....	64
Figura 11. Detección de la expresión de <i>myoD</i> en embriones de la crucea <i>Scarb2a</i> heteróciga X <i>Scarb2a</i> heteróciga en estadio de 10 somitos y 1 dpf...	66

Figura 12. Análisis de la expresión de *krox20* en embriones de la cruce Scarb2a heteróciga X Scarb2a heteróciga en estadio 1 dpf.....67

Figura 13. Expresión de la proteína laminina de la cruce Scarb2a heteróciga X Scarb2a heteróciga en estadio 1 dpf.....68

1. ABREVIATURAS

AP:	Fosfatasa alcalina
AMRF:	Action myoclonus-renal failure syndrome
Boz:	Mutante de pez cebra bozozok
BM-purple:	Substrato cromogénico para fosfatasa alcalina para precipitar enzimas en inmuno-ensayos
BSA:	Suero de Albumina Bovina
CD36:	Cluster of differentiation 36 receptor
CRISPR:	Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente inter-espaciadas
Col15a1:	Gen que codifica para la cadena alfa de la colágena XV
Dpf:	Días Post fertilización
DIC:	Microscopía de Contraste Diferencial interferencial
EDTA:	Ácido etilendiaminotetraacético
EPM4:	Progressive myoclonic epilepsy -4
Flh:	Mutante <i>Floating head</i>
Hpf:	Horas post fertilización
ISH:	Hibridización in situ

LAMP-1	Proteína de membrana asociada a lisosomas-1
LAMP-2	Proteína de membrana asociada a lisosomas-2
LRO:	Organelos Relacionados a Lisosomas
mm:	milímetros
NID1:	Proteína Nidogenina 1
NID2:	Proteína Nidogenina 2
nm:	Nanómetros
<i>ntl:</i>	<i>Gen no tail</i>
O/N:	Toda la noche (over/night)
OSO₄:	Tetraóxido de osmio
PBS:	Amortiguador fosfato salino
PBST:	Amortiguador fosfato salino + Tween
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
PFA:	Paraformaldehido
PK:	Proteinasa K
RT-PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa reversa
Scarb2:	<i>Scavenger Receptor Class B Member 2</i>

Scarb2^{hi1463}:	<i>Scavenger Receptor Class B Member 2</i> mutante
Shh:	Gen <i>sonic hedgehog</i>
TBE:	Disolución tampón formada por Tris, borato y EDTA
TX:	Tritón-X
μm:	Micrómetros
WT:	Silvestre
wt1b:	<i>wound-specific sheat cells</i> positivas para gen <i>Wilms Tumor 1b</i>

2. RESUMEN

La notocorda es una estructura embrionaria mesodérmica de la línea media característica de los cordados. Este órgano se localiza en la parte central del embrión con respecto a los ejes dorsal-ventral y el eje derecho-izquierdo y tiene dos funciones importantes. 1) La notocorda secreta factores de señalización generando un gradiente para el posicionamiento y destino de las células que formarán diferentes órganos; especificando el destino dorsal del sistema nervioso central y controlando la simetría del embrión. 2) Otra importante función de la notocorda es su papel estructural ya que es el elemento esquelético del embrión representando una forma primitiva de cartilago.

En el pez cebra la formación de la notocorda comienza alrededor de la 7 hpf (horas post-fertilización) durante la gastrulación, este proceso se caracteriza por movimientos celulares de convergencia y de extensión en el mesodermo dorsal. La notocorda se origina a partir de una región de la gástrula conocida como el organizador dorsal. Durante el desarrollo el organizador dorsal se convierte en el cordamesodermo que a su vez es el antecedente directo de la notocorda. Por la intercalación medio-lateral y la convergencia de las células en la línea media dorsal, el corda-mesodermo se observa como un pilar de células elongadas. Conforme avanza el desarrollo, las células del corda-mesodermo comienzan a diferenciarse y por lo tanto a especificarse, estas adquieren una matriz extracelular gruesa y en su interior se caracterizan por formar una vacuola.

Scarb2 es una glicoproteína de membrana tipo III presente en endosomas tardíos, lisosomas y en la membrana celular. Forma parte de la familia CD36/Scarb2. Scarb2 tiene dos cruces trans-membranales uno en el extremo amino-terminal y otro en el extremo carboxilo-terminal, además de tener 10 sitios de N-glicosilación en humano y en su región C-terminal hay un dominio Di-Leucina que determina su localización en lisosomas. La familia a la que pertenecen Scarb2/Cd36 recibe el nombre de “*scavenger*” (carroñero) por la habilidad de unirse a diferentes ligandos. Para entender la función de Scarb2 se ha modificado su expresión en modelos *in-vitro*, así como en modelos *in-*

vivo. Por ejemplo, la sobre-expresión de Scarb2 en cultivo de células causó un aumento considerable en el tamaño de los endosomas y al mismo tiempo se encontró una disminución de la cantidad de vesículas intracelulares, lo que sugiere que Scarb2 participa en la biogénesis o formación de estos organelos y en regular el balance entre invaginaciones y evaginaciones de la membrana de los endosomas y lisosomas.

Los ratones nulos para Scarb2, son viables y fértiles, aunque muestran severos problemas siendo los principales, una obstrucción de las vías urinarias, sordera y desmielinización de las células de Schwann lo que provoca una Neuropatía periférica. En Humanos, el síndrome de insuficiencia renal con acción mioclonar (*AMRF* por *Action myoclonus renal failure*) es ocasionado por mutaciones que afectan al gen *scarb2*. *AMRF* es una enfermedad hereditaria en humanos en la que se presenta epilepsia progresiva asociada con falla renal por glomerulo-esclerosis.

El pez cebra (*Danio Rerio*) es un organismo modelo para el estudio del desarrollo de vertebrados e investigación en genética. Entre sus ventajas encontramos un desarrollo externo y los embriones son transparentes, lo anterior permite analizar las diferentes divisiones celulares a lo largo del desarrollo. A las 24 hpf (horas post-fertilización) ya se ha segmentado el cerebro y se han formado el tubo neural (SNC) y los somitos que junto con la notocorda darán origen a los músculos y huesos. A los 5 dpf (días post-fertilización) ya se cuenta con una larva formada y con sus órganos funcionales. Debido a estas ventajas es un buen organismo modelo para el estudio de la formación de la notocorda.

Mediante una mutagénesis a gran escala se obtuvo la mutante de pez cebra para el gen Scarb2a (*Scarb2a^{hi1463}*) en la cual se observó letalidad ya que los organismos homocigotos mueren en etapas de desarrollo avanzado, 6 a 8 dpf (días post-fertilización), estos peces presentan 3 características destacables: i) El cerebro no se forma adecuadamente durante el primer día de desarrollo, ii) En el segundo día de desarrollo (2 dpf) hay una disminución en la pigmentación, iii) En varias regiones de la notocorda se observan vacuolas

atípicas, pequeñas e irregulares y conforme avanza el desarrollo los peces adquieren curvaturas anormales en el tronco. De los tres fenotipos reportados en la mutante de pez cebra para el gen *Scarb2a* (*Scarb2a^{hi1463}*) el que concierne principalmente a este trabajo es el de la notocorda.

Por lo que el objetivo del presente trabajo fue analizar cuál es el papel de *scarb2a* en la formación de la notocorda del pez cebra.

3. ABSTRACT

The notochord is a mesodermal embryonic structure of the midline characteristic of chordates. This organ is in the central part of the embryo with respect to the dorsal-ventral axes and the right-left axis and has two important functions. 1) The notochord secretes signaling factors generating a gradient for the positioning and destiny of the cells that will form different organs; specifying the dorsal destination of the central nervous system and controlling the symmetry of the embryo. 2) Another important function of the notochord is its structural role since it is the skeletal element of the embryo representing a primitive form of cartilage.

In the zebrafish the formation of the notochord begins around 7 hpf (hours post-fertilization) during gastrulation, this process is characterized by cellular movements of convergence and extension in the dorsal mesoderm. The notochord originates from a region of the gastrula known as the dorsal organizer. During development, the dorsal organizer becomes the cordamesoderm, which in turn is the direct antecedent of the notochord. For the medial-lateral intercalation and the convergence of the cells in the dorsal midline, the corda-mesoderm is observed as a pillar of elongated cells. As the development progresses, the cells of the corda-mesoderm begin to differentiate and therefore to be specified, they acquire a thick extracellular matrix and inside they are characterized by forming a vacuole.

Scarb2 is a type III membrane glycoprotein present in late endosomes, lysosomes and in the cell membrane. It is part of the CD36 / *Scarb2* family. *Scarb2* has two trans-membranelles sites, one at the amino-terminal end and

another at the carboxyl-terminal end, in addition to having 10 N-glycosylation sites in humans and in its C-terminal region there is a Di-Leucine domain that determines its Location in lysosomes. The family to which Scarb2 / Cd36 belongs is called "scavenger" (scavenger) for the ability to join different ligands. To understand the function of Scarb2, its expression has been modified in in-vitro models, as well as in-vivo models. For example, the over-expression of Scarb2 in cell culture caused a considerable increase in the size of the endosomes and at the same time a decrease in the number of intracellular vesicles was found, suggesting that Scarb2 participates in the biogenesis or formation of these organelles and in regulating the balance between invaginations and evaginations of the endosome and lysosome membrane.

The null mice for Scarb2, are viable and fertile, although they show severe problems being the main ones, an obstruction of the urinary tract, deafness and demyelination of Schwann cells which causes a peripheral neuropathy. In humans, the myoclonus-acting renal failure syndrome (AMRF due to Action myoclonus renal failure) is caused by mutations that affect the scarb2 gene. AMRF is a hereditary disease in humans in which progressive epilepsy is associated with renal failure due to glomerulo-sclerosis.

The zebrafish (*Danio Rerio*) is a model organism for the study of the development of vertebrates and research in genetics. Among its advantages we find an external development and the embryos are transparent, this allows us to analyze the different cell divisions throughout the development. At 24 hpf (post-fertilization hours) the brain has already been segmented and the neural tube (CNS) and the somites have been formed which, together with the notochord, will give rise to the muscles and bones. At 5 dpf (post-fertilization days) there is already a larva formed with its functional organs. Due to these advantages it is an excellent model organism for the study of notochord formation.

Through a large-scale mutagenesis, the zebrafish mutant was obtained for the Scarb2a gene (Scarb2ahi1463) in which lethality was observed since the homozygous organisms die in stages of advanced development, 6 to 8 dpf

(post-fertilization days). fish have 3 remarkable characteristics: i) The brain is not formed properly during the first day of development, ii) On the second day of development (2 dpf) there is a decrease in pigmentation, iii) In several regions of the notochord are observed atypical, small and irregular vacuoles and as the development progresses the fish acquire abnormal curvatures in the trunk. Of the three phenotypes reported in the zebrafish mutant for the *Scarb2a* gene (*Scarb2ahi1463*), the one that concerns mainly this work is that of the notochord.

Therefore, the objective of this work was to analyze the role of *scarb2a* in the formation of the notochord of the zebrafish.

4. INTRODUCCION

4.1 El pez cebra como organismo modelo

El pez cebra (*Danio rerio*) es un organismo modelo para el estudio del desarrollo de vertebrados e investigación en genética. Entre sus ventajas encontramos que el genoma está secuenciado, su desarrollo es externo y los embriones son transparentes, lo anterior permite observar y estudiar la organogénesis a lo largo del desarrollo. A las 24 hpf (horas post-fertilización) ya se ha segmentado el cerebro y se han formado el tubo neural y los somitos que junto con la notocorda darán origen a los músculos y huesos (**Figura 1**).

A los 5 dpf (días post-fertilización) se han formado los sistemas circulatorio, digestivo y 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). Cada pareja de peces produce una cantidad abundante de embriones, a los cuales les toma 3 meses convertirse en adultos con capacidad reproductiva, son organismos diploides y el 80% de su genoma está completamente secuenciado (Howe et al., 2013). Debido a estas ventajas es un buen organismo modelo para el estudio de la formación de todos los órganos incluyendo la notocorda (Stemple, 2005).

El pez cebra también es un buen modelo para estudiar enfermedades que afectan a los humanos como la lipofuscinosis neuronal ceroida (Mahmood et al., 2013), el síndrome Allan-Herndon-Dudley de retraso psicomotor (Vatine et al., 2013), los neuroblastomas (Zhu et al., 2012), el melanoma maligno (Patton et al., 2005), el cáncer (MacInnes et al., 2008; Moore et al., 2006), las enfermedades hematopoyéticas (Amatruda and Zon, 1999), la poliposis intestinal (Haramis et al., 2006), el riñón policístico (Kishimoto et al., 2008), las infecciones virales (Ludwig et al., 2011), etc.

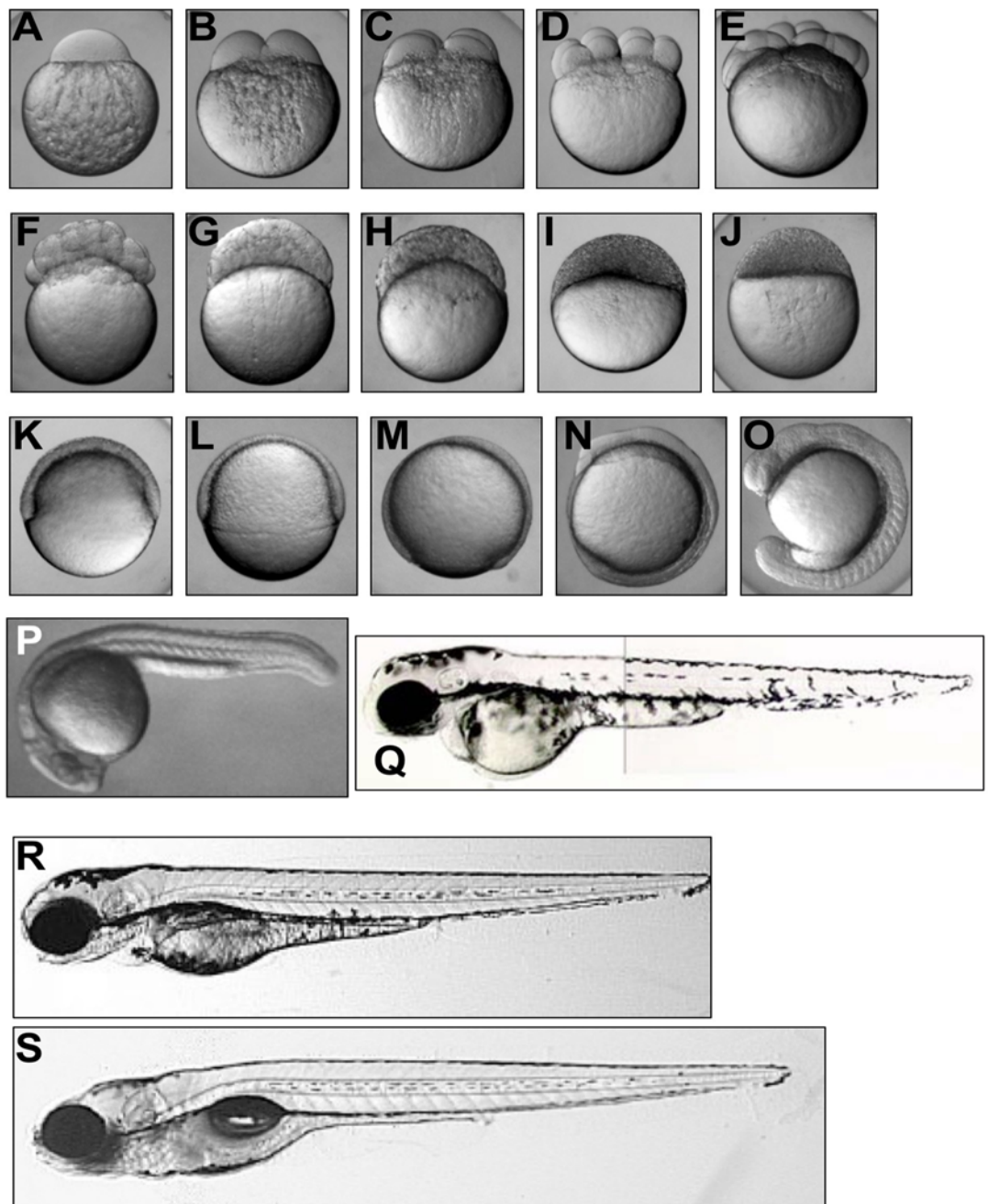


Figura 1. Estadios de desarrollo del pez cebra. A – P: Las primeras 24 horas del desarrollo embrionario del pez cebra. Q – S: Estadios larvarios de desarrollo en donde se forman la mayoría de los órganos. A: Después de la fertilización se separa el polo animal (1a célula) del polo vegetal. B – F: Epíbole temprana de 2, 4, 8, 16 y 32 células. G - H: 512 y 1K células. I - J: estadios de domo y 30% de epíbole. K: estadio de escudo. M: estadio de brote. N: 3 somitos. O: 18 somitos. P: 24 hpf (horas post-fertilización). Q – S: 2, 3 y 5 dpf (días post-fertilización).

Así mismo ha probado ser una excelente plataforma para la búsqueda de nuevos fármacos (Clifton et al., 2010). El genoma del pez cebra esta secuenciado tiene un tamaño de 1.4 Gb, codifica para 26, 206 genes de proteína, 4, 556 genes de RNA, 53,734 transcritos, 218 pseudogenes y 110 genes específicos (Howe et al., 2013). Recientemente se estableció un nuevo protocolo de mutagénesis en pez cebra basado en el sistema CRISPR-Cas el cual consiste en utilizar un sistema que utilizan las bacterias para defenderse de DNA extraño y que induce cortes en DNA de doble cadena por la nucleasa Cas-9 y que puede utilizarse para inducir mutaciones en genes específicos en genes del pez cebra (Hwang et al., 2013).

4.2 Mutagénesis por retrovirus en el pez cebra

Desde la publicación de la secuenciación del genoma humano, se han descubierto numerosos genes específicamente asociados con enfermedades. Sin embargo, la función de estos genes es desconocida. El modelo de ratón ha sido primordial para entender las funciones de los ortólogos de los genes asociados a estas enfermedades. A pesar de que las metodologías de blancos de genes y análisis fenotípico han permitido conocer la función de cerca de un gran porcentaje de los genes codificadores de proteínas, este número sigue siendo corto, considerando que el ratón tiene cerca de 22 000 genes codificadores de proteínas.

De manera similar los estudios de genética de pez cebra, han contribuido a tener un entendimiento de la actividad biológica de los genes de vertebrados sin embargo el porcentaje de genes en los que se ha descrito la función de manera específica, sigue siendo pequeño, por lo que las mutaciones a gran escala son de vital importancia para tener mayor conocimiento de las funciones de los genes. A la fecha se han llevado a cabo cuatro proyectos de mutagénesis en gran escala que han sido primordiales para descubrir la función de genes en el pez cebra, entre estos tenemos el de 1) Nusslein-Volhard donde se analizaron 2,000 mutaciones, este fue realizado por mutación química, 2) El proyecto de Nancy Hopkins donde se obtuvieron 400 mutantes por inserción retroviral, 3) El proyecto de Shawn Burgess y de Shou

Lin donde se identificaron 3,700 mutantes por inserción retroviral y finalmente 4) el proyecto de Derek Stemple en donde se identificaron 10,000 mutantes. La mutante de pez cebra que describimos en este trabajo se obtuvo durante el proyecto realizado en el laboratorio de la Dra. Hopkins, la cual se llevó a cabo empleando inserciones retrovirales.

4.3 La mutante del pez cebra en el gen *scarb2a*

En nuestro laboratorio contamos con una colección de mutantes de pez cebra, entre las cuales se encuentra la mutante insercional *scarb2a^{hi1463}*, la cual se generó durante la mutagénesis a gran escala empleando retrovirus (Golling et al., 2002) en el laboratorio de Nancy Hopkins, esta mutación afecta la expresión de *Scarb2a*, que como se describirá en detalle más adelante es una proteína lisosomal de membrana. En la mutante de pez cebra en el gen *scarb2a* (*scarb2a^{hi1463}*) se observó letalidad ya que los organismos homocigotos mueren en etapas de desarrollo avanzado (6 a 8 días post-fertilización), estos peces presentan 3 características destacables: i) El cerebro no se forma adecuadamente durante el primer día de desarrollo, ii) En el segundo día de desarrollo (2 dpf) hay una disminución en la pigmentación, iii) En varias regiones de la notocorda se muestran células atípicas, pequeñas e irregulares, desarreglo en la membrana basal de la notocorda y conforme avanza el desarrollo los peces adquieren curvaturas anormales en el tronco. Es importante mencionar que existen otras dos copias para el gen *scarb2* en pez cebra a las cuales hemos denominado *scarb2b* y *scarb2c*. Los mamíferos solo tienen una copia de *scarb2*. Cabe mencionar que el fenotipo que más nos interesó y en el que está enfocado el presente trabajo es en el de los defectos en la notocorda.

4.4 La expresión y función de *Scarb2*

El gen *scarb2* se conoce en la literatura por diferentes nombres como *lysosomal glycoprotein 85* (LGP85), *scavenger receptor class B membrana protein -2* (SR-BII) y *cluster of differentiation 36 like-2* (CD36L2). La proteína es codificada por el gen humano *SCARB2*, el cual está constituido por 12

exones y está localizado en el cromosoma 4q21.1. cDNA de SCARB2 fue inicialmente aislado de hígado de rata, tiene 2,065 nucleótidos que dan lugar a una proteína de 478 aminoácidos 11 posibles sitios de N-glicosilación (Fujita et al., 1992). Debido a sus diferentes sitios de glicosilación, el peso molecular de SCARB2 es variable, entre 60 a 85 kDa.

La secuenciación del cDNA de SCARB2 de humano reveló 86 % de similitudes de secuencia de proteína y 79% de homología de ácidos nucleicos con el SCARB2 de rata (Fujita et al., 1992). SCARB2 forma parte de la familia de proteínas denominada CD36/LIMP-II que está altamente conservada evolutivamente y que está representada por receptores de membrana citoplasmática como CD36. El receptor multifuncional CD36 es capaz de unir LDL (low density lipoprotein) oxidado, ácidos grasos de cadena larga, fosfolípidos aniónicos, trombospondina (TSP), colágena y células en apoptosis, por este espectro amplio de ligandos se le ha denominado como un receptor tipo “*scavenger*” (carroñero) y se expresa en monocitos, plaquetas, células del endotelio microvascular y tejido adiposo (Brinkmann et al. 2002). La proteína tiene dos regiones hidrofóbicas que corresponden a los dos dominios transmembranales, con una región C- y N- terminal citoplasmáticas (Fujita et al., 1992; Vega et al., 1991). Esto da lugar a una proteína con dos colas citoplasmáticas y una gran región luminal. En su región carboxilo-terminal tiene un dominio Leucina-Isoleucina (LI) que determina su localización en el lisosoma (Rodríguez F, et al. 2001) y se sabe que al igual que CD36 puede unir TSP (Crombie y Silverstein 1988) lo cual sugiere que interacciona con TSP cuando esta es internalizada a los lisosomas o que en algún momento LIMP-II está en la membrana citoplasmática.

SCARB2 también interacciona con AP-1 (Adaptor protein 1) y AP-3 (Adaptor protein 3) que son componentes de las cubiertas membranales de vesículas (“*membrane coats*”) formadas por la clatrina y otras proteínas y cuya función es el reconocimiento, distribución y anclaje de vesículas provenientes del aparato de golgi o de fagocitosis hacia los organelos. Estas vesículas contienen en su interior las enzimas que se requieren para el funcionamiento

del lisosoma, lo que sugiere que SCARB2 podría participar en el reconocimiento de esas vesículas al lisosoma (Janvier et al. 2003).

La sobre-expresión de SCARB2 en experimentos en cultivo de células COS1, causa que los endosomas primarios y tardíos aumenten de tamaño considerablemente con una disminución de la cantidad de vesículas intracelulares (Kuronita et al. 2002). Lo anterior sugiere que SCARB2 controla el balance entre invaginaciones y evaginaciones de la membrana de la endosoma, y sugiere que tiene una función en la biogénesis y mantenimiento de endosomas y lisosomas. La sobre-expresión de SCARB2 dio lugar a un alargamiento de los endosomas y lisosomas tempranos/tardíos, mientras que la sobre-expresión de LAMP-1 y LAMP-2 no tuvo ningún efecto. También se observó que la sobre-expresión de SCARB2 dio lugar a un transporte dañado y compartimentos celulares afectados, lo cual correlaciona con acumulación de colesterol.

Por otro lado, el grupo de Paul Saftig (Gamp et al. 2003) recientemente llevo a cabo la eliminación de la expresión del gen SCARB2 en ratones por medio de tecnología de recombinación homóloga ("Knockout"). Los ratones homocigotos son viables y fértiles, aunque muestran severos problemas siendo los principales, una obstrucción de las vías urinarias, sordera y desmielinización de las células de Schwann lo que provoca una Neuropatía periférica.

Recientemente se resolvió la estructura de SCARB2 por medio de cristalografía de proteínas, mostrando nuevas posibles funciones para SCARB2 y sus proteínas homologas SR-B1 y CD36 (Neculai et al., 2013). Se encontró que SCARB2 tiene un dominio que une la Glucocerebrosidasa y tiene una cavidad que se extiende sobre toda la proteína. Esta cavidad forma un canal a través del cual los autores sugieren se transporta colesterol. Se han descrito múltiples funciones para SCARB2

Las funciones que se han descrito hasta el momento para SCARB2 son: como proteína involucrada en el mantenimiento de lisosomas, como un receptor de

Glucocerebrosidasa y además puede ser utilizado como receptor por los virus EV71 y Coxsackievirus A7, A14 y A16 (Kuronita et al., 2002; Reczek et al., 2007; Yamayoshi et al., 2012; Yamayoshi et al., 2009).

4.5 Enfermedades asociadas a la deficiencia de Scarb2

La generación del ratón knock-out para SCARB2 reveló, diferentes alteraciones fenotípicas, sugiriendo una función pleiotrópica para SCARB2 (Gamp et al., 2003). Gamp et al. estudiaron al ratón homocigoto y heterocigoto con SCARB2 deficiente, y no notaron diferencia en crecimiento, peso, desarrollo y fertilidad. Las primeras manifestaciones en el ratón fueron: obstrucción de unión pélvica, sordera y desmielinización neuropatía periférica, la cual da como resultado incremento en la mortalidad postnatal. La neuropatía progresiva en el ratón deficiente para SCARB2 se restringe al sistema nervioso periférico lo cual parece ser el resultado de una disminución en la regulación de las proteínas de mielina periféricas (Gamp et al., 2003).

A pesar de que mutaciones en SCARB2 no parecen ser directamente responsables de la enfermedad de Gaucher, SCARB2 parece ser uno de los factores que contribuyen a la heterogeneidad fenotípica observada en los pacientes con esta enfermedad (genotipo *GBA1*) (Velayati et al., 2011). Tradicionalmente la enfermedad de Gaucher se clasifica en 3 tipos dependiendo en la presencia y progresión de síntomas neurológicos (Wong et al., 2004). la enfermedad de Gaucher tipo I, la forma más común, se caracteriza por la ausencia de manifestaciones neurológicas (Rosenbloom and Weinreb, 2013). La enfermedad de Gaucher tipo II, se caracteriza por una neuropatía aguda, que resulta en muerte a los 2 años de edad. la enfermedad de Gaucher tipo III está asociada con diferentes manifestaciones clínicas entre ellas: mioclonias, ataxia, convulsiones, demencia y movimiento sacádico anormal de los ojos (Wong et al., 2004).

La asociación directa entre la deficiencia de SCARB2 y la enfermedad de Gaucher es consecuencia de estudios donde se descubrió que SCARB2 es un receptor de Glucocerebrosidasa (Reczek et al., 2007). La interacción entre

Glucocerebrosidasa y SCARB2 fue confirmada mediante cromatografía de afinidad (Reczek et al., 2007). Estudios adicionales, mostraron in vivo e in vitro que Glucocerebrosidasa y SCARB2 co-localizan en los compartimentos de lisosomas, y que la actividad de Glucocerebrosidasa correlaciona directamente con la presencia de SCARB2 (Reczek et al., 2007). En el ratón knock-out para SCARB2, se encontró en diferentes tejidos una disminución dramática en la actividad y niveles de proteína de GCCase, mientras que en el suero de estos ratones knock-out se encontró un incremento en la actividad y nivel de proteína para Glucocerebrosidasa. Por lo que estos datos demostraron el papel de SCARB2 como receptor de Glucocerebrosidasa para lisosomas.

El síndrome AMRF (por las siglas en inglés de *Action myclonus-renal failure*), se asocia a falla renal que se presenta con síntomas neurológicos como: temblor, convulsiones, ataxia y epilepsia mioclónica progresiva (Berkovic et al., 2008). Frecuentemente estos síntomas, se sobrelapan con los observados en la enfermedad de Gaucher tipo III, lo cual sugiere una base genética similar (Berkovic et al., 2008). Mediante análisis de expresión genética en tres pacientes con AMRF se identificaron mutaciones en SCARB2 (Berkovic et al., 2008). Hasta el momento un total de 14 enfermedades generadas por mutaciones en SCARB2 han sido identificadas, de las cuales la mayoría se asocian a AMRF. La expresión independiente de las mutantes de SCARB2 en células COS7 (Q288X, W146SFsX16 y W178X), muestra que estas proteínas son retenidas en el retículo endoplásmico y no muestran localización en lisosomas. De estas mutantes solo Q288X puede unir Glucocerebrosidasa, mientras que W146SFsX16 y W178X, no unen GCCase (Blanz et al., 2010). La observación de que las mutaciones de SCARB2 afectan diferencialmente la unión a Glucocerebrosidasa, puede ser importante para el diseño de un nuevo medicamento.

Una función inesperada de SCARB2, es el papel que juega en los discos intercalados del corazón (Schroen et al., 2007). En el músculo cardiaco, los discos intercalados conectan los cardiomiocitos. En el corazón de ratón se encontró que SCARB2 se une a N-caderina y β -catenina, una interacción que

es crucial para una respuesta hipertrófica resultado de una sobrecarga cardiaca. Hasta el momento dos pacientes con AMRF han desarrollado cardiopatía, lo cual correlaciona con este hallazgo (Schroen et al., 2007).

4.6 La formación de la notocorda durante el desarrollo embrionario

La notocorda es la estructura que define a los cordados en el desarrollo de los vertebrados. Esta ejerce un papel primordial al ser fuente de señales que determinan el patrón de desarrollo de tejidos circundantes, además de ser el elemento esquelético principal del embrión en desarrollo. En los vertebrados la notocorda existe transitoriamente y tiene dos funciones importantes: 1) La notocorda se encuentra posicionada centralmente en el embrión con respecto a los ejes dorsal-ventral (DV) y los ejes izquierdo y derecho. La cual secreta factores que señalizan en los tejidos circundantes, determinando su posición y destino. En esta función, la notocorda es importante para especificar el destino dorsal del sistema nervioso central, controlando aspectos de asimetría lateral, induce el destino del páncreas, controla la identidad de las venas y arterias, además de especificar una variedad de tipos celulares en la formación de somitos (Corallo et al., 2015). 2) La notocorda tiene una importante función estructural como tejido, esta cercanamente relacionada al cartílago y representa una forma primitiva de este. En consecuencia, la notocorda sirve como esqueleto axial del embrión hasta que las vértebras se forman (Smits and Lefebvre, 2003). En algunos vertebrados la notocorda persiste toda la vida.

En vertebrados la notocorda se origina del organizador dorsal el cual fue originalmente identificado por Spemann y Mangold en anfibios, el organizador dorsal es una región de la gástrula de vertebrados que cuando se trasplanta en la regiones laterales y ventrales de un embrión receptor, este induce la formación de un segundo eje embrionario formando la notocorda y el mesodermo precordial (Harland and Gerhart, 1997; Spemann, 1924). En anfibios, esta región es el labio dorsal del blastoporo. En otras especies, se han encontrado estructuras homólogas: la capa protectora embrionaria de los peces teleósteos, el nodo de Hensen en el pollo y el nodo de los embriones de ratón, todos poseen esencialmente las mismas actividades que el organizador

dorsal de Spemann y Mangold. El organizador dorsal da lugar al cordamesodermo mediante re-arreglos celulares que involucran intercalación medio lateral y convergencia de las células a través de la línea media dorsal. Posteriormente el cordamesodermo se apila en una estructura de células elongadas. Por medio de un tamizado genético en pez cebra se identificaron dos loci, *floating head* y *bozozok*, como genes esenciales en esta transición (Amacher and Kimmel, 1998). Conforme avanza el desarrollo, las células del cordamesodermo adquieren una capa extracelular gruesa y una vacuola. La presión osmótica dentro de la vacuola actúa en contra de la capa extracelular y provee así las propiedades mecánicas que son esenciales para la apropiada elongación de los embriones (Adams et al., 1990). Este proceso de transición es mediante el cual el cordamesodermo se diferencia en notocorda madura. (Saude et al., 2000).

En el pez cebra la formación de la notocorda comienza alrededor de 7 hpf durante la gastrulación y se caracteriza por movimientos celulares de convergencia y de extensión en el mesodermo dorsal a partir del organizador dorsal. La primera transición del organizador dorsal es la formación del cordamesodermo. Esta estructura comienza a diferenciarse al adquirir una matriz extracelular gruesa y en su interior inicia la formación de vacuolas. Cuando estas vacuolas aumentan de tamaño hasta ocupar la mayor parte del volumen celular, se considera que ya se formó una notocorda madura. Algunos de los genes involucrados en la formación de la notocorda han sido identificados mediante la generación de mutantes, las cuales tiene defectos importantes en la especificación del cordamesodermo o en la diferenciación de este a notocorda (Stemple, 2005) (**Figura 2**).

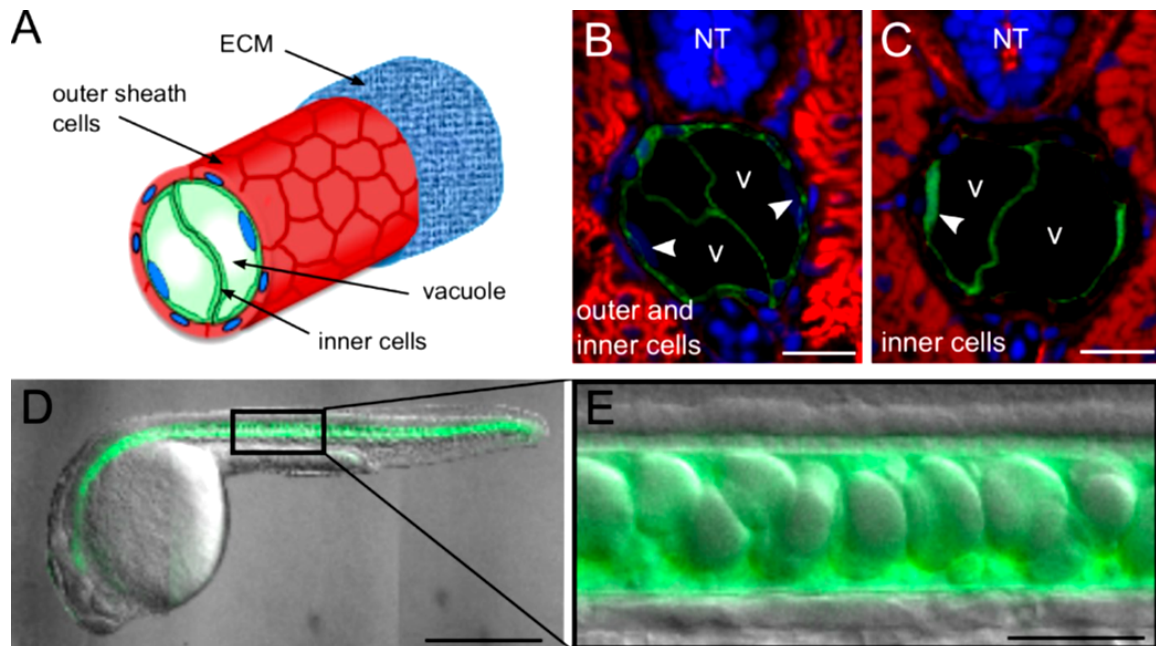


Figura 2. Notocorda del pez cebra y sus capas celulares. A: Representación gráfica de la notocorda de pez cebra, capas de células externas (outer sheath cells) e internas (inner cells) y las células internas vacuoladas (verde), así como la membrana basal (azul). B: Imagen confocal de una sección transversal de larva transgénica 3-dpf de pez cebra, marcada en la membrana con GFP (GFP-CaaX) en las células externas e internas (Tg (rcn3: GFP-CaaX)). C: Imagen confocal de una sección transversal de una larva transgénica de 3 dpf de pez cebra que expresa GFP soluble en las células internas (Gt (SAGFF214A: gal4); Tg (UAS:GFP)). Las secciones transversales se tiñeron con faloidina. En rojo y DAPI en azul. V, vacuola; NT, tubo neural; Las puntas de flecha muestran los núcleos de las células internas. D: Embrión transgénico GFP-CaaX de 24 hpf que ilustra orientación de pez cebra. Anterior está a la izquierda, posterior es a la derecha, dorsal es superior, y ventral es inferior. E: Imagen DIC de 24-hpf GFP-CaaX de embrión de pez cebra donde se observan las vacuolas de la notocorda. (Tomada de Ellis, K., Bagwell, J., Bagnat, M., 2013).

4.7 La membrana basal de la Notocorda

La notocorda se encuentra rodeada de células conocidas como “células en capa” (“sheath cells”) que a su vez son rodeadas por una membrana basal formada por varias proteínas como la laminina, distintos tipos de Colágena, la Nidogenina/Entactina y el Perlecan (**Figura 2**).

La laminina es una glicoproteína hetero-trimérica. Se han reportado once genes que codifican para once cadenas de la familia de las lamininas (α 1-5, β 1-3 y γ 1-3). Las cadenas α tienen un peso promedio de 400 kDa y un tamaño de 160 nm en longitud. En el caso de las cadenas β y γ pesan 200 kDa con brazos cortos de 60 y 40 nm de longitud respectivamente (Tunggal et al., 2000). En pez cebra la clonación de los loci *bashful*, *grumpy* y *sleepy*, dio lugar a la identificación de las tres cadenas de laminina α 1, β 1, y γ 1 (Parsons et al., 2002). Los embriones mutantes *grumpy* y *sleepy*, se caracterizan por un fenotipo en el que las vacuolas de la notocorda no se forman correctamente. Mientras que la microscopía electrónica de estas mutantes muestra que la membrana basal peri-notocordal está ausente y ensayos de inmunohistoquímica contra la laminina no muestran marca (Parsons et al., 2002).

La colágena es la proteína más abundante en los vertebrados. Es una proteína fibrosa, extracelular, insoluble en agua y resistente a todo tipo de tensiones. Se encuentra en casi todos los tejidos y forma tendones y cartílagos; es además el componente orgánico de la matriz de los huesos. Existen varios tipos de colágena adaptados para diferentes funciones. La colágena forma una triple hélice singular que consta de tres fibras, cada una de las cuales contiene alrededor de 1000 aminoácidos. La lateralidad opuesta de esta súper-hélice y sus polipéptidos componentes hacen que la triple hélice de colágeno sea muy resistente al desdoblamiento. Una triple hélice de colágeno tiene 3.3 residuos por giro y una elevación por cada residuo de cerca de dos veces la de una hélice α . Los grupos R en cada hebra polipeptídica de esta triple hélice se compactan entre sí en forma tal que cada tercer aminoácido en el colágeno es un residuo de glicina. El colágeno también tiene alto contenido de prolina e hidroxiprolina, lo que da un modelo Gli-X-Y repetitivo, en el cual la Y por lo general es prolina o hidroxiprolina.

Las triples hélices de colágeno se estabilizan mediante enlaces de hidrógeno entre residuos en *diferentes* cadenas polipeptídicas, proceso auxiliado por los grupos hidroxilo de residuos hidroxiprolina. Enlaces covalentes entre residuos dentro de cadenas polipeptídicas como entre las mismas, proporcionan

estabilidad adicional. La colágena en un inicio se sintetiza como un polipéptido precursor de mayor tamaño, el procolágeno. Muchos residuos prolina y lisina de procolágeno se hidroxilan mediante la propilo-hidroxilasa y la lisil-hidroxilasa, enzimas que requieren ácido ascórbico. Los residuos hidroxiprolineo e hidroxilisino proporcionan capacidad adicional de formación de enlaces de hidrógeno que estabiliza la proteína madura. (MacDonald et al., 2006).

La Nidogenina/Entactina constituye el 2%- 3% de las proteínas de la membrana basal. El núcleo de esta proteína se compone de 3 dominios de tipo globular. El G1 (N-terminal), G2 y G3 (C-terminal) los cuales están separados por segmentos de tipo barra. Dos genes, NID1 y NID2, codifican para dos tipos de nidogeninas. Nidogenina1 / Entactina 1 mide 30 nm de longitud y la nidogenina2/ entactina2 mide 40 nm. Las Nidogeninas se unen a la colágena tipo IV, perlecan, laminina, fibrinógeno y fibronectina. Ambas isoformas se expresan ubicuamente en la membrana basal (Chung et al., 1993; Kimura et al., 1998). Por su parte el Perlecan es un proteoglicano de heparina sulfato. El núcleo de esta proteína mide de 400-450 KDa, con 5 dominios distintos y es similar a perlas de un collar. La proteína núcleo tiene varios sitios de unión para nidogenina/ entactina, colágena IV, integrinas y heparina (French et al., 1999; Handler et al., 1997). Por lo tanto, la Nidogenina y el Perlecan, son proteínas de anclaje para la laminina y la colágena. El ensamblaje de la membrana basal se lleva a cabo por dos pasos principales: 1) Unión de la laminina a la superficie celular, mediante la unión de dominios LG de laminina con integrinas. 2) Acumulación de nidogenina, colágena y perlecan en el andamio de laminina (Kalluri, 2003; Miosge et al., 2003).

4.8 Mutantes de pez cebra que afectan la formación de la notocorda

Al hacer uso del pez cebra como organismo modelo en biología del desarrollo, se han identificado diferentes genes que participan en la formación de la notocorda a los que se le ha denominado tempranos, maduros y tardíos (o estructurales). Entre los tempranos tenemos a *bozozok* (*boz*) y *floating head* (*flh*), los cuales codifican para factores de transcripción y están encargados de controlar la especificación del cordamesodermo, por lo tanto, en ausencia de la actividad de *boz* o *flh* el cordamesodermo no se forma adecuadamente. (Talbot et al., 1995).

Las mutaciones que afectan la maduración o diferenciación de la notocorda incluyen a los loci *ntl* y *doc*. En el caso de los tres grupos de mutante no ocurre la diferenciación del cordamesodermo en una notocorda madura.

Entre los genes tardíos (o estructurales), tenemos los que codifican para las lamininas y coatómeros. Los loci que codifican para laminina α 1 (*bashful*) laminina β (*grumpy*) y laminina γ 1 (*sleepy*), son componentes de la membrana basal (Parsons et al., 2002).

El segundo grupo de genes descubiertos que afectan el desarrollo de la notocorda son: *sneezy*, *happy* y *dopey*, que respectivamente codifican para las cadenas α , β , y γ del complejo de coatómeros, que es un componente importante en la vía de secreción (Coutinho et al., 2004). La pérdida de la actividad secretora en estas mutantes da lugar a pérdida de la membrana basal y defectos en la formación de la vacuola. Las mutantes de laminina y coatómeros resaltan porque son genes importantes para una formación correcta de la notocorda y la membrana basal. Ejemplos de los fenotipos de estas mutantes se muestran en la **(Figura 3)**.

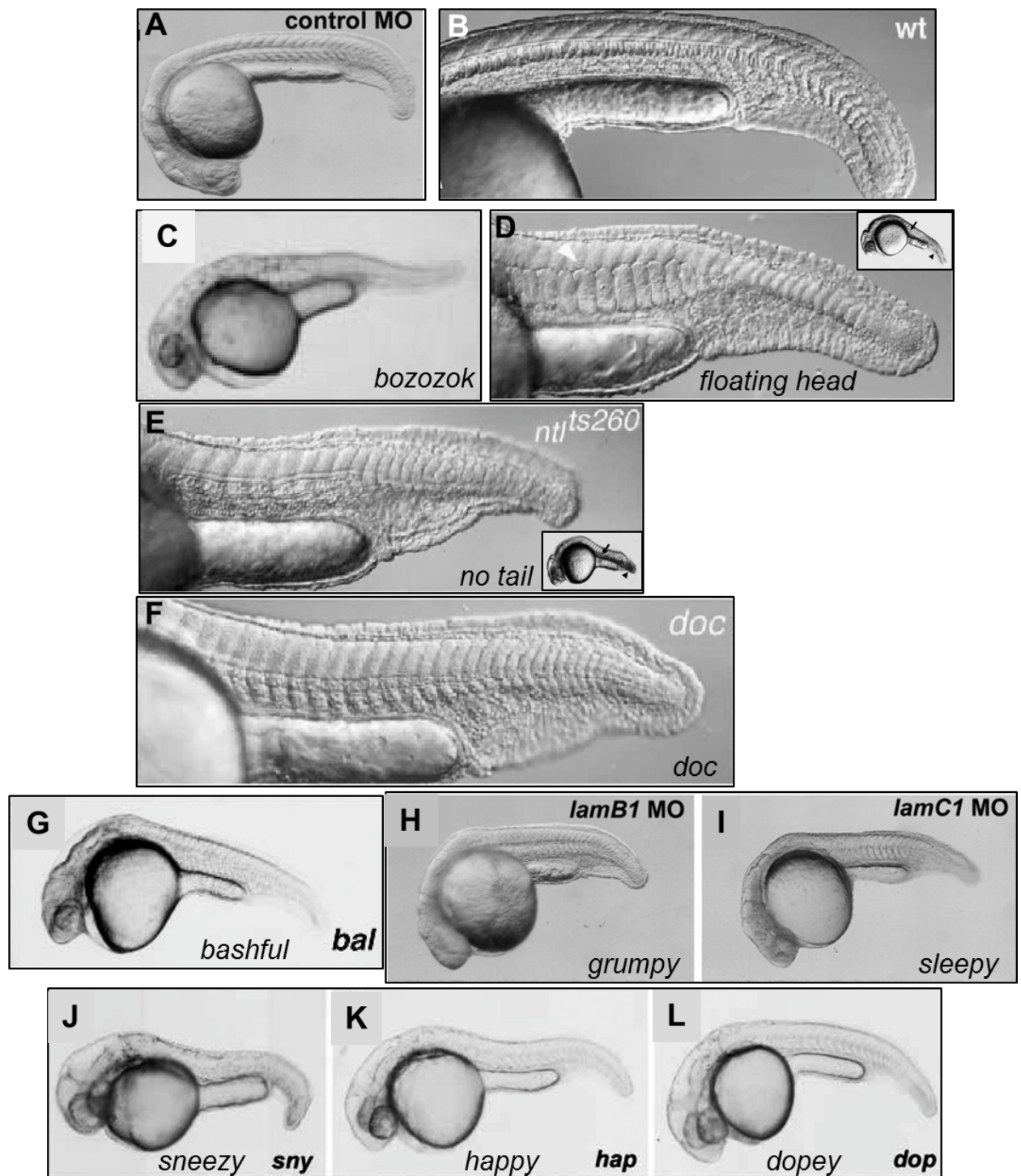


Figura 3. Genes que participan en la formación de la notocorda. A – B: Son controles o peces silvestres de 1 dpf en donde se observa con detalle la notocorda. C – D: mutantes o morfantes de pez cebra de genes que afectan el desarrollo temprano de la notocorda. C: morfante *bozozok* para el gen que codifica para un homólogo de *dharma*. D: mutante *floating head* (gen *flh/noto*). E – F: mutantes de pez cebra en la

diferenciación de la notocorda. E: mutante no tail (gen t). F: mutante doc (gen t-box). G – L: mutantes o morfantes de genes tardíos o de maduración de la notocorda. G: mutante bashful del gen de laminina-alfa-1. H: mutante grumpy del gen de laminina-beta-1. I: mutante sleepy del gen de laminina-gamma-1. J - K: mutantes sneezy, happy y dopey que codifican para genes de las subunidades alfa, beta y gamma, respectivamente que forman parte del complejo Coatómero (COPI). A, H - I: Se tomaron de Parsons et al 2002, Dev. 129: 3137-2146. B, D - F: Se tomaron de la figura 1 de Odenthal et al., 1996, Dev. 123: 103-115. Los recuadros pequeños en D y E: Se tomaron de la figura 8 de Schier et al 1997, Dev. 124: 327-342. C: Se tomó de la figura 5B de Urtishak et al., 2003, Dev. Dyn. 228: 405-413. G: Se tomó de la figura 1 de Stemple et al., Dev. 123: 117-128. J - K: Se tomaron de la figura 1 de Coutinho et al., 2004, Dev. Cell 7: 547-558

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La formación de la notocorda es vital para el desarrollo del sistema nervioso y la determinación del eje dorsal/ventral, izquierdo/derecho en los cordados. No todos los genes que están involucrados en la formación de la notocorda han sido descritos hasta el momento. Scarb2 es una glicoproteína de membrana tipo III presente en la membrana celular, así como en endosomas tardíos y lisosomas y forma parte de la familia CD36/Scarb. El propósito del siguiente trabajo es abordar la pregunta ¿Cuál es papel de Scarb2a del pez cebra en la formación de la notocorda? durante el desarrollo embrionario de este organismo.

6. HIPÓTESIS

El gen *scarb2a* participa en la formación de la notocorda durante el desarrollo embrionario del pez cebra.

7. OBJETIVOS

7.1 Objetivo general

Caracterizar a la mutante de pez cebra *scarb2a^{hi1463}*, así como el patrón de expresión del gen *scarb2a*, para entender cómo participa en la formación de la notocorda

7.2 Objetivos particulares

- 1) Describir los defectos en la formación de la notocorda durante el desarrollo embrionario de la mutante *scarb2a^{hi1463}*
- 2) Localizar el sitio de expresión del mRNA de *scarb2a* en diferentes estadios del desarrollo de pez cebra.
- 3) Analizar si el fenotipo en la notocorda de las mutantes *scarb2a^{hi1463}* es consecuencia de un defecto intrínseco en la formación de las vacuolas
- 4) Estudiar si los defectos en la notocorda de las mutantes *scarb2a^{hi1463}* son inducidos por problemas en la formación de la membrana basal

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 Mantenimiento de la colonia de peces, obtención de embriones, cepas utilizadas

Los peces cebra adultos se mantuvieron en dos sistemas de recirculación continua modelo AHSAM de la compañía Aquatic Habitats-Pentair, cada uno con capacidad para albergar 800 peces adultos. Estos sistemas albergan diferentes cepas de pez cebra que se mantienen a una temperatura constante de 28° C y a un pH de 7.0 y un ciclo circadiano de 10 horas de luz por 14 horas de oscuridad. Los embriones fueron obtenidos mediante cruza naturales y

mantenidos a 28.5 C en cajas de Petri con agua de acuario en una densidad no mayor de 60 embriones por caja. La alimentación de los peces, así como su mantenimiento en general se basó en protocolos reportados (Lawrence, 2011).

Para el presente proyecto fueron utilizadas la cepa silvestre TAB-WIK, la cual fue creada en nuestro laboratorio y es resultado de una cruce entre las cepas TAB-14 y WIK. Además, utilizamos a la cepa mutante *scarb2a^{hi1463}* la cual se encuentra en el fondo genético TAB-WIK. Las cepas TAB-14 y *scarb2a^{hi1463}* provienen del laboratorio de la Dra. Nancy Hopkins del MIT (*Massachusetts Institute of Technology*) y la cepa WIK proviene del cepario ZIRC (*“zebrafish international resource center” www.zebrafish.org*) de los Estados Unidos.

8.2 Genotipificaciones

En la mutante conocida como *scarb2a^{hi1463}* hay una inserción retroviral que se localiza en el intrón 1 del gen *scarb2a*. La mutante es letal recesiva ya que se desarrolla por 5 - 6 días, pero no sobrevive hasta la etapa adulta. Debido a esto la mutante se mantiene en estado heterocigoto hasta el momento que se desean obtener los embriones homocigotos (*scarb2a^{hi1463}/ scarb2a^{hi1463}*) para analizar su desarrollo. Con el propósito de generar los stocks de parejas de peces cebras heterocigotos (*scarb2a/ scarb2a^{hi1463}*). Se genotipificaron 4 generaciones de la cepa TAB-WIK- *scarb2a^{hi1463}*, a lo largo del Doctorado.

Para la identificación de los peces portadores de la inserción retroviral se realizó la genotipificación de peces de 3 meses de edad, realizando PCR a partir de extractos de tejido obtenido de una biopsia de la aleta caudal de los peces esto no les afecta a los peces ya que la aleta vuelve a crecer. Cada aleta fue colocada en uno de los 48 pozos de una placa para PCR conteniendo una solución de lisis (50mM KCl, 200mM NaCl, 0.01% gelatina, 0.45% NP-40, 0.45% Tween-20, 5mM EDTA, 0.2 mg/mL Proteinasa K y 10 mM Tris-HCL, pH 8.0), la placa se incubó durante 4 horas a 55°C y después por 15 minutos a 94° para inactivar a la proteinasa K. Posteriormente la muestra es diluida (1:20) y utilizada para la reacción de PCR.

En la mezcla de PCR (Tabla I) se utilizaron simultáneamente los tres oligonucleótidos Oligo1, Oligo2 y MSL4 (MSL4 5'-GCTAGCTTGCCAAACCTA CAGGT-3'), (Oligonucleótido 1-1463c 5'-GTACTATTTACGCCACAGGGATTGTG-3' y (Oligonucleótido 2-1463c1 5'-TCCCCTGTACGTAACATGATTGTGTA-3') dos de los cuales se unen al gen (Oligonucleótido 1 y Oligonucleótido 2) a más o menos 100bp de los extremos de la inserción retroviral, mientras que MSL4 se une en el extremo 3' del retrovirus (**Figura 4D**). Como consecuencia de la ubicación de estos oligonucleótidos se amplifica una banda de 410 bp de los cromosomas en donde no hay inserción retroviral o se amplifica una banda de 210 bp en donde hay inserción retroviral, con lo cual es posible distinguir a los peces WT (una sola banda de 410 bp), también llamados no portadores y a los peces heterocigos (una banda de 410 bp y una banda de 210 bp), también llamados portadores (**Figura 4D**). Cabe mencionar que durante todo el proceso los peces se mantuvieron individualmente en vasos con aproximadamente 200 ml de agua de acuario marcados de acuerdo al número correspondiente de pozo en la placa para posteriormente facilitar su identificación.

Tabla I. Componentes de la Mezcla de Reacción para Genotipificación

Compuesto	Concentración
Buffer 10X	1X
MgCl ₂	2mM
dNTPs	0.2mM
MSL4	1 µM
Oligo1	1 µM
Oligo2	1 µM
Taq.	0.04 u/µL
Agua MiliQ	-----

Una vez preparada la mezcla de reacción (Tabla I) se adicionaban 2 μ L de dilución de lisado de colas y se colocaban en el termociclador bajo las siguientes condiciones (Tabla II):

Tabla II. Ciclos de PCR.

Temperatura	Tiempo
94°C	1 minuto
94°C	30 segundos
60°C	1 minuto
72°C	1 minuto
Ir al paso 2 y hacer 30 ciclos	----
72°	10 minutos
21°	∞

Una vez terminada la reacción de PCR se agregaban 4 μ L de Buffer de carga (10 mg/mL de Orange G, SIGMA 03756, en glicerol al 50%) y se corrieron en un gel de agarosa 2% preparado en amortiguador TBE (90 mM Tris-HCl, 90 mM Ácido Bórico y 2 mM EDTA) y corrido a un voltaje constante de 100 mili Volts durante aproximadamente 1 hora posteriormente eran visualizados utilizando un transiluminador con luz UV. Se tomaba una fotografía del gel y posteriormente se determinaba en base a la posición de las bandas, de cada pez, si era portador o no portador, los peces se separaban y se regresaban al sistema para ser utilizados posteriormente.

8.3 Hibridación *in situ* (ISH) de embriones completos

Para llevar a cabo la hibridación *in situ* primeramente se procedió a realizar la fijación de los embriones, si el estadio era mayor a 21 somitos, los embriones se decorionaron antes de ser fijados, si eran menores a 21 somitos, no se decorionaron hasta después de ser fijados. Se colocaron hasta 50 embriones

por cada tubo de 2ml, se eliminó el agua y se colocaron en 2ml de 4% PFA (SIGMA 6148-500G) en PBS frío que se agitó suavemente por 4hrs a temperatura ambiente o a 4°C toda la noche. Se retiró el PFA 4% y se procedió a deshidratar a los embriones por varios cambios de metanol (30, 60 y 100%) para posteriormente almacenarse a -20° C un mínimo de 1 hora y un máximo de 6 meses. El metanol además de deshidratar ayuda con la permeabilidad del embrión. Si había que decorionar los embriones se colocaron en una caja de Petri chica con PBST. Se regresaron al tubo de 2ml, se eliminó el PBST y se re-fijo (20 minutos en 4% de PFA en PBST) agitando suavemente. Cuando los embriones ya estaban decorionados se sacaron los embriones de -20°C y se dejaron 15 min hasta que alcanzaron la temperatura ambiente y posteriormente se colocaron en metanol al 60% en PBST en agitación suave por 10 minutos, luego en metanol al 30 % en PBST en agitación suave y posteriormente se realizaron lavados en PBST.

Para permeabilizar los embriones se realizó un tratamiento con la enzima PK (proteínasa K) en PBST (10µg/ml final). Dependiendo del estadio de los embriones era el tiempo que se colocaba en presencia de la PK.

Para terminar con el tiempo de permeabilización los embriones se colocaron en PBST. Y se procedió a un tiempo de re-fijación agregando 4% de PFA en PBST. Después de esto se procedió a realizar la hibridación a 65 °C por dos horas (mínimo una hora). Si se utilizó una sonda por primera vez; se agregaron entre 20 a 100 ni de sonda totales e incubaron por 12 horas (toda la noche) en el horno de hibridación a 65°C. Si se reutilizó la sonda era hasta un máximo de 3 a 4 veces totales. Como paso siguiente se colocaron los embriones en solución bloqueadora por al menos 2 horas, posteriormente los embriones se pasaron a una solución con anticuerpo (mouse Anti-digoxigenina-AP) en solución bloqueadora y se dejaron en agitación suave toda la noche a 4°C.

Al día siguiente se retiró la solución con anticuerpo y se procedió al lavado de los embriones en un portaobjetos excavado, se retiró el PBST y agrego la solución BM-purple, se colocó la placa en agitación, protegida de la luz. Se revisó cada 10 a 15 minutos hasta que apareciera la tinción. Para detener la

reacción se intercambió el BM-purple por PBST y se agitó suavemente a temperatura ambiente. Se volvió a intercambiar por PBST y agito suavemente a temperatura ambiente. Los embriones se aclararon con 50% de glicerol estéril en PBST, se montaron y fotografiaron. Los plásmidos conteniendo los genes a partir de los cuales eran sintetizadas las sondas para detectar a los genes *no-tail*, *myo-D* y *krox-20* fueron donados por el Dr. Isaac Skromne de la Universidad de Richmond

8.4 Microscopía Electrónica

Para las observaciones se utilizaron larvas con fenotipo silvestre y larvas con fenotipo mutante para *scarb2a* de 1 y 3 dpf, las cuales fueron llevadas a la unidad de microscopía donde, se les dio el siguiente tratamiento: fijación con glutaraldehído 2.5%, posteriormente, lavado con medio de fosfatos (PBS) 3 a 4 veces, post-fijación con tetra-óxido de osmio (OSO₄), lavado con medio de fosfatos (PBS) 3 a 4 veces, deshidratación con soluciones de etanol a diferentes graduaciones (30 – 100%) a temperatura de 4°C, deshidratación con etanol al 100% y oxido de propileno, como medio de infiltración se usó una mezcla 1 a 1 de oxidó de propileno y resina epóxica.

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

8.5 Inmunofluorescencia

Para analizar la expresión de laminina se realizaron inmunofluorescencias, para realizar este procedimiento se colocaron en paraformaldehído al 4% (PFA) a 4 °C por toda la noche. Luego se fijaron los embriones se lavaron 3 veces en solución tapón de bloqueo (PBS 1X, BSA 0.1%, TX 100 1%). Posteriormente

se bloquearon 6 horas en solución tampón de bloqueo a temperatura ambiente con agitación ligera. Una vez permeabilizados y bloqueados los embriones, se agregó el anticuerpo anti-laminina (SIGMA, producto L.9393), a una concentración de 1:500 en solución tampón de bloqueo a 4 °C por toda la noche con agitación. Al día siguiente se lavaron los embriones 3 veces durante 10 minutos en solución tampón de bloqueo. Se colocó el anticuerpo secundario Alexa Fluor 488 cabra anti-conejo 1:1000 O/N. Posteriormente se lavaron los embriones 3 veces durante 10 minutos en solución tampón de bloqueo. Finalmente, los embriones se montaron en metil-celulosa 2.5% en PBS para el análisis de epifluorescencia utilizando el microscopio ZEISS.

9. RESULTADOS Y DISCUSION

9.1 CAPITULO 1

9.1.1 Una inserción retroviral interrumpe la expresión del gen *scarb2a*

Durante un proyecto de mutagénesis insercional a gran escala de pez cebra (Amsterdam and Hopkins, 2004; Golling et al., 2002) se obtuvo la mutante *scarb2a*^{hi1463Tg}. Scarb2 es una glicoproteína de membrana de la familia de receptores CD36/Scarb2; así como otros miembros de esta familia, se predijo que Scarb2a es una proteína de membrana con dos hélices transmembranales uno en el dominio N-terminal y otro en el C-terminal (residuos 11-28 y 439-462, respectivamente) y se predijo que contenía 6 sitios de N-glicosilación en residuos asparagina en las posiciones 70,102,108,175,410 y 420 (**Figura 4A**).

La mutación es inducida por una inserción retroviral localizada en el primer intrón del gen *scarb2a* (**Figura 4A**) (Amsterdam and Hopkins, 2004; Golling et al., 2002) y esta inserción produce defectos en el desarrollo de la notocorda. El gen *scarb2a* está localizado en el cromosoma 5 [5:63,941,830–63,956,640] del genoma del pez cebra (Zv9), y existen 3 genes parálogos de *scarb2* (**Figura 4B**).

Los otros genes de *scarb2* (ambos se encuentran en el cromosoma 21) los cuales fueron nombrados *scarb2b* [21:939,426–1,004,051] y *scarb2c* [21:1,029,132–1,062,431]. Un análisis filogenético mostró que mientras que los genes *scarb2c* de pez cebra y pez globo están en el mismo grupo con los genes de *Xenopus Tropicalis*, zarigüeya y humano, los genes de *scarb2a* y *scarb2b*, se encuentran ambos en otro grupo, lo cual sugiere que *scarb2c* de los peces teleósteos está más relacionados con los genes *scarb2* de otros vertebrados que han sido estudiados en detalle por sus funciones como proteínas lisosomales (**Figura 4B**) (Kuronita et al., 2002).

Para mostrar que la inserción del gen *scarb2a* es la causante de los defectos observados en la notocorda descritos en este trabajo, nosotros realizamos el siguiente experimento: Primero, larvas de 25 días post-fertilización fueron obtenidas de cruzas heterocigas *scarb2a*^{hi1463Tg} las cuales fueron escogidas por su fenotipo en la notocorda y posteriormente al DNA y RNA fue extraído. Mientras que el DNA fue utilizado para genotipificar por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Amsterdam et al., 1999), el RNA fue utilizado para la amplificación del mRNA de *scarb2a* por transcripción reversa de la polimerasa (RT-PCR) (**Figura 4C**).

La genotipificación confirmo que todos los embriones que muestran defectos en la notocorda también tienen la inserción retroviral en el gen *scarb2a*, además nosotros encontramos que estos mismos embriones no expresan el transcripto de *scarb2a*. Como control, nosotros repetimos este experimento con 20 larvas de 5 dpf silvestres, nosotros confirmamos por genotipificación que estas larvas no portan el gen *scarb2a* con la inserción retroviral y si expresan mRNA *scarb2* (**Figura 4C**).

Todos los peces homocigos mutantes usados en este trabajo son resultado de las cruzas de los heterocigos *scarb2a*^{hi1463Tg} los cuales fueron seleccionados por genotipificación mediante PCR por la extracción de DNA de las biopsias de la cola de los peces (**Figura 4D**). La genotipificación fue realizada por PCR utilizando 3 oligonucleótidos (**Figura 4D**), uno en cada lado flanqueando a la inserción en ambos extremos y uno localizado en el inserto orientado hacia el exterior. Consecuentemente, nosotros pudimos identificar peces homocigos

para la inserción retroviral por la presencia de una banda de 210 bp. En cambio, los peces silvestres amplifican solo al gen normal de *scarb2a* (410 bp) al carecer del inserto mientras que en los peces heterocigos se amplifican dos bandas, una de 410 bp y otra de 210 bp (**Figura 4D**). Por lo que por cada cruce el 25 % corresponde a embriones WT, 25 % a embriones mutantes y el 50 % a embriones HET.

Con el objetivo de analizar la expresión del mRNA *scarb2a* tejido-sitio-especifico se realizó hibridación in situ (ISH) empleando una sonda anti-sentido. A las 24 h post-fertilización (hpf) se puede observar una clara señal de expresión del mRNA *scarb2a* en el cerebro y en la parte posterior de la notocorda (**Figura 4E**). Como control se empleó una sonda sentido en contra del mRNA *scarb2a*, analizamos 56 embriones a 24 hpf los cuales fueron obtenidos de la cruce de padres *scarb2a*^{hi1463Tg}.

La expresión de *scarb2a* fue detectada en aproximadamente 3/4 de estos embriones (44 de 56), pero en la otra cuarta parte de estos embriones (12 de 56) no detectamos ninguna señal para *scarb2a* (**Figura 4E**). En un experimento en peces silvestres empleando a 40 embriones de la misma edad, se observó la marca específica para *scarb2a* en todos ellos.

Debido a que las inserciones retrovirales son heredadas de manera Mendeliana (Amsterdam et al., 1999) , nosotros siempre observamos el fenotipo de la notocorda en aproximadamente el 25 % de los embriones obtenidos en una cruce de padres heterocigos, los cual es consistente con la proporción de embriones no marcados para ISH (aproximadamente 22 %) (**Figura 4E**).

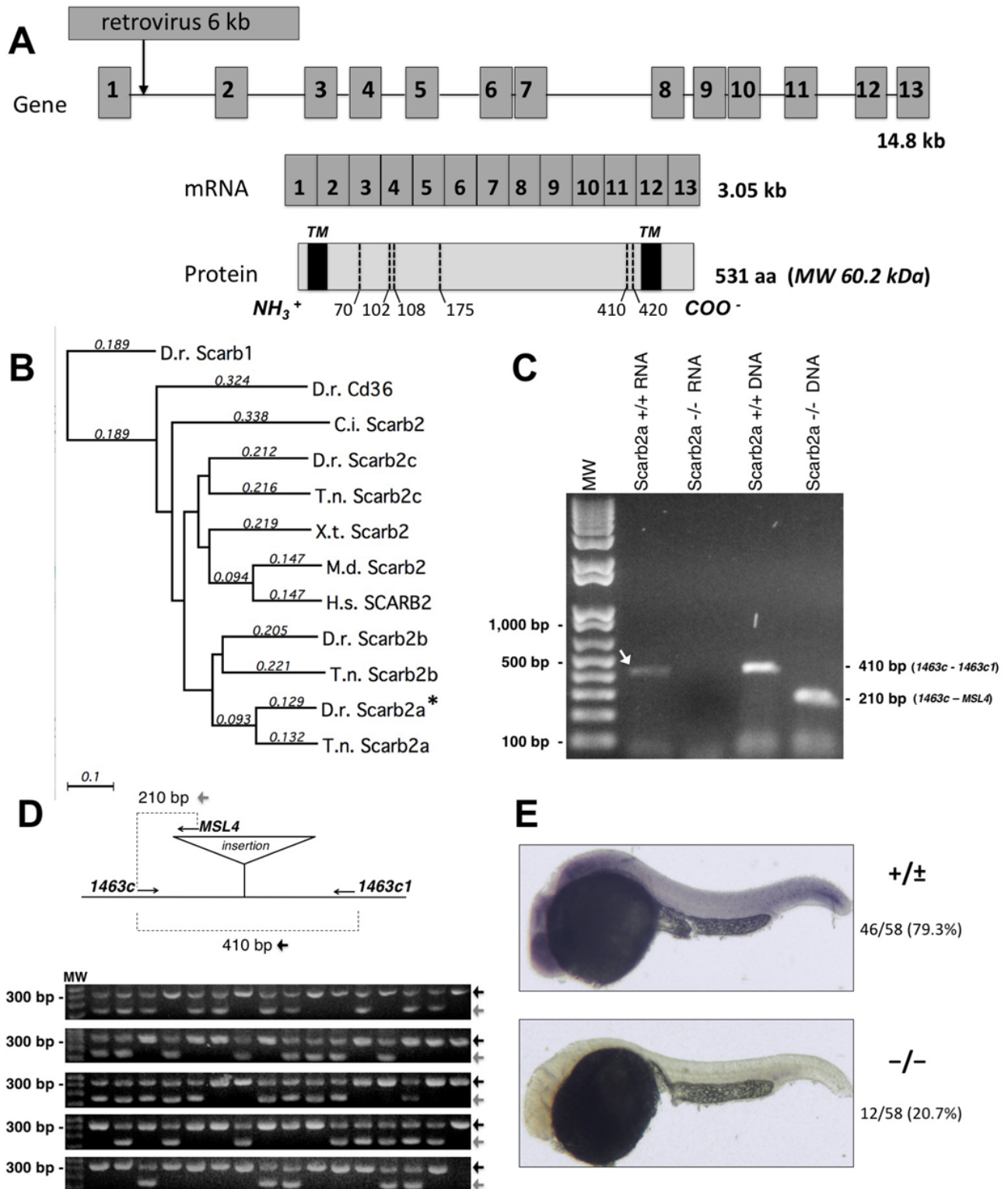


Figura 4. La inserción retroviral del gen *scarb2a*. A: Diagrama de la estructura intron-exon de *scarb2a* y la localización de la inserción retroviral en el primer intron. La proteína *Scarb2a* se representa como un rectángulo en el que se indica la posición de los dos dominios transmembranales (TM) y los residuos de asparagina (líneas punteadas) predichos para los sitios de N-glicosilación. B: Árbol filogenético usando

las secuencias de *Scarb1* y *CD36* de pez cebra como grupo externo. El árbol fue construido con MacVector 12.0 con el algoritmo "Neighbor joining" con distancias "p" no corregidas y los espacios ("gaps") distribuidos proporcionalmente. Los números sobre las líneas indican las substituciones por sitio. Abrevaciones: D.r. (*Danio rerio* "zebrafish"). C.i. (*Ciona intestinalis*), T.n. (*Tetradon nigroviridis* "pez globo"), X.t. (*Xenopus tropicalis*), M.d. (*Monodelphis domestica* "zarigüeya") y H.s. (*Homo sapiens*). C: Reacción de PCR paralela del DNA y RNA de 20 embriones fenotípicamente mutantes *scarb2ahi1463Tg*. Con ello determinamos que todos los embriones fenotípicos analizados llevaban la inserción retroviral en el gen *scarb2a* y al mismo tiempo eran nulos para *scarb2a* por que no expresaban el mRNA de *scarb2a*. D: Las genotipificaciones se realizaron con tres oligonucleótidos, dos flanqueando la inserción retroviral (1463c y 1463c1) y uno en el sitio de la inserción retroviral (MSL4) pero orientado hacia el sitio 5'. En este ejemplo cerca de 80 peces adultos se genotipificaron, de ellos los portadores de la inserción retroviral (aproximadamente el 50 %) fueron usados para obtener embriones homocigotos *scarb2ahi1463Tg* E: Hibridación in situ en embriones completos para detectar la expresión de mRNA de *scarb2a* a 24 hpf. el mRNA de *scarb2a* no fue detectado en aproximadamente 1/4 de todos los embriones. En los otros 3/4 de los embriones, la sonda anti-sentido se detectó en el cerebro y la notocorda posterior.

9.1.2 El transcrito de *scarb2a* se expresa en la notocorda en múltiples estadios del desarrollo del pez cebra

Para estudiar la expresión de *scarb2a* nosotros realizamos RT-PCR en múltiples estadios de desarrollo, lo cual muestra que *scarb2a* se expresa en forma materna y su expresión es constante en los diferentes estadios de desarrollo (**Figura 5A**).

Usando una sonda anti-sentido de marcaje específica para *scarb2a*, se realizó ISH en embriones WT en el estadio de 6 somitos (12 hpf), 26 somitos (22 hpf) y prim 12 (28.5 hpf) (**Figura 5B-E**). En el estadio de 6 somitos, existe una clara señal del mRNA *scarb2a* en la placa precordial y presumiblemente en la notocorda (**Figura 5B,C**).

Con la finalidad de comparar la expresión de *scarb2a* con otros marcadores conocidos de la notocorda realizamos ISH con una sonda para el gen *shh* (*sonic hedgehog*) que se expresa en la notocorda en el estadio de seis somitos (**Figura 5F**) (Schier, 2001). Después, en el estadio de 26 somitos y prim-12, la expresión de *scarb2a* está restringida a las estructuras del cerebro y la región más posterior de la notocorda (**Figura 5D, E**) mientras que *shh* se expresa en los mismos estadios de desarrollo a lo largo de la notocorda (**Figura 5H, I**).

El marcador *α -colágena II* también se expresa en la notocorda a las 24 hpf (Schafer et al., 2005); cuando comparamos su expresión con *scarb2a* marcado, nosotros notamos que ambos se expresan en la parte posterior de la notocorda (**Figura 5J-M**), pero la expresión de *α -collagen II* no está restringida a la parte posterior de la notocorda como es el caso de *scarb2a*.

En este punto decidimos determinar el estadio de desarrollo en que la expresión de *scarb2a* se restringe a la parte posterior de la notocorda. Para tal objetivo, nosotros realizamos ISH para *scarb2a* en embriones WT fijados consecutivamente aproximadamente cada 2 horas: 10 somitos (14 hpf), 14 somitos (16 hpf), 18 somitos (18 hpf), 21 somitos (19.5 hpf) y 29 somitos (24 hpf) (**Figura 5N-R**).

Estos fueron posteriormente montados aplanados sobre su eje dorso-ventral para facilitar la observación del marcaje en la notocorda. Observamos que la expresión de *scarb2a* se restringe a la parte posterior de la notocorda entre los 18 somitos (18 hpf) y 21 somitos (19.5 hpf) (**Figura 5P, Q**). Como control utilizamos la sonda sentido de *scarb2a* la cual no mostro señal específica en la notocorda (**Figura 5S-W**).

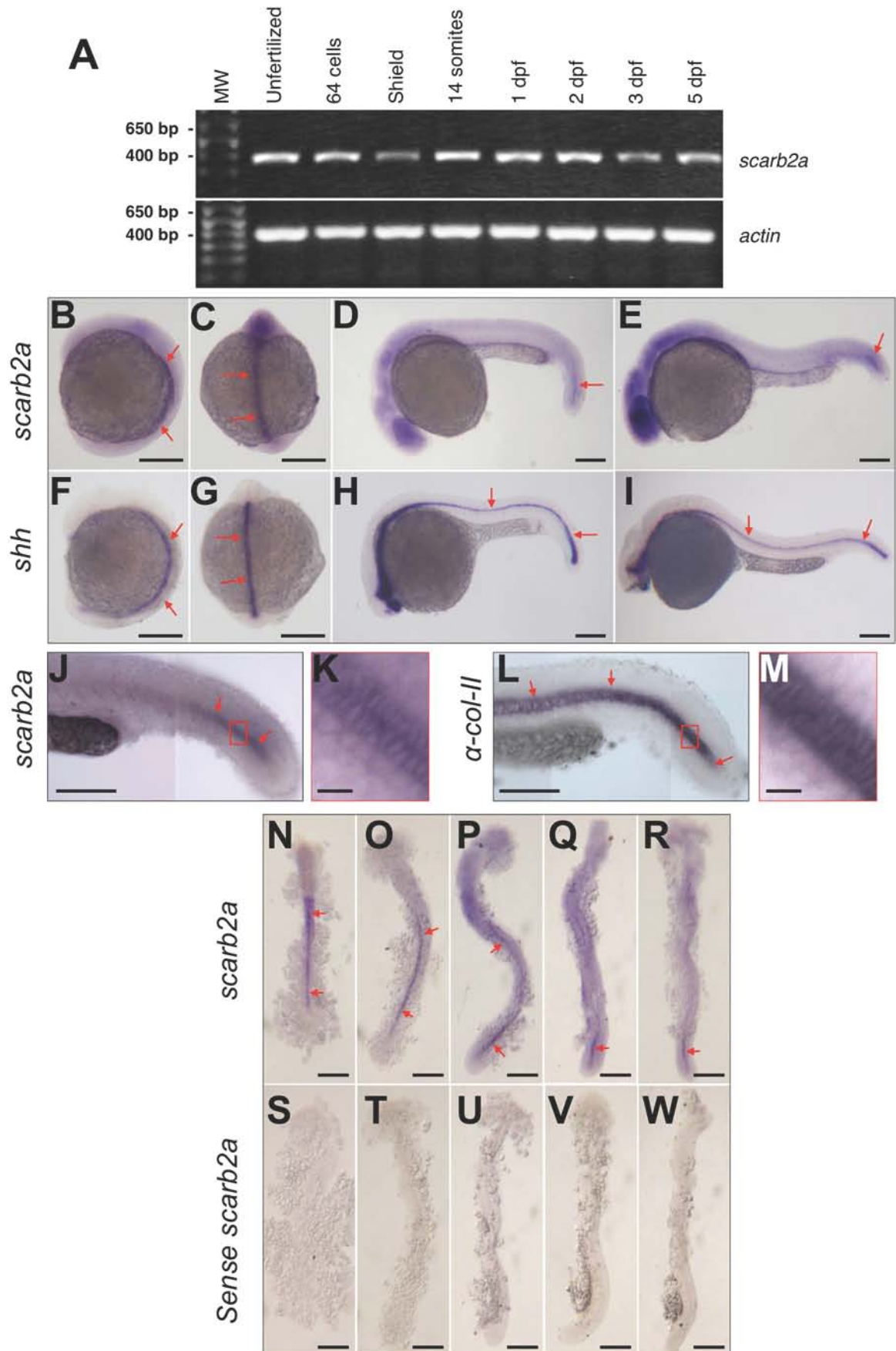


Figura 5. Expresión del mRNA de *scarb2a* de pez cebra. A: RT-PCR de *scarb2a* de cDNA de huevos sin fertilizar y embriones en diferentes estadios de desarrollo: 64 células, escudo, 14 somitos, 1, 2, 3 y 5 dpf. Como control se amplificó también a la *Beta-actina 1* de las mismas muestras. B - E: Expresión de *scarb2a* por hibridación in situ (ISH) en embriones silvestres (sitio lateral y dorsal), en los estadios 6 somitos, 26 somitos y prim-12 respectivamente. F - I: Como comparación el gen *shh* también fue utilizado para marcar la notocorda por ISH en los mismos estadios de desarrollo. J - M: Comparación de los genes *scarb2a* y α -collagena-II en la parte posterior de la notocorda. K: Ampliación (20X) de la región indicada por la caja roja en (J). M: Ampliación (20X) de la caja roja en (L). N - R: Embriones marcados para *scarb2a* por ISH fueron analizados por montaje-plano ("flat mount") para una observación más detallada de su expresión en la notocorda durante los estadios de desarrollo 10 somitos, 14 somitos, 18 somitos, 21 somitos y 24 hpf. S - W: Como controles la ISH fue realizada con la sonda sentido para *scarb2a* en los mismos estadios de desarrollo. Flechas rojas indican la expresión de las sondas analizadas en la notocorda. Barras de escala= 250 μ m, con excepción de los paneles K y M que representan 25 μ m en longitud.

9.1.3 La pérdida de expresión de *scarb2a* previene la correcta formación de la notocorda

La mutación del gen *scarb2a*^{hi14463Tg} es letal y las larvas homocigotas para *scarb2a*^{hi14463Tg} no sobreviven más allá de 7-8 dpf. En estadios tempranos del desarrollo, los embriones homocigotos para *scarb2a*^{hi14463Tg} no se pueden distinguir de los embriones silvestres y no es hasta 1 dpf que se pueden observar claros defectos en el cerebro además de una clara falta de pigmentación; sin embargo, en el estadio 2-3 dpf, ambos defectos desaparecen completamente. Es importante mencionar que los defectos del cerebro y la pigmentación no son parte de este trabajo, el cual está enfocado en el fenotipo específico de la notocorda.

A las 24 hpf, después de examinar detalladamente utilizando el microscopio de iluminación DIC (contraste de interferencia diferencial), fue posible distinguir los defectos de la notocorda en embriones homocigotos de cruces heterocigas *scarb2a*^{hi14463Tg} nosotros observamos que las vacuolas de la notocorda no alcanzan su tamaño correcto y pierden su apariencia normal (**Figura 6A-I**).

Cada embrión fotografiado fue posteriormente genotipificado para comprobar su identidad como WT o homócigo.

Se confirmó por microscopia electrónica que las vacuolas de la notocorda tienen un defecto en su correcta formación en mutantes de 3 dpf cuando se comparan con larvas WT de la misma edad (**Figura 6N, O**). Otro defecto relacionado es que después de 3 dpf, el tronco de las mutantes homocigotas se curva considerablemente hacia arriba (**Figura 6J, K**), lo que les impide nadar correctamente.

Con el objetivo de corroborar que el fenotipo de defecto en la notocorda observado en los embriones homocigotos *scarb2a*^{hi14463Tg}, es consecuencia de la falta de expresión de *scarb2a*, se realizó un experimento rescate mediante la microinyección de mRNA de *scarb2a*. Varios embriones de pez cebra fueron micro-inyectados con 250 pg de mRNA *scarb2a* y 20 de ellos fueron seleccionados al azar para ser analizados con detalle por microscopia de DIC a 24 hpf. Nosotros observamos el tamaño normal de las vacuolas en todos ellos, incluso cuando fue revelado que eran homocigotos para *scarb2a*^{hi14463Tg}. En contraste en embriones no micro-inyectados de la cruce heteróciga *scarb2a*^{hi14463Tg} se observa el defecto en la notocorda en todos los embriones homócigos.

A 5 dpf, el notorio defecto del tronco curvado hacia arriba de *scarb2a*^{hi14463Tg} se observó en 23 % de los embriones micro-inyectados (**Figura 6J, K**) mientras en embriones micro-inyectados con mRNA *scarb2a*; el tronco curvado hacia arriba fue visible solo en 7.7% de las larvas en este estadio, y no llegó a ser tan severo como en los peces no micro-inyectados (**Figura 6L, M**). Estas observaciones sugieren que la expresión endógena de mRNA *scarb2a* está de alguna manera relacionada a la formación de la notocorda y el tronco.

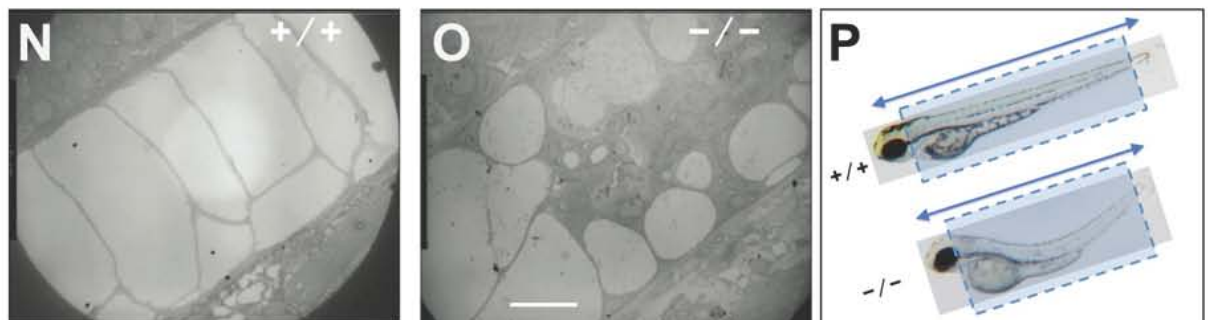
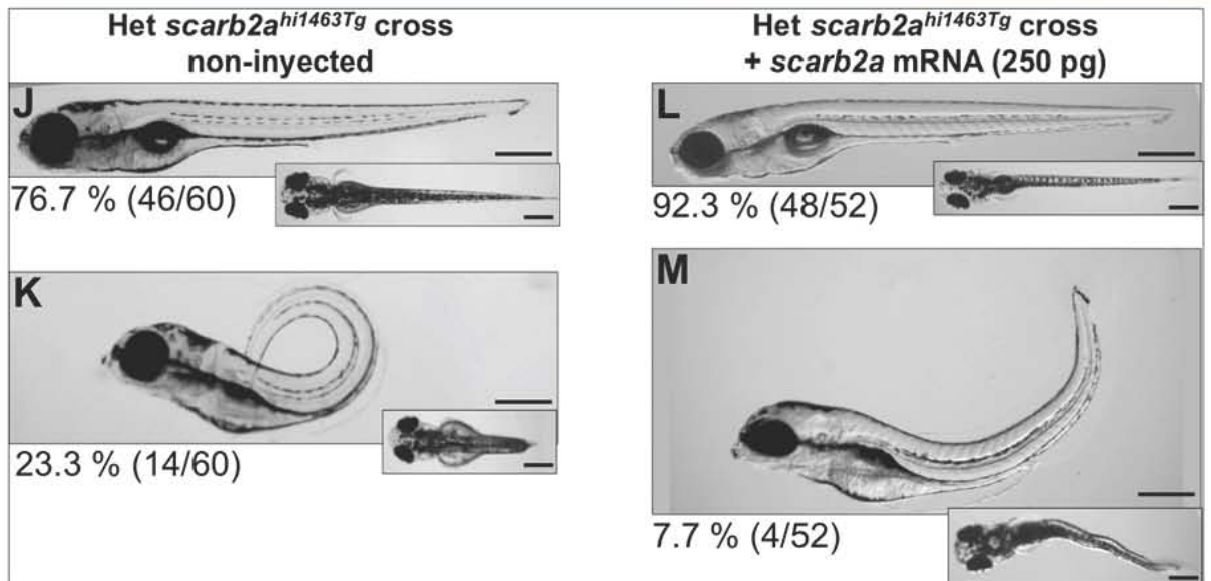
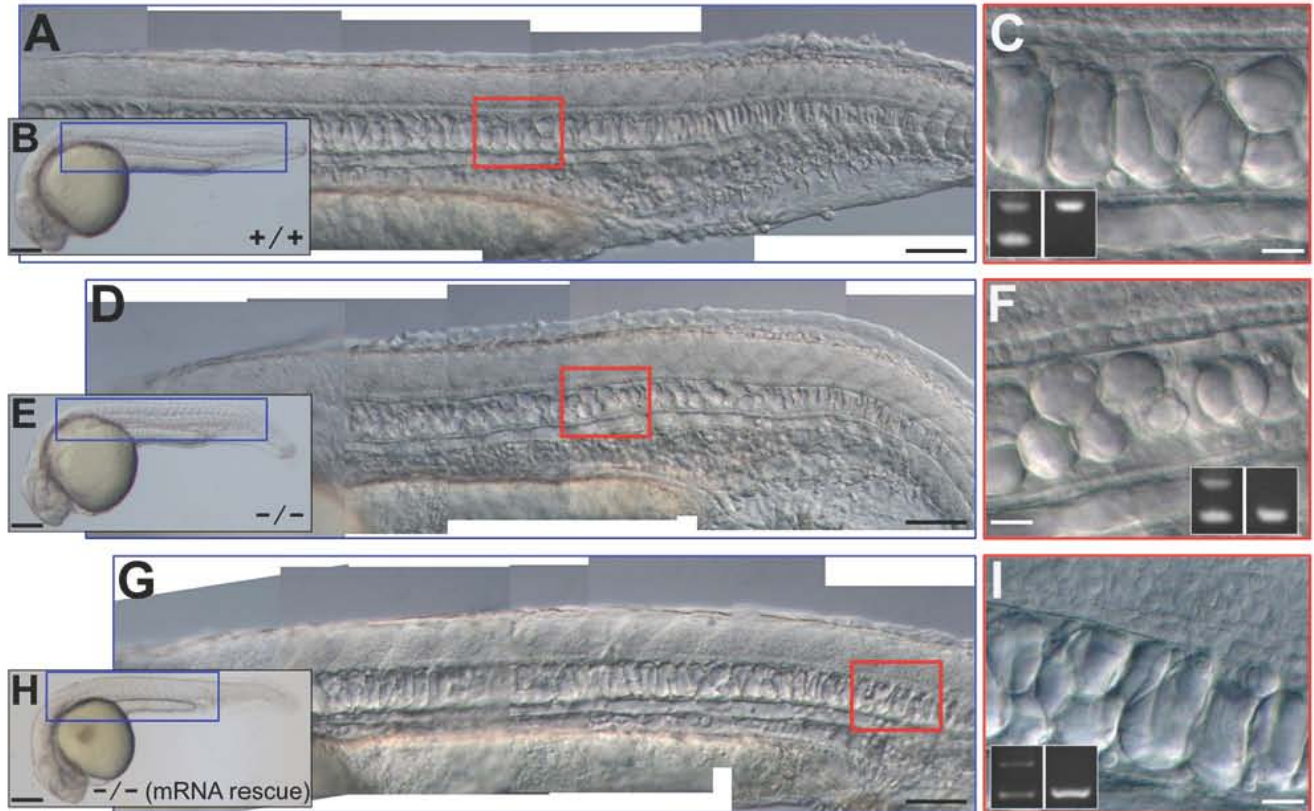


Figura 6. Defectos en la notocorda en la mutante *scarb2a*. A - C, J, L, N: Imágenes de embriones y larvas de pez cebra silvestres. D - I, K, M, O: Embriones de larvas homocigotas para *scarb2ahi1463Tg*. A, D, G: Ensamble de imágenes de microscopía DIC a partir de diferentes fotografías obtenidas a 10X, que corresponden a regiones indicadas en las cajas azules (B, E y H) ampliadas 5 veces lo cual nos permite analizar las características de la notocorda en detalle. C, F, I: Ampliación de las regiones en las cajas rojas (A, D, G), incrementadas 4 para observar la forma de la vacuola. Se muestra la genotipificación de cada pez para mostrar que son silvestres (C) o portadores (F, I). G - I: Embriones homocigotos rescatados por la micro-inyección de mRNA de *scarb2a*. J - M: Experimento de rescate que muestra larvas 5 dpf control (no micro-inyectadas) del lado izquierdo y micro-inyectadas del lado derecho. Mientras 23.3 % de las larvas no micro-inyectadas de las larvas de las cruces heterocigas *scarb2ahi1463Tg* muestran el fenotipo de tronco curvado hacia arriba, solo 7.7% de las larvas micro-inyectadas con mRNA de *scarb2a* muestran el mismo defecto, y además es menos severo. N, O, P: Microscopía electrónica de las vas silvestres y homocigotas para *scarb2ahi1463Tg* de larvas 3 dpf. Secciones longitudinales hechas (P). Barra de escala= 250 μm (B, E, H, J - M) y 100 μm en (A, D, G) 20 \times en (C, F, I, N, O) respectivamente.

9.1.4 *Scarb2a* se requiere para el correcto ensamblaje de la membrana basal de la notocorda

Para entender mejor el mecanismo detrás del fenotipo de defecto en la notocorda observado en los embriones homocigotos *scarb2a^{hi14463Tg}*, decidimos utilizar una estrategia de análisis ultraestructural. Debido a que, en varias mutantes con defectos en la notocorda, se ha observado que la membrana basal, que rodea la notocorda no se ensambla correctamente (Haftek et al., 2003; Scott and Stemple, 2004; Pagnon-Minot et al., 2008; Gray et al., 2014); por lo tanto, nosotros usamos la microscopía electrónica para realizar un análisis detallado de la membrana basal de las mutantes de *scarb2a^{hi1463Tg}* a 30 hpf y 3 dpf. La membrana basal de la notocorda es una estructura tri-laminar, la cual está constituida por la capa interna, media y externa. La membrana basal tiene en la capa interna laminina, colágena en la capa media, y colágena y elastina en la capa externa (Grotmol et al., 2006;

Scott A, 2004). Se realizaron cortes transversales al final del saco vitelino (cerca del somito 16) para todos los embriones analizados.

La membrana basal de la notocorda fue analizada tanto en la región dorsal como en la ventral de la notocorda y detectamos algunas diferencias entre los embriones silvestres y los embriones homocigotos para *scarb2a*^{hi1463Tg}, tanto en embriones de 30 hpf como de 3 dpf. En embriones mutantes a 30 hpf la membrana interna es más ancha que la WT y con apariencia ondulada en ambos sitios dorsal y ventral de la notocorda (**Figura 7A-D**). Al mismo tiempo, los filamentos de colágena no se ensamblan de manera correcta en la membrana basal de la capa media; lo que se observa son filamentos más pequeños y partículas electrodensas (**Figura 7B, D**).

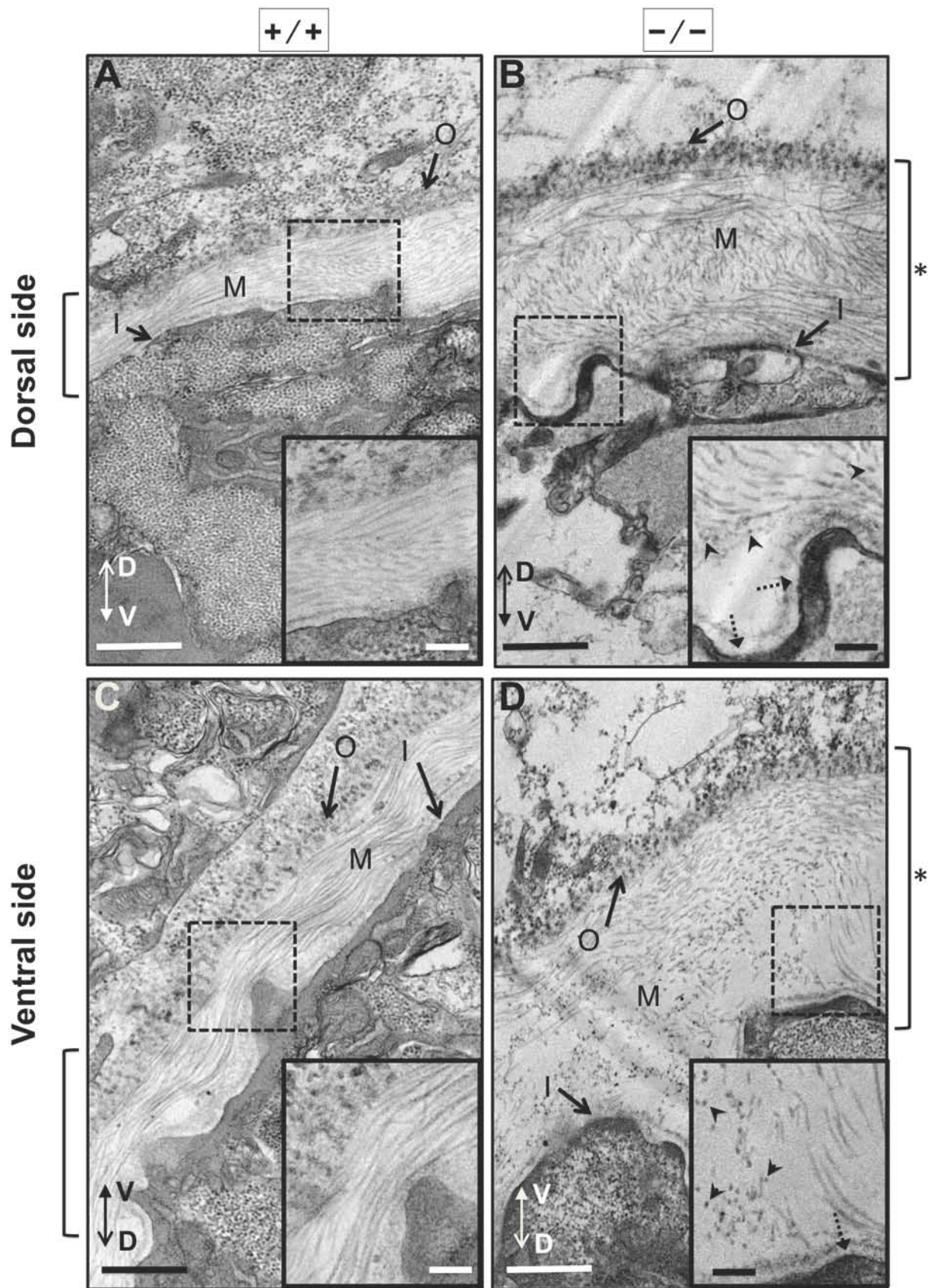


Figura 7. Análisis de microscopía electrónica de la membrana basal de la notocorda de mutantes para *scarb2a* de 1 día desarrollo. Todas las imágenes mostradas corresponden a cortes transversales cerca del somito 16 en embriones de 30 hpf. En esta figura las imágenes fueron colocadas de tal manera que la capa externa de la membrana basal este orientada hacia arriba o hacia la esquina-arriba-izquierda independientemente de la orientación del embrión. Los ejes dorso-ventral de la larva se indican por una doble flecha. A, C: Embriones silvestres de pez cebra B, D: Embriones mutantes para *scarb2ahi1463Tg*. A, B: Imágenes de la membrana basal del sitio dorsal de la notocorda. C, D: Imágenes de la membrana basal del sitio ventral de la notocorda. Todos los embriones mutantes fueron genotipificados, para asegurar que eran embriones homocigotos para *scarb2ahi1463Tg*. Todas las imágenes se muestran a una ampliación de 5,000 X. Los corchetes a los lados de cada figura indican el grueso de la membrana basal que esta aumentado en los mutantes (ver los asteriscos). Las inserciones muestran mayores magnificaciones (10,000 X) de las regiones seleccionadas (cajas punteadas). Puntas de flechas muestran las partículas electrodensas que se observan en la membrana basal media de los embriones homocigotos para *scarb2ahi1463Tg*, y puntas de flechas a la capa media de la membrana basal que es más ancha en embriones mutantes. Membrana basal externa (O), membrana basa media (M), membrana basal interna (I) barras de escala= 500 nm.

Analizando la membrana basal de la notocorda de los sitios dorsales y ventrales de las larvas silvestres y homocigotos para *scarb2a^{hi1463Tg}* de 3 dpf nosotros encontramos dos diferencias importantes: Primero, la capa interna contiene vesículas infladas o ampollas que sobresalen a través de la capa media y pueden ser tan grandes como de 1.5 μm en diámetro (**Figura 8G, H**). Estas vesículas infladas son similares a ampollas de la membrana basal que se forman en pacientes con epidermólisis bullosa (Has and Bruckner-Tuderman, 2014). Estas vesículas inusuales son similares a las ampollas observadas en la epidermis de la mutante de pez cebra para el gen *kindlin-1* (proteína adaptadora intracelular en adherencias focales que contienen integrina)(Postel et al., 2013). Segundo, en la capa media de la membrana basal, nosotros detectamos que la parte de la capa media en contacto con la capa interna no muestra filamentos de colágena, al menos no como la otra

mitad que se encuentra en el extremo exterior y que tiene un arreglo normal de colágena (**Figura 8A - H**). En embriones WT estos filamentos de colágena cubren toda la capa media (**Figura 8A y E**). En algunos cortes de los embriones mutantes, las fibras de colágena de la capa media no muestran un correcto ensamblaje en su orientación, como se observa en el caso de los controles esta característica no se observa en ninguno de los embriones silvestres.

Nosotros creemos que las características fenotípicas observadas a 30 hpf en embriones mutantes *scarb2a*^{hi1463Tg} (capa media engrosada y ensamblaje de colágena defectuosa) de alguna manera producen los defectos observados a 3 dpf en una larva mutante (ampollas en la capa media). Adicionalmente las características observadas en embriones de 30 hpf y larvas de 3 dpf es que la capa externa es menos densa o más difusa en los mutantes de *scarb2a*^{hi1463Tg} en comparación con los peces silvestres.

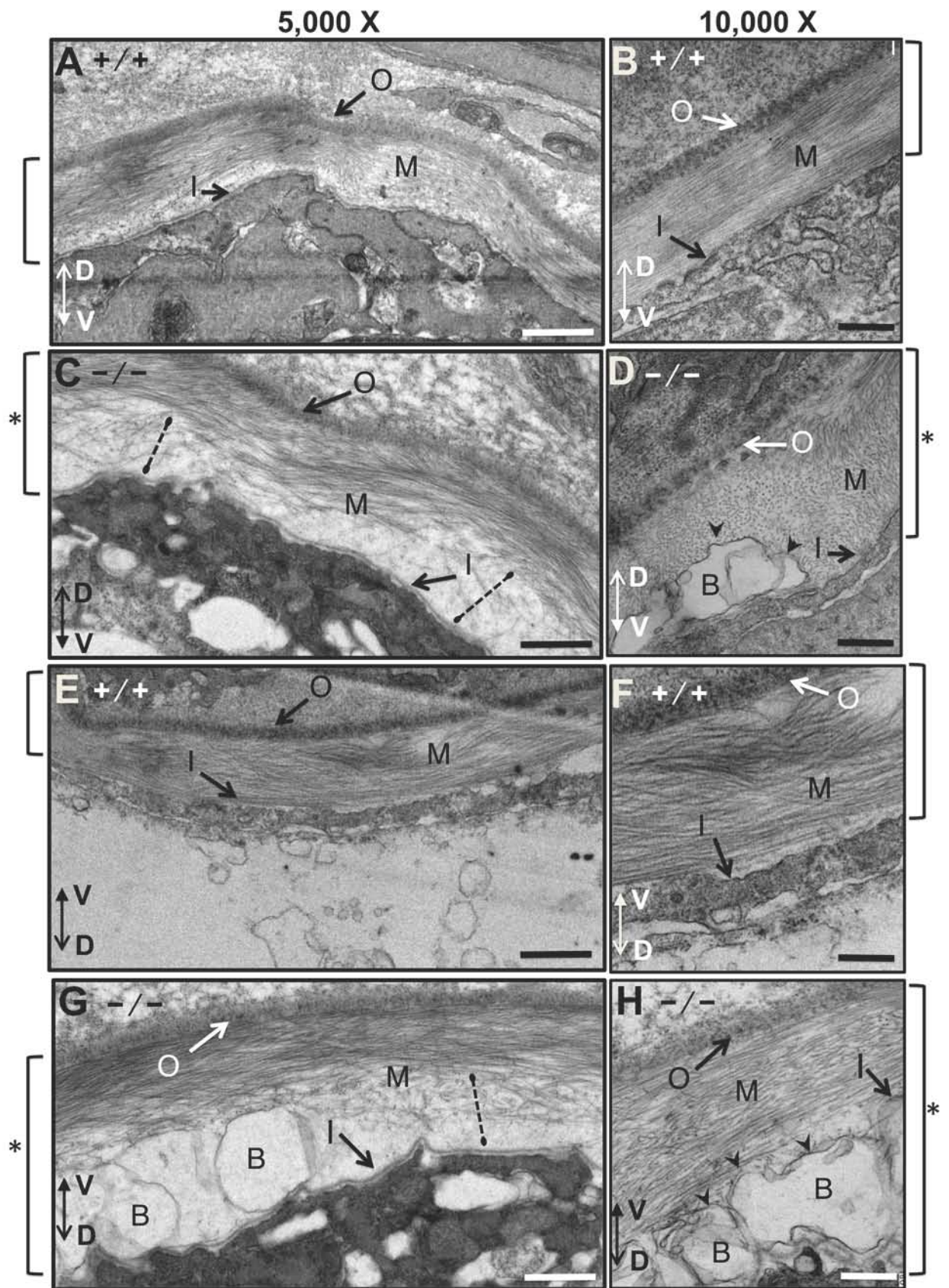


Figura.8. Membrana basal de la notocorda en embriones mutantes y silvestres de 3 dpf analizados por microscopía electrónica. Todas las imágenes son de cortes transversales cerca del somito 16. Para esta figura, las imágenes fueron orientadas con la capa externa de la membrana basal hacia arriba, y el eje dorso-ventral de la larva se indica por una doble flecha. A-D: Fotografías de la membrana basal del lado dorsal de la notocorda. E-H: Fotografías de la membrana basal del lado ventral de la notocorda. A,B,E,F: Embriones silvestres. C,D,G,H: embriones mutantes para *scarb2ahi1463Tg* a 3 dpf. Las imágenes fueron obtenidas a 5,000 X o 10,000 X. Paréntesis cuadrados en los lados de cada figura indican lo ancho de la membrana basal de la notocorda, la cual es más ancha en los mutantes (ver asteriscos). Líneas punteadas en la sección de embriones mutantes muestra las regiones donde la colágena parece no estar ensamblada de manera correcta. Ampollas (flechas) se observan en la membrana basal de la mutante justo debajo de la lámina basal de la capa interna. Membrana basal externa (O), membrana basal media (M), membrana basal interna (I) y ampollas (B). Escala de barras= 500 nm.

En nuestro análisis, nosotros observamos que el grosor de la membrana basal de la notocorda esta incrementado en la mutante de *scarb2a^{hi1463Tg}* (**Figuras 7 y 8**), sin embargo, la medición detallada de varias fotografías muestra que la membrana basal de la región ventral de la notocorda (pero no así del lado dorsal) es más gruesa, existiendo un incremento de 1.8 veces a 30 hpf, y de 2.7 veces a los 3 dpf en las mutantes para *scarb2a^{hi1463Tg}* (**Figura 9**). En contraste en el sitio dorsal de la notocorda no se observan diferencias significativas a 30 hpf en el grosor de la membrana basal entre los peces silvestres y en los mutantes y solo un ligero incremento en el grosor a 3 dpf (1.2 de incremento) en larvas mutantes comparadas con larvas WT (**Figura 9**). La presencia de ampollas en la membrana interna y el hecho de que la base de la mitad de la capa media pierde la mayor parte de los filamentos de colágena probablemente está relacionada al incremento del grosor de la membrana basal de lado ventral (**Figura 8**).

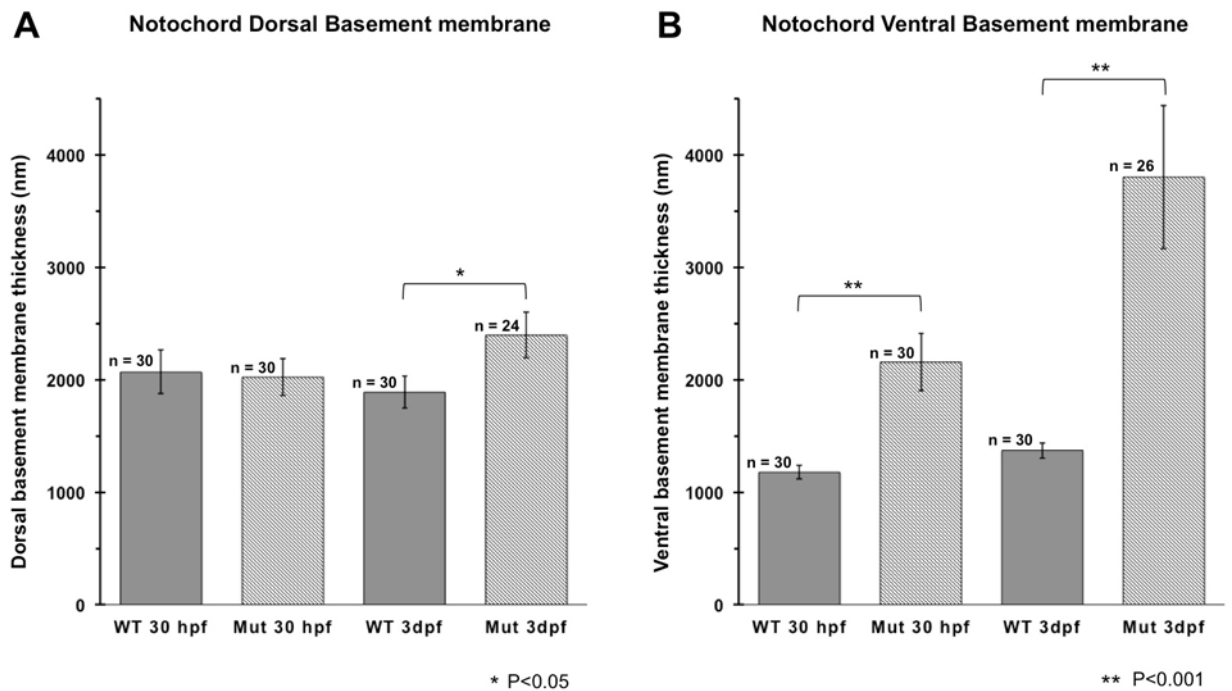


Figura. 9. Comparación del grueso de la membrana basal ventral y dorsal en pez cebra silvestre y mutantes. A: Histograma donde se muestra el ancho de la membrana basal de la notocorda a 30 hpf y 3 dpf en embriones silvestres y mutantes para *scarb2ahi1463Tg*. B: Histograma de los valores del grueso de la membrana basal ventral comparación entre embriones silvestres y mutantes para *scarb2ahi1463Tg* en ambos casos en embriones 30 hpf y larvas 3 dpf. Las barras de error fueron calculadas como el promedio del error estándar, y el valor P entre silvestres y mutantes a 3 dpf en la membrana basal dorsal fue 0.038 ($P<0.05$). El valor para el grueso de la membrana basal de embriones silvestres y mutantes fue 0.0004 ($P<0.001$) a 30 hpf y 0.00015 ($P<0.001$) a 3 dpf. La membrana basal dorsal no muestra diferencias estadísticamente significativas en el grosor ($P>0.05$) entre embriones mutantes y silvestres a 30 hpf.

9.1.5 Discusión del capítulo 1

La notocorda es una estructura embrionaria común a todos los miembros del phylum Chordata. En los vertebrados superiores la notocorda existe transitoriamente y tiene al menos dos funciones importantes: 1) La notocorda secreta factores de señalización hacia los tejidos que la rodean generando un gradiente para el posicionamiento y destino de las células en la formación de tejidos y órganos (de esta manera la notocorda especifica el destino dorsal del sistema nervioso central y controla la simetría del embrión). 2) Otra importante función de la notocorda es su papel estructural ya que es el elemento esquelético del embrión representando una forma primitiva de cartílago. Este trabajo es importante porque nos permitió corroborar la importancia de *Scarb2a* en la función estructural de la notocorda.

Es importante mencionar que esta investigación permitió corroborar que el fenotipo resultante de la inserción retroviral en el gen *scarb2a*^{hi1463Tg} incluye una formación anormal de la notocorda y defectos en el desarrollo del tronco. Además, existen otros dos fenotipos en esta mutante, en donde se afecta la formación del cerebro y el desarrollo de la pigmentación, sin embargo, ambos fenotipos se recuperan a los 3 dpf y no se mencionan con detalle aquí por no ser parte de este trabajo. La inserción retroviral fue localizada con anterioridad en el primer intrón de *scarb2a* (Amsterdam and Hopkins, 2004; Golling et al., 2002), en este trabajo mediante RT-PCR e hibridización *in situ*, nosotros mostramos que los embriones que son portadores para la inserción retroviral en el gen *scarb2a* no expresan el mRNA de *scarb2a*. En el pez cebra no es usual que una inserción retroviral que cae en un intrón, interrumpa completamente la expresión del mRNA (Amsterdam et al., 2011). Además, la microinyección de mRNA transcrito *in-vitro* rescata el defecto de la notocorda, causando una reducción en la proporción de embriones que muestran fenotipo mutante, pasando del 23.3 % al 7.7 % y al mismo tiempo reduce la severidad de la deformación del tronco.

Así mismo, encontramos que el mRNA de *scarb2a* se expresa en la notocorda, empezando en estadios tempranos (6 somitos), lo que sugiere que juega un importante rol en la diferenciación de la notocorda. El transcrito de *scarb2a* se

expresa en toda la notocorda en estadios tempranos, sin embargo, en estadios de 18 a 21 somitos (18 a 19 hpf), la expresión se apaga en la mayoría de la notocorda, permaneciendo expresado solamente en las regiones posteriores de la notocorda en los estadios Prim-12. Es interesante que este patrón de expresión se parece a la expresión del gen de colágena *col15a1* (Pagnon-Minot et al., 2008), el cual también se expresa en toda la notocorda antes de las 15 hpf, pero después de ese estadio de desarrollo, la expresión de *col15a1* se pierde con excepción de la región posterior de la notocorda. Es un descubrimiento novedoso el que la glicoproteína Scarb2 tenga una función en el desarrollo de la notocorda y debido a que la notocorda es esencial para la formación de la espina dorsal, esto podría explicar porque los ratones knockout para *Scarb2* tienen una forma anormal del tronco en forma similar a la escoliosis congénita (Gamp et al., 2003). De manera interesante, la mutante para *scarb2a^{hi1463Tg}* también tiene un tronco con deformaciones, como resultado de los defectos en la formación de la notocorda.

Debido a que, en la mutante de *scarb2a^{hi1463Tg}*, las vacuolas de la notocorda no están completamente formadas, es posible que el gen *Scarb2a* esté involucrado en la formación de las vacuolas. Se sabe que el hinchamiento de las vacuolas es importante como fuerza morfo-genética para la elongación del eje corporal (Ellis et al., 2013). En mamíferos el gen *scarb2* codifica para una glicoproteína localizada en la membrana lisosomas (Reczek et al., 2007) y se ha encontrado que la sobre-expresión de *scarb2a* en células COS induce el alargamiento de endosomas/lisosomas, dando lugar a la hipótesis que *Scarb2a* induce la fusión de vesículas intracelulares. Se ha propuesto que las vacuolas de la notocorda son organelos relacionados a la notocorda (LRO) (Ellis et al., 2013).

Si *Scarb2a* de pez cebra es de hecho una proteína LRO de las vacuolas de la notocorda y su función es la fusión de vacuola-vacuola, esto explicaría porque las vacuolas no alcanzan su tamaño correcto en la mutante de *scarb2a^{hi1463Tg}*. Sin embargo, *Scarb2a* es una glicoproteína y no se han detectado glicosaminoglicanos dentro de las vacuolas de la notocorda (Ellis et al., 2013). Además *Scarb2* de mamíferos tiene un dominio C-terminal con motivo di-leucina

(D/EXXXLL/I) que es esencial para la localización de los lisosomas (Honing et al., 1998) y de hecho muchas otras proteínas usan el motivo di-leucina como señal para viajar a los lisosomas o LROs específicos (Raposo and Marks, 2007). Sin embargo, de las 3 proteínas de Scarb2 solamente la proteína Scarb2c tiene motivo di-leucina. Debido a que Scarb2a no posee motivo di-leucina, no podemos explicar cómo Scarb2a puede ser transferida a las vacuolas de la notocorda. Se sabe que la fragmentación de las vacuolas en la notocorda puede inducir peces cebras con cuerpos y troncos pequeños y curvados (Ellis et al., 2013) tal como se ha observado en otras mutantes de notocorda de pez cebra (Pagnon-Minot et al., 2008). Debido a que la larva mutante de *scarb2a*^{hi1463Tg} muestra una marcada curvatura del cuerpo, es posible que otros defectos de la notocorda más allá de la fragmentación de la vacuola, también están presentes.

Diferentes mutantes de pez cebra para genes de colágena y laminina (*laminin a1-chain*, *laminin b1-chain*, *laminin c1-chain*, *col15a1*, and *col8a1a*) (Gray et al., 2014; Haftek et al., 2003; Pagnon-Minot et al., 2008; Scott A, 2004) muestran también defectos en la formación de la notocorda. Estas proteínas de matriz extracelular están localizadas en la membrana basal que rodea a la notocorda. Por lo tanto, una hipótesis alternativa es que la proteína Scarb2a tiene una función en el ensamblaje de la membrana basal. Después de realizar un análisis ultra-estructural de la membrana basal de la notocorda en las mutantes *scarb2a*^{hi1463Tg}, nosotros encontramos diferentes defectos específicos de la membrana basal. Primero, a 30 hpf, la capa interna de la membrana basal (que es una lámina basal electro-densa) fue de mayor espesor en los embriones mutantes, después a 3 dpf, aparecieron ampollas en esta misma capa interna. Segundo, los filamentos de la colágena, en la parte basal de la capa media, no se ensamblan de manera correcta a 30 hpf y después, a 3 dpf, se ven aún más desarreglados en comparación con la región superior de la capa media, la cual contiene filamentos de colágena bien formados.

Las proteínas Scarb2 son homologas a las proteínas de membrana CD36, las cuales tienen múltiples ligandos y uno de los reportados para CD36 es la

colágena (Asch et al., 1993). Por lo tanto, es posible que la proteína Scarb2a interaccione con la colágena que es una de las principales proteínas de la membrana basal de la notocorda. Scarb2 es considerada principalmente una proteína lisosomal pero también se le ha encontrado asociada a N-caderina (Schroen et al., 2007). Debido a que N-caderina es una proteína de membrana citoplasmática, Scarb2a podría estar localizada en la membrana citoplasmática.

La notocorda es una estructura mecánica que se requiere para la locomoción, es como si fuera una barra rígida pero lo suficientemente flexible para permitir el movimiento del tronco para ambos lados, lo que es importante para permitir la contracción de los músculos y dar lugar al nado. Se ha propuesto que la rigidez de la placa neural (adyacente a la notocorda dorsal) previene que el tronco se doble hacia abajo. Mientras que el hipocordo, que es como un cordón por debajo de la notocorda, evita que el tronco se doble hacia arriba (Stemple, 2005). Por ejemplo, mutaciones en los genes *ope/tdgf1* y *cyc/ndr2* que inducen la pérdida de la placa neural producen embriones con severa curvatura del tronco hacia abajo (Hatta et al., 1991; Schier et al., 1997).

De manera inesperada, encontramos que la membrana basal del lado ventral de la notocorda de los mutantes para *scarb2a^{hi1463Tg}*, se encuentra severamente afectada, y tiene un mayor grosor que la membrana basal del lado dorsal. Debido a que la membrana basal de la notocorda está directamente en contacto con el hipocordo, el grosor de esta membrana basal defectuosa podría desplazar al hipocordo de su lugar correcto o de alguna manera afectar su función y por lo tanto provocar la severa curvatura hacia arriba del tronco que observamos en las larvas mutantes *scarb2a^{hi1463Tg}*. Al reportar que Scarb2a es esencial para la formación de la notocorda en el desarrollo del pez cebra, nosotros extendemos el número de las funciones de esta familia de glicoproteínas que son receptores de membrana.

9.2 CAPITULO 2

9.2.1 Análisis de la expresión del mRNA de *no tail* por Hibridación in situ en embriones de la crucea *scarb2a/ scarb2a^{hi1463} x scarb2a/ scarb2a^{hi1463}*

El gen *ntl* es homólogo al gen *Brachyury* de ratón. BRACHYURY (*T*) el cual es un factor de transcripción con el complejo *T-box*. Embriones de ratón mutantes para *T* se caracterizan por problemas en la formación del mesodermo, la notocorda no se forma adecuadamente y los embriones mueren a los 10 dpf.

En el caso de pez cebra mutantes para (*T*) muestran el mismo fenotipo que en ratón ya que la notocorda tampoco se forma. Debido a que *ntl* se ha utilizado como un marcador temprano de notocorda, proseguimos a analizar el patrón de expresión de *ntl* en embriones provenientes de una crucea heterociga (*scarb2a/ scarb2a^{hi1463} x scarb2a/ scarb2a^{hi1463}*) en estadios de 10 somitos y 1 dpf.

Es importante mencionar que la proporción esperada de embriones mutantes para *scarb2a* es de 25 %, siendo 50 % embriones heterocigotos y 25 % embriones WT. Se analizaron los embriones de 2 cruces individuales, una de estas cruces en estadio de 10 somitos y una de 1 dpf (**Figura 10 A y B**).

Tanto para los estadios de 10 somitos y de 24 hpf no se observó diferencia en la expresión de *ntl* en embriones para la crucea heterociga de peces portadores *scarb2a^{hi1463Tg}*.

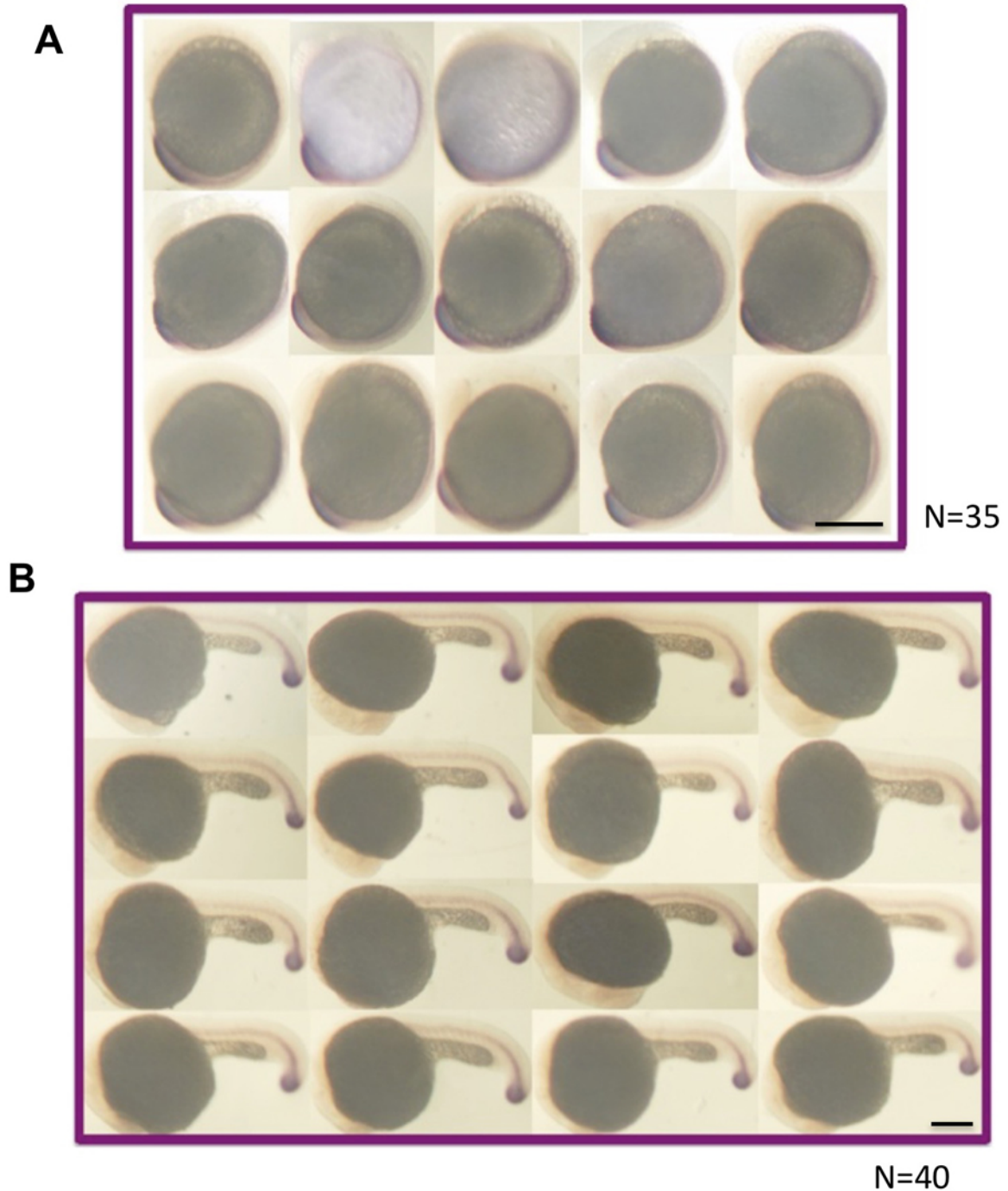


Figura 10. Análisis de la expresión de no tail en embriones de la cruce *scarb2a/scarb2ahi1463* x *scarb2a/scarb2ahi1463* en dos estadios de desarrollo. A: Hibridación in situ empleando una sonda anti-sentido del gen no tail en embriones de 10 somitos. Se muestran 15 embriones de un total de 35. B: Hibridación in situ sonda anti-sentido no tail en embriones de 24 hpf. En la foto se aprecian 16 embriones de un total de 40. Las barras en A y B corresponden a 250 μ m.

9.2.2 Análisis de la expresión del mRNA de *myoD* por Hibridación in situ en embriones de la crucea *scarb2a/scarb2a^{hi1463}* x *scarb2a/scarb2a^{hi1463}*

El gen *myoD* es uno de los marcadores más tempranos cuando se produce miogénesis. Pertenece a la familia de factores de transcripción con dominio hélice-asa-hélice. Debido a que *myoD* ha sido utilizado como marcador de diferenciación de músculo, decidimos utilizar este como marcador control en embriones de la crucea heterociga *scarb2a/scarb2a^{hi1463}* x *scarb2a/scarb2a^{hi1463}* en estadios de 10 somitos y de 1 dpf.

La idea de este experimento es confirmar que los defectos observados de la curvatura anormal del tronco en embriones homocigos *scarb2a^{hi1463Tg}* no tienen que ver con problemas en la diferenciación de músculo. Lo que observamos es que efectivamente no hay diferencia en la expresión de *myoD* en embriones de la crucea heterociga *scarb2a^{hi1463Tg}* (**Figura 11 A y B**).

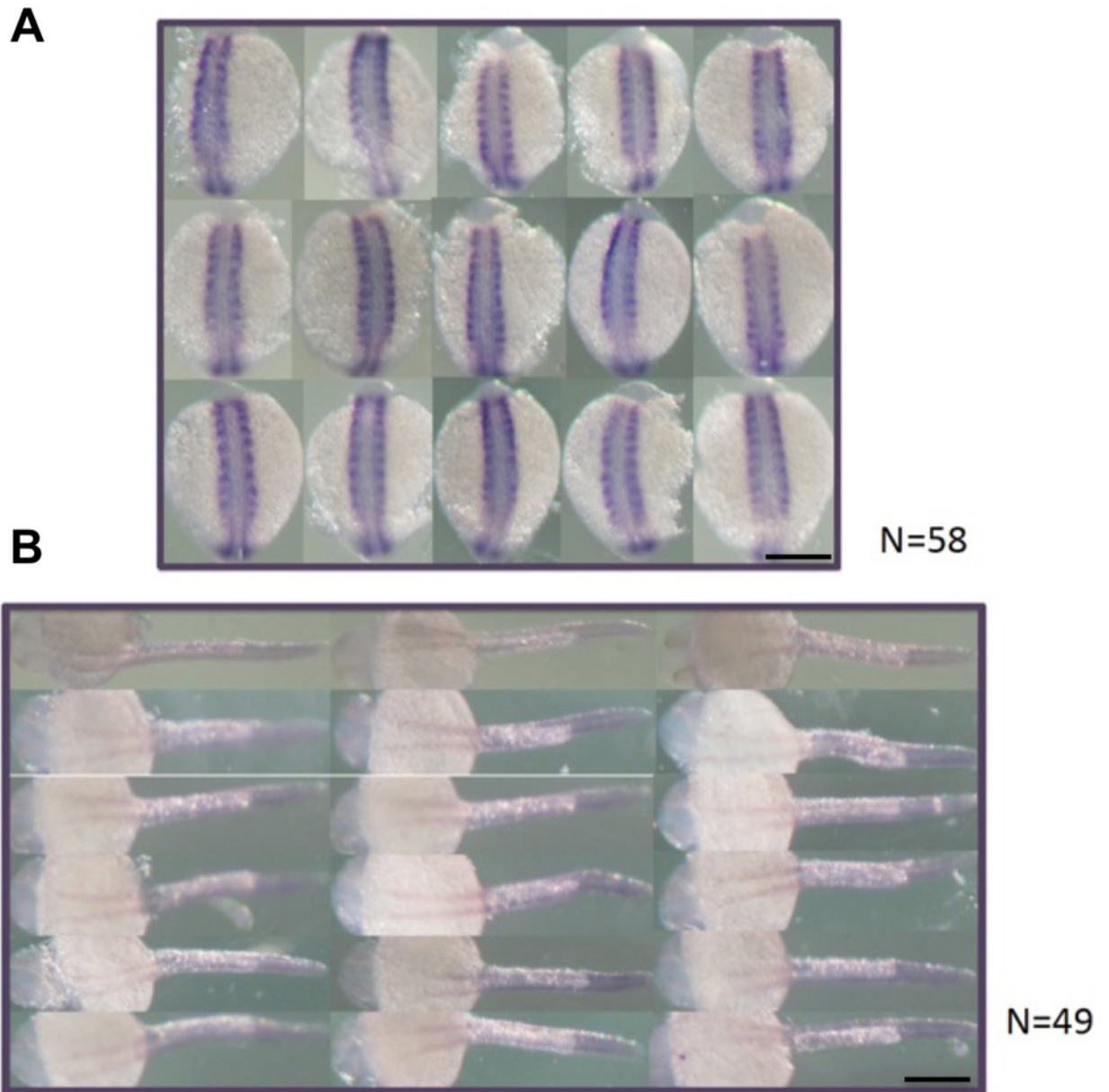
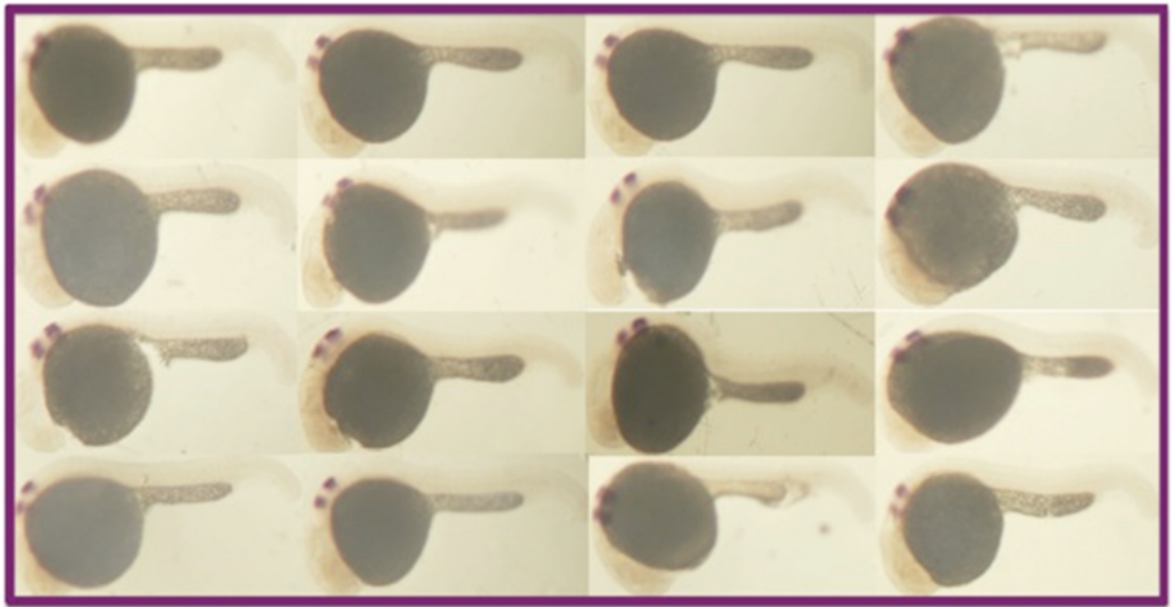


Figura 11. Detección de la expresión de myoD en embriones de la cruce *Scarb2a* heteróciga X *Scarb2a* heteróciga en estadio de 10 somitos y 1 dpf. A: Hibridación in situ sonda anti-sentido myoD en embriones de 10 somitos. Se muestran 15 embriones de un total de 58. B: Hibridación in situ sonda anti-sentido myoD en embriones de 1 dpf. Solo se presentan 18 embriones de un total de 49. La barra de medida equivale a 250 μ m.

9.2.3 Análisis de la expresión del mRNA de *krox20* por Hibridación in situ en embriones de la crucea *scarb2a/scarb2a^{hi1463}* x *scarb2a/scarb2a^{hi1463}*

Krox20 es un factor de transcripción de dedos de zinc que se requiere para el desarrollo de los rombómeros 3 y 5 del rombencefalo. Decidimos utilizarlo como segundo marcador control en embriones de la crucea *scarb2a/scarb2a^{hi1463}* x *scarb2a/scarb2a^{hi1463}* en estadio de 1 dpf, ya que en teoría el defecto que observamos en la mutante de *scarb2a* no se origina por un defecto en la formación de los rombómeros 3 y 5. Lo que observamos es que efectivamente no hay diferencia en la expresión de *krox20* en el estadio de 1 dpf entre embriones WT, heterocigos y homocigos (**Figura 12**).



N=42

Figura 12. Análisis de la expresión de *krox20* en embriones de la crucea *Scarb2a* heterociga X *Scarb2a* heterociga en estadio 1 dpf. A: Hibridación in situ sonda anti-sentido *myoD* en embriones de 1 dpf. Se aprecian 16 embriones de un total de 42. Las barras son de 250 μ m.

9.2.4 Inmunofluorescencias de laminina en embriones WT y MUT de 1 dpf

Los principales componentes de la membrana basal de la notocorda son laminina y colágena, debido a esto proseguimos a analizar mediante inmunofluorescencias a embriones WT y MUT a 1 dpf con un anticuerpo policlonal contra lamininas (SIGMA), lo que observamos con este anticuerpos es una marca en la membrana basal de la notocorda y en la membrana basal de los somitos en embriones WT (**Figura 13**), esta marca también se observa en embriones MUT pasa *scarb2a*, sin embargo es este caso es evidente un desarreglo en la expresión de laminina en la parte posterior de la membrana basal de la notocorda (**Figura 13 C,D**).

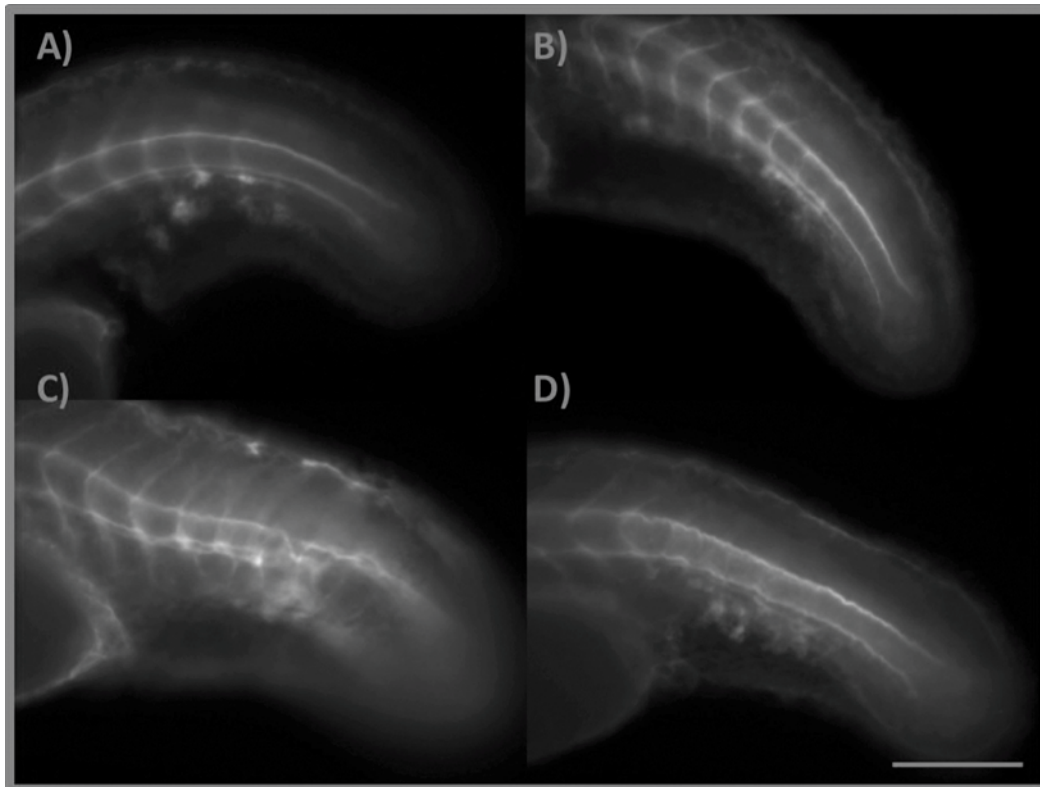


Figura 13. *Expresión de la proteína laminina de la cruce **Scarb2a** heteróciga X **Scarb2a** heteróciga en estadio 1 dpf. A - B: Inmunodetección de la laminina en dos embriones que parecen tener el patrón normal de expresión para la laminina. C - D: Inmunodetección de la laminina en embriones con un defecto severo y leve, respectivamente en la expresión normal de esta proteína de matriz extracelular.*

9.2.5 Discusión del capítulo 2

Con el propósito de corroborar que la vía fenotípica temprana de la formación de la notocorda no está afectada en los mutantes para *scarb2a*, se utilizó el marcador temprano de la notocorda de no tail en embriones de la cruce *scarb2a/ scarb2^{ahi1463}* x *scarb2a/ scarb2^{ahi1463}* en estadio de 10 somitos y 24 hpf para el cual no se observó diferencia en la expresión en embriones WT, MUT y HET.

Como controles se utilizaron a los marcadores para *myoD* y *krox20*, en estos análisis tampoco hubo diferencia entre los embriones WT, MUT y HET.

Otro de los marcadores tardío de notocorda es laminina, previamente se han descrito mutantes para estas proteínas en pez cebra, las cuales muestran un fenotipo similar en la notocorda al que observamos nosotros (vacuolas pequeñas y desarreglo en la membrana basal), debido a esto decidimos analizar a embriones de 1 dpf con anticuerpo que reconoce a las lamininas, y en este caso lo que observamos es un desarreglo en la parte distal de la membrana basal de embriones completos de 1 dpf MUT.

Estos resultados adicionales corroboran que *Scarb2a* participa en la vía fenotípica tardía de la formación de la notocorda ya que en la mutante para *Scarb2a* no hay problemas en la transición del cordamesodermo a notocorda, es decir en esta mutante la notocorda si se forma pero con defectos en el tamaño de las células vacuolas de la notocorda y desarreglos de la membrana basal.

9.3 CAPITULO 3

9.3.1 Discusión adicional

NOTA: Dado que el artículo de este proyecto se publicó en el 2016 se presenta aquí información relacionada al proyecto pero que se publicó después.

El grupo de Michel Bagnat (Garcia et al., 2017) analizó la función de las “caveolas” en la formación de la notocorda, previamente se había demostrado su amplia expresión en las células vacuoladas de la notocorda (Hill et al., 2008; Nixon et al., 2007). Las caveolas son invaginaciones membranales de 50-80 nm delineadas (Parton and del Pozo, 2013; Stoeber et al., 2016) constituidas por Caveolin 1 o Caveolin 3 (Cav1 y Cav3), además de las proteínas Cavin (Hill et al., 2008; Ludwig et al., 2013). Este grupo demostró que las caveolas son esenciales para mantener la integridad de la notocorda, ya que al perderse la función de la caveola las células vacuoladas colapsan en posiciones específicas de la notocorda. En estos sitios afectados se observó la migración de algunas células que recubren la notocorda, también llamada células basales, y que después de internalizarse se diferencian en células vacuoladas.

El estudio del mecanismo de migración hacía el interior de las zonas colapsadas de la notocorda, por parte de células basales fue explorado posteriormente (Lopez-Baez et al., 2018). A esta población de células basales se les dio el nombre de *wound-specific sheat cells* (wt1b), las cuales expresan al factor de transcripción *Wilms Tumor 1b*. Así mismo se encontró que un daño mecánico en la notocorda también provoca la internalización de las células wt1b, las cuales generan una estructura tipo tapón (*stopper-like*), posiblemente para prevenir la pérdida de turgencia en la notocorda y mantener su integridad. Para estudiar a detalle las células wt1b, estas fueron purificadas y separadas por medio de citometría de flujo para analizar la expresión diferencial de sus genes. En estas células se observó un aumento en la expresión de genes de matriz extracelular y de manera significativa de los genes *col2a1a*, *col2a1b*, *col11a2*, *col9a1*, *col9a2* de los cuales el principal componente de la membrana basal es *col2a1a*.

Una de las aportaciones derivada de estos trabajos es que hay una clara interconexión entre las células vacuoladas de la notocorda y las células basales que participan en la formación de la membrana basal. Lo cual nos permite pensar que este mecanismo pudiera funcionar como un mecanismo de protección también en la mutante de *scarb2a* para mantener la estabilidad de la notocorda.

10. CONCLUSIONES

En resumen, este trabajo demuestra que:

- 1.- La falta de expresión de *scarb2a* impide la correcta formación de la notocorda en pez cebra
- 2.- El transcrito de *scarb2a* se expresa en la notocorda del pez cebra en diferentes estadios del desarrollo
- 3.- *Scarb2a* se requiere para el ensamblaje adecuado de la membrana basal de la notocorda en pez cebra

11. LITERATURA CITADA

- Adams, D.S., Keller, R., Koehl, M.A., 1990. The mechanics of notochord elongation, straightening and stiffening in the embryo of *Xenopus laevis*. *Development* 110, 115-130.
- .Amacher, S.L., Kimmel, C.B., 1998. Promoting notochord fate and repressing muscle development in zebrafish axial mesoderm. *Development* 125, 1397-1406.
- Amatruda, J.F., Zon, L.I., 1999. Dissecting hematopoiesis and disease using the zebrafish. *Dev Biol* 216, 1-15.
- Amsterdam, A., Burgess, S., Golling, G., Chen, W., Sun, Z., Townsend, K., Farrington, S., Haldi, M., Hopkins, N., 1999. A large-scale insertional mutagenesis screen in zebrafish. *Genes Dev* 13, 2713-2724.
- Amsterdam, A., Hopkins, N., 2004. Retroviral-mediated insertional mutagenesis in zebrafish. *Methods Cell Biol* 77, 3-20.
- Amsterdam, A., Varshney, G.K., Burgess, S.M., 2011. Retroviral-mediated Insertional Mutagenesis in Zebrafish. *Methods Cell Biol* 104, 59-82.
- Asch, A.S., Liu, I., Briccetti, F.M., Barnwell, J.W., Kwakye-Berko, F., Dokun, A., Goldberger, J., Pernambuco, M., 1993. Analysis of CD36 binding domains: ligand specificity controlled by dephosphorylation of an ectodomain. *Science* 262, 1436-1440.
- Berkovic, S.F., Dibbens, L.M., Oshlack, A., Silver, J.D., Katerelos, M., Vears, D.F., Lullmann-Rauch, R., Blanz, J., Zhang, K.W., Stankovich, J., Kalnins, R.M., Dowling, J.P., Andermann, E., Andermann, F., Faldini, E., D'Hooge, R., Vadlamudi, L., Macdonell, R.A., Hodgson, B.L., Bayly, M.A., Savige, J., Mulley, J.C., Smyth, G.K., Power, D.A., Saftig, P., Bahlo, M., 2008. Array-based gene discovery with three unrelated subjects shows SCARB2/LIMP-2

deficiency causes myoclonus epilepsy and glomerulosclerosis. *Am J Hum Genet* 82, 673-684.

Blanz, J., Groth, J., Zachos, C., Wehling, C., Saftig, P., Schwake, M., 2010. Disease-causing mutations within the lysosomal integral membrane protein type 2 (LIMP-2) reveal the nature of binding to its ligand beta-glucocerebrosidase. *Hum Mol Genet* 19, 563-572.

Chung, A.E., Dong, L.J., Wu, C., Durkin, M.E., 1993. Biological functions of entactin. *Kidney international* 43, 13-19.

Clifton, J.D., Lucumi, E., Myers, M.C., Napper, A., Hama, K., Farber, S.A., Smith, A.B., 3rd, Huryn, D.M., Diamond, S.L., Pack, M., 2010. Identification of novel inhibitors of dietary lipid absorption using zebrafish. *PLoS One* 5, e12386.

Conrad, K.S., Cheng, T.W., Ysselstein, D., Heybrock, S., Hoth, L.R., Chrnyk, B.A., Am Ende, C.W., Krainc, D., Schwake, M., Saftig, P., Liu, S., Qiu, X., Ehlers, M.D., 2017. Lysosomal integral membrane protein-2 as a phospholipid receptor revealed by biophysical and cellular studies. *Nature communications* 8, 1908.

Corallo, D., Trapani, V., Bonaldo, P., 2015. The notochord: structure and functions. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 72, 2989-3008.

Coutinho, P., Parsons, M.J., Thomas, K.A., Hirst, E.M., Saude, L., Campos, I., Williams, P.H., Stemple, D.L., 2004. Differential requirements for COPI transport during vertebrate early development. *Dev Cell* 7, 547-558.

Ellis, K., Bagwell, J., Bagnat, M., 2013. Notochord vacuoles are lysosome-related organelles that function in axis and spine morphogenesis. *J Cell Biol* 200, 667-679.

Engelmann, B., Wiedmann, M.K., 2010. Cellular phospholipid uptake: flexible paths to coregulate the functions of intracellular lipids. *Biochim Biophys Acta* 1801, 609-616.

French, M.M., Smith, S.E., Akanbi, K., Sanford, T., Hecht, J., Farach-Carson, M.C., Carson, D.D., 1999. Expression of the heparan sulfate proteoglycan, perlecan, during mouse embryogenesis and perlecan chondrogenic activity in vitro. *J Cell Biol* 145, 1103-1115.

Fujita, H., Takata, Y., Kono, A., Tanaka, Y., Takahashi, T., Himeno, M., Kato, K., 1992. Isolation and sequencing of a cDNA clone encoding the 85 kDa human lysosomal sialoglycoprotein (hLGP85) in human metastatic pancreas islet tumor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 184, 604-611.

Gamp, A.C., Tanaka, Y., Lullmann-Rauch, R., Wittke, D., D'Hooge, R., De Deyn, P.P., Moser, T., Maier, H., Hartmann, D., Reiss, K., Illert, A.L., von Figura, K., Saftig, P., 2003. LIMP-2/LGP85 deficiency causes ureteric pelvic junction obstruction, deafness and peripheral neuropathy in mice. *Hum Mol Genet* 12, 631-646.

Garcia, J., Bagwell, J., Njaine, B., Norman, J., Levic, D.S., Wopat, S., Miller, S.E., Liu, X., Locasale, J.W., Stainier, D.Y.R., Bagnat, M., 2017. Sheath Cell Invasion and Trans-differentiation Repair Mechanical Damage Caused by Loss of Caveolae in the Zebrafish Notochord. *Curr Biol* 27, 1982-1989 e1983.

Golling, G., Amsterdam, A., Sun, Z., Antonelli, M., Maldonado, E., Chen, W., Burgess, S., Haldi, M., Artzt, K., Farrington, S., Lin, S.Y., Nissen, R.M., Hopkins, N., 2002. Insertional mutagenesis in zebrafish rapidly identifies genes essential for early vertebrate development. *Nat Genet* 31, 135-140.

Gray, R.S., Wilm, T.P., Smith, J., Bagnat, M., Dale, R.M., Topczewski, J., Johnson, S.L., Solnica-Krezel, L., 2014. Loss of col8a1a function during zebrafish embryogenesis results in congenital vertebral malformations. *Dev Biol* 386, 72-85.

Grotmol, S., Kryvi, H., Keynes, R., Krossoy, C., Nordvik, K., Totland, G.K., 2006. Stepwise enforcement of the notochord and its intersection with the myoseptum: an evolutionary path leading to development of the vertebra? *Journal of anatomy* 209, 339-357.

Hafttek, Z., Morvan-Dubois, G., Thisse, B., Thisse, C., Garrone, R., Le Guellec, D., 2003. Sequence and embryonic expression of collagen XVIII NC1 domain (endostatin) in the zebrafish. *Gene Expr Patterns* 3, 351-354.

Handler, M., Yurchenco, P.D., Iozzo, R.V., 1997. Developmental expression of perlecan during murine embryogenesis. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 210, 130-145.

Haramis, A.P., Hurlstone, A., van der Velden, Y., Begthel, H., van den Born, M., Offerhaus, G.J., Clevers, H.C., 2006. Adenomatous polyposis coli-deficient zebrafish are susceptible to digestive tract neoplasia. *EMBO Rep* 7, 444-449.

Harland, R., Gerhart, J., 1997. Formation and function of Spemann's organizer. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13, 611-667.

Has, C., Bruckner-Tuderman, L., 2014. The genetics of skin fragility. *Annual review of genomics and human genetics* 15, 245-268.

Hatta, K., Kimmel, C.B., Ho, R.K., Walker, C., 1991. The cyclops mutation blocks specification of the floor plate of the zebrafish central nervous system. *Nature* 350, 339-341.

Hill, M.M., Bastiani, M., Luetterforst, R., Kirkham, M., Kirkham, A., Nixon, S.J., Walser, P., Abankwa, D., Oorschot, V.M., Martin, S., Hancock, J.F., Parton, R.G., 2008. PTRF-Cavin, a conserved cytoplasmic protein required for caveola formation and function. *Cell* 132, 113-124.

Honing, S., Sandoval, I.V., von Figura, K., 1998. A di-leucine-based motif in the cytoplasmic tail of LIMP-II and tyrosinase mediates selective binding of AP-3. *EMBO J* 17, 1304-1314.

Howe, K., Clark, M.D., Torroja, C.F., Torrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., Collins, J.E., Humphray, S., McLaren, K., Matthews, L., McLaren, S., Sealy, I., Caccamo, M., Churcher, C., Scott, C., Barrett, J.C., Koch, R., Rauch, G.J., White, S., Chow, W., Kilian, B., Quintais, L.T., Guerra-Assuncao, J.A., Zhou, Y., Gu, Y., Yen, J., Vogel, J.H., Eyre, T., Redmond, S., Banerjee, R., Chi, J., Fu, B., Langley, E., Maguire, S.F., Laird, G.K., Lloyd, D., Kenyon, E., Donaldson, S., Sehra, H., Almeida-King, J., Loveland, J., Trevanion, S., Jones, M., Quail, M., Willey, D., Hunt, A., Burton, J., Sims, S., McLay, K., Plumb, B., Davis, J., Clee, C., Oliver, K., Clark, R., Riddle, C., Elliott, D., Threadgold, G., Harden, G., Ware, D., Mortimer, B., Kerry, G., Heath, P., Phillimore, B., Tracey, A., Corby, N., Dunn, M., Johnson, C., Wood, J., Clark, S., Pelan, S., Griffiths, G., Smith, M., Glithero, R., Howden, P., Barker, N., Stevens, C., Harley, J., Holt, K., Panagiotidis, G., Lovell, J., Beasley, H., Henderson, C., Gordon, D., Auger, K., Wright, D., Collins, J., Raisen, C., Dyer, L., Leung, K., Robertson, L., Ambridge, K., Leongamornlert, D., McGuire, S., Gilderthorp, R., Griffiths, C., Manthavadi, D., Nichol, S., Barker, G., Whitehead, S., Kay, M., Brown, J., Murnane, C., Gray, E., Humphries, M., Sycamore, N., Barker, D., Saunders, D., Wallis, J., Babbage, A., Hammond, S., Mashreghi-Mohammadi, M., Barr, L., Martin, S., Wray, P., Ellington, A., Matthews, N., Ellwood, M., Woodmansey, R., Clark, G., Cooper, J., Tromans, A., Grafham, D., Skuce, C., Pandian, R., Andrews, R., Harrison, E., Kimberley, A., Garnett, J., Fosker, N., Hall, R., Garner, P., Kelly, D., Bird, C., Palmer, S., Gehring, I., Berger, A., Dooley, C.M., Ersan-Urun, Z., Eser, C., Geiger, H., Geisler, M., Karotki, L., Kirn, A., Konantz, J., Konantz, M., Oberlander, M., Rudolph-Geiger, S., Teucke, M., Osoegawa, K., Zhu, B., Rapp, A., Widaa, S., Langford, C., Yang, F., Carter, N.P., Harrow, J., Ning, Z., Herrero, J., Searle, S.M., Enright, A., Geisler, R., Plasterk, R.H., Lee, C., Westerfield, M., de Jong, P.J., Zon, L.I., Postlethwait, J.H., Nusslein-Volhard, C., Hubbard, T.J., Crollius, H.R., Rogers, J., Stemple, D.L., 2013. The

zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*.

Hwang, W.Y., Fu, Y., Reyon, D., Maeder, M.L., Tsai, S.Q., Sander, J.D., Peterson, R.T., Yeh, J.R., Joung, J.K., 2013. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nature biotechnology* 31, 227-229.
Kalluri, R., 2003. Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nature reviews. Cancer* 3, 422-433.

Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B., Schilling, T.F., 1995. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 203, 253-310.

Kimura, N., Toyoshima, T., Kojima, T., Shimane, M., 1998. Entactin-2: a new member of basement membrane protein with high homology to entactin/nidogen. *Exp Cell Res* 241, 36-45.

Kishimoto, N., Cao, Y., Park, A., Sun, Z., 2008. Cystic kidney gene seahorse regulates cilia-mediated processes and Wnt pathways. *Dev Cell* 14, 954-961.
Kuronita, T., Eskelinen, E.L., Fujita, H., Saftig, P., Himeno, M., Tanaka, Y., 2002. A role for the lysosomal membrane protein LGP85 in the biogenesis and maintenance of endosomal and lysosomal morphology. *J Cell Sci* 115, 4117-4131.

Lopez-Baez, J.C., Simpson, D.J., L, L.L.F., Zeng, Z., Brunson, H., Salzano, A., Brombin, A., Wyatt, C., Rybski, W., Huitema, L.F.A., Dale, R.M., Kawakami, K., Englert, C., Chandra, T., Schulte-Merker, S., Hastie, N.D., Patton, E.E., 2018. Wilms Tumor 1b defines a wound-specific sheath cell subpopulation associated with notochord repair. *Elife* 7.

Ludwig, A., Howard, G., Mendoza-Topaz, C., Deerinck, T., Mackey, M., Sandin, S., Ellisman, M.H., Nichols, B.J., 2013. Molecular composition and ultrastructure of the caveolar coat complex. *PLoS Biol* 11, e1001640.

Ludwig, M., Palha, N., Torhy, C., Briolat, V., Colucci-Guyon, E., Bremont, M., Herbomel, P., Boudinot, P., Levraud, J.P., 2011. Whole-Body Analysis of a Viral Infection: Vascular Endothelium is a Primary Target of Infectious Hematopoietic Necrosis Virus in Zebrafish Larvae. *PLoS Pathog* 7, e1001269.

MacDonald, B.A., Sund, M., Grant, M.A., Pfaff, K.L., Holthaus, K., Zon, L.I., Kalluri, R., 2006. Zebrafish to humans: evolution of the alpha3-chain of type IV collagen and emergence of the autoimmune epitopes associated with Goodpasture syndrome. *Blood* 107, 1908-1915.

MacInnes, A.W., Amsterdam, A., Whittaker, C.A., Hopkins, N., Lees, J.A., 2008. Loss of p53 synthesis in zebrafish tumors with ribosomal protein gene mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 10408-10413.

Mahmood, F., Fu, S., Cooke, J., Wilson, S.W., Cooper, J.D., Russell, C., 2013. A zebrafish model of CLN2 disease is deficient in tripeptidyl peptidase 1 and displays progressive neurodegeneration accompanied by a reduction in proliferation. *Brain : a journal of neurology* 136, 1488-1507.

Miosge, N., Simniok, T., Sprysch, P., Herken, R., 2003. The collagen type XVIII endostatin domain is co-localized with perlecan in basement membranes in vivo. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 51, 285-296.

Moore, J.L., Rush, L.M., Breneman, C., Mohideen, M.A., Cheng, K.C., 2006. Zebrafish genomic instability mutants and cancer susceptibility. *Genetics* 174, 585-600.

Neculai, D., Schwake, M., Ravichandran, M., Zunke, F., Collins, R.F., Peters, J., Neculai, M., Plumb, J., Loppnau, P., Pizarro, J.C., Seitova, A., Trimble, W.S., Saftig, P., Grinstein, S., Dhe-Paganon, S., 2013. Structure of LIMP-2 provides functional insights with implications for SR-BI and CD36. *Nature* 504, 172-176.

Nixon, S.J., Carter, A., Wegner, J., Ferguson, C., Floetenmeyer, M., Riches, J., Key, B., Westerfield, M., Parton, R.G., 2007. Caveolin-1 is required for lateral line neuromast and notochord development. *J Cell Sci* 120, 2151-2161.

Pagnon-Minot, A., Malbouyres, M., Haftek-Terreau, Z., Kim, H.R., Sasaki, T., Thisse, C., Thisse, B., Ingham, P.W., Ruggiero, F., Le Guellec, D., 2008. Collagen XV, a novel factor in zebrafish notochord differentiation and muscle development. *Dev Biol* 316, 21-35.

Parsons, M.J., Pollard, S.M., Saude, L., Feldman, B., Coutinho, P., Hirst, E.M., Stemple, D.L., 2002. Zebrafish mutants identify an essential role for laminins in notochord formation. *Development* 129, 3137-3146.

Parton, R.G., del Pozo, M.A., 2013. Caveolae as plasma membrane sensors, protectors and organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14, 98-112.

Patton, E.E., Widlund, H.R., Kutok, J.L., Kopani, K.R., Amatruda, J.F., Murphey, R.D., Berghmans, S., Mayhall, E.A., Traver, D., Fletcher, C.D., Aster, J.C., Granter, S.R., Look, A.T., Lee, C., Fisher, D.E., Zon, L.I., 2005. BRAF mutations are sufficient to promote nevi formation and cooperate with p53 in the genesis of melanoma. *Curr Biol* 15, 249-254.

Postel, R., Margadant, C., Fischer, B., Kreft, M., Janssen, H., Secades, P., Zambruno, G., Sonnenberg, A., 2013. Kindlin-1 mutant zebrafish as an in vivo model system to study adhesion mechanisms in the epidermis. *J Invest Dermatol* 133, 2180-2190.

Raposo, G., Marks, M.S., 2007. Melanosomes--dark organelles enlighten endosomal membrane transport. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 786-797.

Reczek, D., Schwake, M., Schroder, J., Hughes, H., Blanz, J., Jin, X., Brondyk, W., Van Patten, S., Edmunds, T., Saftig, P., 2007. LIMP-2 is a receptor for lysosomal mannose-6-phosphate-independent targeting of beta-glucocerebrosidase. *Cell* 131, 770-783.

Rosenbloom, B.E., Weinreb, N.J., 2013. Gaucher disease: a comprehensive review. *Critical reviews in oncogenesis* 18, 163-175.

Saude, L., Woolley, K., Martin, P., Driever, W., Stemple, D.L., 2000. Axis-inducing activities and cell fates of the zebrafish organizer. *Development* 127, 3407-3417.

Schafer, M., Rembold, M., Wittbrodt, J., Scharl, M., Winkler, C., 2005. Medial floor plate formation in zebrafish consists of two phases and requires trunk-derived Midkine-a. *Genes Dev* 19, 897-902.

Schier, A.F., 2001. Axis formation and patterning in zebrafish. *Curr Opin Genet Dev* 11, 393-404.

Schier, A.F., Neuhauss, S.C., Helde, K.A., Talbot, W.S., Driever, W., 1997. The one-eyed pinhead gene functions in mesoderm and endoderm formation in zebrafish and interacts with no tail. *Development* 124, 327-342.

Schroen, B., Leenders, J.J., van Erk, A., Bertrand, A.T., van Loon, M., van Leeuwen, R.E., Kubben, N., Duisters, R.F., Schellings, M.W., Janssen, B.J., Debets, J.J., Schwake, M., Hoydal, M.A., Heymans, S., Saftig, P., Pinto, Y.M., 2007. Lysosomal integral membrane protein 2 is a novel component of the cardiac intercalated disc and vital for load-induced cardiac myocyte hypertrophy. *The Journal of experimental medicine* 204, 1227-1235.

Scott A, S., DL, 2004. Zebrafish Notochord Basement Membrane: Signaling and Structure. *Current Topics in Developmental Biology* 65, 229-253.

Smits, P., Lefebvre, V., 2003. Sox5 and Sox6 are required for notochord extracellular matrix sheath formation, notochord cell survival and development of the nucleus pulposus of intervertebral discs. *Development* 130, 1135-1148.

Spemann, H.a.M., H., 1924. Uber induktion von Embryonalagen durch Impantation Artfremder Organisatoren. *Arch. Entw. Mech.* 100, 599-638.

Stemple, D.L., 2005. Structure and function of the notochord: an essential organ for chordate development. *Development* 132, 2503-2512.

Stoeber, M., Schellenberger, P., Siebert, C.A., Leyrat, C., Helenius, A., Grunewald, K., 2016. Model for the architecture of caveolae based on a flexible, net-like assembly of Cavin1 and Caveolin discs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, E8069-E8078.

Talbot, W.S., Trevarrow, B., Halpern, M.E., Melby, A.E., Farr, G., Postlethwait, J.H., Jowett, T., Kimmel, C.B., Kimelman, D., 1995. A homeobox gene essential for zebrafish notochord development. *Nature* 378, 150-157.

Tunggal, P., Smyth, N., Paulsson, M., Ott, M.C., 2000. Laminins: structure and genetic regulation. *Microscopy research and technique* 51, 214-227.

Vatine, G.D., Zada, D., Lerer-Goldshtein, T., Tovin, A., Malkinson, G., Yaniv, K., Appelbaum, L., 2013. Zebrafish as a model for monocarboxyl transporter 8-deficiency. *J Biol Chem* 288, 169-180.

Vega, M.A., Segui-Real, B., Garcia, J.A., Cales, C., Rodriguez, F., Vanderkerckhove, J., Sandoval, I.V., 1991. Cloning, sequencing, and expression of a cDNA encoding rat LIMP II, a novel 74-kDa lysosomal membrane protein related to the surface adhesion protein CD36. *J Biol Chem* 266, 16818-16824.

Velayati, A., DePaolo, J., Gupta, N., Choi, J.H., Moaven, N., Westbroek, W., Goker-Alpan, O., Goldin, E., Stubblefield, B.K., Kolodny, E., Tayebi, N., Sidransky, E., 2011. A mutation in SCARB2 is a modifier in Gaucher disease. *Human mutation* 32, 1232-1238.

Wong, K., Sidransky, E., Verma, A., Mixon, T., Sandberg, G.D., Wakefield, L.K., Morrison, A., Lwin, A., Colegial, C., Allman, J.M., Schiffmann, R., 2004. Neuropathology provides clues to the pathophysiology of Gaucher disease. *Molecular genetics and metabolism* 82, 192-207.

Yamayoshi, S., Iizuka, S., Yamashita, T., Minagawa, H., Mizuta, K., Okamoto, M., Nishimura, H., Sanjoh, K., Katsushima, N., Itagaki, T., Nagai, Y., Fujii, K., Koike, S., 2012. Human SCARB2-dependent infection by coxsackievirus A7, A14, and A16 and enterovirus 71. *J Virol* 86, 5686-5696.

Yamayoshi, S., Yamashita, Y., Li, J., Hanagata, N., Minowa, T., Takemura, T., Koike, S., 2009. Scavenger receptor B2 is a cellular receptor for enterovirus 71. *Nat Med* 15, 798-801.

Zhu, S., Lee, J.S., Guo, F., Shin, J., Perez-Atayde, A.R., Kutok, J.L., Rodig, S.J., Neuberg, D.S., Helman, D., Feng, H., Stewart, R.A., Wang, W., George, R.E., Kanki, J.P., Look, A.T., 2012. Activated ALK collaborates with MYCN in neuroblastoma pathogenesis. *Cancer Cell* 21, 362-373.

ARTICULO

“Zebrafish *scarb2a* insertional mutant reveals a novel function for the Scarb2/Limp2 receptor in notochord development”.

Diaz-Tellez, A., Zampedri, C., Ramos-Balderas, J.L. Garcia-Hernandez, F and Maldonado, E.

Developmental Dynamics 245, 508-519. (2016)

DOI: 10.1002/dvdy.24383

Zebrafish *scarb2a* Insertional Mutant Reveals a Novel Function for the Scarb2/Limp2 Receptor in Notochord Development

Abigail Diaz-Tellez,¹ Cecilia Zampedri,¹ Jose L. Ramos-Balderas,² Fernando García-Hernández,² and Ernesto Maldonado^{1*}

¹EvoDevo Lab, Unidad de Sistemas Arrecifales, Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Puerto Morelos, Quintana Roo, México

²Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, D.F. México

Background: Scarb2 or Limp2 belong to a subfamily of Scavenger receptors described as lysosomal transmembrane glycosylated receptors, that are mutated in the human syndrome AMRF (action myoclonus-renal failure). The zebrafish insertional mutant *scarb2a*^{hi1463Tg} has notochord defects, the notochord is a defining feature of chordates running along the center of the longitudinal axis and it is essential for forming the spinal column in all vertebrates. **Results:** There are three paralogous *scarb2* genes in zebrafish; *scarb2a*, *scarb2b*, and *scarb2c*. Both Scarb2a and Scarb2b proteins lack the classical di-leucine motif. We found that *scarb2a*^{hi1463Tg} homozygous zebrafish embryos have a null mutation impairing vacuole formation in the notochord and simultaneously disrupting proper formation of the basement membrane resulting in its thickening at the ventral side of the notochord, which may be the cause for the anomalous upward bending observed in the trunk. Through whole-mount in situ hybridization, we detected *scarb2a* mRNA expression in the notochord and in the brain early in development. However, it is puzzling that *scarb2a* notochord mRNA expression is short-lived in the presumptive notochord and precedes the complete differentiation of the notochord. **Conclusions:** This work describes a novel function for the Scarb2 receptor as an essential glycoprotein for notochord development. *Developmental Dynamics* 245:508–519, 2016. © 2016 Wiley Periodicals, Inc.

Key words: *scarb2a*; notochord; vacuole; basement membrane; zebrafish

Submitted 1 March 2015; First Decision 4 December 2015; Accepted 23 December 2015; Published online 6 January 2016

Introduction

Scarb2/Limp2 is a type III glycoprotein belonging to the scavenger receptor protein superfamily. Clustering of scavenger receptors in this superfamily is based on shared functional properties rather than sequence homology, and the name is based on their known wide range of ligands and co-receptors (Canton et al., 2013). Of the eight classes of scavenger receptors, Scarb2 belongs to class B and is highly similar in sequence to CD36 and SR-B1 (Park, 2014). Both Scarb2 and CD36 are membrane glycoprotein receptors with two transmembrane domains at the N- and C-termini. Scarb2 has been described as a lysosomal protein (Lewis et al., 1985) with a role in overall lysosomal maintenance (Barriocanal et al., 1986). The transport of Scarb2a to lysosomes is not dependent on the acquisition of N-linked carbohydrates and does not involve the mannose-6-phosphate mechanism required by other lysosomal proteins (Gonzalez et al., 2014). However, this process is mediated by its interaction with AP-1 and AP-3 (Fujita

et al., 1999). There are many ligands for Scarb2, including the enzyme beta-glucocerebrosidase, which is transported from the endoplasmic reticulum to the lysosomes by means of its association with Scarb2 (Coutinho et al., 2012). Scarb2 is also a regulator of the cardiac intercalated discs in humans (Schroen et al., 2007). The crystal structure of Scarb2 showed a cavity forming a channel that could be used for lipid transport (Neculai et al., 2013)

In humans, mutations in *SCARB2* produce an inherited disease that combines myoclonic epilepsy and glomerulosclerosis; this syndrome is known as action myoclonus-renal failure, or AMRF (Berkovic et al., 2008; Gonzalez et al., 2014). In mutant mice lacking Scarb2, deafness and peripheral demyelinating neuropathy have been described, in addition to a ureteric pelvic junction, and the authors noted that with increasing age, mutant mice were characterized by an altered body shape (a grossly enlarged, ball-like trunk) (Gamp et al., 2003). Even though glomerular lesions have been detected in both humans and mice, the outcome is different: in humans, this leads to collapsing glomerulopathy, whereas in mice, it induces a mild proteinuria (Berkovic et al., 2008). A link between a functional deficiency in Scarb2 and Parkinson disease has been proposed (Michelakakis et al., 2012),

Article is online at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/dvdy.24383/abstract>

© 2016 Wiley Periodicals, Inc.

Grant sponsor: PAPIIT-UNAM; Grant number: IN208512; Grant sponsor: CONACyT; Grant number: 166046.

*Correspondence to: Ernesto Maldonado, EvoDevo Lab, Unidad Académica de Sistemas Arrecifales, Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México, C.P. 77580 Puerto Morelos, Quintana Roo, México. E-mail: ernesto@cmar.unam.mx

but this remains controversial (Gegg et al., 2012; Gonzalez et al., 2014).

In zebrafish, an insertional mutation interrupting the *scarb2a* gene was reported to produce notochord defects in homozygous embryos, which, in combination with an upwardly body curvature, were the most apparent phenotypic characteristic (Golling et al., 2002; Amsterdam and Hopkins, 2004). In light of the current information about *Scarb2*, this is an unexpected finding that requires further confirmation and characterization. The notochord arises from the dorsal organizer in vertebrates and is a defining structure of the chordate phylum. In zebrafish embryos, it is a transient rod-like structure along the middle of the anteroposterior axis, ventral to the neural tube and dorsal to the dorsal aorta. It has the form of a rod filled with large vacuolated cells and is completely surrounded by a tri-laminar basal membrane (Scott and Stemple, 2004).

Notochord development plays an essential role in constructing basic body features; vacuole inflation in notochordal cells is a morphogenetic driving force for the elongation of the anteroposterior axis (Ellis et al., 2013a,b), and later in development, notochord signals are essential for dorsal spine formation (Ellis et al., 2013a; Gray et al., 2014). In this work, we characterized the expression of *scarb2a* in zebrafish, with a specific focus on notochord development. Because we found defects in the formation of vacuoles and the basal membrane, we carried out ultrastructural studies using electron microscopy to obtain a detailed picture of this phenotype in the embryos lacking the expression of the *Scarb2a* membrane glycoprotein receptor.

Results

Retroviral Insertion Disrupts the Expression of *scarb2a*

During a large-scale insertional mutagenesis project in zebrafish (Golling et al., 2002; Amsterdam and Hopkins, 2004), the mutant *scarb2a*^{hi1463Tg} was obtained. *Scarb2a* is a membrane glycoprotein from the CD36/*Scarb2* family of receptors; as with other members of this family, it was predicted that *Scarb2a* is a membrane protein with two transmembrane helices at the N-terminal and C-terminal regions (residues 11–28 and 439–462, respectively) and containing six predicted N-glycosylation sites at the Asn residues at positions 70, 102, 108, 175, 410, and 420 (Fig. 1A). The mutation is induced by a retroviral insertion located in the first intron of the *scarb2a* gene (Fig. 1A) (Golling et al., 2002; Amsterdam and Hopkins, 2004), and this insertion produces specific defects in notochord development (see below). The *scarb2a* gene is located on chromosome 5 [5:63,941,830–63,956,640] of the zebrafish genome (Zv9), and there are three paralogous *scarb2* genes in zebrafish (Fig. 1B). The other *scarb2* genes (both on chromosome 21) were named *scarb2b* [21:939,426–1,004,051] and *scarb2c* [21:1,029,132–1,062,431]. Phylogenetic analysis showed that while the *scarb2c* genes from zebrafish and pufferfish were in the same cluster with other *scarb2* genes from *Xenopus tropicalis*, the opossum and humans, the *scarb2a* and *scarb2b* genes were in a separate cluster, suggesting that *scarb2c* from teleost fishes is more closely related to other vertebrate *scarb* genes that have been studied in detail for their functions as lysosomal proteins (Fig. 1B) (Kuronita et al., 2002).

To show that the insertion in *scarb2a* gene is the cause of the notochord defect phenotype described in this work, we performed the next experiment: First, twenty 5-days postfertilization (dpf) larvae obtained from *scarb2a*^{hi1463Tg} heterozygous parents were

chosen for showing the notochord phenotype, and then DNA and RNA were obtained simultaneously. While DNA was used for genotyping by polymerase chain reaction (PCR) (Amsterdam et al., 2011), RNA was used for *scarb2a* mRNA amplification by reverse transcription-PCR (RT-PCR) (Fig. 1C). Genotyping confirmed that all the embryos showing the notochord defect also carried the *scarb2a* insertion, furthermore we found that these same embryos did not express the *scarb2a* transcript. As a control, we repeated this experiment with twenty 5-dpf wild-type (WT) larvae; we confirmed by genotyping that they do not carry the *scarb2a* retroviral insertion and do express *scarb2* mRNA (Fig. 1C). Genotyping was performed by PCR using three primers (see diagram in Fig. 1D), one on each side flanking the insertion and one located at the insert but directed outward, so products of different size will be amplified by insert-bearing and non-insert-bearing chromosomes. Consequently, we could identify fish homozygous for the insertion (210 bp band only), WT fish amplifying the normal *scarb2a* gene (410 bp band only), and heterozygous fish (both bands). All the phenotypic homozygous fish (mutants) used in this work came from *scarb2a*^{hi1463Tg} heterozygous parents that were selected by PCR genotyping of tail fin biopsies (Fig. 1D) (see the Experimental Procedures section).

Another approach to detect the expression of the *scarb2a* mRNA is in situ hybridization (ISH). At 24 hours postfertilization (hpf), there is a clear signal for *scarb2a* mRNA in the brain and in the posterior part of the notochord (Fig. 1E). Using an antisense probe against *scarb2a* mRNA, we performed ISH in 56 embryos at 24 hpf that were obtained from *scarb2a*^{hi1463Tg} heterozygous parents. Expression of *scarb2a* was detected in only approximately three-quarters of those embryos (44/56); but in one quarter of the embryos (12/56), we did not detect any *scarb2a* signal (Fig. 1E). In a control experiment, 40 WT embryos of the same age all showed *scarb2a*-specific labeling. Because retroviral insertions are transmitted in a Mendelian manner (Amsterdam et al., 2011), we always observed the notochord phenotype in approximately 25% of embryos obtained in a cross from *scarb2a*^{hi1463Tg} heterozygous parents, which is consistent with the proportion of *scarb2a*^{hi1463Tg} embryos not labeled by ISH (approximately 22%) (Fig. 1E).

scarb2a Transcript is Expressed in the Notochord

To study the expression of *scarb2a*, we conducted RT-PCR at multiple developmental stages, which showed that *scarb2a* was maternally expressed and was consistently expressed through development (Fig. 2A). Using a labeled antisense probe specific for *scarb2a*, we carried out ISH in WT embryos at the 6 somite (12 hpf), 26 somite (22 hpf), and prim-12 (28.5 hpf) developmental stages (Fig. 2B–E). At the six somite stage, there was a clear signal of *scarb2a* mRNA in the prechordal plate and the presumptive notochord (Fig. 2B,C). For comparison, we performed ISH with a *shh* (*sonic hedgehog*) probe that was also expressed in the presumptive notochord at the six somites stage (Fig. 2F,G) (Schier et al., 1997). Later, at the 26 somite and prim-12 stages, *scarb2a* expression became restricted to brain structures and the most posterior region of the notochord (Fig. 2D,E), whereas *shh* was still expressed at the same developmental stages but throughout the notochord (Fig. 2H,I). The marker *α-collagen-II* is also expressed in the notochord at 24 hpf (Schafer et al., 2005); when comparing its expression with *scarb2a* labeling, we noticed that both were similarly expressed in the posterior notochord (Fig. 2J–M), but *α-collagen-II* expression is not restricted to posterior notochord as *scarb2a* is.

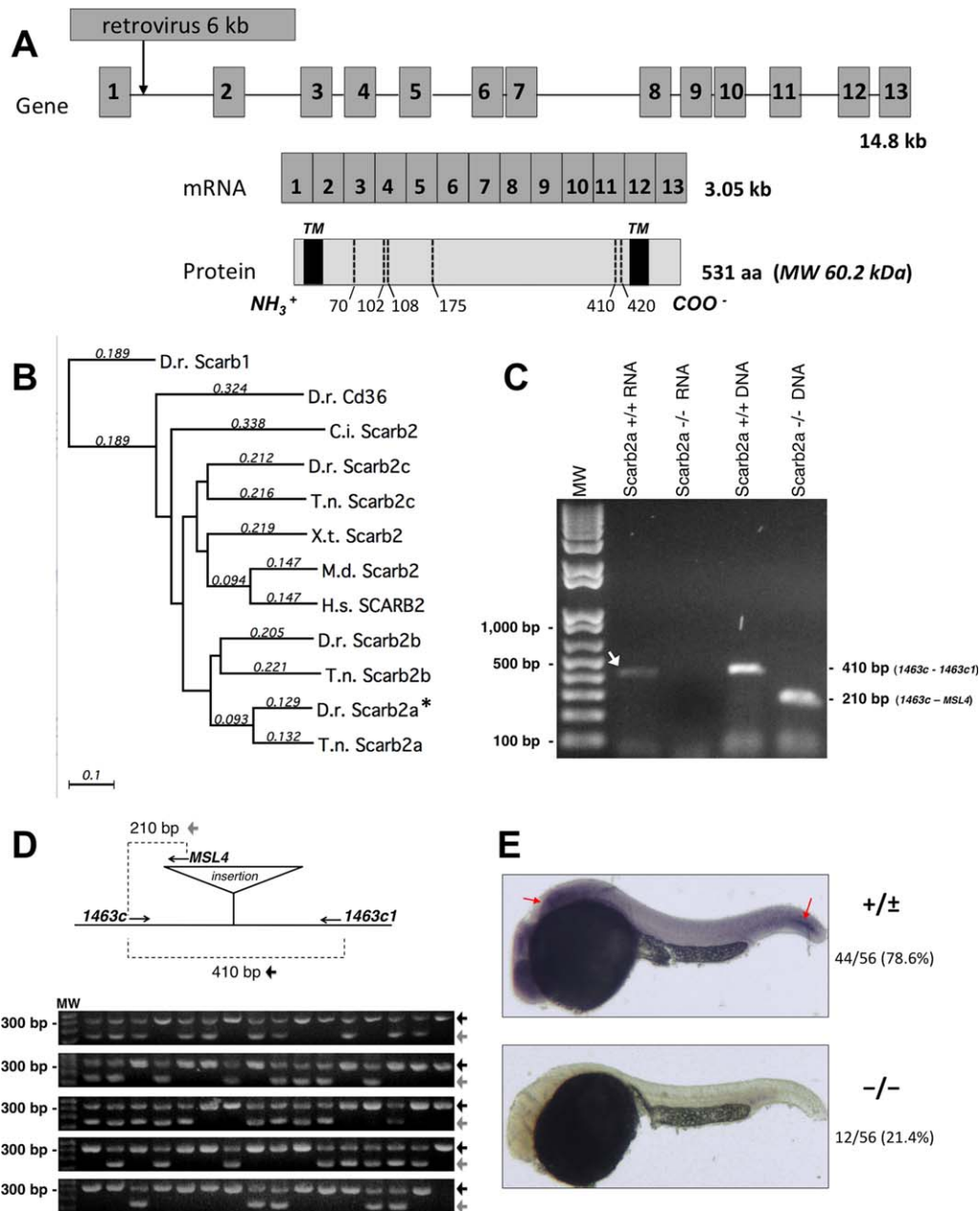


Fig. 1. The retroviral insertion in the *scarb2a* gene from zebrafish. **A:** Diagram of the *scarb2a* exon-intron structure and the location of the retroviral insertion at the first intron. Scarb2a protein is represented by a box in which the predicted positions of the two transmembrane domains (TM) and the predicted Asn residues for N-glycosylation sites are indicated by dotted lines. **B:** Phylogenetic tree using the zebrafish Scarb1 and CD36 sequences as an outgroup. The tree was built with MacVector 12.0 using "Neighbor joining" as the tree-building method in the Best tree mode with uncorrected "p" distance with the gaps distributed proportionally. Numbers above lines indicate substitutions per site. D.r. (*Danio rerio* "zebrafish"), C.i. (*Ciona intestinalis*), T.n. (*Tetraodon nigroviridis* "pufferfish"), X.t. (*Xenopus tropicalis*), M.d. (*Monodelphis domestica* "opossum") and H.s. (*Homo sapiens*). **C:** Simultaneous DNA and total RNA purification from 20 phenotypic *scarb2a*^{hi1463Tg} mutant embryos allowed us to determine that all tested embryos carried the mutagenic insertion in the *scarb2a* gene and at the same time were null for *scarb2a* because they could not express *scarb2a* mRNA. This was performed by genotyping by PCR and by RT-PCR amplification, respectively. **D:** Genotyping was conducted using three primers, two flanking the insertion (1463c and 1463c1) and one at the retroviral insertion site (MSL4) but oriented toward the 5'-end primer. Approximately 80 adults raised from an outcross were fin clipped and genotyped, and then only the identified carriers (approximately 50%) were used to obtain homozygous *scarb2a*^{hi1463Tg} embryos. **E:** Whole-mount in situ hybridization to detect the expression of *scarb2a* mRNA in 24 hpf embryos. *scarb2a* mRNA was not detected in approximately 1/4 of the embryos. In the other 3/4 of the embryos, the *scarb2a* RNA antisense probe was detected in the brain and the posterior notochord (see red arrows).

At this point, we decided to determine the exact developmental time point at which *scarb2a* expression became restricted to the posterior notochord. To that end, we conducted *scarb2a* ISH in WT embryos fixed approximately every 2 hr in consecutive devel-

opmental stages: 10 somites (14 hpf), 14 somites (16 hpf), 18 somites (18 hpf), 21 somites (19.5 hpf), and 29 somites (24 hpf) (Fig. 2N–R). These were later flat-mounted to facilitate observation of the notochord labeling. We found that *scarb2a* expression

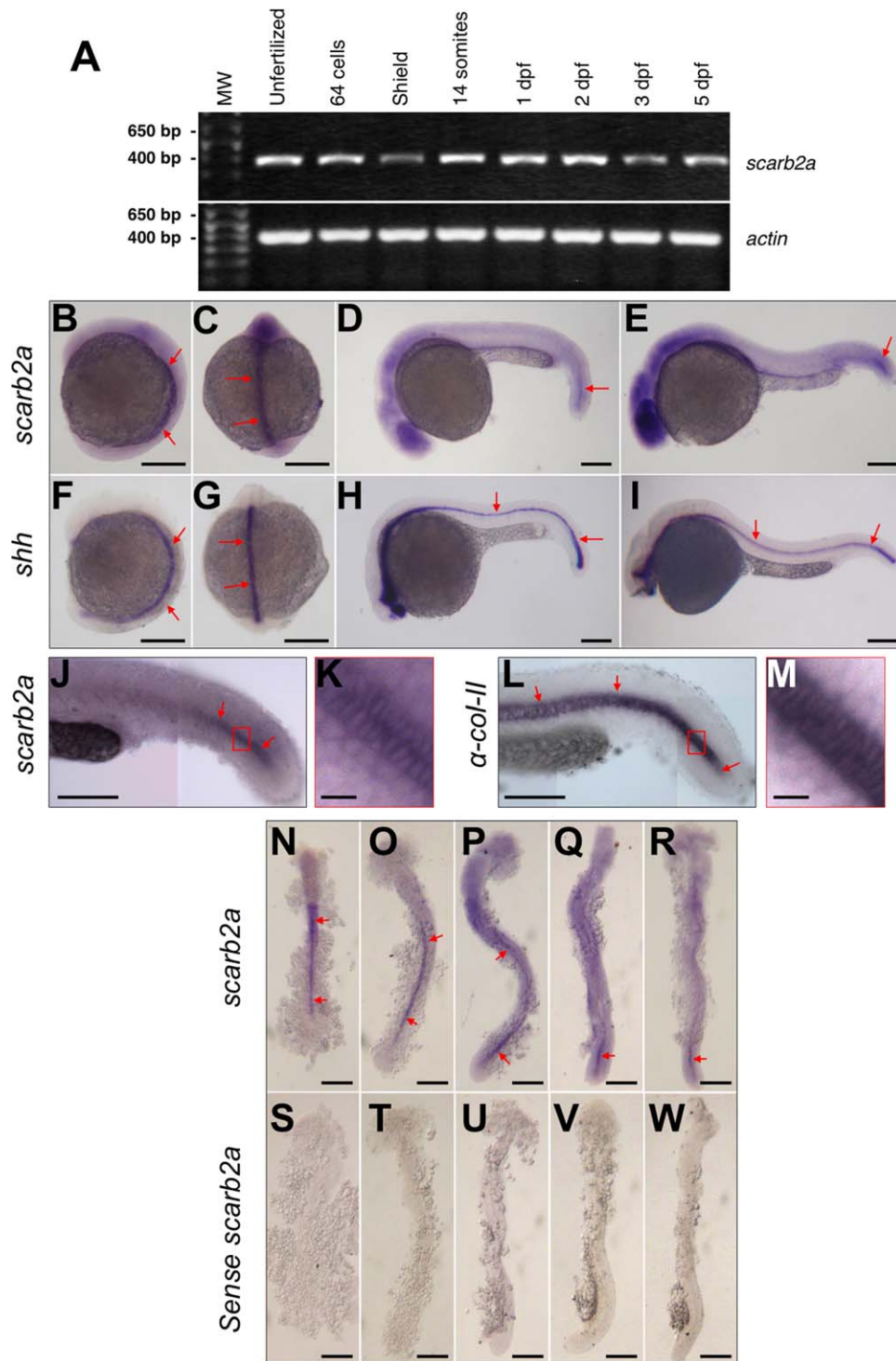


Fig. 2. *scarb2a* mRNA expression. **A:** *scarb2a* RT-PCR from cDNA prepared from unfertilized eggs and different developmental stages; 64 cells, shield, 14 somites, 1, 2, 3 and 5 dpf. Actin-beta1 was also amplified from the same samples as a positive control of expression. **B-E:** ISH expression, in WT embryos, of *scarb2a* at the 6 somite (side and dorsal view), 26 somite and prim-12 developmental stages (side views). **F-I:** For comparison, *shh* was also used for ISH labeling of the notochord at the same developmental stages. **J-M:** Side views of the posterior trunk comparing *scarb2a* and α -collagen-II expression in the notochord. **K:** Magnified view (20X) of the region indicated by the red box in (J). **M:** Magnified view (20X) of the red box in (L). Photographs in (J) and (K) are composite images. **N-R:** Embryos labeled by *scarb2a* ISH and then flat mounted for detailed observation of notochord expression at the 10 somite, 14 somite, 18 somite, 21 somite and 24 hpf developmental stages. **S-W:** As a control, ISH was performed with the *scarb2a* sense probe at the same developmental stages. Red arrows indicate expression of the tested probes in the notochord. Scale bars = 250 μ m, except those in panels **K** and **M**, which represent 25 μ m in length.

became restricted to the posterior notochord between 18 somites (18 hpf) and 21 somites (19.5 hpf) (Fig. 2P,Q). As a control, the sense *scarb2a* mRNA probe was also tested; it showed no specific notochord signal (Fig. 2S–W).

Lack of *scarb2a* Expression Prevents Correct Notochord Formation

The *scarb2a*^{hi1463Tg} mutation is lethal, and *scarb2a*^{hi1463Tg} homozygous larvae do not survive beyond 7–8 dpf, at early developmental stages homozygous *scarb2a*^{hi1463Tg} embryos could not be distinguished from wild-type embryos and it is not until 1 dpf that we observed clear defects in the shape of the brain plus hypopigmentation; however, by 2 to 3 dpf, those two defects completely disappear. Brain and pigmentation defects are not part of this work, which is focused on the specific notochord phenotype. At 24 hpf, upon closer examination using DIC (differential interference contrast) illumination microscopy, it was possible to distinguish notochord defects in homozygous embryos from a *scarb2a*^{hi1463Tg} heterozygous cross, we observed that notochord vacuoles do not reach their proper size and lack the normal “stack of coins” appearance (Fig. 3A–F). It was confirmed by electron microscopy that notochord vacuoles are indeed not forming correctly in 3 dpf homozygous mutants when compared with WT larvae of the same age (Fig. 3N,O). Another possibly related defect is that after 3 dpf, the trunk of homozygous *scarb2a*^{hi1463Tg} mutants became increasingly curved upward (Fig. 3J,K), impairing proper swimming. Both notochord and trunk shape defects were found to be rescued by micro-injection of in vitro transcribed capped *scarb2a*-mRNA.

Sixty embryos were microinjected with 250 pg of *scarb2a* mRNA, and 20 of them, randomly selected, were analyzed in detail by DIC microscopy, at 1 dpf. We observed normal-sized vacuoles in all of them, even those revealed as homozygous for the *scarb2a*^{hi1463Tg} insertion by genotyping, like the one shown in Fig. 3G–I. In contrast, non-microinjected embryos from a *scarb2a*^{hi1463Tg} heterozygous cross showed the notochord defect in all homozygous embryos but not in heterozygous or WT siblings (Fig. 3A–F). At 5 dpf, the notorious *scarb2a*^{hi1463Tg} upward trunk was observed in approximately 23% of the non-microinjected embryos (Fig. 3J,K), while in embryos microinjected with *scarb2a* mRNA, the upward bended trunk was only visible in 7.7% of the larvae at this stage, and it did not become as severe as in the non-microinjected fish. These experiments were repeated once, and similar results were obtained. These observations suggest that endogenous expression of *scarb2a* mRNA is somehow related to the formation of the notochord and the trunk.

Scarb2a Is Required for Proper Assembly of the Notochordal Basement Membrane

In several zebrafish mutants with notochord defects, it has been observed that the basement membrane, surrounding the notochord, is not properly assembled (Haftek et al., 2003; Scott and Stemple, 2004; Pagnon-Minot et al., 2008; Gray et al., 2014); therefore, we used electron microscopy to perform a detailed analysis of the basement membrane from *scarb2a*^{hi1463Tg} mutant embryos at 30 hpf and 3 dpf. The basal membrane of the notochord is a tri-laminar extracellular sheet containing inner, medial and outer layers. It contains laminin in the inner layer, collagen in the medial layer, and collagen and elastin in the outer layer (Scott and Stemple, 2004; Grotmol et al., 2006). Transverse cross-sections were made just at the end of the yolk extension (close to somite 16) for all the embryos analyzed.

The identity of homozygous *scarb2a*^{hi1463Tg} embryos at the 30 hpf stage was confirmed by genotyping (see the Experimental Procedures section).

The notochordal basement membrane was analyzed at the dorsal and ventral sides of the notochord, and we detected some differences between WT and *scarb2a*^{hi1463Tg} homozygous embryos at the 30 hpf stage of development. In mutant embryos at 30 hpf, the inner layer is much wider with a wavy appearance on both the dorsal and ventral sides of the notochord (Fig. 4A–D). At the same time, collagen filaments were not properly assembled in the mutant basement membrane medial layer; instead, we observed much shorter filaments and electron-dense particles (Fig. 4B,D). Both phenotypic characteristics were not seen at 3 dpf (Fig. 5). Analyzing the dorsal and ventral notochordal basement membranes from WT and *scarb2a*^{hi1463Tg} homozygous 3 dpf larvae, we found two important differences: First, the inner layer contained swollen vesicles or blisters that protruded toward the medial layer and could be as large as 1.5 μm in diameter (Fig. 5G,H). These swollen vesicles are similar to blisters formed at the epidermal basement membrane in patients with epidermolysis bullosa (Has and Bruckner-Tuderman, 2014). These unusual vesicles are also similar to blisters observed at the epidermis, in the Kindlin-1 zebrafish mutant (Postel et al., 2013).

Second, in the medial layer of the basement membrane, we detected that the interior half (in contact with the inner layer) lacked collagen filaments, while most of the outer half seemed to have a normal arrangement of collagen filaments. Under normal conditions, these filaments cover the entire medial layer (Fig. 5A,B). In some sections from the mutant embryos, the collagen fibers of the medial layer did not have the correct assembly orientation, instead they appear as ordered spots rather than long ordered fibers, as they should look in fibers a transverse cross-section (Fig. 5D,C), a characteristic never observed in any of the wild-type embryos sampled. We believe that the phenotypic characteristics observed at 30 hpf in the *scarb2a*^{hi1463Tg} mutant embryos (thickened inner layer and defective assembly of collagen filaments) somehow produced the defects observed at 3 dpf in mutant larvae (blisters in the inner layer and the interior half of the medial layer empty of collagen filaments). An additional feature observed in both 30 hpf embryos and 3 dpf larvae is that the outer layer is less dense or more diffuse in *scarb2a*^{hi1463Tg} mutants than in WT fish.

In our analysis, we noticed that the overall thickness of the basal membrane was increased in the *scarb2a*^{hi1463Tg} mutant notochord (Figs. 4 and 5), but detailed measurements from several images revealed a surprising finding: the basement membrane at the ventral side of the notochord (but not the dorsal side) showed a significant increase in thickness, from 1.8-fold at 30 hpf to 2.7-fold increase in 3-dpf *scarb2a*^{hi1463Tg} mutants (Fig. 6). In contrast, to the dorsal notochord showing no significant difference, at 30 hpf, in the basement membrane width between WT and *scarb2a*^{hi1463Tg} homozygous embryos, and only a slight thickening by 3 dpf (1.2-fold) in mutant larvae compared with WT larvae (Fig. 6). The presence of blisters at the inner layer and the fact that the bottom half of the medial layer lacked most of the collagen filaments may be related to the increased thickness of the basement membrane on the ventral side (Fig. 5).

Discussion

We identified that the phenotype resulting from the insertional zebrafish mutant *scarb2a*^{hi1463Tg} includes the disruption of

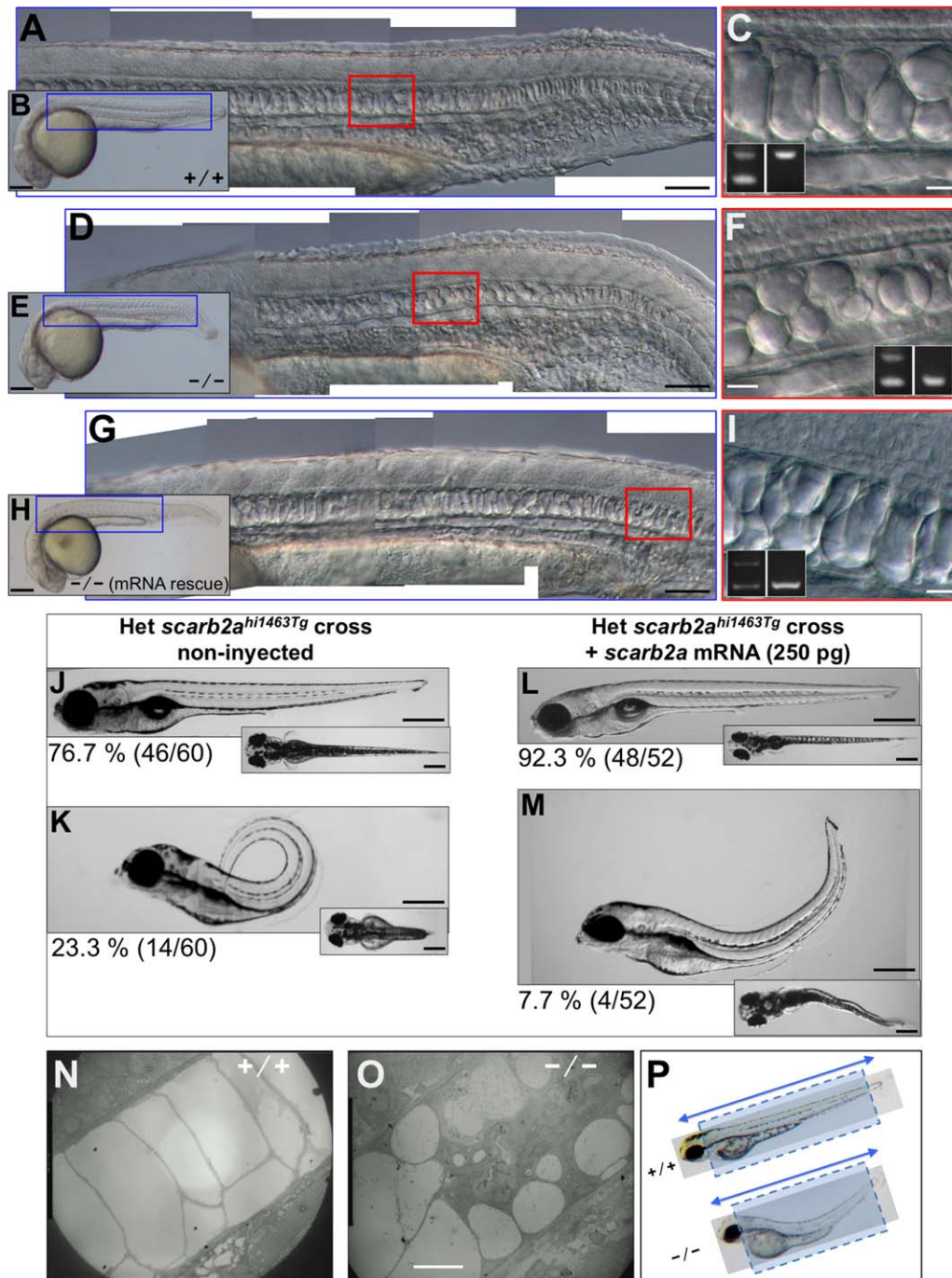


Fig. 3. *scarb2a* mutant notochord and trunk defects. All embryos and larvae were obtained from *scarb2a*^{hi1463Tg} heterozygous parents. **A-C, J, L, N:** Images from nonphenotypic (noncarrier) zebrafish embryos and larvae. **D-I, K, M, O:** Embryos or larvae homozygous for the *scarb2a*^{hi1463Tg} mutagenic insertion. **A, D, G:** DIC microscopy images, composites of several photos obtained at 10X, corresponding to regions indicated in the blue boxes of low-magnification photos (**B, E, H**), respectively, but zoomed 5 times larger, allowing the observation of notochord characteristics in detail. **C, F, I:** The regions in red boxes in (**A, D, G**), respectively, zoomed 4 times larger to see the shape of notochord vacuoles; these images were obtained at 20X. Insets show the genotyping analysis demonstrating that the images in (**A-C**) were from a noncarrier embryo, images in (**D-F**) correspond to an homozygous mutant embryo, and the images in (**G-I**) were also from a homozygous embryo that does not show the small vacuole phenotype due to the micro-injection of *scarb2a* mRNA. **A, D, G** and **C, F, I:** Embryos at 1 dpf obtained with 10X and 20X objectives, respectively, using DIC microscopy. **J-M:** Rescue experiment showing 5 dpf non-microinjected larvae to the left and microinjected larvae to the right, in side views. Insets show the same larvae in dorsal views. While 23.3% of non-microinjected larvae from a *scarb2a*^{hi1463Tg} heterozygous cross show the trunk upward-bending defect (phenotype), only 7.7% of the *scarb2a* mRNA microinjected larvae show the same defect, and it is less severe. The number in parentheses is the proportion of phenotypic larvae with respect to total larvae in the experiment. **N, O, P:** Electron Microscopy of WT and *scarb2a*^{hi1463Tg} homozygous 3 dpf larvae. Longitudinal sections (dotted boxes) were obtained from sections made in the direction of the double arrowed line. **A-M:** These fish were genotyped as described in the Experimental procedures section. Scale bars = 250 μ m in (**B, E, H, J-M**) 100 μ m in (**A, D, G**) 20 μ m in (**C, F, I, N, O**) respectively.

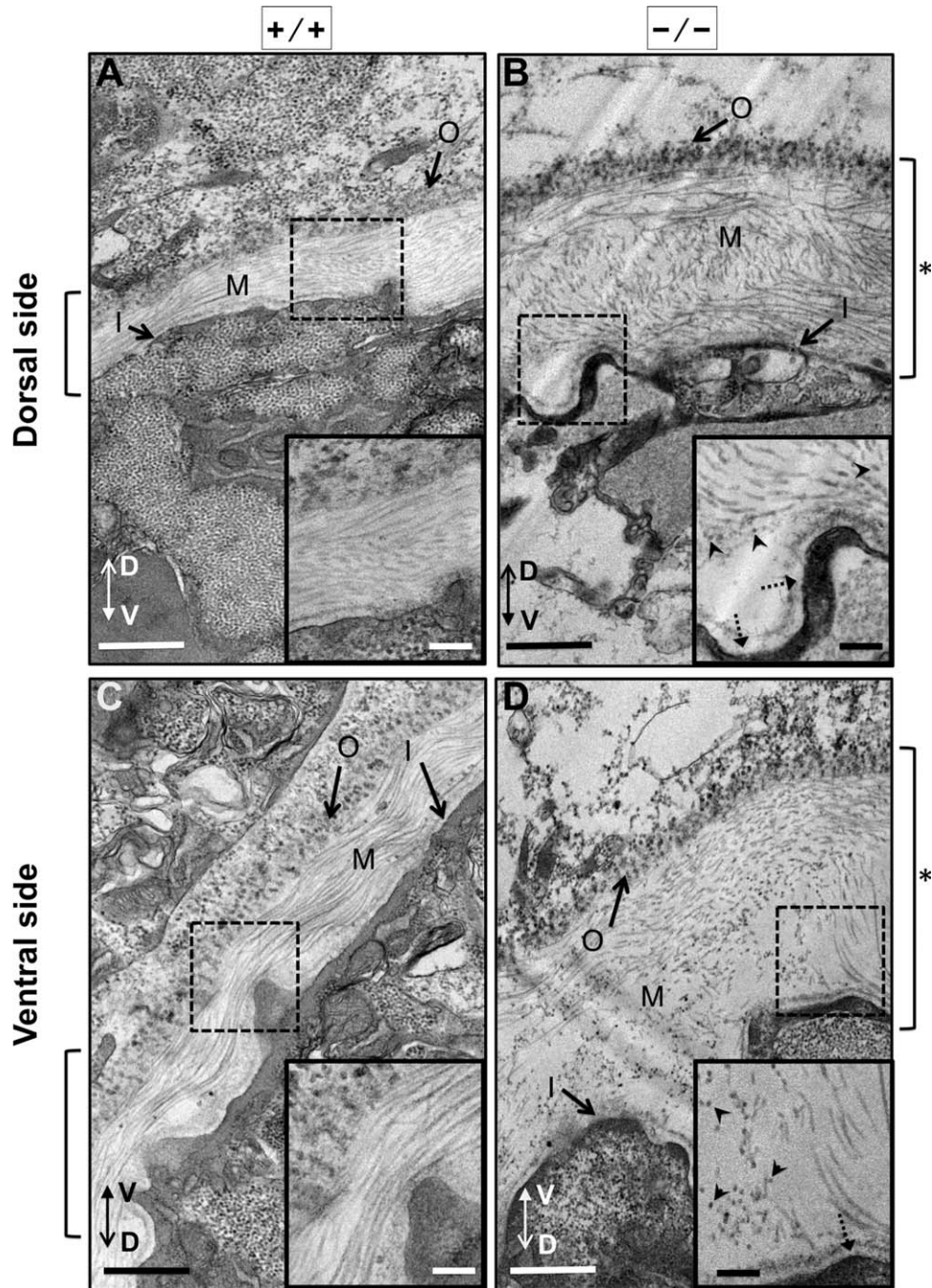


Fig. 4. Electron microscopy analysis of the notochordal basement membrane from 30 hpf *scarb2a* mutants. All images shown are transverse cross-sections close to somit 16 of 30 dpf zebrafish embryos. In this figure, images were arranged so the outer layer of the basal membrane was oriented toward the top or top-left corner regardless of the embryo orientation. The dorso-ventral axis of the larvae is indicated by a double arrow. **A,C:** WT zebrafish embryos prepared for electron microscopy. **B,D:** Mutant embryos *scarb2a*^{hi1463Tg} also prepared for electron microscopy. **A,B:** Images of the basal membrane at the dorsal side of the notochord. **C,D:** Images of the basal membrane at the ventral side of the notochord. All mutant embryos were genotyped first to ensure that they were *scarb2a*^{hi1463Tg} homozygous embryos (see Experimental procedures). All images are shown at 5,000X magnification. Square brackets to the sides of each figure indicate basal membrane thickness, which was wider in the mutants (see asterisks). The insets show higher magnifications (10,000X) of selected regions (dotted boxes). Arrowheads point to electron-dense particles observed in the medial basal membrane in *scarb2a*^{hi1463Tg} homozygous embryos, and dotted arrows point to thickened inner basal lamina in mutant embryos. Outer basal membrane (O), medial basal membrane (M) and inner basal membrane (I). Scale bars = 500 nm.

notochord formation and trunk development. There are two other phenotypes in this mutant, affecting pigmentation and brain formation, but both phenotypes fully recover by 3 dpf and are mentioned only briefly here because they are beyond the scope of this

work. The retroviral insertion was mapped in a previous work to the first intron of *scarb2a* (Golling et al., 2002; Amsterdam et al., 2004); here, using RT-PCR and in situ hybridization, we show that embryos carrying the insertion at the *scarb2a* gene and

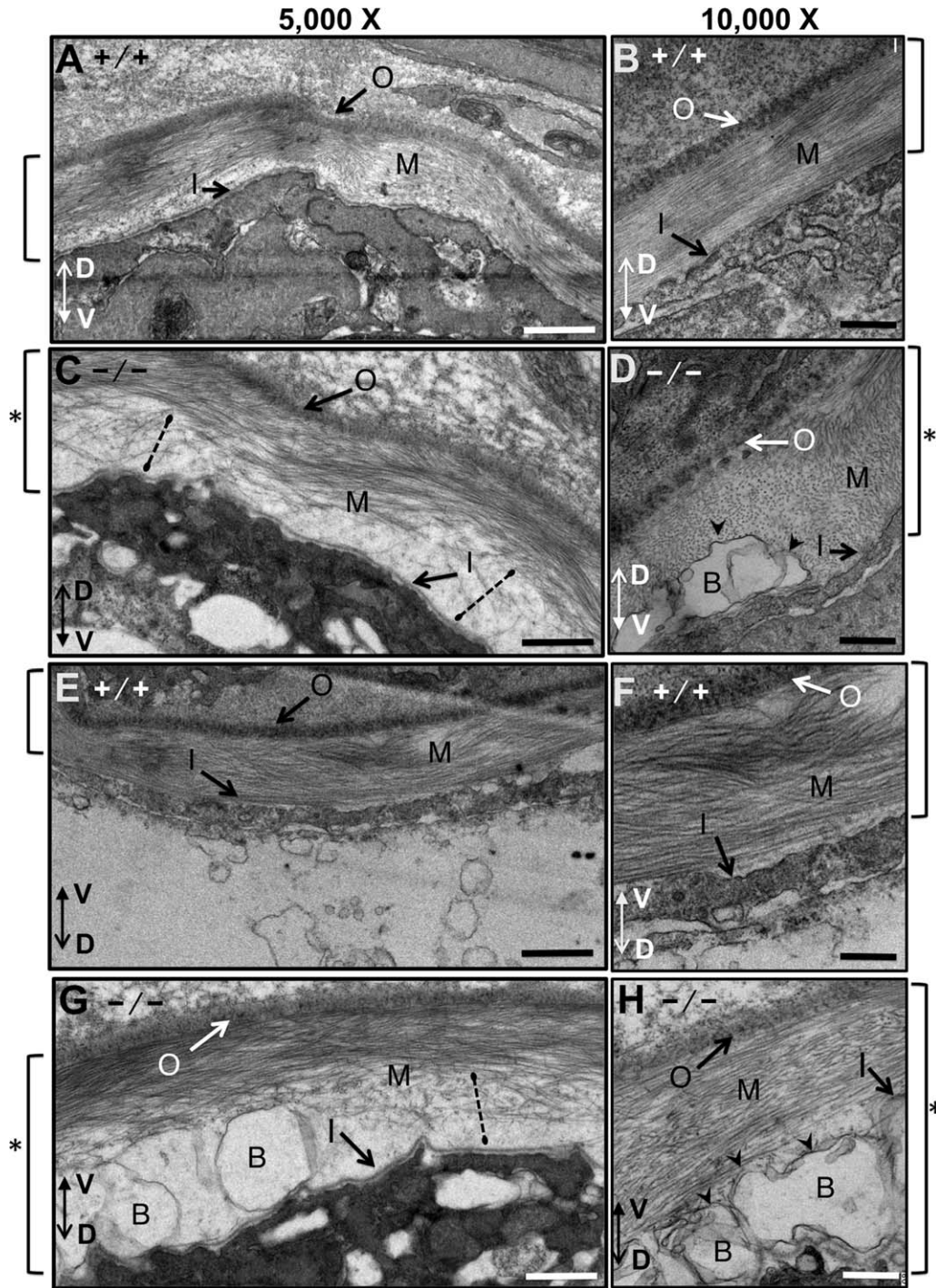


Fig. 5. Notochordal basement membrane in WT and mutant zebrafish embryos at 3 dpf analyzed by electron microscopy. All images are transverse cross-sections from near somite 16. For this figure, images were oriented so the outer layer of the basal membrane is at the top, and the dorso-ventral axis of the larvae is indicated by a double arrow. **A-D:** Views of the basal membrane on the dorsal side of the notochord. **E-H:** Views of the basal membrane on the ventral side of the notochord. **A,B,E,F:** Wild-type embryos. **C,D,G,H:** *scarb2a*^{hi1463Tg} mutant zebrafish embryos at 3 dpf. Images were obtained at either 5,000X or 10,000X. Square brackets to the sides of each figure indicate the thickness of the basement membrane, which was thicker in the mutants (see asterisks). Dotted lines in sections from mutant embryos show regions where collagen appears to be not properly assembled. Blisters (arrowheads) appear in mutant basal membranes just above the basal lamina of the inner layer. Outer basal membrane (O), medial basal membrane (M), inner basal membrane (I) and blisters (B). Scale bars = 500 nm.

expressing the mutant phenotype do not express *scarb2a* mRNA. In zebrafish, it is not unusual that a retroviral insertion that lands in an intron completely blocks mRNA expression (Amsterdam et al., 2011). In addition, microinjection of in vitro transcribed

scarb2a mRNA rescued the notochord phenotypic defects, reducing the proportion of embryos showing the mutant phenotype from 23.3% to 7.7% and reducing the severity of the trunk deformation.

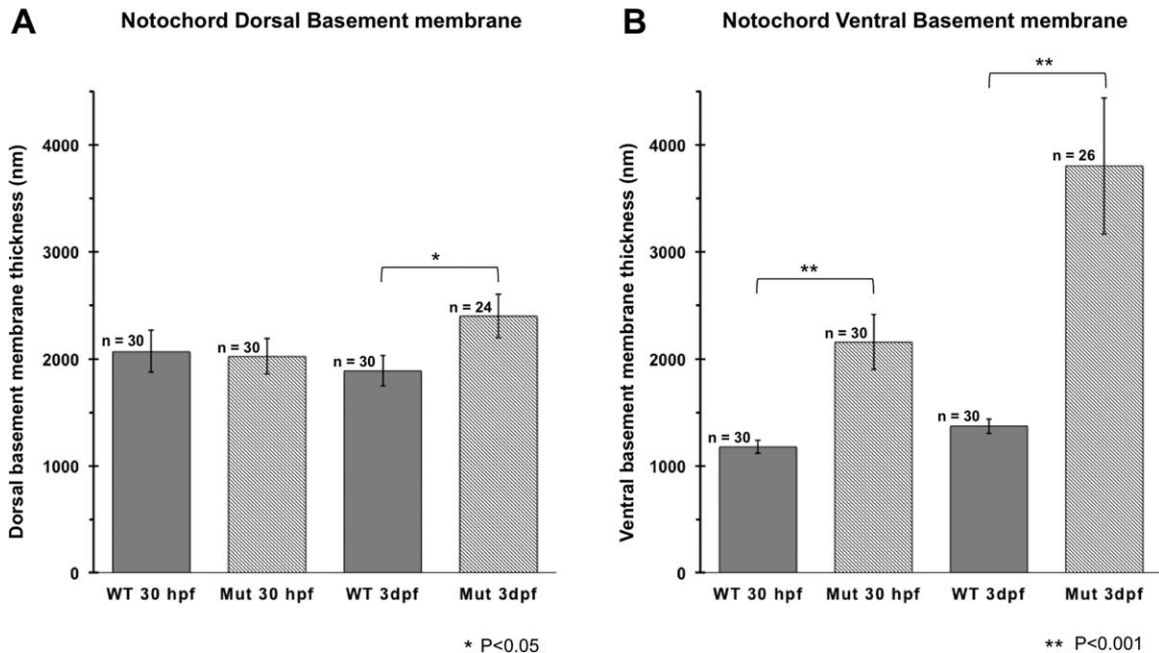


Fig. 6. Comparison of dorsal and ventral notochordal basement membrane thickness in WT and mutant zebrafish. **A:** Histogram showing the thickness of the dorsal basement membrane at 30 hpf and 3 dpf in WT and *scarb2a*^{hi1463Tg} homozygous zebrafish. **B:** Histogram of the values of ventral basement membrane thickness comparing WT vs. *scarb2a*^{hi1463Tg} homozygotes in both; 30 hpf embryos and 3 dpf larvae. Error bars were calculated as the *standard error of the mean*, and the calculated *P*-value between WT and the *scarb2a*^{hi1463Tg} mutant at 3 dpf at the dorsal basement membrane was 0.038 ($P < 0.05$). The *P*-values for the ventral basement membrane thickness between the WT and the *scarb2a*^{hi1463Tg} mutant were 0.0004 ($P < 0.001$) at 30 hpf and 0.00015 ($P < 0.001$) at 3 dpf. The dorsal basement membrane showed no significant difference in thickness ($P > 0.05$) between the WT and the *scarb2a*^{hi1463Tg} mutant at 30 hpf.

We also found that *scarb2a* mRNA is expressed in the presumptive notochord, beginning at early developmental stages (6 somites), suggesting that it plays a still unknown role in notochord differentiation. Importantly, it is also expressed in the prechordal plate. The *scarb2a* transcript remains expressed in the notochord; however, at the 18 to 21 somite stages (18 to 19 hpf), expression is turned off in most of the notochord, remaining expressed only in posterior regions of the notochord by the Prim-12 stage. It is interesting that this expression pattern strongly resembles that reported for collagen gene *col15a1* (Pagnon-Minot et al., 2008), which is also expressed in the whole zebrafish notochord before 15 hpf, but after that developmental stage, *col15a1* notochordal expression is lost except at the posterior region of the notochord. It is a novel finding that Scarb2 glycoprotein has a function in notochord development and because the notochord is essential for further dorsal spine formation, it may explain why *Scarb2* knockout mice have an abnormal trunk shape that is similar to “congenital scoliosis” (Gamp et al., 2003). Interestingly, the *scarb2a*^{hi1463Tg} mutant larvae also have a misshapen trunk, most likely as a consequence of the notochord developmental defects.

Because we observed that notochord vacuoles are not fully formed in the *scarb2a*^{hi1463Tg} homozygous embryos, it is possible that Scarb2a may be involved in vacuole formation. It is known that notochord vacuole inflation is required as a morphogenetic force for body axis elongation (Ellis et al., 2013a). In mammals, the *scarb2* gene codes for a glycoprotein located at the lysosomal membrane (Reczek et al., 2007), and it has been found that over-expression of *scarb2a* in COS cells induce endosomal/lysosomal enlargement, leading us to the hypothesis that Scarb2a induces the fusion of intracellular vesicles. Notochordal vacuoles have been proposed to be a type of lysosome-related organelle (LRO) (Ellis et al., 2013a). If Scarb2a from zebrafish is indeed an

LRO protein from the notochordal vacuoles and its function is vacuole-vacuole fusion, this would explain why vacuoles do not reach their proper size in the *scarb2a*^{hi1463Tg} mutants.

However, Scarb2a is a glycoprotein, and no glycosaminoglycans have been detected inside notochordal vacuoles (Ellis et al., 2013a). Furthermore, mammalian Scarb2 has a C-terminal di-leucine motif (D/EXXXLL/I) that is essential for lysosomal localization (Honing et al., 1998), and in fact many other proteins use the di-leucine motif as a sorting signal to travel to lysosomes or specific LROs (Raposo et al., 2007). However, of the three Scarb2 proteins in zebrafish, only Scarb2c has a di-leucine motif (data not shown). Because Scarb2a does not possess a di-leucine motif, we lack an explanation for how Scarb2a could be transferred to the notochordal vacuole, and therefore, seems unlikely that Scarb2a participates in vacuole formation. It is known that the fragmentation of vacuoles in the notochord can induce a shorter body axis but not a body curvature (Ellis et al., 2013a), as it has been observed in other zebrafish notochord mutants (Pagnon-Minot et al., 2008). Because *scarb2a*^{hi1463Tg} mutant larvae show a marked body curvature, notochord defects other than vacuole fragmentation may be present.

Several zebrafish mutants in laminin and collagen genes (*laminin* $\alpha 1$ -chain, *laminin* $\beta 1$ -chain, *laminin* $\gamma 1$ -chain, *col15a1*, and *col8a1a*) (Haftek et al., 2003; Scott and Stemple, 2004; Pagnon-Minot et al., 2008; Gray et al., 2014) have defects in notochordal development because these are proteins located in the basement membrane surrounding the notochord. Therefore, an alternative hypothesis is that Scarb2a has a function in basement membrane assembly. Upon performing ultra-structural analysis in the notochordal basement membrane in the *scarb2a*^{hi1463Tg} mutant embryos, we found several specific defects: First, at 30 hpf, the

inner layer (identified as an electron-dense thin basal lamina) was thickened in the mutant embryos; later (at 3 dpf), blisters appeared at this inner layer. Second, collagen filaments did not assemble properly at 30 hpf; later, at 3 dpf, the bottom half of the medial layer (just above the inner layer) apparently lacked assembled filaments of collagen, in contrast with the exterior half, which contained well-formed collagen filaments. *Scarb2* proteins are homologous to CD36 membrane proteins, which have multiple ligands. Of interest, one of the reported ligands for CD36 is collagen (Asch et al., 1993); therefore, it is possible the *Scarb2a* may interact with collagen, one of the main structural proteins in the basal membrane, and participate in collagen assembly. *Scarb2* is considered mainly a lysosomal protein (genecards.org), but it has also been found associated with N-cadherin (Schroen et al., 2007); because N-cadherin is a cytoplasmic membrane protein, *Scarb2a* may also be located at the cytoplasmic membrane.

The notochord is a mechanical structure required for locomotion; it is a stiff rod but is flexible enough to allow bending of the trunk to both sides, induced by muscle contractions, to lead to swimming. It has been proposed that bending downward is prevented by the rigid floor plate adjacent to the dorsal notochord, while bending upward is restricted by the hypochord, which is located adjoining to the ventral notochord and over the dorsal aorta (Stemple, 2005). For example, mutations in the *ope/tdgf1* and *cyc/ndr2* genes that induce floor-plate loss also produce embryos with a severe downward curvature of the trunk (Hatta et al., 1991; Schier et al., 1997). Unexpectedly, we found that the basement membrane on the ventral side of the notochord in *scarb2a^{hi1463Tg}* mutants was severely affected, thickened much more than the basement membrane on the dorsal side. Because the ventral basement membrane of the notochord is in direct contact with the hypochord, the thickening of this defective basement membrane may displace the hypochord from its proper place or otherwise affect its function, consequently inducing the severe upward bending of the trunk that we observed in *scarb2a^{hi1463Tg}* mutant larvae.

By reporting that *Scarb2a* is essential for notochord formation in developing zebrafish, we have extended the number of known functions for this family of membrane receptor glycoproteins.

Experimental Procedures

Ethics, Fish Maintenance, and Genotyping

All procedures performed with animals were approved by the Office of Laboratory Animal Welfare (OLAW) of the United States National Institutes of Health (NIH), approval #A5281-01. The zebrafish TAB-WIK wild-type strain and the *scarb2a^{hi1463A}* insertional mutant were kindly donated by Professor Nancy Hopkins from the Massachusetts Institute of Technology. Adult zebrafish were maintained at 28°C in a recirculation system from Aquatic Habitats (Apopka, FL) using standard techniques (Trevarrow and Robison, 2004). Fish embryos were obtained by natural crosses and then maintained at 28.5°C and staged according to (Kimmel et al., 1995). Genotyping was used to identify adult carriers as well as to confirm that the studied phenotypic larvae were homozygous for the *scarb2a^{hi1463ATg}*. Briefly, we lysed adult fin clips or complete larvae in a mixture containing 50 mM KCl, 200 mM NaCl, 0.01% gelatin, 0.45% NP-40, 0.45% Tween-20, 5 mM EDTA, 0.2 mg/ml Proteinase K and 10 mM Tris-HCl, pH 8.0, that was heated at 55°C for 4 hr and then at 94°C for 15 min (all reagents from Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). A diluted sample

(1:20) was then used for PCR. Three primers were used in the same PCR reaction; one was a virus-specific primer (MSL4 5'-GCTAGCTTGCCAAACCTA CAGGT-3'), and the other two were specific for the regions flanking the *scarb2a* genomic sequence (1463c 5'-GTACTATTTACGCCACAGGGATTGTG-3' and 1463c1 5'-TCCCTGTACGTAACATGATTGTGTA-3'). In carrier fishes or embryos, the presence of the proviral insertion will disrupt any amplification between the genomic primer pair, but a PCR product will still be obtained by amplification between the virus-specific primer and one of the genomic primers.

Cloning of *scarb2a* and RT-PCR Experiments

Putative exons encoding the zebrafish *scarb2a* gene were found by TBLASTN from the Ensembl zebrafish genome (Zv9) Web site (http://www.ensembl.org/Danio_riero/index.html). Once the first exon was identified, we designed a forward primer (1463-1: 5'-CTGAGCATCCGAGAAATACTCCCG-3') and reverse primer (1463-2: 5'-CGTGACCTTTAACCCTTCTGCT-3'). These primers were used to amplify the complete *scarb2a* open reading frame (ORF) from cDNA of 1 dpf embryos, and the resulting product was cloned into pCR4TOPO (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) and sequenced. For the RT-PCR experiments, total RNA was obtained from unfertilized eggs to 5 dpf larvae using the Trizol reagent (Invitrogen Life Technologies) according to the manufacturer's instructions, except that genomic DNA was eliminated using the TURBO DNase system (Ambion, Austin, TX). First-strand cDNA was generated using oligo-dT primers with the superscript III system also from (Invitrogen Life Technologies).

The primers used for RT-PCR amplification of *scarb2a* were 1463-3: 5'-GCACCCATTGTTGTGTCATTCCCT-3' and 1463-4: 5'-CATTTCTCTGG CGGTTTCTGC-3'. These primers amplified a 400 bp fragment of *scarb2a*. For the rescue experiment, the *scarb2a* ORF was cloned in the BamH1-EcoR1 sites of the polylinker site of pCS2+ using the primers 1463rscF: 5'-CCGGATCCCGATGACTAGAAGATCTTGTAC-3' and 1463rscR: 5'-CCGAATT CGCCGACACTTTTGTGCTCCACT-3'. Capped mRNA from *scarb2a* was synthesized using the mMessage mMachine SP6 kit (Ambion, Austin, TX, USA) and diluted in RNase/DNase-free water, and 250 µg was micro-injected in 1- to 2-cell fish embryos using the MINJ-1 microinjector (Tritech Research, Los Angeles, CA). After the microinjection, the embryos were placed in embryo medium containing 1% penicillin and streptomycin solution (10,000 U/ml penicillin and 10,000 µg/ml) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) at 28.5°C for recovery.

Whole-Mount In Situ Hybridization

The *scarb2a* probe was generated by cloning a 934 bp fragment from the 5'-untranslated region (UTR) and part of the ORF from the zebrafish *scarb2a* mRNA into the pCR4-TOPO vector using the next set of primers 1463-1: 5'-CTGAGCATCCGAGAAA TACTCCCG-3' and 1463-6: 5'-CACCAATTCATCTGACTGATGCCG-3'. The 5'-UTR was chosen because UTR sequences were not conserved among the three *scarb2* zebrafish paralogous genes. Digoxigenin (DIG)-labeled antisense and sense (control) RNA probes were synthesized using a DIG labeling kit (Roche Basel, Switzerland), and whole-mount in situ hybridization was performed according to (Thisse et al., 2004). Plasmids containing the *sonig hedgehog* and *α-collagen-II* probes were kindly provided by Dr. Isaac Skromne. Flat mounts of labeled embryos were prepared

by removing the yolk with fine forceps (Fine Science Tools, Foster City, CA) and carefully placing flattened embryos between two coverslips separated by four small drops of high vacuum grease (Dow Corning Midland, MI) at the corners. Photographs of the embryos were taken using a Sony Cybershot DSC-H20 camera (Sony Corporation, Minato, Tokyo, Japan) attached to a Nikon SMZ-645 zoom stereomicroscope (Nikon Instruments, Melville, NY) using adaptor lenses (Martin Microscopes, Easley, SC).

Electron Microscopy

For sectioning, larvae were fixed in 1% paraformaldehyde phosphate buffered saline, 2.5% glutaraldehyde, 3% sucrose, and 60 mM phosphate buffer, pH 7.4 for 1.5–3 hr and then post-fixed for 1 hr in 1% osmium tetroxide, 60 mM phosphate buffer, pH 7.4. Post-fixed larvae were dehydrated and infiltrated in epon/araldite resin for electron microscopy on a Jeol 1200EXII instrument (JEOL). Ultra-sectioning were made longitudinally (along the anteroposterior axis) or in transversely (along the dorso-ventral axis) as indicated in the text. Transverse cross-sections of 30 hpf embryos and 3 dpf larvae were made just at the end of the yolk extension (near somite 16) to make comparisons between WT and mutant embryos more accurate. For 30 hpf embryos, after fixation, the head was removed and used for genotyping (see above), while the trunk was used for electron microscopy; this was performed to confirm that analysis was indeed conducted in homozygous *scarb2a*^{hi1463Tg} embryos. Measurements of the basement membrane thickness were made using Image J (Schneider et al., 2012), and statistical analysis was carried out with Excel (Microsoft, Redmond, WA). Approximately five images were processed for each embryo, and two embryos (WT or mutant) were analyzed for each developmental stage.

Acknowledgments

We thank Isabel Guerrero for her assistance in the RT-PCR experiments. Abigail Diaz-Tellez is a doctoral student from “Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)” and received the fellowship 104429 from CONACYT.

References

- Amsterdam A, Hopkins N. 2004. Retroviral-mediated insertional mutagenesis in zebrafish. *Methods Cell Biol* 77:3–20.
- Amsterdam A, Nissen RM, Sun Z, Swindell EC, Farrington S, Hopkins N. 2004. Identification of 315 genes essential for early zebrafish development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:12792–12797.
- Amsterdam A, Varshney GK, Burgess SM. 2011. Retroviral-mediated Insertional Mutagenesis in Zebrafish. *Methods Cell Biol* 104:59–82.
- Asch AS, Liu I, Briccetti FM, Barnwell JW, Kwakye-Berko F, Dokun A, Goldberger J, Pernambuco M. 1993. Analysis of CD36 binding domains: ligand specificity controlled by dephosphorylation of an ectodomain. *Science* 262:1436–1440.
- Barriocanal JG, Bonifacio JS, Yuan L, Sandoval IV. 1986. Biosynthesis, glycosylation, movement through the Golgi system, and transport to lysosomes by an N-linked carbohydrate-independent mechanism of three lysosomal integral membrane proteins. *J Biol Chem* 261:16755–16763.
- Berkovic SF, Dibbens LM, Oshlack A, Silver JD, Katerelos M, Vears DF, Lullmann-Rauch R, Blanz J, Zhang KW, Stankovich J, Kalnins RM, Dowling JP, Andermann E, Andermann F, Faldini E, D’Hooge R, Vadlamudi L, Macdonell RA, Hodgson BL, Bayly MA, Savage J, Mulley JC, Smyth GK, Power DA, Saftig P, Bahlo M. 2008. Array-based gene discovery with three unrelated subjects shows SCARB2/LIMP-2 deficiency causes myoclonus epilepsy and glomerulosclerosis. *Am J Hum Genet* 82:673–684.
- Canton J, Neculai D, Grinstein S. 2013. Scavenger receptors in homeostasis and immunity. *Nat Rev Immunol* 13:621–634.
- Coutinho MF, Prata MJ, Alves S. 2012. A shortcut to the lysosome: the mannose-6-phosphate-independent pathway. *Mol Genet Metab* 107:257–266.
- Ellis K, Bagwell J, Bagnat M. 2013a. Notochord vacuoles are lysosome-related organelles that function in axis and spine morphogenesis. *J Cell Biol* 200:667–679.
- Ellis K, Hoffman BD, Bagnat M. 2013b. The vacuole within: how cellular organization dictates notochord function. *Bioarchitecture* 3:64–68.
- Fujita H, Saeki M, Yasunaga K, Ueda T, Imoto T, Himeno M. 1999. In vitro binding study of adaptor protein complex (AP-1) to lysosomal targeting motif (LI-motif). *Biochem Biophys Res Commun* 255:54–58.
- Gamp AC, Tanaka Y, Lullmann-Rauch R, Wittke D, D’Hooge R, De Deyn PP, Moser T, Maier H, Hartmann D, Reiss K, Illert AL, von Figura K, Saftig P. 2003. LIMP-2/LGP85 deficiency causes ureteric pelvic junction obstruction, deafness and peripheral neuropathy in mice. *Hum Mol Genet* 12:631–646.
- Gegg ME, Burke D, Heales SJ, Cooper JM, Hardy J, Wood NW, Schapira AH. 2012. Glucocerebrosidase deficiency in substantia nigra of parkinson disease brains. *Ann Neurol* 72:455–463.
- Golling G, Amsterdam A, Sun Z, Antonelli M, Maldonado E, Chen W, Burgess S, Haldi M, Artzt K, Farrington S, Lin SY, Nissen RM, Hopkins N. 2002. Insertional mutagenesis in zebrafish rapidly identifies genes essential for early vertebrate development. *Nat Genet* 31:135–140.
- Gonzalez A, Valeiras M, Sidransky E, Tayebi N. 2014. Lysosomal integral membrane protein-2: a new player in lysosome-related pathology. *Mol Genet Metab* 111:84–91.
- Gray RS, Wilm TP, Smith J, Bagnat M, Dale RM, Topczewski J, Johnson SL, Solnica-Krezel L. 2014. Loss of col8a1a function during zebrafish embryogenesis results in congenital vertebral malformations. *Dev Biol* 386:72–85.
- Grotmol S, Kryvi H, Keynes R, Krossoy C, Nordvik K, Totland GK. 2006. Stepwise enforcement of the notochord and its intersection with the myoseptum: an evolutionary path leading to development of the vertebra? *J Anat* 209:339–357.
- Haftak Z, Morvan-Dubois G, Thisse B, Thisse C, Garrone R, Le Guellec D. 2003. Sequence and embryonic expression of collagen XVIII NC1 domain (endostatin) in the zebrafish. *Gene Expr Patterns* 3:351–354.
- Has C, Bruckner-Tuderman L. 2014. The genetics of skin fragility. *Ann Rev Genomics Hum Genet* 15:245–268.
- Hatta K, Kimmel CB, Ho RK, Walker C. 1991. The cyclops mutation blocks specification of the floor plate of the zebrafish central nervous system. *Nature* 350:339–341.
- Honing S, Sandoval IV, von Figura K. 1998. A di-leucine-based motif in the cytoplasmic tail of LIMP-II and tyrosinase mediates selective binding of AP-3. *EMBO J* 17:1304–1314.
- Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF. 1995. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn* 203:253–310.
- Kuronita T, Eskelinen EL, Fujita H, Saftig P, Himeno M, Tanaka Y. 2002. A role for the lysosomal membrane protein LGP85 in the biogenesis and maintenance of endosomal and lysosomal morphology. *J Cell Sci* 115:4117–4131.
- Lewis V, Green SA, Marsh M, Vihko P, Helenius A, Mellman I. 1985. Glycoproteins of the lysosomal membrane. *J Cell Biol* 100:1839–1847.
- Michelakakis H, Xiromerisiou G, Dardiotti E, Bozi M, Vassiliadis D, Kountra PM, Patramani G, Moraitou M, Papadimitriou D, Stamboulis E, Stefanis L, Zintzaras E, Hadjigeorgiou GM. 2012. Evidence of an association between the scavenger receptor class B member 2 gene and Parkinson’s disease. *Move Disord* 27:400–405.
- Neculai D, Schwake M, Ravichandran M, Zunke F, Collins RF, Peters J, Neculai M, Plumb J, Loppnau P, Pizarro JC, Seitova A, Trimble WS, Saftig P, Grinstein S, Dhe-Paganon S. 2013. Structure of LIMP-2 provides functional insights with implications for SR-BI and CD36. *Nature* 504:172–176.
- Pagnon-Minot A, Malbouyres M, Haftak-Terreau Z, Kim HR, Sasaki T, Thisse C, Thisse B, Ingham PW, Ruggiero F, Le Guellec D. 2008. Collagen XV, a novel factor in zebrafish notochord differentiation and muscle development. *Dev Biol* 316:21–35.

- Park YM. 2014. CD36, a scavenger receptor implicated in atherosclerosis. *Exp Mol Med* 46:e99.
- Postel R, Margadant C, Fischer B, Kreft M, Janssen H, Secades P, Zambruno G, Sonnenberg A. 2013. Kindlin-1 mutant zebrafish as an in vivo model system to study adhesion mechanisms in the epidermis. *J Invest Dermatol* 133:2180–2190.
- Raposo G, Marks MS, Cutler DF. 2007. Lysosome-related organelles: driving post-Golgi compartments into specialisation. *Curr Opin Cell Biol* 19:394–401.
- Reczek D, Schwake M, Schroder J, Hughes H, Blanz J, Jin X, Brondyk W, Van Patten S, Edmunds T, Saftig P. 2007. LIMP-2 is a receptor for lysosomal mannose-6-phosphate-independent targeting of beta-glucocerebrosidase. *Cell* 131:770–783.
- Schafer M, Rembold M, Wittbrodt J, Scharl M, Winkler C. 2005. Medial floor plate formation in zebrafish consists of two phases and requires trunk-derived Midkine-a. *Genes Dev* 19:897–902.
- Schier AF, Neuhauss SC, Helde KA, Talbot WS, Driever W. 1997. The one-eyed pinhead gene functions in mesoderm and endoderm formation in zebrafish and interacts with no tail. *Development* 124:327–342.
- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 9:671–675.
- Schroen B, Leenders JJ, van Erk A, Bertrand AT, van Loon M, van Leeuwen RE, Kubben N, Duisters RF, Schellings MW, Janssen BJ, Debets JJ, Schwake M, Hoydal MA, Heymans S, Saftig P, Pinto YM. 2007. Lysosomal integral membrane protein 2 is a novel component of the cardiac intercalated disc and vital for load-induced cardiac myocyte hypertrophy. *J Exp Med* 204:1227–1235.
- Scott A, Stemple DL. 2004. Zebrafish notochord basement membrane: signaling and structure. *Curr Top Dev Biol* 65:229–253.
- Stemple DL. 2005. Structure and function of the notochord: an essential organ for chordate development. *Development* 132:2503–2512.
- Thisse B, Heyer V, Lux A, Alunni V, Degraeve A, Seiliez I, Kirchner J, Parkhill JP, Thisse C. 2004. Spatial and temporal expression of the zebrafish genome by large-scale in situ hybridization screening. *Methods Cell Biol* 77:505–519.
- Trevarrow B, Robison B. 2004. Genetic backgrounds, standard lines, and husbandry of zebrafish. *Methods Cell Biol* 77:599–616.