



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Estudio de la función de la proteína Zmiz1b en el desarrollo embrionario del pez cebra

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Lic. C. Paola Itzel Elizalde Padilla

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Hilda María Lomelí Buyoli

Instituto de Biotecnología UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Celina García Meléndez

Instituto de Biotecnología UNAM

Dr. Fernando López Casillas

Instituto de Fisiología Celular UNAM

Ciudad de Cuernavaca. Octubre, 2021.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dedicada

Con todo mi amor y agradecimiento a mi familia.

Agradecimientos Institucionales

Este proyecto se llevó a cabo en el Instituto de Biotecnología de la UNAM, con financiamiento de DGAPA/PAPIIT UNAM IN200519

Agradezco a todos los integrantes del laboratorio N°. 15 de la Dra. Hilda Lomelí.

A las y los mexicanos, gracias a sus contribuciones fue posible tener los recursos para llevar a cabo este proyecto.

A CONACYT por la beca número 887235

Al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP)

A la unidad de docencia y formación de recursos humanos: Lic. Antonio Bolaños Guillen, Gloria Villa Herrera y al Ing. Jalil Saab.

A las técnicas del laboratorio M. en C. Dulce Benítez Pacheco por su apoyo en el cuidado de los peces y a la M. en C. Laura Ramírez Ángeles por el apoyo experimental.

A mi comité tutorial la Dra. Celina García Meléndez y al Dr. Fernando López Casillas quienes aportaron muy buenas ideas y comentarios que enriquecieron este trabajo.

A los miembros del jurado Dra. Claudia Treviño, Dr. Enrique Reynaud, Dra. Rosa Navarro, Dr. Luis Alfredo Cruz, Dr. Mario Zurita, por su tiempo y aportaciones que ayudaron a enriquecer este manuscrito.

Agradecimientos

En particular quiero agradecerle a la Dra. Hilda quien no solo me ha dado la oportunidad de seguir creciendo profesionalmente, sino que también me ha enseñado y apoyado mucho en lo personal. Gracias!!!

A los integrantes, compañeros, amigos y colegas del laboratorio 15, que me ayudaron mucho a sacar adelante este proyecto, en especial a Paco, Laura, Javi, Arlen, Brenda, Den, Sara, de quienes aprendí mucho y con los que compartí tantas experiencias.

A mi hermosa familia Paco, Luna, mi mamá Paty, mi hermano Aza, mis tíos Ivonne y Alex, mis primos Aline, Yayo e Irving, mis hermanas Rebe, Linda y Sara, así como a Tata, Yanina y Paco, sin ustedes simplemente nada de esto habría sido posible.

Así como a profesores, compañeros, amigos del Instituto, con los que compartí durante este proyecto, a todos y cada uno de los que formaron parte de esta etapa maravillosa de mi vida por estar siempre apoyándome y guiándome a ser la mejor versión de mi misma, y a siempre salir adelante.

RESUMEN

ZMIZ1 es una proteína que cuenta con distintos dominios funcionales entre los que se encuentran dos dominios ricos en prolinas, un sitio de localización nuclear, un dedo de zinc llamado Miz o SP-RING, un dominio de transactivación (TAD), una región de repetición tetratricopeptídica (TPR), una región rica en alaninas, y el sitio de unión al receptor de andrógenos (AR). Se sabe que ZMIZ1 interacciona con diversas proteínas y que funciona como co-regulador de la transcripción; además, se le ha asociado con distintas enfermedades autoinmunes y neurodegenerativas, así como a cáncer y defectos en la vasculogénesis y la angiogénesis que llevan a letalidad a embriones del ratón mutantes *knockout* en ZMIZ. Debido al impacto que podría tener la expresión de ZMIZ1 en etapas del desarrollo embrionario, lo estudiamos en el pez cebra, por ser un modelo que ofrece diversas ventajas.

El genoma del pez cebra codifica para *zmiz1a* y *zmiz1b*. En este trabajo en particular nos centramos en analizar al gen *zmiz1b*, cuya estructura genica, proponemos cuenta con 20 exones; el patrón de expresión espacio-temporal del transcrito, el cual muestra una señal positiva en ovocitos de estadios tempranos (Ib y II) del ovario adulto y también observamos expresión en embriones desde las 24 hasta las 72 horas post fertilización (hpf), en la cabeza y aletas principalmente. Por otro lado, evaluamos la viabilidad de las mutantes de *zmiz1b*^{-/-} y la doble mutante *zmiz1a*^{-/-}/*zmiz1b*^{-/-} en las cuales no encontramos fenotipos visibles, y tras analizar distintas hipótesis que explicaran la ausencia de fenotipo, sugerimos que posiblemente no se está perdiendo la función de la proteína en nuestras mutantes. Creemos que se

está recuperando la función por algún mecanismo compensatorio postranscripcional, por ejemplo, que esté empezando la traducción en un ATG posterior al sitio de mutación, generándose así proteínas truncas funcionales de Zmiz1a. Para dilucidar lo anterior realizamos ensayos de qPCR y *Western blot*. Por qPCR encontramos que las mutantes a las 48 hpf presentan un incremento de la transcripción de *zmiz1b* en 3.1 veces en comparación con las muestras silvestres, mientras que en los experimentos de *Western blot* no obtuvimos una conclusión debido a que el anticuerpo generado para humanos no reacciona con nuestra proteína de interés.

Por lo anterior descrito, concluimos tras haber clonado y secuenciado 10 de 20 exones predichos para *zmiz1b* en la base de datos, que no coincide las secuencias reportadas con los resultados que nosotros obtuvimos en el laboratorio. Así mismo, encontramos que el transcrito de *zmiz1b* se expresa principalmente en el citoplasma de ovocitos de estadios tempranos (Ib y II), y en larvas de 24, 48 y 72 hpf principalmente en la cabeza y aletas pectorales. Por otro lado no encontramos un fenotipo visible en las mutantes de *zmiz1b*, sin embargo, descubrimos que hay un incremento en la expresión del transcrito de *zmiz1b* en embriones mutantes de 48 hpf y en ovarios adultos, respecto a sus equivalentes silvestres.

Índice general

RESUMEN	4
INTRODUCCIÓN.....	8
La proteína ZMIZ1.....	10
Modelo de estudio pez cebra (<i>Danio rerio</i>).....	14
Desarrollo embrionario del pez cebra.....	15
Ovogénesis en el pez cebra.....	17
ANTECEDENTES	18
Antecedentes de <i>zmiz1a</i>	19
Antecedentes de <i>zmiz1b</i>	20
Patrón de expresión temporal <i>zmiz1b</i>	23
HIPÓTESIS	28
OBJETIVOS.....	28
Objetivo general.....	28
Objetivos específicos.....	29
JUSTIFICACIÓN.....	29
MATERIALES Y METODOS.....	30
Cuidado y mantenimiento de los peces cebra.....	30
Genotipificación.....	30
Extracción de ARN.....	31
Síntesis de DNA complementario (cDNA).....	31
Clonación.....	32
Transformación.....	33
Diseño de sondas para HIS.....	33
Identificación de sondas.....	34
Hibridación in situ (HIS).....	34
Cortes histológicos.....	36
qPCR.....	36
Extracción de proteínas y <i>Western blot</i>	37
Ensayos de <i>o</i> -dianisidina.....	38

RESULTADOS.....	39
1. Patrón de expresión espacio temporal de <i>zmiz1b</i> (HIS)	39
1.1 Expresión en larvas de 24 hpf	40
1.2 Expresión en larvas de 48 hpf	41
1.3 Expresión en larvas de 72 hpf	43
Expresión de <i>zmiz1b</i> en ovario de hembras adultas silvestres	45
2. Estudio del fenotipo de pérdida de función de <i>zmiz1b</i>	46
2.1 Expansión de la línea mutante <i>zmiz1b</i>	46
2.2 Análisis de la doble línea mutante de <i>zmiz1a</i> , <i>zmiz1b</i> en larvas de 21 dpf	49
2.3 Estudio del fenotipo de mutantes <i>zmiz1b</i> ^{-/-} en ausencia de herencia materna	52
3. Validación de la pérdida de la función de <i>Zmiz1b</i> en líneas mutantes.	54
3.1 Análisis de la estabilidad y procesamiento del transcrito de <i>zmiz1b</i>	54
3.2 Rescate de la proteína: Un sitio alternativo de inicio de la traducción.	59
3.3 Ensayo de <i>Western blot</i>	60
3.4 Patrón de expresión diferencial entre silvestres y mutantes.....	61
DISCUSIÓN	63
CONCLUSIONES.....	67
PERSPECTIVAS.....	68
BIBLIOGRAFÍA	68

INTRODUCCIÓN

La regulación de la transcripción de un gen es un proceso determinante tanto para la diferenciación celular como para responder a las señales externas e internas que recibe la célula. Estas señales modulan rutas específicas de señalización causando modificaciones de diversos tipos en factores transcripcionales (FT) y alterando así la eficiencia con la que éstos regulan la transcripción de sus genes-blancos. Los principales transmisores de señales externas son los co-reguladores de la transcripción. Los FT se unen a secuencias reguladoras específicas en el DNA y una vez unidos, reclutan proteínas co-reguladoras, las cuales modifican la conformación local de la cromatina y/o la formación de complejos de activación o represión en los sitios de inicio de la transcripción. Se podría considerar entonces que los FT seleccionan los genes que van a regular, mientras que los co-reguladores contribuyen a la eficiencia de activación o represión; ya que estos últimos rara vez se unen directamente al DNA. Por lo tanto, los FT y los co-reguladores representan dos niveles diferentes de regulación transcripcional¹.

Estudios genómicos recientes han revelado que los co-reguladores transcripcionales median la regulación de solo un subconjunto de entre la totalidad de los genes-blancos regulados por un FT. Ese subconjunto corresponde a una condición fisiológica específica que se presenta en un tipo celular particular¹.

Los co-reguladores contribuyen a la regulación de la transcripción a través de diversos mecanismos que incluyen: la modulación de la estructura de la cromatina, el reclutamiento o disociación de la RNA-polimerasa, la modificación post-traducciona l de FTs (fosforilación, ubiquitinación, sumoilación, acetilación,

metilación, etc)^{1,2}. Las modificaciones post-traduccionales pueden impactar al FT de múltiples maneras tales como su estabilidad, localización subcelular, sensibilidad al ligando, y su capacidad de interactuar con otras proteínas, etc.

Hasta ahora se han identificado más de 400 co-reguladores en mamíferos, lo que da una idea de los niveles de complejidad y las sutilezas transcripcionales que existen durante la regulación genética³. El fenómeno de co-regulación se ha estudiado más ampliamente en el contexto de la regulación de los receptores hormonales esteroideos (glucocorticoides, andrógenos, estrógenos), los cuales son receptores nucleares⁴. Estudios con estos modelos han revelado que los co-reguladores, dependiendo de las circunstancias, pueden actuar como co-activadores o como co-represores, incluso para el mismo FT aún en el mismo tipo celular. Los co-reguladores generalmente tienen varios dominios para interactuar de formas diversas con distintas proteínas y se ha visto que utilizan dominios diferentes para ejercer distintos mecanismos de acción y lograr efectos específicos u opuestos en distintos genes-blanco⁵.

Entre las rutas fisiológicas que más frecuentemente utilizan co-reguladores se encuentran el metabolismo energético, la fisiología de la reproducción, la regulación de la respuesta inmune e anti-inflamatoria, el metabolismo de lípidos, etc. También a través de estudios de pérdida de función en ratón, se ha determinado que varios co-reguladores están implicados en enfermedades como el cáncer, síndromes genéticos y desórdenes inmunológicos⁶.

Estudiando los mecanismos que operan durante las respuestas a glucocorticoides, los cuales participan en la homeostasis de varias rutas fisiológicas, se demostró que distintos conjuntos de co-reguladores se asocian a respuestas fisiológicas

específicas. Esto se ha denominado como un código fisiológico de co-regulación. Esta situación ha generado mucho interés, ya que se ha propuesto que los co-reguladores podrían ser blancos terapéuticos mejores que los FT, ya que pueden utilizarse para inhibir rutas de señalización de manera más específica y de esta manera limitar los efectos secundarios de los fármacos. Por eso, drogas anti-cáncer de última generación se enfocan en la inhibición de co-reguladores como blancos principales⁷.

La proteína ZMIZ1

ZIMP10 o ZMIZ1 (del inglés: zinc finger MIZ-type containing 1) es un co-regulador de la transcripción. Originalmente se demostró que co-activa la transcripción mediada por el receptor de andrógeno (RA)⁸. Posteriormente se encontró que participa en la modulación de la actividad de diversos factores transcripcionales como Smad3/4⁹ en la vía de TGF- β /Smad, p53¹⁰, y Notch¹¹, en donde, en todos los casos, aumenta la actividad mediada por los mismos. Además ZMIZ1 está posiblemente implicado en la remodelación de la cromatina debido a sus interacciones con el complejo SWI/SNF (del inglés *SWItch/Sucrose Non Fermentable*)^{12,13}.

ZMIZ1 es una proteína que se encuentra conservada a lo largo de la historia evolutiva en distintos organismos eucariotas desde vertebrados, como el humano y el pez cebra¹⁴. Se ha reportado que contiene distintos dominios reportados (Figura 1), entre los que se incluyen: dos dominios ricos en prolinas, que son dominios de unión a otras proteínas; una secuencia de localización nuclear (NLS) que le permite translocarse al interior del núcleo; una región de repetición tetratricopeptídica (TPR),

que participa en la interacción con NOTCH1^{15,11}, y un sitio rico en alaninas, el cual está altamente conservado evolutivamente entre las proteínas ZMIZ y del que se predice que es una región intrínsecamente desordenada. Se sabe que este tipo de motivos permiten interacciones múltiples con co-reguladores transcripcionales (Tabla 1).

Tabla 1. Dominios de ZMIZ1 que interactúan con diferentes factores transcripcionales.

Región de ZMIZ1 que interactúa	Factor transcripcional/ región que interactúa con ZMIZ1	Función	Referencia
NLS y MIZ (691-804)	Receptor de andrógenos (556-790 aa dominio TAD)	Necesario para la interacción	Sharma et al., (2003)
TPR (1-120)	Notch1 (a través del dominio RAM)	Suficiente para la interacción.	Pinnell et al., (2015)
TAD (837-1067)	Notch1 (no interacciona físicamente)	Necesaria para la actividad de transactivación	Pinnell et al., (2015)
MIZ (728-809)	Smad3 y Samad4 (a través del dominio MH2)	Coactivadores transcripcionales	Li et al., (2006)
Construcción de ZMIZ1 (451-753)	p53 (251-383)	Es la región en la que se da la unión mas fuerte entre estas dos proteínas.	Sun et al., (2007)

ZMIZ1 presenta también un sitio de unión al receptor de andrógenos; un dominio de transactivación (TAD) que podría permitirle la regulación directa de la actividad transcripcional, y un dominio de dedo de zinc, conocido como Miz o SP-RING (del inglés: *M*sx- *i*nteracting *z*inc finger y *S*iz/*P*IAS *R*ING). Este dominio es característico de otra familia de proteínas conocidas como PIAS (del inglés *P*rotein *I*nhibitor of *A*ctivated *S*TAT), de las cuales se sabe que participan en una ruta de modificación pos-traducciona llamada sumoilación, en la que se adiciona un péptido llamado SUMO (Small Ubiquitin-related Modifier) a sustratos proteicos. El dominio SP-RING confiere actividad de ligasa de SUMO a las PIAS. En ZMIZ1 el SP-RING está contenido dentro de una región más grande llamada X-SPRING¹³ (del inglés: Extended SP-RING). Este dominio originalmente se encontró en la proteína TnaA codificada por el gen *tonalli* de *Drosophila melanogaster* y se encuentra conservado en proteínas ortólogas (como ZMIZ1 y ZMIZ2) presentes en diversas especies de eucariontes como el pez cebra, en este último se han identificado dos homólogos de ZMIZ1: *Zmiz1a* y *Zmiz1b* ¹⁴.

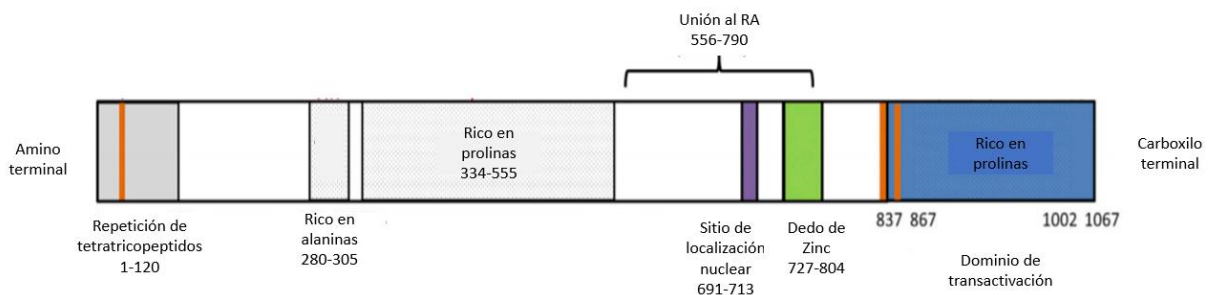


Figura 1. Proteína ZMIZ1 de humano, en la que se muestran los dominios que la conforman y su localización: dos dominios ricos en prolinas, el sitio de localización nuclear, y el dedo de zinc llamado Miz o SP-RING, un dominio de transactivación (TAD), una región de repetición tetratricopeptídica

(TPR), una región rica en alaninas, y el sitio de unión al receptor de andrógenos (AR) (Tomada y editada¹⁶)

Se sabe que *Zmiz1* se expresa de manera sexo-específica en las gónadas embrionarias de ratón con una alta expresión en la gónada masculina a los 13.5 días post coitum (dpc) durante la diferenciación sexual, mientras que en la gónada femenina¹⁷ la expresión es muy baja o nula. Estudios *in vivo* de la sobreexpresión de alelos mutantes de *Zmiz1*; durante el desarrollo de cerebros de ratones, dieron, como resultado anomalías en la morfología, polarización y posicionamiento de neuronas piramidales, lo que se asocia con el síndrome de desarrollo neurológico de humanos¹⁶. *Zmiz1* también se ha asociado a algunos tipos de cáncer¹⁸ entre los que se encuentran el de mama, de colon, de pulmón y de ovario (tabla 2), y a algunas enfermedades autoinmunes, como la leucemia¹⁸, el vitiligo¹⁹, la esclerosis múltiple²⁰, de Crohn²¹, celiaca²², la diabetes tipo II²³ (tabla 3). Particularmente en estudios de esclerosis múltiple se encontró la correlación entre *ZMIZ1* y la vitamina D, en donde se observó que pacientes de diferentes latitudes que tenían una menor exposición a la luz solar, presentaban deficiencia de vitamina D²⁴, posteriormente se demostró que un superpotenciador situado río arriba del gen *ZMIZ1* es el sitio de unión del receptor de vitamina D (VDR) y que la expresión de *ZMIZ1* se induce por vitamina D²⁵. Muchas variantes de riesgo de esclerosis múltiple presentan mutaciones en este superpotenciador.

Por otro lado, también en ratón se ha demostrado que la pérdida de *Zmiz1* en este organismo ocasiona fenotipos letales en la etapa de gestación media²⁶.

Tabla 2. Asociación de Zmiz1 con cáncer.

Tipo de cáncer	Tipo de dato	Alteración en <i>zmiz1</i>	Muestra analizada	Referencias
Carcinoma de células cutáneas	Mutagénesis por transposón	Forma trunca carente del amino terminal	Ratones	Roger et al., (2013)
Cáncer de mama	Inmunohistoquímica	Aumento de la presencia de <i>zmiz1</i> nuclear	Muestras de tumores	Roger et al., (2013)
Cáncer de ovario	Inmunohistoquímica	Aumento de la presencia de <i>zmiz1</i> nuclear	Muestras de tumores	Roger et al., (2013)
Cáncer de colon	Inmunohistoquímica	Aumento de la presencia de <i>zmiz1</i> nuclear	Muestras de tumores	Roger et al., (2013)
Cáncer de pulmón	Inmunohistoquímica	Aumento de la presencia de <i>zmiz1</i> nuclear	Muestras de tumores	Roger et al., (2013)

Tabla 3. Asociación de Zmiz1 a enfermedades autoinmunes.

Tipo de enfermedad autoinmune	Tipo de dato	Alteración en <i>zmiz1</i>	Muestra analizada	Referencias
Leucemia	Transcriptoma	Aumento de la expresión de <i>zmiz1</i>	Ratones	Pinnell et al., (2015)
Esclerosis múltiple	Transcriptoma	Disminución de la expresión de <i>zmiz1</i>	Pacientes humanos	Fewings et al., (2017)
Enfermedad de Crohn	GWAS (Genome-wide association study)	Polimorfismo de <i>zmiz1</i> aumenta la predisponibilidad	Humanos	Lan et al., (2017)
Enfermedad celíaca	GWAS	Polimorfismo de <i>zmiz1</i> aumenta la predisponibilidad	Humanos	Dubois et al., (2010)
Vitiligo	GWAS	Polimorfismo de <i>zmiz1</i> aumenta la predisponibilidad	Humanos	Sun et al., (2014)
Diabetes tipo 2	GWAS	Polimorfismo de <i>zmiz1</i> aumenta la predisponibilidad	Humanos	Harder et al., (2013)

Modelo de estudio pez cebra (*Danio rerio*)

Para entender la función de Zmiz1 se decidió utilizar el modelo del pez cebra, el cual cuenta con distintas ventajas, como el hecho de ser un organismo no placentario con herencia materna, ser de fácil manipulación y mantenimiento en el laboratorio, tener una alta identidad génica con el humano (70%)²⁷, además de su capacidad de producir una progenie numerosa por cruce (entre 200-300 huevos).

Otra característica importante de este modelo es que durante toda su etapa embrionaria, estos organismos son translúcidos, lo que permite observarles a mayor detalle a lo largo de su desarrollo de una manera más sencilla, además son capaces de sobrevivir pese a problemas de oxigenación en la circulación, gracias a que pueden intercambiar oxígeno con su medio ambiente mediante difusión. Estas y otras cualidades lo convierten en un muy buen modelo de estudio para el desarrollo embrionario^{28,29}.

Desarrollo embrionario del pez cebra

Una vez que ha sucedido la fertilización del huevo (0h) se activan corrientes citoplasmáticas que facilitan el transporte de proteínas y ARN mensajeros necesarios para la activación del desarrollo (Figura 2). Tras múltiples divisiones celulares subsecuentes (0.45-2.15 hpf) se genera lo que conocemos como blástula (2.15-5.15 hpf) en la cual, el blástodisco asemeja la apariencia de una esfera, a partir de la que se formará una capa sincicial que terminará por cubrir el polo vegetal, en un proceso llamado epibolia (5.15-10 hpf). Casi al mismo tiempo sucede la gastrulación (6-10 hpf), en la que se forman las capas germinales, producidas por movimientos morfogénicos de involución, convergencia y extensión. Una vez concluida esta etapa sucederá la segmentación del embrión (10-24 hpf), en la que se formarán las somitas y los órganos primarios, que se seguirán desarrollando con el tiempo hasta formar la larva 3 días post fertilización (dpf) con una anatomía y fisiología más compleja^{28,30} (figura 2) .

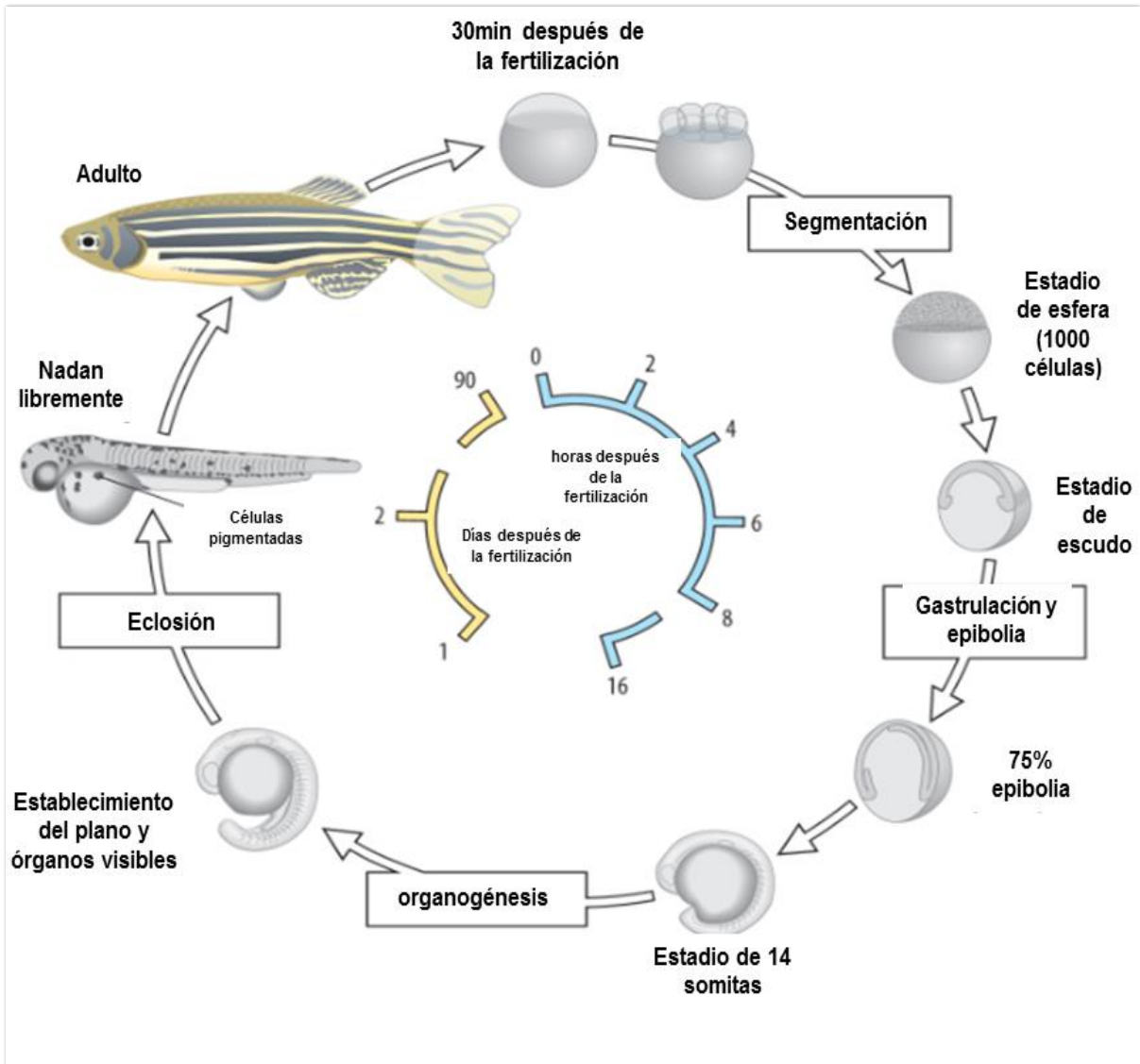


Figura 2. Ciclo de vida del pez cebra³¹. Se muestra el desarrollo a partir de 30 minutos posteriores a la fertilización: el huevo recién fertilizado inicia divisiones celulares rápidas y sincrónicas en las primeras 4 horas; posteriormente, en el estado de esfera inician movimientos celulares complejos que se denominan gastrulación y epibolia. Al mismo tiempo de inicia la organogénesis que genera prácticamente todos los órganos antes de 24 horas. Entre las 48 y 72 horas ocurre la eclosión del embrión y las larvas son capaces de nadar. A los 3 meses los peces alcanzan la etapa adulta.

Ovogénesis en el pez cebra

Durante las etapas tempranas del desarrollo embrionario del pez cebra, la células derivadas del germoplasma darán lugar a las células germinales primordiales (PGC) las cuales migran a las gónadas donde proliferan para posteriormente diferenciarse en ovocitos³². Más tarde en el desarrollo, durante la diferenciación sexual (21-30 dpf), los ovocitos inmaduros se pierden por apoptosis en los individuos destinados a ser machos, mientras que en las hembras se mantiene la ovogénesis. Cabe mencionar que dicho proceso en el pez cebra es asincrónico y se clasifica en 5 etapas (figura 3 y tabla 4): estadio de crecimiento primario (IA y IB), estadio de alveolos corticales (II), estadio de vitelogenesis (III), estado de maduración (IV), estado de ovulación (V)³³.

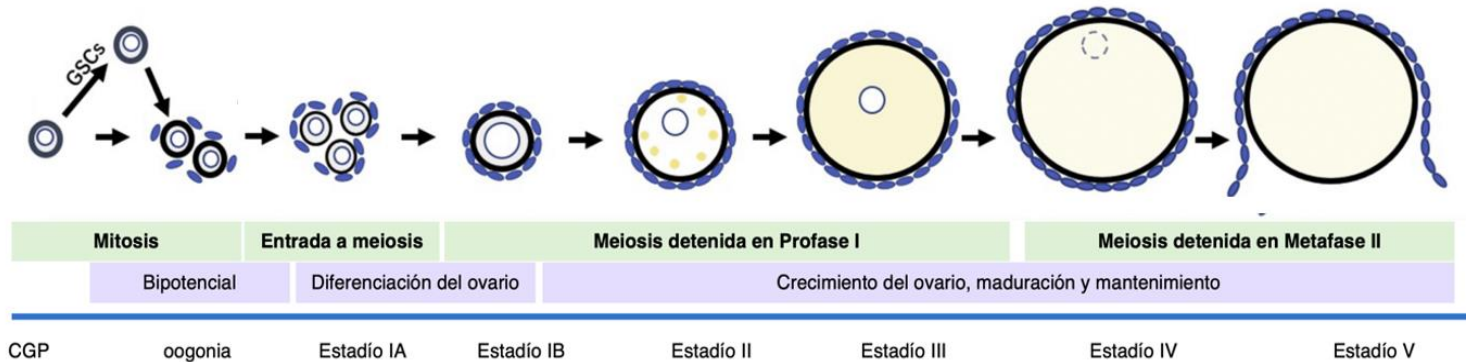


Figura 3. Maduración de los ovocitos. Se muestran las distintas etapas de la ovogénesis. Los ovocitos maduros se producen entre los 60 y 90 dpf. GSCs, (células somáticas de la gónada), CGP (células germinales primordiales)³³.

ANTECEDENTES

Zmiz1 en el pez cebra

A lo largo de la evolución de los organismos se han suscitado diferentes escenarios, como la duplicación de algunos genes o genomas, que han dado pie a la creciente complejidad de los organismos durante la evolución de la vida, como es el caso del pez cebra en el que la mayoría de sus genes se encuentran duplicados debido a eventos muy extensos de duplicación, que ocurrieron durante la evolución de los peces teleósteos hace aproximadamente 320-350 millones de años^{34,35}. Los genes duplicados pueden tener diferentes destinos³⁶, en algunos casos pueden perderse, debido a mutaciones causadas por deriva génica ya que al ser duplicados no tienen presión selectiva, retenerse creando redundancia, adquirir nuevas funciones (neofuncionalización) o dividirse las funciones que llevaba a cabo el gen ancestral (subfuncionalización)^{29,37,29}. Así mismo, tenemos el caso de los dos homólogos de gen *zmiz1*, de acuerdo a las bases de datos de *ensembl*, el pez cebra contiene en su genoma a *zmiz1a* (localizado en el cromosoma 13) y a *zmiz1b* (localizado en el cromosoma 12).

Tabla 4. Características y tamaños de los diferentes estadios de la ovogénesis^{32,33}.

Estadio	Características	Tamaño
IA	Los ovocitos están encerrados en el quiste con muchos nucléolos.	7 a 20 μm de diámetro
IB	los nucléolos se mueven hacia la periferia del núcleo (vesícula germinal), formando ovocitos perinucleolares de diploteno rodeados por una sola capa de células foliculares	20-140 μm de diámetro
II	El estadio del alvéolo cortical, implica la transcripción activa de genes y la distribución de algunos RNAs de herencia materna.	140-340 μm de diámetro
III	La etapa de vitelogénesis, es el período en el que los ovocitos crecen rápidamente debido a la acumulación de vitelo en el citoplasma.	340 a 690 μm de diámetro
IV	La etapa de huevo maduro, es cuando los ovocitos se vuelven translúcidos durante la maduración de los ovocitos debido a la escisión de las proteínas del vitelo y la ruptura de la vesícula germinal seguida de la liberación del primer cuerpo polar.	690 a 730 μm de diámetro
V	Los ovocitos son expulsados de los folículos en el proceso de ovulación hacia la cavidad ovárica hasta que se reproducen como huevos durante el apareamiento. Además se da la ruptura de la vesícula germinal seguida de la liberación del primer cuerpo polar.	730-750 μm de diámetro

Antecedentes de *zmiz1a*

En un proyecto independiente, se estudió la función de *zmiz1a* en el pez cebra. Mediante un análisis por RT-PCR, se descubrió que este gen se expresa en diferentes estadios del desarrollo embrionario, como 64 células, 30% epibolia, escudo, 3 somitas, 24 y 48 hpf (ver más adelante los estadios de desarrollo embrionario del pez cebra), así como en órganos de adultos, con mayor presencia en ojo, corazón e hígado. Posteriormente, mediante hibridación *in situ* (HIS) se encontró expresión en diferentes etapas del desarrollo embrionario, destacando su

presencia en los vasos sanguíneos, primordios de las aletas pectorales, tracto intestinal y tejido neural³⁸. Así mismo, se cuenta ya con la línea mutante nula para *zmiz1a* (con una deleción de 22 pb), a partir de la cual se observó que los embriones mutantes presentan anemia y defectos en la maduración de los eritrocitos. También se determinó que la mayoría de los embriones homocigotos, mueren entre el día 15 y 17 posteriores a la fertilización, lo que probablemente se debe a los defectos observados en la eritropoyesis; además mediante un estudio de RNAseq se encontró evidencia de que se altera la expresión de genes relacionados con la respuesta a vitamina D, y de manera interesante se reprime la expresión de varios genes involucrados en la mitofagia, un proceso de autofagia que ocurre durante la maduración de eritrocitos, mediante el cual se eliminan las mitocondrias.

Antecedentes de *zmiz1b*

En un trabajo previo del laboratorio se encontró mediante un análisis bioinformático que el nivel de conservación de la proteína con su homólogo humano era mayor para *Zmiz1a*, con un 83.43% de identidad, mientras que para *Zmiz1b* era de 53%, sin embargo, también se observó que *zmiz1b* presenta la mayor sintenia en relación a *ZMIZ1* de humano lo que sugiere un alto nivel de conservación funcional³⁸.

Se sabe que el gen *zmiz1b* se encuentra localizado en el cromosoma 12, del cual se ha reportado en la base de datos de *Ensembl* un transcrito (ENSDART00000158348.2) que consta de 17 exones, que codifica para una proteína de 819 aa (figura 4A).

Sin embargo, al revisar cuidadosamente la información descrita sobre la estructura de esta proteína notamos algunas inconsistencias con las anotaciones reportadas para el extremo amino terminal; tales como el hecho de que la proteína no comenzaba en metionina, y además encontramos que existen algunas evidencias *EST* que demuestran la existencia de una región adicional a la reportada en el amino terminal de *zmiz1b*, por lo cual procedimos a clonar y secuenciar esta región de *zmiz1b*. Los resultados de secuenciación demostraron que esta región es similar a la reportada en sus homólogos de otras especies, es decir que cuenta también con el dominio TPR. Debido a estos cambios, nosotros predijimos que *zmiz1b* cuenta con un transcrito de 20 exones (figura 4 B), con una longitud de 2784 pb que generarían una proteína de 927 aa.

Posteriormente analizamos la identidad de los distintos dominios que conforman a *Zmiz1b*, y encontramos que cuenta con un 64.87% de identidad global con respecto a su homólogo en humano, y un 64.61% con *Zmiz1a* de *Danio rerio* (tabla 5 y figura 5).

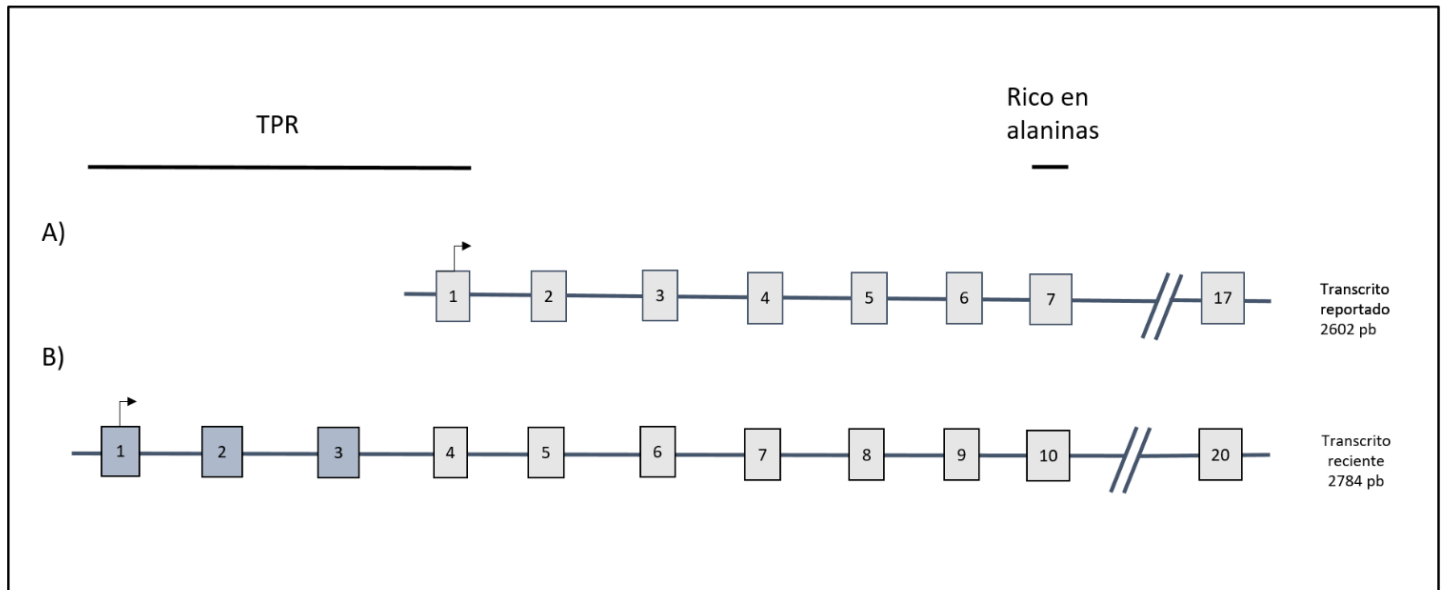


Figura 4. Esquema de los transcritos para *zmiz1b*. A) transcrito reportado en *ensembl*. B) Transcrito modificado tras el análisis de secuenciación que realizamos. Los cuadros numerados representan a los exones y las líneas negras al inicio de la figura señalan las regiones correspondientes a los dominios TPR y rico en alaninas.

Tabla 5. Comparación de la conservación de los diferentes dominios de *Zmiz1* humano con el equivalente de *Zmiz1a* y *Zmiz1b* en pez cebra. Se observa una mayor similitud de identidad de *Zmiz1a* a lo largo de diferentes dominios.

Dominios de ZMIZ1h	Zmiz1a	Zmiz1b	Zmiz1a Vs Zmiz1b
Trp	97.01%	88.33%	86.67%
Alaninas	100%	100%	100%
Primer dominio rico en prolinas	78.34%	39.26%	39.85%
Nls	100%	73.91%	73.91%
SP-RING	100%	83.72%	83.72%
XSP-RING	96.53%	78.33%	83.33%
Tad	68.40%	45.08%	42.41%
Segundo dominio rico en prolinas	58.52%	42.45%	37.34%
Identidad global	83.43%	64.87%	64.61%

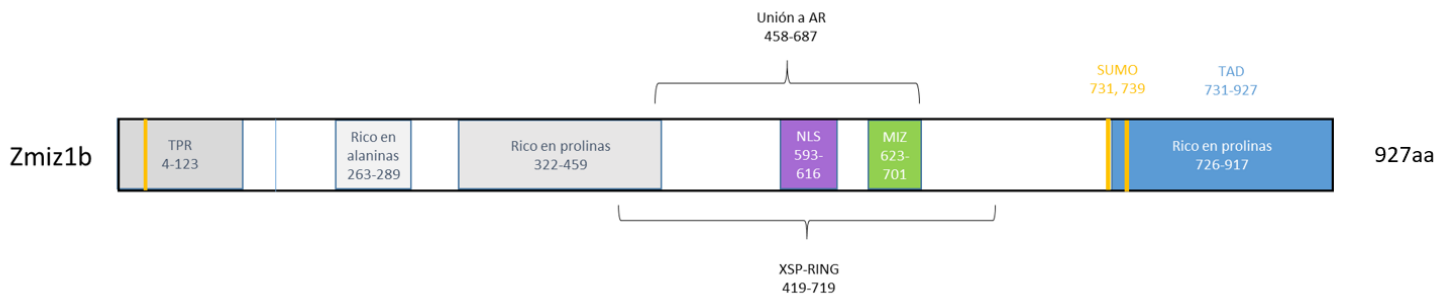


Figura 5. Proteína Zmiz1b. Se muestra la ubicación de los dominios homólogos a la proteína ZMIZ1 de humano.

Patrón de expresión temporal *zmiz1b*

Previamente en mi tesis de licenciatura³⁹, reporté el patrón de expresión temporal de *zmiz1b* mediante RT-PCR y encontré que se expresa prácticamente

en todos los estadios del desarrollo embrionario (figura 6) y en algunos órganos adultos, destacando su abundante presencia en ovario (figura 7).

En el laboratorio como parte del trabajo de maestría de M.C. Francisco Castillo, se utilizó la tecnología CRISPR/Cas9⁴⁰ (del inglés Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/ CRISPR Asociated) para generar peces mutantes de *zmiz1b*, los cuales posteriormente, durante mi tesis de licenciatura, me encargue de genotipificar y seleccionar los peces cebra, que se utilizarían para expandir líneas homogéneas mutantes. Actualmente disponemos de la F2 de dos líneas que presentan distintas deleciones de 11 pb (Figura 8) en el sitio blanco localizado en el exón número seis, las cuales ocasionarían un cambio en el marco de lectura seguido de la formación de un codón de paro prematuro, que resultaría en la generación de proteínas trucas de 208 aa que únicamente tendrían el dominio TPR (Figura 9). La mutante de *zimp10b* se generó con el fin de determinar el efecto de la pérdida de función de este gen durante el desarrollo embrionario.

La mutante de *zimp10b* se generó con el fin de determinar el efecto de la pérdida de función de este gen durante el desarrollo embrionario.

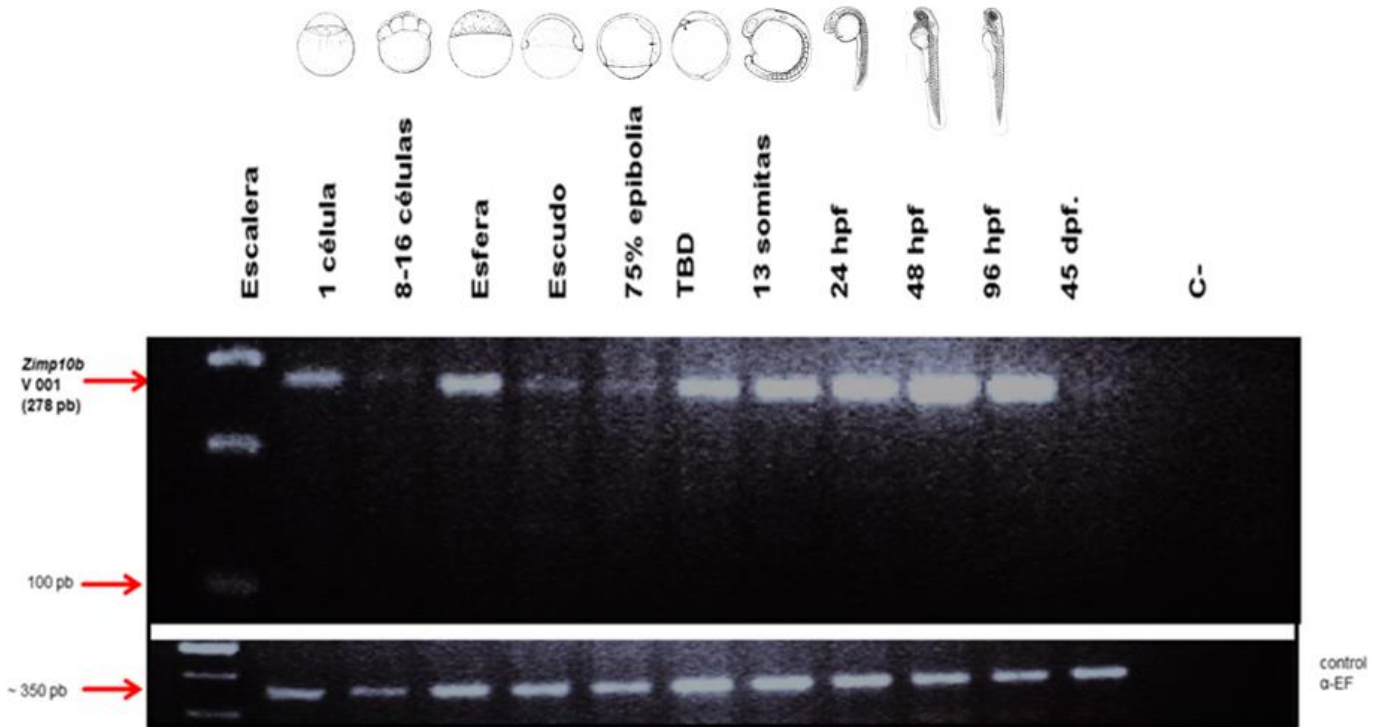
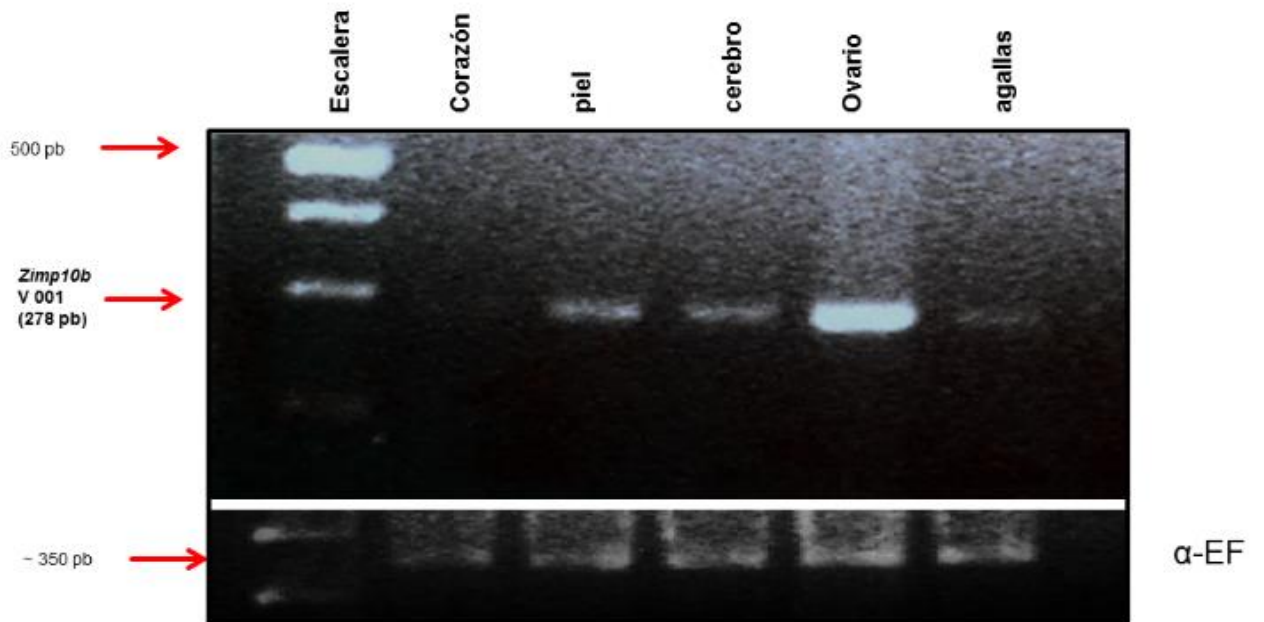


Figura 6. Determinación del momento de expresión de *zmiz1b* en distintos estadios del pez cebra. Gel de agarosa al 3%. En él se muestran los resultados de la amplificación por PCR de ADNc de embriones AB de distintos estadios del desarrollo del pez cebra ³³.

A)



B)

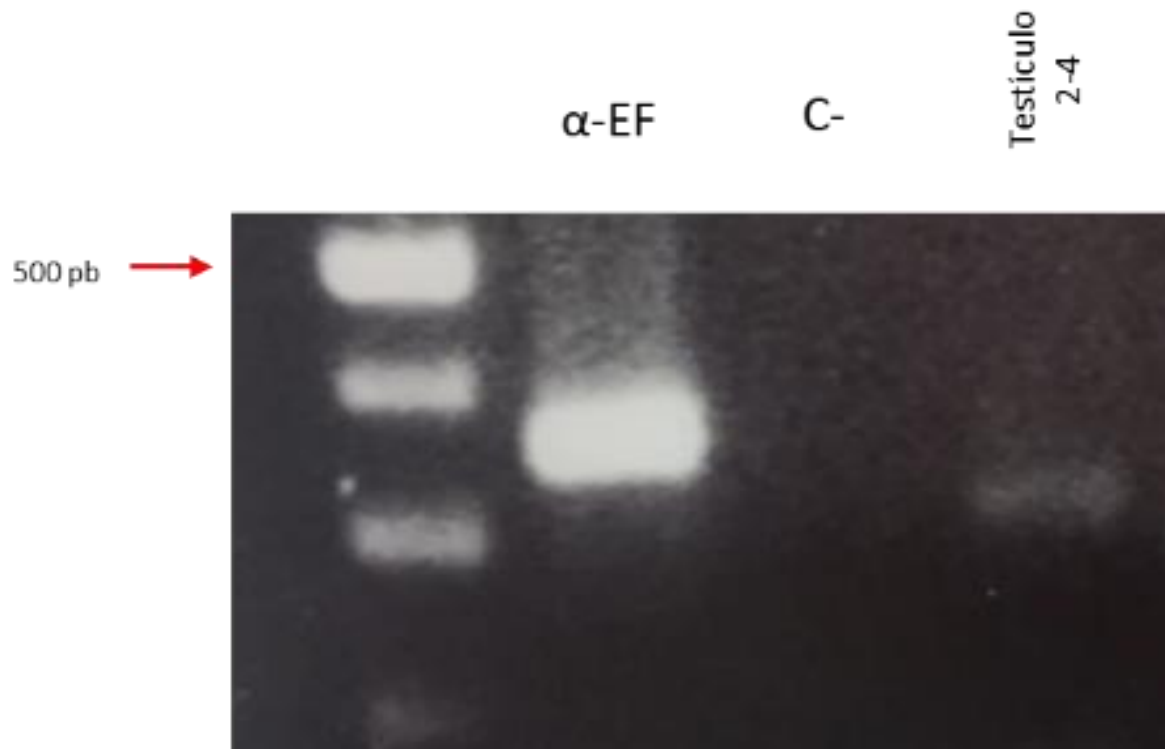


Figura 7. Expresión diferencial de *zmiz1b* en distintos órganos de pez cebra adulto. A) Gel de agarosa al 3%. En él se muestran los resultados de la amplificación por PCR de ADNc de distintos órganos extraídos de una hembra adulta AB de tres meses de edad. B) se observa la expresión de *zmiz1b* en testículo de macho adulto³³.

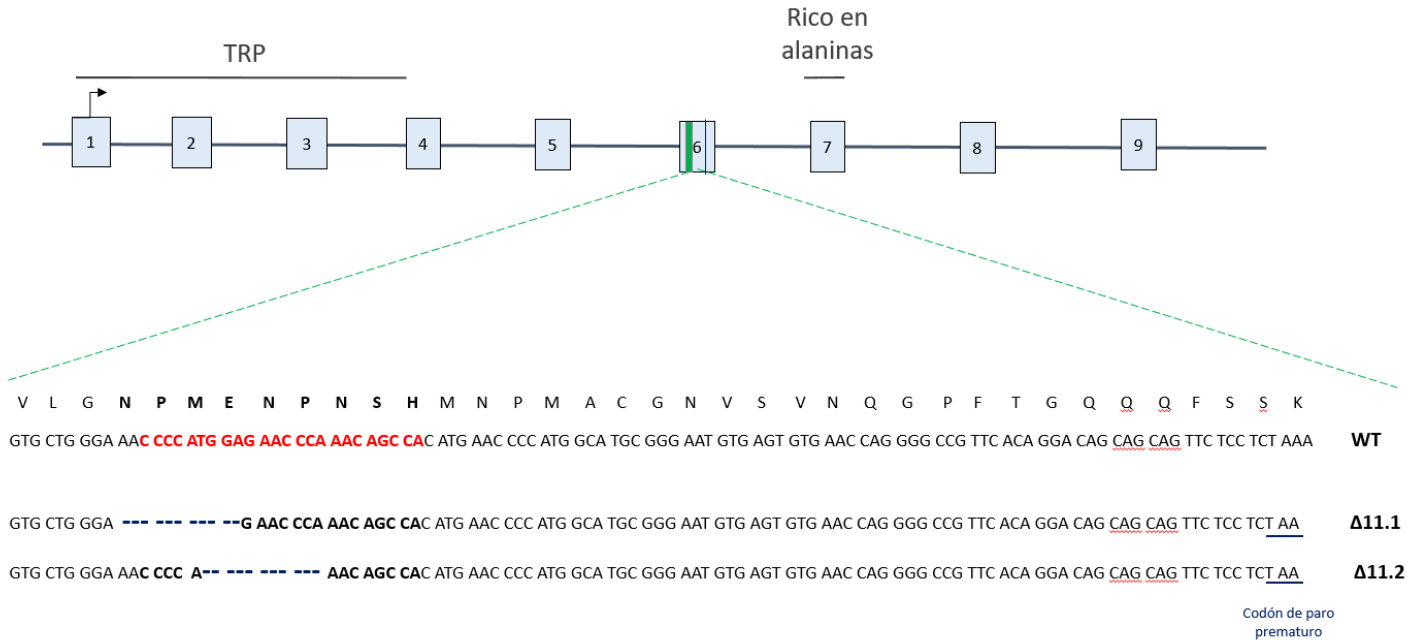


Figura 8. Diferentes deleciones producidas por CRISPR/Cas9 en el exón 6 del gen *zmiz1b*. Secuencias del sitio blanco de *zmiz1b* de plásmidos provenientes de clonas distintas, generadas a partir de extracciones de ADN de las distintas líneas F1, proveniente de la cruce de un pez F0 previamente inyectado con el sistema CRISPR/Cas9 y una hembra silvestre AB, y de una muestra de un embrión silvestre, donde se observan las dos deleciones de 11 pb (señalado con una línea punteada) en la secuencia blanco (en rojo). Así mismo se señala el sitio en el que se generaría el codón de paro prematuro.

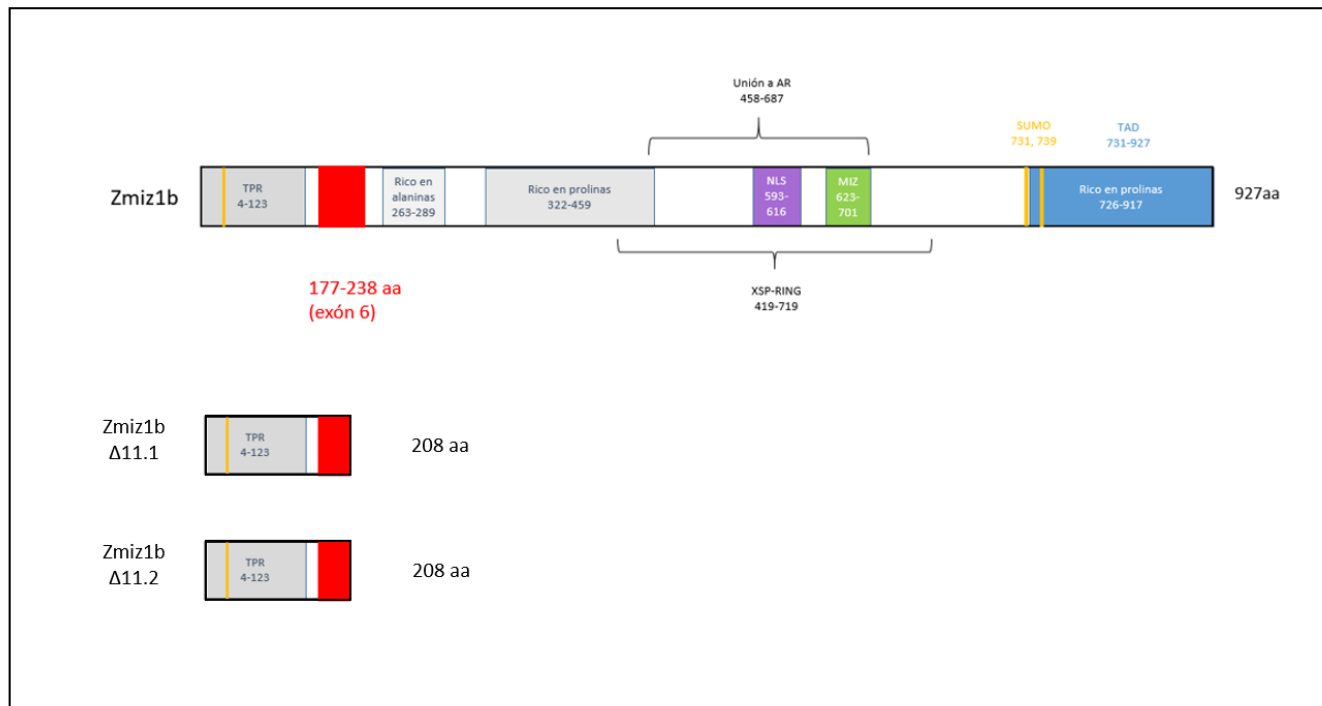


Figura 9. Representación de las proteínas Zmiz1b mutadas y silvestre. En la parte superior se observa la proteína silvestre mientras que en la parte inferior las versiones truncas de las proteínas *zmiz1b* mutadas.

HIPÓTESIS

- La pérdida de la función de la proteína Zmiz1b ocasionará un defecto importante en el desarrollo embrionario del pez cebra.

OBJETIVOS

Objetivo general

- Determinar la función de la proteína Zmiz1b durante el desarrollo embrionario del pez cebra.

Objetivos específicos

- ✚ Determinar el patrón de expresión espacio-temporal de *zmiz1b* durante el desarrollo embrionario de pez cebra.
- ✚ Evaluar la integridad del transcrito en los mutantes de *zmiz1b*.
- ✚ Determinar si la pérdida de función de *zmiz1b* causa un defecto morfológico o una limitación funcional.

JUSTIFICACIÓN

Como se mencionó anteriormente se sabe que en humanos mutaciones en ZMIZ1 causan un síndrome severo. Por ello, es importante conocer con detalle las funciones que tienen los genes ZMIZ en otros modelos biológicos. Se han descrito algunas funciones del gen *Zmiz1* en el ratón. Sin embargo, debido a la muerte de los embriones mutantes en la gestación media por una deficiencia placentaria, no se pudieron explorar etapas posteriores del desarrollo como por ejemplo, en sistema nervioso o retina. Dado que el pez tiene un desarrollo externo y puede vivir sin circulación por más tiempo, es posible que mutantes de *zmiz1* puedan estudiarse en etapas más avanzadas.

En pez cebra *zmiz1* se encuentra duplicado en el genoma y ambos homólogos (*zmiz1a* y *zmiz1b*) tienen patrones de expresión interesantes. En el laboratorio ya hemos descrito algunas funciones de *Zmiz1a*. Por ello, resulta relevante saber si *Zmiz1a* lleva a cabo una función distinta, conjunta o redundante a *Zmiz1a*. Debido a que *ZMIZ1* se encuentra conservado en la evolución, conocer

sus funciones en el pez cebra es importante también para entender el desarrollo de otras especies.

MATERIALES Y METODOS

Cuidado y mantenimiento de los peces cebra

Las larvas y peces adultos de las diferentes líneas transgénicas y silvestres que se utilizaron en este proyecto, se mantuvieron en el bioterio, bajo las siguientes condiciones: fotoperiodos de luz de 14 horas y 10 horas de oscuridad, se cuidaba que las condiciones del agua fueran las siguientes un pH de 6.8-7.2, conductividad entre 500-700 μS y que la temperatura estuviera entre 26°C-29°C. Los peces adultos (a partir de 3 meses de edad) se alimentaron con artemia viva y/o alimento en polvo (Gemma micro Diamond 0.8, Skretting), mientras que las larvas se alimentaban después del 5to dpc con rotíferos vivos y posteriormente con artemia viva y/o alimento en polvo especial para cada etapa de su desarrollo baby1 5-30dpf (GEMMA micro75), baby2 1-1.5 meses (GEMMA micro 150 y GEMMA micro75, en proporción 5:1, Skretting), juvenil 1.5-3 meses (GEMMA micro 300 y GEMMA micro 150, en proporción 5:1, Skretting).

Genotipificación

La extracción de DNA genómico para cada individuo, se realizó mediante la toma de una muestra de alguna de las siguientes formas: aleta caudal, de un embrión completo o de la mitad del embrión, posteriormente se incubaron las

muestras en 50 µl de buffer de lisis con proteinasa K (KCl mM, NaCl 200mM, Tris 10mM a pH 8, gelatina 0.01% NP-40 0.45%, Twen, EDTA 5 mM a pH 8, proteinasa K 20 mg/ml) a 56°C por 3h. Seguido de la inactivación de la proteinasa K por calor a 96°C por 10 min.

Posteriormente el DNA extraído se utilizó para hacer una reacción de PCR, usando oligonucleótidos específicos para cada gen. Las amplificaciones resultantes se observaron mediante geles de agarosa.

La identificación del genotipo se hacía mediante las diferencias observadas en el gel durante la comparación del peso de la bandas de interés con la muestra silvestre.

genotipo	Oligonucleótido sentido	Oligonucleótido antisentido
zmiz1b	5' TGTGTTTAGGTGCTGGGA 3'	5' TTGGGCTCATTTTAGAGGAGAA 3'
zmiz1a	5' TTCTCCACAGGTTGTAAGCC 3'	5' AAGATTTCCCGTCACATCAC 3'
baf57	5' CATCGCGTACCCACATCCAC 3'	5' TCCTCTCGGCTGGCTTTTA 3'

Extracción de ARN.

Para la extracción de ARN se utilizaron muestras de diferentes órganos de peces adultos (ovario, cerebro, testículos, etc.), así como de grupos de 10, 15 y 30 embriones mediante la técnica de fenol-cloroformo con TRIZOL, siguiendo las recomendaciones del fabricante (Life Technologies).

Síntesis de DNA complementario (cDNA).

El cDNA se sintetizó a partir de las muestras de ARN descritas en el apartado anterior, mediante retro transcripción con oligonucleótidos sintéticos (Random Primers) (Thermo Scientific) y M-MLV transcriptasa reversa siguiendo las recomendaciones del fabricante (Invitrogen). El cDNA resultante se diluyó 1:40 para posteriormente utilizado en la reacción de PCR.

PCR

Posteriormente se realizó una PCR utilizando distintos pares de oligonucleótidos (Tabla 5): sentido y antisentido. Siguiendo el programa: 96°C por 5min, 40 ciclos de (96°C por 30s, Tm: 60-65°C por 30s y 72°C por 45s), 72°C por 10min y manteniendo a 4°C hasta su uso.

Región a la que se dirigen	Oligonucleótido sentido	Oligonucleótido antisentido
Exones del 5 al 10	5'AAACACCAATCAGCCACCAG3'	5'CAGACATTAACACAACATCA3'
Exones del 5 al 7	5'AAACACCAATCAGCCACCAG3'	5'TCTGTGATAAGCCCATCCCA '
Exones del 9 al 10	5'CTATGGGCAGCAGTTTAGG3'	5'CAGACATTAACACAACATCA3'
Exones del 1 al 4	5'TGAACACTCTGCCGTCCA3'	5'AGGTTCTGTTTCCGTGGTGA3'
Exones del 4 al 8	5'ACA AAC TGA TCC ATC AGC GG 3'	5'ACGGCTGACCCATAACCAAA3'
Factor de elongación (EF-α)	5' GAT CCA TTG GAG GGC AAG TCT 3'	5' CCA AGA TCC AAC TAC GAG CTT TTT 3'

Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados para RT-PCR.

Clonación.

Se purificaron los productos de PCR por columna (GeneJET Gel Extraction Kit) (Thermo Scientific) de acuerdo a las indicaciones del fabricante. A continuación, se clonaron los fragmentos en el plásmido pJET1.2/Blunt siguiendo las recomendaciones del protocolo Sticky-End Cloning, del kit CloneJET PCR Cloning (Thermo Scientific).

Transformación.

Las ligaciones previamente purificadas se transformaron mediante electroporación de células electrocompetentes (*E. coli* cepa DH5á [$\sim 2.5 \times 10^8$ células/ml]) en electroporador gene pulser II (BIO RAD), con las siguientes condiciones capacitancia de 3 μ F, voltaje de 2.5kV y una resistencia de 200 ohm.

Posteriormente se dejaron recuperar en 1ml de medio LB a 37°C por 1 hora con agitación a 150 rpm, para después plaquear 200 μ l en agar LB con 0.05% ampicilina e incubar por 8horas a 37°C, de ahí se inocularon al azar colonias en medio de cultivo LB con ampicilina, dejando crecer por 8horas el cultivo secundario, luego se extrajo el ADN plasmídico.

Diseño de sondas para HIS

Para este diseño se utilizó el siguiente par de oligonucleótidos 5'AAACACCAATCAGCCACCAG3' Y 5'CAGACATTAAACACAACATCA3', que abracan una región de 897 pb, cabe mencionar que este diseño solo hibrida de manera específica con *zmiz1b* (100% de identidad), mientras que para *zmiz1a*, no se considera que debería hibridar (67% de identidad), los datos anteriores de

especificidad se obtuvieron mediante alineamientos con otras secuencias (usando la herramienta *blast*).

Identificación de sondas

Se realizó una digestión con *NotI* y *BamHI*, y su posterior visualización en geles de agarosa al 1%. Determinando el sentido de acuerdo al patrón de bandeo de las muestras (1 banda de 773 pb indicaban que se encontraban en sentido sense, mientras que una de 124 pb pertenecía al sentido antisense). Una vez identificadas ambas sondas la sentido y la antisentido, se mandaron a secuenciar en la unidad de síntesis y secuenciación del Instituto de Biotecnología, UNAM a través del secuenciador Sanger automático de ADN de 16 capilares (Applied Biosystems, modelo 3130xl).

Posteriormente para generar ambas sondas, la sentido y la antisentido, se linearizó 1.5µg de cada uno de los plásmidos antes mencionados, con la enzima *XbaI*, seguida de la purificación con fenol-cloroformo. El producto se cuantificó, luego se tomaron 1 µg de cada plásmido para llevar a cabo la transcripción con la enzima RNA transcriptasa T7 (Roche) utilizando nucleótidos marcados con Digoxigenina (DIG, de Roche). Posteriormente se añadió 1µl de DNasa por 15 min a 37 °C, para después purificar las muestras con LiCl, una vez lista la sonda se cuantificó y guardó a -20°C hasta su uso.

Hibridación in situ (HIS)

Para cada tratamiento de HIS se recolectaron alrededor de 40-60 embriones de diversos estadios (tratados con feniltiourea (PTU), inhibidor de la biosíntesis de

la melanina), los cuales se decorionaron y fijaron con paraformaldehído al 4% (PFA) por un máximo de 48 horas en agitación suave a 4°C. Posteriormente, se lavaron con PBST y se deshidrataron gradualmente con metanol/PBST (al 25%, 50%, 75% y 100%), se guardaron a -20°C hasta su uso.

Se rehidrataron las muestras de manera gradual con PBST/metanol (25%, 50%, 75% y 100%), posteriormente se trataron con 10µl/ml de proteinasa k de acuerdo a su etapa, 30s (1célula -1 somita), 3 min (somitogenesis), 10 min (24 horas) y 30 min (2-5días). Posteriormente se les añadió a las muestras 500 µl PFA 4% y se dejaron en agitación suave durante 20 min, luego se incubaron en solución de pre-hibridación (formamida 50%, SSC 5X, Tween 0.1% ácido cítrico 500mM) durante 24h a 72°C.

En cada experimento se observaron al menos 20 embriones y para cada estadio se hicieron tres réplicas biológicas. Los embriones se distribuyeron en dos grupos de cada estadio y se les adicionó en 250 µl de solución de hibridación (formamida 50%, SSC 5X, Tween 0.1%, ácido cítrico 500mM, heparina 50µg/ml, tRNA® de Sigma 50µg/ml) 250 ng de las sondas sentido a uno y la sonda antisentido a otro, se dejaron hibridando por 36 h, después se lavaron con soluciones graduales de solución de hibridación/buffer SSC 2x (al 75% 50%, 25%), cada lavado con una duración de 20 min a 70°, dos lavados con SSC 0.2x (100%) de 30 min cada uno. Seguido de lavados graduales con PBST/SSC 0.2x (25%, 50%, 75%, 100%). Posteriormente, se les agregó solución de bloqueo, y se incubaron con el anticuerpo anti-DIG (Roche) a una concentración de (1:2000) a 4°C por 24 h. se lavaron 6 veces las muestras con PBST.

Para el revelado de las HIS, se removió el anticuerpo restante, con seis lavados con PBST, y un lavado con solución AP-, seguido de tres lavados con solución AP+, cada lavado con duración de 15 min c/u a temperatura ambiente, posteriormente se les agregó Nitroblue Tetrazolium (NBT) y 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP) (Roche). Se dejaron revelando alrededor de 48 horas a 4°C y en completa oscuridad. Posteriormente se eliminó la solución de revelado, mediante tres lavados con solución stop (PBST y EDTA 1 mM), y PBST 1x a pH 3.0. Después se guardaron en glicerol y se fotografiaron (Modificado de ⁴¹).

Cortes histológicos.

Se utilizaron embriones previamente tratados según el protocolo para HIS, se dejaron fijando en solución Bouin (ácido pícrico, formaldehído, ácido acético glacial) por 12 horas a 25°C, después se deshidrataron con una serie de lavados con etanol a distintos grados, posteriormente se incluyeron en parafina de acuerdo al protocolo (Modificado de ⁴²), y se procedió a realizar los cortes de 15 uM de grosor en un micrótopo (Leica RM2145), los cuales se montaron en portaobjetos, para ser desparafinados y posteriormente fotografiados con una cámara AxioCam MR5 (Zeiss).

qPCR.

Para realizar estos experimentos utilizamos diluciones 1:40 de cDNA previamente sintetizado de muestras mutantes y silvestres. La reacción de PCR en tiempo real se llevó a cabo de acuerdo las especificaciones del fabricante Sybr® Green de Thermo Fisher. Se utilizó el siguiente par de oligonucleótidos: fwd 5´ACA

AAC TGA TCC ATC AGC GG 3' y rev 5' TCA CCA CGG AAA CAG AAC CT 3',
ubicados entre los exones 4-5.

Extracción de proteínas y *Western blot*.

Para esto se disectaron y extrajeron ovarios de hembras adultas con distintos genotipos, inmediatamente después de la extracción se expusieron a hielo durante 5 min y se lavaron 2 veces con PBS 1X pH 7.5, posteriormente se les añadió 250 μ l de buffer de lisis (25mM Tris pH 7.4, 2mM EDTA, una tableta de Complete mini EDTA-free Protease inhibitor mix (Roche®), 0.125%(v/v) IGEPAL, se llevo a 10 ml con agua miliQ) y se incubaron en agitación suave por 1 hora a 4 °C. Una vez transcurrido este tiempo se centrifugaron durante 10 min a 4°C a 13 000 rpm. Se traspasó a un tubo nuevo y se midió el volumen del sobrenadante, a partir de este se tomó una muestra pequeña 5 μ l para cuantificarlo usando el método de Bradford®, el resto del volumen reservado se mezcló con sample buffer 1X (Tris 62mM pH 6.8, SDS 2.3%, glicerol 10%, β -mercaptoetanol 5%, azul de bromofenol 0.1%, agua destilada) y se dejó el tubo sumergido en agua hirviendo por 5 min, posteriormente se pasó a hielo o se guardó a -20°C hasta su uso.

Las extracciones de proteína previamente descritas y cuantificadas se cargaron (30 μ g/ μ l de cada muestra) en los carriles de un gel SDS-PAGE al 8%, como control positivo se utilizaron células K562 (células de leucemia mielogena humana). Las proteínas ya separadas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se bloquearon con leche en polvo sin grasas al 5% en buffer TBST1X pH 7.5 (TRIS 200mM, NaCl 1.5 M, H₂O y Tween) por una hora a temperatura

ambiente, posteriormente las membranas se incubaron con el anticuerpo primario anti-ZMIZ1 (1:1000; ARP39413_P050; Aviva Systems Biology) y anti-Erk2 (1:5000;SC-1647; Santa Cruz Biotechnologies) durante toda la noche a 4°C en agitación suave. Después de la incubación con el anticuerpo primario, se lavaron las membranas con TBST 1X, y se incubó con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP): anti-conejo (1:5000, SC-2004, Santa Cruz Biotechnologies) y anti-ratón (1:5000, SC-2055, Santa Cruz Biotechnologies) por una hora a temperatura ambiente, posteriormente se lavó con TBST 1X para eliminar el exceso de anticuerpo.

Las bandas de proteínas se visualizaron usando un sustrato quimioluminiscente LumiGLO® (N° de catálogo: 700335, Cell Signaling Technology) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Ensayos de *o*-dianisidina

Para estos ensayos se recolectaron entre 15-20 embriones de 48 hpf de los diferentes genotipos (silvestres y *zmiz1b^{-/-}*) en tubos de 2 ml, se les retiró el agua se lavaron con PBST1X pH7.2. Posteriormente se incubaron durante 5 min en una solución que contenía 1 ml de *o*-Dianisidina® (d9143-5g, Sigma Aldrich) 1.5mg/ml, 25 ul NaOAc 1M pH 4.5, 1.425 ml H₂O miliQ, 50ul H₂O₂. Después se lavaron tres veces con H₂O miliQ, y posteriormente se fijaron con PFA 4% O/N, luego se volvieron a lavar con PBST 1X y se fotografiaron.

RESULTADOS

1. Patrón de expresión espacio temporal de *zmiz1b* (HIS)

Para conocer la localización espacio-temporal del transcrito *zmiz1b*, se diseñó una sonda de RNA de 897pb, a partir de una región entre los exones 5 y 10 del gen (Figura 10). Posteriormente se sintetizó junto con su respectiva sonda control (la cadena complementaria), mismas que se utilizarían para realizar ensayos de HIS.

Las muestras que se utilizaron en estos ensayos se trataron previamente con feniltiourea (*PTU*) que es un inhibidor de la biosíntesis de la melanina y por lo tanto impide la pigmentación de los embriones haciéndolos totalmente transparentes. Este tratamiento es necesario ya que la oscuridad de los melanocitos obstaculiza la detección de la señal (de fosfatasa alcalina) generada por la sonda de hibridación. Se incluyeron embriones desde 512 células hasta los 3 dpf, pasando por la epibolia, escudo, somitogenesis, 24, 48 y 72 hpf. A continuación se muestran únicamente los resultados de 24, 48, 72 hpf y ovario debido a que no se logró observar señal en estadios tempranos.

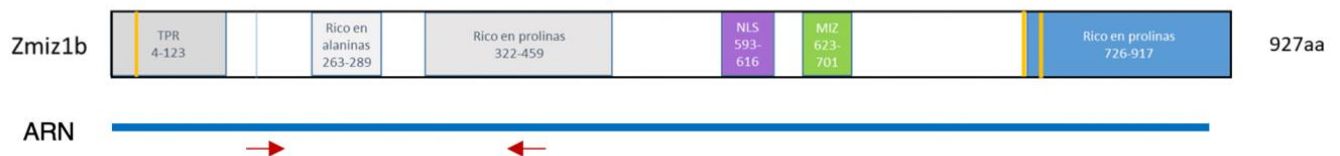


Figura 10. Localización de oligonucleótidos para ADNc usados como cebadores para la amplificación de *zmiz1b* (flechas rojas). Se genera un fragmento de 897 pb.

1.1 Expresión en larvas de 24 hpf

A las 24 hpf observamos señal de *zmiz1b* de manera generalizada en la cabeza: en el cerebro anterior, medio, posterior, cerebelo, tectum óptico, tegumento, ojo, placa olfatoria y el telencéfalo (figuras 11 y 12). En cortes transversales se observa mayor expresión en la médula espinal y en una región ventral del cerebro llamada “placa del piso”.



Figura 11. *Zmiz1b* se expresa en la cabeza a las 24 hpf. La señal positiva (morada) obtenida por HIS (imagen inferior) muestra presencia de transcritos principalmente en cerebro posterior (CP), cerebelo (C), tectum óptico (TO), tegumento (Teg), ojo (O), placa olfatoria (PO), telencéfalo (Tel). La imagen superior muestra un control negativo con una sonda que no es complementaria.



Figura 12. Zmiz1b se expresa en cerebro medio a las 24 hpf. Cortes histológicos de embriones de 24 hpf a la altura de la cabeza después de haber sido tratados para HIS. A) corte transversal en el que se observa la señal en el cerebro medio, particularmente en la médula espinal (ME) y la placa de piso (PP) (flechas). B) Corte longitudinal de la cabeza, se observa la señal en la mesénquima hioideo (MH), mesénquima mandibular (MM), Mesénquima de la cabeza (MCab), lente (L), retina (R), receso optico (RO), teléncefalo (Tel).

1.2 Expresión en larvas de 48 hpf

En embriones de 48 hpf tratados con la sonda sentido y anti-sentido, la señal se encontró en las aletas pectorales (AP), el cerebro anterior (CA), medio (CM) y posterior (CP), en el mesénquima mandibular (MM) y branquial (MB), cerebelo (C),

otolitos (Oto), boca (B), retina (R), mesénquima hioideo (MH), vesícula ótica (VOt), telencéfalo (Tel) y diencéfalo (Die) (figura 13 y 14).

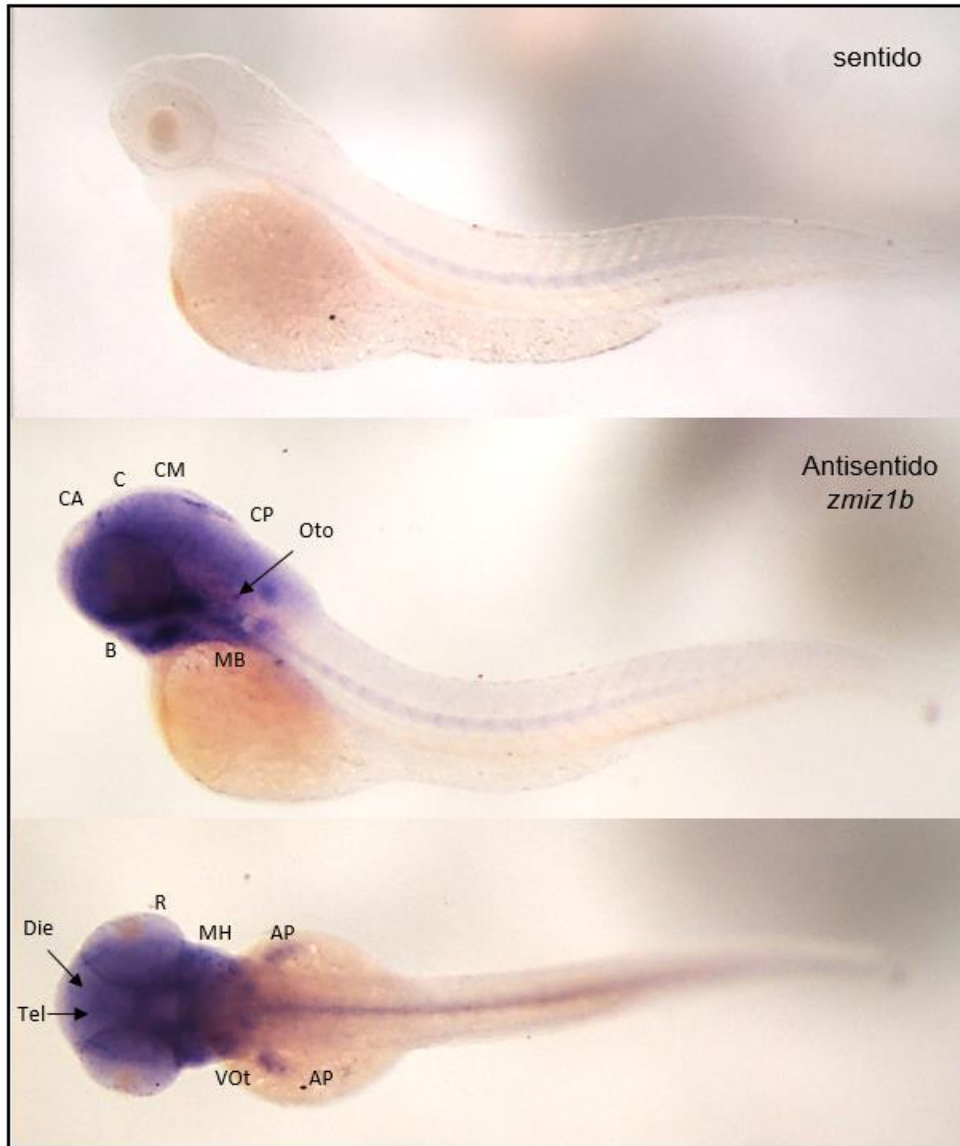


Figura 13. Zmiz1b se expresa en la cabeza y aletas a las 48 hpf. Se muestra una vista lateral de un embrión tratado con la sonda sentido (imagen superior). En las imágenes media e inferior muestran vistas lateral y dorsal de embriones. La señal obtenida con la sonda antisentido se detecta en el cerebro anterior (CA), cerebelo (C), cerebro medio (CM), cerebro posterior (CP), otolitos (Oto), boca (B), mesénquima branquial (MB), retina (R), mesénquima hioideo (MH), aleta pectoral (AP), vesícula ótica (VOt), telencéfalo (Tel), diencéfalo (Die).

Posteriormente se realizaron algunos cortes de estos embriones, en los que observamos señal en el cerebro posterior caudal, aletas y ojo, mesénquima mandibular.

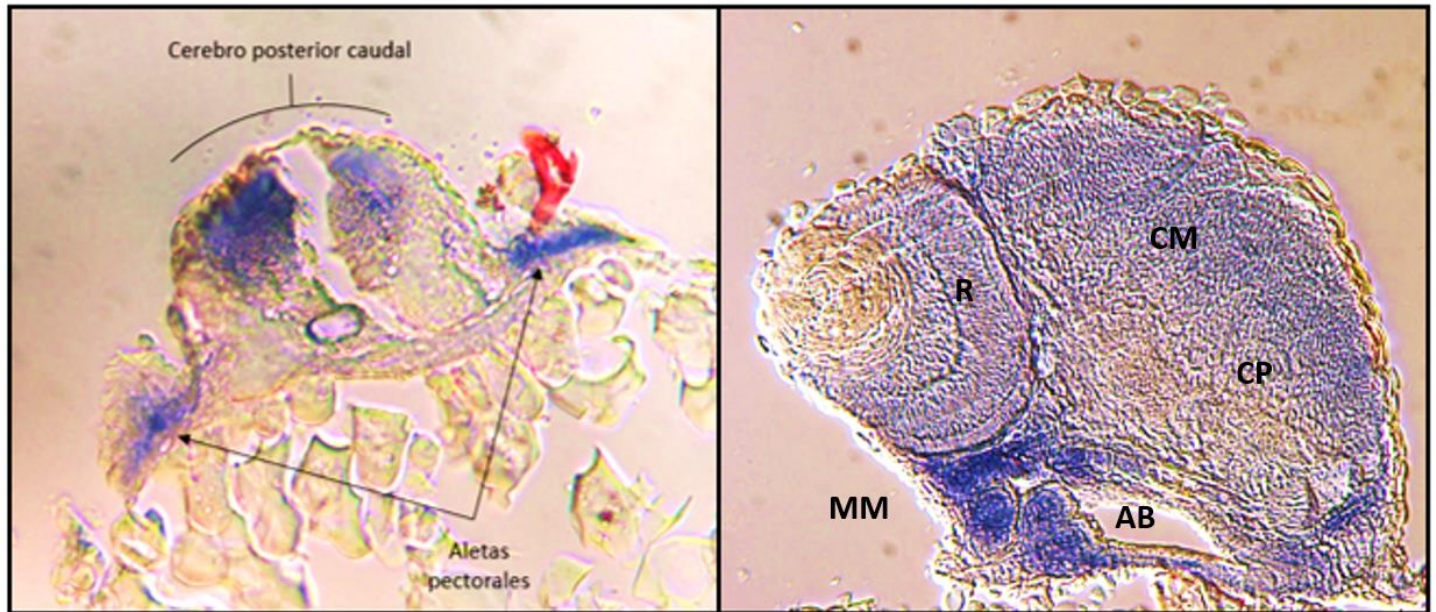


Figura 14. Zmiz1b se expresa en cerebro posterior caudal y en las aletas pectorales a las 48 hpf. Izquierda, corte transversal en el que se observa tinción en el cerebro posterior caudal y las aletas pectorales. Derecha, corte lateral en el que se observa señal en la cabeza, en lo que sería el mesénquima mandibular (MM), la retina del ojo (R), el arco branquial (AR), el cerebro medio (CM) y posterior (CP).

1.3 Expresión en larvas de 72 hpf

La expresión del transcrito de *zmiz1b* a los 3 dpf se sigue conservando en la cabeza, en el cerebro anterior (CA), medio (CM) y posterior (CP), así como en la retina del ojo (R), el telencéfalo (Tel), el cerebelo (C) y el mielencéfalo (Mie) (figura 15).

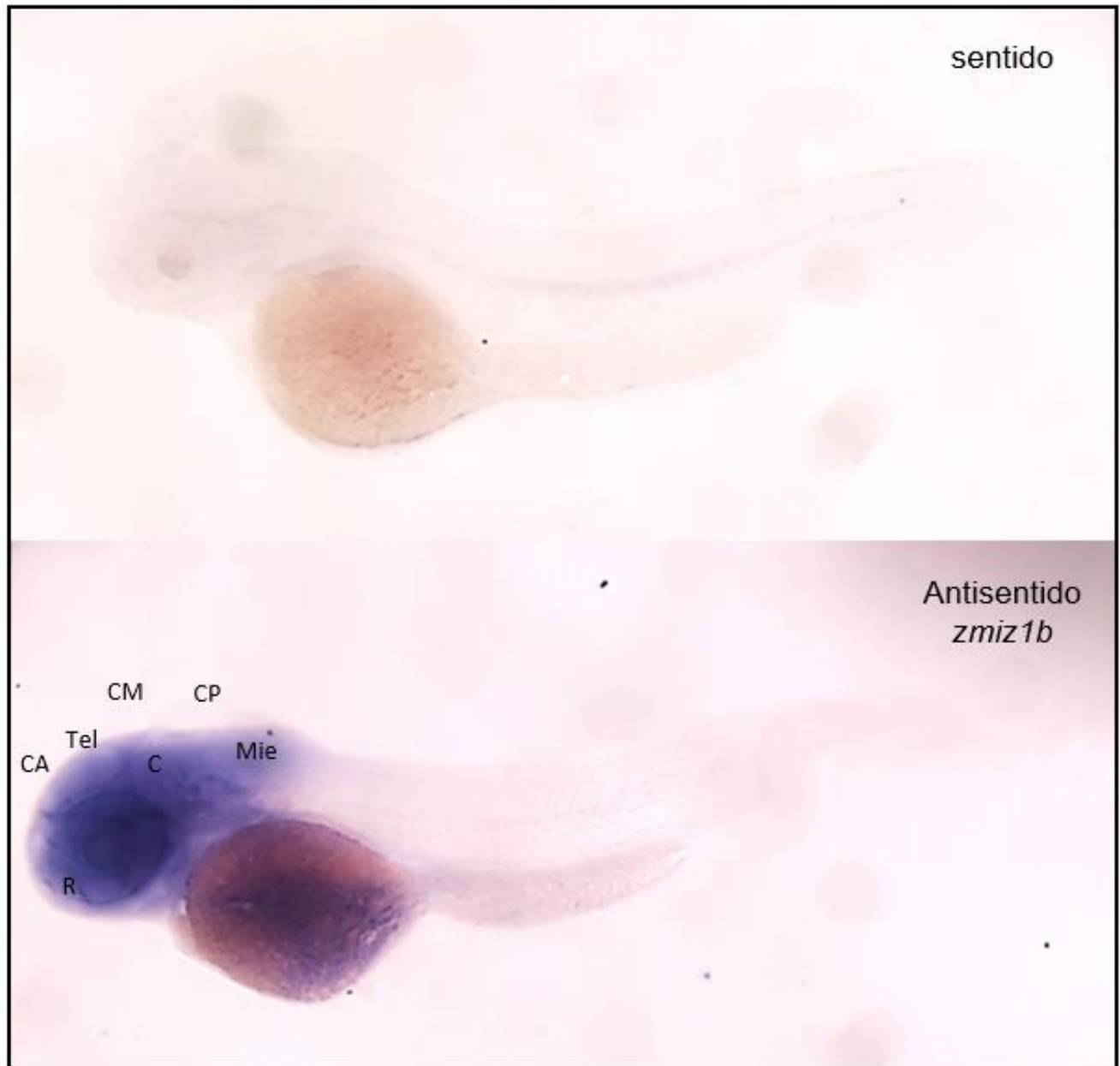


Figura 15. *Zmis1b* se expresa en la cabeza a los 3 dpf. La señal se observa principalmente cerebro anterior (CA), medio (CM) y posterior (CP), así como en la retina del ojo (R), el telencéfalo (Tel), el cerebelo (C), boca (B) y el mielencéfalo (Mie).

Expresión de *zmiz1b* en ovario de hembras adultas silvestres

Para estos ensayos utilizamos ovarios disectados de hembras adultas silvestres de un año de edad en los cuales detectamos señal positiva en el citoplasma de ovocitos de estadios tempranos Ib y II (ver figura 16).

Los ovocitos de la etapa Ib se caracterizan por su crecimiento primario y el aumento de la actividad transcripcional; los de la etapa II presentan agregados de proteínas y carbohidratos llamados alveolos corticales y un aumento mayor de la transcripción. En estos ovocitos, se observó una distribución asimétrica de los transcritos de *zmiz1b* en el citoplasma, si bien, no se puede saber si la región de mayor concentración de señal sobrelapa con el cuerpo de balbiani (plasma germinal), que define al polo animal, o si se localiza en el polo opuesto del citoplasma.

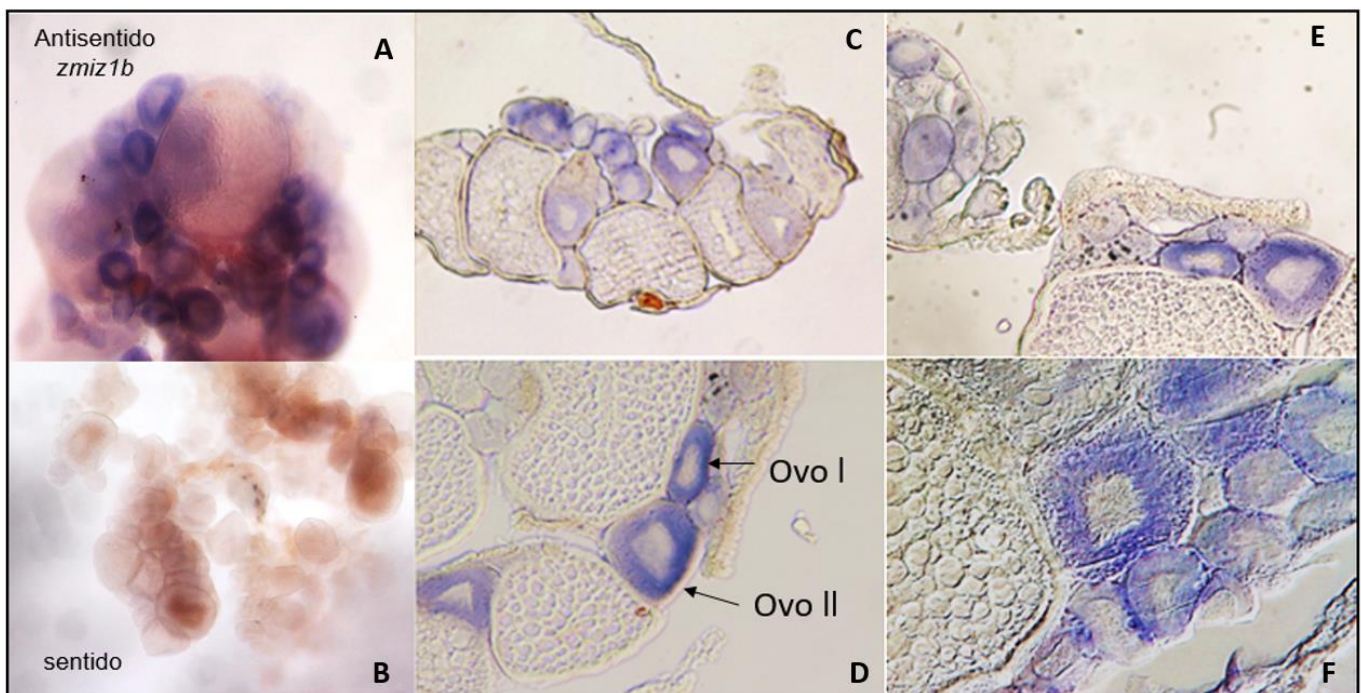


Figura 16. *zmiz1b* se expresa en ovocitos de estadios tempranos. Se muestran fotografías de HIS de dos ovarios enteros en donde se ve señal positiva (A-B). C-F, se muestran cortes histológicos en donde se aprecia que la señal corresponde al citoplasma de ovocitos de estadios Ib y II.

2. Estudio del fenotipo de pérdida de función de *zmiz1b*.

Para poder establecer la relación genotipo-fenotipo en nuestras líneas transgénicas fue necesario analizar detalladamente los resultados que se obtuvieron de las comparaciones morfológicas de los distintos estadios del desarrollo de embriones mutantes contra los silvestres. Para ello, generalmente se hacen observaciones del embrión completo, o bien, si no se detectan defectos visibles, se pueden comparar cortes histológicos teñidos (por ejemplo con eosina y hematoxilina) de las regiones donde se haya observado mayor expresión.

Posteriormente, si se encuentra algún fenotipo concreto se hacen ensayos de rescate del fenotipo, para lo cual se inyectaría el RNA mensajero de *zmiz1b*, en embriones mutantes nulos, para observar si se recupera el fenotipo normal.

Todos estos análisis se realizan en líneas mutantes, con alelos diferentes (mutantes distintas) para dar mayor robustez a los datos.

2.1 Expansión de la línea mutante *zmiz1b*

Se obtuvieron y genotipificaron peces adultos provenientes de cruzas de hembras y machos heterocigotos para *zmiz1b*. Se obtuvo una progenie con una distribución muy similar a la mendeliana esperada 1:2:1 (tabla 6), lo cual es distinto a lo que se ha observado para *zmiz1a* y significa que las mutantes de *zmiz1b* no presentan problemas de sobrevivencia hasta la etapa adulta.

♂ *zimiz1b*^{+/-}

X

♀ *zimiz1b*^{+/-}

Tabla 6. La distribución de genotipos peces adultos presenta un comportamiento normal. En la columna de en medio se presentan los porcentajes obtenidos en la genotipificación por PCR. Éstos se comparan con los porcentajes esperados. B representa al alelo silvestre y b es el alelo mutado.

Genotipo	Cantidad	Porcentaje esperado
Silvestre (BB)	18/69 (26.1%)	25%
Heterocigoto (Bb)	32/69 (46.4%)	50%
Homocigoto (bb)	19/69 (27.5%)	25%

No se observaron diferencias a simple vista en el fenotipo de peces adultos silvestres y mutantes para *zmiz1b* (Figura 17)

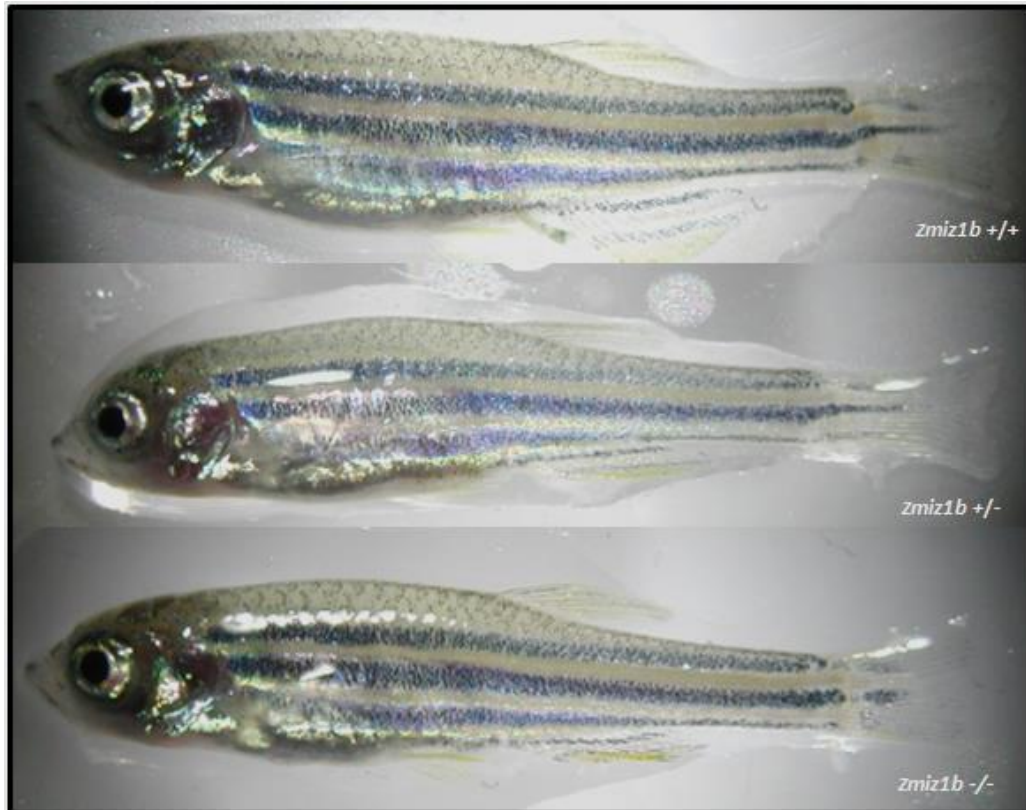


Figura 17. Los peces mutantes homocigotos no presentan diferencias visibles. Comparación fenotípica de peces silvestres (+/+), heterocigotos (+/-) y mutantes (-/-) para *zmiz1b*. Se observaron decenas de individuos en los que no se detectó ninguna anomalía.

Lo anterior podría deberse principalmente a tres razones:

1. Que la proteína de *Zmiz1b* no se requiere para alguna función.
2. Que sí se requiere, pero su ausencia se compensa por la actividad de *Zmiz1a* o a través de aumentar la expresión de otra proteína.
3. Que la mutación introducida en el gen no produjo la pérdida de la función esperada en la mutante. Esto último puede ocurrir a través de varios mecanismos que se describen más adelante

2.2 Análisis de la doble línea mutante de *zmiz1a*, *zmiz1b* en larvas de 21 dpf

Para analizar la posibilidad de que la ausencia de *Zmiz1b* se compensara por *Zmiz1a*, evaluamos la viabilidad de mutantes dobles *zmiz1a*^{-/-}/*zmiz1b*^{-/-}. Con ese objetivo se realizaron análisis genotípicos en larvas de 21 dpf, provenientes de la cruce de grupos de hembras y machos heterocigotos para *zmiz1a* y *zmiz1b* (ver tabla 7).

Genotipo obtenido de la cruce de hembras y machos heterocigotos para ambos genes:

♂ *zmiz1a*^{+/-}, *zmiz1b*^{+/-}

X

♀ *zmiz1a*^{+/-}, *zmiz1b*^{+/-}

Tabla 7. La mutación en *zmiz1b* no incrementa la muerte observada en las mutantes de *Zmiz1a*. Se determinaron los genotipos de la descendencia de cruces dobles heterocigotas para *zmiz1a* y *zmiz1b*. Se muestran los porcentajes obtenidos para cada combinación alélica y se compara con los porcentajes esperados considerando la mortalidad debida a la pérdida de función de *Zmiz1a*. Los genotipos se determinaron en larvas de 21 dpf. Se resalta con amarillo los resultados obtenidos para el genotipo doble mutante *zmiz1a*^{-/-}, *zmiz1b*^{-/-}.

Genotipo <i>zmiz1a</i>	Genotipo <i>zmiz1b</i>	Genotipo obtenido	Porcentaje esperado	Porcentaje esperado, considerando 8% de supervivencia en <i>zmiz1a</i>
+/+	+/+	1/18 (5.55%)	(6.25%)	8%
	+/-	1/18 (5.55%)	(12.5%)	16%
	-/-	1/18 (5.55%)	(6.25%)	8%
+/-	+/+	3/18 (16.6%)	(12.5%)	15%
	+/-	5/18 (27.7%)	(25%)	30%
	-/-	4/18 (22.2%)	(12.5%)	15%
-/-	+/+	1/18 (5.55%)	(6.25%)	2%
	+/-	1/18 (5.55%)	(12.5%)	4%
	-/-	1/18 (5.55%)	(6.25%)*	2%

Con base en los resultados obtenidos, sabemos que a los 21 días sí se encontraron larvas dobles homocigotas *zmiz1a^{-/-}/zmiz1b^{-/-}* en una proporción superior a la esperada (1/18) (5.5%), ya que sabemos que la proporción de mutantes nulas para *zmiz1a* en la población adulta es del 8% (19/240), puesto que presentan una letalidad del 75% de ellos entre los 15 -21 dpf, mientras que la proporción esperada de *zmiz1b^{-/-}* en adultos es de 25%. En este experimento de cruce encontramos 27.5% (19/69) de peces *zmiz1b^{-/-}*; por lo cual se esperaría encontrar 2/100 peces dobles mutantes adultos.

Para corroborar lo anterior, se dejaron creciendo hasta adultos peces provenientes de cruces de heterocigotos para el *zmiz1 a* y *b*, los cuales genotificamos y obtuvimos los siguientes resultados (tabla 8).

Tabla 8. Los peces adultos muestran distribuciones similares a las observadas en larvas de 21 dpf. Se determinaron los genotipos de la descendencia de cruza dobles heterocigotas para *zmiz1a* y *zmiz1b*. Se muestran los porcentajes obtenidos para cada combinación alélica y se compara con los porcentajes esperados considerando la mortalidad debida a la pérdida de función de *Zmiz1a*. Los genotipos se determinaron en peces adultos. Se resalta con amarillo los resultados obtenidos para el genotipo doble mutante *zmiz1a^{-/-}*, *zmiz1b^{-/-}*.

Genotipo <i>zmiz1a</i>	Genotipo <i>zmiz1b</i>	Genotipo obtenido	Porcentaje esperado	Porcentaje esperado, considerando 8% de sobrevivencia en <i>zmiz1a</i>
+/+	+/+	5/69 (7.2%)	(6.25%)	8%
	+/-	11/69 (15.9%)	(12.5%)	16%
	-/-	3/69 (4.3%)	(6.25%)	8%
+/-	+/+	13/69 (18.8%)	(12.5%)	15%
	+/-	20/69 (28.9%)	(25%)	30%
	-/-	13/69 (18.8%)	(12.5%)	15%
-/-	+/+	-	(6.25%)	2%
	+/-	1/69 (1.4%)	(12.5%)	4%
	-/-	3/69 (4.3%)	(6.25%)*	2%

Con base en lo anterior observamos que obtuvimos un 4.3% de peces dobles mutantes, lo que nos indica que la doble mutante en adultos es viable. Creemos que las variaciones obtenidas respecto al valor esperado son estadísticamente normales y se explican por el bajo número de individuos analizados.

En cuanto al fenotipo, no se observó ninguna diferencia a simple vista de los dobles mutantes con respecto al silvestre ni en etapas embrionarias ni en peces adultos (figura 18).

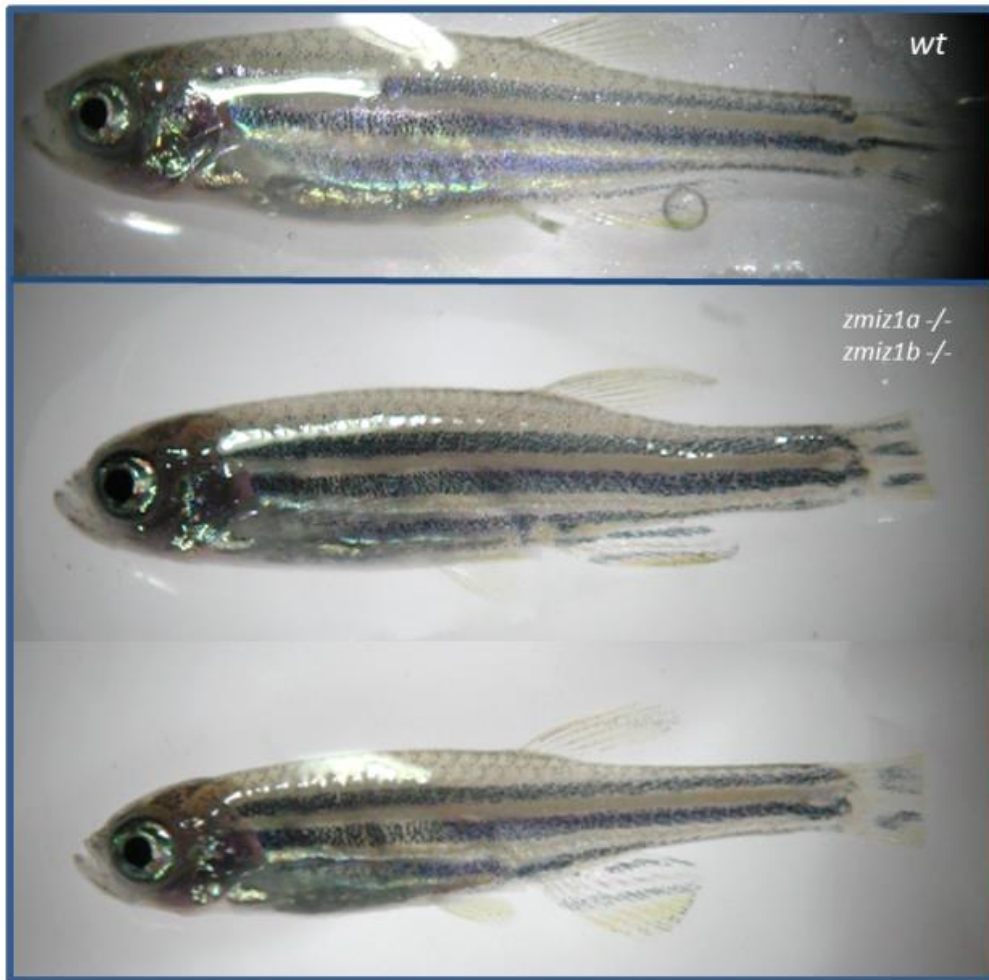


Figura 18. Los peces dobles mutantes homocigotos no presentan diferencias visibles. Comparación fenotípica de peces adultos silvestres (+/+) y dobles mutantes (-/-) para *zmiz1a* y *b*.

Ensayos de genotipificación se realizaron en conjunto con M.C. Fco. Castillo.

2.3 Estudio del fenotipo de mutantes *zmiz1b*^{-/-} en ausencia de herencia materna

Normalmente una cruce de peces heterocigotos (-/+) genera un porcentaje de peces mutantes (-/-) que no expresan el gen mutado. Sin embargo, los cigotos sí tienen el RNA mensajero y la proteína del gen normal, el cual se encuentra

presente en el huevo y por lo tanto es heredado por vía materna y permanece presente durante varias divisiones celulares. En especies como el pez cebra los transcritos maternos tienen un papel importante durante las primeras etapas del desarrollo, ya que la transcripción del cigoto inicia hasta después de la etapa de mil células. Sólo en etapas posteriores, cuando inicia la transcripción del cigoto y los transcritos maternos se degradan, empieza a revelarse el papel de la pérdida de función del gen mutado. Para determinar si en las mutantes de *zmiz1b* había un fenotipo temprano que estaba siendo enmascarado o rescatado por los transcritos maternos, hicimos cruza de peces adultos *zmiz1b^{-/-}* en cuya progenie (F3) no se encuentra el transcrito normal de *zmiz1b* en ningún momento. Analizamos la morfología de los embriones obtenidos desde etapas tempranas del desarrollo. Sin embargo, no observamos ninguna variación morfológica, lo que indicó que no había ningún tipo de rescate de herencia materna y que los peces mutantes no tenían ninguna anomalía. De igual manera, repetimos este mismo ensayo pero con cruza de peces dobles mutantes *zmiz1a^{-/-}/zmiz1b^{-/-}* x *zmiz1a^{-/-}/zmiz1b^{-/-}*, y tampoco observamos diferencias a simple vista. Por otro lado, sabemos que los homocigotos para *zmiz1a* presentan defectos en la eritropoyesis, así que realizamos ensayos de tinción con o-dianisidina (un colorante que reacciona con la hemoglobina) en larvas de 48 hpf, en muestras silvestres y mutantes para el gen *zmiz1b*. No vimos diferencias notables en la cantidad y distribución de los eritrocitos, que nos indicaran algún problema en esta dirección que debíamos profundizar. Lo cual nos sugiere que las mutantes no tienen problemas visibles a simple vista en la eritropoyesis primitiva. (Figura 19).

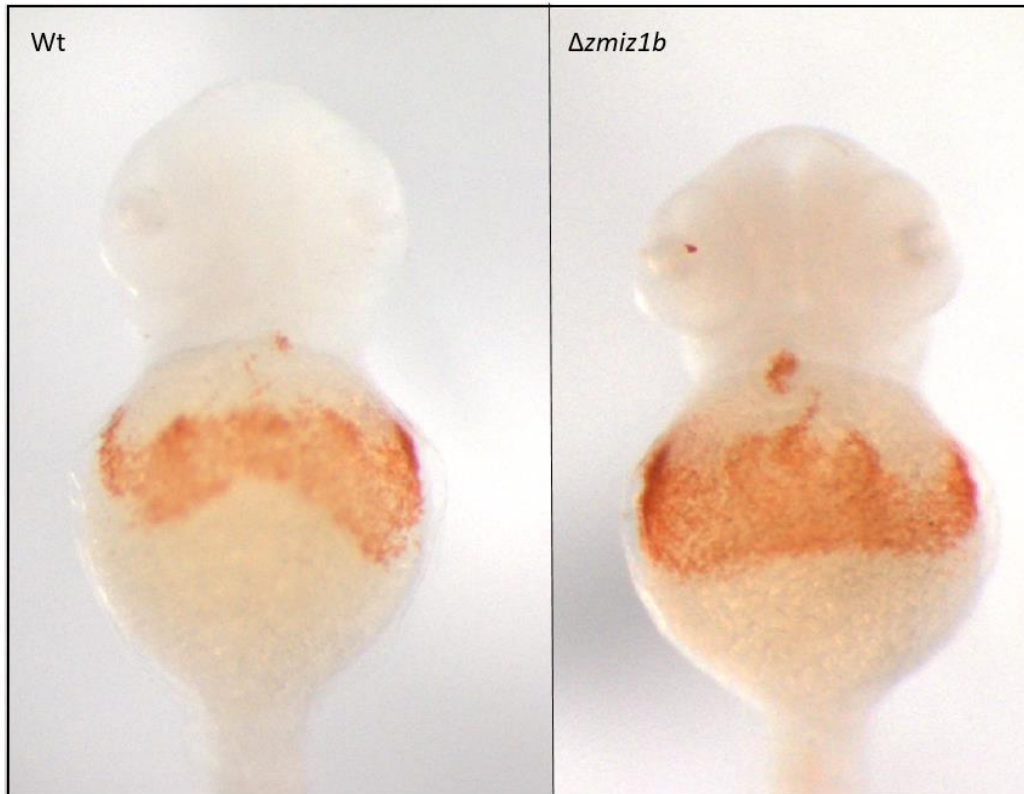


Figura 19. Los peces mutantes no muestran diferencias en su patrón de hemoglobinización. Se tiñeron embriones con o-dianisidina que reveló la presencia de hemoglobina en el vitelo. Imágenes ventrales de embriones de pez cebra de 48 hpf.

3. Validación de la pérdida de la función de Zmiz1b en líneas mutantes.

3.1 Análisis de la estabilidad y procesamiento del transcrito de *zmiz1b*

En vista de que no observamos ninguna anomalía en los embriones mutantes *zmiz1b*, ni vimos que se afectara la sobrevivencia de los peces mutantes tanto *zmiz1b*^{-/-} como *zmiz1a*^{-/-}/*zmiz1b*^{-/-}, concluimos que o bien, la proteína Zmiz1b no es necesaria para alguna función en el desarrollo embrionario o, que a pesar de

tener una mutación, los peces *zmiz1b*^{-/-} fueron capaces de generar una proteína funcional.

En relación a esta segunda hipótesis, se ha demostrado que la célula eucariote cuenta con diversos mecanismos para contender con los daños en el transcrito producidos por mutaciones, por ejemplo, se ha observado que en algunos casos se repara una mutación mediante la escisión durante el “*splicing*”, de uno o más exones, incluyendo al exón mutado (*exón skipping*)⁴³. De esta manera, si el número de nucleótidos de dicho exón, o de la combinación de exones deletados es múltiplo de tres, se mantiene la fase de lectura correcta y se puede producir una proteína que pierde únicamente los aminoácidos correspondientes al exón o exones deletados. Otro mecanismo de rescate de función que se ha demostrado, es que la traducción inicie en un ATG alternativo y subsecuente al sitio de la mutación, en cuyo caso, se produce una proteína que pierde los aminoácidos anteriores al sitio de la mutación⁴³. En ambas situaciones se omiten los efectos de la mutación y se obtiene una proteína que puede ser funcional. Por esta razón, cuando se diseña el RNA guía y se selecciona la secuencia que se desea mutar, es importante que esta secuencia quede dentro de un exón cuya longitud en nucleótidos no sea múltiplo de tres, para que se lleve a cabo un cambio el marco de lectura y se genere una proteína trunca no funcional.

Otro aspecto que hay que considerar es el llamado NMRD (en inglés: non-coding mRNA degradation) o ‘*mRNA decay*’. Este es un mecanismo que opera en células eucariotes que consiste en la degradación de los transcritos largos no-codificantes⁴⁴. Es un proceso ampliamente descrito que se induce para eliminar

RNAs mensajeros con deleciones o mutaciones. Se ha estudiado el mecanismo que activa esta degradación y se sabe que su inducción no ocurre en todos los casos, sino que depende de la ubicación de una mutación respecto al inicio del exón en que se localiza⁴⁵. De esta forma, en ocasiones algunos RNAs no codificantes escapan a este fenómeno. En el caso de la mutación que se introdujo en el gen *zmiz1b* pudimos predecir que probablemente no se induciría el mRNA decay y por lo tanto el mensajero defectuoso permanecería en la célula con la posibilidad de generar una proteína funcional de las maneras que se propusieron anteriormente.

Para explorar las hipótesis anteriores realizamos un análisis de RT-PCR en el que se compararon muestras de cDNA tanto silvestres como mutantes, a lo largo de diferentes regiones del transcrito, es decir, generamos amplicones que incluyeron el sitio en el que está la mutación, o que se ubicaron antes o después de ella. Así, mediante la observación de la expresión de los transcritos y de los fragmentos obtenidos, podría conocerse si en peces mutantes el mRNA de *zmiz1b* estaba siendo degradado o no, o si los RNAs generados contenían deleciones de exones, y podría tenerse una idea de cómo podría estar la proteína. Para conocer lo anterior, diseñamos un par de oligonucleótidos que se dirigían a una región entre los exones cuatro al ocho, y daría productos de 659 pb si la secuencia se encuentra completa (tipo silvestre) o de 477 pb si se deletaba el exón 6 (sitio en el que se encuentra la deleción de 11 pb). Sabemos que el exón 6, en el que se encuentra la mutación tiene 182pb, lo que significa que no es múltiplo de tres, por lo que de escindirse dicho exón se generaría un cambio de marco de lectura, que resultaría en una

proteína trunca de 181 aa; por lo tanto, se esperaría que se escindieran más exones para producir una recuperación de la fase de lectura.

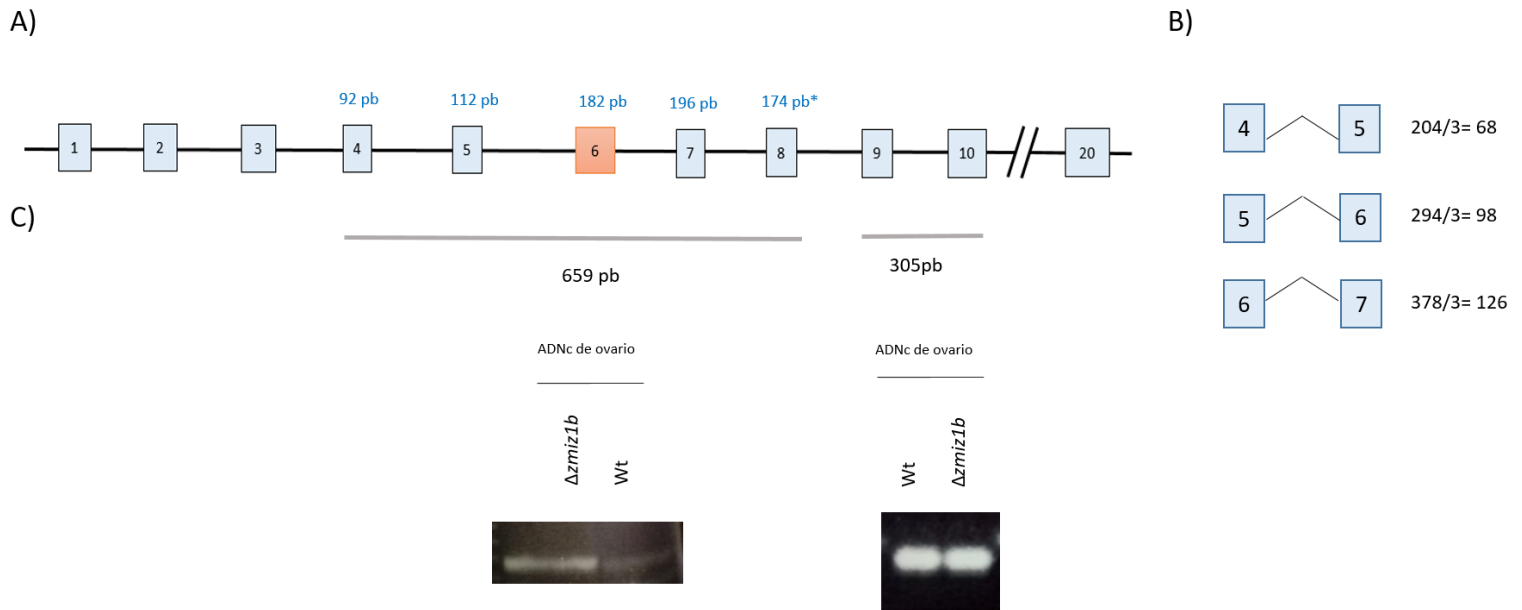


Figura 20. El transcrito de *zmiz1b* se mantiene en los mutantes y no se producen transcritos con pérdida de exones. Experimentos de PCR demostraron que no hay procesamientos alternativos del mensajero de *zmiz1b*. A) Se muestran las regiones genómicas que se analizaron. B) Se muestran las posibles combinaciones que generarían fragmentos múltiples de tres. C) Se observan los productos que se obtuvieron por RT-PCR, se amplifican de los exones 9-10 y 4-8.

Después de realizar los análisis de RT-PCR, observamos que el amplicón que incluye el exón mutado (exones 4 al 8) se expresa tanto en peces silvestres como en mutantes (ver figura 20) y presenta los tamaños predichos (659 pb para el silvestre y 648 para pb el mutado), posteriormente se secuenciaron estos productos, y se confirmó la presencia de la delección de 11 pb (figura 21). No identificamos bandas de menor tamaño con estos “cebadores”, lo que significa que no ocurrió la

escisión de ningún exón. Además, se amplificó la banda correspondiente a los exones 9 y 10, lo que indica que el transcrito no está siendo degradado en los peces mutantes (figura 20C).

```

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

zmiz1bWt_exones4a18      -ACAYGAGATCTGACGGCTCCACAAACTGAGTGTGTAAGCCTGGCCTGACCCCATCTGG  59
zmiz1bMut_exones4a18     GGCTYGAAGTCTGACGGCTCCACAAACTGAGTGTGTAAGCCTGGCCTGACCCCATCTGG  60
                          * ** *
                          *****

zmiz1bWt_exones4a18      AAGGACGAGCACACCGCACGTACTGGTTCATGTCTTGTGTGTCTCATGCAGCGCG  119
zmiz1bMut_exones4a18     AAGGACGAGCACACCGCACGTACTGGTTCATGTCTTGTGTGTCTCATGCAGCGCG  120
                          *****

zmiz1bWt_exones4a18      GCAACCGTTGCCGTGGCGTGGCTGTTGCAGTGGCAGCAGCGGCAGCAACAGCAGCAGCG  179
zmiz1bMut_exones4a18     GCAACCGTTGCCGTGGCGTGGCTGTTGCAGTGGCAGCAGCGGCAGCAACAGCAGCAGCG  180
                          *****

zmiz1bWt_exones4a18      GCAGCAGCAGCAGCTGGTTGGCTGAGGTGAGAAGGGGGCGTGTCTGTGATAAGCCATC  239
zmiz1bMut_exones4a18     GCAGCAGCAGCAGCTGGTTGGCTGAGGTGAGAAGGGGGCGTGTCTGTGATAAGCCATC  240
                          *****

zmiz1bWt_exones4a18      CCACCTGCATAATTAGGACCGCCCCATAACTGCTGAATCCTGCTCCTCCTGCAGTGTGT  299
zmiz1bMut_exones4a18     CCACCTGCATAATTAGGACCGCCCCATAACTGCTGAATCCTGCTCCTCCTGCAGTGTGT  300
                          *****

zmiz1bWt_exones4a18      GTGGATCTCCCGTACTGCATATACGCTGCGTTTGGGCTCATTTAGAGGAGAAGTGTGC  359
zmiz1bMut_exones4a18     GTGGATCTCCCGTACTGCATATACGCTGCGTTTGGGCTCATTTAGAGGAGAAGTGTGC  360
                          *****

zmiz1bWt_exones4a18      TGTCCTGTGAACGGCCCGGGTTCACACTCACATTCCCGCATGCCATGGGGTTCATGTGG  419
zmiz1bMut_exones4a18     TGTCCTGTGAACGGCCCGGGTTCACACTCACATTCCCGCATGCCATGGGGTTCATGTGG  420
                          *****

zmiz1bWt_exones4a18      CTGTTTGGGTTCTCCATGGGGTTTCCAGCACCTGASTCTGTGAKGTATTGGTCACACCC  479
zmiz1bMut_exones4a18     CTGTTTGGGTTCT-----CCAGCACCTGACTCTGWGATGTATTGKTCACACCC  469
                          *****

zmiz1bWt_exones4a18      CACACGGTGGTCACCACGGAACAGAGCCTGGTGKMTGATTGGTGTTTTGTGCCAGGAG  539
zmiz1bMut_exones4a18     CAMWCSGKGGTCACCMCGSAACRGAWCCTGGTGTATGATTGGTGTTTTGTGCCAGGAG  529
                          ** * * ***** ** ** * * ***** *****

zmiz1bWt_exones4a18      ACCGAGTCGTATTGAAATGTATCGCGTGTGTGTCAGTGGTGTCTTCATGTTGTTGATGCTG  599
zmiz1bMut_exones4a18     ACCGAGTCGTATTGAAATGTATCGCGTGTGTGTCAGTGGTGTCTTCATGTTGTTAATGCTG  589
                          *****

zmiz1bWt_exones4a18      TGTTTCACCGCTGATGGTYCAATTTTGTGA  629
zmiz1bMut_exones4a18     TGTTTCACCGCTGATGGATCAGTTTGTGA--  617
                          *****

```

Figura 21. El transcrito de *zmiz1b* se mantiene en los mutantes y no se producen transcritos con pérdida de exones. La secuenciación de transcritos de embriones silvestres y mutantes demuestra que hay homología a todo lo largo de la región correspondiente a los exones 4 a 8 y que se puede identificar la delección correspondiente a la mutación. Amplificaciones de los exones 4 al 8 de ADNc de ovario silvestre y mutante.

3.2 Rescate de la proteína: Un sitio alternativo de inicio de la traducción.

Al revisar con detalle la secuencia del exón 6, nos percatamos de que muy cerca del sitio de la mutación, y en la misma fase de lectura de Zimp10b, se encuentran dos metioninas, que podrían ser utilizadas como inicios alternativos de la traducción como una estrategia para subsanar el daño generado por sistema CRISPR-Cas9, produciendo proteínas truncas con un tamaño de 738 aa o 735 aa (dependiendo de la Met utilizada), que carecerían solo de la región más próxima al amino terminal, y por ende del dominio TPR (figura 22) y podrían ser parcialmente funcionales.

Si fuera el caso de que no se hubiera perdido la expresión de la proteína completamente, sería necesario re-diseñar nuevos RNAs guía para otro sitio blanco que trunque la proteína y lleve a la pérdida de función total, es decir, establecer líneas mutantes distintas.

La formación y localización de estas versiones truncas de Zmiz1b se podrían visualizar mediante análisis de *Western blot* o inmunotinciones, siempre y cuando el anticuerpo no vaya dirigido a la región amino terminal, ya que de ser cierto que inician en un ATG posterior al sitio de mutación, no serían reconocidas por el anticuerpo.

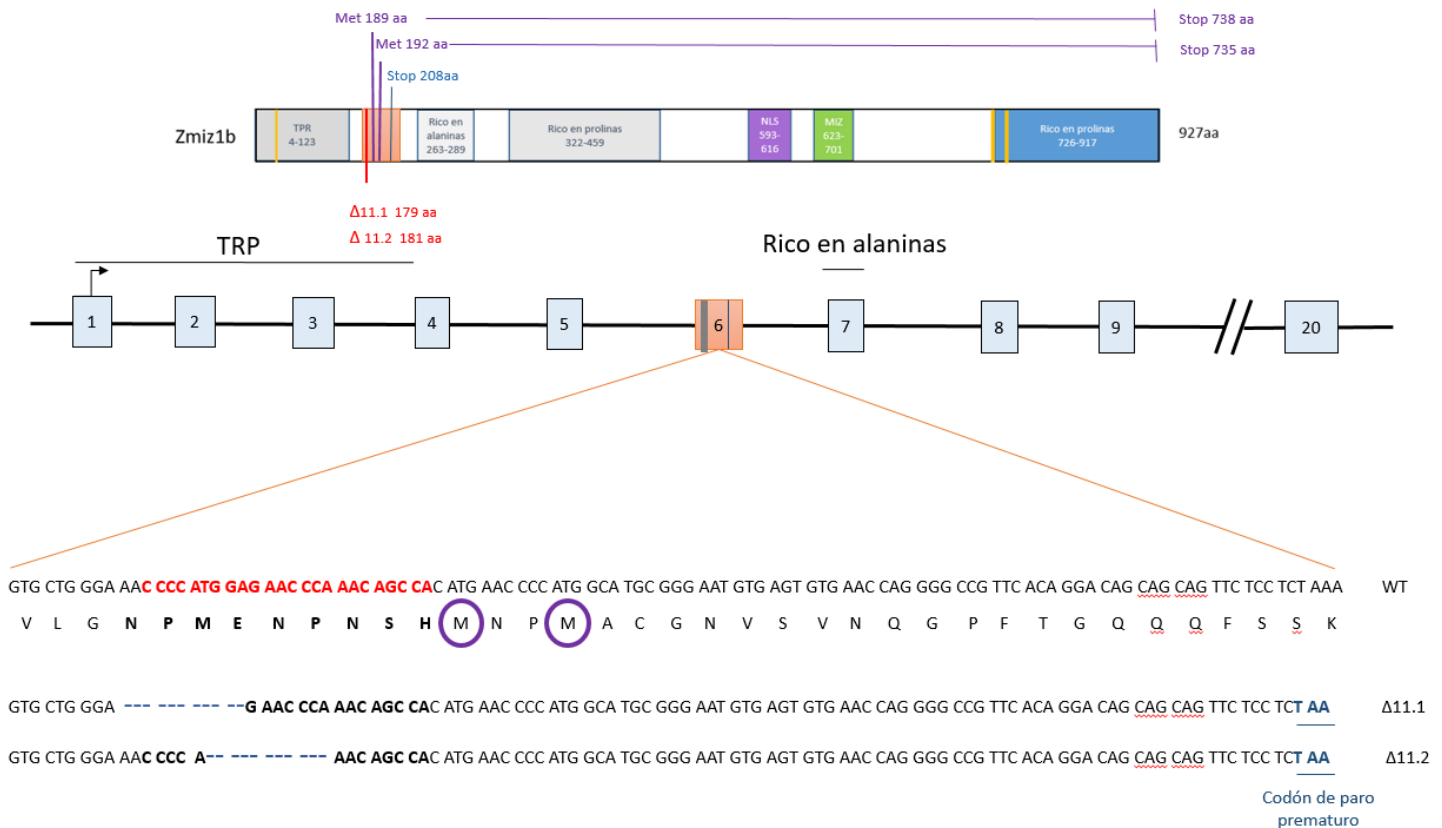


Figura 22. Variantes de la proteína Zmiz1b. En este esquema se observan las dos mutantes generadas mediante CRISPR-Cas9, ambas son deleciones de 11pb que se predice llevan a un cambio en el marco de lectura, dando proteínas truncas de 208 aa. Circuladas con morado se muestran las dos metioninas que podrían usarse para iniciar la traducción, que producirían proteínas truncas de 738 y 735 aa.

3.3 Ensayo de *Western blot*

Realizamos ensayos de tipo *Western blot* usando un anticuerpo comercial que reconoce la región amino de la proteína ZMIZ1 de humano (anti-ZMIZ1), en ensayos con una concentración de 1:1000 (ARP39413_P050; Aviva Systems Biology). De acuerdo a un análisis de secuencia, se predijo que este anticuerpo

podría reconocer también a Zmiz1b de pez cebra. Utilizamos extractos de proteínas de ovarios de hembras adultas tanto de organismos silvestres como de mutantes para *zmiz1b*. Sin embargo, no se pudo distinguir una señal clara de la especificidad del anticuerpo en nuestras muestras (figura 23) pero sí logramos ver una señal tenue para nuestro control positivo (células K562).

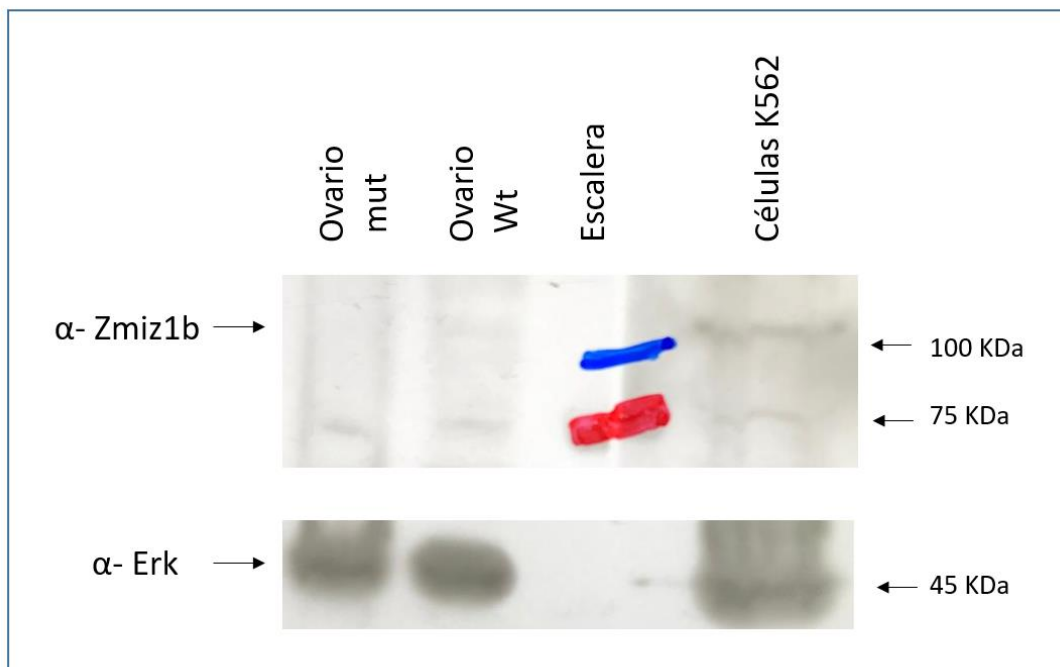


Figura 23. El anticuerpo dirigido al amino-terminal no detectó la proteína del pez cebra. *Western blot* revelado con anti-Zmiz1b. Las líneas azul y roja señalan las bandas de 100 y 75 KDa. Se puede detectar una banda de aproximadamente 100 KDa en la muestra de células K562, sin embargo, no se logró detectar la señal en pez cebra.

3.4 Patrón de expresión diferencial entre silvestres y mutantes

Con la finalidad de tener una comparación visual de la intensidad de la expresión de *zmiz1b* en larvas mutantes realizamos algunos ensayos de HIS en

larvas silvestres y mutantes para *zmiz1b*. Contrario a lo que esperábamos, los embriones con genotipo mutante mostraban una mayor intensidad de señal de la sonda antisentido, que los silvestres (figura 24).

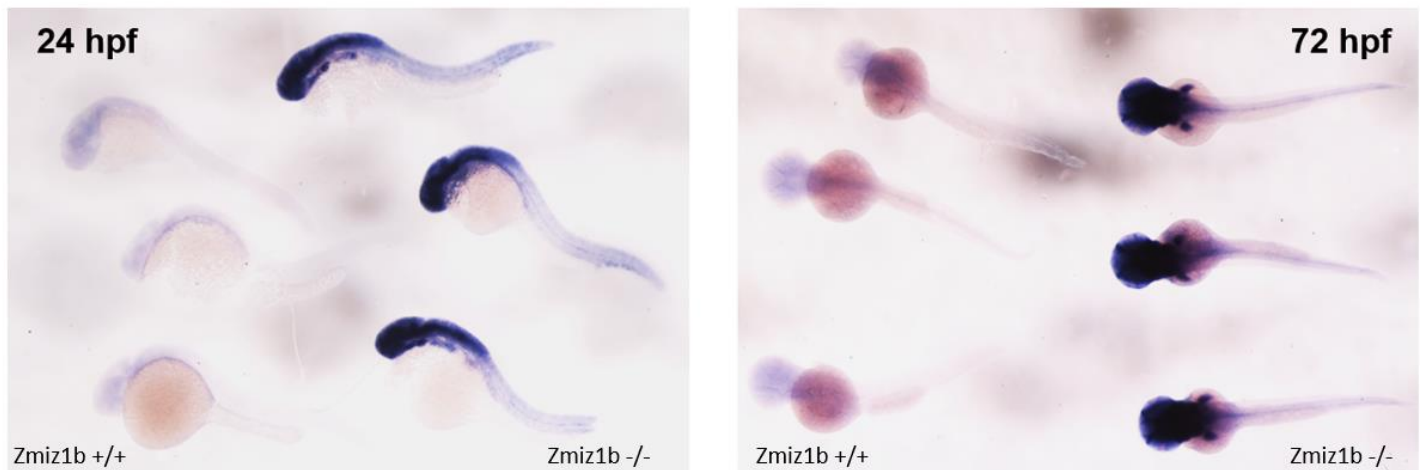


Figura 24. *zmiz1b* tiene mayor nivel de expresión en las larvas mutantes. Comparación de los patrones de expresión de *zmiz1b* obtenidos por HIS en larvas silvestres y mutantes de 24 y 72 hpf.

Curiosamente esto se relacionaba con una diferencia que ya habíamos observado en reacciones PCR de punto final, en los que veíamos que las muestras de los mutantes parecían amplificarse de manera más abundante (ver figura 25 A). Posteriormente, realizamos ensayos de qPCR en larvas de 48 hpf, en donde se vio que se elevaba la expresión 3.1 veces de *zmiz1b* en muestras mutantes que en silvestres (Figura 25 B).

Una hipótesis para explicar el incremento de la transcripción de *zmiz1b* en las mutantes podría ser que se trate de una respuesta a la pérdida de función de la

proteína, lo que sugeriría que la proteína Zmiz1b sí es necesaria para alguna función que no logramos identificar.

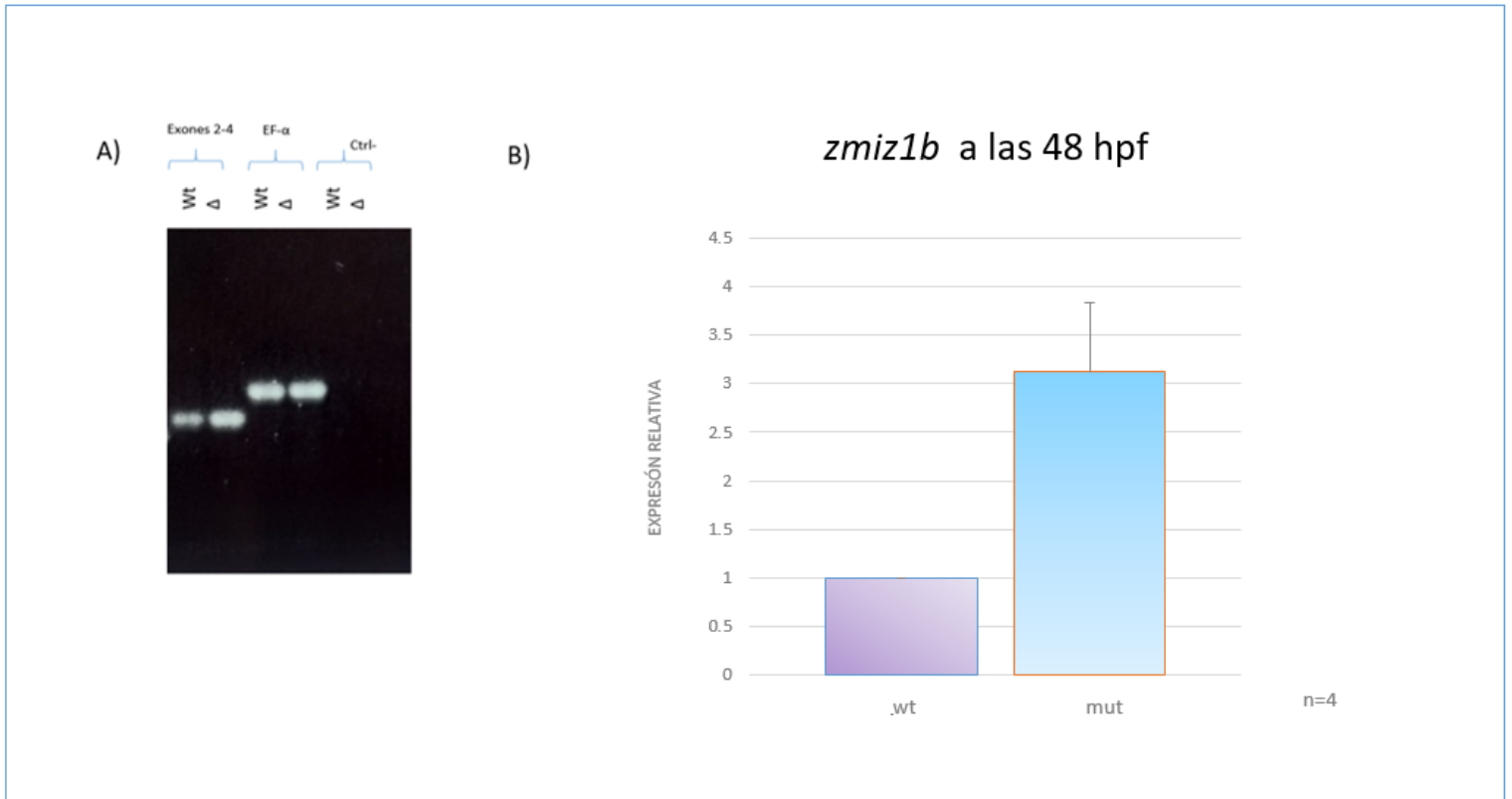


Figura 25. *zmiz1b* se expresa tres veces más en los embriones mutantes que en los silvestres. Expresión del transcrito de *zmiz1b* mediante PCR punto final de muestras de ovario silvestre y mutado. B) qPCR de muestras de embriones de 48 hpf mutantes y silvestres.

DISCUSIÓN

ZMIZ1 es una proteína que se encuentra altamente conservada entre los organismos vertebrados como el ratón, el humano y el pez cebra, entre otros. Esta proteína se ha asociado a distintas patologías por lo que su importancia clínica es

alta, sin embargo, aún se desconoce mucho sobre su función. Dado el impacto que podría tener ZMIZ1 en etapas del desarrollo, quisimos explorar su función en el pez cebra, donde encontramos que el gen está duplicado en el genoma, en donde se codifica *Zmiz1a* y *Zmiz1b*. En este trabajo nos enfocamos en el estudio de *Zmiz1b*.

Al revisar cuidadosamente las anotaciones descritas en las bases de datos para *Zmiz1b*, encontramos errores importantes en el ensamblaje del gen, por lo cual después de clonar y secuenciar la región 5 prima, identificamos tres exones que no se habían reportado y que son homólogos al dominio TPR presentes en las secuencias de ratón y humano; esto abre la posibilidad de contar con un anticuerpo comercial que cruce con *Zmiz1b*. Debido a lo anterior, se vuelve de suma importancia haber determinado la secuencia completa del transcrito de *zmiz1b*. Determinamos el patrón de expresión de *zmiz1b* en pez cebra desde el inicio del desarrollo hasta los tres días post fertilización. Encontramos que, en etapas tempranas se expresa muy poco, de tal forma que puede detectarse por PCR, pero no por HIS. Lo cual indica que hay herencia materna, a pesar de la baja cantidad de transcrito encontrado, sin embargo, es probable que cumpla alguna función en estas etapas del desarrollo. A partir de las 24 hpf y hasta las 72 hpf se detecta una expresión más significativa, esencialmente concentrada en la cabeza. En estadios adultos observamos una expresión importante en los ovarios, específicamente en los ovocitos de etapas tempranas. No obstante, a pesar de su expresión, no observamos ningún fenotipo de pérdida de función en los peces mutantes *zmiz1b*^{-/-} ni durante el desarrollo embrionario, ni en etapas adultas. Además, no detectamos una reducción de la fertilidad o de la capacidad de ovoposición en las hembras

mutantes, lo que se esperaría si *Zmiz1b* tuviera una participación esencial durante la ovogénesis. Esta hipótesis era sugerida por la importante presencia del transcrito de *zmiz1b* en los ovocitos y por su distribución en gradiente en el citoplasma de los ovocitos tipo II. Sin embargo, no resultó cierta. Aun puede especularse que *Zmiz1b* tiene un papel de co-regulación de algún FT durante la ovogénesis, pero que su participación pueda ser compensada por otros co-reguladores. Cómo se describió previamente, algunos FT son co-regulados por un conjunto de proteínas ^{1,2} y por ello, quizá puede sustituirse la función de alguno de ellos en algunos casos. También podría ser que sí haya defectos en la ovogénesis, y tal vez una reducción en la producción de huevos maduros, sin embargo, el pez cebra tiene tal alta fertilidad que probablemente no sea notorio el efecto. Tendría que hacerse un estudio detallado de la ovogénesis con cuantificación de los ovocitos de cada estadio para llegar a una conclusión más sólida.

Como se mencionó antes, *Zmiz1a*, el homólogo de *Zimp1b*, presenta un fenotipo de mortalidad en larvas a los 15 días y un defecto muy evidente en la eritropoyesis. Quisimos analizar la posibilidad de una sinergia genética entre los dos homólogos, por ello estudiamos el fenotipo de peces dobles mutantes. Sin embargo, no vimos un efecto en la progenie de la doble mutante, más allá de lo descritos para la mutante de *zmiz1a* (defectos en la maduración de los eritrocitos), lo que nuevamente indicó que *Zmiz1b* no tiene una participación esencial en el desarrollo del pez.

Debido a nuestros resultados de ausencia de fenotipo, consideramos la posibilidad de que las mutaciones introducidas en el gen *zmiz1b* no conllevaran la pérdida de

función de este gen. Lamentablemente no pudimos conseguir anticuerpos que funcionaran adecuadamente para identificar Zmiz1b. Aunque no se describió en este trabajo, probamos varios anticuerpos comerciales para ZMIZ1 de humano y ratón y trabajamos más intensamente con el más prometedor, pero ninguno nos dio buen resultado ni en *Western* ni en inmuno-histoquímicas. Por lo tanto, no pudimos demostrar de forma absoluta que la línea mutante utilizada en este estudio haya perdido completamente la función de Zimp10b; sin embargo, la evidencia obtenida por el análisis de los mensajeros sugiere que la función de Zimp10b podría estarse restableciendo. El principal dato que apunta en esta dirección es la observación de que en las mutantes se incrementa la transcripción del gen y además identificamos sitios de inicio de la traducción alternativos, entonces podría ser que se esté produciendo una proteína que, aunque pierde un dominio funcional podría conservar varias de las funciones putativas de Zmiz1b. Independientemente de si se restableció o no la función de Zmiz1b, el incremento de la transcripción podría interpretarse como una respuesta de las células a la ausencia de alguna función de Zmiz1b, lo que podría significar que sí tiene algún papel necesario durante el período larvario y/o en la ovogénesis.

Otra idea que es importante discutir es que como se describió en la introducción, los co-reguladores tienen una intensa participación durante la respuesta a señales fisiológicas externas tales como distintos tipos de estrés, respuestas a hormonas, respuestas a vitaminas, cambios nutricionales, etc. ^{1,2,3,4,5,6} Entonces, es posible que Zmiz1b tenga una participación esencial en alguna de estas respuestas. En este caso, la pérdida de su función no tendría efectos evidentes en condiciones

normales. Es decir, solo podría observarse al inducir alguna de las respuestas mencionadas. Por ejemplo, como se dijo anteriormente ZMIZ1 se ha correlacionado de manera muy significativa con enfermedades autoinmunes que dependen de la actividad de vitamina D, como la esclerosis múltiple. Por ello, sería interesante diseñar estudios para la respuesta a vitamina D o a hormonas esteroides en mutantes de *zmiz1b* en que se haya confirmado la pérdida de función. En nuestro estudio únicamente nos enfocamos en la participación de Zmiz1b durante el desarrollo embrionario y es posible que en esta etapa efectivamente no haya una función esencial para Zimp10b. Esto sería concebible, ya que hay que recordar el fenómeno de duplicación que ocurrió en el genoma de pez cebra. Debido a ello, algunas proteínas a lo largo de la evolución pueden volverse redundantes, no funcionales, o adquirir funciones distintas a las de sus homólogos.

CONCLUSIONES

- ✚ La secuencia predicha para el transcrito de *zmiz1b* no coincide con nuestros análisis. Después de clonar y secuenciar 10 de 20 exones predichos corregimos la anotación de la base de datos.
- ✚ *zmiz1b* se expresa principalmente en la cabeza y en las aletas pectorales durante 24, 48 y 72 hpf.
- ✚ *zmiz1b* se expresa en el citoplasma de ovocitos de estadios Ib y II.
- ✚ Las mutantes de *zmiz1b* no presentan fenotipo visible.

- ✚ Hay un incremento de la expresión del transcrito de *zmiz1b* en embriones mutantes respecto a embriones silvestres a las 48 hpf y en ovarios adultos.

PERSPECTIVAS

- ✚ Diseñar y utilizar nuevos guías para mutar *zmiz1b* que consideren lo siguiente: deletar fragmentos grandes del genoma, elegir uno o varios sitios distintos para mutar, tomar en cuenta los mecanismos del complejo surf para el diseño, elegir exones no múltiplos de tres, etc. De esta forma será más probable lograr la pérdida de función en las proteínas Zmiz1b.
- ✚ Mandar a hacer nuevos anticuerpos que reconozcan Zmiz1b de pez cebrá para realizar ensayos de inmunofluorescencia y *Western blot*.
- ✚ Realizar estudios para la respuesta a vitamina D o a hormonas esteroides en mutantes de *zmiz1b* en que se haya confirmado la pérdida de función.

BIBLIOGRAFÍA

1. Stallcup, M. R. & Poulard, C. Gene-Specific Actions of Transcriptional Coregulators Facilitate Physiological Plasticity: Evidence for a Physiological Coregulator Code. *Trends in Biochemical Sciences* vol. 45 497–510 (2020).
2. Lonard, D. M. & O'Malley, B. W. Nuclear receptor coregulators: Modulators of pathology and therapeutic targets. *Nature Reviews Endocrinology* vol. 8 598–604 (2012).

3. Mckenna, N. J., Evans, R. M. & Malley, B. W. O. Nuclear Receptor Signaling : a home for nuclear receptor and coregulator signaling research. **12**, 10–12 (2014).
4. Stashi, E., York, B. & Malley, B. W. O. Steroid receptor coactivators : servants and masters for control of systems metabolism. *Trends Endocrinol. Metab.* **25**, 337–347 (2014).
5. Malley, B. W. O., Qin, J. & Lanz, R. B. Cracking the coregulator codes. 310–315 (2008) doi:10.1016/j.ceb.2008.04.005.
6. Dasgupta, S., Lonard, D. M. & Malley, B. W. O. Nuclear Receptor Coactivators : Master Regulators of Human Health and Disease. 1–14 (2014) doi:10.1146/annurev-med-051812-145316.
7. Zhao, L., Zhou, S. & Ake, J.-. *Nuclear Receptors : Recent Drug Discovery for.* (2019). doi:10.1210/er.2018-00222.
8. Sharma, M. hZimp10 is an androgen receptor co-activator and forms a complex with SUMO-1 at replication foci. *EMBO J.* **22**, 6101–6114 (2003).
9. Li, X., Thyssen, G., Beliakoff, J. & Sun, Z. The Novel PIAS-like Protein hZimp10 Enhances Smad Transcriptional Activity. *J. Biol. Chem.* **281**, 23748–23756 (2006).
10. Lee, J., Beliakoff, J. & Sun, Z. The novel PIAS-like protein hZimp10 is a transcriptional co-activator of the p53 tumor suppressor. *Nucleic Acids Res.* **35**, 4523–4534 (2007).
11. Rakowski, L. A. *et al.* Convergence of the ZMIZ1 and NOTCH1 pathways at C-MYC in acute T lymphoblastic leukemias. *Cancer Res.* **73**, 930–941 (2013).
12. Gutierrez, L. The Drosophila trithorax group gene tonalli(tna) interacts genetically with the Brahma remodeling complex and encodes an SP-RING finger protein. *Development* **130**, 343–354 (2003).
13. Li, X. *et al.* ZMIZ1 Preferably Enhances the Transcriptional Activity of Androgen Receptor with Short Polyglutamine Tract. *PLoS One* **6**, e25040 (2011).
14. Rodriguez-Magadán, H., Merino, E., Schnabel, D., Ramírez, L. & Lomelí, H. Spatial and temporal expression of Zimp7 and Zimp10

- PIAS-like proteins in the developing mouse embryo. *Gene Expr. Patterns* **8**, 206–213 (2008).
15. Pinnell, N. *et al.* The PIAS-like Coactivator Zmiz1 Is a Direct and Selective Cofactor of Notch1 in T Cell Development and Leukemia. *Immunity* **43**, 870–883 (2015).
 16. Carapito, R. *et al.* ZMIZ1 Variants Cause a Syndromic Neurodevelopmental Disorder. *Am. J. Hum. Genet.* **104**, 319–330 (2019).
 17. Rodríguez-Magadán, H., Ramírez, L., Schnabel, D., Vázquez, M. & Lomelí, H. Sexually dimorphic gene expression of the Zimp7 and Zimp10 genes in embryonic gonads. *Gene Expr. Patterns* **10**, 16–23 (2010).
 18. Rogers, L. M., Riordan, J. D., Swick, B. L., Meyerholz, D. K. & Dupuy, A. J. Ectopic Expression of Zmiz1 Induces Cutaneous Squamous Cell Malignancies in a Mouse Model of Cancer. *J. Invest. Dermatol.* **133**, 1863–1869 (2013).
 19. Sun, Y. *et al.* A comprehensive association analysis confirms *ZMIZ1* to be a susceptibility gene for vitiligo in Chinese population. *J. Med. Genet.* **51**, 345–353 (2014).
 20. Fewings, N. L. *et al.* The autoimmune risk gene ZMIZ1 is a vitamin D responsive marker of a molecular phenotype of multiple sclerosis. *J. Autoimmun.* **78**, 57–69 (2017).
 21. Lan, X. *et al.* Identification of Two Additional Susceptibility Loci for Inflammatory Bowel Disease in a Chinese Population. *Cell. Physiol. Biochem.* **41**, 2077–2090 (2017).
 22. Dubois, P. C. A. *et al.* Multiple common variants for celiac disease influencing immune gene expression. *Nat. Genet.* **42**, 295–302 (2010).
 23. Harder, M. N. *et al.* Type 2 Diabetes Risk Alleles Near *BCAR1* and in *ANK1* Associate With Decreased β -Cell Function Whereas Risk Alleles Near *ANKRD55* and *GRB14* Associate With Decreased Insulin Sensitivity in the Danish Inter99 Cohort. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **98**, E801–E806 (2013).
 24. Parnell, G. P. *et al.* The latitude-dependent autoimmune disease risk genes ZMIZ1 and IRF8 regulate mononuclear phagocytic cell

- differentiation in response to Vitamin D. *Hum. Mol. Genet.* **28**, 269–278 (2019).
25. Lu, M., McComish, B. J., Burdon, K. P., Taylor, B. V. & Körner, H. The association between Vitamin D and multiple sclerosis risk: 1,25(OH)₂D₃ induces super-enhancers bound by VDR. *Front. Immunol.* **10**, (2019).
 26. Beliakoff, J. *et al.* The PIAS-Like Protein Zimp10 Is Essential for Embryonic Viability and Proper Vascular Development. *Mol. Cell. Biol.* **28**, 282–292 (2008).
 27. Temo, J. M. Do we need to educate specialists within anesthesia nursing? *J. Am. Assoc. Nurse Anesth.* **58**, 154–155 (1990).
 28. Howe, D. G. *et al.* ZFIN, the Zebrafish Model Organism Database: Increased support for mutants and transgenics. *Nucleic Acids Res.* **41**, (2013).
 29. Takahata, N. & Maruyama, T. *Polymorphism and loss of duplicate gene expression: A theoretical study with application to tetraploid fish (gene duplication/evolution/duplicate genes/population genetics/two-locus problem)*. vol. 76 (1979).
 30. Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B. & Schilling, T. F. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn.* **203**, 253–310 (1995).
 31. D'costa, A. & Shepherd, I. T. *Zebrafish Development and Genetics: Introducing Undergraduates to Developmental Biology and Genetics in a Large Introductory Laboratory Class*. www.liebertonline.com.
 32. Bally-Cuif, L., Schatz, W. J. & Ho, R. K. Characterization of the zebrafish Orb/CPEB-related RNA-binding protein and localization of maternal components in the zebrafish oocyte. *Mech. Dev.* **77**, 31–47 (1998).
 33. Li, J. & Ge, W. Zebrafish as a model for studying ovarian development: Recent advances from targeted gene knockout studies. *Molecular and Cellular Endocrinology* vol. 507 (2020).
 34. Hoegg, S., Brinkmann, H., Taylor, J. S. & Meyer, A. Phylogenetic timing of the fish-specific genome duplication correlates with the diversification of teleost fish. *J. Mol. Evol.* **59**, 190–203 (2004).

35. Amores, A., Catchen, J., Ferrara, A., Fontenot, Q. & Postlethwait, J. H. Genome evolution and meiotic maps by massively parallel DNA sequencing: Spotted gar, an outgroup for the teleost genome duplication. *Genetics* **188**, 799–808 (2011).
36. Li, W. H., Yang, J. & Gu, X. Expression divergence between duplicate genes. *Trends in Genetics* vol. 21 602–607 (2005).
37. Force, A. *et al.* *Preservation of Duplicate Genes by Complementary, Degenerative Mutations*. (1999).
38. Castillo Castellanos F. Determinación de la expresión del gen *zimp10* en el embrión del pez cebra y generación de una línea mutante nula. Tesis. México: Instituto de Biotecnología UNAM (2014).
39. Elizalde Padilla P. Análisis genotípico y expansión de una línea transgénica de pez cebra con mutaciones en el gen *zimp10b*, introducidas por el método de CRISPR/Cas9. Tesis. México: Universidad Autónoma del Estado de Morelos (2017).
40. Hoshijima, K. *et al.* Highly Efficient CRISPR-Cas9-Based Methods for Generating Deletion Mutations and F0 Embryos that Lack Gene Function in Zebrafish. *Dev. Cell* **51**, 645-657.e4 (2019).
41. Thisse, C. & Thisse, B. High-resolution in situ hybridization to whole-mount zebrafish embryos. *Nat. Protoc.* **3**, 59–69 (2008).
42. Sabaliauskas, N. A. *et al.* High-throughput zebrafish histology. *Methods* **39**, 246–254 (2006).
43. Tuladhar, R. *et al.* CRISPR-Cas9-based mutagenesis frequently provokes on-target mRNA misregulation. *Nat. Commun.* **10**, 1–10 (2019).
44. Popp, M. W. & Maquat, L. E. Minireview Leveraging Rules of Nonsense-Mediated mRNA Decay for Genome Engineering and Personalized Medicine. *Cell* **165**, 1319–1322 (2016).
45. Anna, Ł., Tomecki, R. & Dziembowski, A. Biochimica et Biophysica Acta Cytoplasmic RNA decay pathways - Enzymes and mechanisms. **1863**, 3125–3147 (2016).