



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

"ANÁLISIS DE LA DINÁMICA DE EXPRESIÓN
Y CONSERVACIÓN FUNCIONAL DE
LOS GENES *Zimp7* Y *Zimp10* DE RATÓN"

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

PRESENTA:

BIÓL. HÉCTOR MAXIMINO RODRÍGUEZ MAGADÁN

ASESORA: DRA. HILDA MARÍA LOMELÍ BUYOLI

CUERNAVACA, MORELOS

2011



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.

AGRADECIMIENTOS

A la dra. Hilda Maria Lomelí Buyoli por permitirme formar parte de su grupo de investigación y por guiarme con su sapiencia a través del mundo de la biología del desarrollo.

A las dras. Martha Veronica Vazquez Laslop y Diana Maria Escalante por pertenecer a mi comite tutorial y quienes cada semestre me aconsejaban y aportaban ideas para mejorar mi trabajo.

A los dres. Joseph Dubrovsky, Claudia Treviño, Veronica Narvaez, Viviana Valadez y Leandro David Hernandez por la revisión de mi tesis

A la M. en C. Laura Socorro Ramirez Ángeles por su asistencia técnica durante la realización de esta tesis y por esas largas charlas y ricos cafecitos que hacían mas ameno el tiempo en el laboratorio. Por ser mi maestra en la biología del desarrollo.

A la Dra. Denhi Schnabel por su ayuda y enseñanzas en la parte final de la tesis.

A Marcela Ramírez y Sergio Gonzalez por proporcionarme los ratones utilizados durante la elaboración de esta tesis.

Al M en C. Andres Saralegui por su asistencia en la técnica de microscopía confocal.

A CONACYT por apoyarme economicamente con la beca 181202 y a los donativos de DGAPA-UNAM IN213602-3 e IN220009-3 y CONACYT 49114 con los cuales se llevo a cabo el trabajo experiemntal de esta tesis.

Al dr. Juan Mauricio Téllez Sosa por inicar mi camino en la ciencia y por sus sabios consejos y correctivos durante todo este tiempo.

A mi familia por su apoyo ilimitado y porque por ellos he llegado hasta el final de este camino.

A Viridiana por darme animos para seguir adelante y tenderse a mi lado "a la orilla de la chimenea".

A todos mis amigos por hacer mas rejalado este mundo estresante de la ciencia. A Mario, Omar, Bertin, Elsay y Delany quienes han estado conmigo desde antes de entrar en este mundo de la ciencia.

A mis inseparables Angel, Ivan y Javier por su amistad incondicional y por todos los buenos momentos compartidos en el lab y durante lo congresos.

A Oswaldo, Andrea, Brenda, Aimée, Roberto, Christofer y Alejandro por su amistad y buenos comentos compartidos.

A Luis, Alejandro "Jalis", Andres, Humberto "inge" y Richard que siempre estaban dispuestos a quedarse al menos un par de horas mas en la "oficina" resolviendo problemas trascendentales como quien tiene la mula del "6" no importando que fuera lunes o media semana. A Don Horacio y Mario por dejarme ser el quinto.

A Marina Magadán
"Por darme la vida y cultivarla de la mejor
manera llenándome de dicha"

A Viridana gracida
"Por aceptar recorrer el resto de su vida
conmigo y alimentar mi alma con su amor"

ÍNDICE

RESUMEN.....	8
ABSTRACT.....	10
INTRODUCCIÓN.....	12
JUSTIFICACIÓN.....	37
OBJETIVOS.....	38
MATERIALES Y MÉTODOS.....	40
RESULTADOS.....	47
DISCUSIÓN.....	87
CONCLUSIÓN.....	97
REFERENCIAS.....	98
APÉNDICES.....	106

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Desarrollo embrionario del ratón.....	15
2. Desarrollo de las extremidades de mamífero.....	19
3. Diferenciación sexual de las gónadas.....	21
4. Eventos celulares que ocurren durante la espermatogénesis.....	24
5. Esquema de la estructura de las proteínas PIAS.....	29
6. Vía de SUMOilación.....	31
7. Mutantes en <i>tna</i> presentan fenotipos homeóticos.....	33
8. Fenotipos mutantes en combinaciones heteroalélicas de <i>tna</i>	34
9. Expresión de los genes <i>Zimp</i> en el tejido urogenital.....	35
10. Morfología de embriones nulos en <i>Zimp10</i>	37
11. Filogenia de las proteínas ZIMP.....	51
12. Diseño de las ribosondas.....	53
13. Patrón de expresión de <i>Zimp7</i> en el desarrollo embrionario.....	55
14. Patrón de expresión de <i>Zimp10</i>	57
15. Expresión de <i>Zimp7</i> durante el desarrollo de las extremidades de ratón.....	59
16. Expresión de <i>Zimp10</i> en el desarrollo de las extremidades de ratón.....	61
17. Expresión de <i>Zimp10</i> durante el desarrollo de las gónadas.....	65
18. Expresión de <i>Zimp7</i> en el desarrollo de las gónadas.....	68
19. Localización de ZIMP7 por inmunofluorescencia en células germinales de 13.5 dpc.....	70
20. Perfil de expresión de ZIMP7 en testículo de ratón post-natal.....	73
21. Localización subcelular de ZIMP7 en células espermatogénicas.....	75
22. Co-localización subcelular de ZIMP7 y SUMO1 en espermatocitos.....	77
23. Efecto del ácido retinoico en la expresión de <i>Zimp10</i>	80
24. Efecto del ANG sobre la expresión de <i>Zimp10</i>	81
25. Efecto del DEAB sobre la expresión de <i>Zimp10</i>	82
26. Efecto de SHH en la expresión de <i>Zimp10</i>	85
27. Efecto del ácido retinoico en la expresión de <i>Zimp7</i>	87
28. Efecto del DHT en la expresión de <i>Zimp7</i>	89
29. Efecto del DHT en la expresión de <i>Zimp7</i> en testículo.....	90
30. Análisis de la región promotora de <i>Zimp7</i> y <i>Zimp10</i>	93

ABREVIACIONES

A: Anterior
 Al: Alantoides
 AGN193109: Antagonista del AR
 AG-SHH: Agonista de SHH
 AS: Somitas Anteriores
 AER: Surco del Ectodermo Apical
 Antp: Antennapedia
 AR: Ácido Retinoico.
 BA: Arcos Branquiales
 BC: Ventrículo del corazón
 BTB: Barrera de Células Sanguíneas del Testículo
 Ch: Córion
 DA: Aorta Dorsal
 DDN: Días Después de Nacido
 DEAB: Ácido Benzoico 4-Dimetilamina
 DHT: Dihidroxitestosterona.
 Die: Diencéfalo
 DMSO: Dimetíl Sulfóxido.
 DPC: Días Post-Coito
 DPP: Días Post-Parto
 ES: Espermátidas Redondas
 FB: Cerebro Anterior
 FLB: Extremidad Anterior
 G: Intestino
 H: Corazón
 HB: Cerebro Posterior
 HG: Intestino Medio
 HIS: Hibridación *in situ*
 HLB: Extremidad Posterior
 IMC: Masa Celular Interna
 L/Z: Leptoteno/Zigoteno
 M: Meiosis
 MB: Cerebro Medio
 Me: Mesénquima
 MEME: Multiple EM for Motif Elicitation
 Mes: Mesencéfalo
 MPT: Modificaciones Post-Traduccionales
 N: Notocorda
 NCBI: National Center of Biotechnology Information
 Ne: Neuroectodermo
 NeT: Tubo Neural
 NT: Tejido Neural
 O: Ovario
 OpV: Vesícula Óptica
 OV: Vesícula Ótica
 P: Posterior
 PFA: Paraformaldehido

PIAS: Proteínas Inhibidoras de STAT Activadas
PS: Surco Primitivo
RA: Receptor de Andrógenos
RALDH2: Aldehído Deshidrogenasa 2
RAR: Receptor de Ácido Retinoico
RE: Receptor de Estrógenos
RG: Receptor de Glucocorticoides
RS: Espermátidas Redondas
S: Somitas
SAP: motivo de SAF-A/B ACINUS y PIAS
SC: Células de Sertoli
Scr: Sex Comb Reduced
SENP: Proteasas específicas de SUMO
SHH: Sonic Hedgehog
SP: Espermatogonias
STAT: Transductoras de Señales e Iniciadoras de la Transcripción
SUMO: Pequeña proteína Modificadora Similar a Ubiquitina
T: Testículo
Tel: Telencéfalo
Tna: Tonalli
Trx: Thrithorax
TV: Vesícula Telencefálica
Ub: Ubiquitina
Ubx: Ultrabithorax
V: Ventrículo
Ve: Endodermo Visceral
ZIMP7: Zinc finger-containing Miz-1, PIAS-like protein on Chrom. 7
ZIMP10: Zinc finger-containing Miz-1, PIAS-like protein on Chrom. 10
ZPA: Zona con Actividad Polarizante

RESUMEN

Las proteínas PIAS regulan la función de blancos proteicos al facilitar su SUMOilación, lo que conduce a modificar su estabilidad, su localización o su actividad transcripcional. Para llevar a cabo estas acciones, utilizan su dominio SP-RING, el cual les confiere una actividad de E3-ligasa de SUMO. En humano se identificaron ZIMP7 y ZIMP10 como proteínas similares a las PIAS, ya que conservan el SP-RING característico de éstas. Las ZIMP presentan el SP-RING dentro de un dominio más grande llamado SP-RING extendido (XSPRING), que se caracterizó en la proteína Tna de *Drosophila*. Determinaciones bioquímicas indican que ZIMP7 y ZIMP10 interactúan físicamente con factores transcripcionales y receptores hormonales importantes durante la embriogénesis, y al igual que Tna, muestran interacciones con factores de complejos remodeladores de la cromatina. Por otra parte, ratones deficientes en *Zimp10* presentan defectos en la vasculogénesis y mueren a los 10.5 días post coito (dpc). En este trabajo, determinamos el patrón de expresión espacio-temporal de los genes *Zimp7* y *Zimp10* de ratón durante la embriogénesis. Encontramos que estos genes se expresan desde los 7.5 dpc, y muestran un patrón de expresión sobrelapante en algunos tejidos tales como el neuroepitelio, arcos branquiales y somitas; además, ambos restringen su expresión al desarrollo de las extremidades y el tejido neural a los 11.5 dpc. Por otra parte, observamos que *Zimp10* se expresa de manera sobresaliente durante la vasculogénesis. Así mismo, hicimos un análisis detallado de su dinámica de expresión durante la morfogénesis de las extremidades, y determinamos que el mensajero de *Zimp10* se concentra en el organizador conocido como la zona con actividad polarizante (ZPA) a los 11.5 dpc, y en las uniones de las falanges a los 13.5 dpc. Finalmente, la gónada embrionaria fue otra región en donde encontramos un patrón de expresión interesante de los *Zimp*. Ambos se expresan dinámicamente en todo el desarrollo gonadal sólo en macho, iniciando su expresión a los 11.5 y presentando un

pico a los 13.5 dpc, el cual coincide con el momento de la determinación sexual de las germinales. Destaca la presencia de *Zimp7* en las células germinales, que contrasta con la de *Zimp10* en las células somáticas de la gónada. En estadios post-natales encontramos que ZIMP7 está presente en testículos adultos y co-localiza con SUMO1 en el núcleo de espermatoцитos en paquiteno, incluyendo el cuerpo XY.

Por otra parte, con el fin de identificar factores que regulan a los genes *Zimp in vivo*, hicimos cultivos organotípicos de extremidades y de gónada embrionaria. En ellos analizamos el efecto de morfógenos como el ácido retinoico y el factor de crecimiento Sonic Hedgehog (SHH) sobre la expresión de los *Zimp*. A través de estos estudios, determinamos que la expresión de *Zimp10* en la zona polarizante anterior es dependiente del ácido retinoico, y que SHH, es capaz de inducir la expresión de *Zimp10* en cultivos de extremidades. Una observación interesante, es que el ácido retinoico no regula la expresión de *Zimp7* en cultivos de gónadas de macho, pese a que se identificó como un gen inducido por el retinoico. Concluimos que ambos genes *Zimp* tienen una expresión dinámica en el desarrollo, mostrando algunas regiones sobrelapantes donde podrían tener funciones redundantes, pero con expresión específica en otros. Los patrones observados indican que los genes *Zimp* deben tener una participación importante en la embriogénesis de ratón, particularmente durante la morfogénesis de las extremidades, la diferenciación de la gónada masculina y en la espermatogénesis.

ABSTRACT

Members of the PIAS family regulate protein function by promoting SUMO modification of their targets, thereby affecting their stability, localization, or activity. These actions are mediated by their SP-RING finger domain, which confers them SUMO E3-ligase activity. ZIMP7 and ZIMP10 are two proteins identified in humans that share the SP-RING domain with the PIAS proteins. However, in the ZIMP proteins, the SP-RING is included into a larger domain known as the extended SPRING, which was first identified in the *Drosophila's* Tna protein. The ZIMP proteins have been shown to physically interact with transcription factors and hormonal receptors that are known to be important during embryogenesis, and like Tna, they interact with components of chromatin remodeling complexes. On the other hand, mouse embryos deficient in *Zimp10* have defects in vasculogenesis and die around 10.5 days post coitum (dpc). In this study, we determined the spatial and temporal expression pattern of *Zimp7* and *Zimp10* in mouse embryos, and with more detail, in limbs and developing gonads. We found that these two genes, start to be expressed at 7.5 dpc and exhibit partially overlapping patterns in some tissues such as the neuroectoderm, branchial arches and somites; also, both genes restrict their expression to the limb bud and neural tissue at 11.5 dpc. Furthermore, we saw a predominant expression of *Zimp10* in the developing vascular system.

Our analysis of the expression patterns of the *Zimp* genes during limb morphogenesis, revealed that at 11.5 dpc *Zimp10* mRNA concentrates in the organizer region known as the zone of polarizing activity (ZPA), and at 13.5 dpc the transcripts are found in the joints of the phalanges. Finally, in the embryonic gonads we found a particular expression profile for the *Zimp* genes. Both genes initiate their transcription at early stages in the embryonic male gonad (11.5 dpc), reaching their peak at 13.5 dpc, which coincides with the

process of sex-specific germ cell mitotic arrest. However while *Zimp7* is expressed in germ cells of the embryonic gonad and the adult testis, *Zimp10* is found in somatic cells, outside the testis cords. Immunofluorescence of spermatogenic cells revealed that ZIMP7 protein localizes to nuclear territories in meiotic spermatocytes, including the XY bodies.

In the last part of this study, we carried on organotypic cultures of limbs and embryonic gonads. The purpose of these assays was to identify factors involved in the transcriptional regulation of *Zimp7* and *Zimp10* *in vivo*. We analyzed the effects of morphogens such as the retinoic acid or the growth factor Sonic Hedgehog (SHH) on the expression of the *Zimp* genes. As a result of these assays, we found that retinoic acid is required for *Zimp10* expression in the ZPA, and SHH is able to induce *Zimp10* expression in limb-bud culture. Another interesting observation is that retinoic acid does not regulate *Zimp7* expression in gonad culture, despite it was previously identified as a retinoic-induced gene.

Our conclusion of this study is that both *Zimp* genes have a dynamic expression pattern during the development, with partially overlapping patterns indicating possible functional redundancy, but with specific expression in some tissues. The patterns shown here indicate that both *Zimp* genes are important for mouse embryogenesis. Interesting roles can be anticipated in the limbs, during antero-posterior patterning and in gonads during sex determination.

INTRODUCCIÓN

El desarrollo de los organismos multicelulares ha sido siempre un tema intrigante; cómo es que a partir de una sola célula se pueden generar organismos relativamente simples como los moluscos o nemátodos, hasta animales tan complejos y diferenciados como los vertebrados, o cómo son capaces de reproducirse y generar un individuo similar a él para continuar su ciclo de vida.

El desarrollo de los vertebrados comienza con la fusión de dos células haploides, el óvulo y el espermatozoide, y la recombinación de su material genético. A este proceso se le llama fertilización y da paso a la formación de un huevo fertilizado o una célula diploide llamada cigoto. Esta célula después de la fertilización, empieza a dividirse rápidamente y forma una esfera llena de pequeñas células llamada blástula. Una vez que se ha formado la blástula, las células comienzan a diferenciarse para formar las tres capas germinales: mesodermo, endodermo y ectodermo (proceso conocido como gastrulación). Posteriormente, las células comienzan a reorganizarse y comunicarse entre ellas hasta la formación de los diferentes órganos y tejidos que componen a un organismo (organogénesis) (Pesce y Schöler, 1998). Todos estos cambios que sufre un organismo durante la embriogénesis y aquellos que ocurren incluso después del nacimiento son la materia de estudio para la biología del desarrollo. Esta área de la ciencia estudia cómo una célula o cigoto puede diferenciarse en diferentes tipos celulares como neuronas, piel, músculo, células sanguíneas, etc.; o cómo las células diferenciadas se organizan para formar estructuras tan ordenadas como el corazón, el cerebro o las manos y cómo es que cada uno de estos órganos se localizan siempre en el mismo lugar o como es sensan señales que les indican cuando detener su crecimiento. Otro aspecto importante que estudia la biología del desarrollo es el porqué los planos corporales que tiene un organismo son heredados a su progenie a través de diferentes

generaciones y como es que algunos de éstos mecanismos o señales involucradas en los procesos relevantes están conservados en diferentes especies, desde los invertebrados hasta los mamíferos.

Para tratar de entender estos temas, la biología del desarrollo ha utilizado diversos modelos tales como el nemátodo *Caenorhabditis elegans*, la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* y algunos vertebrados como la rana *Xenopus laevis* o el pez *Danio rerio*. Evidentemente de entre estos modelos, los de mamíferos son los de mayor interés. El más representativo de ellos ha sido el ratón (*Mus musculus*), que se ha utilizado para extrapolar lo que sucede con el desarrollo de humanos. Además, por análisis comparativos entre las secuencias del genoma de ratón y humano, se sabe que hay una alta conservación entre los genes de ambos. Por otra parte, el ratón ofrece algunas ventajas para el estudio del desarrollo embrionario ya que se han establecido metodologías para manipular su genoma y generar mutaciones para inhibir la función de genes ("knock-out"), o para expresar genes heterólogos y estudiar así el efecto de cualquier gen en un lugar y espacio determinado (Nagy, 2000). El período de gestación del ratón dura aproximadamente 18 - 20 días (Fig. 1). Después de la fecundación, el cigoto se divide por mitosis lentamente durante 2 días hasta formar un embrión de 16 células conocido como mórula (Barlow *et al.*, 1972). A las células que permanecen en el interior de la mórula formarán la masa celular interna (ICM, por sus siglas en inglés) y a partir de ellas se forman los tejidos que darán origen al embrión (Dyce *et al.*, 1987). Las células que rodean la ICM forman el tejido extraembrionario o trofotodermo, y posteriormente darán origen a la membrana extracelular llamada corion (futura parte embrionaria de la placenta). El trofotodermo secreta una sustancia líquida al interior de la mórula formándose así una cavidad interna; el embrión en esta etapa se conoce como blastocisto y es éste el que se implanta en el cuello uterino a los 3.5 de desarrollo o días post coito (dpc) (Borland, 1977; Wiley, 1984). La división de las células hacia trofotodermo y de la ICM es el primer evento de diferenciación

durante el desarrollo embrionario del ratón. Las células de la ICM comienzan a diferenciar e inician la gastrulación a los 6.5 dpc. Una vez formadas las tres capas germinales se comienzan a formar los diferentes órganos y tejidos que constituyen al embrión, este proceso ocurre desde el día 8.5 hasta los 13.5 de gestación. Finalmente, el embrión termina de crecer a partir del 14 dpc hasta su nacimiento (Pesce y Schöler, 1998).

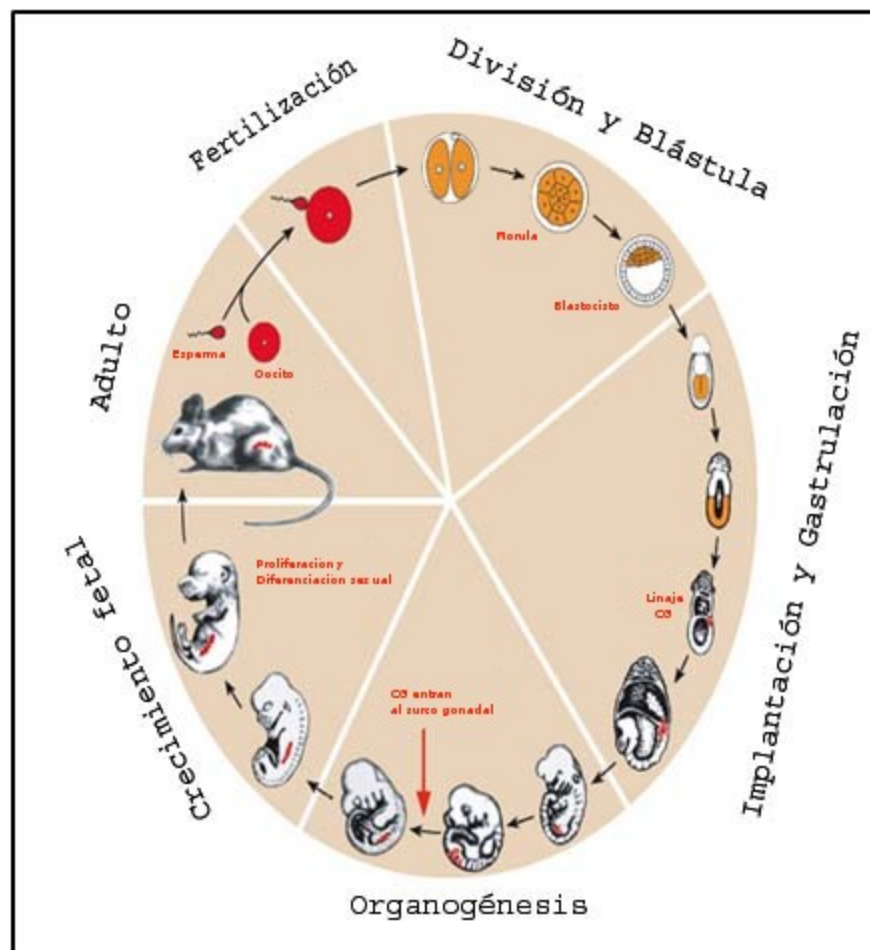


Fig. 1. Desarrollo embrionario del ratón. El espermatozoides y el óvulo se fusionan y forman el cigoto. Del día 0.5 al 3.5 se divide, forma el blastocisto y se implanta en el útero. A partir de los 6.5 dpc se empiezan a formar las tres capas germinales en la gastrulación y posteriormente se comienzan a generar los órganos a los 8.5 dpc. El embrión termina de desarrollarse hasta los 18 o 20 dpc (Figura tomada de Pesce y Schöler, 1998). CG: células germinales primordiales.

El estudio del desarrollo embrionario de ratón también puede abordarse a través de experimentos de cultivo organotípico. Es decir, que pueden disectarse órganos embrionarios específicos y cultivarse de manera aislada lográndose así reproducir los eventos del desarrollo que ocurren en el organismo entero. En este estudio realizamos experimentos de cultivo de órganos en los que buscamos identificar factores que regularan la transcripción de los genes *Zimp*. Los órganos embrionarios que mejor han funcionado para este tipo de experimentos han sido las extremidades y las gónadas del ratón, los cuales pueden cultivarse hasta por 96 horas, tiempo en el que puede observarse su desarrollo y analizar las vías de señalización involucradas. A continuación se describirá brevemente el desarrollo de cada uno de estos órganos.

Desarrollo de las extremidades.

Las extremidades de los vertebrados son órganos extremadamente complejos que derivan del mesodermo lateral del embrión a partir de los 9.5 dpc y siempre en una posición exacta y de manera perpendicular al cuerpo del embrión. Su desarrollo comienza con la proliferación de células mesenquimales y la formación de una cresta o primordio rodeada por una lámina de células del ectodermo conocida como surco apical del ectodermo o AER (por sus siglas en inglés). Las extremidades se desarrollan en tres diferentes ejes: el eje próximo-distal (P - D), el antero-posterior (A - P) y el dorso-ventral (D - V) los cuales se forman por la influencia de dos centros señalizadores u organizadores que son el AER y la zona polarizante anterior (ZPA; Fig. 2a).

El eje P - D define la dirección del crecimiento de la extremidad desde los hombros a la punta de los dedos y la formación de las estructuras óseas del estilopodio (brazo), zeugópodo (antebrazo) y autópedo (mano o pie) (Fig. 2a y b). La formación de

este eje está dada por la interacción entre señales provenientes de las células del mesodermo lateral y por señales del AER. Las células del mesénquima sintetizan ácido retinoico (AR), quien mantiene la identidad proximal de las células e induce la expresión de genes involucrados en la formación del estilopodio (*Meis1* y *Meis2*) (Tabin y Wolpert 2007; Zeller et al., 2009), mientras que el AER expresa los factores de crecimiento de fibroblastos o FGFs 8, 4, 9 y 17, los cuales evitan la proximalización de las células y mantienen una identidad distal y una continua proliferación durante todo el desarrollo de la extremidad. Además, mantienen un efecto opuesto a la señalización generada por el AR e inducen la expresión de genes como los *Hox* (*Hox9-Hox13*), involucrados en la especificación del estilopodio y el autópedo (Lewandoski et al., 2000; Moon y Capechi 2000; Sun et al., 2002, Lu et al., 2006; Zeller et al., 2009).

El eje antero - posterior define la identidad de los dígitos del pulgar (anterior) al meñique (posterior) y la formación de los huesos del zeugópodo (radio y ulna en la extremidad anterior, tibia y fíbula en la extremidad posterior) (Fig. 2c). Durante el establecimiento de éste eje se forma la ZPA en la parte posterior de la extremidad. Las células que se encuentran en la región de la ZPA expresan y secretan el morfógeno Sonic Hedgehog (SHH), quien tiene un papel central en la formación del patrón A - P y el número correcto e identidad de dígitos. Los morfógenos son moléculas de origen proteico o de vitaminas, difusibles secretadas por células de centros señalizadores y tienen un efecto autócrino y parácrino (De Robertis, 2006). Si se coloca ectópicamente SHH en la parte anterior de la extremidad se produce una duplicación de los dígitos posteriores, formándose una imagen de espejo. Además, quitar la expresión de *Shh* en el primordio de la extremidad resulta en una pérdida dramática de los huesos, generándose solo el estilopodio, un reducido zeugópodo y un solo dedo, confirmando así la importancia de ésta molécula en la formación del eje A - P (Chiang et al., 1996; Chiang et al., 2001). Se sabe que SHH también está involucrado en la proliferación de las células en la

ZPA, debido a que la inhibición de la señalización de SHH por ciclopamina detiene el ciclo celular en esta zona, resultando en la pérdida de la identidad de los dígitos (Towers *et al.*, 2008). Por otra parte, en ratón se conocen varios factores de transcripción como HAND2 y los HOXD9-13 implicados en el funcionamiento de la ZPA, ya que la pérdida de estos factores evitan la expresión de *Shh* en el margen posterior de las extremidades (Tarchini *et al.*, 2006; Zeller *et al.*, 2009)

El eje D-V se distingue por la formación de los nudillos en la región dorsal y las uñas y de la palma de la mano en la región ventral (Fig. 2d). La formación de la polaridad dorsal en las extremidades se genera por la señalización de células ectodermales, quienes expresan el morfógeno WNT7a e inducen la expresión de *Lmx1b* en las células mesenquimales para mantener la identidad dorsal durante el desarrollo de las extremidades (Ahn *et al.*, 2001; Pizette *et al.*, 2001).

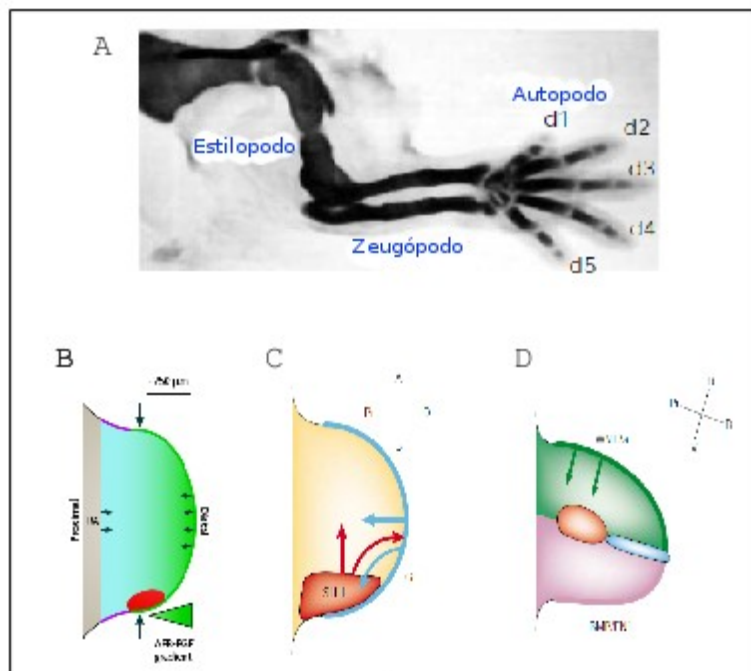


Fig. 2. Desarrollo de las extremidades de mamífero. A) Esqueleto de una extremidad de ratón, el estilopodio es la parte mas proximal que forma el húmero o el fémur.

El zeugópodo es la región intermedia y da origen al radio y la ulna o a la tibia y el peroné. Mientras que el elemento más distal es el autópedo, donde se forman los dedos. B) Interacciones moleculares opuestas entre el AR y los FGF's durante la formación del patrón próximo-distal. C) Señalización de SHH en la ZPA durante la formación del eje A - P. D) Esquema de la señalización de WNT7a para la dorsalización de las extremidades (Figuras tomadas y modificadas de Niswander, 2003 y Bénazet y Zeller *et al.*, 2009).

Los patrones de crecimiento de la extremidad en las tres dimensiones son acciones coordinadas de los tres centros señalizadores y las moléculas que éstos producen, tales como el AR, FGF's, SHH y WNT7a. La ausencia de cualquiera de estos centros afecta a las otras vías de señalización y por ende el correcto desarrollo de la extremidad. Por ejemplo, en experimentos donde se remueve el AER disminuye la expresión de *Shh*, sin embargo éste se recupera al colocarle perlas con FGF8 (Sun *et al.*, 2002; Laufer *et al.*, 1994; Niswander *et al.*, 1994). Además SHH se requiere para la expresión de *Gremlin*, el cual es un antagonista de BMP4 y promueve la expresión del los FGF en el AER (Michos *et al.*, 2004; Zuñiga *et al.*, 1999), lo que define un ciclo de regulación SHH-GREMLIN-FGF (Michos *et al.*, 2004; Bénazet y Zeller *et al.*, 2009).

Desarrollo de las gónadas embrionarias y determinación sexual.

La determinación sexual en mamíferos comienza desde la segregación cromosomal, donde las hembras reciben un par de cromosomas X y los machos llevan un cromosoma X y uno Y. Las gónadas de hembra y de macho en ratón se empiezan a desarrollar a los 10.5 dpc, una vez que las células germinales invaden el surco urogenital. El surco urogenital a los 11.5 dpc forma una gónada bipotente o indiferenciada, la cual es idéntica en machos y hembras. Posteriormente, la diferenciación de la gónada de macho empieza con la expresión del gen *Sry* que está codificado en el cromosoma Y, y por

lo tanto sólo se activa en machos. Este gen es conocido como el factor determinante de testículo y se expresa en algunas células somáticas de soporte dentro de la gónada, las cuales diferencian a células de Sertoli a los 12.5 dpc (Wilhelm *et al.*, 2007). Las células de Sertoli inducen directa e indirectamente la diferenciación de otras células somáticas tales como las células de Leydig o esteroidogénicas y mioideas peritubulares, las cuales se organizan alrededor de las de Sertoli y las germinales, formando los cordones seminíferos (Palmer y Burgoyne 1991; Ross y Capel, 2005; Kocer *et al.*, 2009). En la hembra, las células de soporte de la gónada no expresan SRY y diferencian a células de la granulosa. Estas células expresan WNT4 y RSPO1, que son antagonistas de la acción de SRY y son requeridos para la diferenciación de las células somáticas de hembra (Fig. 3; Vainio *et al.*, 1999; Chassot *et al.*, 2008; Kocer *et al.*, 2009).

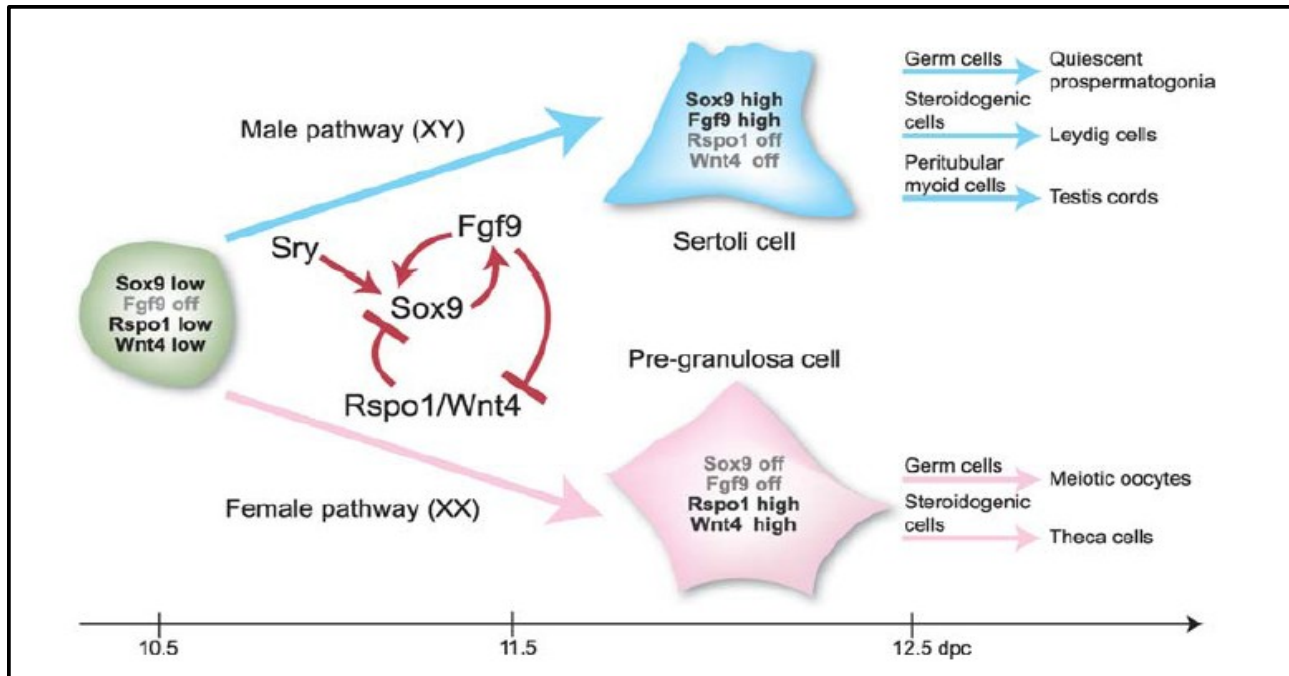


Fig. 3. Diferenciación sexual de las gónadas. El esquema muestra la diferenciación de las células somáticas hacia Sertoli en macho y a granulosa en hembra. Los cambios en la expresión de SRY/SOX9 o WNT4/Rspo1 inducen la diferenciación sexual hacia macho o hembra, respectivamente (Figura tomada de Kocer *et al.*, 2009).

Durante el desarrollo de las gónadas, las células germinales también sufren diferenciación sexual. Esto ocurre aproximadamente a los 13.5 dpc cuando las células germinales de hembra inician la meiosis y diferencian a ovocitos, mientras que las germinales de macho detienen su división celular, quedando suspendidas en la fase G0 del ciclo celular e iniciando así el camino de diferenciación a proespermatogonias. La decisión de las germinales de diferenciar a ovocito o espermatozoide depende de señales que vienen de su entorno, mas que de su composición cromosomal (Ford *et al.*, 1975; Palmer y Burgoyne, 1991). Las germinales de macho se comprometen a espermatogénesis a los 12.5 dpc, cuando empiezan a ser rodeadas por las Sertoli y empaquetadas dentro de los cordones seminíferos. Por su parte las germinales de hembra se comprometen a ovocitos a los 12.5 dpc e inician la meiosis a los 13.5 dpc por la acción del ácido retinoico (AR). El AR se sintetiza en el mesonefros y difunde hacia

la gónada, donde induce la expresión de *Stra8* y la entrada a meiosis (Bowles *et al.*, 2006; Kouvoba *et al.*, 2006). Las germinales continúan en meiosis hasta los 14.5 dpc donde se detienen en el estadio de diploteno. Estas células retomarán la meiosis una vez que sean fertilizadas por el espermatozoide.

En macho, la gónada expresa la enzima CYP26b1 a los 12.5 dpc. Esta enzima metaboliza el AR y evita que las germinales entren en meiosis (Bowles *et al.*, 2006). En consecuencia, las germinales de macho se comprometen a espermatogénesis y continúan proliferando hasta los 13.5 dpc donde se detienen mitóticamente.

La espermatogénesis.

Después del nacimiento, los ratones machos retoman la espermatogénesis. Entre el día 3 y el 7 del período post-natal, los cordones sexuales se diferencian y forman los túbulos seminíferos. A partir de los 7 días postpartum (dpp), las células germinales dentro de los túbulos reinician su ciclo celular y comienza la proliferación de espermatogonias. La espermatogénesis es un proceso altamente regulado y se puede dividir en 4 distintos eventos: mitosis, meiosis, espermiogénesis y espermiación (Fig. 4; Pearl *et al.*, 2009). Primero las germinales se dividen mitóticamente y eventualmente diferencian a espermatogonias tipo A, las cuales se caracterizan por ser más pequeñas que las germinales y tener la cromatina asociada a la membrana nuclear. Estas espermatogonias pasan por 4 estadios diferentes (A1 - A4) y dan origen a las espermatogonias tipo B. Las células tipo B pueden seguir dividiéndose mitóticamente o entrar a meiosis diferenciándose a espermatocitos primarios o en leptoteno a los 14 dpp. A los productos de la primera división meiótica se les denomina espermatocitos secundarios o en paquiteno, los cuales después de terminar la segunda división meiótica generan células haploides y diferencian a espermátidas. Las espermátidas sufren

varios cambios morfológicos, incluyendo la condensación cromosomal y formación del acrosoma, la cola y el cuerpo residual, en un proceso llamado espermiogénesis.

Durante estas divisiones las células no completan la citocinesis y se mantienen unidas por puentes citoplasmáticos formando un sincisio. Además, mientras las células se van dividiendo también se van moviendo, alejándose de la membrana basal del túbulo y acercándose al lumen, por lo que cada tipo celular se puede localizar en una capa particular del túbulo (Fig. 4). Finalmente, las espermatidas que se encuentran en el borde del lumen pierden sus conexiones citoplasmáticas y terminan su diferenciación a espermatozoides, esperando ser liberados en la espermiación (Kretser y Kerr, 1983; Pearl *et al.*, 2009).

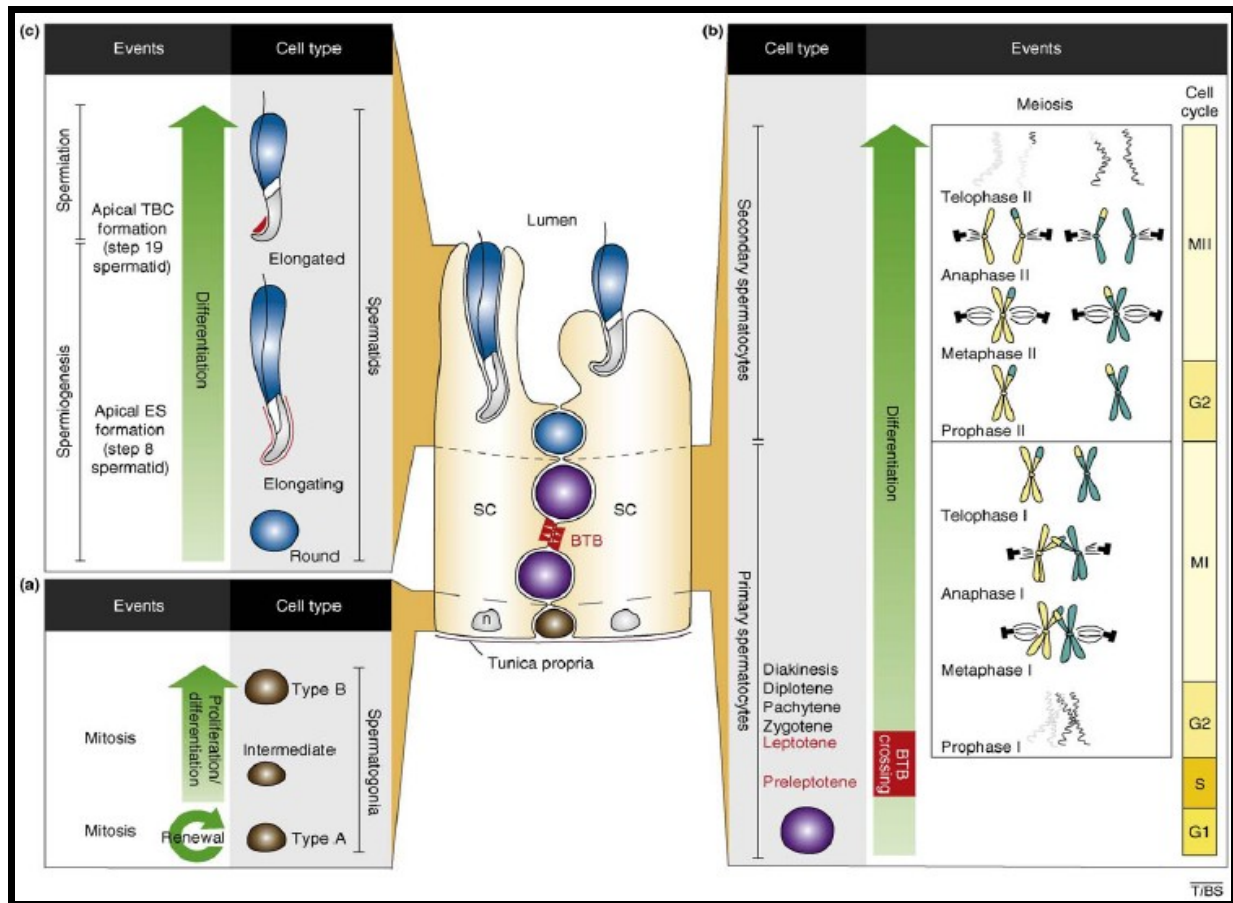


Fig. 4. Eventos celulares que ocurren durante la espermatogénesis. En el centro de la imagen se ilustra una sección del túbulo seminífero de un testículo adulto. Se muestran dos células de Sertoli en color amarillo y las células germinales en diferentes estadios de desarrollo. La progresión del ciclo celular en los espermatocitos primarios está sincronizada con el remodelaje y migración celular a través de la barrera de células sanguíneas del testículo (BTB). a) Mitosis, las espermatogonias de tipo A se están autorenovando y diferencian al de tipo B; esto ocurre en el compartimento basal del túbulo seminífero. b) Meiosis (M), que incluye las dos divisiones meióticas MI y MII. c) espermiogénesis y espermiación. Las espermatídas redondas comienzan la espermiogénesis con la formación del acrosoma, posteriormente se forma la cola y el cuerpo residual en las espermatídas elongadas. Al término de la espermiogénesis, las espermatídas elongadas se liberan al lumen del túbulo en la espermiación. BTB: barrera de células sanguíneas del testículo; MI: meiosis I; MII: meiosis II; N: núcleo; SC: célula de Sertoli; Figura tomada de Pearl *et al.*, 2009.

La expresión genética determina el desarrollo embrionario.

Los eventos que ocurren durante el desarrollo pueden explicarse en términos de circuitos genéticos interpretados y ejecutados por vías de señalización de proteínas que operan dentro de las células y en células vecinas, determinando el comportamiento celular. La proliferación, diferenciación, migración y muerte de las células son procesos esenciales cuya regulación genera el plan de desarrollo que permite la formación de un organismo. Durante el desarrollo de diferentes organismos se utilizan genes similares dentro del establecimiento del plan corporal. Los genes se expresan de forma compleja y generan patrones dinámicos de expresión con redes de interrelaciones. Hay sólo un grupo de genes que se expresan en todas las células del organismo y codifican para proteínas que son esenciales para el funcionamiento general de las células y son conocidos como “housekeeping” o de mantenimiento. El resto se expresan diferencialmente en tipos celulares y tiempos específicos, dependiendo de la función de un tejido particular.

Los factores de transcripción son reguladores clave durante la expresión genética. Éstos actúan como controles moleculares para activar o reprimir permitiendo así que cada tipo celular exprese proteínas específicas en cantidades y en el momento adecuado. A su vez, estos factores de transcripción son regulados por cascadas de señalizaciones que se inducen por efecto de moléculas externas a la célula, y las comunican al interior del núcleo. Los factores transcripcionales realizan su función reconociendo y uniéndose a secuencias concretas de ADN, a otros factores, o interactuando directamente con la ARN polimerasa. Además su actividad puede ser modulada selectivamente por otras proteínas, a menudo como paso final de una cadena de vías de señalización intracelulares. Con frecuencia la regulación de su actividad depende de modificaciones postraduccionales (MPT) tales como la fosforilación, acetilación, ubiquitinación y SUMOilación. La modulación rápida y reversible de la actividad de los factores transcripcionales a través de MPT es

esencial para poder adaptarse rápidamente a cambios ambientales y se lleva a cabo mediante cambios en la estabilidad de las proteínas; cambios en la localización subcelular y cambios en las capacidades de interacción con otras proteínas o con el ADN. De ésta manera las MPT proveen un nivel de control más fino en contextos biológicos particulares.

Tal es el caso de las proteínas ZIMP7 y ZIMP10 de mamífero, de las cuales se sabe que regulan la acción de factores transcripcionales importantes durante el desarrollo. Este trabajo de tesis se enfocó en realizar un análisis de las proteínas ZIMP durante el desarrollo embrionario de ratón, por lo que a continuación se describen con detalle sus propiedades estructurales, bioquímicas y funcionales que hasta ahora se conocen.

ZIMP7 y ZIMP10 y su relación con la familia PIAS.

ZIMP7 y ZIMP10 son dos proteínas que presentan similitud a lo largo de un dominio de aproximadamente 300 aminoácidos. Dentro de este dominio existe un motivo conocido como el SP-RING, el cual también está presente en una familia de proteínas llamadas PIAS. El SP-RING se ha asociado funcionalmente con el proceso de modificación post-traducciona llamada SUMOilación, y es la única función sugerida por su estructura en las proteínas ZIMP.

La familia de proteínas PIAS (Protein inhibitor of activated STAT) se nombró así basándose en la identificación de la actividad de PIAS1 y PIAS3 como represores de la actividad de los factores de transcripción STAT1 y STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription) respectivamente (Chung *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1998). En estudios subsecuentes se demostró que su actividad no es específica de las STAT, sino que interaccionan con una diversidad de proteínas, entre las cuales se encuentran otros factores de

transcripción como p53. Las proteínas PIAS están conservadas en levadura (Siz1 y Siz2 de *S. cerevisiae*) (Johnson y Gupta 2001), nemátodos (GEI-17 de *C. elegans*), invertebrados [Su(var)2-10 de *D. melanogaster* (Hari et al., 2001)] y vertebrados, donde se conocen cuatro miembros: PIAS1, PIAS2 (PIASxa y PIASxb), PIAS3 y PIAS4 (PIASy) (Fig. 5; Palvimo 2007; Sharrocks 2006; Rytinki et al., 2009).

Estas proteínas muestran una gran actividad en la regulación de la función de muchas otras proteínas, como la translocación subcelular de proteínas (Matsuura et al., 2005; Hattory et al., 2006; Imoto et al., 2008), pero su mayor actividad está relacionada principalmente con la regulación de la actividad transcripcional, por lo que se les considera como proteínas co-reguladoras de la transcripción. Su función sobre la transcripción puede ser mediante la activación o la represión de la misma, dependiendo del gen blanco o de la interacción con otros reguladores transcripcionales. Como ya se mencionó, uno de los mecanismos mediante los cuales actúan las PIAS es favoreciendo la SUMOilación de factores proteicos lo cual es posible gracias a su actividad de E3 ligasa de SUMO (Rytinki et al., 2009). También se ha demostrado que son capaces de re-localizar proteínas en diferentes compartimentos subcelulares (Van De Akker et al., 2005; Lee et al. 2006), aunque no se sabe como se relaciona esta actividad con la SUMOilación.

Las PIAS conservan dentro de su estructura 5 dominios importantes para su actividad de regulación transcripcional y localización subcelular, además presentan una identidad del 65% en su secuencia de aminoácidos (Fig. 5). En su parte central conservan el dominio SP-RING antes mencionado, que es rico en cisteínas y similar al RING finger de las E3 ligasas de Ubiquitina (Ub) (Hochstrasser, 2001). El SP-RING tiene 6 residuos de cisteínas y una histidina, las cuales unen dos átomos de zinc formando una estructura de "brazo cruzado". Este dominio está involucrado en la interacción de las PIAS con otras proteínas y se sabe que es el que les confiere la actividad

de E3-ligasa de SUMO (Johnson y Gupta 2001; Kotaja *et al.*, 2002; Rytinki *et al.*, 2009; Sachdev *et al.*, 2001, Schmidt y Muller 2003; Takahashi *et al.*, 2008). Además del SP-RING, las PIAS presentan en su extremo amino un dominio llamado SAP (acrónimo de SAF-A/B ACINUS y PIAS), involucrado en la interacción con el ADN en regiones ricas en AT lo que favorece la condensación de la cromatina y la unión del ADN a regiones de la matriz nuclear (MARS) (Sachdev *et al.*, 2001; Cen *et al.*, 2004). Este dominio también está involucrado en la unión con factores transcripcionales como p53 (Okubo *et al.*, 2004) y con receptores hormonales nucleares (Moilanen *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2001). Adyacente al dominio SAP, tienen un dominio llamado PINIT, esencial para mantener al menos a PIAS3L dentro del núcleo (Duval *et al.*, 2003) y en algunos casos contribuye junto con el SP-RING a la selección del sustrato a SUMOilar (Wong *et al.*, 2004; Kotaja *et al.*, 2002; Takahashi y Kikuchi 2005; Reindle *et al.*, 2006). Cerca de su carboxilo terminal poseen un motivo SIM (SUMO-Interacting Motive) el cual interactúa de manera no covalente con SUMO y está involucrado en el reconocimiento de blancos de SUMOilación (Perry *et al.*, 2008; Wilkinson y Henley 2010) o en el reconocimiento de factores de transcripción (Yang *et al.*, 2005). En su carboxilo terminal, a excepción de PIAS2, poseen una región rica en residuos de serinas y treoninas (Palvimo, 2007).

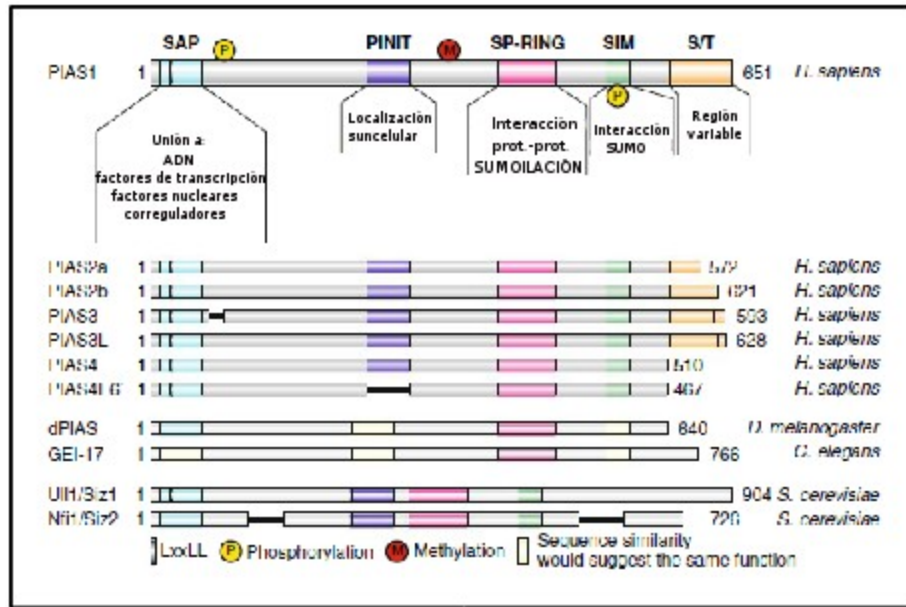


Fig. 5. Esquema de la estructura de las proteínas PIAS. Se muestran los 5 diferentes motivos conservados en la familia de las proteínas PIAS y sus homólogos en diferentes especies. M: Metilación, P: Fosforilación (Figura tomada de Rytinki *et al.*, 2009).

SUMOilación.

La SUMOilación es un proceso reversible mediante el cual se modifican algunas proteínas por la unión covalente de SUMO (Small Ubiquitin-like Modifier) regulando así su actividad en diferentes procesos celulares (Friedlander y Melchior 2007). Esta proteína de aproximadamente 11 KDa se encuentra conservada desde levadura (Smt3) hasta humano (SUMO1 - 4) (Wilkinson y Henley 2010) y mantiene una alta similitud en su estructura tridimensional con Ubiquitina (Ub), pese a que solo comparten el 18% de identidad en su secuencia de aminoácidos (Perry *et al.*, 2008). Las proteínas SUMO se expresan en una forma inmadura y su maduración consiste en la remoción de su extremo carboxilo terminal por proteasas específicas de SUMO (SENPs) dejando expuestos dos residuos de glicina importantes para la unión de SUMO con sus proteínas blanco (Melchior F. *et al.*, 2003). Estas mismas enzimas SENP son las encargadas de remover SUMO de las

proteínas blanco regulando el ciclo de la vía de SUMO (Drag M. y Salvense G. S. 2008).

SUMO se une a las proteínas blanco en un proceso análogo al proceso de ubiquitinación donde participan tres tipos de enzimas: La enzima heterodimérica E1 (SAE1/SAE2) o de activación, la E2 (Ubc9) o conjugante y la E3 ligasa (PIAS, Pc2, RanBP2) (Fig. 6). La E1 reconoce a SUMO y lo une a ella mediante la hidrólisis de ATP, formando un enlace tioéster entre la glicina del carboxilo terminal de SUMO y una cisteína de SAE2. Después, la E1 transfiere SUMO a otra cisteína en E2 y finalmente la E2 une SUMO a una lisina de las proteínas blanco preferentemente dentro del motivo YKxE (donde Y es un aminoácido alifático y x es cualquier aminoácido). Este último paso es asistido por la acción de las E3 ligasas de SUMO que aumentan la especificidad por el sustrato y la velocidad de la reacción (Friedlander y Melchior 2007; Tang *et al.*, 2008).

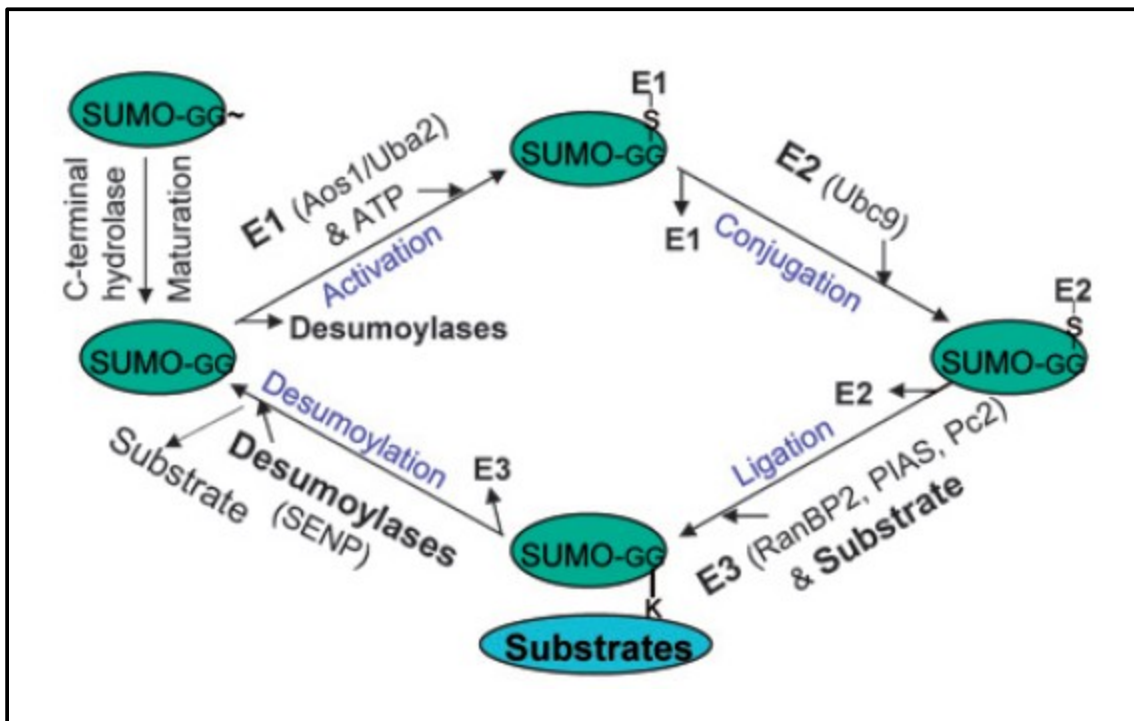


Fig. 6. Vía de SUMOilación. Las proteínas SUMO se procesan (maduración) en su extremo carboxilo terminal por proteasas específicas de SUMO (SENP). Después, la E1 reconoce a SUMO, lo une a ella y lo transfiere a la E2 conjugante. La enzima conjugante transfiere SUMO a las proteínas blanco asistidas por las E3 ligasas. S1: SUMO, S2: SUMO (Figura tomada de Zhao, 2007).

La SUMOilación está involucrada en la regulación de diferentes procesos biológicos. Por ejemplo, puede estabilizar a sus blancos protegiéndolos de degradación mediada por ubiquitinación (Desterro *et al.*, 1999); está involucrado en el mantenimiento de la estabilidad del genoma así como en su empaquetamiento y dinámica (Heideker *et al.*, 2009; Anckar y Sistonen 2007); en transducción de señales (Johnson, 2004; Hay, 2005); durante la regulación del ciclo celular y en la meiosis (La Salle *et al.*, 2008; Cheng *et al.*, 2006; Gutiérrez y Ronai 2006; Montpetit *et al.*, 2006). Una de las funciones más prominentes de la SUMOilación es la regulación de la transcripción, principalmente mediante la inhibición de la misma (Gill, 2005). Esto debido a que los principales blancos de la SUMOilación son proteínas involucradas en la represión transcripcional y se ha observado que mutaciones que inactivan la vía de SUMOilación, aumentan dramáticamente la actividad transcripcional de esos blancos (Ross *et al.*, 2002; Holmstrom *et al.*, 2003; Hay, 2005). Sin embargo existen también numerosos ejemplos de la participación de SUMO en la activación de la transcripción (Schmidt y Müller, 2003; Watts, 2004).

Las proteínas ZIMP están altamente conservadas.

Como se mencionó antes, las proteínas ZIMP7 y ZIMP10 se relacionan estructuralmente con las PIAS por conservar el dominio RING que en estas últimas da la identidad de E3-ligasa de SUMO. Sin embargo las ZIMP no tienen ningún otro de los dominios de las proteínas PIAS, lo que hace debatible el que sean parte de esta

familia. Por otro lado es importante tomar en cuenta que además del dominio SP-RING las PIAS y las ZIMP comparten ciertas propiedades funcionales que serán mencionadas mas adelante, tales como regular la transcripción mediada por receptores de hormonas nucleares, interaccionar con p53 y con componentes de la vía de TGF- β . En todo caso las proteínas ZIMP se encuentran presentes en una gran diversidad de organismos, desde invertebrados a mamíferos, en todos los cuales su signo de identidad es el dominio extendido o X-SPRING. El X-SPRING abarca una tercera parte de las proteínas ZIMP y en mosca se encuentra presente en la proteína Tonalli (Tna) en donde comparte un 60% de similitud con las proteínas de mamíferos.

El gen *tonalli* (*tna*) se aisló en *Drosophila melanogaster* en un análisis genético de mutantes que afectaban la función de genes homeóticos. Los genes homeóticos son aquellos encargados de darle identidad a los segmentos corporales de los organismos (Lewis, 1978). Tna interactúa genéticamente con los genes *Osa* y *Brahma*, quienes codifican para factores del complejo remodelador de la cromatina BRAHMA (BRM). Estos genes han sido anteriormente clasificados como del grupo Thrithorax (Trx) debido a que contribuyen al mantenimiento de la expresión de genes homeóticos. Por la misma razón, Tna se consideró un gen del grupo Trx ya que participa en la regulación positiva de la expresión del promotor 2 de Antennapedia (Antp) (Fig. 7A). Por otro lado, el Dr. Zurita y colaboradores en el 2003 demostraron que a diferencia de las PIAS, Tna es importante durante el desarrollo de *Drosophila*. Esto debido a que combinaciones mutantes heteroalélicas de *tna* resultan en la muerte de las moscas durante el desarrollo en los estadios de larva de tercer instar, pupa y farato (Fig. 8). Además, estas mutantes presentan deficiencias en la función de las proteínas homeóticas Sex comb reduced (Scr) y Ultrabithorax (Ubx) (Fig. 7b y c) (Gutiérrez et al., 2003).

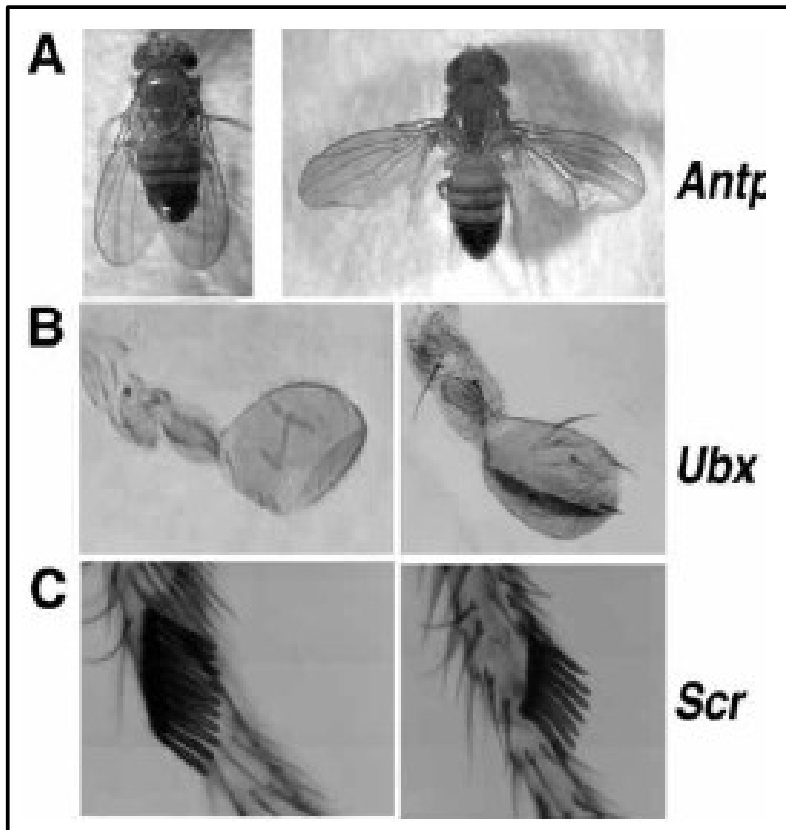


Fig. 7. Mutantes en *tna* presentan fenotipos homeóticos. Del lado izquierdo la condición silvestre y del lado derecho la condición mutante. A) Combinación doble heterociga tna^1/brm^1 que tiene un fenotipo de extensión de alas indicando una deficiencia en el funcionamiento de Antp. B) Transformación parcial de halterio a ala en un fondo mutante tna^1/tna^4 mostrando una deficiencia en la función de Ubx. C) Macho mutante tna^3/tna^4 quien tiene una reducción en el número de peines sexuales en el primer par de patas, indicando una disminución en la actividad de la proteína Scr (Imagen tomada de Gutiérrez *et al.*, 2003).

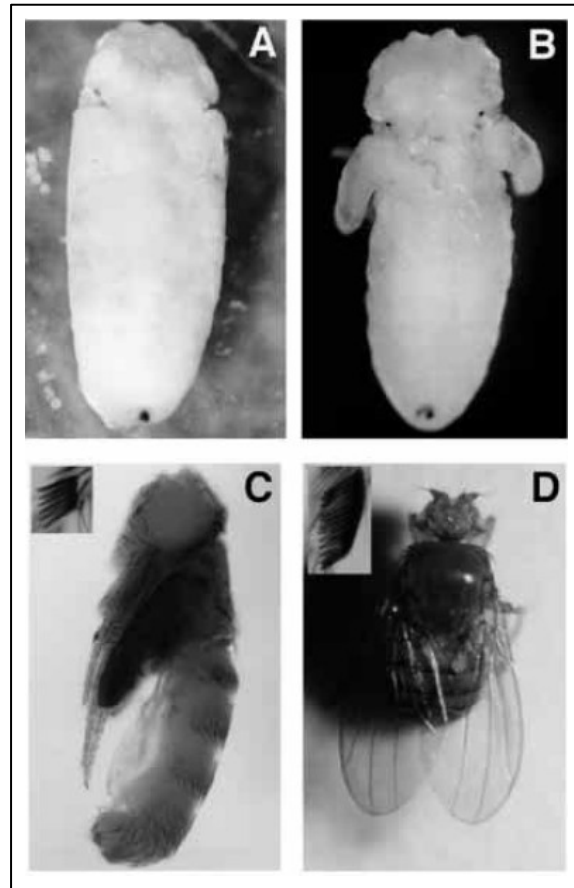


Fig. 8. Fenotipos mutantes de combinaciones heteroalélicas de *tna*. Moscas mutantes, que portan una mutación en *tna* en combinación con la deficiencia del gen (*tna¹/Df(3L)lxd6*) mueren en los estadios de A) prepupa, B) pupa y C) farato. Además, los faratos machos muestran una reducción en los peines sexuales (recuadro en C). D) Macho *tna¹/+* con un fenotipo silvestre y un número normal de peines sexuales (recuadro en D; Figura tomada de Gutiérrez *et al.*, 2003).

Proteínas ZIMP de humano.

Las proteínas ZIMP7 y ZIMP10 (Zinc finger-containing Miz-1, PIAS-like protein on chromosome 7 or 10) de humano se identificaron en ensayos de 2 híbridos por interactuar con el receptor de andrógenos (RA) y aumentar la actividad transcripcional mediada por éste en cultivos de células CV-1 (células de riñón de mono) (Huang *et al.*, 2005; Sharma *et al.*, 2003). Los genes *ZIMP7* y *ZIMP10* se expresan en tejido urogenital adulto de humano, ambos se expresan en próstata;

ZIMP10 tiene una mayor expresión en el ovario y *ZIMP7* se encuentra preferentemente en testículo (Fig. 9). Además, las proteínas de ambos co-localizan con el RA y SUMO1 en el núcleo de células epiteliales de próstata en focos de replicación del DNA (Sharma *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2005; Beliakoff y Sun 2006). Por otro lado, *ZIMP10* favorece la unión de SUMO al RA en ensayos de co-transfección en células COS-1, sugiriendo un papel de ésta proteína en el proceso de SUMOilación (Sharma *et al.*, 2003). Además, Peng y colaboradores (2010) demostraron recientemente que *ZIMP7* interactúa físicamente con PIAS3 y juntas co-regulan positivamente la actividad transcripcional mediada por el RA en fibroblastos de ratón.

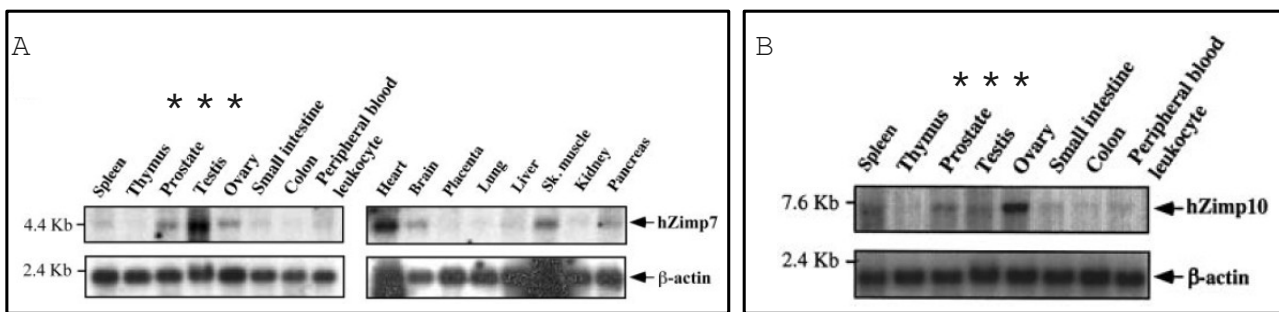


Fig. 9. Expresión de los genes *ZIMP* en los tejidos urogenitales. Análisis por Northern Blot de la expresión de *ZIMP10* (izquierda) y *ZIMP7* (derecha). Los asteriscos denotan el tejido urogenital (Figuras tomadas y modificadas de Sharma *et al.*, 2003 y Huang *et al.*, 2005).

Se ha demostrado en cultivos *in vitro* mediante inmunoprecipitación que las proteínas *ZIMP* pueden interactuar físicamente con otros receptores hormonales y algunos factores transcripcionales. Por ejemplo se sabe que *ZIMP10* se une con los factores p53 y SMAD3 regulando positivamente su actividad en fibroblastos de ratón, lo que demuestra un papel de ésta proteína en las vías de señalización de TGF- β y p53 (Lee *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2006). Por su parte, *ZIMP7* interactúa con los receptores hormonales de estrógenos (RE) y glucocorticoides (RG) y con los factores BAF57 y

BRG1 (subunidades del complejo remodelador de la cromatina SWI/SNF). Estas interacciones inducen la actividad transcripcional mediada por cada uno de estos factores (Huang *et al.*, 2005). Las ZIMP interactúan con ellos a través de una región de 250 aminoácidos localizada en la parte central, donde contiene el SP-RING, lo que sugiere que podrían actuar a través de la SUMOilación, o favoreciendo su unión a regiones promotoras.

En lo que respecta a la función *in vivo*, Beliakoff y colaboradores (2008) determinaron la importancia de *Zimp10* durante el desarrollo embrionario estudiando el fenotipo en ratones nulos. Embriones con pérdida de función del gen *Zimp10* (*Zimp10*^{-/-}) presentan una morfología normal, pero tienen una reducción del 50% en su tamaño a los 9.5 dpc (Fig. 10A). Estos embriones mueren a los 10.5 dpc debido a una reducción en el diámetro de los vasos capilares del aorta dorsal y defectos en los ventrículos del corazón, además de presentar defectos en la organización de las redes del plexo vascular en el saco vitelino (Fig. 10B y C). En ensayos de microarreglos, se observó que ZIMP10 aumenta la expresión de *Fra-1*, un gen involucrado en la formación de las redes vasculares del embrión y la placenta, demostrando que ZIMP10 es necesario para la adecuada formación del sistema vascular durante el desarrollo embrionario de ratón (Beliakoff *et al.*, 2008).

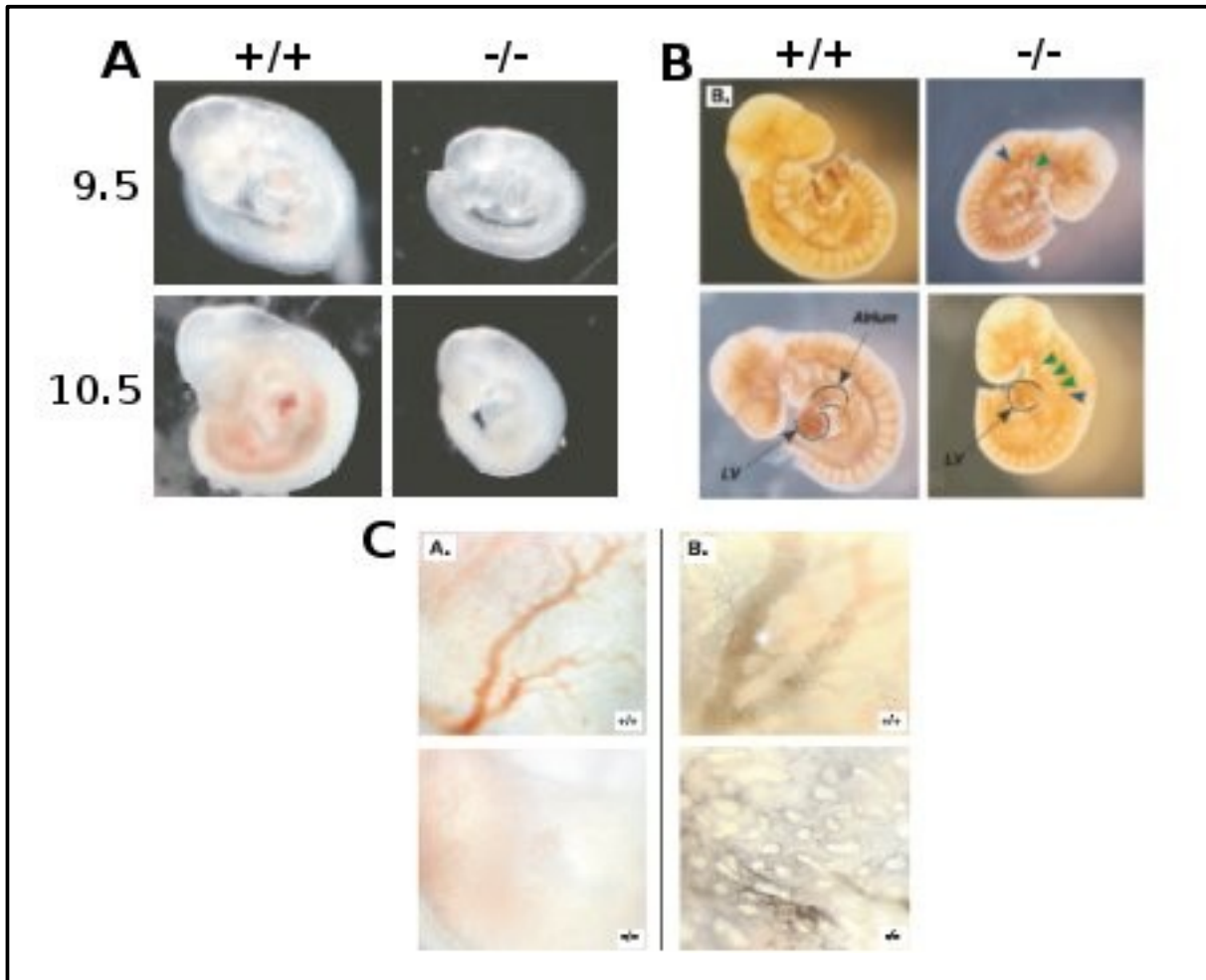


Fig. 10. Morfología de embriones nulos en *Zimp10*. A) Embriones de 9.5 y 10.5 dpc, donde se observa la disminución del tamaño. B) se muestra la reducción en el tamaño del corazón y los defectos en las redes vasculares. C) Defectos en la vascularización de los sacos vitelinos en embriones de 10.5 dpc (Figura tomada y modificada de Beliakoff et al., 2008).

Todos los resultados anteriores demuestran que las proteínas ZIMP7 y ZIMP10, al igual que Tonalli de *Drosophila*, son importantes para el correcto desarrollo y la viabilidad de los organismos durante la embriogénesis.

JUSTIFICACIÓN

Los genes *ZIMP7* y *ZIMP10* se encuentran en el genoma de todos los vertebrados y otros organismos multicelulares constituyendo una subfamilia de identidad muy clara, de la cual se sabe muy poco funcionalmente. A diferencia de las proteínas PIAS cuya pérdida de función con frecuencia no produce fenotipos durante el desarrollo embrionario, existen suficientes evidencias (como patrones de expresión y fenotipos observados en mosca y ratón), que destacan la relevancia tanto del gen *tna* como de las proteínas ZIMP durante la embriogénesis. En el laboratorio, nuestro interés fundamental es definir la importancia de algunos genes de vertebrados característicos de etapas embrionarias. El primer paso en esa dirección es el análisis del patrón de expresión de dichos genes durante el desarrollo. El definir los perfiles de expresión de los genes *ZIMP7* y *ZIMP10* nos puede ayudar a delinear los momentos del desarrollo en los cuales podrían estar participando. Además en el laboratorio se ha establecido el modelo de cultivo de órganos y se manejan herramientas que nos permiten explorar los factores que regulan la expresión de estos genes *in vivo*. Identificar algunos de estos factores también podría darnos información sobre las vías de transducción en las que están involucrados. Por lo anterior, creemos que los enfoques mencionados nos permitirán avanzar en el conocimiento de la función de *ZIMP7* y *ZIMP10* en el desarrollo embrionario.

OBJETIVOS

GENERALES:

- Determinar los perfiles de expresión para los genes *Zimp7* y *Zimp10* en embriones de ratón desde el inicio de la gastrulación hasta el final de la organogénesis.
- Identificar factores que regulan la expresión de los genes *Zimp* *in vivo*, en cultivos de extremidades y gónadas de embriones de ratón.

PARTICULARES:

- Identificar el patrón general de expresión de *Zimp7* y *Zimp10* durante la embriogénesis de ratón en las etapas de gastrulación y organogénesis.
- Analizar con detalle el patrón de expresión de *Zimp10* durante el desarrollo de las extremidades. En particular observar las correlaciones existentes entre los momentos críticos de la determinación del eje antero - posterior y la presencia de *Zimp10* en la ZPA.
- Analizar si los genes *Zimp7* y *Zimp10* se expresan en la gónada embrionaria, y si éste es el caso, ver si presentan un patrón dimórfico que pudiera relacionarlos con una participación en la determinación sexual.

- Caracterizar el efecto del ácido retinoico sobre la regulación de la expresión de *Zimp10 in vivo* y determinar si regula su expresión durante el establecimiento de la ZPA.
- Analizar el efecto de SHH en la expresión de *Zimp10* durante el establecimiento de la ZPA.
- Determinar si el ácido retinoico tiene un efecto en la expresión de *Zimp7* durante el desarrollo de la gónada de macho a los 12.5dpc.

MATERIALES Y MÉTODOS

Análisis computacional.

Se usaron las secuencias de las proteínas ZIMP7, ZIMP10 y Tonalli y se buscaron en la base de datos del GenBank todas las proteínas homólogas en secuencia a ellas utilizando el programa "BLAST" del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>). En el análisis se descartaron todas aquellas secuencias parciales o redundantes de las proteínas ZIMP. Después de este análisis se escogieron 23 secuencias de proteínas relacionadas a las ZIMP. Para identificar las motivos sobre-representadas en nuestro conjunto de secuencias se utilizó el programa Multiple EM for Motif Elicitation (MEME) (Bailey y Elkan, 1994). Se identificaron 30 motivos no sobrelapantes. Se utilizó el programa "CLIQUE" del paquete de programas de inferencia filogenética PHYLIP3.57c de Felsenstein (Felsenstein, 1995) para calificar la presencia (1) o ausencia (0) de estos motivos en las secuencias de las proteínas y usarlos para obtener el mayor número de caracteres y árboles filogenéticos sugeridos. El alinamiento de las proteínas se realizó con el programa MUSCLE (Edgar, 2004). El dominio SP-RING se identificó utilizando el servidor de la red Pfam (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/search.shtml>).

La predicción de los sitios de unión a factores transcripcionales en la región promotora de los genes *Zimp7* y *Zimp10* se hizo usando el programa CONREAL (<http://conreal.niob.knaw.nl/>) (Berezikov *et al.*, 2004; Berezikov *et al.*, 2005). El cual compara secuencias ortólogas entre dos especies y usa la base de TransFac 7.2 Pro para generar una base de datos con sitios de unión a factores transcripcionales.

Preparación de ribosondas.

La ribosonda de *Zimp10* se generó subclonando las primeras 500 pb de la región codificante del cADN en el vector pBluescript II KS. Para la ribosonda de *Zimp7* se subcló el fragmento del 532 al 1098 pb del cADN en el vector pBluescript II KS. Después, se linearizaron ambas construcciones con la enzima de restricción *HinD* III (Invitrogen) para generar la ribosonda antisentido y con *Not* I (Invitrogen) para la sentido. Cada una de las ribosondas se transcribieron *in vitro* utilizando RNA UTP-dioxigenina marcada (ROCHE) y la T7 ARN polimerasa (ROCHE) para la antisentido y la T3 ARN polimerasa (ROCHE) para la sentido.

Manejo de Animales.

Se utilizaron ratones de la cepa CD1 durante la realización de éste trabajo. Las hembras gestantes utilizadas en este trabajo se sacrificaron por dislocación cervical y se extrajeron los embriones en etapas desde 7.0 hasta 14.5 dpc (el día 0.5 se considera al momento de observar el tapón vaginal en la hembra). Para la extracción de los testículos usamos ratones machos de 8, 15 y 30 días post parto.

Hibridación *in situ*.

Se disectaron embriones en estadios de 7.0 hasta 12.5 dpc y se fijaron con 4% de paraformaldehído (PFA) a 4°C durante toda la noche. Se obtuvieron las extremidades y las gónadas de embriones de 10.5 hasta 14.5 dpc y se fijaron con PFA 4% durante toda la noche a 4°C. La hibridación *in situ* se realizó siguiendo las condiciones previamente descritas por Hogan y colaboradores (1994). Brevemente, primero se blanquearon los embriones, las extremidades y gónadas con H₂O₂ al 2% durante 1 hr y después se incubaron con 10 µg/ml de proteinasa K (Invitrogen) a temperatura ambiente por 5 minutos para

las extremidades y gónadas, y de 10 a 30 minutos los embriones. Se fijaron nuevamente con PFA4%/glutaraldehído0.2%, se lavaron con PBT y se pusieron a hibridar toda la noche con 200 ng de ribosondas específicas para *Zimp7* y *Zimp10*. Después se realizaron 3 lavados con solución I por 30 min a 68°C y tres lavados con solución II a temperatura ambiente durante 30 min. Posteriormente se les agregó solución de bloque durante 2 hrs y se dejaron toda la noche a 4°C con anticuerpo anti-DIG (ROCHE). Después se lavaron 5 veces con solución de TBST a temperatura ambiente y se reveló la hibridación con NBT/BCIP (ROCHE). Finalmente, se fijaron las muestras con PFA 4%, se deshidrataron con gradientes de metanol y se guardaron a -20°C.

Cultivo de extremidades de ratón.

Los cultivos se realizaron siguiendo el protocolo descrito previamente por Salas-Vidal y colaboradores (1998). Se utilizaron extremidades de embriones a partir de 11.5 dpc y los estadios de éstas se clasificaron de acuerdo al sistema de Wanek (Wanek *et al.*, 1989). Brevemente, las extremidades se cultivaron durante 7 o 24 hrs en medio DMEM con penicilina y le agregamos según el caso ácido retinoico (1 µM) (Sigma), 100 µM del antagonista de los RAR ANG193109 (Allergan), DEAB 10 µM (Sigma), el agonista Ag-SHH a 10 µM y con DMSO (Sigma) como control del experimento. Fijamos las extremidades con PFA 4% y las deshidratamos con gradientes de metanol.

Cultivo de gónadas de ratón.

Disectamos gónadas de embriones de 11.5 y 12.5 dpc y las cultivamos siguiendo el protocolo de Moreno-Mendoza (Moreno-Mendoza *et al.*, 1981.) Brevemente, las gónadas disectadas se cultivaron en membranas de nucleoporo "Track-Etch" (Whatman Schleicher & Schuell) flotando en medio McCoy suplementado con L-glutamina y NaHCO₃ (microlab, México) y con penicilina-estreptomocina (5M/ml). Cultivamos las gónadas con 1, 5 y 10 µM de RA (Sigma, St. Louis. MO) con 1µM de

DHT (Sigma, St. Louis. MO) y con DMSO como vehículo durante 24 hrs. Al final fijamos las gónadas con PFA al 4% toda la noche y otras se prepararon para extracción de ARN.

Disectamos gónadas de embriones de 14.5 dpc y testículos de ratones de 15 y 30 ddn y las cultivamos bajo el protocolo reportado por Szczepny (Szczepny *et al.*, 2009). Los testículos disectados se colocan en medio de cultivo y se descapsulan (quitar túnica). Después se disocian gentilmente con pinzas delgadas y se cortan en fragmentos de 5 mm. Las gónadas y los fragmentos de los túbulos los cultivamos en gotas colgantes de 25 - 30 ml de medio DMEM con 0.1% de BSA a 32°C durante 48 horas. Posteriormente se fijan los fragmentos con PFA 4%, se deshidratan con gradientes de metanol y se conservan a -20°C.

Análisis de la expresión de *Stra8*.

Las gónadas cultivadas con y sin AR se colocaron en trizol (Invitrogen) y se hizo la extracción de ARN total siguiendo las especificaciones recomendadas. Las muestras de ARN se analizaron por triplicado mediante RT-PCR usando los oligonucleótidos *StraUp* (5'-GTTTCCTGCGTGTTCCACAAG) y *StraLow* (5'-CCCGAGGCTCAAGCTTC) para *Stra8* que amplifican un producto de 151 pb (Jana *et al.*, 2005). Como control y para normalizar la expresión de *Stra8* se empleó la expresión de β -actina, para ello se utilizaron los oligonucleótidos *Uactin* (5'-ATGGATGACGATATCGCTG) y *Lactin* (5'-ATGAGGTAGTCTGTCAGGT).

RT-PCR cuantitativo.

Se disectaron gónadas de 12.5 hasta 14.5 dpc, se separaron de acuerdo al sexo y se les hizo extracción de ARN. Se sintetizó el cADN a partir de 500 ng de ARN total utilizando la enzima M-MLV-RT (Invitrogen) usando oligonucleotidos degenerados (Invitrogen) siguiendo las especificaciones de la enzima. Para el PCR se diseñaron los oligonucleótidos *upHPRT* (5'-GGACCTCTGCAAGTGTGGA) y *lowHPRT* (5'-

GCGCTCATCTTAGGCTTTGT) para el gen *hprt* (167 pb), los oligos *upZimp7* (5'-TGTCTTCCAGCTCCGAGATT) y *lowZimp7* (5'-TTGTGCGAGGTCTTGTTGTC) para *Zimp7* (183 pb), y los oligos *upZimp10* (5'-AGCATGTGCAGTGCTTTGAC) y *lowZimp10* (5'-AAACTCGGAGTGTGGATGC) para *Zimp10* (158 pb). La reacción de PCR se hizo en el termociclador "Light Cycler® 480 SW 1.5.0" (ROCHE), utilizando el programa "Light Cycler® 480 software release 1.5.0 version 1.5.0.39" con las siguientes condiciones: 95°C 10 min, seguidos de 40 ciclos de desnaturalización a 95°C por 15 seg., alineamiento a 60°C por 30 seg. y extensión a 70°C por 30 seg. haciendose la lectura de fluorescencia en cada ciclo. Se analizó la curva de "melting" para demostrar que solo había un producto final. Se generaron curvas estandar con los valores de Cp entre el log de ADN total del plásmido para cada gen específico. Los valores de las curvas estandar se utilizaron para calcular la cantidad de producto final de cada muestra. Las cantidades finales de los productos se normalizaron a los niveles de expresión del gen *HPRT*.

Obtención del anticuerpo anti-ZIMP7.

El anticuerpo anti-ZIMP7 se generó en la compañía "New England Peptide LLC" usando el péptido Ac-C(Ahx)QLRDSVYK-amida. Posteriormente purificamos el anticuerpo por cromatografía de inmunoafinidad de acuerdo a lo descrito previamente (Agraz *et al.*, 1994). Brevemente, el anticuerpo se acopló a sefarosa 4B activada con bromido de cianógeno (Sigma). Equilibramos la resina con HCl 0.1 M, la incubamos con el suero por 2 hr y la lavamos con HCl 0.1 M. Eluimos el anticuerpo con ácido acético 100 mM.

Western Blot.

Los túbulos seminíferos de testículos de 8, 14 y 30 ddn se separaron de las células somáticas mesenquimales y de Leydig en PBS bajo el microscopio estereoscópico. Posteriormente, se extrajeron las células germinales de los túbulos seminíferos mediante pipeteo. Éstas

células se centrifugaron y después se resuspendieron en solución de lisis. Después se analizó la concentración de las proteínas utilizando el método de Bradford (BioRad Richmond, CA). Se Realizó un SDS-PAGE al 10% con 40 µg de proteína total y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa de 0.45 µm (BioRad Richmond, CA). Se bloqueó la membrana con 5% de leche sin grasa en TBST durante 1 hr y se incubó con el anticuerpo correspondiente diluido en 5% de leche sin grasa/TBST. Después se lavó con TBST 3 veces por 5 min, se incubó con el anticuerpo secundario anti-rabbit acoplado a peroxidasa de caballo (Roche) y se visualizó con reactivo LumiGLO (Cel Signaling, Technology Inc) siguiendo las instrucciones del protocolo. El anticuerpo control anti-tubulina (sc-9104) y el anti-rabbit IgG-HRP (sc-2004) se obtuvieron de Santa Cruz Bio-technology.

Inmunofluorescencia.

Las células germinales se obtuvieron por disrupción mecánica de la gónada con una aguja fina. Las espermatogénicas de testículo adulto se aislaron de los tubulos seminíferos pipeteandolos varias veces hasta la liberación de las células. Ambos tipos celulares se colocaron por separado en portaobjetos cubiertos con PFTE (Erie Scientific Company) y se fijaron con 2% de PFA durante una hora. La inmunofluorescencia para ZIMP7 y SUMO1 (Santa Cruz Bio-technology, Sata Cruz CA) la realizamos como se describió previamente por Chuma y Nakatsuji (2001). Brevemente, Los portaobjetos con las células se lavaron con PBS, se permeabilizaron por 20 min. con acetona y se bloquearon con BSA 3%/Suero de cabra 10% en PBS durante 1 hr. Posteriormente se incubaron con anti-ZIMP7 y anti-SUMO1 diluidos 1:250 en BSA 0.1%/PBS. Los portaobjetos se lavaron con PBS 5 min y se incubaron con los anticuerpos secundarios alexa fluor 488 anti-rabbit IgG (Invitrogen) y 647 anti-mouse IgG (invitrogen). Finalmente, se lavaron las laminillas con PBS 5 min y se montaron con 50% glicerol/PBS. Los experimentos control sin anti-ZIMP7 y con el péptido preabsorbido se realizaron bajos las mismas condiciones. El

anticuerpo anti-ZIMP7 se preabsorbió con el péptido durante toda la noche a 4°C con un exceso molar de 500 veces del péptido.

Microscopía confocal de escaneo por laser.

Las imágenes se obtuvieron con un microscopio confocal LSM 510 Meta con un objetivo de 63 X W N. A. 1.2 (Zeiss, Germany). Para la detección del anticuerpo alexa fluor 488 anti-rabbit se utilizó un filtro BP 500-530 IR y un laser de Argón con una longitud de onda de excitación 480 nm. Y para el anticuerpo 647 anti-mouse se usó el filtro BP 650-710 IR y el laser HeNe con una longitud de onda de 633 nm de excitación. Las imágenes se obtuvieron con secciones ópticas seriadas de 1 mm.

RESULTADOS

Relación estructural y filogenética de la familia de las proteínas ZIMP.

El presente trabajo se inició con la identificación de las secuencias proteicas de ZIMP7 y ZIMP10 de ratón a partir de bases de datos, utilizando secuencias parciales reportadas en humanos para cada una de ellas. Las secuencias se obtuvieron del National Center for Biotechnology Information (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y conservan con sus homólogos humanos 87 y 97% de similitud respectivamente. Con el fin de analizar el grado de conservación de estas proteínas y de sus dominios estructurales a lo largo de la escala evolutiva utilizamos 25 secuencias diferentes de genes reportados en la base de datos del NCBI que incluyen genomas desde invertebrados hasta mamíferos y las alineamos utilizando el programa MUSCLE (Eggar, 2004). Con este análisis encontramos tres diferentes dominios en su estructura: 1) Regiones altamente conservadas en todas las proteínas ZIMP7, ZIMP10 y Tonalli de *Drosophila*; 2) Secuencias muy conservadas sólo entre las ZIMP7 y ZIMP10 y 3) Regiones no conservadas. Con estos datos y utilizando el programa CLIQUE (Felsenstein, 1995), generamos un árbol filogenético evaluando la presencia (1) o ausencia (0) de los diferentes dominios en las proteínas ZIMP (Fig. 11A). Éste análisis nos mostró un árbol congruente de la familia con los ortólogos ZIMP7 y ZIMP10 agrupados en distintas ramas y a Tonalli de *Drosophila* colocado en medio del árbol. Con el análisis de estos datos, encontramos que uno de los dominios conservados con mayor significancia estadística fue el dominio XSPRING anteriormente caracterizado (Gutiérrez et al., 2003; Fig. 11B). Esta región incluye al SP-RING, característico de las PIAS, que está involucrado en el proceso de SUMOilación (Kotaja et al., 2002). Además, encontramos dos regiones altamente conservadas ricas en prolinas en los extremos del XSPRING, la primera localizada entre los aminoácidos 334-555 de ZIMP10 y 201-403 de ZIMP7 de ratón; y la segunda, hacia la parte carboxilo, abarcando los aminoácidos del 867 al 1002 de ZIMP10 y del 725 al 906 de ZIMP7. De ésta segunda región de prolinas se ha visto que al menos para ZIMP10 de humano es importante, debido a que tiene una actividad de activador de la

transcripción (Sharma et al., 2003).

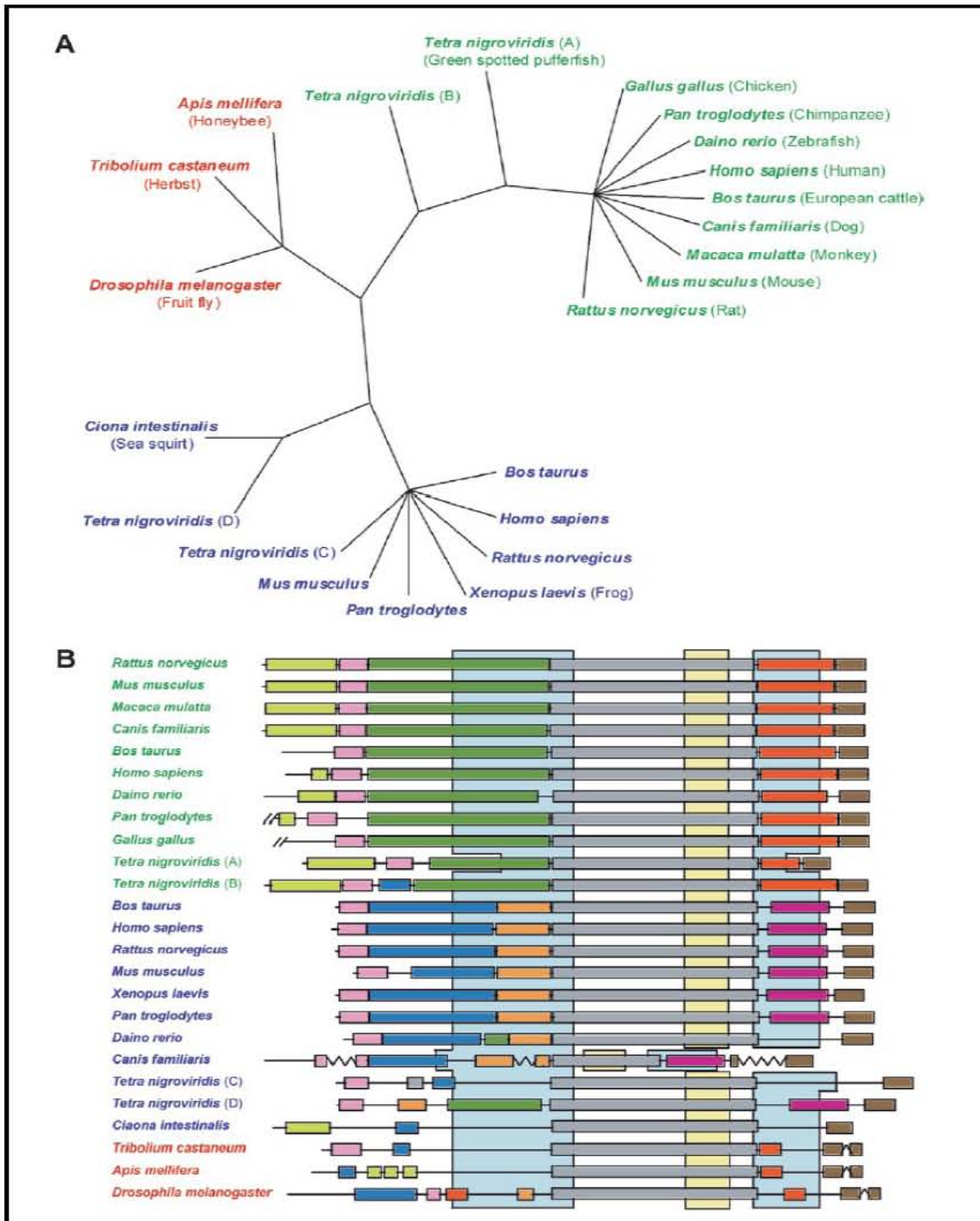


Fig. 11. Filogenia de las proteínas ZIMP. A) Árbol filogenético de éstas proteínas. Los nombres de los organismos están escritos en verde para las proteínas ZIMP10 y en azul para ZIMP7. Las proteínas de *Drosophila*, *Apis* y *Tribolium* forman un tercer grupo de proteínas similares a ZIMP y se denotan en rojo. B) Motivos y dominios de estas proteínas. El código de colores para cada una de las proteínas es el mismo que en (A). Cada uno de los dominios se representa con rectángulos de un color distinto. El XSPRING se muestra con un cuadro gris e incluye al SP-RING resaltado en amarillo. Adyacente a éste hay dos regiones ricas en prolinas marcadas en un cuadro azul. El cuadro café oscuro resalta el extremo carboxilo terminal muy conservado en éstas proteínas. Las líneas en zig zag de algunas proteínas indican inserciones de secuencias en motivos conservados.

Expresión de Zimp7 y Zimp10 en embriones de ratón durante la gastrulación y organogénesis.

Para continuar con este estudio analizamos la dinámica del patrón de expresión de los genes *Zimp7* y *Zimp10* durante la embriogénesis de ratón desde el inicio de la gastrulación hasta el período medio de gestación, y en algunas etapas de la organogénesis, como durante en el desarrollo de sus extremidades y gónadas. Con esta finalidad, obtuvimos la secuencia completa del cADN para los genes *Zimp7* (2400 pb) y *Zimp10* (3600 pb) de ratón mediante RT-PCR utilizando ARN total de hígado de ratón adulto y los clonamos en el vector pBluescript KS. A partir de estas construcciones generamos ribosondas de aproximadamente 500 pares de bases específicas para cada gen (Fig. 12). Utilizamos la técnica de hibridación *in situ* (HIS) para determinar el patrón de expresión de los genes *Zimp7* y *Zimp10* en embriones completos. El análisis de la expresión se realizó durante la gestación media desde los 7.0 dpc, etapa en la que inicia el proceso de gastrulación, hasta el estadio de 12.5 dpc cuando ya está terminando la organogénesis.

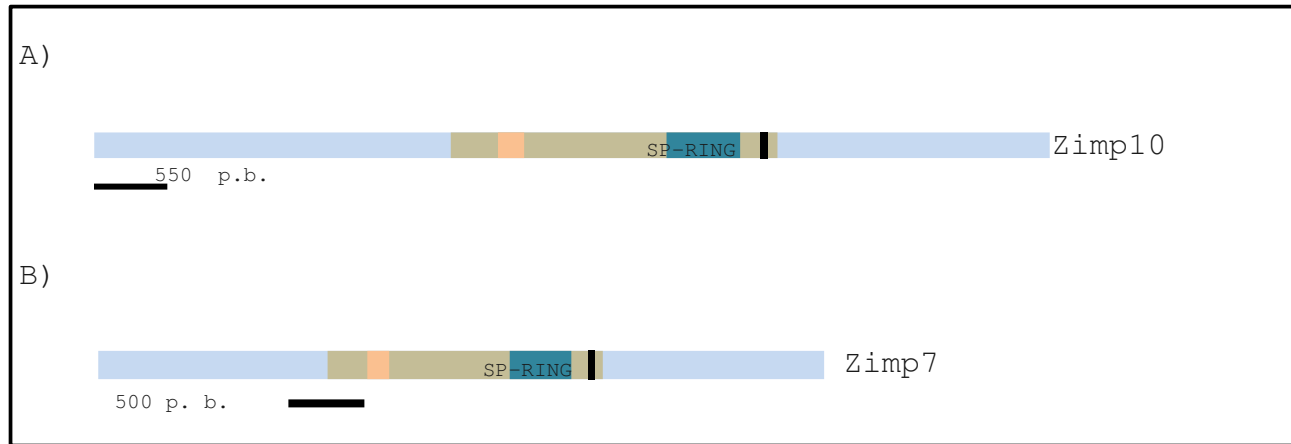


Fig. 12. Diseño de las ribosondas. En el esquema, se muestra con una línea negra la región utilizada para generar cada ribosonda. A) Para *Zimp10* se ocuparon los primeros 550 nucleótidos del gen. B) Para *Zimp7* se diseñó la ribosonda a partir de una secuencia de 500 nucleótidos adyacentes al dominio X-SPRING. En ambos esquemas se muestra el XSPRING en color café, el dominio SP-RING con un rectángulo azul, el motivo de localización nuclear en un cuadro rosa y el sitio de SUMOilación con un cuadro negro.

a) *Zimp7* se expresa en la región anterior del embrión

Durante nuestro análisis no encontramos expresión para *Zimp7* a los 7.0 dpc por HIS (datos no mostrados). Detectamos señal a partir de los 7.5 dpc principalmente en el surco primitivo y en la región anterior de ectodermo embrionario (futuro neuroectodermo), así mismo se conserva una ligera expresión en el epiblasto y en el mesodermo embrionario (Fig. 13A). Aunque la mayoría de la señal se observó en el tejido embrionario, también encontramos un poco de tinción en el tejido extraembrionario del corion. A los 8.5 y 9.0 dpc, se detectó únicamente en la región anterior del embrión, principalmente en el tejido neural y en la parte media y posterior del cerebro, pero no se encontró expresión en el cerebro anterior (Fig. 13B-D). A los 9.0 la señal se ve también en las vesículas óptica y ótica y en los arcos branquiales, abarcando las primeras somitas hasta la base del corazón (Fig. 13E y F). A los 10.5 dpc, la expresión se extiende a todo lo

largo del embrión, principalmente en la zona del cerebro medio, en los componentes maxilares y mandibulares de los arcos branquiales y en las somitas, excepto en el corazón y la punta del primordio de la cola (Fig. 13G y H). La señal del mensajero disminuye en embriones de 11.5 dpc y se comienza a restringir solo al tejido neural formando un margen en los ventrículos del telencéfalo, mesencéfalo y diencéfalo, a la espina dorsal y al mesénquima del primordio de las extremidades (Fig. 13 J y K). Esta expresión se mantiene hasta los 12.5 dpc (datos no mostrados).

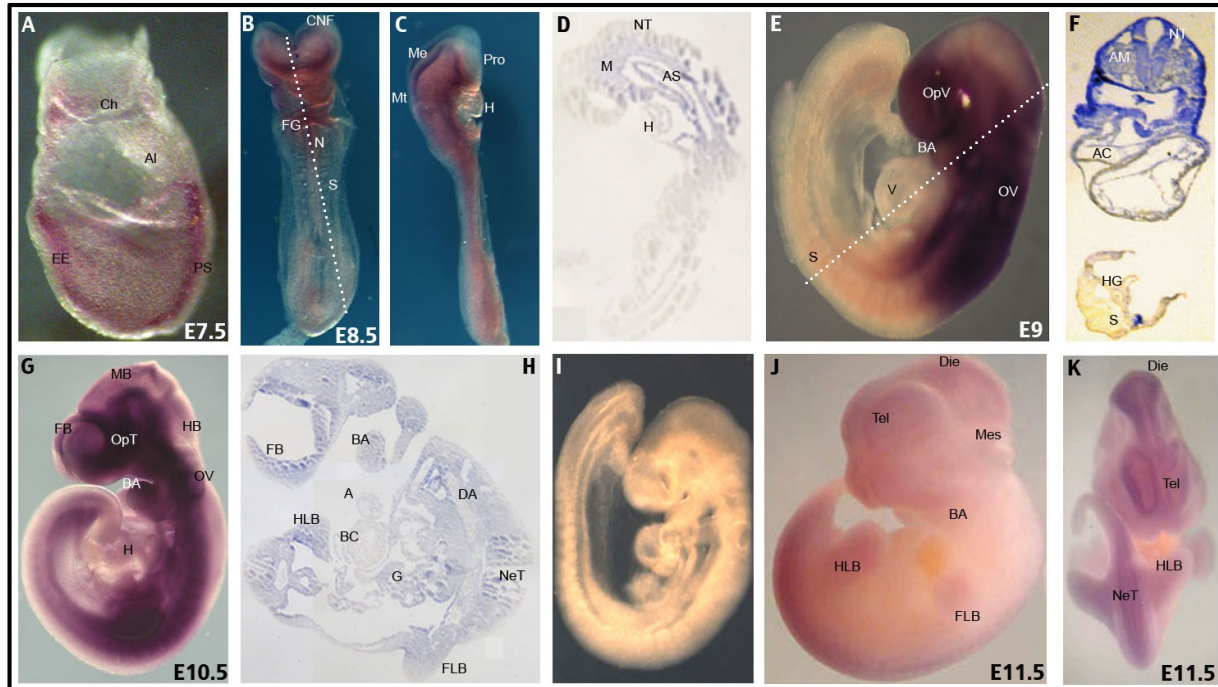


Fig. 13. Patrón de expresión de *Zimp7* durante el desarrollo embrionario. La expresión se aprecia a partir de los 7.5 hasta los 12.5 dpc y se localiza principalmente en el tejido neural. La señal se detectó por HIS en embriones de A) 7.5, B y C) 8.5, E) 9.0, G) 10.5, J y K) 11.5 dpc. En I) Se presenta el control del experimento con la sonda sentido. En D, F y H) Se muestran cortes sagitales de embriones en 8.5, 9.0 y 10.5 respectivamente, embebidos en parafina. El experimento se repitió al menos 5 veces para cada estadio. A: atrio, AC: cámara atrial, AM: mesénquima anterior, AS: somitas anteriores, Al: alantoides, BA: arcos branquiales, BC: ventrículo del corazón, Ch: corion, CNF: Cresta neural, DA: aorta dorsal, Die: diencéfalo, EE: Ectodermo embrionario, FB: cerebro anterior, FLB: Extremidad anterior, G: intestino, H: corazón, HB: cerebro posterior, HG: Intestino medio, HLB: Extremidad posterior, M: mesénquima, ME: cerebro medio, MB: cerebro medio, Mes: mesencéfalo, MT: metencéfalo, N: notocorda, NT: tejido neural, NeT: tubo neural, OpV: vesícula óptica, OV: vesícula ótica, PS: surco primitivo, S: somitas, Tel: telencéfalo, TV: vesícula telencefálica V: ventrículo.

b) *Zimp10* se expresa durante la formación del sistema vascular.

Al igual que en el caso de *Zimp7* no se observó señal para *Zimp10*

a los 7.0 dpc (datos no mostrados). La expresión de *Zimp10* a los 7.5 dpc se localiza solo en el tejido embrionario, con mayor intensidad en la parte anterior del epiblasto, lo que corresponde al ectodermo neural. También detectamos señal en el alantoides (Fig. 14A). A los 8.5 dpc, este gen mantiene su expresión en el tejido neural, principalmente en la zona del cerebro anterior y en la notocorda, además muestra señal en la aorta dorsal y el alantoides, que son estructuras precursoras del sistema vascular (Fig. 14B y C). La señal se extiende a prácticamente a todo el embrión a los 9.5 dpc destacando su presencia en las vesículas ótica y óptica, el tejido neural y los arcos branquiales, pero no se detectó en el corazón ni en la punta del primordio de la cola (Fig. 14D y E). A los 10.5 dpc continúa observándose en el tejido neural, los arcos branquiales y la parte dorsal de las somitas, además se ve expresión en la zona donde se empiezan a formar los primordios de las extremidades (Fig. 14H). Al igual que *Zimp7*, *Zimp10* se restringe solo al tejido neural y al mesénquima de las extremidades en embriones de 11.5 y 12.5 dpc (Fig. 14I-K). Además, se puede observar en regiones del embrión donde hay una alta proliferación, como en el primordio de los folículos conocidos como *de vibrassae*, las fosas nasales y en el primordio de la cola.

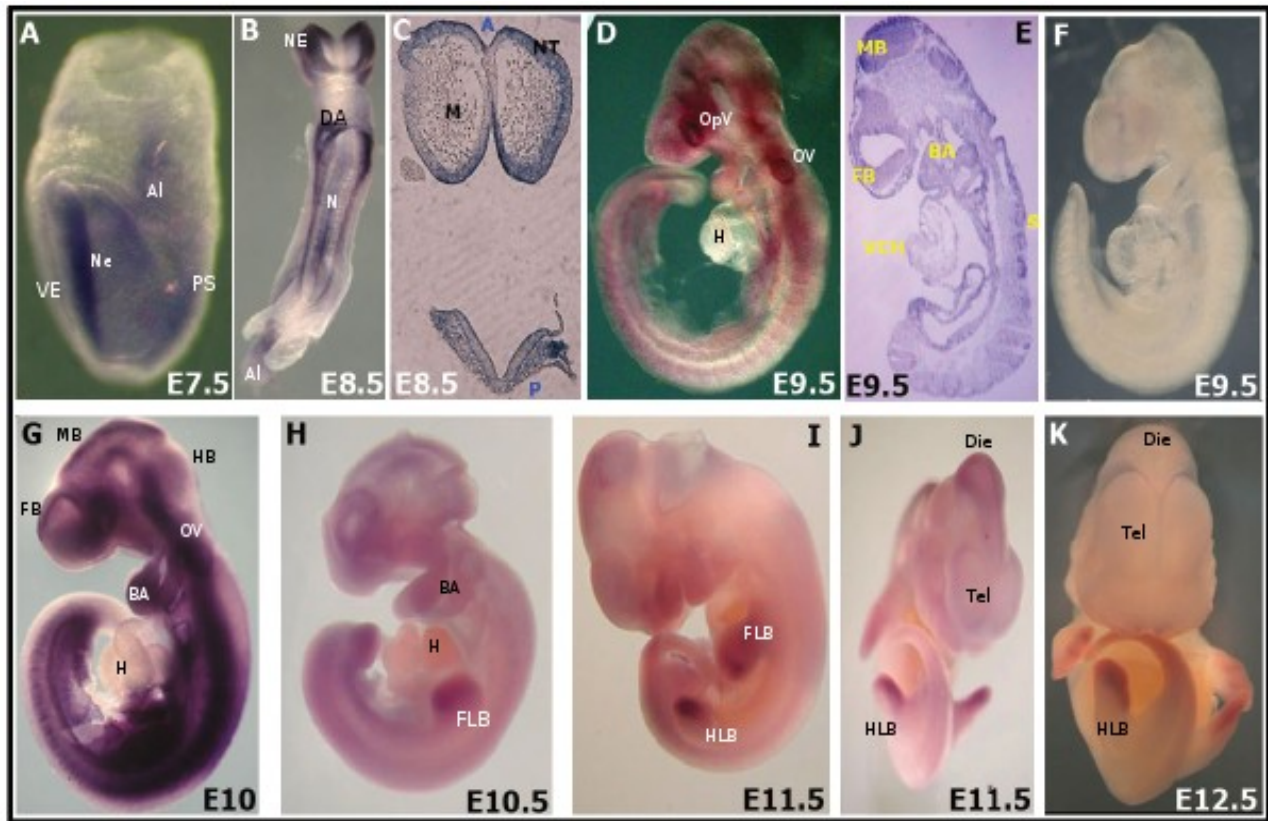


Fig. 14. Patrón de expresión de *Zimp10*. El transcrito puede apreciarse a partir de los 7.5 hasta los 12.5 dpc y se localiza principalmente en el tejido neural. La señal se detectó por HIS en embriones de A) 7.5, B) 8.5, D) 9.5, G) 10.0, H) 10.5, I y J) 11.5 y K) 12.5 dpc. En C y E se muestran cortes histológicos sagitales de embriones embebidos en parafina. En F se presenta el control con la sonda sentido. El experimento se repitió al menos 5 veces para cada estadio. A: anterior, Al: alantoides, BA: arcos branquiales, DA: aorta dorsal, Die: diencéfalo, FB: cerebro anterior, FLB: Extremidad anterior, H: corazón, HB: cerebro posterior, HLB: extremidad posterior, M: mesénquima, MB: cerebro medio, N: notocorda, NE: neuroectodermo, NT: tejido neural, OpV: vesícula óptica, OV: vesícula óptica, P: posterior, PS: surco primitivo, S: somitas, Tel: telencéfalo, VCH: cámara ventricular, VE: endodermo visceral.

Dinámica de expresión de los genes *Zimp7* y *Zimp10* durante el desarrollo de las extremidades.

Como se mencionó anteriormente, las proteínas ZIMP están presentes en los primordios de las extremidades a los 11.5 dpc, particularmente llama la atención la expresión de *Zimp10*, que es muy predominante en esta etapa. Por ello decidimos analizar estos patrones en detalle. El análisis lo realizamos por HIS utilizando las mismas ribosondas generadas para los embriones completos.

Como se describió en la introducción, las extremidades en ratón comienzan a formarse durante la embriogénesis a los 9.5dpc. Éstas se clasifican de acuerdo a Wanek y colaboradores (1989) en 15 diferentes estadios: desde S1 cuando aparece un primordio, hasta S15 cuando se encuentra completamente formada la extremidad. Para nuestro análisis tomamos los estadios de S2 a S9, que cubre el período de formación del eje antero - posterior (A - P), la formación de los dígitos y el inicio de la muerte de las células en los espacios interdigitales. Utilizamos solo las extremidades anteriores para el análisis de expresión para no tener variaciones de resultados, ya que las posteriores se desarrollan mas tardíamente. Ninguna de las sondas sentido para *Zimp7* o *Zimp10* mostraron tinción, indicando que nuestras ribosondas antisentidos eran específicas para cada mRNA (datos no mostrados).

a) *Zimp7* se expresa en el mesénquima.

En la extremidad, la expresión se observa a partir del S3 en la parte central del tejido mesenquimático y aumenta en S4. Esta señal disminuye casi completamente en S5, conservándose en la región adyacente a los dígitos. *Zimp7* prácticamente deja de expresarse en el estadio S9 a los 13.5 dpc (Fig. 15). Estos resultados muestran que este gen presenta un pico muy pronunciado dentro de una ventana de

expresión muy estrecha. Lo anterior sugiere que *Zimp7* tiene un papel muy específico en el estadio S4 en el tejido mesenquimático de la extremidad. En este momento se están especificando la identidad y expansión de los dígitos por acción de las BMP y que es inducida por las células mesenquimales interdigitales antes de que éstas entren a muerte celular (Bénazet y Zeller, 2009).

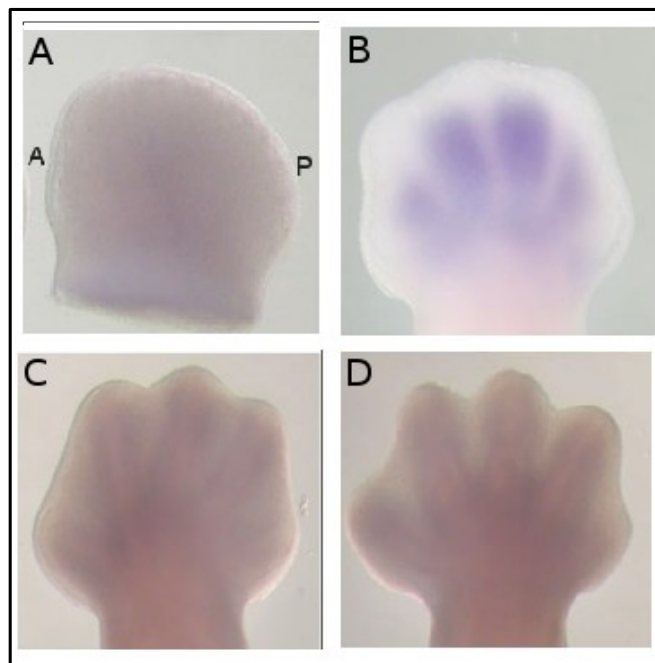


Fig. 15. Patrón de expresión de *Zimp7* durante el desarrollo de las extremidades de ratón. La detección del ARN mensajero de *Zimp7* fue por HIS. El transcrito se observa sólo en el mesodermo interdigital del estadio S4. Las imágenes muestran una vista dorsal de extremidades anteriores en estadios de A) S3; B) S4; C) S5 y D) S9. Los ensayos de hibridación se hicieron por triplicado. A: anterior, P: posterior.

b) *Zimp10* presenta un patrón más dinámico en el desarrollo de la extremidad.

A diferencia de *Zimp7*, *Zimp10* se expresa durante todo el desarrollo de la extremidad. En S4, se presenta intensamente en las células mesenquimales de la zona posterior, formando un gradiente hacia la parte anterior (Fig. 16A). En extremidades de S5 la señal se

extiende a la región anterior del tejido mesenquimático que bordea a los futuros dígitos (Fig. 16B). En el estadio S8, se forma un margen alrededor de los dígitos hasta la primera unión entre las falanges (Fig 16C). La expresión se delimita a la unión de las falanges y la punta de los dígitos en S9 (Fig. 16D). Las extremidades ya no muestran expresión de *Zimp10* en el S10 (datos no mostrados). Por su patrón de expresión, *Zimp10* parece ser importante en dos diferentes momentos del desarrollo en la extremidad: en S4, en la región posterior de la zona con actividad polarizante (ZPA), y posteriormente en S8 - S9, durante la formación de las uniones de las falanges.

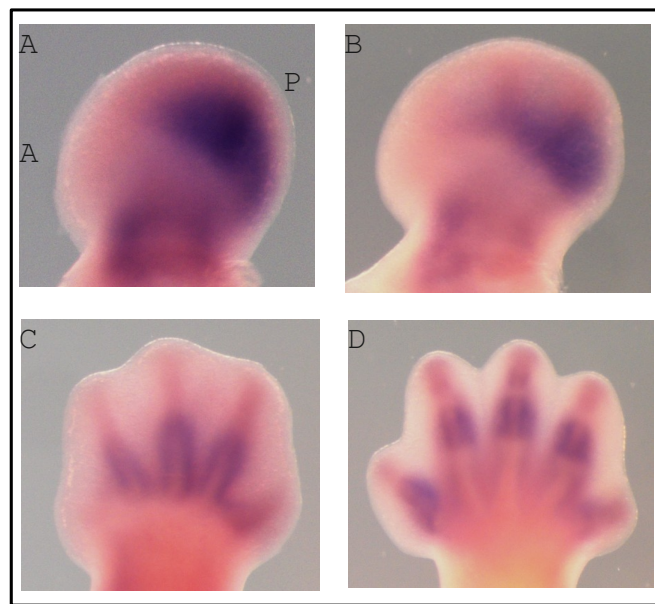


Fig. 16. Expresión de *Zimp10* en el desarrollo de la extremidad de ratón. La presencia del mensajero se detectó por HIS. Las imágenes muestran una vista dorsal de extremidades anteriores en estadios de A) S4, B) S5, C) S8 y D) S9 dpc. De los estadios S4 al S6 se observa un gradiente de expresión de la parte posterior a la anterior. No hay señal en el ectodermo apical. El análisis se repitió 3 veces por cada estadio. A: anterior, P: posterior.

Dinámica de expresión de los genes Zimp durante el desarrollo de las gónadas.

Como se mencionó anteriormente, se sabe que las proteínas *Zimp7* y *Zimp10* de humano aumentan la actividad transcripcional del receptor de andrógenos (RA) en cultivo de células de próstata. Análisis por *northern blot* muestran que ambos genes se encuentran en el sistema urogenital humano. La expresión de *Zimp7* es mayor en el testículo que en el ovario, mientras que para *Zimp10* ocurre lo contrario (Sharma et al., 2003; Huang et al., 2005). Por otro lado, se sabe que el RA es importante durante el desarrollo de las gónadas en la embriogénesis. Tomando en cuenta estos datos, pensamos que los genes *Zimp* podrían ser relevantes para el desarrollo gonadal e incluso estar participando en los eventos tempranos de la determinación sexual, o bien en la diferenciación de las células germinales. Si así fuera cabría esperar que *Zimp7* y *Zimp10* tuvieran una expresión temprana en la gónada embrionaria y dimórfica si se asociara a la diferenciación sexual. Por ello, decidimos analizar la expresión de ambos genes durante el desarrollo de las gónadas embrionarias de ratón, establecer en que momento del desarrollo de la gónada inician su expresión y determinar si tienen una expresión diferencial durante la determinación sexual en la gónada.

a) *Zimp10* se expresa en la gónada de macho en las células somáticas.

Los genes como *Sry* y *Sox9* en macho y *Wnt4* y *Rspo1* en hembra, participan en la determinación sexual de las gónadas y células germinales e inician su expresión entre los días 11.5 y 13.5. Por lo tanto decidimos explorar esta ventana de tiempo y analizar si nuestros genes de interés se expresan también durante este periodo.

Disectamos gónadas de 11.5 a 14.5 dpc y analizamos la expresión por HIS en gónadas de macho y hembra (Fig. 17). Previo a la

diferenciación sexual, la señal de *Zimp10* se vio en la región anterior de la gónada indiferenciada y el mesonefros a los 11.5 dpc. Después, a partir de los 12.5 dpc no encontramos expresión ni en la gónada ni en el mesonefros de hembra. En contraste, en gónada de macho de 12.5 dpc, la señal de *Zimp10* se extendió a lo largo de todo el cuerpo gonadal observándose en los espacios intersticiales, además de mantenerse en la parte anterior del mesonefros. La señal se observó hasta los 14.5 dpc en las células de los espacios intersticiales y el mesonefros con un pico de expresión a los 13.5 dpc dentro de la gónada. Realizamos cortes sagitales de la gónada de macho de 14.5 dpc y verificamos que efectivamente la señal se encontraba en los espacios intersticiales, lo que implica que se podría estar expresando en las células esteroidogénicas de Leydig, o bien en las células mioides o vasculares. Estos datos sugieren que *Zimp10* está involucrado en la diferenciación de las células de los espacios intersticiales.

Para corroborar los resultados de la expresión del transcrito de *Zimp10*, realizamos ensayos de RT-PCR cuantitativo (Gráfica 1). Esta prueba confirmó lo observado en la HIS, *Zimp10* se expresa durante todo el desarrollo de la gónada de macho, con un aumento a los 13.5 dpc y disminuye a los 14.5 dpc, tampoco encontramos expresión en el desarrollo de hembras mediante esta técnica.

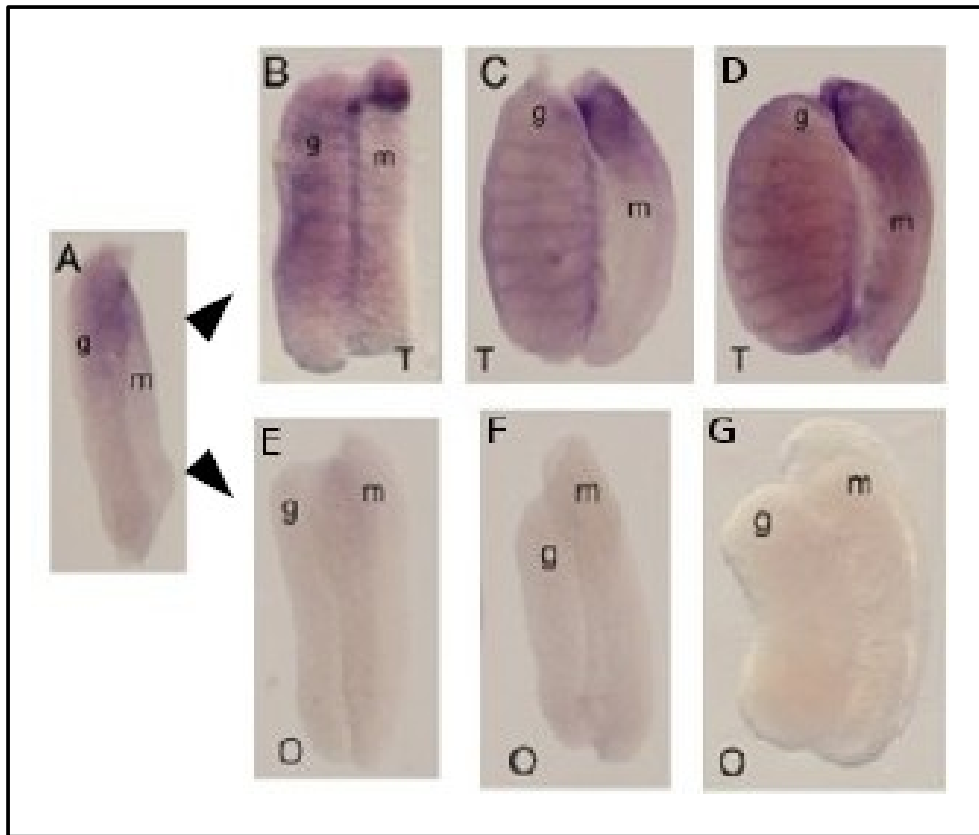
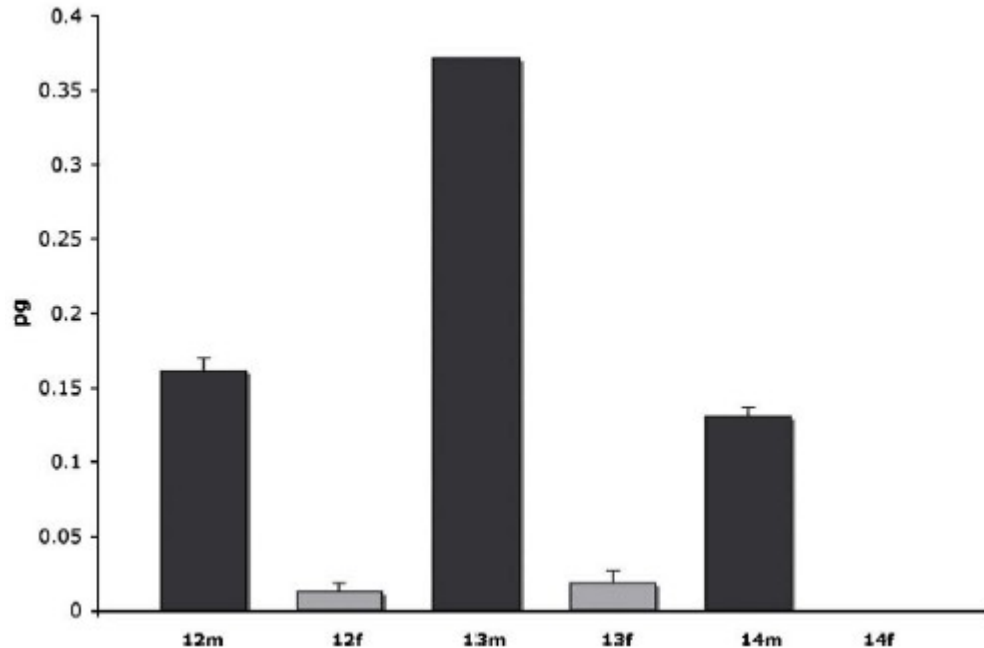


Fig. 17. Expresión de *Zimp10* durante el desarrollo de las gónadas. El transcrito se detectó en gónadas desde 11.5 hasta 14.5 dpc. A) Gónada indiferenciada, B-D) Gónadas de macho, E-G) Gónadas de hembra. *Zimp10* se expresa durante todo el desarrollo de la gónada de macho, en los espacios intersticiales y la parte anterior del mesonefros (B-D). Los ensayos de HIS se repitieron por triplicado. m: mesonefros, g: gónada, O: ovario, T: testículo.



Gráfica 1. Análisis de la expresión del mensajero de *Zimp10* por RT-PCR cuantitativo. *Zimp10* se expresa durante todo el desarrollo de la gónada de macho con un pico de expresión a los 13.5 dpc. Los niveles del mRNA de *Zimp10* se normalizaron con la expresión del gen *hprt*. Se extrajo ARN total de 6 gónadas sin mesonefros para cada experimento. Se realizaron 3 experimentos independientes, cada uno por triplicado.

b) *Zimp7* se expresa en las células germinales de la gónada de macho a los 13.5 dpc.

Realizamos el análisis de la detección del mRNA de *Zimp7* por HIS en los mismos estadios gonadales (Fig. 18). Observamos que este gen no se expresa en la gónada indiferenciada a los 11.5 dpc, ni en el mesonefros. En forma similar a lo que encontramos para *Zimp10*, la señal del mensajero de *Zimp7* se encontró de manera exclusiva en la gónada de macho. A partir de los 12.5 dpc la señal se localizó en la región anterior del cuerpo de la gónada. La expresión se extiende a lo largo de la gónada a los 13.5 dpc y parece localizarse dentro de los cordones seminíferos. Generamos cortes sagitales de gónada de macho embebida en parafina y vimos que efectivamente la señal se encontraba dentro de los cordones seminíferos. Observamos los cortes

en un mayor aumento (100X) y encontramos que la señal está en las células germinales. El transcrito de *Zimp7* disminuye a los 14.5 dpc en macho, pero aún se puede observar un poco de señal dentro de los cordones. Al igual que para *Zimp10*, no encontramos expresión de *Zimp7* durante todo el desarrollo de la gónada de hembra, lo que nos sugiere que solo se requiere durante la diferenciación de la gónada de macho.

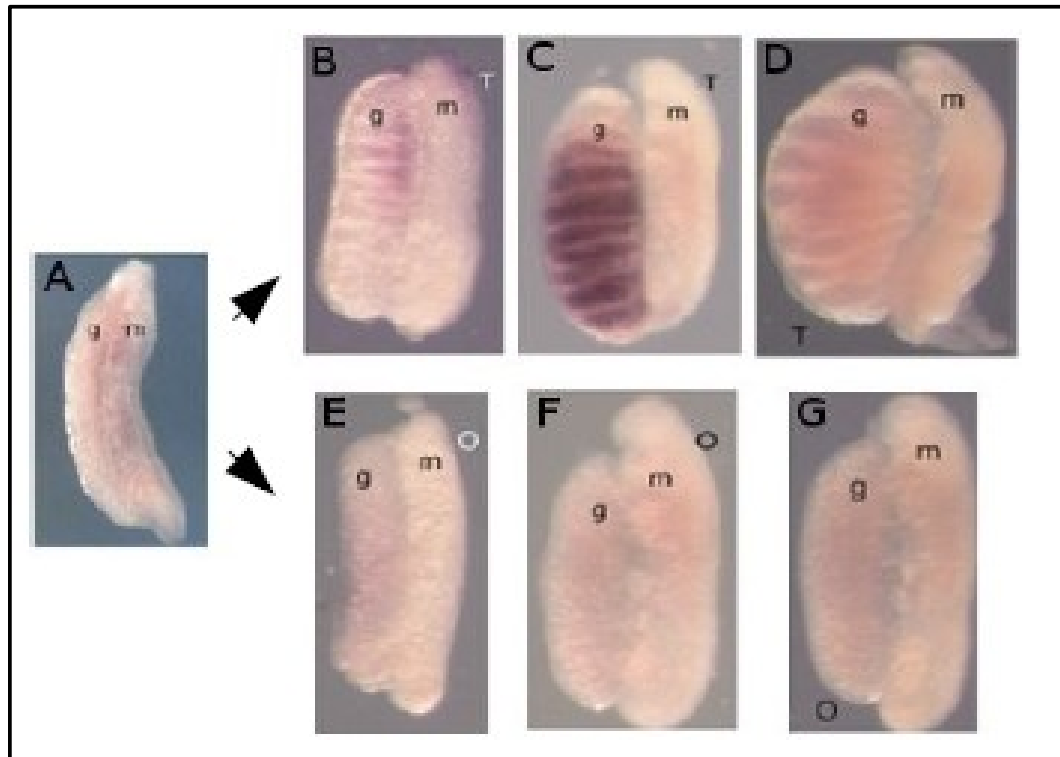
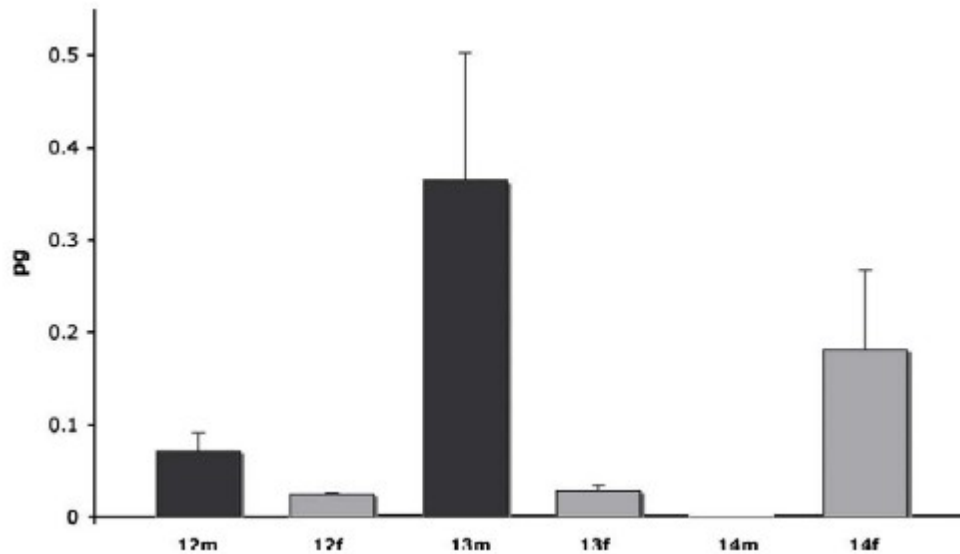


Fig. 18. Expresión de *Zimp7* en el desarrollo de la gónada. El transcrito se detectó en gónadas desde 11.5 hasta 14.5 dpc por HIS. *Zimp7* tiene un aumento de la expresión a los 13.5 dpc dentro de los cordones seminíferos. A) Gónada indiferenciada, B-D) Gónadas de macho, E-G) Gónadas de hembra. Los experimentos de hicieron por triplicado. m: mesonefros, g: gónada, O: ovario, T: testículo.

Corroboramos la expresión del transcrito de *Zimp7* mediante PCR cuantitativo (Gráfica 2). Encontramos que inicia su expresión a los 12.5 dpc, aumentando los niveles de mensajero a los 13.5 dpc en la gónada de macho. A diferencia de lo que vimos por HIS, detectamos

expresión de *Zimp7* en la gónada de hembra a los 13.5 dpc. La discrepancia de éste resultado se debe quizá a que el PCR cuantitativo es una técnica más sensible para la detección de ARN mensajero.



Gráfica. 2. Análisis de la expresión del mRNA de *Zimp7* por RT-PCR cuantitativo. *Zimp7* aumenta su expresión en la gónada de macho a los 13.5 dpc. Los niveles de expresión del mRNA se normalizaron con la expresión del gen *hprt*. Se extrajo ARN total de 6 gónadas sin mesonefros para cada experimento. Se realizaron 3 experimentos independientes, cada uno por triplicado.

La presencia de la señal de *Zimp7* dentro de los cordones seminíferos implicaba que esta proteína se expresa en las células germinales, en las de Sertoli o en ambos tipos celulares. La presencia de *Zimp7* en las germinales era muy relevante, ya que este momento del desarrollo es crítico para la determinación sexual de estas células. Por ello, quisimos confirmar esta posibilidad para lo cual realizamos inmunofluorescencia en germinales disgregadas mecánicamente (Fig. 19). Al igual que en la HIS, encontramos inmunofluorescencia con un anticuerpo anti - ZIMP7 en el núcleo de las células de macho. No detectamos señal en las germinales de hembra. Co-inmunoteñimos estas células para OCT4 (proteína específica

de células germinales) y corroboramos que ZIMP7 se está expresando en las germinales de macho a los 13.5 dpc (Fig. 19C). La expresión de ZIMP7 también la encontramos en células que no eran positivas para OCT4, indicándonos que adicionalmente podría haber expresión en células somáticas de los cordones seminíferos, posiblemente las células de Sertoli. Sin embargo no se puede descartar que se traten de células intersticiales. Estos resultados nos muestran que ZIMP7 se encuentra en el momento en que las germinales ya están comprometidas a espermatogénesis y detienen su división mitótica, sugiriendo un papel de ésta proteína en el proceso de entrada al reposo mitótico.

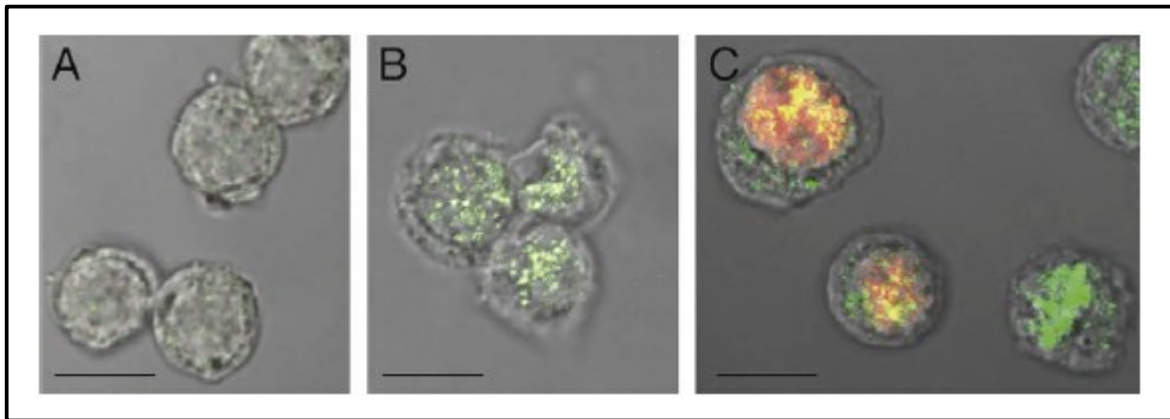


Fig. 19. Localización de ZIMP7 por inmunofluorescencia en células germinales de 13.5 dpc. A) Células germinales de hembra donde no hay presencia de ZIMP7. B) Se observa ZIMP7 en verde dentro del núcleo de gonocitos. C) Co-localización de las proteínas ZIMP7 (verde) y OCT4 (rojo) en germinales de macho. La señal se observa en los núcleos de las células para ambas proteínas. El ensayo se repitió 5 veces. Barra de escala = 10 μ m.

c) *Zimp7* reactiva su expresión en células meióticas de testículos post-natales.

Zimp7 disminuye su expresión en la gónada de macho a los 14.5 dpc en embriones de ratón. Sin embargo, en humano se expresa intensamente en testículo adulto (Huang *et al.*, 2005), por lo que

consideramos factible que la expresión de *Zimp7* se reactivara en etapas posnatales. Por ello, decidimos analizar la presencia del transcrito de *Zimp7* en testículos de ratones neonatos durante diferentes etapas de la espermatogénesis. Las etapas analizadas fueron: a los 8 días después del nacimiento (ddn), donde solo se encuentran células de Sertoli y espermatogonias dentro de los túbulos seminíferos. En ésta etapa hay proliferación de espermatogonias y aun no inicia la meiosis; a los 15 ddn, cuando encontramos el 40% de las germinales en meiosis. Las germinales que inician la meiosis se denominan espermatocitos; y a los 30 ddn, cuando ya ha comenzado la espermiogénesis. Las células que sufren la espermiogénesis se conocen con el nombre de espermatidas.

Zimp7 no se detectó a los 8 ddn por HIS. La expresión inicia a los 15 ddn poco después del inicio de la meiosis en los espermatocitos y la mayor expresión se observa a los 30 ddn cuando el mayor número células son espermatocitos en meiosis (Fig. 20A). Para establecer si el patrón observado a nivel de transcripción correspondía a la expresión de la proteína, aislamos extractos de proteína total de testículo de cada uno de los estadios mencionados y por inmunodetección en gel (western blot), analizamos si ZIMP7 tenía un patrón de expresión similar al del mensajero (Fig. 20B). Encontramos que se detecta también a partir de los 15 ddn y aumenta a los 30 ddn, confirmando que la proteína tiene un patrón equivalente al del transcrito.

Para determinar de forma específica los tipos celulares donde se localiza ZIMP7 hicimos un análisis de inmunohistoquímica en cortes de 10 μ m de testículo adulto embebido en parafina (Fig. 20C). Las células espermatogénicas fueron identificadas bajo el microscopio con base en su morfología, tamaño y posición. Encontramos que ZIMP7 se localiza mayoritariamente en las células de la periferia del túbulo, en los espermatocitos en estadio leptoteno/zigoteno y paquiteno, aunque también hay expresión en espermatidas elongadas y redondas.

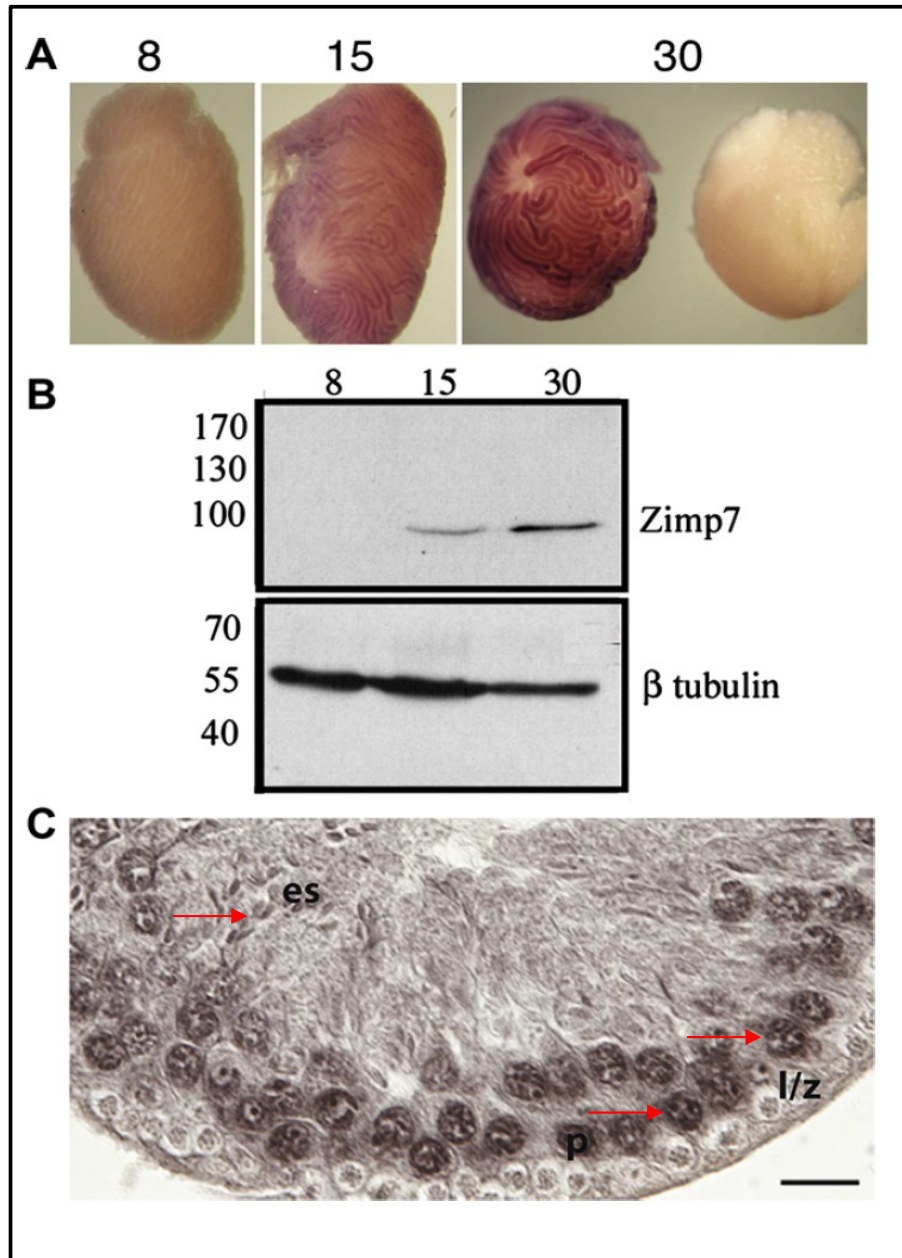


Fig. 20. Perfil de expresión de ZIMP7 en testículo de ratón post-natal. A) Detección del transcrito de *Zimp7* por HIS en testículos de 8, 15 y 30 ddn. En la imagen de 30 ddn del lado derecho se muestra el control. B) Análisis de ZIMP7 por western blot en proteína total de testículo de 8, 15 y 30 ddn. Utilizamos β -tubulina como control de carga. Los números de la izquierda marcan los kDa del marcador de peso. C) Inmunohistoquímica en corte de testículo de 30 ddn embebido en parafina. ZIMP7 se observa en espermatocitos en leptoteno/zigoteno y paquiteno y en espermátidas redondas. Se repitió cada experimento por triplicado. es: espermátidas redondas, p: paquiteno, l/z: leptoteno/zigoteno. Barra de escala = 25 μ m.

d) Localización subcelular de ZIMP7 en células espermatogénicas.

Para determinar la localización específica de ZIMP7 en células espermatogénicas realizamos un análisis de inmunofluorescencia. Para ello, disgregamos células espermatogénicas mecánicamente a partir de túbulos seminíferos de ratón adulto. Los estadios de las células se determinaron por su morfología y diámetro.

Encontramos que ZIMP7 se localiza mayoritariamente en células en paquiteno y espermatidas redondas, aunque también observamos señal en espermatocitos en leptoteno/zigoteno (Fig. 21). En relación a la localización subcelular, identificamos células donde ZIMP7 sólo está en el citoplasma, como en las espermatidas redondas; o en el núcleo y citoplasma, como en las células en paquiteno. Hicimos un ensayo control pre-absorbiendo el anti - ZIMP7 con su péptido epítipe para verificar que todos los sitios de expresión fueran específicos (Fig 21C y F).

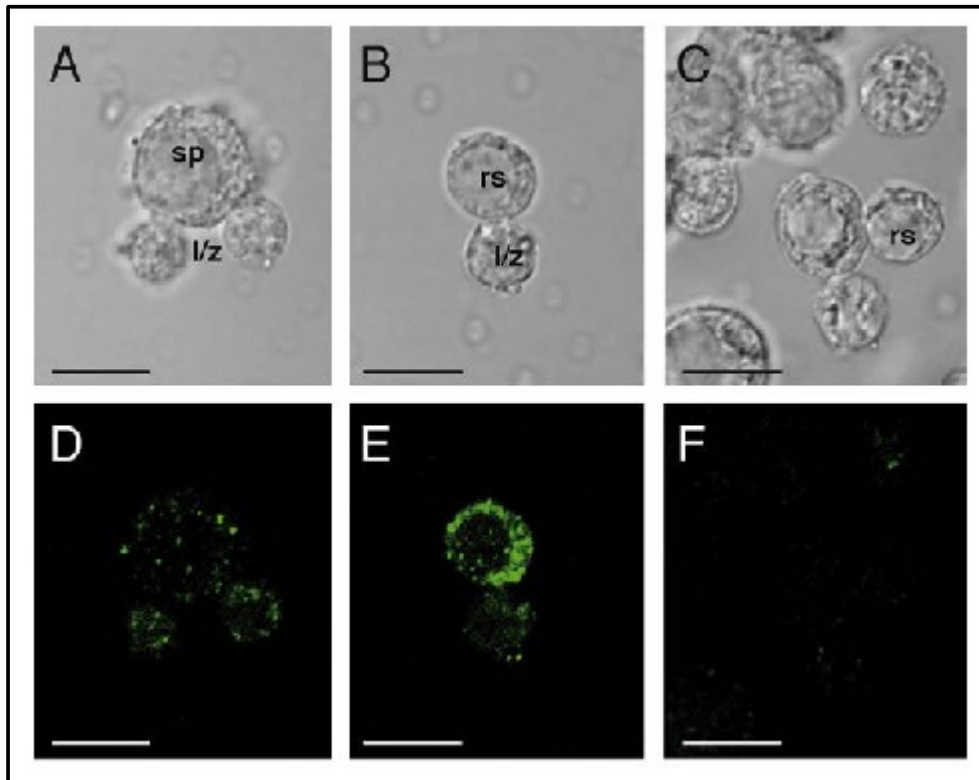


Fig. 21. Localización subcelular de ZIMP7 en células espermatogénicas. A-C) imágenes de células espermatogénicas en campo claro. D-F) Inmunofluorescencia de ZIMP7 de las células presentadas en A-C. En D y E, ZIMP7 se encuentra en el citoplasma y núcleo de espermatocitos de leptoteno/zigoteno. En B y E se ve sólo en el citoplasma de las espermatidas redondas. En C y F se muestra el experimento control de competencia con el péptido. Se muestran las proyecciones de las imágenes en confocal y el experimento se hizo por triplicado. l/z: leptoteno/zigoteno; rs: espermatidas redondas; sp: espermatogonias. Barra de escala = 10 μm .

Los espermatocitos en paquiteno también muestran expresión de ZIMP7 en núcleo, en una estructura heterocromática denominada cuerpo cromatoide XY (Fig. 22). El cuerpo cromatoide XY es una estructura que se observa mas densa en microscopía de luz. Se forma por la condensación de la cromatina de los cromosomas X y Y durante la meiosis, en el estadio de paquiteno (Hooker y Roeder, 2006) y se caracteriza por el silenciamiento transcripcional. Otros componentes de la vía de SUMO se han localizado en ésta región nuclear.

e) ZIMP7 co-localiza con SUMO1 en espermatocitos en paquiteno.

La presencia de ZIMP7 en espermatocitos, específicamente en el estadio de paquiteno es significativa, ya que se sabe que en levadura la SUMOilación tiene un papel importante durante la meiosis (Hooker y Roeder, 2006). Además, en humano SUMO1 y SUMO2/3 se localizan también en estructuras heterocromáticas como el antes mencionado cuerpo XY, los cromocentros y el complejo sinaptonémico (Vigodner y Morris, 2005; La Salle *et al.*, 2008). Tomando en cuenta estos resultados y considerando que ZIMP7 conserva el dominio SP-RING, relacionado con el proceso de SUMOilación, nos pareció muy relevante comparar la localización de SUMO con la de ZIMP7 en el núcleo de los espermatocitos.

Por inmunofluorescencia comprobamos que efectivamente ZIMP7 y SUMO1 co-localizan en células en paquiteno (Fig. 22). Ambas proteínas se ubican en la región del cuerpo cromatoide XY del núcleo de los espermatocitos. Estos datos sugieren que SUMO1 y ZIMP7 podrían estar interactuando durante la formación de este territorio heterocromático.

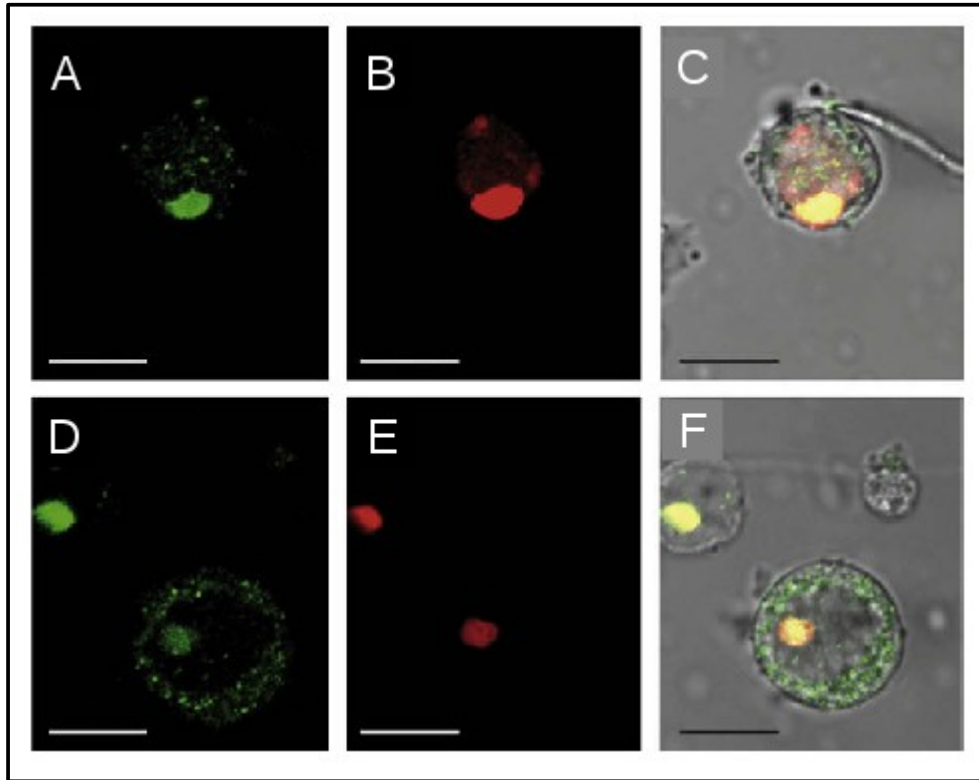


Fig. 22. Co-Localización subcelular de ZIMP7 y SUMO1 en espermatocitos. Las proteínas ZIMP7 y SUMO1 se expresan en células en paquiteno y co-localizan en el cuerpo XY. A y D) ZIMP7 se encuentra en el núcleo y en el citoplasma de espermatocitos en paquiteno. B y E) SUMO1 está en el cuerpo XY de paquitenos. C y F) Se muestra la co-localización de ambas proteínas. El experimento se realizó tres veces. Barra de escala = 10 μm

Identificación de factores que regulan la expresión de los genes Zimp in vivo.

Esta parte del proyecto se centra en descubrir factores de crecimiento, hormonas o factores transcripcionales que regulen la expresión de los genes *Zimp* en las extremidades embrionarias y en la gónada. La idea surgió a partir del hallazgo de que en estos órganos ambos genes tienen patrones de expresión particularmente dinámicos e interesantes, y como se mencionó antes, pueden cultivarse *in vitro* por períodos de hasta 72 horas, lográndose en esas condiciones, recapitular el proceso normal de desarrollo. Este tipo de cultivos

pueden exponerse a diversos agentes químicos y factores proteicos y así determinar su participación en el desarrollo embrionario. En este caso queríamos analizar la importancia de ciertos factores de crecimiento y hormonas en la regulación de la transcripción de las proteínas ZIMP *in vivo*. Inicialmente realizamos cultivos en presencia de ácido retinoico (AR). Las razones por las que iniciamos nuestros experimentos con este agente fueron, por un lado que *Zimp7* y *Zimp10* aparecen dentro de bases de datos de genes inducibles por AR; y por otro lado, el AR es el morfógeno determinante durante la formación del eje antero - posterior de la extremidad (Tickle, 2006) y también es crítico durante la determinación sexual de las células germinales (Bowles y Koopman, 2007), posteriormente probamos el efecto de factores de crecimiento y otras hormonas tanto en gónadas embrionarias como en cultivos de testículo post-natal.

Factores que regulan la expresión de Zimp10 en la extremidad embrionaria.

a) El ácido retinoico se requiere para la expresión de Zimp10 en la extremidad.

Como se demostró anteriormente, *Zimp10* se expresa en S4 en la región conocida como zona con actividad polarizante o ZPA, la cual como ya se mencionó, es un centro organizador muy importante durante la formación del patrón antero - posterior de las extremidades y está involucrado en darle identidad a los dígitos (Bénazet y Zeller 2009). También se dijo que una de las moléculas involucradas en el inicio del establecimiento de la ZPA es el ácido retinoico. El AR es un derivado de la vitamina A y es una molécula difusible que se sintetiza en el mesodermo lateral, donde inicia la formación de las extremidades a partir de los 9.5 dpc. El AR mantiene la identidad proximal de las células en la base del primordio de la extremidad, e induce la expresión de genes como *Hand2* y *Hoxd8* en la parte

posterior, involucrados en la formación de la ZPA (Tickle *et al.*, 1982; Summerbell y Harvey 1983). Para analizar la posibilidad de que el AR regulara la expresión de *Zimp10* cultivamos extremidades en estadio S4 con 1 μ M de AR y DMSO como vehículo durante 7 horas (Fig. 23). Encontramos que el AR induce la expresión de *Zimp10* dentro de la ZPA y también extiende la señal hacia la región anterior de la extremidad. Este resultado indicó que la adición exógena de AR es capaz de inducir la expresión de *Zimp10* en la extremidad.

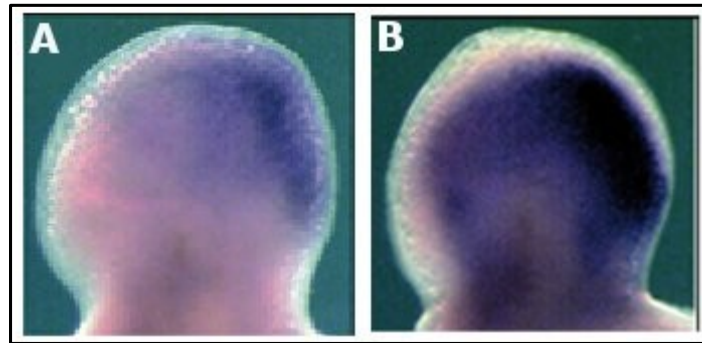


Fig. 23. Efecto del ácido retinoico en la expresión de *Zimp10*. El AR induce la expresión de *Zimp10* en cultivo de extremidades en S4. A) Expresión de *Zimp10* en cultivos con DMSO, B) Expresión de *Zimp10* en cultivos con ácido retinoico. Repetimos cada ensayo 5 veces. AR: ácido retinoico. DMSO: dimetil sulfóxido.

Para investigar si el AR endógeno es relevante para la regulación de expresión de *Zimp10*, inhibimos la acción del ácido retinoico en cultivos de extremidades en S4 (Fig. 24). Para ello se cultivaron primordios de extremidades durante 7 hr con 100 μ M del antagonista de AR AGN193109, que inhibe la señalización endógena del AR al competir por la unión a los receptores RAR α . En estos cultivos la adición del antagonista disminuyó la expresión de *Zimp10*, restringiéndose a la parte más posterior y distal de la extremidad.

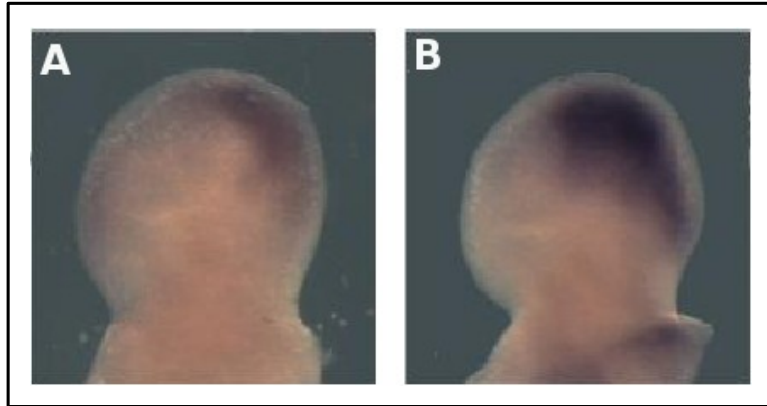


Fig. 24. Efecto del AGN193109 sobre la expresión de *Zimp10*. A) El transcrito de *Zimp10* disminuye con el inhibidor ANG193109 de los receptores RAR del ácido retinoico, B) DMSO como control del experimento. DMSO: dimetil sulfóxido; AGN193109: antagonista del AR.

Durante el desarrollo de las extremidades, el AR es sintetizado por la enzima aldehído deshidrogenasa 2 (RALDH2). Esta enzima tiene dos ventanas de expresión. La primera a los 9.0 dpc en el mesodermo lateral del embrión al inicio de la formación del primordio, y la segunda en las regiones interdigitales en S5 (Pennimpe et al., 2010). Con el fin de confirmar el resultado observado con el AGN193109 cultivamos primordios de extremidades en S4 en presencia de un inhibidor de la RALDH2. Este inhibidor es el ácido benzóico 4-dimetilamina (DEAB) y se utilizó a una concentración de 10 μ M en cultivos de 24 hrs; como control cultivamos a las extremidades con DMSO (Fig. 25). Al inhibir la síntesis del AR en los espacios interdigitales, se observó la disminución de la expresión de *Zimp10* en las uniones de las falanges. Tomando en cuenta estos resultados, concluimos que el AR endógeno no solo es capaz de inducir la expresión de *Zimp10*, sino que es necesario para que este gen se exprese durante el desarrollo de la extremidad.

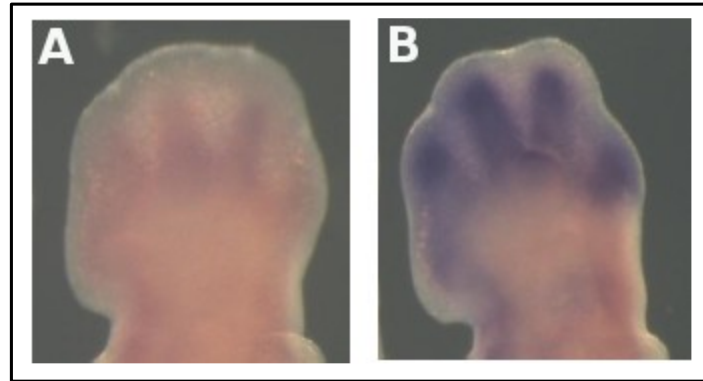


Fig. 25. Efecto del DEAB sobre la expresión de *Zimp10*. A) Inhibición de la síntesis de AR en cultivos de extremidades en S4 evita la expresión de *Zimp10* durante la formación de los dígitos. B) Usamos DMSO como vehículo y control del experimento. El ensayo se repitió 3 veces. DMSO: dimetil sulfóxido, DEAB: inhibidor de la enzima retinaldehído deshidrogenasa.

b) SHH afecta la expresión de *Zimp10* en la ZPA.

Sonic Hedgehog (SHH) es un factor de crecimiento, que como ya se describió, tiene un papel importante en la organogénesis y establecimiento de patrones antero - posteriores de los embriones. Es una molécula difusible que actúa como morfógeno de forma parácrina y tiene un efecto en las células dependiendo de su concentración. En la extremidad, este factor se expresa de S2 a S4 en la región posterior y participa en el establecimiento de la ZPA, y al igual que *Zimp10* se expresa formando un gradiente con la máxima concentración en el extremo posterior. SHH activa una cascada transduccional que determina la expresión de distintos genes importantes para la morfogénesis de la extremidad. Se ha demostrado que *Shh* es regulado de manera indirecta por AR, de tal forma que este último regula al factor transcripcional HAND2, quien a su vez determina la expresión de *Shh* en la parte posterior de la extremidad. Por su parte HAND2 también regula positivamente a *Shh*, estableciéndose así un “loop” regulatorio (Towers y Tickle, 2009). Por ello era importante preguntarse si el efecto de AR sobre la expresión de *Zimp10* es directo o es mediado por factores como SHH o HAND2. Los experimentos realizados consistieron en incubar por 7 horas extremidades embrionarias de S4 en presencia de un agonista de SHH (ag-SHH). Este agonista se administró a las extremidades de dos maneras: se introdujeron perlas empapadas con ag-Shh en distintas regiones de la extremidad (Fig. 26A y B), o alternativamente se agregó ag-Shh al medio de cultivo (Fig. 26C y D). Al cabo del período de incubación se colectaron las extremidades y se realizó una HIS, para determinar la expresión de *Zimp10*. Como resultado de estos experimentos, encontramos que SHH es capaz de inducir la expresión de *Zimp10* en cualquier región de la extremidad e independientemente de la manera en que se aplicara el agonista. Para valorar si SHH era realmente indispensable para la activación de la transcripción de *Zimp10* *in vivo*, procedimos a incubar las extremidades en presencia de ciclopamina. Este fármaco inhibe la actividad de SHH (Chen *et al*, 2002) a través de impedir la unión de SHH con la proteína llamada

Smoothened (mediadora de la actividad de SHH), y por lo tanto puede revelarnos si dicha actividad es necesaria para que se exprese *Zimp10*. Si fuera este el caso, la ausencia de actividad de SHH podría resultar en la falta de expresión de *Zimp10*. Como resultado de estos experimentos encontramos que no se inhibió la expresión de *Zimp10* en comparación con la de extremidades en las que no se agregó ciclopamina. Este resultado indica que además de SHH participan otros factores en la inducción de *Zimp10* (HAND2, o directamente el AR). Para un mayor entendimiento de este fenómeno estamos examinando las variaciones de expresión de HAND2 y otros blancos transcripcionales de SHH tales como *Gli3* en relación a la actividad de ciclopamina y la expresión de *Zimp10*.

El papel inductor de AR, SHH y posiblemente HAND2 sobre la activación transcripcional de *Zimp10* sugiere que este último es relevante durante la formación del eje antero - posterior. Para concluir este trabajo en el laboratorio se están realizando cultivos de extremidades en las que se introducen perlas empapadas de otros factores de crecimiento que participan en la morfogénesis de la extremidad tales como FGF8 y BMP2 para determinar el efecto de éstos sobre la expresión de *Zimp10*. Así mismo se están probando antagonistas o inhibidores de estos factores.

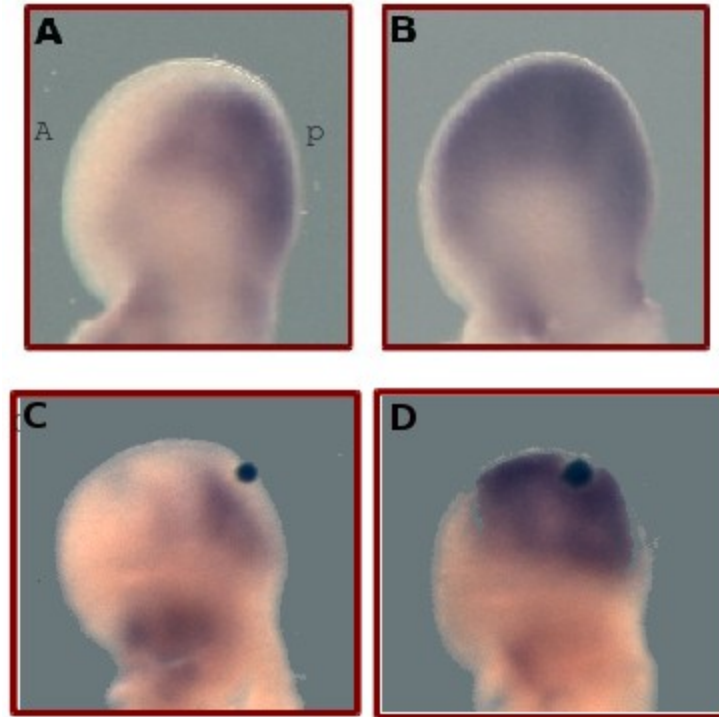


Fig. 26. Efecto de SHH en la expresión de *Zimp10*. Las imágenes muestran una vista dorsal de las extremidades con la expresión de *Zimp10* detectada por HIS. El agonista de Shh aumenta la expresión de *Zimp10* en las extremidades en cultivos de 7 hrs B) adicionado al medio y D) implantado en perlas. A y C) Utilizamos DMSO como vehículo y control de la expresión. Los experimentos se realizaron por triplicado. A: anterior, DMSO: dimetil sulfóxido, P: posterior.

c) El ácido retinoico y su efecto sobre la expresión de *Zimp7* en la gónada de macho.

Como se ha descrito anteriormente, encontramos que *Zimp7* se expresa en las células germinales de macho justo en la etapa de la determinación sexual. Se sabe que el AR tiene un papel determinante durante el desarrollo de éstas células (Koubova *et al.*, 2006). El AR se requiere para la expresión de *Stra8* en las germinales de la gónada de hembra y es responsable del inicio de la meiosis en estas células. También se sabe que el AR es capaz de iniciar la expresión de *Stra8* en células germinales de macho de manera artificial, e inducir la entrada a meiosis, cuando se cultivan gónadas en presencia de AR

exógeno. Por otra parte en este mismo estudio se encontró que de manera natural, la enzima CYP26b1 degrada el AR en machos, evitando así que las células entren a meiosis (Bowles y Koopman, 2007).

Considerando estos antecedentes, nos interesó saber si el AR tenía una influencia sobre la expresión de *Zimp7* en la gónada de macho, ya sea debido a la inducción artificial de la expresión de *Stra8*, o debido a los cambios fisiológicos producidos por la acción anormal del AR en el testículo. Es decir, la pregunta es si estas modificaciones "feminizantes" eran compatibles con la expresión de *Zimp7* en las células germinales. Para abordar esta pregunta, analizamos el efecto del AR exógeno sobre la expresión de *Zimp7* en cultivo de gónadas embrionarias de macho. Habíamos especulado que la adición de AR a las gónadas en cultivo podría causar la represión de *Zimp7*. Para probarlo, disectamos gónadas de macho de embriones de 11.5 y 12.5 dpc y las cultivamos durante dos días en presencia de 1, 5 y 10 μM de AR (Fig. 27A y B). Contrario a lo que esperábamos, observamos que el AR no afectó la expresión de *Zimp7* en las germinales de macho. Como control, algunas de las gónadas cultivadas las utilizamos para analizar la expresión de *Stra8* por RT-PCR (Fig. 27C). De ésta manera demostramos que el AR sí induce la expresión de *Stra8*, es decir, que tiene una actividad "feminizante" sobre la gónada, pero ésta no tenía influencia sobre la expresión de *Zimp7*.

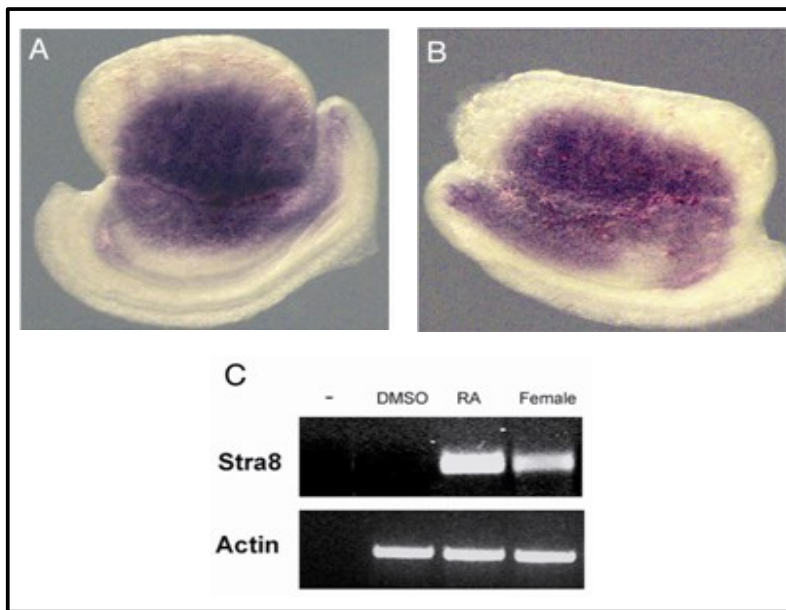


Fig. 27. Efecto del ácido retinoico en la expresión de *Zimp7* en la gónada de macho. Se muestra la expresión de *Zimp7* por HIS en gónadas de macho de 12.5 dpc cultivadas durante 24 horas con A) 5 mM de AR y B) DMSO como vehículo y control negativo. C) Se muestra el análisis de la expresión de *Stra8* por RT-PCR en gónadas cultivadas bajo las mismas condiciones y en gónadas de hembra sin cultivar. Utilizamos la expresión de actina como control de carga. Realizamos 5 repeticiones para cada experimento. DMSO: dimetil sulfóxido; RA: ácido retinoico.

d) Estudios con la dihidrotestosterona (DHT).

Adicionalmente nos interesamos en determinar si la DHT tenía un efecto positivo en la transcripción de *Zimp7*. Esta hipótesis surgía de que ya se ha demostrado que *Zimp7* interacciona con el receptor de andrógeno para co-regular la transcripción, por ello sería probable que a su vez este receptor también regulara positivamente la expresión de *Zimp7*. Para abordar esta pregunta hicimos cultivos de gónadas embrionarias de macho de 15.5 dpc en presencia de DHT. Primero probamos 2 concentraciones distintas de DHT (1, y 5 μM ; Fig. 28). En estos cultivos también determinamos la expresión de *Zimp7* en función de la presencia de DHT. Nuevamente, en la gónada embrionaria de 15.5 dpc no encontramos un efecto notorio por parte de este andrógeno. Sin embargo dado que el papel de los andrógenos en el control de la masculinización de los genitales y el tracto reproductivo está mas ampliamente documentado en adultos, pensamos que un efecto de la testosterona en la gónada postnatal podría ser mas notorio. Con esa finalidad diseñamos cultivos de testículos postnatales de 8, 15 y 30 días después del nacimiento (ddn). Los cultivos de testículo postnatal sufrieron deformaciones importantes al cabo de 48 horas en las condiciones de cultivo en las que regularmente hacemos los cultivos de gónada embrionaria. Por esta razón, probamos cultivos de gota colgante y de esta manera logramos que se conservara la morfología de la gónada y se recapitularan los eventos de la espermatogénesis. En cultivos optimizados de gota colgante, incubamos testículos de 15 ddn en presencia de DHT 1 μM por 48 horas (Fig. 29). Si bien inicialmente observamos un aumento en la expresión de *Zimp7*, que sugería que el DHT sí estimulaba su transcripción en el testículo, en estudios posteriores en los que hicimos un análisis por PCR de tiempo real para cuantificar dicho efecto, observamos que no era muy reproducible, de tal forma que a veces era muy visible y en ocasiones no era perceptible (datos no mostrados). Al hacer un análisis estadístico de estas observaciones encontramos que el efecto del DHT no resultaba significativo. Es decir, no hay una estimulación importante de la expresión de *Zimp7* en

respuesta a DHT. En conclusión hemos encontrado que ni el AR ni el DHT tienen un papel regulatorio sobre la expresión del gen *Zimp7* en la gónada.

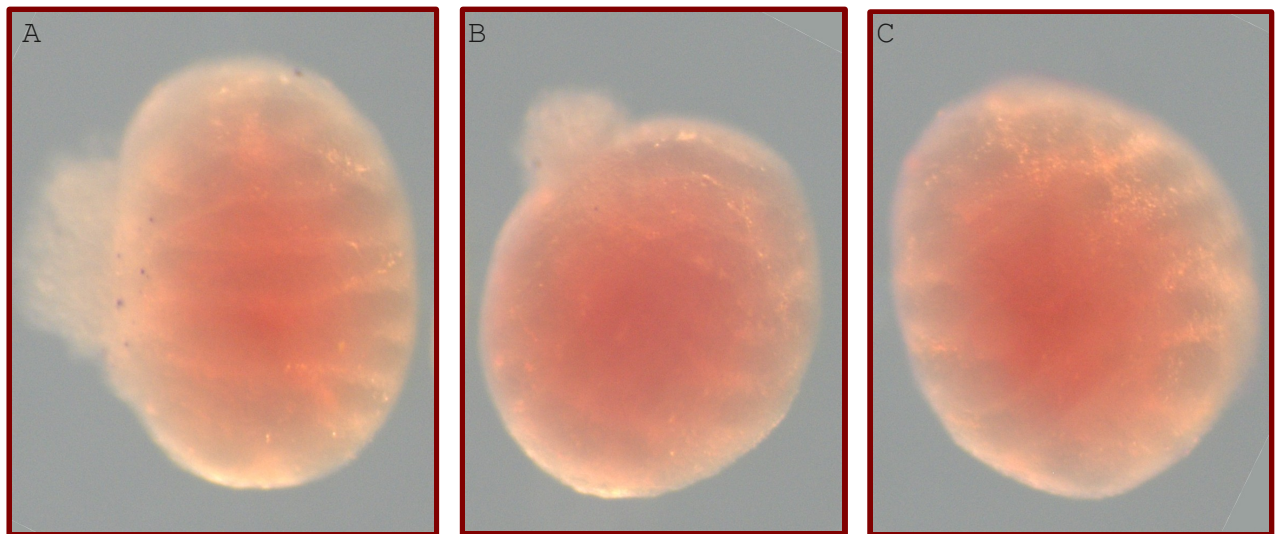


Fig. 28. Efecto del DHT sobre la expresión de *Zimp7* en gónadas de macho. El transcrito de *Zimp7* lo detectamos por HIS en gónadas de 15 dpc cultivadas durante 2 días con A) 1mM, B) 5 mM y con C) DMSO como control. El experimento se hizo por triplicado. DHT: dihidrotestosterona, DMSO: dimetil sulfóxido.

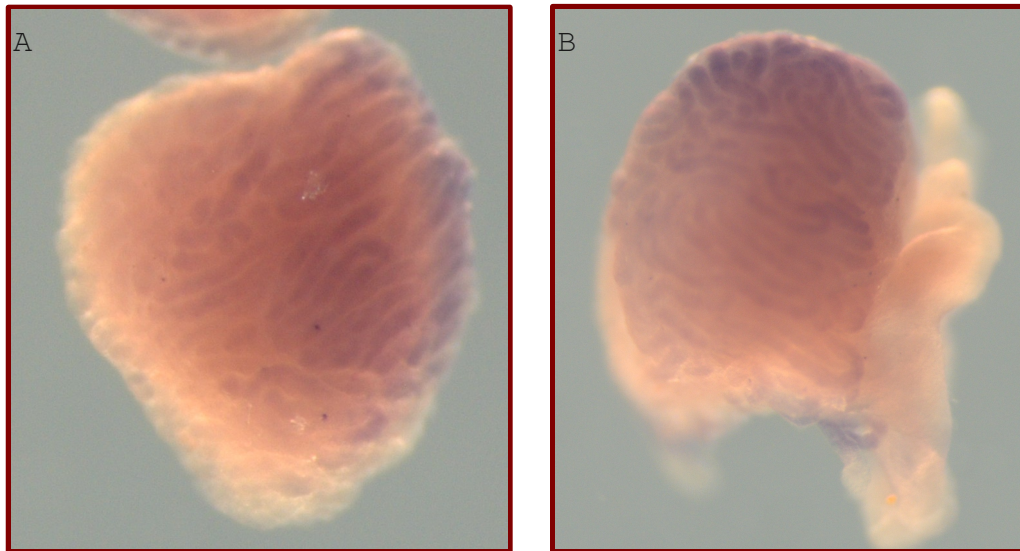


Fig. 29. Efecto del DHT en la expresión de *Zimp7* en testículo. El transcrito de *Zimp7* lo detectamos por HIS en testículos cultivados durante 2 días con A) 1mM y B) DMSO como vehículo y control. El experimento se hizo por triplicado. DHT: dihidrotestosterona, DMSO: dimetil sulfóxido.

e) Análisis bioinformático de la región promotora en los genes *Zimp*.

En nuestros resultados de cultivos organotípicos observamos que *Zimp10* y *Zimp7* responden diferente al estímulo del AR, pese a que ambos se reportaron en la base de datos del NCBI como genes activados por éste. Por lo que decidimos analizar la región promotora para cada gen y ver si tenían sitios de unión a los receptores del ácido retinoico (RAR) (Fig. 30).

Para éste estudio analizamos 3 Kb río arriba del inicio de transcripción de los genes *Zimp7* y *Zimp10* de ratón y de humano. Utilizamos el programa CONREAL, el cual permite la identificación de sitios de unión de factores transcripcionales que además estén conservados entre dos organismos ortólogos (Berezikov et al., 2004; Berezikov et al., 2005). Encontramos sitios consenso conservados en la región promotora de *Zimp10* entre humano y ratón (Fig. 30A). Entre ellos hay 3 sitios de unión a receptores del ácido retinoico (RAR, RXR), 16 sitios para el factor AP2- α y 17 para MZF1-4. Estos últimos

son factores transcripcionales que responden a la señalización del AR e inducen la transcripción de otros genes. Además encontramos un sitio de reconocimiento a GLI1, factor de transcripción que activa la transcripción bajo la señalización de SHH. Por otro lado, en el análisis de la región promotora de *Zimp7* (Fig. 30B), no encontramos sitios de unión a los RAR y solo observamos 1 sitio para el factor AP2- α y 2 para MZF1-4. Estos datos apoyan nuestros resultados obtenidos en los cultivos de órganos, donde vemos que hay una inducción de *Zimp10* por el AR retinoico pero no de *Zimp7*. Además, el sitio de unión a GLI1 en el promotor de *Zimp10* nos sugiere que SHH también está activando la expresión de éste último directamente.

Dentro de éste mismo análisis del promotor de *Zimp10* destaca el hecho de que encontramos 6 sitios de unión SRY, quien como se mencionó antes, es un factor determinante en la diferenciación de la gónada de macho y se expresa solo en las células somáticas de la gónada (Wilhelm *et al.*, 2007). Aunque la transcripción de Sry sólo dura hasta los 11.5 dpc, induce la expresión de otros factores importantes como SOX9 que permanece durante toda la diferenciación de la gónada (Kocer *et al.*, 2009). Por lo que sugerimos que SRY podría activar, quizá de forma indirecta, la transcripción de *Zimp10* en la gónada de macho.

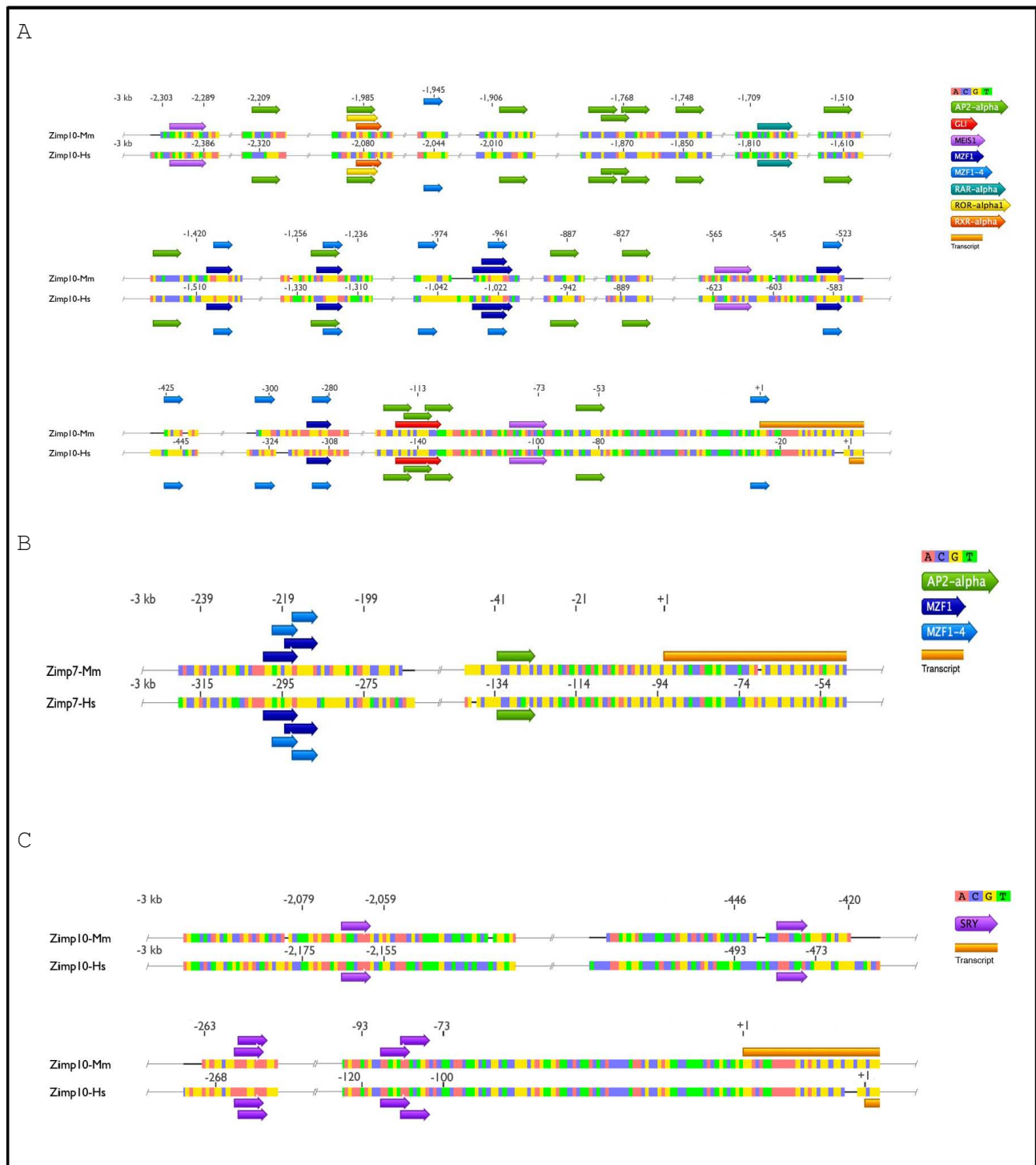


Fig. 30. Análisis de la región promotora de *Zimp7* y *Zimp10*. Los sitios de unión de la región promotora de *Zimp10* se conservan entre humano y ratón. A) Se muestra la región promotora de *Zimp10* con los posibles sitios de unión de los receptores del ácido retinoico- α o RAR- α (azul verdoso), RAR- α 1 (amarillo), RXR- α (naranja), sitios de factores transcripcionales activados por el AR como la proteína AP2- α (verde), MEIS1 (morado), MZF1 (azul), MZF1-4 (azul claro) y un sitio de unión a GLI

(rojo) que induce la transcripción en respuesta a la señalización de SHH. B) Esquema de la región promotora de *Zimp7* indicando los sitios de unión a los factores de transcripción AP-2 α (verde), MZF1 (azul) y MZF1-4 (azul claro). El rectángulo naranja muestra donde inicia la transcripción de cada gen. Los números indican la distancia en pares de bases río arriba del inicio de transcripción (+1). Los colores de la secuencia indican a cada uno de los nucleótidos. C) Sitios de unión al factor de transcripción SRY (flechas moradas) en el promotor de *Zimp10*.

DISCUSIÓN

Durante el desarrollo de este trabajo, presentamos el análisis de la estructura genética de los miembros de la familia de las proteínas ZIMP y mostramos su conservación a través de la evolución en diferentes especies. Además, estudiamos el patrón de expresión espacio - temporal de los genes *Zimp7* y *Zimp10* en la embriogénesis de ratón y demostramos que morfógenos como el ácido retinoico y Sonic Hedgehog regulan la expresión de *Zimp10 in vivo*, ya que activan su transcripción durante el establecimiento del patrón antero - posterior en las extremidades embrionarias. Por otra parte detectamos la presencia de la proteína ZIMP7 durante la espermatogénesis y evidenciamos que co-localiza con SUMO1 durante la meiosis de los espermatoцитos en paquiteno.

Las proteínas ZIMP y su estructura genética.

A través de nuestros análisis bioinformáticos sobre la estructura genética de las proteínas ZIMP, encontramos que están presentes desde invertebrados hasta humano. Las proteínas ZIMP7 y ZIMP10 comparten regiones altamente conservadas en todos los organismos, como la región rica en prolina en su extremo carboxilo terminal. En ZIMP10 este dominio es importante puesto que en humano muestra una actividad transcripcional intrínseca (Sharma *et al.*, 2003). Las zonas ricas en prolina, se encuentran frecuentemente en dominios de activación en varios factores transcripcionales y actúan regulando la actividad de la ARN polimerasa II (Mitchell y Tijal 1989). Además, cuando los dominios de prolina se encuentran en el extremo carboxilo terminal de las proteínas, muestran actividad de transactivación como en p53 y p73 (Ruaro *et al.*, 1997; Takada *et al.*, 1999). Todos estos datos nos sugieren que las ZIMP pueden actuar como transactivadores de ciertos genes durante el desarrollo y que esta

actividad podría estar conservada en las diferentes especies.

Las proteínas Zimp conservan además una región de 300 aminoácidos llamada XSPRING. En humano se sabe que esta región es importante para la interacción de las ZIMP con diversos factores que participan en el desarrollo embrionario, como son receptores hormonales y componentes del complejo remodelador de la cromatina SWI/SNF. Todas estas interacciones aumentan la actividad transcripcional mediada por los factores mencionados (Sharma *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2007). El dominio XSPRING o SP-RING extendido se caracterizó inicialmente en la proteína *Tonalli* (*Tna*) de *Drosophila melanogaster* y se demostró que interactúa genéticamente con factores del complejo remodelador de cromatina BRAHMA, homólogo de SWI/SNF de humano (Gutiérrez *et al.*, 2003). Debido a estas similitudes funcionales entre las ZIMP de humano y *Tna* de mosca, así como a la conservación del dominio XSPRING, y dado que en nuestro análisis no encontramos alguna otra proteína con mayor similitud a las ZIMP en *Drosophila*, creemos que estas proteínas son las ortólogas a *Tonalli* de mosca.

Otra observación que surgió de nuestro estudio es que las ZIMP de ratón, al igual que *Tna*, conservan dentro de la región del XSPRING un dominio tipo dedo de zinc, llamado SP-RING (Gutiérrez *et al.*, 2003), el cual es característico de la familia de proteínas PIAS. Se sabe que las PIAS participan en el proceso de SUMOilación y presentan actividad de E3-ligasa de SUMO, la cual contribuye a catalizar la unión de SUMO a sustratos específicos (Johnson y Gupta 2001; Kotaja *et al.*, 2002; Rytinki *et al.*, 2009; Sachdev *et al.*, 2001; Takahashi *et al.*, 2008). Como se mencionó anteriormente, la SUMOilación promueve la interacción entre proteínas alterando en algunos casos su función, en otros su interacción con otras proteínas, y a veces su localización subcelular (Martin *et al.*, 2007; Martin *et al.*, 2008; Bischof *et al.*, 2006; Onishi *et al.*, 2009; Rytinki *et al.*, 2009). Por otra parte, Sharma y colaboradores (2003) mostraron que ZIMP10 co-

localiza con SUMO1 en células de próstata de humano y es capaz de favorecer la SUMOilación del receptor de andrógenos en cultivos celulares. Éste aumento en la SUMOilación del RA se lleva a cabo con la región que abarca al SP-RING. Además ZIMP7 y ZIMP10 de humano comparten algunas propiedades similares a las PIAS, como la regulación de factores transcripcionales tales como p53 y componentes de la vía de TGF- β (Beliakoff y Sun 2006; Huang *et al.*, 2005; Sharma *et al.*, 2003). Tomando en cuenta todos estos datos, y pese a que las ZIMP no comparten otros dominios característicos de las PIAS, sugerimos que las primeras se relacionan con las PIAS y se pueden clasificar como una subfamilia de éstas.

Expresión de los Zimp durante la embriogénesis de ratón.

En este trabajo analizamos la actividad transcripcional de los genes *Zimp* durante la etapa de gastrulación y organogénesis. Encontramos que dicha expresión se regula dinámicamente desde los 7.5 dpc, cuando se están formando las tres capas germinales, hasta los 12.5 dpc cuando están terminando de formarse los órganos. Se han realizado trabajos funcionales de éstas proteínas ZIMP en líneas celulares de humano, los cuales indican que al menos ZIMP10, tiene una actividad específica en la regulación de la transcripción (Li *et al.*, 2006). Por ello, y considerando la intensidad de la expresión de ambos genes en todas las etapas embrionarias, es posible que los dos tengan un papel importante durante el desarrollo. Una característica importante de los genes *Zimp* es que presentan algunas zonas sobrelapantes de expresión, como el tejido del neuroepitelio, indicándonos una posible redundancia de función, aunque también muestran lugares donde son totalmente excluyentes.

En nuestros análisis mostramos que uno de las zonas donde solo se transcribe *Zimp10* es durante el desarrollo del sistema vascular, expresándose durante la formación de la aorta dorsal y el alantoides,

además de expresarse en la base del corazón donde se están formando los vasos capilares. Beliakoff y colaboradores (2008) encontraron que ratones mutantes para *Zimp10* mueren a los 10.5 dpc, etapa donde se lleva a cabo la vasculogénesis y angiogénesis. Además, demostraron por microarreglos que en ratones *Zimp10*^{-/-} disminuían varios transcritos involucrados en el desarrollo vascular (Beliakoff et al., 2010). Estos resultados concuerdan con la expresión sobresaliente de *Zimp10* que detectamos en el sistema vascular en desarrollo. Por otra parte, se sabe que BRG1 es importante en la embriogénesis durante el desarrollo vascular, y al igual que *Zimp10*, ratones condicionales *BRG1*^{f1/f1}:*Tie2-Cre*^{+/0} mueren a los 10.5 dpc (Griffin et al., 2008). Tomando en cuenta estos datos y considerando que ZIMP10 y ZIMP7 interactúan con BRG1 en células de próstata de humano (Huang et al., 2005), proponemos que la participación de *Zimp10* en la vasculogénesis y angiogénesis podría darse mediante su interacción con factores remodeladores de la cromatina, tales como BRG1.

Por otra parte, vimos que *Zimp7* tiene una dinámica de expresión muy interesante a los 8 dpc, donde se expresa solo en la región anterior del embrión en el tejido del mesénquima y epitelial. Además su transcripción comienza a extenderse hacia la parte posterior mientras avanza el desarrollo, mostrando una organización de la transcripción particular. *Zimp7* se observa intensamente en el tejido neural y en los primeros somitas en la parte anterior del embrión. Éste patrón de expresión es similar al que presentan algunos genes como TDP-43, p450, AP-2 involucrados en la formación la región anterior del cerebro y tubo neural (Fujii et al., 1997; Mitchell et al., 1991; Sephton et al., 2010), sugiriéndonos un papel de *Zimp7* en la neurogénesis.

Zimp10 en las extremidades.

Como se describió en la introducción, el desarrollo temprano de los primordios que van a dar lugar a las extremidades, se inicia con un programa de señalización que polariza estos primordios generando el eje antero - posterior, e iniciando la formación e identidad de los dígitos. Las células mesenquimales que se encuentran en la zona más posterior son las responsables de generar esta asimetría estableciendo el centro señalizador conocido como ZPA (Bénazet y Zeller, 2009), al cual ya nos referimos anteriormente. La actividad transcripcional de *Zimp10* en esta etapa, comienza en S4 y el transcrito se localiza justamente en la ZPA. Su expresión se encuentra en el mesénquima de la parte posterior de la extremidad, formando un gradiente hacia la región anterior. Este patrón es muy significativo y es además similar al que forman otros factores que se expresan en la ZPA, como *Hand2*, *Shh*, *Gremlin* y *HoxD13*. Todo lo anterior sugiere fuertemente que *Zimp10* participa en los eventos que determinan la formación del eje antero-posterior.

Puesto que ZIMP10 tiene un papel en la co-regulación de la transcripción y quizás también como activador transcripcional, creemos que es muy probable que esté involucrado en la compleja cascada regulatoria que conduce al establecimiento y funcionamiento de la ZPA. Para confirmar esta hipótesis, quisimos explorar la relación genética que existía entre *Zimp10* y otros factores que se expresan en la ZPA y/o que tienen papeles regulatorios importantes en este organizador. En primera instancia, analizamos los efectos del AR y de SHH sobre la expresión de *Zimp10* en cultivos de extremidades embrionarias. La selección de estos dos factores se hizo en función de su importancia dentro del "loop" regulatorio que controla la determinación del eje antero - posterior. Cabe aquí recordar que el AR se expresa en las células del mesodermo lateral del embrión, e inicia el establecimiento de la ZPA al inducir la expresión de genes como *Hand2* y *HoxD8* en la parte posterior de la extremidad (Tickle, 2006). HAND2 y otros factores HOX, participan en la formación de los

dígitos al inducir y regular la expresión de *Shh* en éstas células (Charité *et al.*, 2000; Zakany y Duboule, 2007; Scherz *et al.*, 2004). A su vez, SHH regula otros genes esenciales de la ZPA, tales como *Gli1* y *Gremlin*. Por otro lado, GLI3 se encuentra en la parte anterior de la extremidad y actúa como un represor de la ZPA restringiendo la expresión de genes del organizador (Fig. 2) (Zuñiga y Zeller, 1999; te Welscher *et al.*, 2002a).

Encontramos que tanto el AR como SHH tenían capacidad de inducir la expresión de *Zimp10 in vivo*, e inclusive en el caso del AR pudimos demostrar que se requiere endógenamente para que se exprese *Zimp10*. Estos resultados nos confirman que *Zimp10* es parte de la cascada regulatoria que se da en el ZPA, si bien no nos dicen a que nivel actúa, ni que blancos podría estar regulando. Para contestar estas preguntas sería necesario generar ratones transgénicos con inactivación condicional de *Zimp10* en las extremidades, o por ejemplo, hacer estudios de co-expresión con regiones regulatorias ligadas a genes reporteros, en cultivo celular. No obstante, es interesante mencionar que en estudios bioinformáticos realizados en este trabajo, encontramos que la región promotora de *Zimp10* presenta sitios de unión a receptores del ácido retinoico (RARs), a factores de transcripción que responden al AR como AP-2 α y a la proteína GLI1, un factor de transcripción que es blanco directo de la señal de SHH e induce la transcripción de genes en la ZPA (Lee *et al.*, 1997; Panman y Zeller, 2003). Tomando en cuenta estas observaciones, sugerimos que la transcripción de *Zimp10* en la ZPA se activa por la señalización inducida con el AR y en respuesta a la señalización de SHH a través de GLI1.

En otro de nuestros resultados sobre la dinámica de expresión de *Zimp10*, encontramos que un período más tardío (a los 13.5 dpc), la señal del transcrito se encuentra formando un margen en los dígitos y alrededor de las uniones de las falanges. En este estadio, las células mesenquimáticas que forman parte de los dígitos comienzan a

condensarse y a diferenciar hacia condrocitos para formar las falanges. En estas zonas, la transcripción de *Zimp10* colocaliza con los sitios de expresión de GDF5 (Storm y Kingsley, 1999). El factor GDF5 es un miembro de la familia de las proteínas morfogenéticas del hueso (BMP) y actúa como un inductor de la condrogénesis en células de la extremidad (Hötten et al., 1996), incrementando la proliferación de los condrocitos (Francis-West et al., 1999) e induciendo la formación de cartílago y hueso (Erlacher et al., 1998). Éste factor lleva a cabo su función a través de interactuar con los receptores BMPRI y 2, induciendo la fosforilación de las SMAD1 y 5, quienes a su vez, transducen la señal hasta el núcleo y activan la expresión de genes (Chabra et al., 2003; Coleman y Tuan, 2003; Nakamura et al., 2003; Chen et al., 2006).

Considerando el antecedente de que ZIMP10 de humano interactúa físicamente con las SMAD en células CV-1 (Sharma et al., 2003), y que la deficiencia de *Zimp10* en cultivos de fibroblastos de ratón disminuye la proliferación celular (Beliakoff et al., 2008) además de nuestra observación de la co-localización de *Zimp10* y *Gdf5* en los sitios de unión entre las falanges, creemos que ZIMP10 podría estar participando junto con GDF5 en la proliferación de los condrocitos.

Las proteínas ZIMP y el desarrollo de las gónadas.

Analizamos el patrón de expresión de los genes *Zimp7* y *Zimp10* durante el desarrollo temprano de las gónadas, donde demostramos que para ambos genes su expresión se observa con mayor intensidad en la gónada de macho. *Zimp7* se expresa en las células germinales primordiales de machos, teniendo su máxima expresión a los 13.5 dpc, cuando éstas comienzan su diferenciación sexual y se comprometen a espermatogonias. *Zimp10* se expresa en las células somáticas de las gónadas masculinas, fuera de los cordones seminíferos desde los 12.5 hasta los 14.5 dpc, teniendo un aumento de expresión a los 13.5 dpc

que coincide con la diferenciación de las diferentes células somáticas de la gónada de macho. Estos resultados apoyan la idea de que las proteínas ZIMP tienen un papel importante dentro del desarrollo de las gónadas masculinas. Sin embargo, mientras que la expresión de *Zimp7* se puede asociar al desarrollo de las células germinales, la dinámica de expresión de *Zimp10* se relaciona con la diferenciación de las células somáticas de la gónada. Las células somáticas del mesonefros migran hacia el cuerpo de la gónada a partir de los 12.5 hasta los 14.5 dpc, además se sabe que estos movimientos celulares dan origen al sistema vascular dentro del cuerpo gonadal (Cool et al., 2008). La entrada de éstas células se da al mismo tiempo en que comienza la expresión de *Zimp10* dentro de la gónada de macho. Como se mencionó anteriormente, *Zimp10* se expresa en el sistema vascular y ya se ha demostrado que participa en la vasculogénesis (Beliakoff et al., 2008). Por lo tanto, podría ser que su presencia en las células somáticas de macho, sea indicativa de una posible participación en la formación del sistema vascular de la gónada de macho.

Recientes descubrimientos han demostrado que el tiempo de iniciación de la meiosis sexo - específica depende de la acción del AR en el ovario fetal (Koubova et al., 2006). Por otra parte, nosotros encontramos que el AR induce la expresión de *Zimp10 in vivo* en extremidades embrionarias de ratón (Rodríguez-Magadán et al., manuscrito en preparación), por lo cual, estudiamos la posibilidad de que el AR tuviera un efecto negativo sobre la expresión de *Zimp7* en las gónadas embrionarias de hembra. Sin embargo, encontramos que no era capaz de alterar la expresión de *Zimp7* en cultivo de gónadas, sugieréndonos que la expresión de éste gen es independiente a la acción del AR en los eventos de determinación sexual.

ZIMP7 y la espermatogénesis.

La expresión testículo - específica de *Zimp7* también la detectamos en ratones adultos postnatales. La expresión se reinicia antes de la pubertad, después de un largo período de silenciamiento que ocurre en los últimos estadios embrionarios. Análisis previos de expresión a gran escala en el tejido reproductivo de mamíferos machos, han permitido la identificación de dos olas de activación transcripcional durante la espermatogénesis; una asociada con el inicio de la meiosis y la otra con la maduración de las células germinales post-meióticas (Schultz *et al.*, 2003). La activación transcripcional de *Zimp7* correlaciona con estas olas de expresión. Descubrimientos recientes demuestran que el testículo tiene complejos de transcripción especializados que coordinan los diferentes programas de la espermatogénesis (Kimmis *et al.*, 2004). Dado que *Zimp7* actúa como un co-regulador transcripcional, es posible que esté participando en alguno de éstos complejos transcripcionales de las células germinales. Además, el hecho de que regula la actividad del RA (Sharma *et al.*, 2005), cuya acción dentro de los túbulos seminíferos es esencial para una espermatogénesis normal, indica que tiene un papel importante en el control transcripcional durante la meiosis y la espermatogénesis.

Por otro lado, a través de nuestros experimentos de inmunofluorescencia localizamos a la proteína ZIMP7 en territorios nucleares específicos de los espermatoцитos en paquiteno. Uno de éstos territorios corresponde al cuerpo heterocromático XY. Previamente, se demostró que SUMO1 y SUMO2/3 tienen una localización predominante en los cromosomas sexuales en el estadio de paquiteno de espermatoцитos de ratón, lo que sugiere que la SUMOilación de proteínas en éstos cromosomas tiene un papel importante durante la meiosis (Rogers *et al.*, 2004, Vigodner y Morris, 2005, La Salle *et al.*, 2008). La localización de ZIMP7 en los cuerpos XY provee evidencias para sugerir que la SUMOilación puede ocurrir en éstos cuerpos heterocromáticos. En este sentido, es interesante que se han

encontrado otros componentes de la vía de SUMOilación dentro de los cuerpos XY, tales como la E2 conjugante, PIAS4 y UBE21 (Matsuura *et al*, 2005, La Salle *et al*, 2008). ZIMP7 podría estar involucrada en la formación de éstos territorios heterocromáticos durante la meiosis. Ésta hipótesis es atractiva debido a que se sabe que ZIMP7 interacciona con factores del complejo remodelador de la cromatina SWI/SNF. Por lo que es importante examinar cual de ellos se encuentra también dentro de los cuerpos XY.

CONCLUSIÓN

1. En conclusión, nuestro trabajo muestra que las proteínas ZIMP7 y ZIMP10 de ratón están conservadas a través de la evolución en diversas especies desde invertebrados como *Drosophila* hasta mamíferos como el humano.

2. Demostramos que los genes *Zimp7* y *Zimp10* tienen una expresión muy dinámica y altamente regulada desde los 7.5 hasta los 12.5 dpc de gestación. Ambos genes tienen regiones de expresión sobrelapantes como es la del neuroepitelio, en donde pueden tener una función redundante, y así mismo presentan también sitios de expresión específicos.

3. Demostramos que ambos genes presentan un perfil de expresión específico durante todo el desarrollo de la gónada de macho que es consistente con su posible participación en el desarrollo de este órgano, abarcando la diferenciación del testículo y los diferentes pasos en la diferenciación de las células germinales. Analizamos la posible participación de ZIMP7 en la meiosis, encontrando que la proteína se expresa en las células espermatogénicas y co-localiza con SUMO1 en los cuerpos XY de los espermatoцитos en paquiteno. Lo anterior sugiere que podría estar asociada con el dimorfismo sexual, por lo que es de interés el estudio de la inactivación de éste gen durante la espermatogénesis.

4. Finalmente, demostramos que *Zimp10* se induce por el AR endógeno y por un agonista de SHH en cultivos de extremidades, sugiriendo una participación de *Zimp10* durante la polarización de la extremidad. Además, a diferencia de *Zimp10*, *Zimp7* no es regulado por la acción del AR ni por el DHT en cultivo de gónadas y testículo adulto.

REFERENCIAS

- Agraz A., Duarteb C.A., Costac L., Pérez L., Páeza R., Pujola V. and Fontirrochie, G.** 1994. Immunoaffinity purification of recombinant hepatitis B surface antigen from yeast using a monoclonal antibody. *J. Chromatogr. A.* 24, 25-33.
- Ahn K., Mishina Y., Hanks M.C., Behringer R.R. and Crenshaw III E.B.** 2001. BMPR-IA signaling is required for the formation of the apical ectodermal ridge and dorsal-ventral patterning of the limb. *Development* 128: 4449-4461.
- Anckar J. and Sistonen L.** 2007. SUMO: getting it on. *Biochem. Soc. Trans.* 35(pt6):1409-1413.
- Bailey T.L. and Elkan C.** 1994. Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers. *Proc. Int. Conf. Intell. Syst. Mol. Biol.* 2:28-36.
- Barlow R., Mutter G., Gruss P. and Kessel M.** 1972. DNA synthesis in the preimplantation mouse embryo. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 27:432-445.
- Beliakoff, J. and Sun Z.** 2006. Zimp7 and Zimp10, two novel PIAS-like proteins, function as androgen receptor coregulators. *Nucl. Recept. Signal.* 4:e017.
- Beliakoff J., Lee J., Ueno H., Aiyer A., Weissman I. L., Barsh G. S., Cardiff R. D., and Sun Z.** 2008. The PIAS-Like Protein Zimp10 Is Essential for Embryonic Viability and Proper Vascular Development. *Molecular and Cellular Biology* 28 (1): 282-292.
- Bénazet J.D. and Zeller R.** 2009. Vertebrate limb development: moving from classical morphogen gradients to an integrated 4-dimensional patterning system. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 1: 1-14
- Berezikov E., Guryev V., Plasterk R.H. and Cuppen E.** 2004 CONREAL: conserved regulatory elements anchored alignment algorithm for identification of transcription factor binding sites by phylogenetic footprinting. *Genome Res.* 14:170-178.
- Berezikov E., Guryev V. and Cuppen E.** 2005. CONREAL Web Server: Identification and Visualization of Conserved Transcription Factor Binding Sites. *Nucleid Acid Research.* 33:447-450.
- Bischof O., Schwamborn K., Martin N., Werner A., Sustmann C., Grosschedl R. and Dejean A.** 2006. The E3 SUMO ligase PIASy is a regulator of cellular senescence and apoptosis. *Mol Cell.* 22:783-794
- Borland R. M.** 1977. Transport processes in the mammalian blastocyst. *Dev. Mammals.* 1:31-67.
- Bowles J., Knight D., Smith C., Wilhelm D., Richman J., Mamiya S., Yashiro K., Chawengsaksophak K., Wilson M.J. and Rossant J.** 2006. Retinoid signaling determines germ cell fate in mice. *Science.* 312:596-600.
- Bowles J. and Koopman P.** 2007. Retinoic acid, meiosis and germ cell fate in mammals. *Development.* 134(19):3401-3411.
- Cen, B., Selvaraj, A. and Prywes, R.** 2004. Myocardin/MKL family of SRF coactivators: Key regulators of immediate early and muscle specific gene expression. *J. Cell. Biochem.* 93: 74-82.
- Chabra A., Tsou D., Clark R.T., Gaschen V., Hunziker E.B. and Mikic B.** 2003. GDF-5 deficiency in mice delays Achilles tendon healing. *J Orthoptera Res.* 21(5):826-35.
- Charité J., McFadden D.G. and Olson E.N.** 2000. The bHLH transcription factor dHAND controls Sonic hedgehog expression and establishment of the zone of polarizing activity during limb development. *Development.* 127:2461-2470.
- Chassot A.A., Ranc F., Gregoire E.P., Roepers-Gajadien H.L., Taketo M.M., Camerino G., de Rooij D.G., Schedl A. and Chaboissier M.C.** 2008. Activation of b-catenin signaling by Rspol controls differentiation of the mammalian ovary. *Hum. Mol. Genet.* 17:1264-1277.

- Chen A., Wang P.Y., Yang Y.C., Huang Y.H., Yeh J.J., Chou Y.H., Cheng J.T., Hong Y.R. and Li S.S.** 2006. SUMO regulates the cytoplasmic nuclear transport of its target protein Daxx. *J. Cell Biochem.* 98(4):895-911.
- Chen J. K., Taipale J. and Cooper M.K.** 2002. Inhibition of Hedgehog signaling by direct binding of cyclopamine to Smoothened. *Genes Dev.* 16:2743-2748.
- Chen X., Zankl A., Niroomand F., Liu Z., Katus H.A., Jahn L. and Tiefenbacher C.** 2006. Upregulation of ID protein by growth and differentiation factor 5 (GDF5) through a smad-dependent and MAPK-independent pathway in HUVSMC. *J. Mol. and Cel. Cardiology.* 41:26-33
- Chiang C., Litingtung Y., Lee E., Young K.E., Corden J.L., Westphal H. and Beachy P.** 1996. Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking *Sonic hedgehog* gene function. *Nature* 383:407-413.
- Chiang C., Litingtung Y., Harris M.P., Simandl B.K., Li Y., Beachy P.A. and Fallon J.F.** 2001. Manifestation of the limb prepattern: Limb development in the absence of Sonic Hedgehog function. *Dev Biol* 236: 421-435.
- Chuma S. and Nakatsuji N.** 2001. Autonomous transition into meiosis of mouse fetal germ cells in vitro and its inhibition by gp130-mediated signaling. *Dev. Biol.* 229, 468-479.
- Chung C. D., Liao J., Liu B., Rao X., Jay P., Berta P. and Shuai K.** 1997. Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3. *Science* 278:1803-1805.
- Coleman C.M. and Tuan R.S.** 2003. Growth/differentiation factor 5 enhances chondrocyte maturation. *Dev Dyn.* 228(2):208-16.
- Cool J. and Capel B.** 2009. Mixed signals: development of the testis. *Semin. Reprod. Med.* 27: 5-13.
- Cool J., Carmona F.D., Szucsik J.C. and Capel B.** 2008 Peritubular myoid cells are not the migrating population required for testis cord formation in the XY gonad. *Sex Dev.* 134:128-33.
- De Kretser D.M. and Kerr J.B.** 1983. The effect of testicular damage of Sertoli and Leydig cell function. *Monogr. Endocrinol.* 25:133-154.
- De Robertis E.M.** 2006. Spemann's organizer and self-regulation in amphibian embryos. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7: 296-302.
- Desterro J.M., Rodriguez M.S. and Hay R.T.** 1998. SUMO-1 modification of IkappaBalpha inhibits NF-kappaB activation. *Mol. Cell.* 2:233-239
- Drag M. and Salvense G.S.** 2008. DeSUMOylating enzymes--SENPs. *IUBMB life.* 60(11):734-742.
- Duval D., Duval G., Kedinger C., Poch O. and Boeuf H.** 2003. The "PINIT" motif, of a newly identified conserved domains of the PIAS protein family, is essential for nuclear retention of PIAS3L. *FEBS letters* 554: 111-118.
- Dyce J., George M., Goodall H. and Fleming T. P.** 1987. Do trophectoderm and inner cell mass in the mouse blastocyst maintain discrete lineages? *Development.* 100:685-698.
- Edgar R. C.** 2004. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics* 5: 113.
- Erlacher L. McCartney J. Piek E. ten-Dijke P. Yanagishita M. and Oppermann H.** 1998. Cartilage-derived morphogenetic proteins and osteogenic protein-1 differentially regulate osteogenesis. *J Bone Miner Res.* 13:383-92.
- Felsenstein J.** 1995. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.57c. *Department of Genetics, University of Washington, Seattle*
- Francis-West P.H. Abdelfattah A. Chen P. Allen C. Parish J. and Ladher R.** 1999. Mechanisms of GDF-5 action during skeletal development. *Development.* 126:1305-15.
- Friedlander G.R. and Melchior F.** 2007. Concepts in SUMOylation: a decade on. *Nat. Rev. Mol.*

Cel. Biol. 8(12):947-956.

Ford C.E., Evans E.P., Burtenshaw M.D., Clegg H.M., Tuffrey M. and Barnes R.D. 1975. A functional 'sex-reversed' oocyte in the mouse. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 190:187-197.

Fujii H., Sato T., Kaneko S., Gotoh O., Fujii-Kuriyama Y., Osawa K., Kato S. and Hamada H. 1997. Metabolic inactivation of retinoic acid by a novel P450 differentially expressed in developing mouse embryos. *EMBO J.* 16:4163-4173.

Geiss-Friedlander R. and Melchior F. 2007. Concepts in SUMOylation: a decade on. *Nature Reviews* 8: 947-957.

Gill G. 2005. Something about sumo inhibits transcription. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 15(5):536-541

Gutiérrez L., Zurita M., Kennison J. A. and Vázquez M. 2003. The Drosophila trithorax group gene tonalli (tna) interacts genetically with the Brahma remodeling complex and encodes an SPRING finger protein. *Development* 130: 343-354.

Griffin C.T., Brennan J. and Magnuson T. 2008. The chromatin-remodeling enzyme BRG1 plays an essential role in primitive erythropoiesis and vascular development. *Development.* 135:493-500.

Gutiérrez G.J. and Ronai Z. 2006. Ubiquitin and SUMO systems in the regulation of mitotic checkpoints. *Trend Biochem. Sci.* 31(6):324-332.

Hari K.L., Cook K.R. and Karpen G.H. 2001. The Drosophila Su(var)2-10 locus regulates chromosome structure and function and encodes a member of the PIAS protein family. *Genes Dev.* 15:1334-1348.

Hattori T., Eberspaeche H., Lu J., Zhang R., Nishida T., Kahyo T., Yasuda H. and Crombrughe B. 2006. Interaction between PIAS proteins and SOX9 results in an increase in the cellular concentration of SOX9. *Journal of Biological Chemistry.* 281(20):14417-14428.

Hay R.T. 2005. SUMO: A history of modification. *Mol. Cell.* 18:1-12.

Heideker J., Perry J.J. and Boddy M.N. 2009. Genome stability roles of SUMO- targeted ubiquitin ligases. *DNA repair.* 8(4):517-524.

Hochstrasser M. 2001. SP-RING for SUMO: new functions bloom for a ubiquitin-like protein. *Cell* 107:5-8

Hogan B., Beddington R., Costantini F. and Lacy E. 1994. Manipulating the Mouse Embryo: a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Holmstrom S., Van Antwerp M.E. and Iniguez-Lluhi J.A. 2003. Direct and distinguishable inhibitory roles for SUMO isoforms in the control of transcriptional synergy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100:15758-15763

Hooker G. W. y Roeder G. S. 2006. A role for SUMO in meiotic chromosome synapsis. *Current Biology* 16: 1238-1243.

Hötten G.C. Matsumoto T. Kimura M. Bechtold R.F. Kron R. and Ohara T. 1996. Recombinant human growth/differentiation factor 5 stimulates mesenchyme aggregation and chondrogenesis responsible for the skeletal development of limbs. *Growth Factors.* 13:65 - 74.

Huang C., Beliakoff J., Li X., Lee J., Li X, Sharma M., Lim B. and Sun Z. 2005. hZimp7, a Novel PIAS-Like Protein, Enhances Androgen Receptor-Mediated Transcription and Interacts with SWI/SNF-Like BAF Complexes. *Molecular Endocrinology* 19(12):2915-2929

Imoto S., Ohbayashi N., Ikeda O., Kamitani S., Muromoto R., Sekine Y. and Matsuda T. 2008. SUMOylation of Smad3 stimulates its nuclear export during PIASy mediated suppression of TGF- β signaling. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 370:359-365.

Jana K., Douglas B.M., Qing Z., Blanche C., Michael D.G. and David C.P. 2005. Retinoic acid regulates sex-specific timing of meiotic initiation in mice. *PNAS.* 103:2474-9

Johnson E.S. 2004. Protein modification by SUMO. *Annu. Rev. Biochem.* 73:355-382

- Johnson E.S. and Gupta A.A.** 2001. An E3-like factor that promotes SUMO conjugation to the yeast septins. *Cell*. 106(6):735-744.
- Kimmins S., Kotaja N., Davidson I. and Sassone-Corsi P.** 2004 Testis-specific transcription mechanisms promoting male germ-cell differentiation. *Reproduction*. 128 5-12.
- Kocer A., Reichmann J., Best D and Adams I.R.** 2009. Germ cell sex determination in mammals. *Mol. Hum. Reprod.* 15 (4):205-213.
- Kotaja N., Karvonen U., Janne O.A. and Palvimo J.J.** 2002. PIAS proteins modulate transcription factors by functioning as SUMO-1 ligases. *Mol Cell Biol* 22:5222-5234.
- Koubova J., Menke D.B., Zhou Q., Capel B., Griswold M.D. and Page D.C.** 2006. Retinoic acid regulates sex-specific timing of meiotic initiation in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 103:2474-2479.
- Laufer E., Nelson C.E., Johnson R.L., Morgan B.A. and Tabin C.** 1994. Sonic hedgehog and Fgf-4 act through a signaling cascade and feedback loop to integrate growth and patterning of the developing limb bud. *Cell* 79: 993-1003.
- La Salle S., Sun F., Zhang X.D. Matunis M.J. and Andel M.A.** 2008. Developmental control of sumoylation pathway proteins in mouse male germ cells. *Dev. Biol.* 321: 227-237.
- Lee J., Beliakoff J. and Sun Z.** 2007. The novel PIAS-like protein hZimp10 is a transcriptional coactivator of the p53 tumor suppressor. *Nucleic Acids Research* 35(13): 4523-4534
- Lee H., Quinn J.C., Prasanth K.V., Swiss V.A., Economides K.D., Camacho M.M., Spector D.L. and Abate-Shen C.** 2006. PIAS1 confers DNA-binding specificity on the Mx1 homeoprotein. *Genes & Dev.* 753-758.
- Lee J., Platt K.A., Censullo P., Ruiz I. and Altaba A.** 1997. Gli1 is a target of Sonic hedgehog that induces ventral neural tube development. *Development*. 124:2537-2552.
- Lewandoski M., Sun X. and Martin G.R.** 2000. Fgf8 signalling from the AER is essential for normal limb development. *Nat Genet* 26: 460-463.
- Lewis E.B.** 1978. A gene complex controlling segmentation in Drosophila. *Nature*. 276:565-570.
- Li X., Thyssen G., Beliakoff J. and Sun Z.** 2006. The Novel PIAS-like Protein hZimp10 Enhances Smad Transcriptional Activity. *Journal of Biol. Chem.* 281(33): 23748-23756.
- Liu B., Gross M., ten Hoeve J. and Shuai K.** 2001. A transcriptional corepressor of Stat1 with an essential LXXLL signature motif. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98: 3203-3207.
- Liu B., Liao J., Rao X., Kushner S.A., Chung C.D., Chang D.D. and Shuai K.** 1998. Inhibition of Stat1-mediated gene activation by PIAS1. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:10626-106313.
- Lu P., Minowada G. and Martin G.R.** 2006. Increasing Fgf4 expression in the mouse limb bud causes polysyndactyly and rescues the skeletal defects that result from loss of Fgf8 function. *Development* 133: 33-42.
- Martin S., Nishimune A., Mellor J.R. and Henley J.M.** 2007. SUMOylation regulates kainate-receptor-mediated synaptic transmission. *Nature*. 447:321-325
- Martin N., Schwamborn K., Urlaub H., Gan B., Guan J.L. and Dejean A.** 2008. Spatial interplay between PIASy and FIP200 in the regulation of signal transduction and transcriptional activity. *Mol Cell Biol*. 28:2771-2781
- Matsuura T., Shimono Y., Kawai K., Murakami H., Urano T., Niwa Y., Goto H. and Takahashi M.** 2005. PIAS proteins are involved in the SUMO-1 modification, intracellular translocation and transcriptional repressive activity of RET finger protein. *Exp. Cell Res.* 308:65-77.
- Melchior F., Schergaut M. and Pichler A.** 2003. SUMO: Ligases, isopeptidases and nuclear pores. *Trends Biochem Sci* 28:612-618.
- Michos O., Panman L., Vintersten K., Beier K., Zeller R. and Zuñiga A.** 2004. Gremlin-

mediated BMP antagonism induces the epithelial-mesenchymal feedback signaling controlling metanephric kidney and limb organogenesis. *Development*. 131 (14):3401-3410.

Mitchell P.J. and Tjian R. 1989. Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science* 245:371-378.

Mitchell P.J., Timmons P.M., Hébert J.M., Rigby P.W. and Tjian R. 1991. Transcription factor AP-2 is expressed in neural crest cell lineages during mouse embryogenesis. *Genes Dev.* 5(1):105-119.

Moilanen A.M., Karvonen U., Poukka H., Yan W., Toppari J., Jänne O.A. and Palvimo J.J. 1999. A testis-specific androgen receptor coregulator that belongs to a novel family of nuclear proteins. *J. Biol. Chem.* 274: 3700-3704.

Montpetit B., Hazbun T.R., Fields S. and Hieter P. 2006. SUMOylation of the budding yeast kinetochore protein Ndc10 is required for Ndc10 spindle localization and regulation of anaphase spindle elongation. *J. Cell Biol.* 174(5):653-663

Moon A.M. and Capecchi M.R. 2000. Fgf8 is required for outgrowth and patterning of the limbs. *Nat Genet* 26: 455-459.

Moreno-Mendoza N., Torres-Maldonado L., Chimal-Monrroy J., Harley V. and Merchant-Larios H. 2004. Disturbed expression of Sox9 in Pre-Sertolli cells underlies sex-reversal in mice B6.Y^{tm1}. *Biol. of Rep.* 70 114-22.

Nakamura T., Yamamoto M., Tamura M. and Izumi Y. 2003. Effects of growth/differentiation factor-5 on human periodontal ligament cells. *J Periodontal Res.* 38(6):597-605.

Niswander L., Jeffrey S., Martin G.R. and Tickle C. 1994. A positive feedback loop coordinates growth and patterning in the vertebrate limb. *Nature* 371: 609-612.

Niswander L. 2003. Pattern formation: old models out on a limb. *Nat. Rev. Genet.* 4:133-143.

Okubo S., Hara F., Tsuchida Y., Shimotakahara S., Suzuki S., Hatanaka H., Yokoyama S., Tanaka H., Yasuda H. and Shindo H. 2004. NMR Structure of the N-terminal Domain of SUMO Ligase PIAS1 and Its Interaction with Tumor Suppressor p53 and A/T-rich DNA Oligomers. *The Journal of Biological Chemistry* 279 (30): 31455-31461.

Onishi A., Peng G.H., Hsu C., Alexis U., Chen S. and Blackshaw S. 2009. Pias3-dependent SUMOylation directs rod photoreceptor development. *Neuron.* 61:234-246.

Palmer S.J. and Burgoyne P.S. 1991. XY follicle cells in the ovaries of XO/XY and XO/XY/XY mosaic mice. *Development.* 111:1017-1019.

Palvimo J. J. 2007. PIAS proteins as regulators of small ubiquitin-related modifier (SUMO) modifications and transcription. *Biochemical Society Transaction* 35(6): 1405-1408.

Panman L. and Zeller R. 2003. Patterning the limb before and after SHH signalling. *J. Anat.* 202(1):3-12.

Pearl P.Y., Lie C., Yan Cheng and Mruk D.D. 2009. Coordinating cellular events during spermatogenesis: a biochemical model. *Cell Press.* 34(7):336-373.

Peng Y., Lee J., Zhu Ch. and Sun Z. 2010. A novel role for protein inhibitor of activated STAT (PIAS) in modulating the activity of Zimp7, a novel PIAS-like protein, in androgen receptor-mediated transcription. *The Journal of Biological Chemistry* 285 (15): 11465-11475.

Pennimpede T., Cameron D. A., MacLean G. A. and Petkovich M. 2010. Analysis of Cyp26b1/Rarg compound-null mice reveals two genetically separable effects of retinoic acid on limb outgrowth. *Dev. Biol.*

Pesce M., Wang X., Wolgemuth D. and Schöler H. 1998. Differential expression of the Oct4 transcription factor during mouse germ cell differentiation. *Mech. Dev.* 71:89-98.

Perry J.J., Tainer J.A. and Boddy M.N. 2008 A SIM-ultaneous role for SUMO and ubiquitin. *Trends Biochem. Sci.* 33:201-208.

Pizette S., Abate-Shen C. and Niswander L. 2001. BMP controls proximodistal outgrowth, via

induction of the apical ectodermal ridge, and dorsoventral patterning in the vertebrate limb. *Development* 128: 4463-4474.

Reindle A., Belichenko I., Bylebyl G.R., Chen X.L., Gandhi N. and Johnson E.S. 2006. Multiple domains in Siz SUMO ligases contribute to substrate selectivity. *J Cell Sci.* 119:4749-4757

Rogers R.S., Inselman A., Handel M.A. and Matunis M.J. 2004. SUMO modified proteins localize to the XY body of pachytene spermatocytes. *Chromosoma* 113: 233-243.

Ross A.J. and Capel B. 2005. Signaling at the crossroads of gonad development. *Trends Endocrinol Metab.* 16:19-25.

Ross S., Best J.L., Zon L.I. and Gill G. 2002. SUMO-1 modification represses Sp3 transcriptional activation and modulates its subnuclear localization. *Mol. Cell.* 10:831-842.

Ruaro E.M., Collavin L., Del Sal G., Haffner R., Oren M., Levine A.J. and Schneider C. 1997. A proline-rich motive in p53 is required for transactivation-independent growth arrest as induced by Gas1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94:4675-4680.

Rytinki M.M., Kaikkonen S., Pehkonen P., Jaaaskelainen T. and Palvimo J.J. 2009. PIAS proteins: pleiotropic interactors associated with SUMO. *Cell. Mol. Life Sci.*

Sachdev S., Bruhn L., Sieber H., Pichler A., Melchior F. and Grosschedl R. 2001. PIASy, a nuclear matrix-associated SUMO E3 ligase, represses LEF1 activity by sequestration into nuclear bodies. *Genes Dev* 15:3088-3103

Sachdev S., Bruhn L., Sieber H., Pichler A., Melchior F. and Grosschedl R. 2001. PIASy, a nuclear matrix-associated SUMO E3 ligase, represses LEF1 activity by sequestration into nuclear bodies. *Genes Dev.* 15:3088-3103

Salas-Vidal E., Valencia C. and Covarrubias L. 2001. Differential tissue growth and patterns of cell death in mouse limb autopod morphogenesis. *Dev. Dyn.* 220: 295-306.

Scherz P.J., Harfe B.D., McMahon A.P. and Tabin C.J. 2004. The limb bud Shh-Fgf feedback loop is terminated by expansion of former ZPA cells. *Science.* 305:396-399.

Schmidt D. and Muller S. 2003. PIAS/SUMO: new partners in transcriptional regulation. *Cell. Mol. Life Sci.* 60, 2561-2574

Schultz N., Hamra F.K. and Garbers D.L. 2003 A multitude of genes expressed solely in meiotic or postmeiotic spermatogenic cells offers a myriad of contraceptive targets. *PNAS* 100:12201-12206.

Sephton C.F., Good S.K., Atkln S., Dewey C.M., Mayer III P. and Herz J. 2010. TDP-43 is a developmental regulated protein essential for early embryonic development. *J. Biol. Chem.* 285(9):6826.6834.

Sharma M., Li X., Wang Y., Zarnegar M., Huang Ch., Palvimo J.J., Lim B. and Sun Z. 2003. hZimp10 is an androgen receptor co-activator and forms a complex with SUMO-1 at replication foci. *The EMBO Journal* 22(22): 6101-6114.

Sharrocks A.D. 2006. PIAS proteins and transcriptional regulation-more than just SUMO E3 ligases?. *Genes Dev* 20: 754-758.

Storm E.E. and Kingsley D.M. 1999. GDF5 coordinates bone and joint formation during digit development. *Dev Biol.* 209:11- 27.

Summerbell D. and Harvey F. 1983. Vitamin A and the control of pattern in vertebrate limbs. In *Limb development and regeneration.* (ed. Fallon J.F., Caplan A.I.), 109-118. *Liss, New York.*

Sun X., Mariani F.V. and Martin G.R. 2002. Functions of FGF signalling from the apical ectodermal ridge in limb development. *Nature* 418: 501-508.

Szczepny A., Hogarth C.A., Young J. and Loveland K.L. 2009. Identification of Hedgehog signaling outcome in mouse testis development using a hanging drop-culture system. *Biology of reproduction.* 80:258-263.

- Tabin C. and Wolpert L.** 2007. Rethinking the proximodistal axis of the vertebrate limb in the molecular era. *Genes Dev* 21: 1433-1442.
- Takahashi Y. and Kikuchi Y.** 2005. Yeast PIAS-type Ull1/Siz1 is composed of SUMO ligase and regulatory domains. *J. Biol. Chem.* 280(43):35822-35828.
- Takahashi Y., Iwase M., Strunnikov A.V. and Kikuchi Y.** 2008. Cytoplasmatic SUMOylation by PIAS-type Siz1-SUMO ligase. *Cell Cycle.* 7(12):1738-1744.
- Tang Z., Hecker C.M., Scheschonka A. and Betz H.** 2008. Protein interactions in the sumoylation cascade-lesson from X-ray structures. *FEBS journal* 275: 3003-3015.
- Takada N., Ozaki T., Ichimiya S., Todo S. and Nakagawara A.** 1999. Identification of a transactivation activity in the COOH-terminal region of p73 which is impaired in the naturally occurring mutants found in human neuroblastomas. *Cancer Research.* 59:2810-2814.
- Tarchini B., Duboule D. and Kmita M.** 2006. Regulatory constraints in the evolution of the tetrapod limb anterior-posterior polarity. *Nature* 443: 985-988.
- Tickle C., Alberts B.M., Wolpert L. and Lee J.** 1982. Local application of retinoic acid in the limb bud mimics the action of the polarizing region. *Nature* 296: 564-565.
- Tickle C.** 2006. Making digit patterns in the vertebrate limb. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 7:45-53.
- Towers M., Mahood R., Yin Y. and Tickle C.** 2008. Integration of growth and specification in chick wing digit-patterning. *Nature* 452: 882-886.
- Towers M. and Tickle C.** 2009. Generation of patten and form in the developing limb. *Int. J. Dev. Biol.* 53(5-6):805-812.
- Vainio S., Heikkila M., Kispert A., Chin N., McMahon A.P.** 1999. Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. *Nature.* 397:405-409.
- van den Akker E., Ano S., Shih H.M., Wang L.C., Pironin M., Palvimo J.J., Kotaja N., Kirsh O., Dejean A. and Ghysdael J.** 2005. FLI-1 functionally interacts with PIASxalpha, a member of the PIAS E3 SUMO ligase family. *J. Biol. Chem.* 280:38035-38046
- Vigodner M. and Morris P.L.** 2005. Testicular expression of small ubiquitin-related modifier-1 (SUMO-1) supports multiple roles in spermatogenesis: silencing of sex chromosomes in spermatocytes, spermatid microtubule nucleation, and nuclear reshaping. *Dev. Biol.* 15: 480-492.
- Wanek N., Muneoka K., Holler-Dinsmore G., Burton R. and Bryant S.V.** 1989. A staging system for mouse limb development. *J. Exp. Zool.* 249: 41-49.
- Watts F.Z.** 2004. SUMO modification of proteins other than transcription factors. *Seminars in Cell and Developmental Biology.* 15:211-220.
- te Welscher P., Fernandez-Teran M., Ros M.A. and Zeller R.** 2002a. Mutual genetic antagonism involving GLI3 and dHAND prepatterns the vertebrate limb bud mesenchyme prior to SHH signaling. *Genes Dev.* 16:421-426.
- Wiley L. M.** 1984. Cavitation in the mouse preimplantation embryo: Na/K ATPase and the origin of nascent blastocoel fluid. *Dev. Biol.* 105:330-342.
- Wilhelm D., Palmer S., and Koopman P.** 2007. Sex determination and gonadal development in mammals. *Physiol. Rev.* 87: 1-28.
- Wilkinson K.A. and Henley M.J.** 2010. Mechanism, regulation and consequences of protein SUMOylation. *Biochem. J.* 428: 133-145.
- Wong K.A., Kim R., Christofk H., Gao J., Lawson G., Wu H.** 2004. Protein inhibitor of activated STAT Y (PIASy) and a splice variant lacking exon 6 enhance sumoylation but are not essential for embryogenesis and adult life. *Mol Cell Biol.* 24:5577-5586
- Yang S.H. and Sharrocks A.D.** 2005. PIASx acts as an Elk-1 coactivator by facilitating

derepression. *EMBO J.* 24:2161-2171.

Zakany J. and Duboule D. 2007. The role of Hox genes during vertebrate limb development. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 17:359-366.

Zhao J. 2007. SUMOylation regulates diverse biological processes. *Cell Mol. Life Sci.* 64:3017-3033.

Zúñiga A., Haramis A.P., McMahon A.P. and Zeller R. 1999. Signal relay by BMP antagonism controls the SHH/FGF4 feedback loop in vertebrate limb buds. *Nature.* 401:598-602.

Zúñiga A. and Zeller R. 1999. Gli3 (Xt) and formin (Id) participate in the positioning of the polarising region and control of the posterior limb-bud identity. *Development.* 126(1):13-21.

APÉNDICES

REACTIVOS

Polvo de embrión para hibridación *in situ*.

Homogenizar embriones de 12.5 - 14.5 dpc en un volumen mínimo de PBS.

Añadir 4 volúmenes de acetona, mezclar y colocar en hielo.

Centrifugar a 1000 rpm por 10 min y quitar el sobrenadante.

Lavar la pastilla con acetona fría y centrifugar nuevamente.

Dispersar la pastilla en papel filtro y dejar secar toda la noche.

Moler en un mortero estéril hasta tener un polvo fino y almacenar a -20°C.

Anticuerpo pre-absorbido para hibridación *in situ*.

Añadir 60 mg de polvo de embrión en 10 ml de TBST y dejar en agitación por 30 min a 70°C.

Dejar en hielo por algunos minutos.

Agregar 100 µl de suero de oveja y 20 µl de anticuerpo anti-DIG.

Poner en agitación durante 1 hr a 4°C.

Centrifugar por 5 segundos y pasar el sobrenadante a un tubo nuevo y llevar el volumen a 50 ml en TBST/1% de suero de oveja.

SOLUCIONES

	PBS 1x	100 ML
NaCl	8 g	
KCl	0.2 g	
NaHPO	1.44 g	
KH ₂ PO	0.24 g	
Agua	100 ml	
Ajustar pH a 7.4		

	PBT 1X	100 ml
PBS 1X	100 ml	
Tween 20	100 ml	

	H₂O₂ 6%	5 ml
PBT	4 ml	
H ₂ O ₂ (30%)	1 ml	

	PK	10 mg/ml
PBT	5 ml	
proteinasas K (10mg/ml)	5 mg	

	PFA 4%/GTA 0.2%	5 ml
PFA 4%	5 ml	
Glutaraldehido	20 ml	

Tween 20 5 µl

Solución de hibridación 50 ml.

Formamida 25 ml
 SSC 20% pH 4.5 12.5ml
 SDS 20% 2.5 ml
 ARNt 0.230 ml
 Heparina 10mg/ml 0.250 ml
 Agua DEPC cbp 50 ml

Sol I 50 ml

Formamida 25 ml
 SSC 20X 12.5 ml
 SDS 20X 2.5 ml
 Agua DEPC 10 ml

Sol II 50 ml

Formamida 25 ml
 SSC 20X 2.5 ml
 Agua DEPC 22.5 ml

TBST RNA 50 ml.

NaCl 5 M 0.4 ml
 Tris-HCl 1 M 1.25 ml

Tween 20	0.5 ml
KCl	0.010 g
Levamisol	0.024 mg/ml
Agua DEPC	cbp 50 ml

Buffer de lisis.

25 mM de Hepes pH 7.5
150 mM de NaCl
1.5 mM de MgCl₂
0.2 mM de EDTA
0.5 % de Tritón 100X
Inhibidor de proteasas "Complete mini EDTA-free" (Roche)

TBST proteínas

50 mM de buffer TBS pH 7.5
0.05% de Tween 20

TBS (10x)

Tris	12.11 g
NaCl	43.83 g
Agua	cbp 500 ml

Ajustar el pH a 7.5