



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA**

**Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular**

**“Atrx DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO TEMPRANO  
DEL PEZ CEBRA”**

**T E S I S**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS**

P R E S E N T A

**LCG. DAFNE ANDREA IBARRA MORALES**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**DRA. DENHÍ SCHNABEL PERAZA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA**

**INTEGRANTES DE COMITÉ TUTOR:**

**DRA. DIANA ESCALANTE  
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA  
CELULAR**

**DR. CRISTOPHER WOOD  
INSTITUTO DE  
BIOTECNOLOGÍA**

**MÉXICO, DF**

**JUNIO 2014**



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. Denhí Schnabel, mi tutora, por el tiempo y dedicación que puso a mi formación académica, por ser mi guía y aconsejarme siempre, por toda su atención, interés y empeño en este trabajo.

Al Dr. Mario Zurita, por permitirme hacer este proyecto en su laboratorio, por todo su apoyo y por sus útiles consejos durante el trayecto.

A todos los miembros del laboratorio MZ y HL, por su ayuda, sus recomendaciones, sus consejos, su apoyo, su compañía y amistad en estos años.

A la Dra. Diana Escalante y al Dr. Cristopher Wood, miembros de mi comité tutor, por sus recomendaciones acertadas, por todas las ideas que aportaron y por las discusiones que me orientaron durante estos dos años.

A la Dra. Claudia Treviño, Dra. Verónica Narvárez, Dr. Félix Recillas, Dr. Fernando López Casillas y al Dr. Luis Covarrubias, por aceptar ser parte de mi jurado, por el tiempo que dedicaron a leer mi tesis y por sus valiosas observaciones, comentarios y correcciones.

A mis papás y a mi hermana, por su apoyo incondicional y sus palabras de aliento, que siempre estuvieron ahí para ayudarme a salir adelante.

A Oscar, por hacerme ver siempre el lado bueno de las cosas, por creer en mí, por escucharme cuando lo necesitaba y estar para mí siempre.

Este proyecto fue financiado por DGAPA proyecto IN212514

## ÍNDICE GENERAL

NOMENCLATURA DE GENES Y PROTEÍNAS .....	3
RESUMEN .....	4
INTRODUCCIÓN .....	5
I. ATRX .....	5
Ia. -ATRX, su papel en la estructura y dinámica de la cromatina y su influencia en la expresión de genes.....	5
Ib.-ATRX y su papel en el desarrollo embrionario de vertebrados .....	7
II.-El pez cebra.....	8
II.a- El pez cebra como modelo.....	8
II.b-El desarrollo del pez cebra.....	11
II.c-La especificación del eje dorsoventral.....	13
ANTECEDENTES.....	18
JUSTIFICACIÓN.....	24
HIPÓTESIS.....	24
OBJETIVOS.....	24
METODOLOGÍA.....	25
Cruza y obtención de embriones .....	25
Hibridaciones in situ.....	25
Síntesis de sondas .....	25
Hibridaciones in situ utilizando NBT/BCIP .....	27
Hibridaciones in situ fluorescentes .....	29
Método de cuantificación de los ángulos de tinción de cordina.....	29
Inmunotinción .....	30
Clonación del gen atrx14 de pez cebra .....	30
Diseño y secuencia de oligonucleótidos.....	30
Preservación de embriones previo a la obtención de ARN .....	31
Extracción de ARN.....	31
RT-PCR .....	31
Purificación de productos de PCR .....	32

Ligación de productos de PCR.....	33
Transformación de bacterias competentes por choque de calor .....	33
Purificación de ADN plasmídico .....	34
Transcripción in vitro de ARN .....	34
Reacción.....	34
Purificación del transcrito.....	35
Diseño del morfolino.....	36
Microinyección de embriones de pez cebra.....	36
Morfolinos .....	36
atrx14 ARN.....	37
RESULTADOS.....	38
Colocalización del ARN de atrx14 con la proteína $\beta$ -catenina.....	38
Microinyección de embriones con morfolinos .....	42
Hibridaciones in situ de marcadores.....	45
Hibridación in situ de cordina .....	45
Hibridación in situ de no tail .....	46
Pérdida de efectividad del morfolino.....	47
Microinyección de embriones con ARN de atrx14.....	49
Clonación del transcrito de atrx14 .....	49
Inyección del ARN de atrx14.....	50
Diseño de oligonucleótidos de atrx14 para CRISPRs.....	52
DISCUSIÓN.....	55
CONCLUSIONES.....	62
PERSPECTIVAS.....	63
BIBLIOGRAFÍA .....	64

## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Fig.1 Esquema de ATRX y ATRXt .....	6
Fig.2 Esquema de un heterodúplex morfolino-ARN donde se muestran las características de los morfolinos .....	9
Fig.3 Similitudes y diferencias entre los sistemas de silenciamiento tipo CRISPR y el ARNi .....	10
Fig.4 Esquema de estadios seleccionados del desarrollo de pez cebra.....	13
Fig.5 Especificación del eje dorsoventral en el pez cebra.....	15
Fig.6 Señalización por BMP .....	15
Fig.7 Componentes de la vía de Nodal, Wnt y BMP regulan positivamente la expresión de <i>no tail</i> .....	16
Fig.8 <i>Danio rerio</i> tiene 2 genes homólogos a ATRX humano .....	18
Fig.9 <i>atrx5</i> y <i>atrx14</i> son de herencia materna y se expresan en todos los estadios analizados del desarrollo embrionario.....	19
Fig.10 <i>atrx14</i> tiene al menos una isoforma alternativa .....	20
Fig.11 Hibridaciones <i>in situ</i> de <i>atrx5</i> en embriones completos durante el desarrollo de <i>Danio rerio</i> .....	20
Fig.12 Hibridaciones <i>in situ</i> de <i>atrx14</i> en embriones completos durante el desarrollo de <i>Danio rerio</i> .....	21
Fig.13 Hibridaciones <i>in situ</i> de <i>atrx14</i> en estadios tempranos.....	21
Fig.14 $\beta$ -catenina se transloca al núcleo en la parte dorsal del embrión .....	22
Fig.15 El transcrito de <i>wnt8a</i> está distribuido asimétricamente en el vitelo durante las primeras divisiones celulares .....	22
Fig. 16 La inyección del morfolino contra <i>atrx14</i> tiene un efecto más dramático en los embriones que la inyección del morfolino contra <i>atrx5</i> .....	23
Fig. 17 Preparación de la crusa .....	25
Fig.18 ARN obtenido de la transcripción <i>in vitro</i> .....	35

Fig.19 Localización en el transcrito de los morfolidos diseñados contra <i>atrx14</i> .....	36
Fig.20 El gradiente de tinción de <i>atrx14</i> desaparece cerca del estadio de esfera .....	38
Fig.21 La distribución en gradiente de <i>atrx14</i> se sobrelapa en algunos estadios con la localización nuclear de $\beta$ -catenina.....	39
Fig.22 $\beta$ -catenina se localiza en la membrana de todas las células, pero sólo se encuentra en el núcleo en el lado dorsal .....	39
Fig.23 Corte óptico donde se aprecia la localización de $\beta$ -catenina en algunos núcleos .....	40
Fig.24. <i>atrx14</i> se distribuye en gradiente en la etapa de 256 células.....	40
Fig. 25 El patrón de $\beta$ -catenina se pierde con la tinción de la hibridación <i>in situ</i> de <i>atrx14</i> .....	41
Fig. 26 Aun cuando no se utiliza el Hoechst, el patrón de $\beta$ -catenina cambia.....	42
Fig.27 Inyección con el morfolido que inhibe la traducción de <i>atrx14</i> .....	43
Fig.28 Fenotipos observados con la inyección del morfolido contra <i>atrx14</i> en embriones de 24 horas .....	44
Fig.29 El primordio de la aleta (median fin fold en inglés) disminuye en los embriones inyectados con morfolido contra <i>atrx14</i> .....	44
Fig.30. Los embriones inyectados con morfolido contra <i>atrx14</i> tienen alteraciones en la forma de la cabeza y la regionalización del cerebro.....	44
Fig. 31 Hibridación <i>in situ</i> de <i>cordina</i> .....	45
Fig.32 Cuantificación del ángulo de tinción de <i>cordina</i> en embriones morfantes para <i>atrx14</i> .....	46
Fig.33 Distintos fenotipos encontrados en los embriones morfantes para <i>atrx14</i> cuando se hacen hibridaciones <i>in situ</i> de <i>no tail</i> .....	46
Fig. 34 Los embriones morfológicamente más afectados presentan interrupciones más grandes en la expresión de <i>no tail</i> .....	47
Fig.35. En inyecciones subsecuentes no se ve diferencia en el ángulo de tinción de <i>cordina</i> .....	48
Fig.36 Los embriones inyectados con mayor cantidad de morfolido contra <i>atrx14</i> presentan un fenotipo ventralizante suave y alteraciones en la tinción de <i>no tail</i> .....	48
Fig.37 Estrategia de clonación del transcrito de <i>atrx14</i> .....	49

Fig.38 Supervivencia de embriones inyectados con ARN de <i>atrx14</i> .....	50
Fig.39 Porcentaje de embriones anormales de acuerdo a la cantidad de ARN inyectada por embrión.....	51
Fig.40. Fenotipo de los embriones inyectados con ARN de <i>atrx14</i> durante la epibolia .....	51
Fig.41 Fenotipos observados en embriones inyectados con 700pg de ARNm de <i>atrx14</i> .....	52
Fig.42 Fenotipos observados en embriones de 24 horas inyectados con 800pg de ARNm de <i>atrx14</i> .....	52
Fig.43. Mutantes en genes de la especificación dorsoventral que contribuyen a la parte dorsal tienen fenotipos ventralizantes .....	55
Fig.44. Morfantes de <i>follistatin-like 1/2</i> y la sobreexpresión de <i>bmp4</i> generan una extensión en el marcador de <i>no tail</i> a las 24 horas .....	56
Fig.45 Morfantes o mutantes con fenotipos similares al de la morfante <i>atrx14</i> en la expresión de <i>no tail</i> .....	57
Fig.46 La expresión de una proteína dominante negativa de CiclinaH (CiclinaH <sup>DN</sup> ) también genera retraso en el desarrollo y alteraciones en la formación del ojo.....	58
Fig.47 Embriones mutantes para Squint presentan alteraciones en la formación de los ojos.....	59
Fig.48 La sobreexpresión de Wnt8a también está asociada a defectos en la formación de los ojos y el mesodermo axial.....	60
Fig.49 La sobreexpresión de $\beta$ -catenina 1 genera anoftalmía .....	60
Tabla 1. Identidad global y por dominios de las proteínas de pez cebra Atrx5 (DrAtrx5) y Atrx14 (DrAtrx14) con la proteína ATRX de humano (hATRX). .....	18
Tabla 2. Comparación del porcentaje de los distintos fenotipos de expresión de <i>no tail</i> .....	47



## NOMENCLATURA DE GENES Y PROTEÍNAS

La nomenclatura para los genes y las proteínas que se utiliza en este trabajo está de acuerdo a las normas establecidas para cada uno de los organismos. Aunque para cada organismo existen excepciones, las reglas generales para la nomenclatura de genes y proteínas son las siguientes:

### **Humano (*Homo sapiens*):**

\*Genes: Tanto el símbolo del gen como el nombre oficial son los aprobados por el "HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC)". Los nombres de genes generalmente se escriben en itálicas y con letras mayúsculas.

\*Proteínas: Generalmente el símbolo y nombre es igual al del gen, pero no se escriben en itálicas. Todas las letras son mayúsculas.

Sitio Web con información de las reglas de nomenclatura y los símbolos de genes humanos:  
<http://www.genenames.org/>

### **Ratón (*Mus musculus*):**

\*Genes: Los símbolos de nombres de genes deberán escribirse en itálicas y comenzar con una letra mayúscula (no un número), seguido por todas las demás letras o números en minúsculas.

\*Proteínas: Los símbolos para nombrar las proteínas utilizan exclusivamente letras mayúsculas y no se escriben en itálicas.

Información en la página Web:

<http://www.informatics.jax.org/mgihome/nomen/gene.shtml#ps>

### **Pez cebra (*Danio rerio*):**

\*Genes: Los nombres completos de genes se escriben en minúsculas e itálicas; los símbolos de genes deben llevar 3 o más letras minúsculas también en itálicas.

\*Proteínas: El símbolo de la proteína es igual al símbolo de su gen, pero no se escribe en itálicas y la primera letra deberá escribirse en mayúsculas.

Información en la página Web:

<https://wiki.zfin.org/display/general/ZFIN+Zebrafish+Nomenclature+Guidelines#ZFINZebrafishNomenclatureGuidelines-2>

**Nota:** Los símbolos y nombres de los genes y proteínas caracterizados en este trabajo fueron asignados por su homología y por el cromosoma dónde se encontraron. No son símbolos oficiales y no han sido sometidos a revisión.

## RESUMEN

ATRX es una proteína remodeladora de la cromatina cuya función durante el desarrollo embrionario temprano no está bien definida. Su participación es evidente por los efectos que tienen las mutaciones en el gen que la codifica, causantes de un síndrome en humanos que se caracteriza por retraso mental, anomalías esqueléticas y urogenitales, y alfa talasemia. La abolición de ATRX es letal en ratón y el aumento de sus niveles provoca reabsorción, retraso en el desarrollo o anomalías en la cabeza de los embriones. En el pez cebra, nuestro modelo de estudio, el transcrito de *Atrx* se localiza de manera asimétrica desde muy temprano en el desarrollo, concentrándose en un lado del embrión. Se conocen pocos transcritos con un patrón de distribución similar a éste y corresponden a genes involucrados en la especificación del eje dorsoventral. El objetivo del proyecto fue elucidar si *Atrx* participa en esta vía. Para ello se hicieron experimentos de pérdida de función utilizando morfolidos como herramienta. Los morfolidos son oligonucleótidos antisentido que inhiben la traducción de los transcritos a los cuales son complementarios. La inyección de embriones con un morfolino específico para *Atrx* produjo un fenotipo ligeramente ventralizante, caracterizado por la expansión de tejidos ventrales, como la sangre, y la disminución de tejidos dorsales, como el neuroectodermo. La tinción del marcador dorsal *cordina* presentó una tendencia a disminuir en embriones inyectados con el morfolino específico de *Atrx*. La tinción del marcador *no tail* demostró que la notocorda no se formaba bien en estos mismos embriones. La evidencia anterior apunta a que *Atrx* tiene un papel en la especificación del eje dorsoventral durante el desarrollo embrionario temprano del pez cebra.

## INTRODUCCIÓN

### **I. ATRX**

#### ***1a. -ATRX, su papel en la estructura y dinámica de la cromatina y su influencia en la expresión de genes.***

El gen *ATRX* humano comprende cerca de 300kb de DNA genómico y se encuentra localizado en el cromosoma X banda q13.3 (Garrick, 2004). La proteína para la cual codifica, ATRX, tiene 2492 aminoácidos, es nuclear y contiene los siguientes dominios:

En la parte amino terminal se encuentra un dominio compuesto cuya conformación se ha encontrado, además de en ATRX, en las ADN metiltransferasas 3A, 3B y 3L, razón por la cual recibe el nombre de ADD (ATRX-DNMT3-DNMT3L) [Fig. 1, arriba] (Argentaro et al., 2007). Este dominio se conforma por un dedo de zinc tipo GATA, que coordina un ion de zinc y generalmente está asociado con unión a ADN o a cromatina; un dedo de zinc tipo PHD (Argentaro et al., 2007), identificado en otras proteínas como un módulo de unión a la histona H3 (Mansfield et al., 2011) que también coordina dos iones de zinc; y una alfa hélice C-terminal. Se ha demostrado que, en ensayos *in vitro*, este dominio reconoce la combinación de dos marcas: La lisina 4 sin modificación de la histona H3 y la lisina 9 trimetilada también de la histona H3. Ésta última generalmente asociada a un estado represivo de la cromatina (Dhayalan et al., 2011; Iwase et al., 2011). *In vivo*, se ha visto que esta combinación de marcas es necesaria para la localización de ATRX en la cromatina (Eustermann et al., 2011).

En la parte carboxilo de ATRX se localiza un dominio de Helicasa/ATPasa [Fig.1, arriba] que la identifica como miembro de la subfamilia de remodeladores de la cromatina llamada SNF2 (Gibbons et al., 2000). Se ha visto que proteínas pertenecientes a esta familia forman grandes complejos y usan la hidrólisis de ATP para desestabilizar las interacciones ADN-histonas (Pazin & Kadonaga, 1997). *In vitro*, ATRX posee actividad de ATPasa, que es estimulada por ADN o nucleosomas (Xue et al., 2003). Experimentalmente se ha comprobado que mutaciones de cambio de aminoácido en el dominio de Helicasa/ATPasa atenúan la actividad de ATPasa de esta proteína (Iwase et al., 2011; Tang et al., 2004).

ATRX fue originalmente identificada debido a que mutaciones en el gen que la codifica causan el síndrome de Alfa Talasemia y Retraso mental ligado al cromosoma X, de ahí su nombre (Argentaro et al., 2007). Existe gran variabilidad en el fenotipo de la enfermedad, sin embargo, entre las características principales están: retraso mental de moderado a severo (95% de los casos), dimorfismo facial (>90%), fallas psicomotoras (95%), anormalidades esqueléticas (90%), limitaciones en el habla (95%), anormalidades urogenitales (80%), microcefalia (75%), convulsiones (30%), defectos en la visión (23%), alfa talasemia (90%, con distinta severidad) (Gibbons, 2006; Medina et al., 2009) y dificultad para deglutir (85%) (Bérubé et al., 2005). La mayoría de las mutaciones responsables del síndrome de ATRX se localiza dentro de alguno de los dominios, que están altamente conservados (Gibbons et al., 2008).

El gen *ATRX* codifica para al menos 2 isoformas predominantes de la proteína, una completa, de 2492 aminoácidos que contiene los 2 dominios (tanto ADD como el motivo Helicasa/ATPasa) y una isoforma trunca (*ATRxt*) que, tanto en humano como en ratón, se produce al no removerse el intrón 11 del transcrito primario y utiliza una señal poli(A) que se encuentra codificada en el

mismo intrón. Esta isoforma sólo contiene el dominio ADD [Fig. 1, abajo]. Dada esta diferencia es poco probable que sea un equivalente funcional de la proteína completa. Se sabe que ATRXt humana se expresa en una gran variedad de tejidos, los cuales también expresan a la isoforma completa. Sin embargo, su función se desconoce hasta la fecha (Garrick 2004).

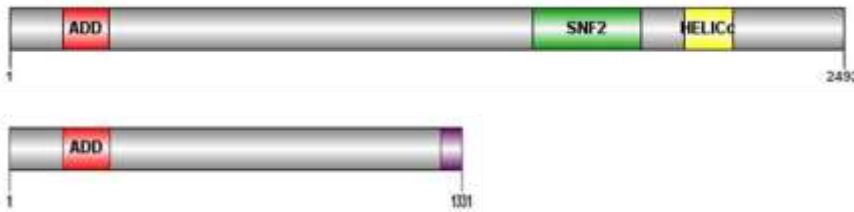


Fig. 1. Esquema de ATRX y ATRXt. Arriba: La proteína ATRX en humanos tiene 2492 aminoácidos, está conformada por el dominio ADD en la parte amino terminal. En el carboxilo tiene un dominio SNF2 que la identifica como miembro de esta familia y un motivo de helicasa. La proteína pesa alrededor de 280kDa. Abajo: isoforma trunca (ATRXt) con un peso molecular de alrededor de 200 kDa, que se origina al no removerse el intrón 11 y usa una señal poli(A) intrónica. La región que contiene parte del intrón 11 en ATRXt está indicada en morado.

Los motivos en esta proteína sugieren que ATRX podría funcionar como un regulador de la expresión génica, probablemente teniendo un efecto sobre la estructura de la cromatina (Garrick, 2004). La asociación de mutaciones en ATRX con la reducción en la síntesis de alfa globina en los pacientes con el síndrome de ATRX sugiere que esta proteína tiene un papel en la regulación de la expresión del gen de alfa globina. Sin embargo, la pleiotropía del síndrome hace probable que ATRX también participe en la regulación de otros genes (Wong et al., 2010).

Algunos datos que evidencian su función como proteína remodeladora de la cromatina son los siguientes; *in vitro*, un complejo que contiene a la proteína ATRX cambia el patrón de digestión de DNasa I en los sitios de entrada al nucleosoma solamente en presencia de ATP (Xue et al., 2003). Además, se sabe que la falta de ATRX también provoca alteraciones en el patrón de metilación del ADN en secuencias repetidas como ADN ribosomal (ADNr), secuencias repetidas subteloméricas y otras en heterocromatina (Gibbons et al., 2000).

Recientemente se encontró que tanto ATRX humana como ATRX de ratón, interactúan con secuencias que tienen un número variable de repetidos en tándem (conocidos como VNTRs por sus siglas en inglés "variable nucleotide tandem repeats"). Estas secuencias son ricas en guaninas, la mayoría con alta probabilidad de formar una estructura conocida como G4 (o cuádruplex de guaninas) y se comprobó que ATRX puede unirse a estas estructuras G4 *in vitro*. Este tipo de secuencias repetidas generalmente han estado asociadas a regiones teloméricas, subteloméricas y ADNr; sin embargo, en este estudio localizan varias en cuerpos de genes y regiones intergénicas. La disregulación de ATRX produce cambios en la expresión de algunos de estos genes y, de manera interesante, esta alteración en la expresión está directamente relacionada al número de repetidos en la secuencia. Esto daría una explicación al por qué individuos con mutaciones idénticas en ATRX tienen rangos variables de alfa talasemia y otros fenotipos (Law et al., 2010).

Se ha visto que ATRX tiene un papel importante en la cohesión de cromátidas hermanas durante la mitosis y se requiere para la segregación normal en cultivos de células HeLa y neuroprogenitores de ratón (células neuroepiteliales) (Ritchie et al., 2008). Además, se sabe que tiene un papel en el mantenimiento de la heterocromatina en el cromosoma X inactivo de mamíferos, pues la ablación

condicional del gen provoca que se pierda la inactivación del cromosoma X paterno (Baumann & De La Fuente, 2009).

### ***Ib.-ATRX y su papel en el desarrollo embrionario de vertebrados***

Actualmente se sabe muy poco sobre el papel preciso de la proteína durante el desarrollo de los vertebrados. El primer enfoque para dilucidar su función fue la sobreexpresión del gen *Atrx* en ratones mediante un transgen. Las líneas de ratones que lo expresaban en la mayor parte de los tejidos examinados también eran aquellas que producían camadas mucho más pequeñas, que tenían un alto porcentaje de muerte perinatal, y cuyos embriones presentaban, en distintos estadios del desarrollo, reabsorciones y retrasos o anormalidades que incluían morfología anormal de la cabeza y defectos en el tubo neural. Los animales que sobreviven hasta adultos tienen un desorden craneofacial leve que es notorio como un hocico corto y ancho, además, algunos presentan convulsiones epilépticas y conductas compulsivas como rascarse obsesivamente, a veces hasta el punto en que tienen que ser sacrificados (Bérubé et al., 2002).

Es notorio que este fenotipo recapitula en cierto grado algunos de los fenotipos encontrados en las personas con síndrome ATRX. Esto sugiere que la dosis de la proteína, más que su presencia o ausencia, es la responsable del fenotipo. Lo cual concuerda con el hecho de que hasta el momento no se conocen mutaciones en el síndrome que abatan por completo el nivel de proteína. Algunas mutaciones producen codones de paro prematuros y se pensaba que eran nulas; sin embargo, ahora se sabe que sí producen proteína completa, aunque en menor cantidad (Garrick et al., 2006; Gibbons et al., 2008; Bérubé et al., 2005). Al parecer en estos casos sucede un procesamiento alternativo del ARN mensajero de *ATRX* que excluye la región que contiene la mutación (Gibbons et al., 2008).

Por otra parte, en el trabajo de Garrick y colaboradores, 2006, se buscó hacer células troncales embrionarias nulas para ATRX a través de recombinación homóloga para después conseguir ratones mutantes; sin embargo, no se logró obtener ninguna clona. Esto sugiere una función muy temprana en el desarrollo. Es por ello que siguieron una estrategia de eliminación condicional utilizando el sistema de Cre-LoxP. Las células troncales embrionarias nulas para ATRX (*ATRX*<sup>-</sup>) pueden mantenerse en cultivo pero su crecimiento es mucho más lento que las células *ATRX*<sup>+</sup>. En este trabajo comprobaron que esto no es debido a un defecto en el ciclo celular o a una mayor inducción de apoptosis. Aunque no pueden encontrar la causa exacta, proponen que el retraso en el crecimiento se debe a que estas células se diferencian espontáneamente. Finalmente, concluyen que ATRX es importante para el crecimiento de las células troncales embrionarias.

Para investigar el papel de ATRX durante el desarrollo de ratón siguen la misma estrategia de eliminación condicional, donde la recombinasa Cre está activa desde la etapa de 16 células (mórula). Sin embargo, la abolición de ATRX en el desarrollo embrionario es letal, pues no nacen ratones machos con este genotipo. Los embriones mueren entre los 7.5 y 9.5 dpc (días post-coito) debido a un defecto en la formación del trofoblasto que es aparente desde los 7.5 dpc (Garrick et al., 2006). Sin embargo, en este trabajo no se caracterizó a detalle el fenotipo en los tejidos embrionarios.

Se sabe que el 95% de los pacientes con el síndrome tienen retraso mental. Al observar el patrón de expresión normal de ATRX en el cerebro anterior de ratón es notable que ésta es mucho mayor en las neuronas completamente diferenciadas en comparación con los progenitores. Tratando de

esquivar el problema de letalidad debido a defectos en tejidos extraembrionarios, se eliminó la expresión de *Atrx* en ratones únicamente en esta parte del cerebro.

Los ratones machos mutantes nacen más pequeños y no succionan bien, muriendo entre las primeras 24 a 48 horas después de nacer. La pérdida de ATRX en el cerebro anterior reduce su tamaño y causa hipocelularidad en el neo córtex y el hipocampo. Esta hipocelularidad denota mayor apoptosis de células durante la corticogénesis. En conclusión, ATRX es importante para la supervivencia de neuroprogenitores que han comenzado a diferenciarse (Bérubé et al., 2005).

Otra característica del síndrome de ATRX es que algunos pacientes presentan anormalidades en la visión. Los problemas más comunes presentados son estrabismo, miopía y atrofia del nervio óptico (Medina et al., 2009; Gibbons, 2006). Durante el desarrollo embrionario de ratón, *Atrx* se expresa en todos los tipos celulares de la retina periférica, exceptuando los conos. La inactivación de *Atrx* en esta región conlleva a la pérdida de dos tipos de neuronas: las células amacrinas y las células horizontales. Esta pérdida no se debe a un desorden en la especificación de los subtipos de neuronas, sino a un defecto en la supervivencia de estas interneuronas durante el periodo posnatal una vez que están diferenciadas. Los ratones mutantes también presentan defectos en la función de la retina, lo que fue probado a través de electroretinografías (Medina et al., 2009).

La expresión de *Atrx* durante el desarrollo embrionario es muy extendida. Intentos por entender su función en el desarrollo del organismo o solamente en el cerebro anterior sugieren un papel importante para ATRX tanto en células troncales embriónicas como en células diferenciadas. Sin embargo, los estudios funcionales se han dificultado debido a la letalidad asociada con la ablación ubicua o restringida de este gen (Medina et al., 2009).

La evidencia anterior sugiere que ATRX participa en múltiples procesos y tiene un papel esencial durante el desarrollo embrionario, el cual aún no se comprende por completo. Es por esto que en el laboratorio se inició una línea de investigación enfocada a entender la función de esta proteína, utilizando como modelo al pez cebra.

## ***II.-El pez cebra***

### ***II.a- El pez cebra como modelo***

El pez cebra (*Danio rerio*) se ha utilizado frecuentemente como modelo para procesos durante el desarrollo embrionario dado que posee las siguientes ventajas: Se reproduce durante todo el año, las hembras pueden poner gran cantidad de huevos, que son fácilmente manipulables; la fertilización y el desarrollo son externos y el desarrollo es sincrónico; los embriones son grandes y transparentes, por lo tanto se observan y se pueden seguir fácilmente bajo el microscopio; su desarrollo es muy rápido, dentro de las primeras 24 horas ya se encuentran formados la mayor parte de los tejidos y primordios de los órganos; se puede hacer mutagénesis a gran escala, además de transgénicos; su genoma está casi completo; existen proyectos de mutagénesis y de patrones de expresión que abarcan una gran cantidad de genes; y se puede hacer diferenciación *in vitro* de ovocitos y células espermatogénicas, además de fertilización *in vitro* (<http://www.neuro.uoregon.edu/k12/zfk12.html>), lo que potencialmente permitiría abolir la expresión materna de genes.

Recientemente, se han desarrollado diversas metodologías para disminuir o eliminar la expresión de proteínas. Entre ellas el uso de morfolinós, ZFNs (“zinc-finger nucleases”), TALENs (“transcription activator like effector nucleases”) y CRISPRs (“clustered regulatory interspaced short palindromic repeats”) (Huang, et al., 2012; Hwang, et al., 2013; Gaj, et al., 2013). Los morfolinós son oligonucleótidos anti sentido similares al ADN y ARN, excepto porque tienen un anillo morfolino en vez de una ribosa, esto los hace resistentes a nucleasas [Fig.2]. Además, por su tamaño y su composición química, no disparan la respuesta inmune del organismo (Skromne & Prince, 2008).

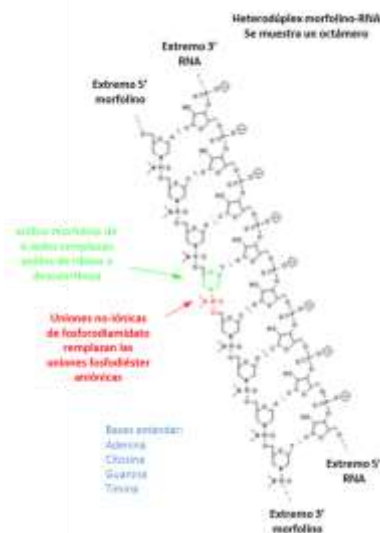


Fig.2 Esquema de un heterodúplex morfolino-ARN donde se muestran las características de los morfolinós. Imagen modificada de <http://files.genetools.com/Biocompare/>.

Los morfolinós pueden funcionar de dos formas dependiendo de su diseño:

Primero, si se encuentran en el 5'UTR o cerca del codón de inicio de la traducción funcionan bloqueando la traducción del ARNm. De esta forma, disminuyen la cantidad de proteína. Segundo, si el morfolino se diseña en un límite exón-intrón o intrón-exón pueden modificar el empalme normal (Skromne & Prince, 2008).

Las ZFNs son proteínas generadas de la fusión del dominio de corte de una endonucleasa inespecífica, con dedos de zinc. Un dedo de zinc consiste aproximadamente de 30 aminoácidos en la configuración  $\beta\beta\alpha$ . Aminoácidos en la superficie de la hélice  $\alpha$  contactan 3 pares de bases en el surco mayor del ADN con distintos niveles de selectividad. En base a eso, las ZFNs contienen arreglos de dedos de zinc con distintas especificidades ordenados especialmente para el reconocimiento de una determinada secuencia. Actualmente, se han diseñado dedos de zinc capaces de reconocer a cada uno de los 64 tripletes posibles. Una vez que la secuencia es reconocida por los dedos de zinc, el dominio de endonucleasa genera un corte en doble cadena que activa las vías de reparación del ADN. En el proceso de reparación pueden cometerse errores, introduciendo mutaciones en la secuencia (Gaj, et al., 2013).

Los TALENs consisten en una fusión de fragmentos de dos proteínas: El dominio de corte de una nucleasa y los dominios de unión a ADN de una proteína llamada TALE. Esta última proviene de una bacteria patógena de plantas del género *Xanthomonas* y contiene múltiples dominios repetidos de 33-35 aminoácidos en total. Cada uno de estos dominios tiene la capacidad de reconocer una sola base. Como las ZFNs, estos módulos de TALEs repetidos se ensamblan de

manera que reconozcan un sitio específico en el ADN e inducen un corte de doble cadena dirigido específicamente a este sitio, permitiendo de esa forma la modificación de la secuencia. A diferencia de las ZFNs, el reconocimiento de una sola base (y no tripletes) le confiere mayor flexibilidad a los TALENs. A pesar de eso, La clonación de los arreglos repetidos presenta un reto técnico muy elevado debido a la gran cantidad de secuencias repetidas idénticas y a lo laborioso del procedimiento (Gaj, et al., 2013).

CRISPR (“Clustered regularly interspaced short palindromic repeat”) es un sistema similar al ARN de interferencia que es comúnmente usado por bacterias y arqueas como una especie de sistema inmune adaptativo. Éste consiste en que en respuesta a un reto de tipo viral o por un plásmido, las bacterias y arqueas integran fragmentos cortos del ADN foráneo en su cromosoma, en un locus particular caracterizado por secuencias repetidas al que se le conoce como CRISPR (Wiedenheft, et al., 2012). Además de mantener el récord genético de los encuentros con ADN foráneo, este locus se transcribe. El transcrito primario se procesa en una librería de ARN pequeños conocidos como crARNs que contienen entonces las secuencias complementarias al ADN foráneo con que el organismo se ha encontrado previamente. Cada crARN se adjunta a un complejo (en el que se incluye la endonucleasa Cas9, que se encuentra en el mismo locus CRISPR) que patrulla el espacio intracelular y media la detección y destrucción de blancos con ADN foráneo (Wiedenheft, et al., 2012), este sistema se ha comparado comúnmente con los sistemas de mamíferos de interferencia por ARNs pequeños [Fig.3].

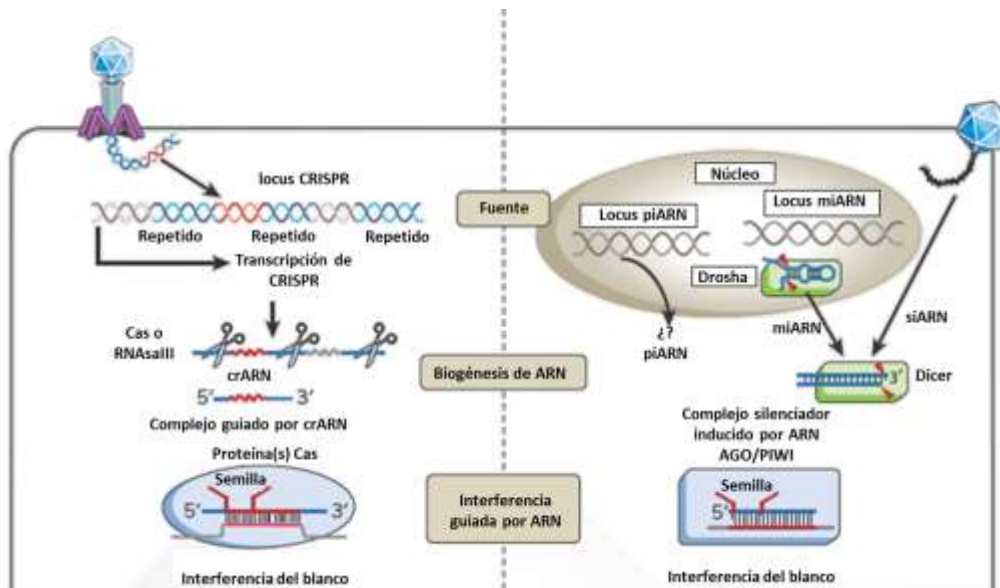


Fig.3 Similitudes y diferencias entre los sistemas de silenciamiento tipo CRISPR y el ARNi. Ambos sistemas reconocen precursores de ARNs largos que se procesan en fragmentos pequeños, los cuales actúan como guías específicas para los blancos de ácidos nucleicos complementarios. Sin embargo, la forma de procesamiento de estos ARN pequeños es distinta. Esta imagen fue tomada y modificada de Wiedenheft, et al., 2012.

A principios del 2013 el sistema se adaptó para la generación de mutaciones dirigidas en diversos organismos modelo eucariontes como células humanas, la mosca de la fruta y el pez cebra. Los crARN se modificaron para generar “ARN guías” que dirigen, de manera sitio específica, un corte de doble cadena en el ADN, utilizando para esto a la endonucleasa Cas9. Una vez hecho el corte en



doble cadena, el sistema de reparación del organismo puede generar inserciones o deleciones en el momento de reparar el daño, con lo que se generarían mutaciones (Hwang, et al., 2013).

Dado que los vertebrados comparten ciertas similitudes fundamentales, la generación de mutantes estables en el pez cebra puede proporcionar información importante sobre los genes cuyas funciones están conservadas en otros vertebrados, incluidos los humanos. De hecho, muchos fenotipos mutantes encontrados en el pez cebra se parecen a condiciones de enfermedades humanas y, en muchos casos, está claro que la similitud de estas anormalidades resulta de la inactivación de genes ortólogos en las dos especies. Métodos poderosos de biología celular como marcaje de células, trasplantes y microinyecciones permiten un detallado entendimiento de los fenotipos mutantes en el pez cebra. De esta manera, el análisis fenotípico del pez cebra puede proveer información funcional que es difícil de obtener en otras especies (Woods et al., 2000).

### ***II.b-El desarrollo del pez cebra***

De acuerdo a Kimmel y colaboradores, 1995, el desarrollo del pez cebra se puede dividir a grandes rasgos en 7 periodos: cigoto (0-45min), de división (45min-2hrs), blástula (2hrs.15min-5hrs.15min), gástrula (5hrs 15 min-10hrs), segmentación (10-24hrs), faríngrula (24-48hrs) y eclosión (48 -72hrs).

**\*Periodo de Cigoto:** El huevo recién fertilizado se encuentra en el periodo de cigoto hasta que ocurre la primera división celular (cerca de los 40 minutos después de la fertilización). El corion se infla y se separa del huevo. La fertilización activa los movimientos citoplásmicos, donde la parte citoplásmica que no formará parte del vitelo comienza a viajar hacia el polo animal, segregando lo que se conoce como el blastodisco [Fig.4 en 1 célula].

**\*Periodo de división celular:** Después de la formación de la primera célula comienzan las divisiones celulares que suceden aproximadamente cada 15 minutos. Estas divisiones son meroblásticas, es decir la célula se segmenta de manera incompleta pues el surco de división no penetra el vitelo, y los blastómeros o una porción de ellos permanecen interconectados a través de puentes citoplásmicos. Este periodo abarca las primeras 6 divisiones celulares (de 2 a 64 células). A partir de este periodo y hasta poco antes del comienzo de la epibolia (ya en el periodo de blástula) las divisiones celulares hacen que se vaya formando una especie de montículo de células sobre el vitelo [Fig.4, en 2 y 4 células].

**\*Blástula:** Comienza a partir de que el embrión tiene alrededor de 128 células y continúa hasta el comienzo de la gastrulación. Es durante esta etapa, y aproximadamente cuando el embrión está cerca de 1000 células cuando comienza a transcribirse el genoma del embrión, lo que se llama transición de la blástula media (MBT por sus siglas en inglés). La fila marginal de blastómeros (la que está justo por encima del vitelo) tiene una característica especial, pues ha permanecido conectada a través de puentes citoplásmicos con el vitelo durante la etapa de división. Paralelamente a la transición de la blástula media, estas células liberan su citoplasma y núcleo al vitelo formando lo que se conoce como capa sincitial de vitelo (YSL por sus siglas en inglés) y se encargan de regular los movimientos celulares durante la epibolia.

Después de esto, ninguno de los blastómeros tiene puentes citoplásmicos a otras células más que al momento de la división celular. Los núcleos que se encuentran en la capa sincitial del vitelo

continúan dividiéndose por aproximadamente 3 ciclos. Minutos después de la transición de la blástula media, el eje animal-vegetal comienza a acortarse pues el blastodisco se comprime sobre el vitelo. Eventualmente, el embrión toma una forma elipsoidal visto lateralmente, es por ello que este estadio se conoce como oblongo [Fig.4]. Conforme el eje animal-vegetal se acorta, se genera un embrión en blástula tardía con forma de esfera, donde la interfase entre la parte inferior del blastodisco y la parte superior del vitelo es plana (o casi plana) [Fig.4].

Aproximadamente 40 minutos después de que el embrión alcanzó el estadio de esfera comienza el proceso conocido como epibolia, que consiste en el adelgazamiento de la capa y migración de las células del blastodisco sobre y a través del vitelo, envolviéndolo. Este proceso involucra movimientos de intercalación entre algunas células del blastodisco; y se define de acuerdo a qué tanto han cubierto las células al vitelo, en porcentaje, de acuerdo al radio total. Este periodo termina en la etapa de 30% epibolia, cuando se produce un blastodermo de grosor uniforme [Fig.4, 30% epibolia].

**\*Gástrula:** Continúa la epibolia. Cuando el embrión se encuentra alrededor del 50% de epibolia aparece la estructura conocida como anillo germinal (por su apariencia si se le ve desde el polo animal). Movimientos de involución producen el anillo germinal, que se origina al formarse las dos capas germinales: la capa superior, el epiblasto (que formará el ectodermo), cuyas células continúan en movimiento hacia la capa inferior, el hipoblasto (que formará el mesodermo y el endodermo). Esto marca el inicio de la gastrulación. Poco después, movimientos de convergencia producen la acumulación local de células en una posición del anillo germinal al margen del blastodermo, llamado el escudo embrionario, que marca el futuro lado dorsal del embrión.

Durante estos eventos la epibolia se detiene temporalmente, continúa poco después de la formación del escudo y el margen del blastodermo continúa avanzando hasta cubrir por completo el vitelo, al mismo tiempo el escudo se extiende hacia el polo animal, engrosando el blastodermo en lo que será el lado dorsal del embrión. Pocos minutos después de que el vitelo queda cubierto, lo que corresponderá a la parte caudal del embrión desarrolla una protuberancia distintiva, conocida como el primordio de la cola o "tailbud", cuya progenie contribuirá significativamente a la cola [Fig.4, escudo, 75% epibolia y bud].

**\*Segmentación:** Este periodo recibe su nombre principalmente debido al desarrollo de los somitas. Los somitas son componentes no diferenciados del mesodermo que aparecen como segmentos de manera secuencial en el tronco y la cola, desarrollándose primero los somitas anteriores y después los posteriores. La mayoría de las células interiores de cada somita se desarrollará como un miotomo o segmento muscular. Los somitas también derivarán en esclerotomo, que dará lugar al cartílago. Durante este periodo se vuelven visibles los rudimentos de los órganos primarios como el tubo neural y el primordio del cerebro, que también durante este periodo comienza su segmentación. Ya se pueden diferenciar con facilidad los ductos pronéfricos y comienza el desarrollo de los riñones, también aparece el primordio del ojo y de la vesícula ótica. Se dan las primeras contracciones musculares. Es notable el desarrollo y la extensión de la cola [Fig.4, 3 somitas, 6 somitas, 18 somitas].

**\*Farínula:** Este periodo abarca de las 24 a las 48 horas a partir de la fertilización. Durante éste se desarrollan los arcos faríngeales que formarán las mandíbulas y agallas; se estira la cabeza; se desarrolla la vesícula ótica; las aletas pectorales comienzan a formarse y se desarrollan a lo largo del periodo. Las células de pigmentación se diferencian, siendo las primeras las del epitelio de la retina y los melanocitos de la cresta neural. Se forma el sistema circulatorio y el corazón empieza a

latir justo al inicio de este periodo, formado por cámaras bien definidas. Se desarrolla la sensibilidad táctil [Fig.4, 24 horas].

**\*Eclósión:** Para este periodo la morfogénesis de los rudimentos de los órganos están casi completamente formados a excepción del intestino y órganos asociados. Las aletas y el sistema circulatorio continúan su desarrollo y se forma la mandíbula y la apertura de la boca del embrión. Los embriones eclosionan entre los 3 ó 4 días de desarrollo.

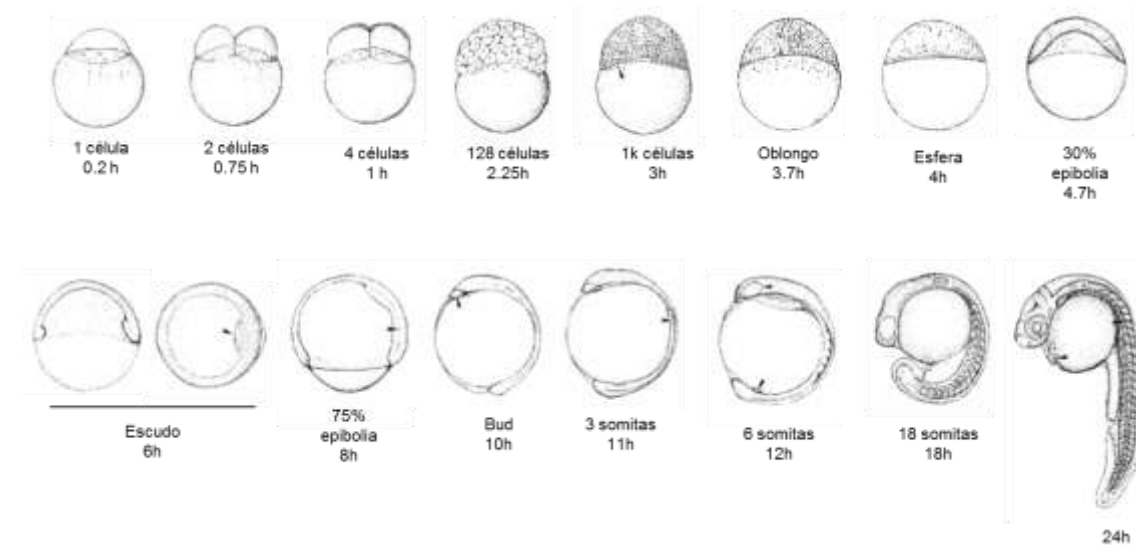


Fig. 4. Esquema de estadios seleccionados del desarrollo de pez cebra. En los estadios tempranos el polo animal está hacia arriba excepto para la vista desde el polo animal en la etapa de escudo (el de la derecha). En etapas posteriores la parte anterior está hacia arriba. Después de la etapa de escudo, las vistas son del lado izquierdo del embrión, pero antes de que aparezca el escudo no se puede determinar por observación qué lado es cuál. Se omitió la pigmentación. Las cabezas de flecha indican la aparición temprana de algunas características claves en los siguientes estadios: 1k-células: La capa sincitial del vitelo. Escudo: la formación del escudo. 75% epibolia: Hendidura de Brachet (divide el hipoblasto del epiblasto). 3 somitas: el tercer somita. 6 somitas: primordio del ojo. Imagen modificada de Kimmel et al., 1995.

### ***II.c-La especificación del eje dorsoventral***

En el desarrollo embrionario del pez cebra la especificación de ejes es uno de los procesos más importantes y más tempranos, comenzando con la diferenciación del polo animal y el polo vegetal, que inicia desde la ovogénesis. Después comienza la especificación del eje dorsoventral, que se puede distinguir morfológicamente en la etapa de escudo, en la cual, como se mencionó anteriormente, el futuro lado dorsal del embrión presenta una acumulación de células debida a los movimientos de convergencia que se dan durante la gastrulación. Sin embargo, molecularmente es posible diferenciar el lado dorsal del ventral desde la transición de la blástula media (Thisse, et al., 2011). A continuación se describe el proceso de especificación dorsoventral:

Se sabe que la parte vegetal del vitelo contiene toda la información necesaria para establecer la polaridad dorsoventral y la región anterior del embrión, pues al remover este segmento del vitelo solamente se obtienen embriones completamente ventralizados (Ober & Schulte-Merker, 1999). Es por ello que se especuló la existencia de un factor “dorsalizante” que se transporta de manera asimétrica en el vitelo hacia el futuro lado dorsal. Además se encontró que el transporte de este

factor depende de microtúbulos, pues el tratamiento temprano con nocodazol ocasiona también la pérdida de estructuras dorsales (Langdon & Mullins, 2011; Schier & Talbot, 2005).

Se propone que la proteína Wnt8a materna es este factor [Fig.3a], pues se expresa de manera asimétrica en el vitelo desde el estadio de dos células y su falta también genera fenotipos ventralizantes. Hipotéticamente, la translocación asimétrica de Wnt8a establece la parte dorsal del embrión a través de la activación de la vía de Wnt, que tiene como resultado la localización nuclear de la proteína  $\beta$ -catenina cerca de la transición de la blástula media solamente en la parte dorsal [Fig. 5a y b] (Thisse et al., 2011). En una fracción pequeña de embriones (15%) se puede observar la localización nuclear de  $\beta$ -catenina desde las 128 células (Dougan, et al., 2003). Sea temprana o tardía su translocación al núcleo, ésta es la primera señal conocida de polaridad dorsoventral en el embrión y se requiere para el establecimiento de la región dorsal (Langdon & Mullins, 2011).

Existen dos genes que codifican para proteínas  $\beta$ -catenina cuyo transcrito se deposita de manera materna,  $\beta$ -catenina1 y 2. Se sabe que en la ausencia de  $\beta$ -catenina2 materna los embriones tienen fenotipos ventralizantes muy severos. La activación de la vía de Wnt y la translocación nuclear de  $\beta$ -catenina2 (únicamente en la región que será la parte dorsal del embrión) resulta en la expresión de genes requeridos para la formación o función del organizador dorsal, un centro señalizador que al trasplantarse a cualquier otra región en el pez es suficiente para establecer un segundo eje. Entre los genes activados por  $\beta$ -catenina se encuentran *bozozok*, *cordina* y *gooseoid* [Fig.5b y 5c] (Langdon & Mullins, 2011; Schier, 2001), que se describen a continuación.

Bozozok es un represor transcripcional, cuyos blancos incluyen principalmente factores que promueven la ventralización [Fig.5c, ampliación], entre ellos a la proteína Bmp2b que pertenece a las proteínas conocidas como BMPs (“Bone Morphogenetic Proteins”). Las BMPs son ligandos secretados, miembros de la familia de señalizadores TGF- $\beta$  que regulan la expresión de genes requeridos para la especificación ventral [Fig. 6] (Langdon & Mullins, 2011). (Schier & Talbot, 2005; Langdon & Mullins, 2011).

El represor Bozozok además activa de manera indirecta a Cordina, un factor dorsalizante que actúa de manera no redundante en el establecimiento del patrón dorso-ventral en el embrión. Cordina se une a las proteínas BMPs, inhibiendo así su habilidad de asociarse a sus receptores e iniciar la señalización para establecer destinos ventrales [Fig. 5c].

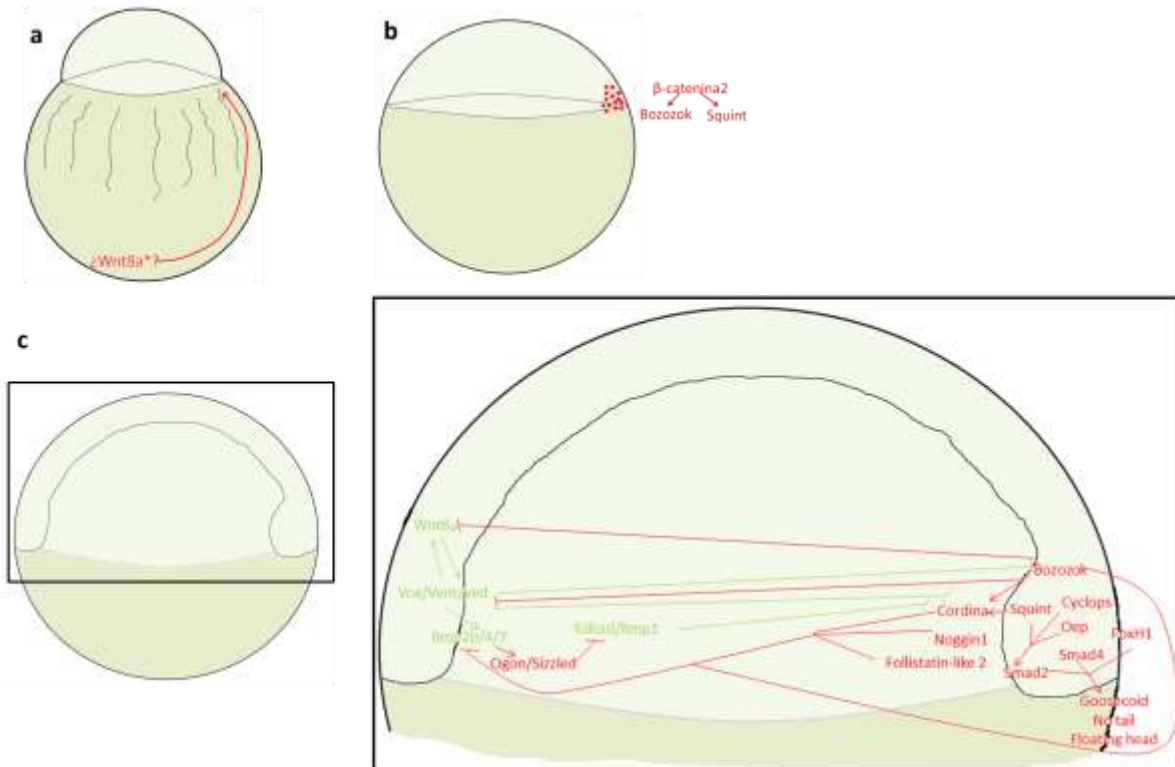


Fig.5 Especificación del eje dorsoventral en el pez cebra. Las flechas representan regulación positiva, mientras que las barras tipo T representan regulación negativa. (a) Embrión de una célula donde se ve al determinante dorsal subiendo hacia el polo animal de manera asimétrica, se especula que es Wnt8a materno. (b) Embrión durante la transición de la blástula media,  $\beta$ -catenina se transloca a los núcleos del lado dorsal y activa la transcripción de boozok y squint. (c) Embrión en 50% de epibolia, en la ampliificación se muestra el resto de la vía explicada en el texto. En rojo están las proteínas promotoras de destinos dorsales, mientras que en verde están proteínas promotoras de destinos ventrales. Wnt8a\* denota la proteína de origen materno, mientras que Wnt8a denota a la proteína de origen cigótico.

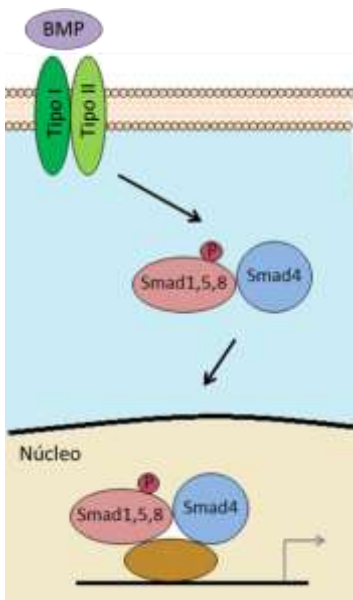


Fig.6 Señalización por BMP. Las proteínas BMPs se unen a un heterotetrámero compuesto de dos receptores tipo I y dos receptores tipo II. Los receptores tipo II fosforilan a los receptores tipo I, activándolos. Estos receptores activos fosforilan a factores transcripcionales conocidos como Smad reguladores (que incluyen a Smad 1,5 y 8), que a su vez se asocian a una proteína coactivadora conocida como co-Smad (Smad4) y se translocan al núcleo para regular la expresión de un grupo de genes. Imagen modificada de Kimelman, D., 2006.

Cordina también es activada de manera indirecta por Squint [Fig.5c], un factor tipo Nodal cuya señalización se requiere tanto para la formación del organizador y el escudo, como más adelante en el desarrollo para la formación del mesendodermo (Langdon & Mullins, 2011). Squint y Cyclops son dos proteínas tipo Nodal que señalizan a través del co-receptor Oep y receptores tipo TGF- $\beta$  para la activación de genes de la vía de Nodal [Fig.7a], entre ellos *gooseoid*, otro inhibidor de BMPs que actúa de manera independiente a Cordina. La expresión de *gooseoid*, y la de algunos otros genes en la vía de Nodal como *no tail*, requieren además del factor transcripcional FoxH1 [Fig.5c, Fig. 7], el cuál forma un complejo con la proteína Smad2 en su forma activa, es decir, fosforilada por el receptor tipo TGF- $\beta$  y Oep, y Smad4 para iniciar la expresión de estos genes. Una vez que comienza la epibolia, la expresión de *no tail* en la región ventral del embrión también es dependiente de las vías de BMP y Wnt [Fig.7b].

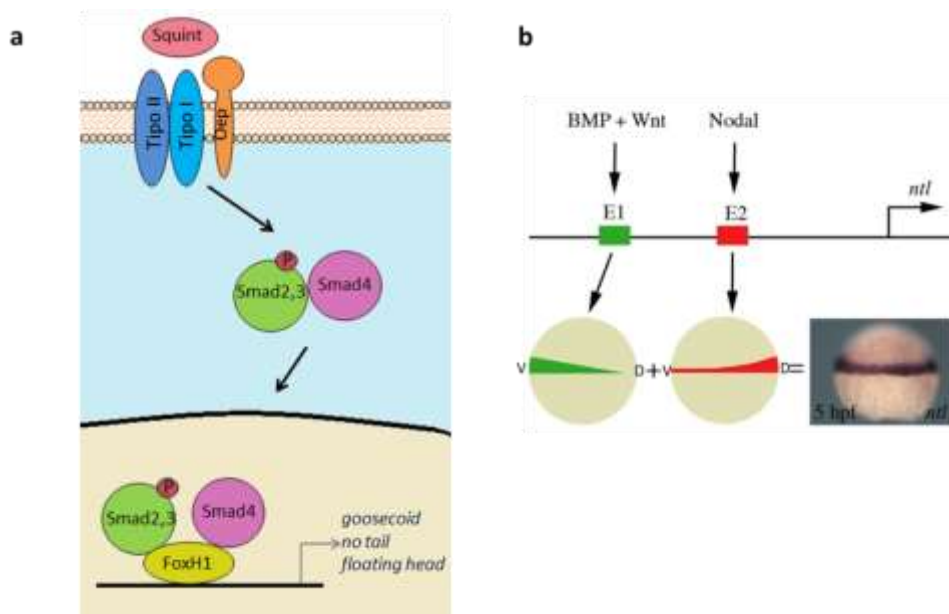


Fig.7 Componentes de la vía de Nodal, Wnt y BMP regulan positivamente la expresión de *no tail*. (a) Squint señala con ayuda de Oep la activación de Smad2, que al estar fosforilada es capaz de unirse a Smad4 y otros factores transcripcionales como FoxH1 para a ctivar genes dependientes de la vía de Nodal (Pogoda, et al., 2000). Imagen modificada de Kimelman, D., 2006 (b) El gen de *no tail* tiene 2 enhancers, uno regulado por la vía de Nodal que da lugar a la expresión de *no tail* en la parte dorsal del embrión, y otro regulado por la vía de BMP y Wnt, que da lugar a la expresión de *no tail* en la parte ventral del embrión. Figura tomada de Harvey et al., 2010.

Dos antagonistas de BMPs llamados Noggin1 y Follistatin-like 2 funcionan de manera redundante con Cordina para refinar el dominio de señalización de las BMPs [Fig.5c]. Igual que Cordina, éstos se unen directamente a los ligandos de BMP y bloquean su asociación con los receptores (Langdon & Mullins, 2011). Asimismo, Ogon/Sizzled es un miembro de la familia proteica de factores secretados relacionados con Frizzled. A pesar de que estos factores se reconocieron inicialmente como antagonistas de la señal de Wnt, Ogon/Sizzled parece ser un antagonista más de las señales ventralizantes de BMPs [Fig. 5c] (Schier & Talbot, 2005).

Al mismo tiempo que comienzan a expresarse los factores dorsalizantes en el organizador, también comienza la expresión de factores ventralizantes en el resto del embrión. Entre las

proteínas requeridas para el establecimiento de destinos ventrales se incluyen los ligandos de BMPs, Bmp2b y Bmp7, el receptor tipo I Alk8 y el factor transcripcional Smad5 (Schier & Talbot, 2005). El ligando Bmp4 también se requiere para la especificación de destinos ventrales, aunque su expresión es dependiente de Bmp2b y Bmp7a y por lo tanto es más tardía (Langdon & Mullins, 2011).

También existen factores ventralizantes cuya función es inhibir factores dorsalizantes. Por ejemplo, la proteasa Tolloid, que se encarga de inactivar al antagonista Cordinina (Langdon & Mullins, 2011; Schier & Talbot, 2005); también los factores de transcripción Vox/Vent/Ved son importantes para inhibir la expresión de genes dorsalizantes como *bozozok* y *cordinina* [Fig. 5c], además de mantener la expresión de *bmp2b* y *wnt8a* cigóticos durante la gastrulación. Por otro lado, Wnt8a también promueve, mediante una retroalimentación positiva, la expresión de *vox/vent/ved* para restringir el tamaño del organizador [Fig. 5c] (Langdon & Mullins, 2011).

El balance entre la expresión de los genes requeridos para la formación de tejidos ventrales y aquellos que promueven la formación de destinos dorsales genera la formación de un gradiente dorsoventral que resulta en el establecimiento de este eje.

## ANTECEDENTES

Durante mi tesis de licenciatura trabajé con Atrx en el pez cebra. Mediante análisis bioinformático encontré que la proteína ATRX humana (hATRX) tiene dos homólogos en pez cebra; uno en el cromosoma 5 (*atrx5*) y otro en el 14 (*atrx14*). El gen *atrx5* está conformado por 35 exones y la proteína para la cual codifica (Atrx5) tiene 1737 aminoácidos [Fig.8]. El gen *atrx14* está conformado por 33 exones y la proteína para la cual codifica (Atrx14) tiene 2013 aminoácidos [Fig.8]. De los dos, *atrx14* es el gen que codifica para la proteína con mayor identidad a la humana (45.31%) [Tabla 1]. La identidad de hATRX con Atrx5 sugiere que esta última está divergiendo (28.64%) [Tabla 1]. Sin embargo, todos los dominios están altamente conservados (con una identidad entre 58 y 70%) [Tabla 1].

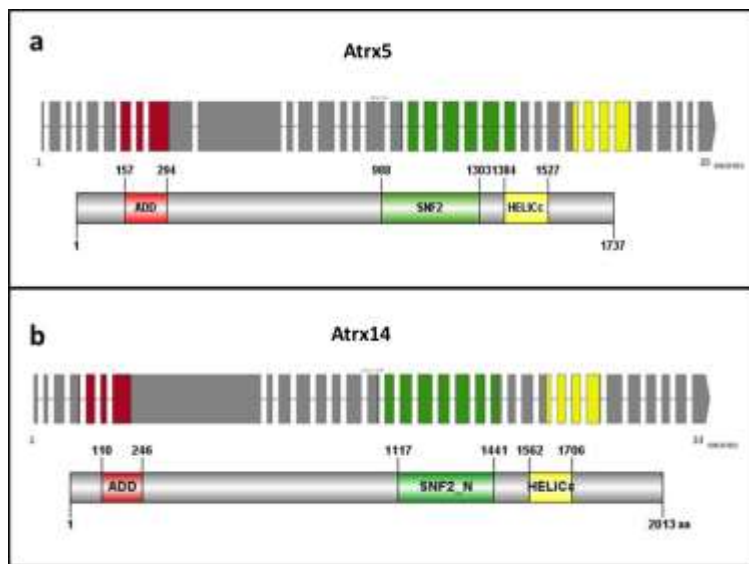


Fig.8 *Danio rerio* tiene 2 genes homólogos a ATRX humano. (a) Esquema del gen homólogo a ATRX en el cromosoma 5 (arriba) y la proteína para la cual codifica (abajo). (b). Esquema del gen homólogo a ATRX en el cromosoma 14 (arriba) y la proteína para la cual codifica (abajo). El código de colores ubica en los genes los dominios encontrados en las proteínas.

Nivel de comparación		hATRX vs DrAtrx5		hATRX vs DrAtrx14	
		Identidad	Idénticos + Similares	Identidad	idénticos + Similares
Global		28.64%	40.60%	45.31%	56.16%
Dominios	ADD	69.57%	85.50%	71.00%	81.88%
	SNF2	58.77%	70.76%	86.76%	95.07%
	HELICc	68.03%	80.95%	84.35%	89.79%

Tabla 1. Identidad global y por dominios de las proteínas de pez cebra Atrx5 (DrAtrx5) y Atrx14 (DrAtrx14) con la proteína ATRX de humano (hATRX). Idénticos + similares denota aquellos aminoácidos que además de los idénticos tienen propiedades fisicoquímicas similares.



Como parte del mismo trabajo caractericé el patrón de expresión temporal y espacial de ambos genes durante las primeras 24 horas de desarrollo del pez cebra. Mediante experimentos de RT-PCR determiné que ambos transcritos son de herencia materna dado que se encuentran desde la etapa de 1-4 células, cuándo aún no comienza a transcribirse el genoma del cigoto, y continúan hasta las 24 horas [Fig.9].

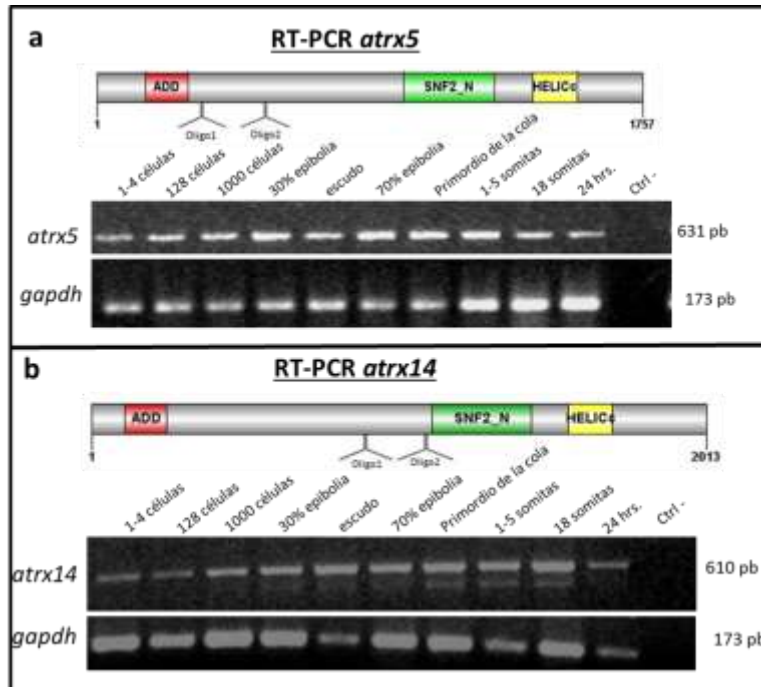


Fig.9 *atrx5* y *atrx14* son de herencia materna y se expresan en todos los estadios analizados del desarrollo embrionario. (a)Arriba: Esquema de *Atrx5* donde se muestra la localización de los oligonucleótidos utilizados para el RT-PCR. Abajo: RT-PCR *atrx5* en los distintos estadios, RT-PCR *gapdh* como control positivo. (b)Arriba: Esquema de *Atrx14* donde se muestra la localización de los oligonucleótidos utilizados para el RT-PCR. Abajo: RT-PCR *atrx14* en los distintos estadios y RT-PCR *gapdh* como control positivo. Ctrl- (control negativo).

Como se puede observar en las figuras 8 y 9, en el RT-PCR de *atrx14* se distinguen dos bandas, una de ellas es el producto esperado (610pb) y otra banda más pequeña que se clonó y secuenció, demostrando que se trata de una isoforma del transcrito de *atrx14*, la cual no contiene al exón 12 que se localiza entre los dominios ADD y SNF2 [Fig.10, arriba]. Es interesante mencionar que la traducción teórica de la secuencia eliminando el exón 12 reveló que se cambiaría el marco de lectura de la proteína produciendo un codón de paro y dejando únicamente el dominio ADD en una proteína teórica de 1,017 aminoácidos [Fig.10, abajo]. Una isoforma que sólo contiene este dominio ya está reportada tanto para ratón como para humano y se le conoce como ATRXt, aunque ésta se genera de forma distinta (debido a la inclusión del intrón 11). Todavía no se conoce la función específica de esta isoforma. Es interesante que en pez cebra este transcrito alterno comience a expresarse después de iniciarse la transcripción cigótica y deje de expresarse para las 24 horas.

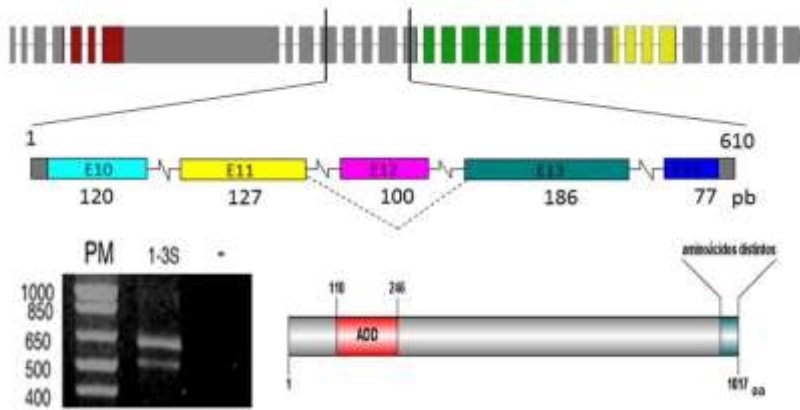


Fig.10 *atrx14* tiene al menos una isoforma alternativa. Arriba: Esquema de la región amplificada de la isoforma que no contiene el exón 12. La región de los oligonucleótidos se muestra en gris. Abajo izquierda: RT-PCR del estadio de 1-3 somitas donde se aprecia el doblete. Abajo derecha: Esquema de la proteína que teóricamente generaría este transcrito, en verde se muestra aquellos aminoácidos que no se encuentran en la proteína completa. PM: Peso molecular, (-) representa el control negativo.

Hibridaciones *in situ* de cada uno de los transcritos corroboraron que ambos eran de herencia materna y el ARN mensajero estaba presente durante las primeras 24 horas de desarrollo embrionario. Sin embargo, algo que nos llamó mucho la atención fue que durante las primeras divisiones celulares y hasta la transición de la blástula media, ambos transcritos se distribuyen en gradiente, es decir, se concentran más en un lado del embrión [Figs. 11a-d, 12a-d]. Una vez que comienza la transcripción cigótica, la expresión de ambos se vuelve homogénea hasta la somitogénesis temprana [Figs. 11e-f, 12e-m], un poco más tarde en la somitogénesis la expresión se va localizando en la región anterior del embrión, hasta que a las 24 horas ya se ve completamente restringido a esta región, abarcando principalmente el sistema nervioso central [Figs.11g, 12n-s]. A pesar de que este patrón es muy similar entre los dos genes, existen algunas diferencias sutiles, como el hecho de que el transcrito de *atrx14* se exprese en el extremo dorsal de la cola.

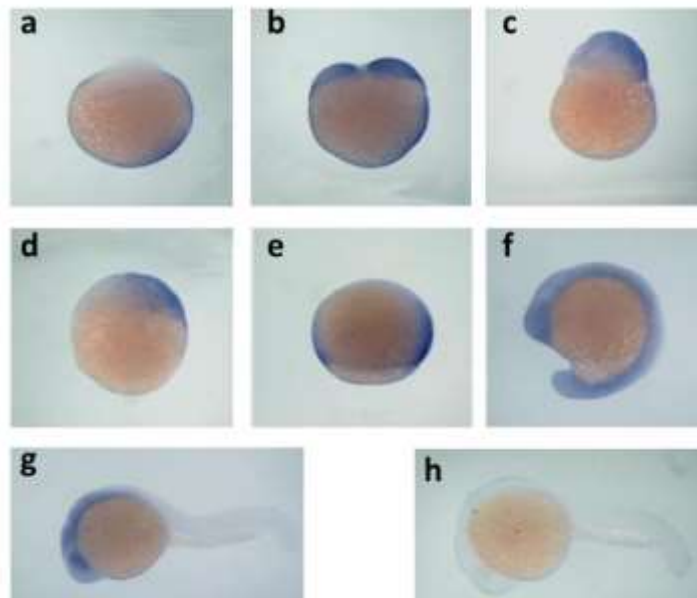


Fig.11 Hibridaciones *in situ* de *atrx5* en embriones completos durante el desarrollo de *Danio rerio*. (a-e)Vista lateral de los embriones con el polo animal en la parte superior; (f) Vista lateral izquierda con la parte anterior hacia arriba y la dorsal a la derecha; (g-h) Vista lateral de los embriones con el lado dorsal del embrión hacia arriba y la parte anterior a la izquierda. (a)Embrión de 1 célula; (b)

Embrión de 2 células; (c) Embrión de 128 células; (d) Embrión de 1000 células; (e) 75% epibolia; (f) 14somitas; (g-h) 24 horas; (h) Control de la sonda sentido.

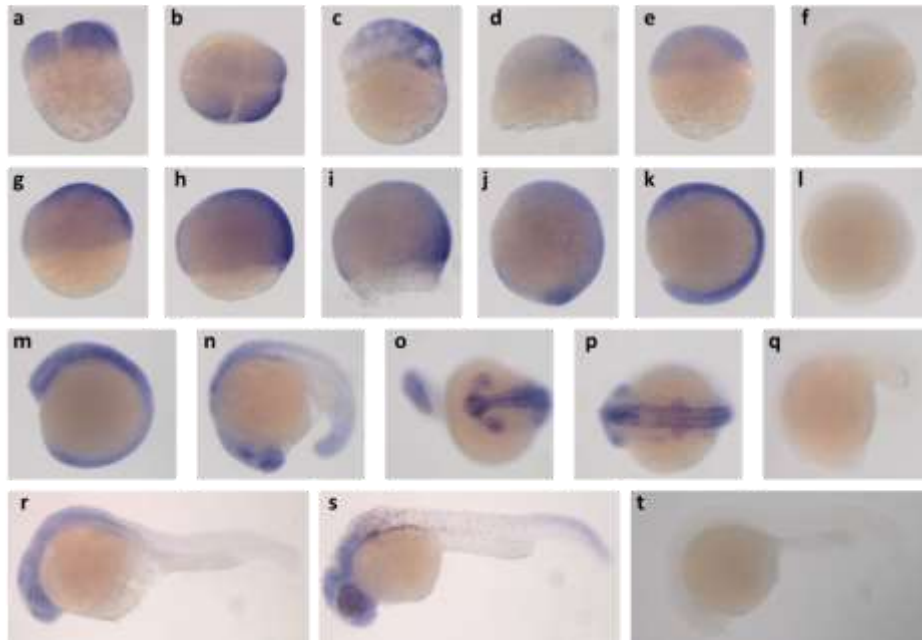


Fig.12 Hibridaciones *in situ* de *atrx14* en embriones completos durante el desarrollo de *Danio rerio*. (a,c,d,e,f,g,h,i) Vista lateral de los embriones con el polo animal hacia arriba; (b,o) Vista desde el polo animal; (j,k,l,q) Vista lateral izquierda con la parte anterior arriba y la dorsal a la derecha; (r-t) Vista lateral con la parte anterior hacia la izquierda y la dorsal hacia arriba; (a-b) Embrión de 4 células; (c) 128 células; (d) 1000 células; (e,f) 30% epibolia; (g) 50% epibolia; (h-i) 75% epibolia; (j) "tailbud"; (k,l) Embrión alrededor de 3 somitas; (m) Alrededor de 8 somitas; (n-q) Alrededor de 18 somitas; (r-t) 24 horas. (f,l,q,t) Control de sonda sentido.

Para caracterizar a mayor detalle la expresión particular que se observa en estadios tempranos se realizó una hibridación *in situ* de *atrx14* únicamente en los estadios de 1, 2, 4 y 128 células [Fig.13]. Se encontraron patrones distintos en los embriones de una sola célula, que van desde expresión únicamente en el vitelo, expresión tanto en el vitelo como en la célula hasta expresión únicamente en la célula [Fig. 13a-d], esto podría estar indicando el movimiento del transcrito hacia el polo animal después de la fertilización, sin embargo, se requieren de otros experimentos para poder validar esta teoría. En los estadios de 2, 4 y 128 células se puede observar un gradiente donde la tinción en una región del embrión es muy fuerte y va disminuyendo hacia el extremo opuesto [Fig13e-m]. Estos resultados muestran un patrón dinámico en la expresión de los genes y sugieren que ambas proteínas tienen una función en el desarrollo embrionario del pez cebra.

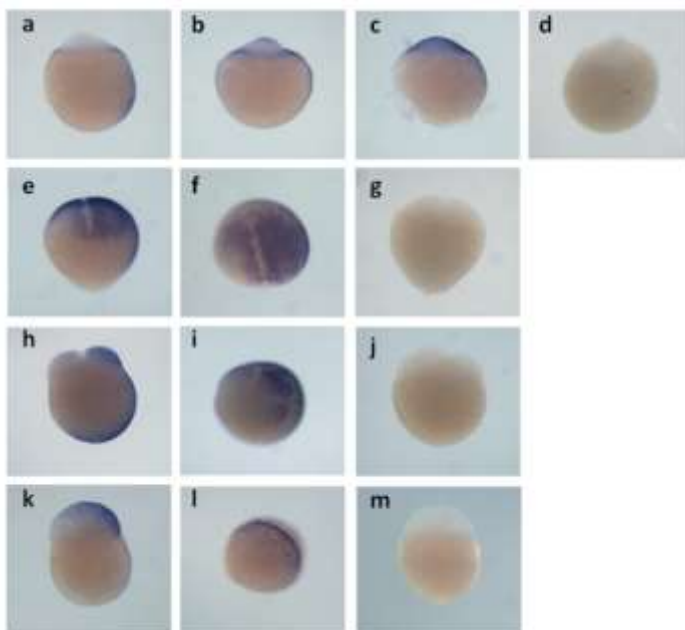


Fig.13 *atrx14* se expresa en gradiente antes de la transición de la blástula media. Hibridaciones *in situ* de *atrx14* en distintos estadios (a-d) Embriones de 1 célula; (e-g) Embriones de 2 células; (h-j) Embriones de 4 células; (k-m) Embriones de 128 células; (a-d,e,g,h,j,k,m) Vista lateral de los embriones con el polo animal hacia arriba; (f,i,l) Vista desde el polo animal; (d,g,j,m) Controles de la sonda sentido.

Se conocen pocos transcritos y proteínas que tengan un patrón de distribución asimétrico similar a éste durante el desarrollo temprano de pez cebra. Uno de los más estudiados es el de la proteína  $\beta$ -catenina. Esta proteína se encuentra localizada en la membrana plasmática de todas las células, sin embargo, en el desarrollo de pez cebra, a partir del estadio de 128 células  $\beta$ -catenina se estabiliza y comienza a localizarse también en el núcleo de algunas células. Poco después del comienzo de la transcripción cigótica, todos los embriones contienen  $\beta$ -catenina nuclear en los blastómeros que darán lugar a las estructuras dorsales del embrión [Fig. 5 y Fig.14] (Schier, 2001).

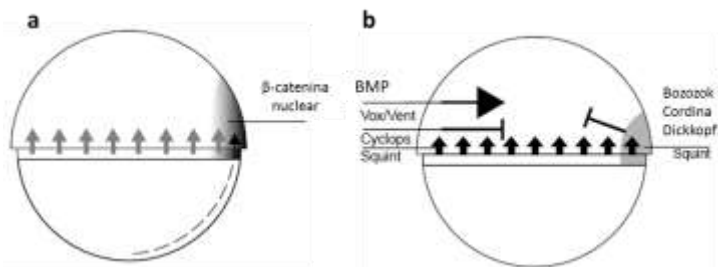


Fig.14  $\beta$ -catenina se transloca al núcleo en la parte dorsal del embrión. (a) Un determinante dorsal que se encuentra en el polo vegetal durante la fertilización se transloca asimétricamente (línea punteada) al polo animal y estabiliza a  $\beta$ -catenina, que se transloca al núcleo en el futuro lado dorsal del embrión poco antes del inicio de la transcripción cigótica. (b)  $\beta$ -catenina activa la transcripción de genes que reprimen la ventralización como *boozok*, *cordina*, *dickkopf* y *squint*. Algunos de ellos antagonizan las señales de BMP. Las flechas al margen del vitelo indican que existen factores en la capa sincitial que influyen en la especificación de destinos marginales. Imagen tomada de Schier, 2001.

Más recientemente, se encontró que el transcrito del gen *wnt8a* tiene un patrón de distribución asimétrico en el vitelo durante las primeras divisiones celulares (Thisse et al., 2011) [Fig.15]. Este patrón se asemeja al patrón que se observa en la tinción del vitelo de los transcritos de *atrx* (comparar Fig.15 con Fig.13e y Fig.13h) por el hecho de encontrarse localizado solamente en un lado del vitelo. En este mismo trabajo se encontró que la proteína Wnt8a lleva a la estabilización y localización nuclear de  $\beta$ -catenina.

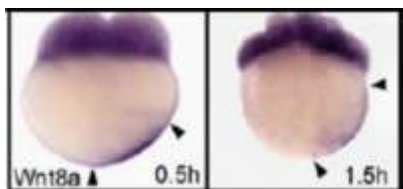


Fig.15 El transcrito de *wnt8a* está distribuido asimétricamente en el vitelo durante las primeras divisiones celulares. Hibridación in situ de *wnt8a* de un embrión de 2 células (izquierda) y un embrión de 16 células (derecha). Las flechas indican los límites de la localización del transcrito de *wnt8a*. Imagen tomada de Thisse et al., 2011

Tanto la expresión como la función de estos dos genes están relacionadas con la especificación del eje dorsoventral en pez cebra. Se han caracterizado algunos fenotipos de baja de función de proteínas involucradas en la determinación de este eje. Estos fenotipos incluyen generalmente un aumento en los tejidos dorsales o ventrales del embrión, dependiendo de si la proteína funciona promoviendo, de manera directa o indirecta, destinos ventrales o dorsales.

Experimentos preliminares hechos en el laboratorio muestran que las inyecciones de morfolinolinos específicos contra *atrx14* y *atrx5* (cada inyección por separado) generan fenotipos ventralizantes [Fig. 16]. La inyección del morfolino de *atrx14* tiene un efecto más marcado, pues los embriones presentan defectos evidentes en la regionalización del cerebro y en la cola [Fig.16a-c]. Las

inyecciones con el morfolino específico de *atrx5* tienen un fenotipo similar pero mucho más suave [Fig.16d-e]



Fig. 16 La inyección del morfolino contra *atrx14* (a-c) tiene un efecto más dramático en los embriones que la inyección del morfolino contra *atrx5* (d-e). (a) Embrión no inyectado, (b) Embrión inyectado con morfolino contra *atrx14*, se ven defectos en la estructura de la cabeza y en la cola, (c) Embrión inyectado con morfolino contra *atrx14*, el embrión tiene alteraciones más dramáticas en la cabeza y la cola a comparación de (b). (d) Embrión no inyectado, (e) Embrión inyectado con morfolino contra *atrx5*, estos embriones presentan un fenotipo más suave. La barra representa 0.3mm en cada una de las imágenes.

## JUSTIFICACIÓN

La estructura y los estudios hechos de ATRX sugieren que está involucrada en diversos procesos celulares y moleculares entre los que destaca la regulación transcripcional de un grupo específico de genes. La importancia de esta proteína durante el desarrollo embrionario se manifiesta en los múltiples trastornos presentados por aquellos que tienen mutaciones en el gen que la codifica y por los efectos que presentan los animales modelos en los que la expresión de *Atrx* se ha modificado. Sin embargo, por causas de letalidad o muerte temprana, aún se desconoce su función durante el desarrollo embrionario.

Estudios hechos en el laboratorio demostraron que los dos genes homólogos a ATRX en pez cebra tienen un patrón de expresión muy amplio y dinámico en los embriones. Ambos transcritos tienen un patrón muy particular en los estadios más tempranos (1-1000 células), donde es notoria una diferencia de concentración de transcrito en distintas células, formando un gradiente de expresión. Esto se asemeja a los patrones asimétricos que presentan algunos genes o proteínas implicados en la especificación del eje dorsoventral. Esto sugiere una posible implicación de *Atrx* en la especificación del eje dorsoventral del pez cebra. Experimentos preliminares muestran que el morfolino contra *atrx14* tiene un efecto más severo sobre los embriones. Además, la proteína *Atrx14* es la que tiene mayor identidad con la humana. Es por ello que me enfoqué en su estudio para este proyecto.

## HIPÓTESIS

La proteína *Atrx14* participa en la determinación del eje dorso-ventral durante el desarrollo temprano del pez cebra.

## OBJETIVOS

### Objetivo General

Determinar si *Atrx14* de pez cebra tiene un papel en la determinación temprana del eje dorso-ventral durante el desarrollo del pez cebra.

### Objetivos particulares

- Determinar si existe colocalización de *Atrx14* en el desarrollo temprano con  $\beta$ -catenina, una proteína que participa en la especificación del eje dorso-ventral.
- Caracterizar si la disminución de *Atrx14* de pez cebra afecta la determinación del eje dorso-ventral mediante el uso de marcadores tempranos de los destinos dorsales y ventrales.
- Diseño de oligonucleótidos de *atrx14* para CRISPRs, una nueva metodología para la generación de mutantes estables en pez cebra.

## METODOLOGÍA

### ***Cruza y obtención de embriones***

La noche anterior a la cruce se coloca una red en la pecera y ahí se ponen las hembras, dentro de esta red también se pone un contenedor con los peces machos, de manera que se encuentran en la misma pecera pero físicamente separados, como se muestra en la fig. 17. Dado que la luz es el estímulo para ovopositar los huevos, cuando se enciende la luz al día siguiente se juntan machos y hembras. El propósito de la red es evitar que los peces se coman a los embriones (que es un comportamiento normal en vida silvestre). Los embriones se colectan con una manguera que los succiona hacia otro recipiente y se lavan varias veces con “agua de embrión” (1.5 ml de concentrado de sales\* y 10 gotas de concentrado de azul de metileno\*\* en 1 litro de H<sub>2</sub>O desionizada) para remover suciedad.

\*Concentrado de sales: 2 g de sales Instant Ocean® en 50ml de H<sub>2</sub>O

\*\*Concentrado de azul de metileno: 0.01g azul de metileno en 10 ml de H<sub>2</sub>O.

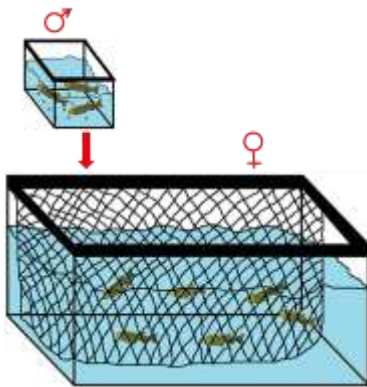


Fig.17 Preparación de la cruce. Los machos se colocan en un contenedor dentro de la red donde se encuentran las hembras.

### ***Hibridaciones in situ***

#### ***Síntesis de sondas***

Se utilizaron 3 sondas:

***cordina***: 3174pb. Donado por Mary Mullins. Para información del plásmido referirse a Miller-Bertoglio, et al., 1997.

***no tail***: 2200pb. Donado por Stefan Schulte-Merker. Para información del plásmido referirse a Schulte-Merker et al, 1992.

***atrx14***: 610pb. El fragmento se encuentra insertado en el vector pCR®II (Invitrogen®).

Para sintetizar las sondas primero se digieren los plásmidos con las enzimas correspondientes (ver abajo), después se purificaron las digestiones y se hizo la transcripción *in vitro*, cómo se describe a continuación:

->Digestiones:

El plásmido con el fragmento de *atrx14* para la sonda se digiere con XhoI (para anti sentido) y BamHI (para sentido). El plásmido con el fragmento de *cordina* se digiere con SpeI (para anti sentido) y Sall (para sentido). El plásmido con el fragmento de *no tail* se digiere con XhoI (para anti sentido).

**Xho-I:**

Componente	Cantidad
DNA de plásmido	6µg
Enzima XhoI (Roche®)	2µl
SuRE/Cut Buffer H®	5 µl
H <sub>2</sub> O	Para 50 µl

**BamHI:**

Componente	Cantidad
DNA de plásmido	6µg
Enzima BamHI (Roche®)	2µl
SuRE/Cut Buffer B®	5µl
H <sub>2</sub> O	Para 50 µl

**Sall:**

Componente	Cantidad
DNA de plásmido	6µg
Enzima Sall (Roche®)	2µl
SuRE/Cut Buffer H®	5 µl
H <sub>2</sub> O	Para 50 µl

**SpeI:**

Componente	Cantidad
DNA de plásmido	6µg
Enzima SpeI (Invitrogen®)	1µl
10X BufferM	5µl
H <sub>2</sub> O	Para 50 µl

Estas reacciones se incubaron a 37°C toda la noche. Pueden almacenarse a -20°C y visualizarse por electroforesis en gel.

## -&gt;Purificación de digestiones con butanol

Se pusieron 500 µl de Butanol grado Biología Molecular a la reacción con la digestión. Se vortexeó. Se centrifugó a 13,000 rpm durante 7 min. o hasta que se vio el precipitado. Se quitó el sobrenadante y se limpió el pellet con 500 µl de Etanol absoluto. Se centrifugó 10 min. a 13,000 rpm y se removió el sobrenadante. Se lavó con 500 µl de Etanol al 70% y se centrifugó 10 min a 13,000 rpm. Se desechó el sobrenadante y se dejó evaporar. Finalmente, se resuspendió en 20 µl de H<sub>2</sub>O.

## -&gt;Transcripción in vitro:

Este protocolo está basado en la hoja técnica del reactivo "DIG RNA LabelingMix" (Roche®). En un tubo eppendorf de 1.5 ml se colocaron:

Buffer de transcripción 10X	2µl
"DIG RNA Labelling mix" (Roche®)	2µl
RNAseOUT® (Invitrogen®)	1µl
DNA linearizado	500ng
Polimerasa SP6/T7	SP6 3µl/T7 1 µl
H <sub>2</sub> O libre de RNAsas	Para 20 µl

Se incubó toda la noche a 37°C. Después de esto deben purificarse las sondas sintetizadas, para ello se utilizó el equipo NucAway™ SpinColumns (AppliedBiosystems|Ambion®), siguiendo el protocolo especificado por la compañía. Brevemente: Se llevó el gel seco al fondo de la columna. Se hidrató la columna con 650 µl de agua libre de RNAsas. Se tapó, se vortexeó y se quitaron todas las burbujas. Se hidrató a temperatura ambiente de 5 a 15 minutos. Se colocó la columna en un tubo de colecta de 2 ml. y se centrifugó a 7500xg por 2 minutos. Se descartó el tubo de colecta y se aplicó inmediatamente la muestra (20-100 µl) al centro del gel hasta arriba de la columna sin tocar la superficie del gel ni los lados de la columna con la pipeta. Se colocó la columna en un tubo de elución de 1.5 ml y éste en el rotor, manteniendo la orientación de la primera centrifugación.



Se centrifugó a 250xg por 2 minutos. La muestra ahora se encuentra purificada en el tubo de elución.

### ***Hibridaciones in situ utilizando NBT/BCIP***

Este protocolo está basado en el artículo de Thisse & Thisse, 2008.

->Soluciones:

Todas las soluciones se hacen con agua tratada con DEPC.

Paraformaldehído 4%: Se preparó en campana de flujo. Se calentaron 450ml de H<sub>2</sub>O a 60°C. Se agregaron 20 gramos de paraformaldehído (Sigma®) y se mantuvo en agitación y a 60°C. Se adicionaron 5 gotas de NaOH 2N (1 gota por cada 100ml). La solución se volvió clara en un par de minutos (hay partículas finas que no desaparecen). No se debe calentar a más de 70°C porque el paraformaldehído se degrada. Se retiró y se adicionaron 50ml de PBS 10X. Posteriormente, se ajustó el pH a 7.2 utilizando HCl cuando fue necesario. Finalmente se filtró y se almacenó a -20°C.

PBS 10X (pH 5.5): 10.8 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 65 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 80 g. NaCl, 2 g KCl, disueltos en 1 litro de agua.

PBST: PBS 1X, 0.1% Tween® 20 (vol/vol) (Sigma®)

MH (Mezcla de hibridación): 50% Formamida (Invitrogen®), SSC 5X, 0.1% Tween® 20, 50 µg/ml heparina (Sigma®), 50 µg/ml de ARNt (Sigma®) libre de ribonucleasas, 10mM ácido cítrico pH 6.0.

SSC 20X: 175.3 g. NaCl y 88.2 g. de ácido cítrico, sal trisódica disueltos en 1 litro de agua.

Buffer de bloqueo: PBST 1X, 2% suero de oveja (v/v) (Rockland®), 2mg/ml BSA (Roche®).

AP-: 100mM Tris HCl pH 9.5, 100mM NaCl, 0.1% Tween® 20.

AP+: 50mM MgCl<sub>2</sub> disuelto en AP-.

Solución de tinción: 225 µl NBT (Roche®), 175 µl BCIP (Roche®), 50 ml de AP+.

Solución stop: PBS 1X, 1mM EDTA, 0.1% Tween® 20.

Proteinasa K: Solución para almacenar, 10mg (Roche®)/ml en PBST y guardar a -20°C en alícuotas de 100 ml. La concentración para permeabilizar embriones es de 10ug/ml

Metilcelulosa: Se prepara al 2.5% (g (Sigma®) disueltos en ml de PBST1X)

->Colecta de embriones: Se colectaron ~15 embriones del mismo estadio. Si los embriones eran de 24 horas o más, antes de fijarlos se decorionaron con pinzas. Se les quitó todo lo posible de agua de embrión y se les puso 1 ml de paraformaldehído al 4% para fijarlos. Estos embriones fijados se guardaron a 4°C durante una noche.

->Deshidratación y decorionado de los embriones: Se les quitó el paraformaldehído al 4% y se lavaron 3 veces con PBST, 10 minutos cada lavado (3 x 10min). Se decorionaron los embriones menores de 24 horas con pinzas estériles. Después, los embriones se deshidrataron lavando en

diluciones sucesivas de metanol en PBST: 10min metanol 25% (vol/vol); 10 min metanol 50% (vol/vol); 10 min metanol 75% (vol/vol). Se lavaron 4 veces, 5 min por lavado, en metanol al 100%. Estos embriones se pueden guardar en metanol (el mayor volumen posible) a -20°C por varias semanas.

->Hibridación *in situ*

Se rehidrataron los embriones cambiando la solución en diluciones sucesivas de metanol en PBST: 5 min metanol 75% (vol/vol); 5 min metanol 50% (vol/vol); 5 min metanol 25%(vol/vol). Se lavaron 4 veces, 5 minutos por lavado, en PBST al 100%. Se permeabilizaron los embriones por digestión con proteinasa K (10ug/ml) a temperatura ambiente por el tiempo indicado según el estadio de acuerdo a la siguiente tabla:

<b>Estadio del desarrollo</b>	<b>Duración del tratamiento con proteinasa K</b>
1 célula-1 somita	30 segundos
1-8 somitas	1 minuto
9-18 somitas	3 minutos
18 somitas-24 horas	10 minutos
36 horas-5 días	30 minutos

Se detuvo la digestión de proteinasa K incubando los embriones por 20 min en paraformaldehído al 4%. Se lavaron 4 veces, 5 minutos por lavado, en PBST para remover el paraformaldehído. Se prehibridaron los embriones con 1ml de la solución MH por 5 horas en un horno a 70°C. Se quitó la solución MH y se agregaron 500 µl de solución MH que contenía 100-200 ng de sonda de ARN marcada con DIG. Se hibridaron toda la noche a 70°C.

Las soluciones MH, SSC 2X y SSC 0.2X, se precalentaron a 70°C antes de usarse como se describe a continuación. Se reemplazó la solución MH con sonda por 1ml de solución MH sin sonda, sin ARNt y sin heparina, se dejó a 70°C por 10 min. Se hicieron cambios graduales de MH a SSC 2X a través de una serie de lavados de 10 min a 70°C en MH diluido con SSC 2X. Se lavó una vez en cada uno: 75% MH, 50% MH, 25% MH y SSC 2X 100%. Se hicieron los lavados a 70°C. (Este MH no contenía ARNt ni heparina). Se lavó 2 veces, 30 minutos por lavado, en SSC 0.2X a 70°C. Se reemplazó progresivamente el SSC 0.2X con PBST a través de una serie de lavados de 10 minutos a temperatura ambiente en SSC 0.2X diluido con PBST en 1 ml de las siguientes soluciones: 75% SSC 0.2X; 50% SSC 0.2X, 25% SSC 0.2X y PBST 100%. Se incubaron los embriones de 3 a 4 horas en buffer de bloqueo. Después, se incubaron los embriones en 500 µl de anticuerpo anti-DIG diluido 1/10,000 en buffer de bloqueo durante toda la noche a 4°C con agitación suave.

Se desechó la solución de anticuerpo y se lavaron los embriones brevemente en PBST. Posteriormente, se lavaron 6 veces, 15 minutos por lavado, en PBST a temperatura ambiente con agitación suave. En seguida se lavaron dos veces, 5 minutos por lavado, con la solución AP-. Se incubaron los embriones a temperatura ambiente lavando 3 veces, 5 minutos por lavado, en la solución AP+ con agitación suave. Se reemplazó la solución AP+ con 500 µl de solución de tinción

recién preparada y se cubrieron los embriones de la luz. Se monitoreó la reacción de color periódicamente (se expuso a los embriones el menor tiempo posible a la luz) y, una vez que se alcanzó la intensidad de tinción deseada, se detuvo la reacción descartando en lo posible la solución de tinción y lavando 3 veces, 15 minutos por lavado, en solución stop con agitación suave. Los embriones teñidos pueden guardarse en la oscuridad en solución stop a 4°C por varios meses.

Los embriones de estadios tempranos (1 célula-1000 células) se incubaron 5 minutos en PBST pH 3.0 para prevenir la reacción fotosensible del vitelo.

->Montaje de embriones:

Se vaciaron 3 ml de agarosa al 1% (disuelta en PBS1X) en una caja petri y se dejó solidificar. En el caso de embriones menores de 24 horas se utilizó un molde para hacer una caja con “pocitos”, de manera que los embriones pudieran orientarse mejor. Al momento en que se iban a montar los embriones, estas cajas se cubrieron con metilcelulosa. La viscosidad de la metilcelulosa permite acomodar los embriones para fotografiarlos.

->Fotografías

La obtención de imágenes se llevó a cabo mediante microscopía de campo claro utilizando un microscopio Leica MZ 12.5 y una cámara AxioCam MRC5 0450-354.

#### ***Hibridaciones in situ fluorescentes***

Este procedimiento es igual que para las hibridaciones no fluorescentes, excepto por la composición de las siguientes soluciones:

AP-: 100mM Tris HCl pH 8.2, 100mM NaCl, 0.1% Tween® 20.

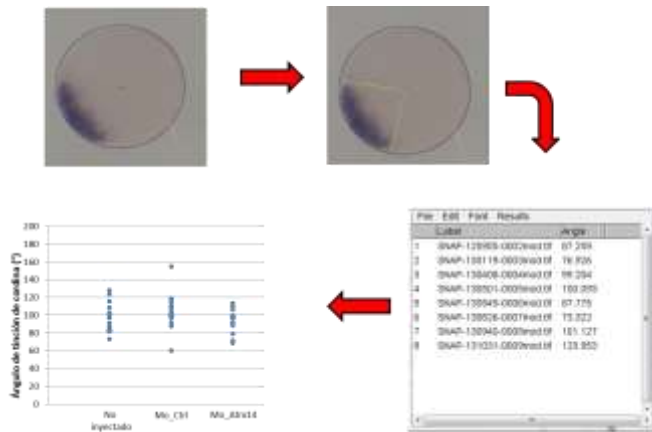
AP+: 50mM MgCl<sub>2</sub> disuelto en la solución AP- descrita en esta sección.

Solución de tinción: 120 µl FastRed (SIGMA®, 50mg/ml en dimetilformamida), 60µl Naphtol (SIGMA®, 50mg/ml en dimetilformamida), 6ml de AP+.

El tiempo de revelado también aumentó. Los embriones se dejaron en solución de tinción durante toda la noche.

#### ***Método de cuantificación de los ángulos de tinción de cordina***

Los embriones se fotografiaron con vista desde el polo animal. Utilizando el programa GIMP 2.8 (<http://www.gimp.org/>) se trazó un círculo correspondiente a la región animal de cada embrión en cada fotografía y se marcó el centro del círculo. Después se utilizó el programa ImageJ para trazar el ángulo que ocupaba la tinción de cordina desde el centro del círculo, y se obtuvo la medida de los ángulos de todos los embriones. Estos datos se graficaron. El siguiente diagrama muestra los pasos en este proceso:



## Immunotinción

Los embriones se colectaron en el estadio deseado y se fijaron en paraformaldehído al 4% toda la noche a 4°C. Después, se lavaron 3 veces (10 minutos por lavado) en buffer de bloqueo de inmunotinción (PBS1X, BSA 0.1%, TritonX100 1%), se decorionaron manualmente y se bloquearon por 4-6 horas en el mismo buffer de bloqueo de inmunotinción a temperatura ambiente. A partir de este paso los embriones se colocan en agitación suave. El anticuerpo primario (anti  $\beta$ -catenin, C 2206, Sigma-aldrich®) se diluyó 1:200 en el buffer de bloqueo y los embriones se incubaron en esta solución a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente, los embriones se lavan 3 veces en buffer de bloqueo y se incuban en anticuerpo secundario (Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Rabbit IgG) en una dilución 1:200 en buffer de bloqueo de inmunotinción por 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente se lavan los embriones 3 veces en el mismo buffer de bloqueo. En este punto, los embriones menores a las 1000 células se trataron con RNAsa (Roche) a una concentración de 0.4mg/ml por 1 hora a 37°C. En los casos donde se realizó también tinción de núcleos se agregó una dilución 1:4000 de Hoechst (SIGMA®) en el mismo buffer de bloqueo por 1 hora y enseguida se lavó 3 veces. Los embriones se montaron el mismo día en que serían observados en agarosa de bajo punto de fusión diluida en PBS para microscopía confocal láser de barrido (Olympus FV1000 IX81 Invertido).

## Clonación del gen *atrx14* de pez cebra

### Diseño y secuencia de oligonucleótidos

Para el diseño de los oligonucleótidos específicos para cada fragmento del transcrito de *atrx14* en *Danio rerio* se utilizó el programa "Primer3" (Rozen & Skaletsky, 2000) utilizando como parámetro contenido de CG  $\geq$  50%. Se verificó que los oligonucleótidos no reconocieran otras secuencias mediante una búsqueda en BLASTn de NCBI (Altschul et al., 1997) contra los transcritos reportados de pez cebra. Además se verificó que los oligonucleótidos no crearan estructuras secundarias o dímeros con el programa "OligoCalc: Oligonucleotide Properties Calculator" (Kibbe, 2007). Las secuencias de los oligonucleótidos son las siguientes:

	Fragmento	Secuencia oligo 1 (5'-3')	Secuencia oligo 2 (5'-3')
<b><i>atrx14</i></b>	1	GGGTCATTCTCCAGACATCG	CCTGATGACTGATGGAAACCA
	2	CCAGTGACGAAGAGGAGGAG	TCGTGGTAACAAACGATGTGA
	3	GGGAACCATGGAGGAAAAGA	TCCTCTTACTACTCGAGGAGC

### ***Preservación de embriones previo a la obtención de ARN***

Se colectaron ~60 embriones de entre 1 y 4 células. Al momento de colectar los embriones en un tubo estéril de 2 ml. se les quita en lo posible el agua de embrión y se le agrega 1ml. de RNAlater® (AppliedBiosystems|Ambion®) a cada tubo con 60 embriones. Estos embriones se guardan a 4°C por al menos una noche y hasta una semana. Después de esto, a cada tubo se le quita el RNAlater® y se congelan en nitrógeno líquido para después guardarlos a -70°C.

### ***Extracción de ARN***

La extracción de ARN se llevó a cabo de acuerdo al protocolo establecido para el reactivo TRIZOL® (Invitrogen®). Brevemente:

A los embriones aún congelados se les agregó 1ml de TRIZOL®. Se homogenizó la mezcla con una jeringa de 3 ml. Se centrifugó a 12,000xg por 10 min. a 4°C. Se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo. Se incubó 5 min a temperatura ambiente. Se añadieron 0.2 ml de cloroformo, se mezcló vigorosamente por 15 segundos y se incubó a temperatura ambiente por 3 min. Se centrifugó la muestra a 12000xg por 15 min a 4°C. Después de esto la mezcla se separa en 3 fases: La fase inferior roja (fenol-cloroformo), la interfase, y la fase acuosa superior, que es incolora. El ARN permanece exclusivamente en esta fase acuosa, la cual se transfiere a un tubo nuevo.

Para precipitar el ARN se usaron 0.5 ml de isopropanol, se incubaron las muestras a temperatura ambiente por 10 min. y se centrifugaron a no más de 12,000xg por 10 min. a 4°C. El ARN precipitado forma un gel en el fondo del tubo. Se removió el sobrenadante y se lavó el precipitado de ARN con 1ml de etanol al 75%. Se mezcló con el vórtex y se centrifugó a no más de 7,500xg por 5 min a 4°C. Se removió el sobrenadante y se secó el precipitado de ARN al aire por 5-10 min. Se disolvió el ARN en 30 µl de agua libre de nucleasas, se mezcló con la pipeta y se incubó por 10 min a 55°C. Una vez extraído, el tubo con ARN puede guardarse varias semanas a -20°C. La integridad del ARN se comprobó corriendo 1µl en un gel de agarosa al 1%.

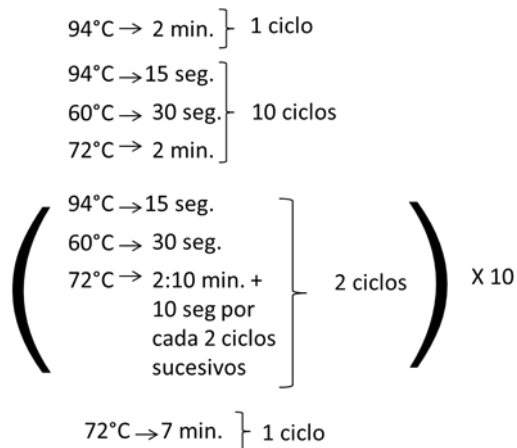
### ***RT-PCR***

La amplificación de la secuencia se hizo en dos pasos. Primero se sintetizó ADNc a partir del ARN extraído y con ese ADNc se hizo amplificación mediante PCR utilizando los oligonucleótidos específicos para cada uno de los fragmentos de *atrx14*.

Síntesis de ADNc: Se realizó de acuerdo al protocolo del reactivo “M-MLV Reverse Transcriptase ®” (Invitrogen®), con algunas modificaciones. Se agregó a un tubo libre de nucleasas: 1µl de oligo dT (Invitrogen®) (500ug/ml); 50-250ng de “random primers” (Invitrogen®), 1ng-5ug de ARN total, 1µl mezcla de dNTPs (Invitrogen®) a 10mM cada uno y agua destilada hasta 12ul. Se calentó la mezcla a 65°C por 5 min y se pasó inmediatamente a hielo. Se centrifugó rápidamente y se agregaron: 4µl de “5x First Strand Buffer”, 2µl 0.1M DTT (Invitrogen®) y 1µl “RNase OUT™” (Invitrogen®). Se mezcló suavemente y se incubó a 37°C por 2 minutos. Se adicionó 1µl (200 Unidades) de M-MLV

RT y se mezcló pipeteando suavemente. Se incubó el tubo a temperatura ambiente 10 min. Después se incubó 50 min a 37°C y se inactivó la reacción calentándola a 70°C por 15 min. Este ADNc se almacenó a -20°C.

Amplificación por PCR: Se utilizó el sistema “Expand High Fidelity PCR System” (Roche®) que está optimizado para amplificar fragmentos de ADN de hasta 5Kb y contiene una mezcla de una Taq ADN polimerasa y otra ADN polimerasa termoestable con actividad correctora. Se mezclaron los siguientes componentes en un tubo estéril de 0.5 ml: 2.5 µl de Buffer “Expand High Fidelity” 10x con MgCl<sub>2</sub> (Roche®), 0.5 µl de dNTPS (Invitrogen®) a 10mM cada uno, 1 µl del oligo 1 (10µM), 1 µl del oligo 2 (10µM), 0.4 µl de la mezcla de enzimas (Roche®), 2 µl de ADNc y 17.6 µl de agua estéril. Bajo las siguientes condiciones de amplificación:



Esta reacción se puede guardar a 4°C por varios días y visualizarse por electroforesis en gel de agarosa

### **Purificación de productos de PCR**

Los productos de PCR de los distintos fragmentos amplificados del transcrito de *atrx14* se purificaron por extracción de la banda del gel, utilizando el kit “QIAEX II®” (QIAGEN®) y el protocolo establecido en el manual. Brevemente: Se cortó la banda de ADN del gel de agarosa con un escalpelo limpio. Se pesó el pedazo de gel en un tubo transparente. Se agregaron 3 volúmenes de buffer QX1 a 1 volumen de gel para fragmentos de 100 pb a 4 kb. Se resuspendió el reactivo QIAEX II por vórtex durante 30 segundos. Se agregaron 10 µl. de QIAEX II a la muestra (<2ug. de ADN) y se mezcló. Se incubó a 50°C por 10 minutos. Se mezcló por vórtex cada 2 minutos para mantener la solución QIAEX II en suspensión. Se centrifugó a 13, 000 rpm por 30 segundos. Se desechó el sobrenadante. Se resuspendió el pellet en 500 µl de buffer QX1 vortexeando. Se centrifugó por 30 segundos a 13,000 rpm y se desechó el sobrenadante. Se resuspendió el pellet dos veces en 500 µl de buffer PE vortexeando, centrifugando por 30 seg. a 13,000 rpm y removiendo el sobrenadante. Se secó el pellet al aire 15 min. Para eluir se agregaron 20 µl de agua, se vortexeó e incubó a temperatura ambiente por 5 minutos. Se centrifugó 30 segundos a 13,000 rpm. Se puso el sobrenadante en un tubo nuevo. Este sobrenadante contiene el producto de PCR purificado.

### **Ligación de productos de PCR**

Se ligaron los productos de PCR purificados de los fragmentos de *atrx14* al vector pCR<sup>®</sup>2.1 (Invitrogen<sup>®</sup>) utilizando el protocolo del manual de TA Cloning<sup>®</sup> Kit (Invitrogen<sup>®</sup>).

Brevemente: Se calculó la concentración de producto de PCR purificado para una proporción 1:3 (vector: inserto) de acuerdo al tamaño del vector y del producto de PCR. Se puso en un tubo de 0.6 ml, la siguiente reacción:

<b>Componente</b>	<b>Cantidad</b>
Producto de PCR	X µl (la cantidad calculada dependiendo de la proporción)
Buffer de Ligación 10x *	1µl
Vector pCR2.1 <sup>®</sup>	1µl (25ng)
H <sub>2</sub> O	A un volumen de 9 µl
T4 ADN ligasa	1 µl
<b>Total</b>	<b>10 µl</b>

\*Buffer de ligación 10X (60 mM Tris-HCl, pH 7.5, 60 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM NaCl, 1 mg/ml albúmina de suero bovino, 70 mM β-mercaptoethanol, 1 mM ATP, 20 mM dithiothreitol, 10 mM spermidina).

Se incubó la reacción a 14°C toda la noche. Una vez hecho esto, esta reacción de ligación se puede guardar por varios meses a -20°C.

### **Transformación de bacterias competentes por choque de calor**

Se transformaron bacterias competentes *Escherichia coli* de la cepa DH5α<sup>™</sup> siguiendo el protocolo del manual de TA Cloning<sup>®</sup> Kit (Invitrogen<sup>®</sup>). Previamente cajas de agar LB\* con ampicilina (50ug/ml) se esparcieron con X-Gal (40mg/ml por caja). Brevemente: Se centrifugaron rápidamente los viales que contenían las reacciones de ligación y se pusieron en hielo. Se descongelaron en hielo 100µl de bacterias competentes para cada reacción de ligación. Se pipetearon 4 µl de la reacción de ligación directamente en el vial de células competentes y se mezcló suavemente con la punta de la pipeta. Se incubaron los viales en hielo 30 min. Se aplicó un choque de calor a las células 45 segundos a 42°C sin agitar y se transfirieron a hielo inmediatamente. Se agregaron a cada vial 500 µl de medio SOC\*\* a temperatura ambiente y se agitaron los viales horizontalmente en una incubadora a 37°C por una hora a 225 rpm. Se esparcieron 100 µl de bacterias para cada ligación en un plato de agar LB. El resto de las bacterias de esa ligación se centrifugó a 1000 rpm por 5 min, se tiró el sobrenadante, se resuspendieron en el medio que quedaba y se esparció todo en un plato de agar LB. Se incubaron los platos toda la noche a 37°C. Se cambiaron los platos a 4°C por 2-3 horas para permitir el desarrollo de color. Se seleccionaron únicamente colonias blancas.

\***Agar LB:** 950ml H<sub>2</sub>O, 10g bacto-tryptone, 5g bacto-yeast extract, 10g NaCl. Ajustar el pH a 7.0. Ajustar el volumen a 1 litro. Agregar 15g de bacto-agar. Autoclavear.

\*\***Medio SOC:** 950ml H<sub>2</sub>O, 20g bacto-tryptone, 5g bacto-yeast extract, 0.5g NaCl, 2.5mM KCl. Ajustar el pH a 7.0. Ajustar el volumen a 1 litro. Justo antes de usar, agregar MgCl<sub>2</sub> y glucosa para que quede a 0.01M MgCl<sub>2</sub> y a 20mM de glucosa.

### **Purificación de ADN plasmídico**

Se sembraron las colonias blancas en cajas de agar LB y además se dejaron creciendo en 3 ml. de medio LB toda la noche. Se utilizaron dos métodos distintos de purificación de plásmido de acuerdo al propósito. Si el ADN se utilizaría para checar si la colonia tenía el inserto adecuado, el ADN plasmídico se purificó con el protocolo de “Molecular cloning, a laboratory manual” (Sambrook, J., Russel, D. W., 2001) páginas 1.25-1.28 por el método de lisis alcalina; si la colonia sí tenía el inserto, el ADN plasmídico se purificaba con el kit QIAprep® Miniprep (QIAGEN®) para enviarse a secuenciación y utilizarse posteriormente para las subclonaciones. Purificación por lisis alcalina:

Se colocaron 1.5 ml del cultivo en una microcentrífuga. Se centrifugó a 12,000g por 30 segundos a 4°C en una microcentrífuga. Se removió el medio por aspiración o invirtiendo el tubo, dejando el precipitado bacteriano tan seco cómo fue posible. Se resuspendió el precipitado de bacterias en 100µl de Solución I (50mM glucosa, 25mM Tris Cl pH 8.0, 10mM EDTA pH 8.0, autoclavear y almacenar a 4°C) fría (4°C). Se agregaron 200µl de Solución II (0.2N NaOH, 1% SDS) recién preparada. Se cerró bien el tubo y se mezcló invirtiendo rápidamente el tubo 5 veces, asegurándose de que toda la superficie estuviera en contacto con la Solución II. Se puso el tubo en hielo. Se adicionaron 150µl de la Solución III (60ml de acetato de potasio 5M, 11.5ml ácido acético glacial, 28.5ml H<sub>2</sub>O) fría. Se cerró el tubo y se agitó suavemente en una posición invertida por 10 segundos para dispersar la Solución III en el lisado bacteriano.

Se puso el tubo en hielo de 3 a 5 minutos. Se centrifugó a 12,000g por 5 min. a 4°C. Se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo. Se precipitó el ADN de doble cadena con dos volúmenes de etanol a temperatura ambiente. Se mezcló vortexeando. Se dejó reposar 2 min. a temperatura ambiente, para luego centrifugarse a 12,000g por 5 min. a 4°C. Se removió el sobrenadante y se secó el precipitado invirtiendo el tubo. Se lavó el precipitado con 1ml de etanol al 70% a 4°C y se removió el sobrenadante. Finalmente, se permitió al precipitado de ADN secarse al aire libre por 10 min.

### **Transcripción in vitro de ARN**

Antes de realizar la transcripción *in vitro* se linearizó el plásmido con la enzima de restricción KpnI (Roche®). El producto se purificó utilizando el kit “GeneJet PCR Purification Kit” (Invitrogen®) de acuerdo al protocolo ahí establecido.

### **Reacción**

Ésta se realizó con el kit “mMESSAGE mMACHINE® Kit” (Ambion®). Brevemente:

<b>Cantidad</b>	<b>Componente</b>
Para 19µl	Agua libre de nucleasas
10µl	2XNTP/CAP
2µl	10X Reaction Buffer
1µg	Templado linearizado
2µl	“Enzyme Mix”
1µl**	GTP extra

\*\*Esta cantidad de GTP se puso después de 5min para maximizar la eficiencia de obtención de transcritos completos de ~6Kb.



Esta reacción se incubó a 37°C por 4 horas. Después se agregó 1µl de “TURBO DNase” para fragmentar el ADN plasmídico por 15 minutos a 37°C. Se guardó a -20°C.

### **Purificación del transcrito**

Se purificó el producto de la transcripción *in vitro* mediante la extracción por fenol-cloroformo seguido de precipitación con isopropanol de la siguiente manera:

Se llevó la solución a 280µl agregando 230µl de agua y 30µl de la solución “ammonium acetate stop solution”, incluida en el kit. Después se agregó un volumen equivalente de fenol-cloroformo, se vortexeó y se centrifugó a máxima velocidad (13,000rpm) por 2 minutos. Se recuperó el sobrenadante y se repitió la operación anterior. Se agregó un volumen de cloroformo-alcohol isoamílico, se vortexeó y se centrifugó a máxima velocidad por 2 minutos para después recuperar el sobrenadante. Este procedimiento también se repitió una vez más. Enseguida se agregó un volumen de isopropanol y se incubó por 20 minutos a -20°C. Después se centrifugó a 4°C por 15 minutos a máxima velocidad, se desechó el sobrenadante, se dejó secar el tubo abierto y se resuspendió el ARN en 20µl de agua libre de nucleasas.

Para verificar la integridad del ARN transcrito se corrió un gel de agarosa, donde se pueden ver dos bandas [Fig.18].

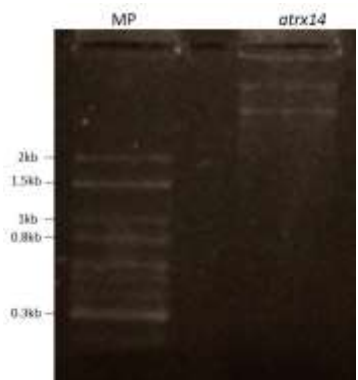


Fig.18 ARN obtenido de la transcripción *in vitro*. El tamaño de la banda esperada es de ~6Kb.

Este gel se hizo de agarosa al 1.5% con formaldehído, como a continuación se describe:

Gel 1.5% Agarosa-> 1.5g de agarosa en 10 ml de MOPS 10X (0.2M MOPS, 50mM Ac.Na, EDTA 10mM, pH 7.0) y 87 ml de H<sub>2</sub>O. Disolver agarosa calentando en microondas y enfriar a 60°C-50°C. Antes de que solidifique adicionar 5.1 ml de formaldehído al 37% y mezclar. Verter esta solución en un molde para hacer geles, con el peine puesto. Cuando solidifique, retirar el peine y colocar el gel en una cámara de electroforesis con buffer de corrida hasta cubrir el gel.

Buffer de corrida -> MOPS 1X (1ml de MOPS 10X y 9 ml de H<sub>2</sub>O por cada 10 ml de solución)

Muestra-> 2µl de ARN + 17 µl de Buffer de muestra para ARN (1 muestra: 2µl MOPS 10X, 10µl formamida (Invitrogen®), 4µl formaldehído 37%, 1µl Bromuro de Etidio<sup>+</sup>). Calentar a 80°C por 15 minutos. Pasar inmediatamente a hielo 10 minutos. Agregar 2µl de buffer de carga 10X<sup>++</sup>, cargar y correr.

+200ug/ml Bromuro de Etidio en agua tratada con DEPC.

++50% de glicerol diluido en H<sub>2</sub>O DEPC, 10mM EDTA (pH 8.0), 0.25% (peso sobre volumen) azul de bromofenol.

### Diseño del morfolino

Una de las maneras en que se puede hacer una baja de función de una proteína en pez cebra es mediante la microinyección de morfolinós. En el laboratorio se diseñó un morfolino de cada tipo para *atrx14* [Fig.19].

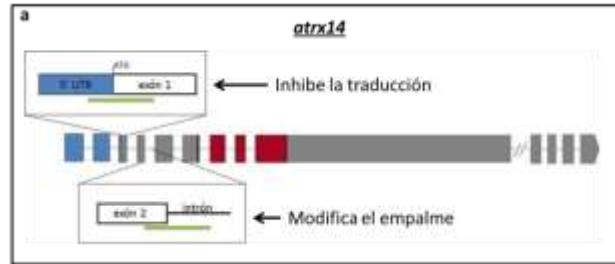


Fig.19 Localización en el transcrito de los morfolinós diseñados contra *atrx14*(a). La línea verde dentro de la ampliación representa el morfolino. Para cada morfolino se indica el mecanismo esperado (inhibición de la traducción o modificación del empalme)

### Microinyección de embriones de pez cebra

#### Morfolinós

Los embriones de una célula se microinyectaron ya sea con buffer Danieau (58 mM NaCl, 0.7 mM KCl, 0.4 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.6 mM Ca (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 5 mM HEPES, pH 7.6), morfolino control o morfolino específico para *atrx14*. Los morfolinós se diluyeron a una concentración de 1mM. Se toman 2 µl de esta solución y se colocan en la jeringa (que no está abierta en la punta). Se rompe la punta de la jeringa recargándola suavemente sobre un portaobjetos. Una vez abierta la punta de la jeringa, se coloca un portaobjetos que contiene una regleta, la cual se cubre con una gota de aceite mineral. Se ajustan los parámetros de presión y tiempo de inyección en el microinyector (eppendorf®) de manera que la burbuja que se genere en el aceite al inyectar tenga el diámetro necesario para la inyección de la cantidad deseada. Hasta el momento, se ha inyectado una burbuja de aproximadamente 160 µm de diámetro, que corresponde a 17.8ng de morfolino por embrión. Una vez que se han ajustado los parámetros, los embriones (que deben estar en los estadios de 1 a 4 células o incluso antes de que formen la primera célula) se colocan en una caja de inyección, ésta es una caja petri que contiene un fondo de agarosa (1% agarosa en agua de embrión) con canales que impiden que los embriones se muevan de su sitio para poder ser inyectados y no se deshidraten. En cualquier experimento con inyecciones se deja una cantidad de embriones sin inyectar que es similar o mayor a la de los inyectados para poder determinar si la inyección está afectando la supervivencia de los embriones.

En los experimentos de inyección con morfolino contra *atrx14* siempre se inyectó, además, un número similar de embriones con morfolino control (que también estaba en una concentración de 1mM) con una burbuja del mismo tamaño, por lo que se inyectó en una cantidad equivalente. Esto se hace para verificar que el fenotipo que se observa con el morfolino contra *atrx14* no sea un efecto mecánico o tóxico solamente por la inyección. Una hora después de la inyección se revisan los embriones para descartar los huevos que no están fertilizados.

### ***atrx14* ARN**

El ARN obtenido mediante transcripción *in vitro* se disuelve en KCl 1M de manera que el KCl quede a una concentración final de 0.1M. Con el propósito de evaluar los fenotipos, la supervivencia de los embriones y evitar toxicidad por exceso de ARN se inyectaron 4nl de éste por embrión en distintas concentraciones (ver resultados). Como control de cada experimento se inyectó una parte de los embriones solamente con buffer (KCl 0.1M) en la misma cantidad y se dejó un número similar de embriones sin inyectar. El procedimiento de inyección es el mismo que para los morfolidos.

## RESULTADOS

### **Colocalización del ARN de *atrx14* con la proteína $\beta$ -catenina**

Como se mencionó anteriormente debido a la activación de la vía de Wnt,  $\beta$ -catenina se estabiliza, lo cual tiene como consecuencia su translocación al núcleo solamente en lo que será el lado dorsal del embrión. Este cambio comienza cerca de las 128 células en un porcentaje muy pequeño de embriones, pero se encuentra presente en la mayoría poco antes del inicio de la transcripción cigótica (Dougan et. al, 2003). Por otro lado, sabemos que el transcrito de *atrx14* se distribuye en gradiente desde las 2 células y hasta el inicio de la transcripción cigótica, y que para la epibolia el transcrito ya es homogéneo. Sin embargo, entre el inicio de la transcripción cigótica y el comienzo de la epibolia existen una serie de estadios descritos por Kimmel y colaboradores en 1995 donde desconocíamos si el transcrito todavía se encontraba en gradiente o no. Por ello, realicé hibridaciones *in situ* en los estadios de esfera y oblongo (estadios intermedios entre el inicio de la transcripción cigótica y el comienzo de la epibolia) [Fig.20]. En éstas se puede observar todavía el gradiente en el estadio de oblongo, aunque es mucho menos evidente que en estadios más tempranos, mientras que en esfera el gradiente ya es casi invisible [Fig.20 y 21].

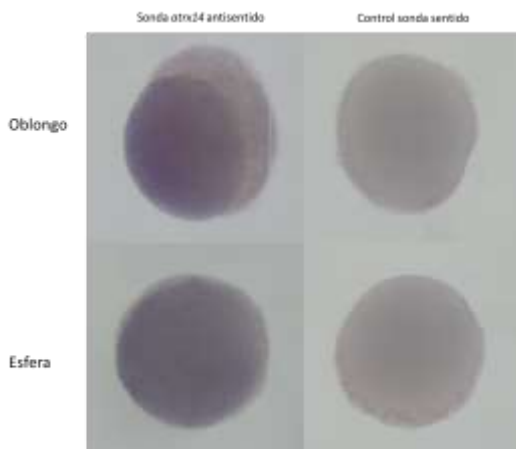


Fig. 20 El gradiente de tinción de *atrx14* desaparece cerca del estadio de esfera. Arriba: Hibridación *in situ* de *atrx14* en el estadio de oblongo. Abajo: Hibridación *in situ* de *atrx14* en el estadio de esfera. Para cada uno se muestra el control de la sonda sentido.

Por lo tanto, y como se observa en la Fig. 21, el transcrito de *atrx14* se observa en gradiente hasta el estadio de oblongo, mientras que  $\beta$ -catenina comienza a localizarse en los núcleos en la mayoría de los embriones entre las 512 células y el inicio de la transcripción cigótica, es por ello que estos estadios son ideales para realizar una colocalización mediante inmunotinción e hibridación *in situ* fluorescente lo cual nos permitiría conocer si el transcrito de *atrx14* se localiza preferencialmente del lado dorsal o ventral del embrión.

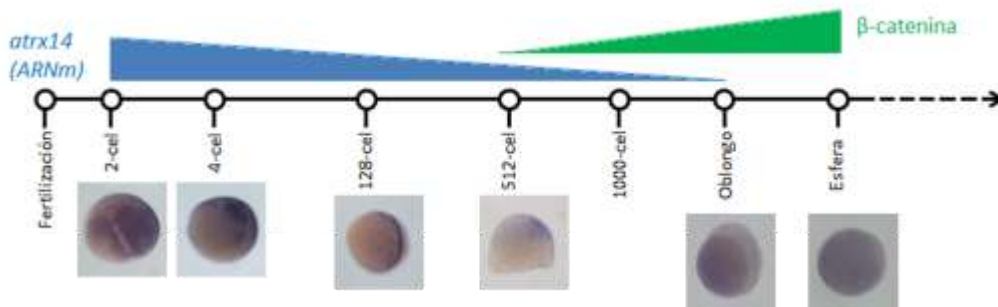


Fig. 21 La distribución en gradiente de *atrx14* se sobrelapa en algunos estadios con la localización nuclear de  $\beta$ -catenina. En azul el patrón de expresión en gradiente de *atrx14*, que comienza desde el estadio de 2 células y ya no es distinguible para el estadio de esfera. En verde, la localización nuclear de  $\beta$ -catenina en el lado dorsal del embrión, que comienza en 15% de los embriones en 128 células, localizándose en muy pocas células pero aumentando considerablemente para el estadio de esfera, según resultados de Dougan et. al., 2003.

Para ello, ambas técnicas se probaron primero de manera independiente. Las inmunotinciones de  $\beta$ -catenina se realizaron sobre embriones en la etapa de esfera debido a que es un estadio cercano al inicio de la transcripción cigótica pero tiene una mayor cantidad de núcleos por embrión donde  $\beta$ -catenina se ha translocado. Debido a que el anticuerpo reconoce la proteína total (y no solamente la forma que es capaz de translocar al núcleo) ésta se puede ver también en las membranas [Fig.22], lo cual dificulta un poco ver su localización en el núcleo cuando se hace una reconstrucción. Sin embargo, y de acuerdo a lo esperado, la proteína es visible en algunos núcleos en ciertos cortes ópticos preferencialmente de un solo lado del embrión [Fig.23].

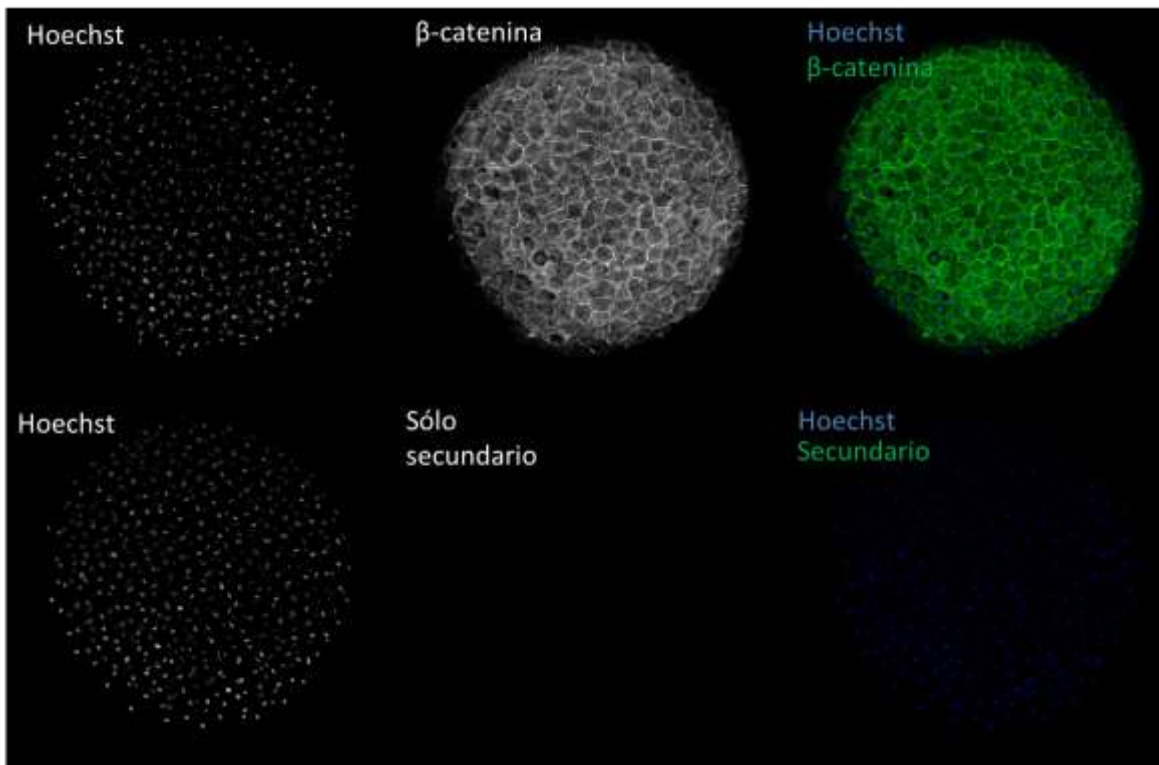


Fig.22  $\beta$ -catenina se localiza en la membrana de todas las células, pero sólo se encuentra en el núcleo en el lado dorsal. (Arriba) Inmunotinción de  $\beta$ -catenina en embriones en la etapa de esfera. El embrión está visto desde el polo animal. Los núcleos se tiñeron también con Hoechst para contrastar la tinción en las membranas. (Abajo) Control de anticuerpo secundario y la tinción con Hoechst del mismo embrión.

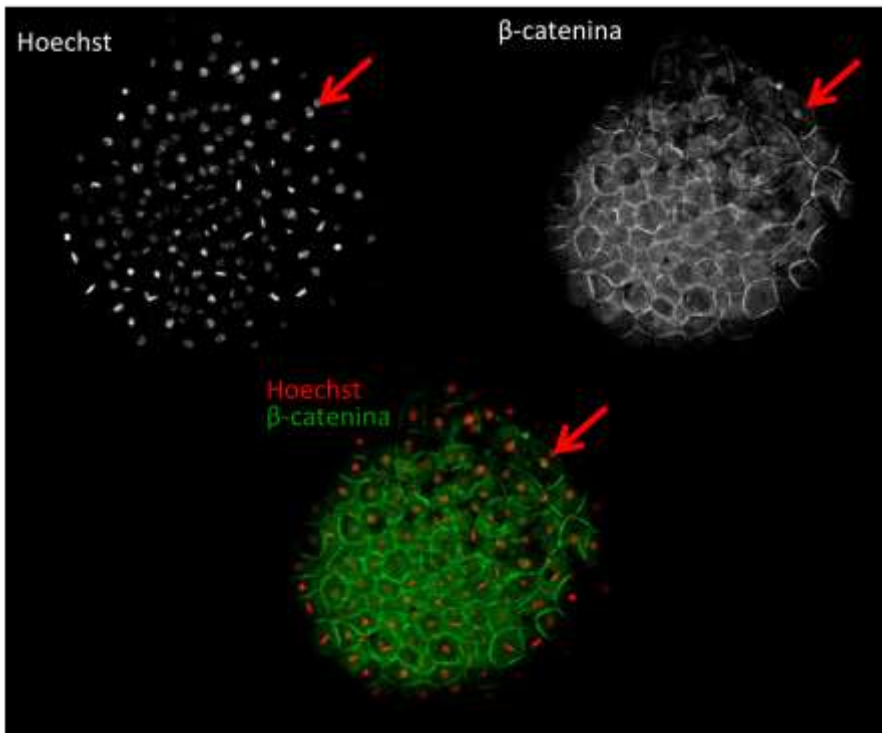


Fig.23 Corte óptico donde se aprecia la localización de  $\beta$ -catenina en algunos núcleos. El embrión se encuentra en la etapa de esfera. Izquierda: tinción con Hoechst. Derecha: tinción de  $\beta$ -catenina. Abajo: Superposición de las imágenes superiores. La flecha roja señala el mismo núcleo en las 3 figuras.

Las hibridaciones *in situ* fluorescentes de *atrx14* se realizaron en el estadio de 256 células, que es donde el gradiente era claramente visible en las tinciones con NBT/BCIP (Ver metodología). Utilizando el reactivo fluorescente FastRed también pudimos detectarlo [Fig.24].

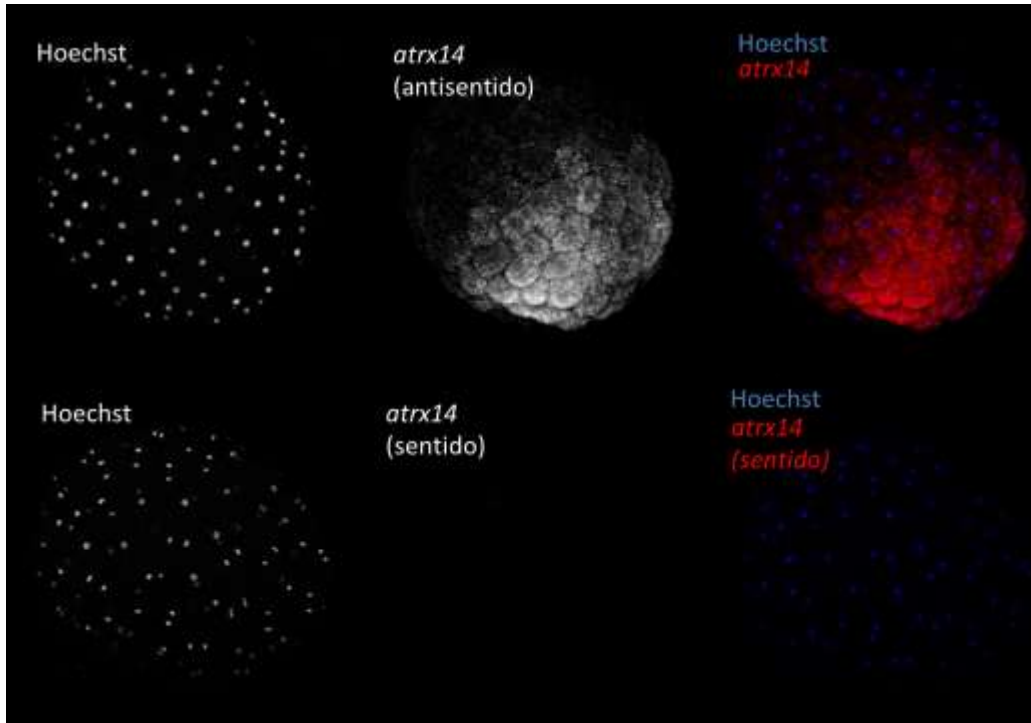


Fig.24. *atrx14* se distribuye en gradiente en la etapa de 256 células. Arriba: Hibridación *in situ* fluorescente de *atrx14*. La tinción se ve claramente en gradiente cuando se contrasta con la tinción de núcleos (derecha). Abajo: Hibridación *in situ* fluorescente utilizando un control de sonda sentido. La tinción de núcleos demuestra la presencia del embrión.

A pesar de eso, la doble tinción (donde se hizo primero la hibridación *in situ* y luego la inmunotinción) no nos permitió saber en qué parte se localiza el transcrito de *atrx14*. En una primera prueba, donde se tiñó el transcrito de *atrx14*, la proteína  $\beta$ -catenina y los núcleos con Hoechst, se observó que el patrón de  $\beta$ -catenina era distinto, localizándose ahora en todos los núcleos [Fig.25]. Debido a que el marcaje con Hoechst pudiera estar interfiriendo en la visualización de  $\beta$ -catenina, se realizaron nuevas tinciones ahora sin utilizar el marcaje de núcleos, sin embargo, el resultado fue el mismo [Fig.26]. Por lo tanto, el tratamiento de la hibridación *in situ* parece alterar el patrón de  $\beta$ -catenina, o al menos la ubicación del anticuerpo que la reconoce. Es importante mencionar que la intensidad de la inmunotinción disminuye de manera notable después del tratamiento con la hibridación *in situ* comparado con embriones en los que solamente se hizo la inmunotinción. Esto podría deberse a que el tratamiento con altas temperaturas y/o los detergentes utilizados para la hibridación modifican la permeabilización de las células, la estructura de  $\beta$ -catenina o de las otras proteínas de manera que el reconocimiento de los epítopes se altera.

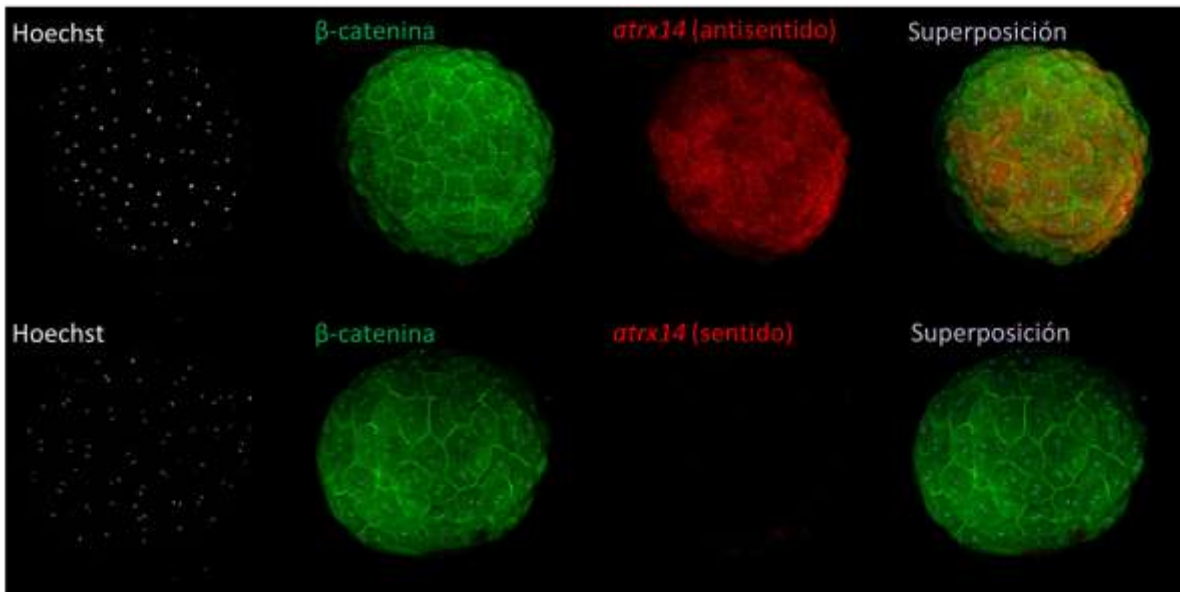


Fig. 25 El patrón de  $\beta$ -catenina se pierde con la tinción de la hibridación *in situ* de *atrx14*. Arriba: Triple tinción de núcleos (Hoechst, azul),  $\beta$ -catenina (verde) y *atrx14* (rojo). A la derecha se muestra la superposición de las tres imágenes. Abajo: Lo mismo pero utilizando la sonda sentido de *atrx14* en vez de la anti sentido como control.

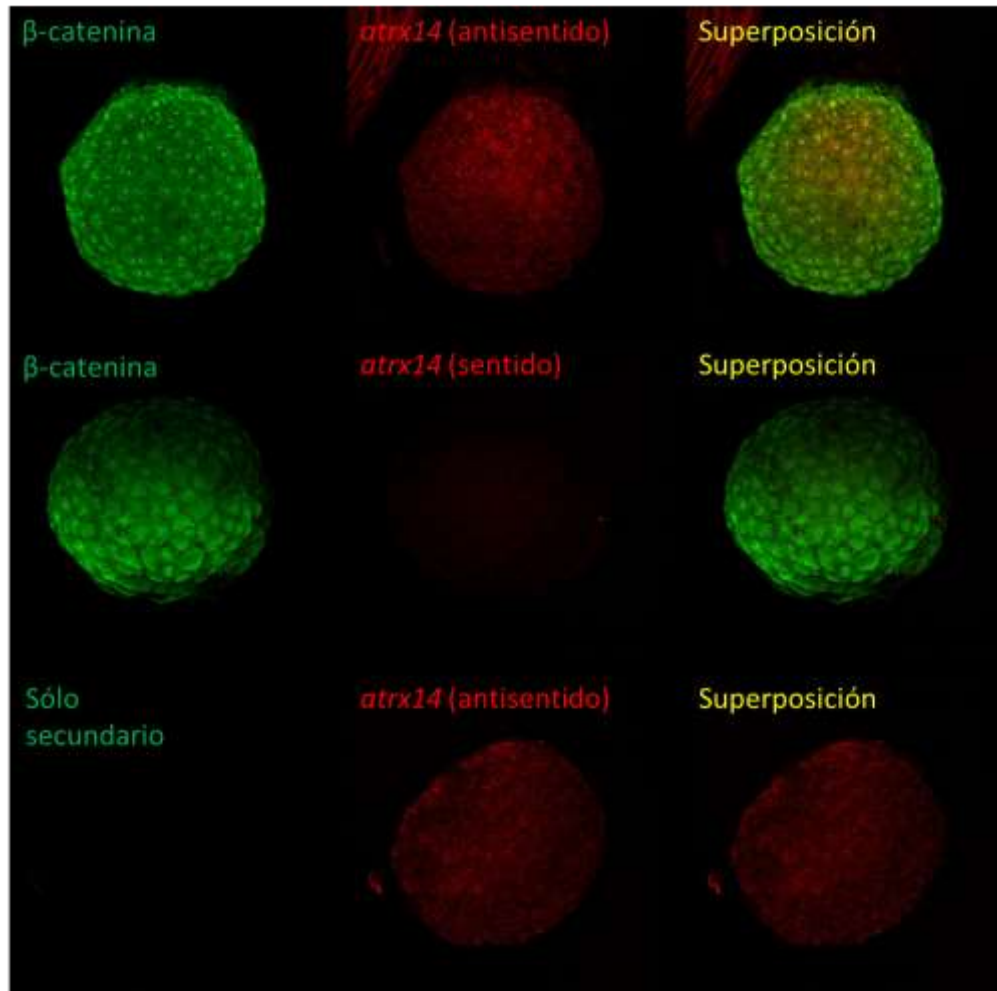


Fig. 26 Aun cuando no se utiliza el Hoechst, el patrón de  $\beta$ -catenina cambia. Arriba: Doble tinción de  $\beta$ -catenina (izquierda) con el transcrito de *atrx14* (en medio) y la superposición (derecha). Las filas de abajo muestran los controles de la sonda sentido y el anticuerpo secundario.

Una posible solución es invertir el orden de las tinciones. Otra posibilidad es hacer una hibridación *in situ* doble utilizando marcadores tempranos de ARN, ya que recientemente se publicó que el transcrito de *squint*, que codifica para una proteína tipo Nodal, se localiza de manera asimétrica en el futuro lado dorsal desde el estadio de 4 células (Kumari, et al., 2013).

#### **Microinyección de embriones con morfolidos.**

Se realizaron inyecciones del morfolino de *atrx14* que inhibe la traducción (ver metodología). Dentro del mismo experimento, además de utilizar como control de supervivencia a los embriones no inyectados, se inyecta otra parte de los embriones con un morfolino control (Mo Std Ctrl), cuya secuencia no coincide con ninguna secuencia de transcritos de pez cebra, y por lo tanto, no debe tener ningún efecto. Cada embrión se inyectó con 17.8ng de cualquiera de los 2 morfolidos y después se cuantificó el porcentaje de supervivencia de los embriones. Los resultados de esta cuantificación se muestran en la gráfica de la Fig.27a. Además, una parte de los embriones inyectados con el morfolino contra *atrx14* presentaban un rango de fenotipos ligeramente



ventralizantes. El fenotipo ventralizante se caracteriza por el aumento en las estructuras ventrales y la disminución de estructuras dorsales (Hammerschmidt, et al., 1996). Dentro del fenotipo ventralizante, los embriones menos afectados presentan defectos en la formación de la notocorda, mientras los más afectados carecen de cabeza o no poseen ningún territorio dorsal, a éstos últimos se les conoce como radializados (Thisse et al., 2011).

En nuestros resultados podemos observar el engrosamiento de la cola a expensas de la cabeza y la región anterior del tronco. Estos resultados se cuantificaron y se clasificaron de acuerdo a la severidad del fenotipo observado [Fig.27b, c].

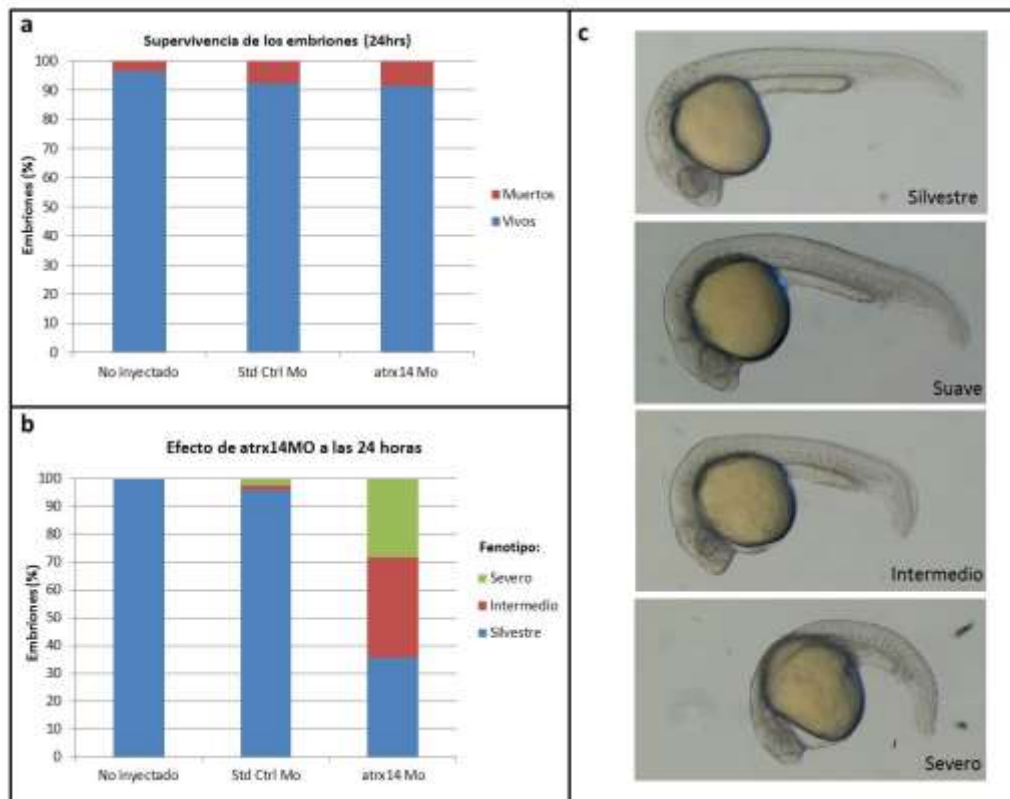


Fig.27 Inyección con el morfolino que inhibe la traducción de *atrx14*. Las gráficas muestran el promedio de 3 experimentos distintos (En total: n=447 para los no inyectados, n=128 para los inyectados con Std Ctrl MO, n=226 para los inyectados con *atrx14* Mo). (a) El porcentaje de supervivencia es similar entre los embriones no inyectados, los inyectados con el morfolino control (Std Ctrl Mo) y los inyectados con el morfolino de *atrx14* (*atrx14*MO). (b) Cuantificación de los embriones que presentan fenotipo, clasificados de acuerdo a la severidad del mismo. En (c) se muestra una imagen representativa de los distintos fenotipos obtenidos en la inyección.

Los embriones inyectados con morfolino de *atrx14* poseen una curvatura en la parte posterior de la cola, donde se puede observar cómo se altera la morfología normal de los somitas en la parte más posterior (perdiendo su forma característica en punta de flecha) y la región correspondiente a la isla de sangre se ensancha [Fig. 28d, e, f]. Además, el primordio de la aleta central (median fin fold en inglés) disminuye en la parte dorsal y presenta un relieve rugoso, a diferencia del control, donde el relieve es liso [Fig.29]. El cerebro anterior no se desarrolla de manera normal y la región de transición del cerebro medio y posterior (MHB “midbrain hindbrain boundary”) está afectada en los embriones con fenotipo suave y se pierde en aquellos con fenotipo intermedio [Fig. 30]. Como se puede observar, más de la mitad de los embriones inyectados con el morfolino específico contra *atrx14* presentaban fenotipo (ya sea severo o intermedio) [Fig.27b], mientras que los

embriones inyectados con el morfolino control y los no inyectados no presentan ningún fenotipo similar.

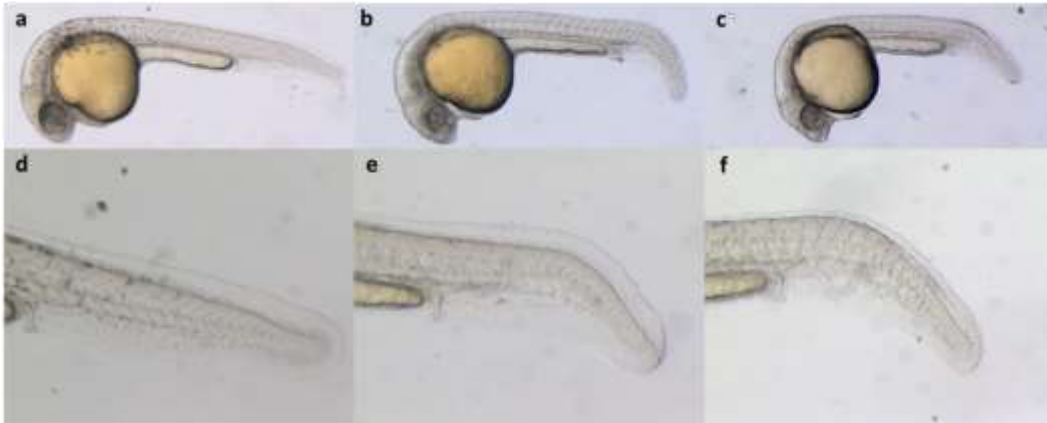


Fig.28 Los embriones inyectados con el morfolino contra *atrx14* presentan fenotipos ligeramente ventralizantes. (a,d) Embrión con fenotipo silvestre. En los acercamientos (8x) se observa la forma de la cola. (b,e) Embrión con fenotipo suave. En (e) se observa el ensanchamiento en la isla de sangre. (c,f) Embrión con un fenotipo intermedio. La isla de sangre también se encuentra ensanchada, además se pierde la morfología de los somitas en la región posterior. Estos embriones tienen 24 horas.

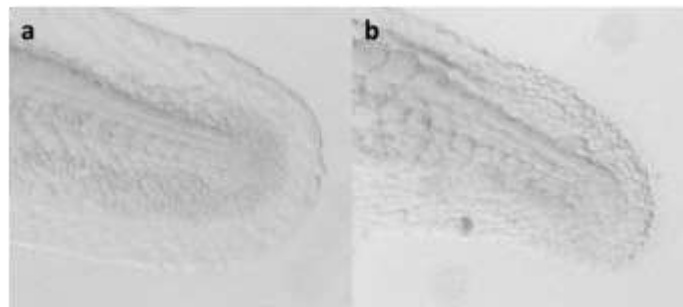


Fig.29 El primordio de la aleta (median fin fold en inglés) disminuye en los embriones inyectados con morfolino contra *atrx14*. (a) Embrión no inyectado. (b) Embrión morfante para *atrx14*. También aquí puede apreciarse la pérdida de la forma de punta de flecha en los somitas de embriones morfantes.



Fig.30. Los embriones inyectados con morfolino contra *atrx14* tienen alteraciones en la forma de la cabeza y la regionalización del cerebro. (a) Cabeza de embrión con fenotipo silvestre. (b,c) Cabeza de embrión con fenotipo suave e intermedio, respectivamente. La región MHB presenta defectos en los embriones con fenotipo suave y la regionalización del cerebro desaparece en los embriones más afectados. Estos embriones tienen 24 horas.

### **Hibridaciones *in situ* de marcadores**

Con el propósito de caracterizar si la inyección del morfolino contra *atrx14* afecta la determinación del eje dorso-ventral se realizaron hibridaciones *in situ* de los marcadores de *cordina* y *no tail*, cuya intervención en la vía de Wnt para la determinación del eje dorsoventral se da a distintos niveles [Fig.7].

#### **Hibridación *in situ* de *cordina***

El transcrito de *cordina* se expresa normalmente en la región dorsal del embrión y es un factor importante para mantener el gradiente de BMPs que da lugar a la correcta especificación del eje dorsoventral (Langdon & Mullins, 2011). Dado el fenotipo ventralizante de los embriones morfantes para *atrx14*, esperaríamos que la expresión de este transcrito estuviese disminuida. Para observar si existía este efecto se realizaron hibridaciones *in situ* de *cordina*. Primero observamos una disminución en la tinción en los embriones inyectados con el morfolino contra *atrx14* a diferencia del control y los embriones no inyectados, tanto en el estadio de esfera como después del comienzo de la epibolia [Fig.31].

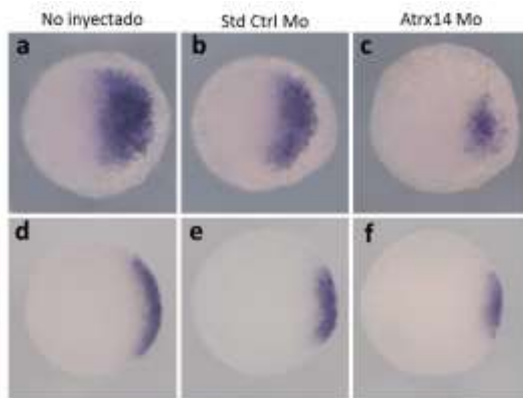


Fig. 31 La tinción de *cordina* disminuye en los embriones inyectados con morfolino específico para *atrx14* en los primeros experimentos. Hibridación *in situ* de *cordina* en diferentes condiciones indicadas en la parte superior. (a), (b), (c): Embriones en estadio de esfera. (d), (e), (f): Embriones en 30% epibolia. Todos los embriones están vistos desde el polo animal.

Posteriormente, se cuantificó y comparó el ángulo que abarca la tinción del marcador en las distintas condiciones (Ver metodología). Una vez más, los resultados indicaron que los embriones inyectados presentaban un ángulo menor de tinción [Fig.32].

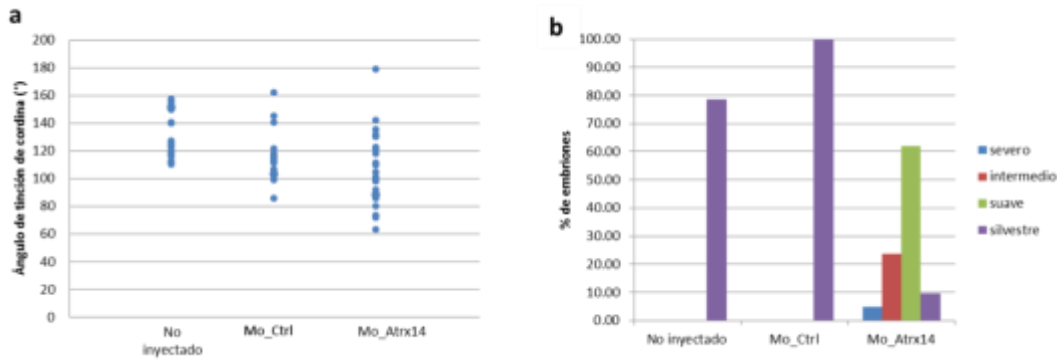


Fig.32 Cuantificación del ángulo de tinción de *cordina* en embriones morfantes para *atrx14*. En este experimento se puede ver una tendencia en los embriones morfantes para *atrx14* a presentar un ángulo menor de tinción de *cordina* comparado con los inyectados con morfolino control y los no inyectados, que coincide con el porcentaje de embriones con fenotipos. (a) Gráfica que representa las medidas del ángulo de tinción de cordina en las distintas condiciones. Cada punto azul representa un embrión (n=23 para No inyectado, n=19 para Mo\_Ctrl, n=23 para Mo\_Atrx14). (b) Porcentaje de embriones de acuerdo al fenotipo observado. (n=15 para No inyectado, n=13 para Mo\_Ctrl, n=22 para Mo\_Atrx14).

### Hibridación *in situ* de *no tail*

La notocorda es una de las estructuras más afectadas en embriones con fenotipos ventralizantes, dado que su biogénesis requiere la expresión correcta de componentes tanto de la vía de Wnt como de la vía de Nodal [Fig.7a]. Es por ello que también realicé hibridaciones *in situ* del marcador de notocorda *no tail* para ver si se encontraba alterado en los embriones inyectados con el morfolino específico contra *atrx14*.

La mayoría de los embriones silvestres (14 de 16 embriones, ver fig.33a y Tabla 2) e inyectados con morfolino control (8 embriones, ver fig.33a y Tabla 2) presentan una tinción normal a las 24 horas, mientras que muy pocos de los inyectados con el morfolino (1 de 13 embriones, ver fig.33a y Tabla 2) contra *atrx14* se ven de la misma forma. En cambio, una alta proporción de éstos últimos (12 de 13 embriones, ver fig.33b, 33c y Tabla 2) presenta alteraciones, ya sea solamente expresión extendida o expresión extendida y una pequeña interrupción en la parte posterior. Los embriones morfológicamente más afectados presentan mayores alteraciones en la expresión de *no tail* [Fig.34].



Fig.33 Distintos fenotipos encontrados en los embriones morfantes para *atrx14* cuando se hacen hibridaciones *in situ* de *no tail*. La expresión normal denota el patrón reportado previamente a las 24 horas en embriones no alterados. La mayoría de los embriones morfantes presentan expresión extendida y extendida interrumpida, (ver tabla 2).

Fenotipo Condición	Normal	Extendida	Extendida interrumpida
Silvestre	87.5%	12.5%	0%
Mo_Ctrl	100%	0%	0%
Mo_Atrx14	7.7%	38.5%	53.8%

Tabla 2. Comparación del porcentaje de los distintos fenotipos de expresión de *no tail* en distintos embriones no inyectados (silvestre, n=16 embriones), inyectados con morfolino control (Mo\_Ctrl, n=8 embriones) e inyectados con morfolino contra Atrx14 (Mo\_Atrx14, n=13 embriones). La figura 33 muestra un embrión representativo de cada uno de los fenotipos.



Fig. 34 Los embriones que parecen morfológicamente más afectados también presentan interrupciones más grandes en la expresión de *no tail* o una expresión extendida más anteriormente.

#### ***Pérdida de efectividad del morfolino***

La primera parte del trabajo con el morfolino contra *atrx14* consistió en la caracterización morfológica del fenotipo de embriones inyectados. Como se describió anteriormente, esta caracterización apuntó a un papel en la especificación del eje dorsoventral. Posteriormente, para comprobar esto, se realizaron hibridaciones *in situ* de los marcadores *cordina* y *no tail*. Durante la realización de estos experimentos siempre se deja un porcentaje de embriones sin fijar para cuantificar después los embriones con fenotipo. En esta etapa se observó que el porcentaje de embriones con fenotipos intermedios y severos disminuyó drásticamente entre los primeros experimentos y los siguientes, lo cual resultó en una gran variabilidad en los resultados, donde los experimentos subsecuentes no parecían presentar una tendencia clara a la disminución de la tinción de *cordina* [Fig.35].

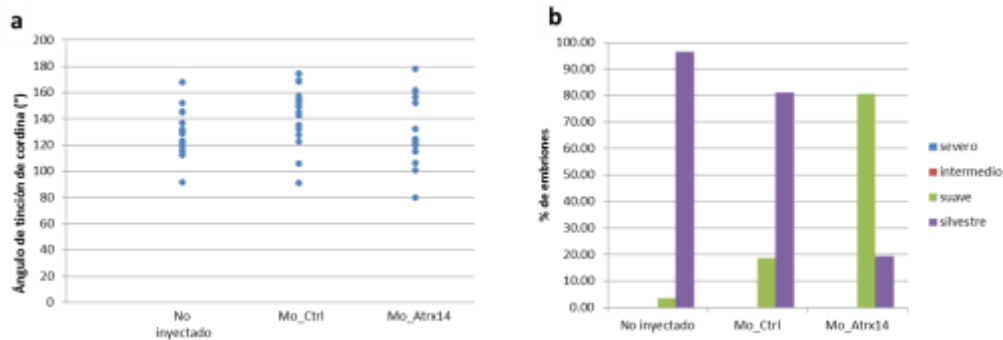


Fig.35. En inyecciones subsiguientes (posteriores a la de la Fig. 32) no se ve diferencia en el ángulo de tinción de *cordina*. Además, el porcentaje de embriones con fenotipos intermedios y severos disminuyó drásticamente. (a) Gráfica que representa las medidas del ángulo de tinción de *cordina* en las distintas condiciones. Cada punto azul representa un embrión (n=15 para No inyectado, n=16 para Mo\_Ctrl, n=14 para Mo\_Atrx14). (b) Porcentaje de embriones de acuerdo al fenotipo observado. (n=28 para No inyectado, n=16 para Mo\_Ctrl, n=31 para Mo\_Atrx14).

Es por ello que nos planteamos si el morfolino había perdido efectividad. Para comprobar esto, se hicieron inyecciones con mayor cantidad de morfolino por embrión y solamente al inyectar 35 ng por embrión pudimos observar de nuevo fenotipos un poco más severos, aunque no en la misma proporción que antes. Sin embargo, esta cantidad de morfolino ya resulta un poco tóxica para los embriones, pues incluso los inyectados con morfolino control comienzan a presentar algunas deformidades que no se observaban anteriormente.

Por otro lado, los experimentos de tinción de *no tail* realizados a la par de los últimos experimentos de tinción de *cordina* corroboran la disminución del fenotipo, pues aunque presentan extensión del marcador, la expresión ectópica de *no tail* no es tan fuerte como antes [Fig.36]

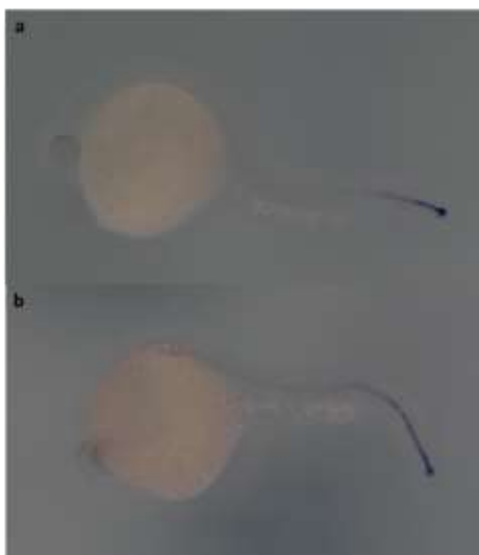


Fig.36 Los embriones inyectados con mayor cantidad de morfolino contra *atrx14* presentan un fenotipo ventralizante suave y alteraciones en la tinción de *no tail*. (a) Hibridación in situ de *no tail* en un embrión inyectado con el morfolino control. (b) Hibridación in situ de *no tail* en un embrión inyectado con 35 ng de morfolino contra *atrx14*. Como se puede ver, este embrión presenta una extensión en la tinción del marcador.

Los resultados obtenidos tanto en la cuantificación de los fenotipos como en las tinciones de *cordina* y *no tail* en embriones inyectados con morfolino contra *atrx14* apuntan a una pérdida de efectividad del morfolino. Sin embargo, los resultados previos sugieren que la inyección del morfolino contra *atrx14* altera el patrón de expresión de *cordina* y *no tail*, pues la proporción de los embriones más afectados coincide con la proporción de embriones que tienen estos patrones alterados. Por ello es esencial la repetición de estos experimentos con morfolino nuevo.

Además, como parte de los controles requeridos para comprobar la efectividad del morfolino se debe determinar mediante western blot que el nivel de la proteína baja. Para comprobar la especificidad de la disminución o eliminación de la función de *atrx14* se requiere hacer un rescate del fenotipo mediante la inyección de ARNm del transcrito.

### **Microinyección de embriones con ARN de *atrx14***

#### **Clonación del transcrito de *atrx14***

Se decidió inyectar a los embriones con el transcrito que codifica para la isoforma completa de la proteína. Para ello se intentó amplificar primero el cDNA de todo el transcrito, sin embargo, no fue posible obtener ningún producto, probablemente debido a la longitud del mismo (>6000pb), por lo que decidimos emplear una estrategia distinta, amplificándolos por partes (3 partes en total) [Fig. 37].

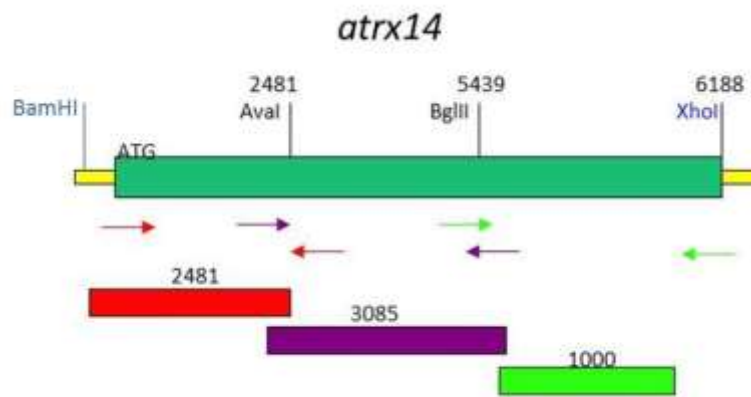


Fig.37 Estrategia de clonación del transcrito de *atrx14*. Arriba: Esquema del transcrito de *atrx14* donde se muestran los sitios de restricción que se utilizarán para la clonación y su posición en la secuencia. Las flechas de colores muestran el lugar donde se localizan los oligonucleótidos diseñados. Abajo se esquematizan los fragmentos que se amplificarán para la clonación en 3 partes. Los números representan el tamaño del fragmento. Los sitios de restricción en azul no se encuentran en la secuencia per se, sino en los oligonucleótidos modificados.

Cada fragmento se clonó de manera independiente en el vector pCR®2.1 (Invitrogen®) y después se secuenció. Todas las secuencias corresponden a lo reportado en la base de datos, con cambios menores que representan mutaciones sinónimas. Los fragmentos se unieron en el plásmido pCS2+, que contiene un promotor para la polimerasa Sp6, la cual se utilizó para hacer transcripciones *in vitro* (ver metodología).

### **Inyección del ARN de *atrx14***

Para conocer las concentraciones a las cuales el ARN de *atrx14* no produce efecto (importante para hacer el rescate con el morfolino) y ver si existía algún fenotipo asociado a su sobreexpresión, los embriones se microinyectaron con 4 distintas cantidades de ARN por embrión: 500pg, 650pg, 700pg y 800pg, todas dentro del rango comúnmente usado (50pg-1ng) según Bill et. al., 2009. Es importante mencionar que cada una de estas concentraciones solamente se ha inyectado una vez en los embriones por lo que es necesario repetirlas para corroborar los datos. También es esencial distinguir si el fenotipo obtenido en los embriones inyectados se debe a la acción del transcrito completo o a algún transcrito trunco o modificado, dado que en el gel desnaturalizante se observan dos productos obtenidos [Fig.18] aproximadamente en la misma proporción

Como se puede ver en la figura 38, la supervivencia de los embriones es dependiente de la dosis de ARN inyectado. Con la inyección de 800pg, más del 80% de los embriones mueren para las 24 horas. Sin embargo, todos los embriones llegan al estadio de esfera sin ningún fenotipo anormal aparente.

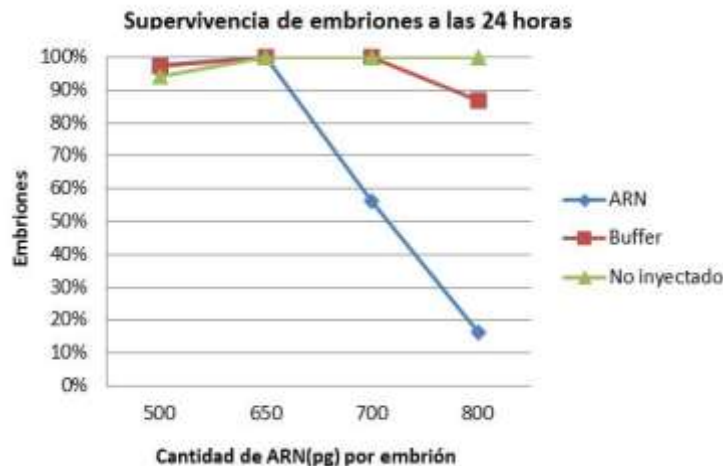


Fig.38 Porcentaje de supervivencia de los embriones en las primeras 24 horas del desarrollo inyectados con diferentes cantidades de ARN de *atrx14* por embrión. Cada inyección incluye su control de embriones no inyectados y los inyectados con el mismo volumen de buffer. Para 500pg: n=53 no inyectados, n= 39 inyectados con buffer y n=41 inyectados con ARN. Para 650pg: n=19 no inyectados, n= 12 inyectados con buffer y n=18 inyectados con ARN. Para 700pg: n=30 no inyectados, n= 32 inyectados con buffer y n=41 inyectados con ARN. Para 800pg: n=60 no inyectados, n= 23 inyectados con buffer y n=37 inyectados con ARN

Como se puede ver en las figuras 38 y 39, la inyección de 500pg no tiene efecto ni en la supervivencia ni en el fenotipo de los embriones, se comporta igual que los controles. Por lo cual esta concentración sería la adecuada para el rescate del morfolino. Concentraciones mayores tienen diversos efectos en los embriones, que se mencionan a continuación: la inyección de 650pg de ARN no tiene un efecto sobre la supervivencia de los embriones pero sí sobre el fenotipo a las 24 horas, donde 38.89% de los embriones presentan una gama de fenotipos que incluyen ojos fusionados, anoftalmía unilateral y embriones con el tronco deforme.



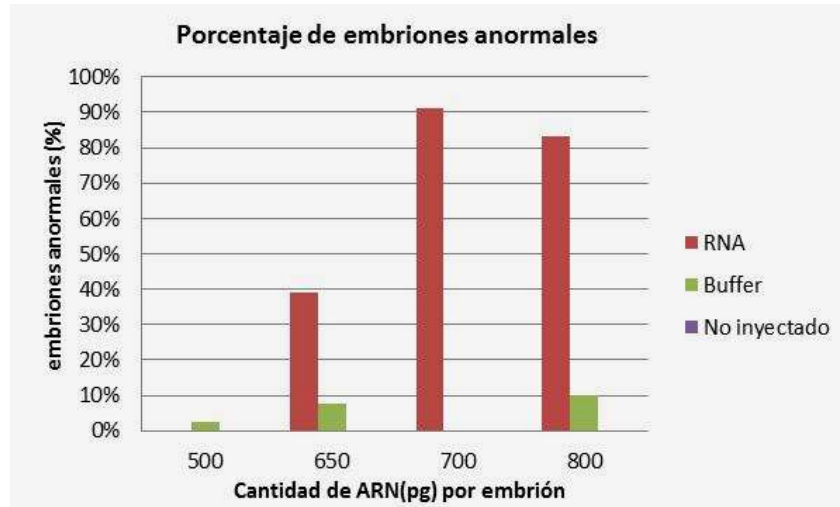


Fig.39 Porcentaje de embriones anormales de acuerdo a la cantidad de ARN inyectada por embrión. Para cada una de las inyecciones se muestra el control de embriones inyectados sólo con buffer y los no inyectados. El número de embriones en cada inyección para cada condición es el mismo que la Fig. 38. Es notable que los dos valores más altos presenten más de 80% de embriones con fenotipo anormal.

Los embriones inyectados con 700pg y 800pg de ARNm tienen un porcentaje menor de supervivencia (56.10% y 16.22%, respectivamente) y un fenotipo visible a partir del comienzo de la epibolia, donde comienzan a retrasarse en el desarrollo en comparación con los controles. Este fenotipo se distingue con mayor claridad en etapas más avanzadas de la epibolia y consiste en mayor engrosamiento de un solo lado del embrión durante la migración celular [Fig.40]. Se requiere el uso de marcadores dorsoventrales tempranos, como *cordina*, para determinar si este superengrosamiento corresponde con el lado ventral o dorsal de los embriones.

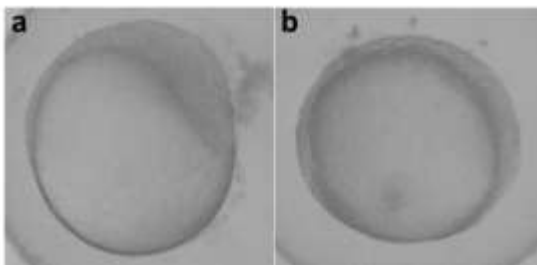


Fig.40. Fenotipo de los embriones inyectados con ARN de *atrx14* durante la epibolia. Aproximadamente el 50% de los embriones tienen un superengrosamiento en un solo lado del embrión (a), además de un retraso evidente en el desarrollo con respecto a los controles. En (b) se muestra un embrión que pertenece al 50% que no tiene un fenotipo aparente en este estadio. Estos embriones se inyectaron con 700pg de ARN.

91.30% de los embriones que sobreviven a la inyección de 700pg de ARNm de *atrx14* presentan fenotipos distintos al silvestre, que además de incluir los mencionados, también abarcan cíclopes, anoftalmía bilateral, ensanchamiento de la isla eritroblástica, embriones amorfos y defectos en la extensión del eje anteroposterior [Fig.41]. En lo que respecta a los embriones inyectados con 800pg de ARN, los pocos sobrevivientes tenían fenotipos muy similares, que incluían cíclopes y anoftalmía unilateral, falta total de la cola y embriones amorfos [Fig.42].

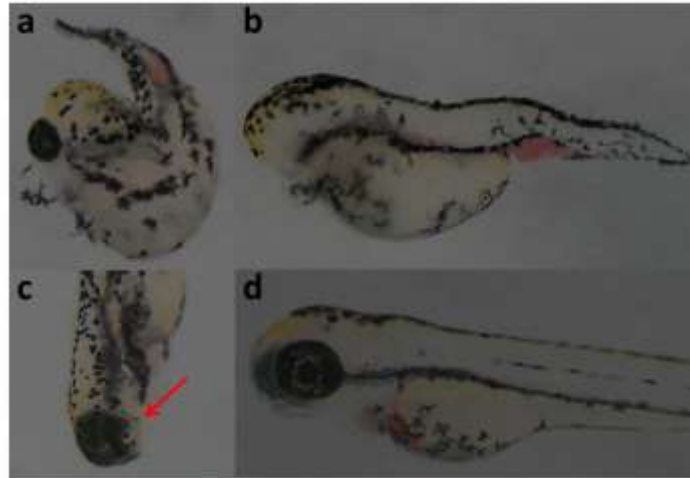


Fig.41 Fenotipos observados en embriones inyectados con 700pg de ARNm de *atrx14*. Estos defectos incluyen ciclopía (a), ensanchamiento de la isla eritroblástica (a y b), anoftalmía bilateral (b) o anoftalmía unilateral (c), a diferencia de los embriones inyectados con buffer (d) que no presentan ninguno de estos fenotipos. Estos embriones tienen 72 horas y se inyectaron con 700pg de ARN por embrión. Los embriones de (a),(b) y (d) se muestran en vista lateral, con el extremo anterior al frente, mientras que el (c) está en vista dorsal, con la parte anterior hacia abajo. La flecha roja señala la ausencia del ojo izquierdo.

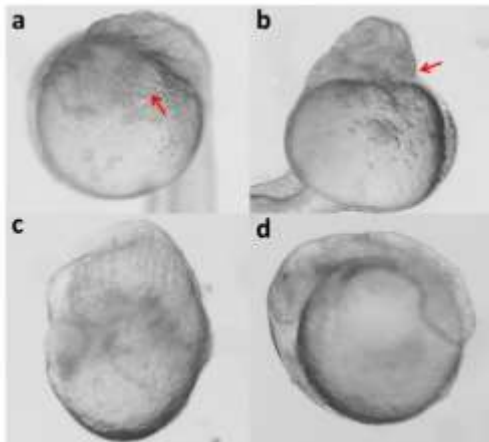


Fig.42 Fenotipos observados en embriones de 24 horas inyectados con 800pg de ARNm de *atrx14*. Estos embriones presentan fenotipos de anoftalmía unilateral (a), ciclopía (b), son amorfos (c) o no poseen cola (d).

Como se mencionó anteriormente, los datos presentados anteriormente son preliminares. Sin embargo, el hecho de que el porcentaje de embriones afectados aumente respecto a la concentración de ARN inyectado y que la gama de fenotipos observados sea la misma para las distintas inyecciones sugiere un efecto específico que se relaciona con mutantes de genes que participan en la especificación del eje dorsoventral.

#### ***Diseño de oligonucleótidos de atrx14 para CRISPRs***

Como se mencionó anteriormente, durante la realización de este proyecto (a principios del 2013) surgió la metodología CRISPR-Cas para la generación de mutantes estables en pez cebra (Hwang,

et al., 2013). Esta nueva metodología tiene la ventaja de ser mucho más sencilla que las descritas anteriormente (como ZFNs y TALENs), y permite la obtención de mutantes en un tiempo más corto. La utilización de mutantes presenta ciertas ventajas sobre el uso de los morfolinós, pues elimina la variabilidad que se tiene con las inyecciones, también elimina fenotipos inespecíficos y no requiere un control de muerte celular como en los morfolinós. A pesar de ello, ambos estudios son complementarios, pues la inyección del morfolino permite modular la cantidad de proteína de manera dependiente a la cantidad de morfolino inyectado mientras la mutante carece de la proteína. A continuación se describe brevemente la metodología para la generación de peces mutantes con la metodología CRISPR-Cas:

En el pez cebra, el primer paso es encontrar la secuencia del tipo 5'-GGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-NGG-3', alrededor de la cual se generarán las mutaciones. Esta secuencia se clona en un plásmido que se encuentra comercialmente disponible (<http://www.addgene.org/crispr/jounglab>) y que contiene el resto del esqueleto para el "ARN guía" con un promotor. También el plásmido que contiene la secuencia de la endonucleasa Cas9 se encuentra comercialmente disponible. Después se hace la transcripción *in vitro* de ambas secuencias y la inyección conjunta de los transcritos en el estadio de 1 ó 2 células (Hwang, et al., 2013).

Realicé una búsqueda para ver si en *atrx14* encontraba secuencias que coincidieran con las características de "ARN guía" que se requieren para dirigir a la endonucleasa. Para ello utilicé primero el programa ZiFit targeter (Sander, et al., 2007; Sander, et al., 2010), que busca posibles secuencias de acuerdo las constricciones que impone el sistema, utilizando la secuencia de *atrx14* a partir del ATG y hasta el nucleótido anterior al dominio ADD. Una vez que obtuve los resultados, analicé las posibles secuencias utilizando una herramienta de la página "CRISPR genome engineering resources" (<http://crispr.genome-engineering.org/>) que contiene todas las secuencias únicas en el genoma del pez cebra del tipo "5'-NNNNNNNNNNNN-NGG-3'" y encontré una coincidencia, que correspondía a la secuencia:

5'-GGTCCTGAGTTCGTAACAA-GGG-3'

Los oligonucleótidos que se requieren para clonar esta secuencia tienen la única restricción de que deben tener sitios compatibles con los extremos cohesivos que deja la enzima BsaI, con lo cual quedaron de la siguiente manera:

Oligonucleótido1: 5'-TAGGTCCTGAGTTCGTAACAA-3'

Oligonucleótido2: 5'-AAACTTGTTACGGAAGCTCAGGA-3'

Oligonucleótidos con esta secuencia pueden usarse para clonar el fragmento de *atrx14* que servirá como ARN guía y llevar a cabo el procedimiento de la generación de mutantes estables. Éstos servirían para corroborar los experimentos de pérdida de función que se describieron anteriormente.

Los embriones mutantes se pueden identificar y seleccionar de varias formas. Si el sitio a mutar contiene un sitio específico de alguna enzima de restricción, se puede distinguir un alelo silvestre de uno mutante por el cambio en el patrón de restricción de un fragmento que contenga este sitio (siempre y cuando la mutación elimine o modifique esta secuencia). Otra alternativa consiste en usar la endonucleasa CEL1, esta enzima hace una incisión en el extremo 3' de un mismatch en una de las dos cadenas de ADN de un heterodúplex, con lo cual podemos detectar cualquier clase de mutación que impida el apareamiento correcto de las dos cadenas (Oleykowski, et. al, 1998). El tercer método consiste en un análisis de la curva de disociación del ADN. Éste se basa en que la energía requerida para romper los puentes de hidrógeno entre las bases es dependiente de su longitud, contenido de GC y complementación, por lo tanto cadenas que contengan mutaciones requerirán una temperatura distinta (Ririe, et. al, 1997). Una vez que se ha comprobado la existencia de una mutación mediante uno de los métodos anteriores, ésta se evalúa mediante secuenciación. Esto nos permite conocer si el cambio introducido puede traducirse en uno que afecta la secuencia una vez que se traduce. Es importante conocer la naturaleza de la mutación dado que los cambios podrían ser por codones sinónimos o que no afecten el marco de lectura, con lo que podrían producirse proteínas funcionales.

## DISCUSIÓN

La disminución de *Atrx14* mediante la inyección de un morfolino específico ocasiona un fenotipo que consiste en la desaparición del límite entre el cerebro medio y posterior, cambios en la morfología de la cabeza, además del ensanchamiento de la isla de sangre y la deformación de las somitas posteriores. Estas características se asemejan a fenotipos encontrados con la disminución de proteínas involucradas en la especificación del eje dorsoventral, específicamente en la parte dorsal, por ejemplo,  $\beta$ -catenina2, *Cordina* y *Sizzled* [Fig.43b,c,e,f]. Muchas de éstas se requieren para mediar la formación o regular la función del organizador dorsal, que se define morfológicamente por el escudo. El mismo efecto puede verse también cuando se sobreexpresan transcritos de proteínas involucradas en promover la ventralización del embrión, como *Bmp4* [Fig.43 g,h,i].

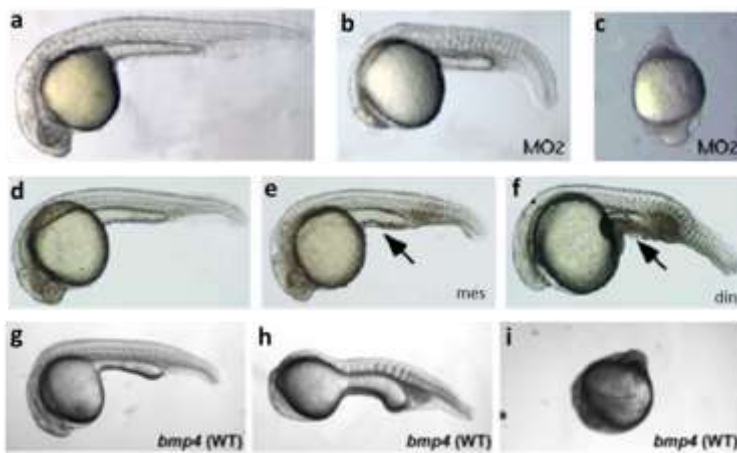


Fig.43. Mutantes en genes de la especificación dorsoventral que contribuyen a la parte dorsal tienen fenotipos ventralizantes. Comparación de un embrión no inyectado (a), con embriones morfantes para  $\beta$ -catenina2 con distinta severidad en el fenotipo (b,c). Mutantes *mes* (*sizzled*) (e), *din* (*cordina*) (f) comparadas con un embrión silvestre (d). (g-i) Embriones inyectados con ARNm de *bmp4* con distinta severidad de fenotipo. (a-c) Imágenes tomadas de Bellipanni, et al., 2006, (d-f) Hammerschmidt, et al., 1996. (g-i) Weber, et al., 2008.

Como se puede observar, la abolición o disminución de las proteínas mencionadas anteriormente (con un papel central en la especificación del eje dorsoventral) tiene, en general, un efecto dramático en los embriones. Sin embargo, esto no se observa en el caso de los morfantes de *Atrx14*. Posibles causas son: los morfolinos no disminuyen la cantidad de proteína de manera significativa (la cantidad de proteína que queda es suficiente para rescatar parte de la función), lo cual puede ser comprobado mediante un experimento tipo western blot con un anticuerpo específico que reconozca la proteína; tiene un papel regulatorio cuya disminución altera pero no abate la expresión de genes esenciales en la especificación de este eje, o actúa parcialmente redundante con otra proteína como su parólogo, *Atrx5*.

La formación y especificación del eje dorsoventral en pez cebra está mediada por factores maternos y cigóticos que actúan a través de las vías de Wnt, BMP, Nodal y FGF (Mullins & Langdon, 2011). Alteración en este proceso causa cambios en la expresión de genes que están regulados o son parte de estas vías. Los marcadores *cordina* y *no tail*, regulados por las vías de Wnt y Nodal, no sólo nos indican si existe una alteración en la especificación del eje dorsoventral, también nos pueden decir en qué parte de la vía se encuentra esta alteración. *Cordina* es un

inhibidor de las proteínas tipo BMP que se expresa poco después del inicio de la transcripción cigótica de manera dependiente a la translocación nuclear de  $\beta$ -catenina (Mullins & Langdon, 2011). Mutantes o morfantes para el gen de cordina presentan un fenotipo ventralizante [Fig.43f]. Cuando la alteración en la especificación del organizador dorsal es temprana, se pueden observar cambios en la expresión de este gen.

Debido a la pérdida de efectividad del morfolino en el transcurso de este trabajo, no se pudo observar si realmente existe una disminución del marcador *cordina* en los embriones inyectados. Análisis de cada inyección de manera independiente muestra que el porcentaje de embriones con un ángulo menor de tinción coincide a grosso modo con el porcentaje de embriones con fenotipo severo, lo cual nos exhorta a pensar que podría estar alterando la vía el comienzo de la transcripción cigótica. Sin embargo, se requiere realizar inyecciones con morfolino nuevo, de manera que el porcentaje de embriones afectados sea significativo y podamos ver si existe una diferencia real en la tinción de *cordina*.

Por otro lado, la notocorda, junto con la placa precordial, forma parte del mesodermo axial, el cual se deriva del organizador dorsal. Etapas morfológicamente distintas son aparentes durante su desarrollo. Poco después de la gastrulación, el cordamesodermo (antecedente directo de la notocorda) se distingue por su expresión continua del gen *no tail* (homólogo del gen *brachyury* de ratón) (Stemple et al., 1996). Las células de la notocorda diferenciadas adquieren una gran vacuola que le provee soporte estructural. Junto con estos cambios, los genes que se expresan en el cordamesodermo (incluyendo *no tail*) se extinguen conforme el tejido madura (Esterberg, et al., 2008).

El marcador de *no tail* a las 24 horas presenta dos características sobresalientes en los morfantes de Atrx14. Una es la extensión del marcador, lo que significa que la expresión de este gen se prolonga a comparación de los controles, asemejando embriones de estadios más tempranos. Embriones morfantes para *follistatin-like 1* y *follistatin-like 2* (*fstl1/2*) presentan un fenotipo similar de extensión de *no tail* [Fig.44 a, b]. El papel principal de estas proteínas es inhibir a *Bmp4* durante la gastrulación tardía (Esterberg, et al., 2008). De acuerdo con ello, la sobreexpresión de *bmp4* en este estadio también genera un fenotipo similar [Fig.44c, d]. Tanto las proteínas

Follistatin-like 1/2 como *Bmp4* participan en la especificación tardía del eje dorsoventral.

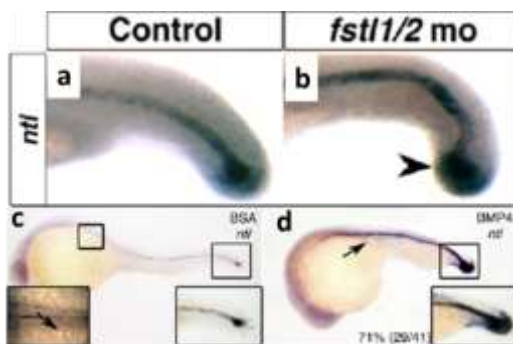


Fig.44. Morfantes de *follistatin-like 1/2* y la sobreexpresión de *bmp4* generan una extensión en el marcador de *no tail* a las 24 horas (a,b) y 27 horas (c,d). (a)Control de expresión de *no tail*. (b) Embriones inyectados con morfolinos específicos para *fstl 1/2*. La cabeza de flecha señala el primordio de la cola (c) *no tail* en embriones incubados con perlas empapadas en BSA. (d) Embriones incubados con perlas empapadas con proteína *Bmp4*. Las ampliificaciones muestran la punta de la cola. Imágenes tomadas de Esterberg, et al., 2008.

La segunda característica sobresaliente es que la expresión del marcador se encuentra, además, interrumpida en algunos embriones. Como se mencionó anteriormente, este fenotipo se vuelve más severo en los embriones que se ven morfológicamente más afectados. Fenotipos similares se han observado en embriones mutantes o morfantes en componentes de la vía de Nodal y Wnt involucrados en la especificación del eje dorsoventral. Por ejemplo, el factor transcripcional FoxH1 forma un complejo con Smad2 fosforilada y Smad4 y es importante para mantener la expresión de algunos genes de la vía de Nodal (Pogoda, et al., 2000) [Fig.7a]. En los embriones mutantes de FoxH1 la expresión de *no tail* es discontinua [Fig.45g-j]. Embriones morfantes para Wnt3a (que forma parte de la vía canónica de Wnt) presentan una expresión interrumpida muy similar a la observada en los morfantes para *atrx14* (Thorpe, et al., 2005) [Fig.45a-d]. Por otro lado, también presentan un patrón similar embriones morfantes para  $\beta$ -catenina 1 [Fig.45e y 45f], aunque hasta ahora no se le conoce ningún papel en la especificación del eje dorso-ventral (Zhang, et al., 2012).

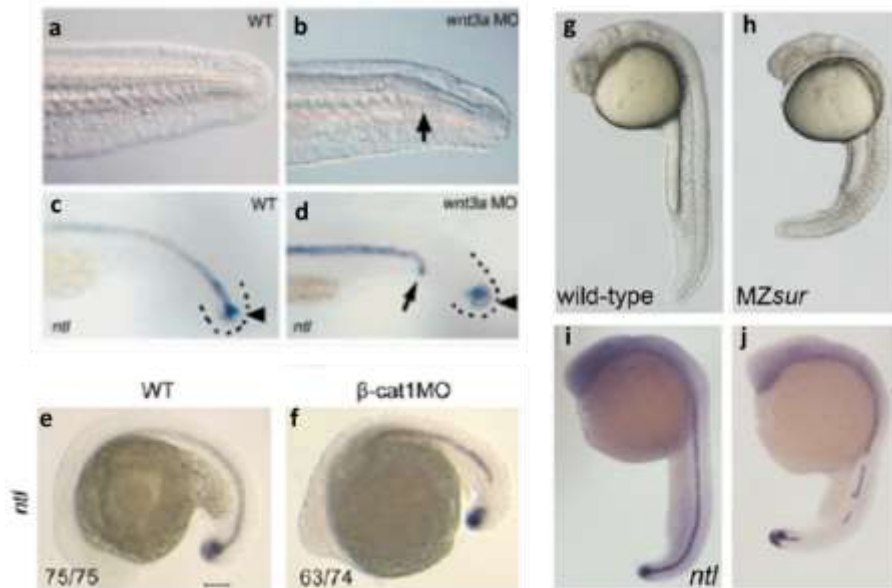


Fig.45 Morfantes o mutantes con fenotipos similares al de la morfante *atrx14* en la expresión de *no tail*. (a-d) Parte más posterior de la cola de embriones de 28hpf. Arriba: comparación del fenotipo morfológico de una silvestre con una morfante para *wnt3a*. La flecha señala la terminación prematura de la notocorda. Abajo: Hibridación in situ de *no tail*. La flecha señala el final de la notocorda truncada. La cabeza de flecha señala el primordio de la cola. (e-f) Hibridaciones in situ de en un embrión silvestre (e) y un morfante de *beta-catenina 1* (f) en el estadio de 19 somitas. (g-j) Imágenes de embriones de 24 horas. Arriba: embriones con fenotipo silvestre (g) y mutante materna-cigótica de FoxH1 (h). Abajo: Hibridaciones in situ del marcador *no tail* en embriones silvestres (i) y mutantes FoxH1(j). Estas imágenes están tomadas y modificadas de (a-d) (Thorpe, et al., 2005), (e-f) (Zhang, et al., 2012), (g-j) (Slagle, et al., 2011).

Las alteraciones en el marcador *no tail* sugieren un posible papel regulatorio de *Atrx14* a distintos niveles, involucrado en las vías de Nodal y/o Wnt. Alteraciones similares pueden encontrarse en genes previamente asociados con la especificación del eje dorsoventral. Debido a que las tinciones del marcador de *no tail* se hicieron en embriones de 24 horas es necesario realizar hibridaciones *in situ* en estadios más tempranos del desarrollo (durante la epibolia). De esta manera será posible

comprobar que los defectos fenotípicos son resultado de una alteración temprana en el establecimiento de los ejes y descartar que se deba a algún proceso que sucede más tarde en el desarrollo.

Con el objetivo de buscar la dosis adecuada de ARNm de *atrx14* para realizar el rescate de las morfantes de *Atrx14* se inyectaron distintas cantidades de mensajero. Los embriones inyectados con 500pg de ARNm no presentan diferencias fenotípicas con los controles, con lo cual esta concentración sería ideal para realizar el rescate. Inyecciones de concentraciones más altas (650pg o más) presentan fenotipos en el desarrollo del ojo, la disminución del eje antero-posterior y defectos durante la epibolia.

Sabemos, por hibridaciones *in situ*, que *atrx14* se expresa en el primordio del ojo desde el estadio de 8 somitas y que mantiene su expresión al menos hasta las 24 horas. Los defectos observados en los ojos podrían deberse a que la sobreexpresión en esta región altera su desarrollo normal modificando la expresión de proteínas que participan en éste.

Asimismo en la literatura se reportan casos en que cambios en la expresión de proteínas más ubicuas generan fenotipos similares. Un ejemplo es la CiclinaH, cuya función principal es regular la activación de la proteína Cdk7, subunidad catalítica del complejo CAK (“Cdk-activating kinase”) importante para la progresión del ciclo celular y el inicio de la transcripción (Liu, et al., 2007). La inyección de una dominante negativa de CiclinaH genera detención del desarrollo en el estadio de blástula media y muerte en el 36% de los embriones (Liu, et al., 2007). Los embriones que quedan comienzan a retrasarse al comienzo de la epibolia, al igual que con la inyección de *atrx14*, y tienen un fenotipo parecido en esta etapa [Figs.46a, 46b]. Para las 60 horas presentan defectos severos en la cabeza y los ojos, además de un cuerpo pequeño. Las aberraciones en estos embriones son notorias particularmente en el ojo, con defectos que incluyen anoftalmía bilateral, unilateral o fusión de los ojos [Fig. 46c] (Liu, et al., 2007)

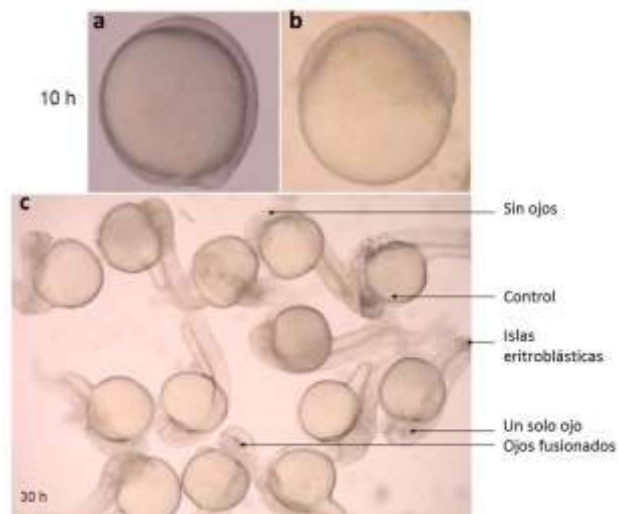




Fig.46 La expresión de una proteína dominante negativa de CiclinaH (CiclinaH<sup>DN</sup>) también genera retraso en el desarrollo y alteraciones en la formación del ojo. (a) Embrión control inyectado con GFP a las 10 horas, (b) embrión inyectado con CiclinaH<sup>DN</sup> a las 10 horas. (c) Fenotipos que presentan los embriones de (b) a las 24 horas. Esta imagen fue tomada de Liu, et al., 2007.

Dado el patrón de expresión de *atrx14* y su papel como remodelador de la cromatina (importante en la regulación transcripcional), no es inusual que su sobreexpresión presente un fenotipo similar al de proteínas como Pax6b o ciclinaH. Aunque, como se mencionó anteriormente, el fenotipo de las morfantes de *atrx14* parece indicar que existe un efecto temprano relacionado con la especificación del eje dorsoventral, pues los embriones inyectados con el morfolino que inhibe la traducción de *atrx14* presentan una expansión de tejidos ventrales (como la isla de sangre). Acorde con ello, también el aumento en proteínas involucradas en esta vía, y que además se expresan durante el desarrollo temprano, generan fenotipos similares.

Por ejemplo, la ciclopía en el pez cebra se ha asociado comúnmente a mutantes en la vía de Nodal [Fig.7], la cual es importante primero en la especificación del eje dorsoventral (Kumari, et al., 2013) y más adelante en la especificación del endodermo y mesodermo (Pei & Feldman, 2009). La disminución de las proteínas tipo Nodal Cyclops y Squint generan embriones cíclopes o con ojos parcialmente fusionados (Aquilina-Beck, et al., 2007) [Fig.47], lo mismo sucede con el co-receptor de las mismas One-eyed pinhead (Oep, ver Fig. 7, Zhang, J., et al., 1998). Los embriones mutantes en cualquiera de los ligandos tipo Nodal también presentan anomalías en el rostro y el cerebro anterior (Pei & Feldman, 2009).

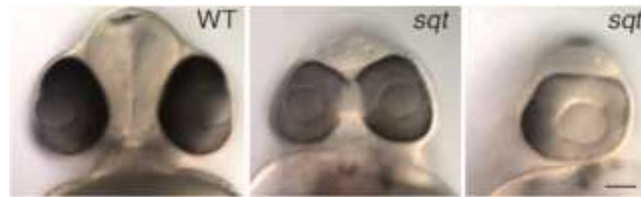


Fig.47 Embriones mutantes para Squint presentan alteraciones en la formación de los ojos. Izquierda: Los ojos de embriones silvestres y unos pocos mutantes para Squint están completamente separados. En medio: Otros mutantes tienen los ojos parcialmente fusionados con dos lentes. Derecha: Algunos tienen un solo ojo con un lente. Figura tomada de: Aquilina-Beck, et al., 2007

Además, alteraciones en la expresión de genes que participan en las vías canónica y no-canónica de Wnt pueden generar también fenotipos en el desarrollo de los ojos. Como Wnt8a, se propone que la proteína materna determina el lado dorsal del embrión mientras que la cigótica participa en la formación temprana de un patrón que dará lugar al mesodermo (Lekven, et al., 2001). La sobreexpresión de los homólogos de Wnt8 (Wnt8a y Wnt8b en pez cebra) también genera algunos fenotipos similares a los encontrados con la inyección de ARN de *atrx14*. Más de la mitad de los embriones presentan defectos principalmente en la región dorso anterior. La mayoría no desarrollan uno o los dos ojos [Fig.48] y tienen una pérdida en el límite del cerebro medio-posterior (Kelly, et al., 1995). Con mayores cantidades de ARN los embriones presentan fenotipos más severos que incluyen embriones amorfos y radializados (Kelly, et al., 1995).

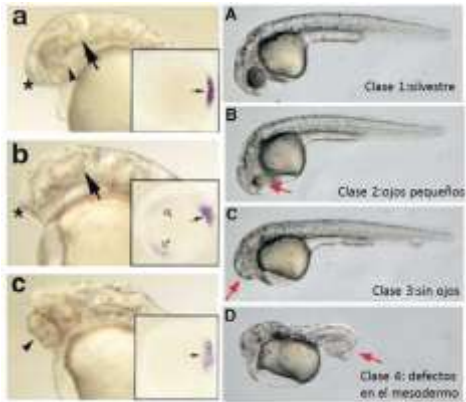


Fig.48 La sobreexpresión de Wnt8a también está asociada a defectos en la formación de los ojos y el mesodermo axial. (a,b,c) sobreexpresión de cada uno de los 2 ORFs que se encuentran en el locus de *wnt8a*. Se muestran vistas laterales de la cabeza a las 24 horas. Los insertos muestran el patrón de expresión del gen *gooseoid* (un marcador dorsal) en el estadio de escudo. (a) Embrión silvestre, (b) sobreexpresión del ORF1, nótese la ausencia del ojo, (c) Embrión que sobreesprime el ORF2, la cabeza de flecha señala el ojo único. Las flechas señalan el límite entre el cerebro medio y posterior y los asteriscos el telencéfalo. (A,B,C,D) Sobreexpresión del ORF1. Los embriones se clasificaron de acuerdo a la severidad del fenotipo en 4 clases. Es notoria la falta de ojos en los embriones clase 3. Las flechas rojas en (B) y (C) marcan la región de los ojos, y la flecha en (D) resalta el fenotipo enrollado de la cola. Estos embriones tienen 30 horas. (a,b,c) Imagen tomada de Lekven, et al., 2001. (A,B,C,D) Imagen tomada de: Weidinger, et al., 2005

Mutaciones en los genes *bozozok (boz)* y *silberblick (slb/wnt11)* también pueden causar ciclopía (Pei & Feldman, 2009). Embriones transgénicos que expresan  $\beta$ -catenina 1 bajo el promotor *hsp70* activado en el estadio de esfera por choque de calor presentan falta de la parte anterior de la cabeza [Fig.49] (Caron, et al., 2012).



Fig.49 La sobreexpresión de  $\beta$ -catenina 1 genera anoftalmía. Embriones transgénicos para una construcción de  $\beta$ -catenina 1 bajo el promotor *hsp70*. Arriba: Embrión al que no se le dio choque de calor. Abajo: Embrión en el que se activó la expresión del transgen a través de un choque de calor en el estadio de esfera. Imagen tomada de Caron, et al., 2012.

Para determinar de manera específica qué vía (o vías) están afectadas con la sobreexpresión de *Atrx14* se necesita realizar hibridaciones *in situ* tanto de *cordina* y *no tail* como de otros marcadores de las vías de Nodal, Wnt y BMPs en embriones inyectados con el ARNm de *atrx14*.

Es importante mencionar que el fenotipo de sobreexpresión de *Atrx14* podría representar una dorsalización parcial. No es raro que en este tipo de experimentos no se obtenga el fenotipo completamente opuesto al de la pérdida de función. Ello puede deberse a la sensibilidad a la dosis de la proteína o el ARNm, o podría asociarse a proteínas cuya intervención se da en varios momentos distintos del desarrollo, realizando diversas tareas en diferentes tejidos.

Otra posibilidad sería que el aumento en el nivel de proteína suceda en un momento posterior al de las funciones más tempranas, por lo que el efecto solamente es notorio en los procesos subsecuentes. Esto se podría comprobar con un western blot en diferentes momentos del desarrollo después de la inyección de ARNm, para checar qué tan temprano se da el aumento en el nivel de proteína.

A pesar de que la penetrancia del fenotipo de ganancia de función es alta y el fenotipo parece ser mucho más severo que con la pérdida, los resultados obtenidos en este trabajo deben tomarse con cautela dado que es necesario corroborar que lo visto por las inyecciones de ARN es debido a un aumento en la cantidad de Atrx14 (la proteína completa) y no por interacciones que surgen como una función de *novo* ocasionados por la sobreexpresión únicamente de un fragmento de la proteína, sobre todo debido a que en la transcripción *in vitro* se producen dos bandas. Esto puede deberse a que exista un sitio de terminación prematuro o que el ARN tenga una estructura secundaria muy rígida y persistente. Sin embargo, los resultados preliminares obtenidos con la inyección del ARNm de *atrx14* parecen apuntar también a un posible defecto en la especificación del eje dorsoventral.

La falta de una metodología eficiente para la generación de mutantes estables en pez cebra fue una limitante que impidió los análisis de genética reversa durante mucho tiempo. A pesar de la existencia de mutagénesis a gran escala, existen una gran gama de genes de los que no se tienen mutaciones disponibles por este método. Recientemente, se han logrado diseñar técnicas que facilitan la mutación de genes específicos en el pez cebra, las más sobresalientes son las nucleasas de zinc finger (ZFN, por sus siglas en inglés), los TALEN y el sistema CRISPR-Cas (descrito arriba). Siendo esta última la más sencilla en términos metodológicos. Esta técnica se describió a principios del año 2013 y ha tenido una rápida expansión, lo cual ha permitido grandes avances orientados a aumentar su especificidad y simplicidad. Tiene una tasa bastante alta de mutagénesis (Hwang, et al., 2013) y ya existen numerosos ejemplos de su uso, tanto en pez cebra (Hwang, et al., 2013) como en otras especies (Pennisi Elizabeth, 2013).

En el laboratorio está comenzando a implementarse esta técnica, por lo que hice una búsqueda de los posibles ARN guías que se podrían generar para *atrx14*, utilizando solamente la secuencia 5' al dominio ADD. Esto con el propósito de evitar en lo posible la generación de una proteína trunca que pueda tener un remanente de la función o adquiera funciones que no se encuentran en la proteína original. Existe una secuencia contenida en el exón 4 con las características necesarias y pocas probabilidades de inespecificidad (las secuencias más similares en el genoma de pez cebra no se encuentran dentro de ningún exón y tienen de 3 a 4 nucleótidos distintos). La generación de una mutante de *atrx14* sería una herramienta muy útil que permitiría comprobar los resultados obtenidos con los morfolinis y plantearse nuevas preguntas.

## CONCLUSIONES

El transcrito *atrx14* de pez cebra se caracteriza por una expresión en gradiente que sugiere un papel en la especificación del eje dorsoventral. La inyección de un morfolino específico contra *atrx14* genera un fenotipo ligeramente ventralizante en los embriones, que tienen malformaciones en la cola, la cabeza y la notocorda.

En el transcurso de este trabajo el morfolino fue perdiendo efectividad, esto puede ser debido a la precipitación del mismo por un problema con la solubilidad ([https://www.genetools.com/morpholino\\_antisense\\_oligos](https://www.genetools.com/morpholino_antisense_oligos), Bill et. al, 2009). Sin embargo, cuando la proporción de embriones afectados era alta, el marcador de *cordina* tendía a disminuir en los embriones inyectados, lo cual apunta a un papel temprano en la regulación de la especificación del eje dorsoventral.

También *no tail*, un marcador de notocorda, se altera en los embriones morfantes de *atrx14*, su expresión se extiende en los embriones con fenotipos suaves e intermedios y, en los embriones con fenotipos severos, la expresión es interrumpida. Ambos fenotipos sugieren la desregulación en una vía temprana en el desarrollo de la región dorsal.

Con los experimentos de inyección de ARNm de *atrx14* se determinó que 500pg era una concentración adecuada para realizar el rescate del morfolino, debido a que no disminuye la viabilidad de los embriones ni genera fenotipos anormales. Por otro lado, la inyección de dosis mayores de *atrx14* generan un fenotipo parcialmente dorsalizante en el que se distinguen defectos en el desarrollo del ojo (anoftalmía uni o bilateral y ciclopía) y defectos en la extensión del eje antero-posterior. Estas malformaciones comúnmente están asociadas con la vía de Nodal en el desarrollo temprano o con la vía de Wnt y su participación en la especificación del eje dorsoventral, además de los movimientos de convergencia-extensión que suceden durante la epibolia.

Los resultados obtenidos al inyectar en el pez cebra un morfolino específico contra *atrx14* o al inyectar el ARN de su transcrito evidencian la importancia de su función durante el desarrollo e insinúan un posible papel en la especificación del eje dorsoventral, aunque también sugieren su participación en otros procesos más tarde en el desarrollo.

## PERSPECTIVAS

El tiempo de vida del morfolino contra *atrx14* es muy corto, por ello primero sería necesario repetir las inyecciones de ARN para corroborar los resultados obtenidos en cuanto a la concentración ideal para hacer el rescate. Una vez teniendo esto, es esencial repetir las inyecciones con morfolino nuevo, hacer las hibridaciones *in situ* de *cordina* y *no tail* en 30% de epibolia y realizar el rescate. Todo ello con la comprobación mediante western blot de la disminución (y restauración, en el caso del rescate) del nivel de la proteína.

Por otro lado, los CRISPRs como tecnología para introducir modificaciones en el genoma han probado ser altamente específicos y eficientes en el pez cebra (Jao, et al., 2013), además de ser metodológicamente más simples que otros métodos desarrollados anteriormente. Debido a esto, la generación de mutantes de *Atrx14* representaría un gran avance, permitiéndonos no sólo corroborar los experimentos previos sino eliminar la variabilidad que, aunque poca, podría estar generando la microinyección.

Además, es importante determinar en qué momento del desarrollo contribuye *Atrx14* con la especificación del eje dorsoventral. Para ello es necesario determinar si disminuyen los niveles de expresión de sus genes blanco al inyectar el morfolino específico o analizar la transcripción en embriones mutantes para *atrx14*. Conocer el papel de esta proteína en la especificación del eje dorsoventral nos puede llevar elucidar cómo participa en la regulación de genes y sobre qué vías específicas tiene un efecto.

## BIBLIOGRAFÍA

- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research*, 25(17), 3389-402.
- Aquilina-Beck, A., Ilagan, K., Liu, Q. and Liang, J. O. (2007). Nodal signaling is required for closure of the anterior neural tube in zebrafish. *BMC developmental biology*, 7, 126-146.
- Argentaro, A., Yang, J.-C., Chapman, L., Kowalczyk, M. S., Gibbons, R. J., Higgs, D. R., Neuhaus, D., et al. (2007). Structural consequences of disease-causing mutations in the ATRX-DNMT3-DNMT3L (ADD) domain of the chromatin-associated protein ATRX. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(29), 11939-44. doi:10.1073/pnas.0704057104
- Bassett, A. R., Cooper, S. E., Ragab, A., & Travers, A. A. (2008). The chromatin remodelling factor dATRX is involved in heterochromatin formation. *PLoS one*, 3(5), e2099. doi:10.1371/journal.pone.0002099
- Baumann, C., & De La Fuente, R. (2009). ATRX marks the inactive X chromosome (Xi) in somatic cells and during imprinted X chromosome inactivation in trophoblast stem cells. *Chromosoma*, 118(2), 209-22. doi:10.1007/s00412-008-0189-x
- Bellipanni, G., Varga M., Maegawa, S., Imai, Y., Kelly, C., Myers, A. P., Chu, F., Talbot, W. S., Weinberg, E. S. (2006). Essential and opposing roles of zebrafish  $\beta$ -catenins in the formation of dorsal axial structures and neurectoderm. *Development* 133, 1299-1309 doi:10.1242/dev.02295
- Bérubé, N. G., Smeenk, C. A., & Picketts, D. J. (2000). Cell cycle-dependent phosphorylation of the ATRX protein correlates with changes in nuclear matrix and chromatin association. *Human molecular genetics*, 9(4), 539-47.
- Bérubé, N. G., Mangelsdorf, M., Jagla, M., Vanderluit, J., Garrick, D., Gibbons, R. J., Higgs, D. R., et al. (2005). The chromatin-remodeling protein ATRX is critical for neuronal survival during corticogenesis. *The Journal of Clinical Investigation*, 115(2). doi:10.1172/JCI200522329.258
- Bérubé, N. G., Jagla, M., Smeenk, C., De Repentigny, Y., Kothary, R., & Picketts, D. J. (2002). Neurodevelopmental defects resulting from ATRX overexpression in transgenic mice. *Human molecular genetics*, 11(3), 253-61.
- Bill, B. R., Petzold, A. M., Clark, K. J., Schimmenti, L. A., and Ekker, S. C. (2009). A Primer for Morpholino Use in Zebrafish. *ZEBRAFISH*, 6(1), 69-77. doi: 10.1089=zeb.2008.0555.
- Caron, A., Xu, X. & Lin, X., 2012. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling directly regulates Foxj1 expression and ciliogenesis in zebrafish Kupffer's vesicle. *Development (Cambridge, England)*, 139(3), pp.514-24.
- Dal-Pra, S., Fürthauer, M., Van-Celst, J., Thisse, B., Thisse, C. (2006). Noggin1 and Follistatin-like2 function redundantly to Chordin to antagonize BMP activity. *Developmental Biology* (298) 514-526.
- Dhayalan, A., Tamas, R., Bock, I., Tattermusch, A., Dimitrova, E., Kudithipudi, S., Ragozin, S., et al. (2011). The ATRX-ADD domain binds to H3 tail peptides and reads the combined methylation state of K4 and K9. *Human molecular genetics*, 20(11), 2195-203. doi:10.1093/hmg/ddr107

- Dougan S. T., Warga R. M., Kane D. A., Schier A. F., Talbot W. S. (2003). The role of the zebrafish nodal-related genes *squint* and *cyclops* in patterning of mesendoderm. *Development*, 130(9), 1837-51.
- Esterberg, R., Delalande, J., Fritz, A. (2008). Tailbud-derived Bmp4 drives proliferation and inhibits maturation of zebrafish chordamesoderm. *Development* 135, 3891-3901, doi:10.1242/dev.029264.
- Eustermann, S., Yang, J.-C., Law, M. J., Amos, R., Chapman, L. M., Jelinska, C., Garrick, D., et al. (2011). Combinatorial readout of histone H3 modifications specifies localization of ATRX to heterochromatin. *Nature structural & molecular biology*, 18(7), 777-82. Nature Publishing Group. doi:10.1038/nsmb.2070
- Gaj, T., Gersbach, C. A., Barbas III, C. F. (2013). ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends in Biotechnology*, 31(7), 397-405. doi: 10.1016/j.tibtech.2013.04.004.
- Garrick, D. (2004). A conserved truncated isoform of the ATR-X syndrome protein lacking the SWI/SNF-homology domain. *Gene*, 326, 23-34. doi:10.1016/j.gene.2003.10.026
- Garrick, D., Sharpe, J. A., Arkell, R., Dobbie, L., Smith, A. J. H., Wood, W. G., Higgs, D. R., et al. (2006). Loss of *Atrx* affects trophoblast development and the pattern of X-inactivation in extraembryonic tissues. *PLoS genetics*, 2(4), e58. doi:10.1371/journal.pgen.0020058
- Gibbons, R. J., McDowell, T. L., Raman, S., O'Rourke, D. M., Garrick, D., Ayyub, H., & Higgs, D. R. (2000). Mutations in ATRX, encoding a SWI/SNF-like protein, cause diverse changes in the pattern of DNA methylation. *Nature genetics*, 24(4), 368-71. doi:10.1038/74191
- Gibbons, R. J. (2006). Alpha thalassaemia-mental retardation, X linked. *Orphanet journal of rare diseases*, 1, 15. doi:10.1186/1750-1172-1-15
- Gibbons, R. J., Wada, T., Fisher, C. a, Malik, N., Mitson, M. J., Steensma, D. P., Fryer, A., et al. (2008). Mutations in the chromatin-associated protein ATRX. *Human mutation*, 29(6), 796-802. doi:10.1002/humu.20734
- Hammerschmidt, M., Pelegri, F., Mullins, M. C., Kane, D. A., van Eeden, F. J., Granato, M., Brand, M., Furutani-Seiki, M., Haffter, P., Heisenberg, C-P, Jiang, Y-J, Kelsh, R. N., Odenthal, J., Warga, R. M., Nüsslein-Volhard, C. (1996). *dino* and *mercedes*, two genes regulating dorsal development in the zebrafish embryo. *Development* 123, 95-102.
- Havey, S. A., Tümpel, S., Dubrulle, J., Schier, A. F., Smith, J. C. (2010). *no tail* integrates two modes of mesoderm induction. *Development* 137, 1127-1135 doi:10.1242/dev.046318
- Heaphy, C. M., de Wilde, R. F., Jiao, Y., Klein, A. P., Edil, B. H., Shi, C., Bettegowda, C., et al. (2011). Altered telomeres in tumors with ATRX and DAXX mutations. *Science (New York, N.Y.)*, 333(6041), 425. doi:10.1126/science.1207313
- Huang, P., Zhu, Z., Lin, S., Zhang, B. (2012). Reverse Genetic Approaches in Zebrafish. *J Genet Genomics*. Sep 20;39(9):421-33. doi: 10.1016/j.jgg.2012.07.004
- Hwang, W. Y., Fu, Y., Reyon, D., Maeder, M. L., Tsai, S. Q., Sander, J. D., Peterson, R. T., Yeh, J-R. J., & Joung, K., (2013). Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol*. Mar;31(3):227-9. doi: 10.1038/nbt.2501

- Iwase, S., Xiang, B., Ghosh, S., Ren, T., Lewis, P. W., Cochrane, J. C., Allis, C. D., et al. (2011). ATRX ADD domain links an atypical histone methylation recognition mechanism to human mental-retardation syndrome. *Nature structural & molecular biology*, 18(7), 769-776. Nature Publishing Group. doi:10.1038/nsmb.2062
- Jao, L., Wente, S. R., Chen, W. (2013). Efficient multiplex biallelic zebrafish genome editing using a CRISPR nuclease system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(34):13904-9. doi: 10.1073/pnas.1308335110.
- Kernohan, K. D., Jiang, Y., Tremblay, D. C., Bonvissuto, A. C., Eubanks, J. H., Mann, M. R. W., & Bérubé, N. G. (2010). ATRX partners with cohesin and MeCP2 and contributes to developmental silencing of imprinted genes in the brain. *Developmental cell*, 18(2), 191-202. doi:10.1016/j.devcel.2009.12.017
- Kelly, G.M., Greenstein, P., Erezilmaz, D. F. and Moon, R. T. (1995). Zebrafish wnt8 and wnt8b share a common activity but are involved in distinct developmental pathways. *Development (Cambridge, England)*, 121(6), pp.1787–99.
- Kibbe, W. A. (2007). OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic acids research*, 35(Web Server issue), W43-6. doi:10.1093/nar/gkm234
- Kimelman, D. (2006). Mesoderm induction: from caps to chips. *Nature reviews. Genetics*, 7(5):360-72. doi:10.1038/nrg1837.
- Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B., & Schilling, T. F. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, 203(3), 253-310. doi:10.1002/aja.1002030302
- Kleinjan, D. A., Bancewicz, R. M., Gautier, P., Dahm, R., Schonthaler, H. B., Damante, G., Seawright, A., Hever, A. M., Yeyati, P. L., van Heyningen, V., Coutinho, P. (2008). Subfunctionalization of Duplicated Zebrafish pax6 Genes by cis-Regulatory Divergence. *Plos Genetics*, 4(2):e29. doi: 10.1371/journal.pgen.0040029.
- Kumari, P., Gilligan, P. C., Lim, S., Tran, L. D., Winkler, S., Philp, R. and Sampath, K. (2013). An essential role for maternal control of Nodal signaling. *eLife*, vol. 2, e00683.
- Langdon, Y. G. & Mullins, M. C. (2011). Maternal and Zygotic Control of Zebrafish Dorsoventral Axial Patterning. *Annu. Rev. Genet.* 45:357–77. doi: 10.1146/annurev-genet-110410-132517
- Law, M. J., Lower, K. M., Voon, H. P. J., Hughes, J. R., Garrick, D., Viprakasit, V., Mitson, M., et al. (2010). ATR-X syndrome protein targets tandem repeats and influences allele-specific expression in a size-dependent manner. *Cell*, 143(3), 367-78. Elsevier Ltd. doi:10.1016/j.cell.2010.09.023
- Lekven, A. C., Thorpe, C. J., Waxman, J. S. and Moon R. T. (2001). Zebrafish wnt8 encodes two wnt8 proteins on a bicistronic transcript and is required for mesoderm and neurectoderm patterning. *Developmental cell*, 1(1), pp.103–14.
- Lewis, P. W., Elsaesser, S. J., Noh, K. M., Stadler, S. C., & Allis, C. D. (2010). Daxx is an H3. 3-specific histone chaperone and cooperates with ATRX in replication-independent chromatin assembly at telomeres. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(32), 14075. National Acad Sciences. doi:10.1073/pnas.1008850107



- Liu, Q.Y., Wu, Z. L., Lv, W. J., Yan, Y. C. and Li, Y. P. (2007). Developmental expression of cyclin H and Cdk7 in zebrafish: the essential role of cyclin H during early embryo development. *Cell research*, 17(2), pp.163–73.
- Mansfield, R. E., Musselman, C. A., Kwan, A. H., Oliver, S. S., Garske, A. L., Davrazou, F., Denu, J. M., et al. (2011). Plant homeodomain (PHD) fingers of CHD4 are histone H3-binding modules with preference for unmodified H3K4 and methylated H3K9. *The Journal of biological chemistry*, 286(13), 11779-91. doi:10.1074/jbc.M110.208207
- Medina, C. F., Mazerolle, C., Wang, Y., Bérubé, N. G., Coupland, S., Gibbons, R. J., Wallace, V. A., et al. (2009). Altered visual function and interneuron survival in Atrx knockout mice: inference for the human syndrome. *Human molecular genetics*, 18(5), 966-77. doi:10.1093/hmg/ddn424.
- Miller-Bertoglio, V. E., Fisher, S., Sánchez, A., Mullins, M. C., Halpern, M. E., (1997) Differential Regulation of *chordin* Expression Domains in Mutant Zebrafish. *DEVELOPMENTAL BIOLOGY* 192, 537–550.
- Mullins, Mary C. & Langdon Yvette G. (2011). Maternal and Zygotic Control of Zebrafish Dorsoventral Axial Patterning. *Annu. Rev. Genet*, 45:357–77. doi:10.1146/annurev-genet-110410-132517.
- Ober, E.A. & Schulte-Merker, S. (1999). Signals from the yolk cell induce mesoderm, neuroectoderm, the trunk organizer, and the notochord in zebrafish, *Dev. Biol.* 215(2):167-181
- Oleykowski, C. A., Bronson Mullins, C. R., Godwin, A. K., Yeung, A. T. (1998). Mutation detection using a novel plant endonuclease. *Nucleic Acids Research*, 26(20): 4597–4602.
- Pazin, M. J., & Kadonaga, J. T. (1997). SWI2/SNF2 and related proteins: ATP-driven motors that disrupt protein-DNA interactions? *Cell*, 88(6), 737-40.
- Pei, W. & Feldman, B. (2009). Identification of common and unique modifiers of zebrafish midline bifurcation and cyclopia. *Developmental biology*, 326(1), 201–11.
- Pennisi, Elizabeth. (2013). NewsFocus: The CRISPR Craze. *Science* (341) 833-836.
- Pogoda, H., Solnica-Krezel, L., Driever, W., Meyer, Dirk. (2000). The zebrafish forkhead transcription factor FoxH1/Fast1 is a modulator of Nodal signaling required for organizer formation. *Current Biology*, 10:1041-1049.
- Ririe, K. M., Rasmussen, R. P., Wittwer, C. T. (1997). Product Differentiation by Analysis of DNA Melting Curves during the Polymerase Chain Reaction. *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY* 245, 154–160.
- Ritchie, K., Seah, C., Moulin, J., Isaac, C., Dick, F., & Bérubé, N. G. (2008). Loss of ATRX leads to chromosome cohesion and congression defects. *The Journal of cell biology*, 180(2), pp. 315-24. doi:10.1083/jcb.200706083
- Ro, H. & Dawid, I.B. (2009). Organizer restriction through modulation of Bozozok stability by the E3 ubiquitin ligase Lnx-like. *Nature cell biology*, 11(9), pp.1121–7.
- Rozen, Steve and Skaletsky, Helen J. (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386.

- Sambrook, J., Russel, D. W. (2001). *Molecular Cloning: A laboratory Manual*. United States of America. 3rd edition. *Cold Spring Harbor Press*.
- Sander, J.D., Zaback, P.Z., Joung, J.K., Voytas, D.F., Dobbs, D. (2007) Zinc Finger Targeter (ZiFiT): an engineered zinc finger/target site design tool. *Nucleic Acids Research*, 35, W599-605.
- Sander, J.D., Maeder, M.L., Reyon, D., Voytas, D.F., Joung, J.K., Dobbs, D. (2010) ZiFiT (Zinc Finger Targeter): an updated zinc finger engineering tool. *Nucleic Acids Research*, 38:W462-468.
- Schier, A. F. (2001). Axis formation and patterning in zebrafish. *Current opinion in genetics & development*, 11(4), 393-404.
- Schier, A. F., & Talbot W. S. (2005) Molecular Genetics of AxisFormation in Zebrafish. *Annu. Rev. Genet.* 39:561–613. doi: 10.1146/annurev.genet.37.110801.143752.
- Schulte-Merker, S., Ho, R. K. , Hermann, B. G., Nüsslein-Volhard, C. (1992). The protein product of the zebrafish homologue of the mouse T gene is expressed in nuclei of the germ ring and the notochord of the early embryo. *Development*, 116(4): 1021-1032.
- Skromne, I., & Prince, V. E. (2008). Current perspectives in zebrafish reverse genetics: moving forward. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, 237(4), 861-82. doi:10.1002/dvdy.21484
- Slagle, C. E., Aoki, T. & Burdine, R. D. (2011). Nodal-dependent mesendoderm specification requires the combinatorial activities of FoxH1 and Eomesodermin. *PLoS genetics* 7, e1002072.
- Stemple, D. L., Solnica-Krezel, L., Zwartkruis, F., Neuhauss, S. C. F., Schier, A. F., Malicki, J., Stainier, D. Y. R., Abdelilah, S., Rangini, Z., Mountcastle-Shah, E., Driever, W. (1996). Mutations affecting development of the notochord in zebrafish. *Development* 123, 117-128.
- Tang, J., Wu, S., Liu, H., Stratt, R., Barak, O. G., Shiekhhattar, R., Picketts, D. J., et al. (2004). A novel transcription regulatory complex containing death domain-associated protein and the ATR-X syndrome protein. *The Journal of biological chemistry*, 279(19), 20369-77. doi:10.1074/jbc.M401321200
- Thisse, B., Thisse C., Lu F-I. (2011). Identification and mechanism of regulation of the zebrafish dorsal determinant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(38): 15876–15880.
- Thorpe, C. J., Weidinger, G., Moon, R. T. (2005). Wnt/ $\beta$ -catenin regulation of the Sp1-related transcription factor sp5l promotes tail development in zebrafish. *Development* 132, 1763-1772. doi:10.1242/dev.01733
- Weber, S., Taylor, J. C., Winyard, P., Baker, K. F., Sullivan-Brown, J., Schild, R., Knüppel, T., Zurowska, A. M., Caldas-Alfonso, A., Litwin, M., Emre, S., Ghiggeri, G. M., Bakkaloglu, A., Mehls, O., Antignac, C., Schaefer, F., Burdine, R. D. (2008). *SIX2* and *BMP4* Mutations Associate With Anomalous Kidney Development. *J Am Soc Nephrol* 19: 891–903. doi: 10.1681/ASN.2006111282
- Weidinger, G., Thorpe, C. J., Wuennenberg-Stapleton, K., Ngai, J. and Moon, R. T. (2005). The Sp1-related transcription factors sp5 and sp5-like act downstream of Wnt/beta-catenin signaling in mesoderm and neuroectoderm patterning. *Current biology : CB*, 15(6), pp.489–500.
- Wiedenheft, B., Sternberg, S.H. & Doudna, J.A. (2012). RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. *Nature* 482, 331–338.

- Wong, L. H., McGhie, J. D., Sim, M., Anderson, M. a, Ahn, S., Hannan, R. D., George, A. J., et al. (2010). ATRX interacts with H3.3 in maintaining telomere structural integrity in pluripotent embryonic stem cells. *Genome research*, *20*(3), 351-60. doi:10.1101/gr.101477.109
- Woods, I. G., Kelly, P. D., Chu, F., Ngo-Hazelett, P., Yan, Y. L., Huang, H., Postlethwait, J. H., et al. (2000). A comparative map of the zebrafish genome. *Genome research*, *10*(12), 1903-1914. Cold Spring Harbor Lab. doi:10.1101/gr.164600
- Xu, M., & Zhu, B. (2010). Nucleosome assembly and epigenetic inheritance. *Protein & cell*, *1*(9), 820-9. doi:10.1007/s13238-010-0104-0
- Xue, Y., Gibbons, R., Yan, Z., Yang, D., McDowell, T. L., Sechi, S., Qin, J., et al. (2003). The ATRX syndrome protein forms a chromatin-remodeling complex with Daxx and localizes in promyelocytic leukemia nuclear bodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(19), 10635-40. doi:10.1073/pnas.1937626100
- Zhang, J., Talbot, W. S. & Schier, A. F. (1998). Positional cloning identifies zebrafish one-eyed pinhead as a permissive EGF-related ligand required during gastrulation. *Cell* **92**, 241–51.
- Zhang, M., Zhang, J., Lin, S., Meng, A. (2012).  $\beta$ -Catenin 1 and  $\beta$ -catenin 2 play similar and distinct roles in left-right asymmetric development of zebrafish embryos. *Development* *139*, 2009-2019. doi:10.1242/dev.074435